



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**TUZLANMIŞ KÜÇÜKBAŞ HAYVAN DERİLERİNDEN
İZOLE EDİLEN ILIMLI HALOFİL BAKTERİLERİN
PROTEOLİTİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

NESLİHAN ÖZTÜRK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı
Biyoloji Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Meral BİRBİR

EŞ-DANIŞMAN

Prof. Dr. Ayşe OGAN

İSTANBUL, 2019



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**TUZLANMIŞ KÜÇÜKBAŞ HAYVAN DERİLERİNDEN
İZOLE EDİLEN ILIMLI HALOFİL BAKTERİLERİN
PROTEOLİTİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

NESLİHAN ÖZTÜRK

(520115004)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Biyoloji Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Meral BİRBİR

EŞ-DANIŞMAN

Prof. Dr. Ayşe OGAN

İSTANBUL, 2019

MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Öğrencisi Neslihan ÖZTÜRK'ün "Tuzlanmış Küçükbaş Hayvan Derilerinden İzole Edilen İhlmlı Halofil Bakterilerin Proteolitik Aktivitelerinin Araştırılması" başlıklı tez çalışması, 25.02.2019 tarihinde savunulmuş ve jüri üyeleri tarafından başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

Prof.Dr. Meral BİRBİR (Danışman)
Marmara Üniversitesi(İMZA).....

Prof.Dr. Ümran SOYOĞUL GÜRER (Üye)
Marmara Üniversitesi(İMZA).....

Prof.Dr. Esra SUNGUR (Üye)
İstanbul Üniversitesi(İMZA).....

ONAY

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 06.03.2019 tarih ve 2019/05-02 sayılı kararı ile Neslihan ÖZTÜRK'ün Biyoloji Anabilim Dalı, Biyoloji Programında Yüksek Lisans derecesi alması onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Bülent EKİCİ



TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans'a başladığım ilk günden itibaren fikirleriyle beni yönlendiren, tezimin planlanması, gerçekleşmesi ve sonuçlanmasında emeğini ve yardımını hiçbir zaman esirgemeyen, çalışmalarım sırasında bilgisi ve tecrübelerinden yararlandığım, tüm bu süreç sırasında bana gösterdiği sevgi dolu yaklaşımı, fedakârlığı ve sabrından dolayı Kıymetli Danışman Hocam Prof. Dr. Meral BİRBİR'e,

Tez çalışmalarım süresince bilgisiyle ve tecrübesiyle her zaman yardımcı olan, ilgi dolu ve hoşgörülü bir üslupla desteğini gösteren Değerli Danışman Hocam Prof. Dr. Ayşe OGAN'a,

Bu aşamaya gelmemde üzerimde hakkı ve emeği bulunan Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi ve Marmara Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi'ndeki Saygıdeğer Hocalarıma, Yüksek Lisans eğitimimizdeki değerli katkılarından ötürü Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'ndeki Hocalarıma ve Enstitü Personeline,

Deneylerim süresince laboratuvarıda bana eşlik edip bilgisini paylaşan, her konuda yardımcı olup uzun çalışma saatlerimde beni yalnız bırakmayan, çalışkanlığı, fedakârlığı ve sevecenliğiyle hatırlayacağım Kıymetli Hocam Araştırma Görevlisi Dr. Pınar ÇAĞLAYAN'a,

Laboratuvar aşamasındaki yardımlarından ötürü Doç. Dr. Serap GÜRBÜZ DEMİR'e, Yüksek Lisans eğitimim boyunca tüm güçlüklerle birlikte göğüs gerdiğim, deneylerim süresince benimle birlikte laboratuvarıda çalışarak emeğini paylaşan, her daim neşesiyle ve içtenliğiyle yanbaşımında olan Sevgili Ekip Arkadaşım Burçin GÜÇLÜ'ye,

Tüm hayatım boyunca her alanda benden esirgemedikleri maddi ve manevi destekleriyle beni bugünlere getiren Değerli Aileme teşekkür ederim.

Şubat, 2019

Neslihan ÖZTÜRK

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
SEMBOLLER	vi
KISALTMALAR	vii
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
1. GİRİŞ	
1.1. Giriş ve Amaç.....	1
1.2. Proteaz Enziminin Özellikleri.....	2
1.3. Proteaz Enziminin Elde Edildiği Kaynaklar ve Kullanım Alanları.....	6
1.4. Dericilik, Derinin Yapısı ve Dericilikte Deri İşleme Basamakları.....	9
1.5. Proteaz Enziminin Deri Sektöründeki Önemi.....	15
1.6. Ilımlı Halofil Mikroorganizmalar ile İlgili Bilgiler.....	19
1.6.1. <i>Marinacoccus</i> Cinsi.....	22
1.6.2. <i>Staphylococcus</i> Cinsi.....	23
1.6.3. <i>Chromohalobacter</i> Cinsi.....	24
1.6.4. <i>Halomonas</i> Cinsi.....	26
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	29
2.1.Kullanılan Besiyeri, Çözelti, Kimyasallar.....	29
2.1.1. Kullanılan Besiyerleri.....	29
2.1.1.1. % 10 Tuz İçeren Kompleks Sıvı Besiyeri.....	29
2.1.1.2. % 10 Tuz İçeren Kompleks Agar.....	29
2.1.1.3. % 5 Tuz İçeren Kompleks Sıvı Besiyeri.....	29

2.1.1.4. % 5 Tuz İçeren Jelatin Agar.....	30
2.1.1.5. % 10 Tuz İçeren Jelatin Agar.....	30
2.1.1.6. % 5 Tuz İçeren Jelatinli Sıvı Besiyeri.....	30
2.1.2. Kullanılan Çözelti ve Kimyasallar.....	31
2.1.2.1. % 30 Tuz İçeren Tuzlu Su Çözeltisi (TS30).....	31
2.1.2.2. % 10 Tuz İçeren Tuzlu Su Çözeltisi (TS10).....	31
2.1.2.3. 1.8 N NaOH Çözeltisi.....	31
2.1.2.4. % 10 Triklorasetik Asit Çözeltisi (TCA).....	31
2.1.2.5. 100 mM TrisHCl Tampon Çözeltisi.....	32
2.1.2.6. % 1 Azokazein Çözeltisi.....	32
2.1.2.7. % 5 NaCl İçeren Tuz Çözeltisi.....	32
2.1.2.8. Frazier Ayırıcı.....	32
2.1.2.9. %95 Etil Alkol Çözeltisi.....	32
2.1.2.10. İyot Çözeltisi.....	33
2.1.2.11. Safranin Çözeltisi.....	33
2.1.2.12. % 0,25 Kristal Viyole Çözeltisi.....	33
2.2. Çalışmada Kullanılan İlımlı Halofil Mikroorganizmalar.....	33
2.3. Kullanılan Laboratuvar Ekipmanları.....	34
2.4. Yapılan Çalışmalar.....	34
2.4.1. İlımlı halofil izolatların sıvı besiyerinde üretilmesi.....	34
2.4.2. İlımlı halofil izolatların saf kültür olup olmadıklarının incelenmesi.....	35
2.4.3. İlımlı halofil izolatlar tarafından üretilen proteaz enzimlerinin aktivitelerinin farklı tuz konsantrasyonlarında, farklı pH ve farklı sıcaklık değerlerinde agarlı besiyerinde araştırılması.....	35
2.4.4. Optimum koşullarda sıvı besiyerinde üretilen bakteri izolatlarının proteaz enzimi üretimlerinin spektrofotometrik yöntemle saptanması.....	36
2.4.5. Bradford metodu ile protein miktarının belirlenmesi.....	37
3. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	39
4. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	61
5. KAYNAKLAR.....	63
ÖZGEÇMİŞ.....	81

ÖZET

TUZLANMIŞ KÜÇÜKBAŞ HAYVAN DERİLERİNDEN İZOLE EDİLEN ILIMLI HALOFİL BAKTERİLERİN PROTEOLİTİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Çalışmamızda ılımlı halofil *Marinococcus tarijensis*, *Staphylococcus equorum*, *Chromohalobacter canadensis*, *Halomonas eurihalina* test mikroorganizmaları olarak kullanılmıştır. Bu mikroorganizmaların proteolitik aktiviteleri % 2 jelatin içeren agar besiyerinde farklı sıcaklıklarda (24°C, 30°C, 37°C), farklı pH değerlerinde (7, 8, 9) ve farklı tuz konsantrasyonlarında (% 5, % 10) incelenmiştir. Bu mikroorganizmalarının proteolitik aktiviteleri koloniler etrafında oluşan şeffaf zonlara göre tayin edilmiştir. İlimli halofil test bakterilerinin % 5 tuz konsantrasyonunda, tüm pH değerlerinde (7, 8, 9) ve 37°C’de 120 saatlik inkübasyon periyodunun sonunda oluşturdukları şeffaf zon çaplarının büyüklükleri 4 cm ile 6 cm arasında ölçülmüştür. En büyük şeffaf zon çapı hem *Staphylococcus equorum* hem de *Marinococcus tarijensis*’te saptanırken, en küçük şeffaf zon çapı *Halomonas eurihalina*’da % 5 tuz konsantrasyonunda 120 saatlik inkübasyon periyodunda belirlenmiştir. Ayrıca ılımlı halofil bakterilerin proteaz aktiviteleri spektrofotometrik yöntem kullanılarak % 2 jelatin ve % 5 tuz içeren sıvı besiyerinde pH 7, pH 8 ve pH 9’da 6, 12, 24, 48, 72, 96 saatlik inkübasyon periyotlarında incelenmiştir. *Chromohalobacter canadensis*, *Staphylococcus equorum*, *Halomonas eurihalina* ve *Marinococcus tarijensis*’in en yüksek proteaz aktiviteleri sırasıyla 250.2 U/ml, 246.2 U/ml, 227.4 U/ml, 200.2 U/ml olarak ölçülmüştür. Sonuç olarak, ılımlı halofil bakteriler tarafından üretilen proteaz enzimlerinin, deri üretiminde kullanılma potansiyeli olabilir.

Şubat, 2019

Neslihan ÖZTÜRK

ABSTRACT

EXAMINATION OF THE PROTEOLYTIC ACTIVITIES OF MODERATELY HALOPHILIC BACTERIA ISOLATED FROM SALTED SHEEP SKINS

Moderately halophilic *Marinococcus tarijensis*, *Staphylococcus equorum*, *Chromohalobacter canadensis*, *Halomonas eurihalina* were used as test microorganisms in this study. Proteolytic activities of these microorganisms were examined on agar medium containing 2 % gelatin at different temperatures (24°C, 30°C, 37°C), different pH values (7, 8, 9) and different salt concentrations (5 %, 10 %). Proteolytic activities of the these microorganisms were determined according to clear zones around the colonies. The diameters of clear zones of moderately halophilic test bacteria were measured in the range of 4 cm to 6 cm at 120 hours of incubation period, 37°C and 5 % salt concentration with pH 7, pH 8, pH 9. While the largest clear zone diameters were observed for both *Marinococcus tarijensis* and *Staphylococcus equorum*, the smallest clear zone diameter was detected at *Halomonas eurihalina* on the agar medium containing 5 % salt, after 120 hours of incubation period. In addition, protease activities of the moderately halophilic bacteria were determined spectrophotometrically in liquid medium containing 2 % gelatin and 5 % salt with pH 7, pH 8, pH 9 at 37°C for 6, 12, 24, 48, 72, 96 hours of incubation period. The highest protease activities of *Chromohalobacter canadensis*, *Staphylococcus equorum*, *Halomonas eurihalina* and *Marinococcus tarijensis* were measured as 250.2 U/mL, 246.2 U/mL, 227.4 U/mL, 200.2 U/mL, respectively. As a conclusion, the protease enzymes produced by moderately halophilic microorganisms may have potential usage in leather production.

February, 2019

Neslihan ÖZTÜRK

SEMBOLLER

μl	:	Mikrolitre
$^{\circ}$C	:	Santigrat derece
%	:	Yüzde
ml	:	Mililitre
μg	:	Mikrogram
cm	:	Santimetre
M	:	Molar
N	:	Normal
pH	:	Bir çözeltinin asitlik veya bazlık derecesini ifade eden ölçü birimi
g	:	Gram

KISALTMALAR

kob	:	Koloni oluşturma birimi
rpm	:	Dakikadaki d6n6m hızı
HgCl	:	Civa klor6r
NaCl	:	Sodyum klor6r
MgCl₂.6H₂O	:	Magnezyum klor6r hegzahidrat
TCA	:	Triklorasetik Asit 6zeltisi
NaOH	:	Sodyum hidroksit
TS	:	Tuzlu Su
MgSO₄.7H₂O	:	Magnezyum klor6r heptahidrat
CaCl₂	:	Kalsiyum klor6r
KCl	:	Potasyum klor6r
NaHCO₃	:	Sodyum bikarbonat
NaBr	:	Sodyum brom6r
Na₂S	:	Sodyum s6lfit
NaH	:	Sodyum hidr6r
S	:	K6k6rt
Ca(OH)₂	:	Kalsiyum hidroksit
(NH₄)₂SO₄	:	Amonyum tuzları
H₂SO₄	:	S6lfirik asit
CH₂O₂	:	Formik asit
C₃H₆O₃	:	Laktik asit
C₂H₄O₃	:	Glikolik asit
Cr(SO₄)₃	:	Krom (III) s6lfat
PHA	:	polihidroksialkanoat
EPS	:	ekzopolisakkarit
G	:	Guanin
C	:	Sitozin

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1. Derinin Yapısı.....	10
Şekil 1.2. Epidermis Tabakaları.....	11
Şekil 2.1. Ovalbümin (BSA) ile hazırlanan standart grafik.....	38
Şekil 3.1. İzolatların % 5 tuz içeren, pH'ı 7 olan sıvı jelatin besiyerinde, 37°C' de 96 saatlik inkübasyon süresince proteaz aktiviteleri (U/ml).....	51
Şekil 3.2. İzolatların % 5 tuz içeren, pH'ı 8 olan sıvı jelatin besiyerinde, 37°C' de 96 saatlik inkübasyon süresince proteaz aktiviteleri (U/ml).....	52
Şekil 3.3. İzolatların % 5 tuz içeren, pH'ı 9 olan sıvı jelatin besiyerinde, 37°C' de 96 saatlik inkübasyon süresince proteaz aktiviteleri (U/ml).....	53
Şekil 3.4. İzolatların % 5 tuz içeren, pH'ı 7 olan sıvı jelatin besiyerinde, 37°C' de 72 saatlik inkübasyon süresince protein miktarları (µg/ml).....	57
Şekil 3.5. İzolatların % 5 tuz içeren, pH'ı 8 olan sıvı jelatin besiyerinde, 37°C' de 72 saatlik inkübasyon süresince protein miktarları (µg/ml).....	58
Şekil 3.6. İzolatların % 5 tuz içeren, pH'ı 9 olan sıvı jelatin besiyerinde, 37°C' de 96 saatlik inkübasyon süresince protein miktarları (µg/ml).....	59

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Çalışmamızda kullanılan ılımlı halofil mikroorganizmaların izolat kodu, 16S rRNA dizisi uzunluğu, benzerliği ve filogenetik olarak benzediği tür.....	34
Tablo 2.2. Proteaz enziminin spektrofotometrik ölçümü için hazırlanan çözeltilerin içeriği.....	37
Tablo 2.3. Bradford metodu standardı için hazırlanan çözeltilerin içeriği.....	38
Tablo 3.1. İzolatların % 5 tuz içeren jelatin agar besiyerinde, 24°C’de farklı inkübasyon sürelerinde zon çapları.....	40
Tablo 3.2. İzolatların % 10 tuz içeren jelatin agar besiyerinde, 24°C’de farklı inkübasyon sürelerinde zon çapları.....	42
Tablo 3.3. İzolatların % 5 tuz içeren jelatin agar besiyerinde, 30°C’de farklı inkübasyon sürelerinde zon çapları.....	44
Tablo 3.4. İzolatların % 10 tuz içeren jelatin agar besiyerinde, 30°C’de farklı inkübasyon sürelerinde zon çapları.....	46
Tablo 3.5. İzolatların % 5 tuz içeren jelatin agar besiyerinde, 37°C’de farklı inkübasyon sürelerinde zon çapları.....	48
Tablo 3.6. İzolatların % 10 tuz içeren jelatin agar besiyerinde, 37°C’de farklı inkübasyon sürelerinde zon çapları.....	50
Tablo 3.7. İzolatların % 5 tuz içeren sıvı jelatin besiyerinde, 37°C’de farklı inkübasyon sürelerinde proteaz aktiviteleri (U/ml).....	54
Tablo 3.8. İzolatların % 5 tuz içeren sıvı jelatin besiyerinde, 37°C’de farklı inkübasyon sürelerinde protein miktarları (µg/ml).....	60

1. GİRİŞ

1.1.Giriş ve Amaç

Deri endüstrisinde daha düzgün, pürüzsüz ve parlak yüzey görünümüne sahip kaliteli deri elde etmek amacıyla derilerin ıslatılması, deri kıllarının dökülmesi, derideki kirecin ve yağların giderilmesinde, sama işleminde ve atık işleme aşamalarında proteaz enzimleri yaygın olarak kullanılmaktadır (Toptaş, 2004; Choudhary ve ark., 2004; Birbir ve ark, 2016). Deri işleme basamaklarından kireç gidermede ve banyolama basamaklarında derideki dekorin proteinlerini uzaklaştırmak için kullanılan alkali proteazlar derileri yumuşak ve esnek hale getirmekte ve derinin fiziksel özelliklerini bozmamaktadır (Mozersky ve ark, 2002; Birbir ve ark, 2016). Kireç giderme sonrası sama işleminde pH 8 - 9'da aktif olan hayvansal, bitkisel ve mikrobiyal proteolitik enzimler kullanılarak derilerdeki kollajen ve elastin fibrillerinin hareketliliği sağlanır, deri üzerinde kalan kıllar ve fibril yapıda olmayan proteinler uzaklaştırılmaktadır. Kullanılan proteaz enzimleri sayesinde derinin sırça yüzeyi pürüzsüz bir hale gelmektedir (Rao, 1998; Toptaş, 2004; Aslan, 2009). Deri endüstrisinde kullanılmak üzere mikrobiyal proteazları içeren pek çok ticari ürün bulunmaktadır. Deri ıslatma ve kıl giderme basamaklarında pankreatik tripsin, bakteriyel lipazlar ve proteazlar, deri kireçleme aşaması için mikrobiyal lipaz ve proteaz karışımları endüstriyel olarak üretilmektedir (Toptaş, 1998). Deri işleminde proteaz enzimlerinin kimyasalların (sodyum sülfid gibi) yerine kullanılmasıyla çevreye verilen zarara da engel olunmaktadır (Choudhary, 2004). Daha önceki yapılan çalışmalarda deri endüstrisinde kullanılan tuzlarda ve tuzlanmış derilerde, deri endüstrisinde kullanılma potansiyeli olan proteaz üreten halofil bakterilerin ve arkelerin olduğu sonucu elde edilmiştir (Birbir ve ark., 2004; Birbir ve ark., 2007; Berber ve Birbir, 2010; Bailey ve Birbir, 1993; Birbir, 1997; Birbir ve ark, 2008). Deri endüstrisinde kullanılan tuzlardan ve tuzlanmış derilerden izole edilen proteaz üreten halofil izolatlar, deri endüstrisi açısından oldukça önemli endüstriyel mikroorganizmalar olabilir. Derinin farklı işlemleri safhalarında değişik pH'larda, değişik tuz konsantrasyonlarında ve farklı sıcaklıklarda aktivite gösterecek bakteriyel proteazlara oldukça ihtiyaç bulunmaktadır. Farklı pH, farklı tuz ve farklı sıcaklıklarda üreme potansiyeline sahip, derilerden izole edilen ılımlı halofil bakterilerin ürettikleri proteaz enzimlerinin deri endüstrisinde kullanım potansiyeli olacağını düşünmekteyiz. Bu nedenle bu çalışmanın amacı, özellikle derinin farklı işlemleri basamaklarında kullanılacak proteazların, tuzlanmış küçükbaş hayvan derilerinden

izole edilerek moleküler ve klasik yöntemlerle tanımlanmış ılımlı halofil bakteri izolatları tarafından üretilip üretilmediklerini incelemektir. Çalışmamızda özellikle bazik ve asidik ortamlarda çalışacak proteaz üreticilerinin saptanması ile bu mikroorganizmaların deri endüstrisindeki farklı deri işleme basamaklarında kullanılabilirliği belirlenmiştir. Bu Yüksek Lisans tezinden elde edilen sonuçların, hem deri endüstrisi açısından hem de endüstriyel önemi olan proteaz üreten ılımlı halofil bakteriler hakkında da önemli bir bilgi kaynağı oluşturacağını düşünmekteyiz.

1.2. Proteaz Enziminin Özellikleri

Enzimler biyokimyasal tepkimelerde yüksek önem taşıyan, aktivasyon enerjisini düşürmeleri dolayısıyla reaksiyonları hızlandıran; protein yapısına, katalitik ve anabolik aktivitelere sahip biyolojik katalizörlerdir (Koolman ve Röhm, 2002). Enzimler, yapılarında bulunan aktif bölgeleri ile reaksiyona gireceği substrata geçici bir süre bağlanmaktadır. Bu aktif merkez ile substrat arasında anahtar ile kilit benzeri bir ilişki vardır. Substrat ile enzim uygun bir şekilde bağlandıktan sonra, substrat enzim tarafından ürün veya ürünlere dönüştürülmektedir (Pant ve ark., 2015).

Enzimler altı temel sınıfa ayrılarak sınıflandırılmıştır. Bunlar; hidrolazlar, transferazlar, liyazlar, izomerazlar, ligazlar ve oksiredüktazlardır. Bu enzim sınıfları, enzimlerin katalizledikleri tepkimelerin türüne ve substratlarına göre belirlenmiştir (Koolman ve Röhm, 2002).

Hidrolaz enzim grubu peptid bağları, P-N bağları, ester bağları, glikozit bağları, anhidrit bağları, asitanhidrit bağları, C-O bağları, C-N bağları ve C-C bağlarını su varlığında katalize etmektedir. Hidrolaz sınıfına ait enzimler proteazlar, esterazlar, lipazlar, amilazlar, fosfatazlar ve karbohidrazlardır. Hidroliz tepkimeleri, canlıların hücre bazındaki metabolizmalarında önemli bir yer tutmaktadır (Yenigün, 2000).

Proteaz enzimi, hidrolaz enzim sınıfı içerisinde bulunmaktadır. Proteinleri ve hatta kendilerini katalitik olarak parçalayan proteaz enzimleri, insan genomunun tahmini % 2'sini oluşturan en büyük tek enzim ailesidir (Schilling ve Overall, 2008; Marnett ve Craik, 2005). Canlılardaki proteaz enzimleri genellikle pankreas ve midede üretilmektedir

ve sindirim sisteminde çokça bulunmaktadır. Ayrıca canlı metabolizmasında gerçekleşen hidroliz reaksiyonları için gerekli proteaz enzimleri, canlı vücudunun farklı kısımlarında da üretilmektedir. Kanın pıhtılaşması sürecinde ve bağışıklık sisteminin aktifleşmesinde serin proteazlar, hücre hidrolizinde metallo proteazlar görev almaktadır. Birçok hormonun işlevleri proteaz enzimi ile düzenlenmektedir. Virüsler, canlılıklarını sürdürmede ve gelişmelerinde gerekli proteazları kodlamaktadırlar. Picorna virüsü serin proteazı, adenovirüs sistein proteaz ve retrovirüs aspartil proteazı kodlamaktadır (Fersht, 1998). Yapısal ve fonksiyonel çeşitlilik sayesinde proteazlar, hücre içi protein geri dönüşümünden besinlerin sindirimine ve bağışıklık sistemine kadar bir çok kritik işleve sahip olmaktadır (Li ve ark., 2013).

Proteazlar, proteinlerin hidrolizini katalizleme yetenekleri sebebiyle enzimler içerisinde önemli bir grubu oluşturmaktadır. Proteaz enzimi, besinlerle alınan proteinin polipeptit zincirlerindeki peptid bağlarını hidrolize ederek işlev görmektedir. Proteazlar, büyük polipeptit moleküllerini, küçük peptidler ile serbest aminoasitlere hidrolize etmektedir. Proteaz enzimleri, hidrolize ettikleri proteinlerin büyüklüklerine göre peptidaz (proteaz) ve polipeptidaz olarak ikiye ayrılmaktadır (Van Qua ve ark., 1981; Fersht, 1998). Proteazlar aktif merkezlerine göre iki büyük gruba ayrılmaktadır. Bunlar endopeptidazlar ve ekzopeptidazlardır. Ekzopeptidazlar (ekzoproteazlar) polipeptit zincirinin karboksil (-COOH) ve amino (-NH₂) uçlarındaki peptid bağlarını, endopeptidazlar (endoproteazlar) ise polipeptit zincirinin orta ve iç kısımlarındaki peptid bağlarını hidrolize etmektedir (Rao, 1998). Proteaz enzimleri, her bir üyesi için ortak ve tutarlı karakteristik özelliklere sahiptir ve ortak özelliklerinin yanı sıra bağlanabildikleri aminoasit çeşidine ve katalitik mekanizmalarına göre altı alt gruba ayrılmaktadır. Bunlar endoproteazlar olarak bilinen Aspartil proteaz, Sistein proteaz, Metallo proteaz, Serin proteaz, Treonin proteaz ve Glutamik proteazdır (Lopez-Otin ve Bond, 2008). Proteaz enziminin pek çok farklı biçim ve fonksiyonunun olmasına rağmen, peptid bağının koparılmasının altında yatan tema tüm proteazlarda aynı olarak; peptid bağının (C=O) polarizasyonu ve aynı zamanda hidrolize yol açan karbonil karbonuna saldırmak için bir nükleofilik grubun aktivasyonudur (Li ve ark., 2013).

Endoproteazlar sporlanma ve farklılaşma, protein döngüsü, enzimlerin ve hormonların olgunlaşması ve hücre protein havuzunun onarımı ve korunması gibi çeşitli hücre ve metabolik süreçler için önemlidir (Kalisz, 1988).

Aspartil proteazlar, düşük pH değerlerinde aktivite gösterdikleri için asit endopeptidazlar olarak da bilinmektedir. Ortam pH'nın 3 ve 4 olduğunda maksimum aktiviteye sahip olmaktadır. Aspartil proteazlar; pepsin, retropepsin ve pararetrovirüs enzimleri olarak üç gruba ayrılmaktadır. Katepsin D ve rennin (kimosin) enzimleri de asit endopeptidazlardır. Mikrobiyal aspartil proteaz kaynakları iki kısma ayrılmaktadır. Pepsin benzeri aspartil proteazlar *Neurospora*, *Aspergillus*, *Rhizopus* ve *Penicillium* cinslerine ait türler tarafından üretilmektedir. Rennin benzeri aspartil proteazlar ise *Mucor* ve *Endothia* cinslerine ait mikroorganizmalar tarafından sentezlenmektedir (Fersht, 1998; Barrett, 1995; Rao, 1998).

Glutamik proteazlar, aktif haldeki bir su molekülünü nükleofil olarak kullanıp substratın peptid bağlarını koparmaktadır. Glutamik proteazlara memeli canlılarda rastlanmamıştır (Lopez-Otin ve Bond, 2008).

Treonin proteaz, substratın peptid bağına saldırırken aktif merkezinde bulunan treonin aminoasit kalıntısını nükleofil olarak kullanmaktadır (Lopez-Otin ve Bond, 2008).

Sistein proteazlar, başka bir isimlendirme ile tiyol proteazlar olarak da bilinmektedirler. Aktif merkezlerinde histidin, sistein ve aspartik asit aminoasitlerini bulunduran sistein proteazlar, hücre içi proteinlerin dönüşüm reaksiyonlarını katalize etmektedirler. Sistein proteazlar hem ökaryotlarda hem de prokaryotlarda görülür ve yan zincir özgüllüklerine dayanarak papain benzeri sistein proteazlar, tripsin benzeri sistein proteazlar, glutamik aside özgül olan sistein proteazlar ve diğerleri olmak üzere dört gruba ayrılmaktadır. En çok bilinen sistein proteazı papaindir, papaya meyvesinden elde edilmektedir. Papain enzimi, 212 aminoasidin oluşturduğu tek bir polipeptit zinciridir. İncir bitkisinden elde edilen fisin, kividenden elde edilen aktinidin ve ananastan elde edilen bromelain bitkisel kaynaklı diğer sistein proteazlardır. *Clostridium histolyticum*'un sentezlediği Clostripain ve *Streptococcus* cinsi bakterilerin ürettiği Streptopain bakteri kaynaklı sistein proteazlardır. Memeli canlıların lizozom organelleri içerisinde katepsin B1 ve B2 tiyol proteazları bulunmaktadır. Sistein proteazları genellikle nötral pH'ta optimum aktivite

gösterir ancak lizozomal sistein proteazları asidik pH'ta aktif olmaktadır (Rao, 1998; Barrett, 1994; Fersht, 1998, Stryer, 1981; Bugg, 1996).

Serin proteazlar, aktif merkezlerinde serin aminoasidi bulunduran, genellikle pH 7 ile 11 arasında optimum aktiviteye sahip enzimlerdir. Serin proteazlar virüsler, ökaryotlar ve bakteriler arasında çok yaygın olarak bulunduğu hayati önem taşıdığı öne sürülmektedir. Subtilisin enzimi, *Bacillus* türleri tarafından sentezlenen bir serin proteaz enzimidir. Subtilisin, *Escherichia* D-Ala-D-Ala peptidaz A, kimotripsin ve karboksipeptidaz C birbirinden tamamen ilgisiz temel yapılara sahip serin proteaz enzimleridir. Bu da serin proteazlar için en az dört ayrı evrimsel köken olduğunu göstermektedir (Bugg, 1996; Barrett, 1994; Fersht, 1977; Gorind ve ark., 1981; Brenner, 1988).

Metallo proteazlar, aktivite gösterebilmeleri için iki değerlikli bir katyona ihtiyaç duymaları ile tanımlanmaktadır. Bu katyon genellikle çinko metali olduğundan çinko proteinazlar olarak da karakterize edilmektedir. Metallo proteazlar etki ettikleri spesifik bölgelere göre dört gruba ayrılmaktadır. Bunlar; nötral, alkali, *Myxobacter* I ve *Myxobacter* II dir. Kollajenaz, elastaz ve termolizin birer nötral metallo proteazdır. Matriks metalloproteazlar ise dokuların farklılaşması ve yeniden oluşturulması sırasında hücre dışı matriksin bozunmasında görev alan enzimlerdir. Metallo proteazlar, EDTA gibi metal iyonlarının stabilize edilmesinde kullanılan kimyasal bileşikler tarafından inhibe edilmesiyle tanımlanmaktadır (Fersht, 1998; Browner ve ark., 1995; Weaver ve ark., 1977).

Ekzopeptidazlar (ekzoproteazlar) polipeptit zincirinin karboksil(-COOH) ve amino(-NH₂) uçlarındaki peptit bağlarını hidrolize etmektedir (Rao, 1998).

Aminopeptidazlar; bir aminoasidin, bir dipeptidin ya da bir tripeptidin protein veya peptit substratlarının amino (-NH₂) uçlu kısmından ayrılmasını katalizlemektedir. Aminoproteazlar hayvanlarda, bitkilerde, bakterilerde ve mantarlarda bulunmakla birlikte birçok hücre fonksiyonunu yerine getirmek için bazı organellerde, sitoplazmada ve membran bileşeni olarak bulunmaktadır (Taylor, 1993; Watson, 1976).

Karboksipeptidazlar; bir aminoasidin veya bir dipeptidin polipeptit zincirinin karboksi (-COOH) uçlu kısmından serbest bırakılmasını katalize etmektedir. Mantarlardan elde edilen birçok ticari proteaz enzimi, karboksi proteaz içermektedir. Sindirim sisteminde bulunan karboksi proteazlar tripsin, kimotripsin, elastaz gibi serin proteazlarla birlikte hareket etmektedir (Reed, 1993; Rao, 1998).

1.3. Proteaz Enziminin Elde Edildiği Kaynaklar ve Kullanım Alanları

Endüstriyel öneme sahip olan enzimler genellikle bakteriler ve mantarlardan elde edilmektedir (Madigan ve ark., 2012). Bunun sebebi ise mikroorganizmaların kolayca temin edilebilmeleri, ucuz besiyerlerinde hızlıca üreyebilmeleri, farklı kimyasal reaksiyonlarda kullanılabilirmeleri, yüksek ürün vermeleri, genetik manipulasyona yatkın olmaları ve düşük maliyetli olmalarıdır. Endüstriyel uygulamaların bazılarının gerçekleşmesi için yüksek ısı gerekmektedir ve bu reaksiyonlarda enzimlerin kullanılması ile büyük enerji tasarrufu sağlanarak endüstriyel işlemlerin maliyeti oldukça düşmektedir (Wiseman, 1995; Hasan ve ark., 2006; Birbir ve ark, 2016).

Enzimler insan ve hayvan gıdalarında, ilaçlarda, deri endüstrisinde, içeceklerde, kozmetik ürünlerinde, deterjanlarda, tekstil üretiminde, selüloz ve kağıt yapımında, biyo-yakıt endüstrisinde, ziraat alanında ve biyoteknolojik çalışmalarda yaygınca kullanım alanı bulmaktadır (Birbir ve ark, 2016). Genellikle yaygın olarak kullanılan endüstriyel enzimler proteazlar, amilazlar, lipazlar, invertazlar, glikoz oksidazlar, glikoz izomerazlar, pektinazlar, rennin, laktazlar, DNA polimerazlar, selülazlar ve nükleazlardır (Madigan ve ark., 2012; Binod ve ark., 2013). Bu enzimlerden özellikle proteazlar en fazla miktarda üretilen enzim grubudur (Madigan ve ark., 2012).

Mikrobiyal proteazlar, en önemli hidrolitik enzimler arasındadır ve Dünya çapında üretilen enzimlerin toplamının yaklaşık % 60'ını oluşturmaktadır. Proteolitik enzimlerin, canlı yapısındaki metabolik yollardaki rolünün yanısıra endüstriyel uygulamalarda da kullanışlı olduğunun farkedilmesi sonucu proteazlara olan ilgi ticari anlamda giderek artmaktadır. Mikrobiyal proteaz enzimleri 1914 yılında ilk kez deterjan katkı maddesi olarak piyasaya sürüldükten sonra çeşitli endüstrilerde geniş bir kullanım alanı bulmuştur (Gupta ve ark., 2002).

Proteaz enzimleri deterjan, yiyecek, ilaç, deri, ipek endüstrilerinde, bira yapımında, organik sentezlerde, atıkların muamelesinde, biyoremediasyon çalışmalarında ve X-ray filmlerde kullanılan gümüşü geri kazanmak için proteaz enzimi kullanılmaktadır (Banerjee ve ark., 1999; Godfrey ve West, 1996 ; Kumar ve Takagi, 1999; Gupta, Beg ve Lorenz, 2002; Van Qua ve ark., 1981). Ayrıca yiyecek endüstrisinde sütün pıhtılaştırılmasında, yeni doğan mamalarında ve aroma verici olarak, bisküvi ve kurabiye yapımında, kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde biyofilm önleyici olarak kullanılmaktadır (Kirk ve ark., 2002).

Uygun spesifiklikte, farklı pH ve farklı ısılarda aktif olabilen, metal iyonlarına ve surfaktanlara karşı dayanıklı enzimlere endüstrilerde gereksinim duyulduğundan, araştırmacılar sürekli olarak farklı organizmalardan yeni proteolitik enzimler üzerine yoğun olarak çalışmalar yapmaktadır. Proteaz enzimi bakteri, mantar ve maya gibi çeşitli mikroorganizmalardan ve ayrıca memeli dokularından üretilmektedir (Haddar ve ark., 2009). En çok üretilen ticari alkalın proteazlar *Bacillus* cinslerine ait türlerden izole edilmektedirler (Sloma ve ark., 1991; Ferrero ve ark., 1996; Kumar, 2002; Guangrong ve ark., 2006; Setyorini ve ark., 2006; Venugopal and Saramma, 2007; Rao ve ark., 2007; Mukherjee ve ark., 2008; Shivanand ve Jayaraman, 2009; Rao ve ark., 2009; Gaur ve Gupta, 2012).

Bacillus circulans'tan elde edilen alkalın serin proteaz, deri işleme ve deterjan endüstrisinde çevre dostu uygulama potansiyeli ile karakterize edilmiştir (Rao ve ark., 2009).

Gümüş metali, çok farklı amaçlar için kullanımının yanısıra ağırlıklı olarak fotoğraf endüstrisinde kullanılmaktadır. Atık X-ışını veya fotoğraf filmleri jelatin içerdiğinden üzerinde yayılmış olan siyah metalik gümüş metalinin geri kazanımı için mükemmel bir kaynak oluşturmaktadır. Jelatinin enzimatik hidroliziyle X-ışını filmlerinden gümüşün başarılı bir şekilde geri kazanımının, *Bacillus subtilis* türüne ait alkali proteaz enzimiyle sağlanabildiği bildirilmiştir (Puri, 2001; Oyama ve ark., 2005).

Kümes hayvanları işleme endüstrisinden ve deri endüstrisinden ortaya çıkan atıklar, keratin açısından zengin olmakla beraber polipeptitler, çok sayıda hidrojen bağı ve hidrofobik etkileşimler içermektedir. Alkali proteazlar ve keratinaz enziminin kullanımıyla

hem atık arıtımında kullanılan kimyasalların çevreye etkilerinden korunulmakta hem de hidrolitik aktivite sonucu açığa çıkan oksijen, sucul yaşam formlarının oksijen ihtiyacını karşılamaktadır (Hou ve ark., 2006; Gupta ve Khare, 2007). Tüylerin ve kılların hidrolizini sağlayan keratinaz enzimlerinin bakteriyel kaynağının *Bacillus* türleri olduğu bildirilmiştir (Okazaki ve ark., 2000)

İpek böceğinin ürettiği kozanın yapısında iki çeşit protein bulunmaktadır. Bunlar; iplik yapısında olan fibroin ve bu iplik yapısını bir arada tutan sericin proteinleridir. Alkali proteolitik enzimlerin uygulanmasıyla ipek proteini olan sericin, iplik yapısına zarar vermeden hidrolize edilmektedir. Yüksek konsantrasyonlarda proteaz enzimiyle ile muamele edilen ipek proteinlerinin iplik üzerinde zararlı bir etki bırakmayıp aksine ipek ipliklerin, geleneksel yöntemlerle işlenmiş halinden daha sağlam yapıda kaldığı gösterilmiştir (Kamal ve ark., 2017).

Etin daha yumuşak ve daha lezzetli hale getirilmesinde elastaz enzimi; yanık ve yaraların tedavisinde uygulanan geniş spektrumlu antibiyotiklerin birleşiminde subtilisin enzimi kullanılmaktadır (Kamal ve ark., 2017).

Deterjan katkı maddesi olarak kullanılan proteazlardan bazıları şunlardır; *Bacillus amyloliquefaciens* tarafından üretilen nötraz enzimi optimum olarak pH 6-7 arasında ve 50°C'de çalışmaktadır, Novozymes tarafından ticari olarak sağlanmaktadır; *Bacillus licheniformis* tarafından üretilen maksataz enzimi optimum olarak pH 8.5-9 arasında ve 60°C'de çalışmaktadır, Genencor International tarafından ticari olarak sağlanmaktadır; *Bacillus lentus* tarafından üretilen purafekt enzimi optimum olarak pH 10 ve 55°C'de çalışmaktadır, Genencor International tarafından ticari olarak sağlanmaktadır; *Bacillus halodurans* tarafından üretilen esperaz enzimi optimum olarak pH 8.5-11 arasında ve 60°C'de çalışmaktadır, Novozymes tarafından ticari olarak sağlanmaktadır; *Bacillus clausii* tarafından üretilen properaz enzimi optimum olarak pH 9-11 arasında ve 50°C'de çalışmaktadır, Genencor International tarafından ticari olarak sağlanmaktadır (Jones, 2004).

Banerjee ve arkadaşları (1999), *Bacillus brevis*'in bir termofilik ve alkalofilik suşundan bir alkalin proteaz izole etmiştir. Enzim, pH 10.5 ve 37°C'de maksimum aktivite göstermiştir.

Proteazların ayrıca, *Pseudomonas* (Jelluoli ve ark., 2008; Rahman ve ark., 2006; Dutta ve Banerjee, 2006; Gaur ve ark., 2010; Patil ve Chaudhari., 2009), *Salinivibrio* (Karbalaie-Heidari ve ark., 2007), *Listeria* (Shumi ve ark., 2004) ve *Enterococcus* cinslerine ait türlerden de (Sato ve ark., 2004) izole edildiği bildirilmiştir (Gaur ve Gupta, 2012).

Halofilik proteazlar *Bacillus*, *Virgibacillus*, *Chromohalobacter* ve *Halobacillus* gibi çok sayıda bakteri cinslerine ait türlerden izole edilmektedir. Bu halofilik proteazlar, NaCl varlığında ve pH 5-10 arasındaki ortamlarda optimal aktivite göstermektedir. Ayrıca 40 °C ile 75°C arasındaki sıcaklıklara dayanabilmekte ve organik çözücülerin varlığında stabil kalabilmektedir. Halofilik serin proteaz enzimleri *Natronomonas pharaonis*, *Natrialba magadii* ve *Natrococcus occultus* türlerinden elde edilmiştir (Enache ve Kamekura, 2010; Setati, 2010).

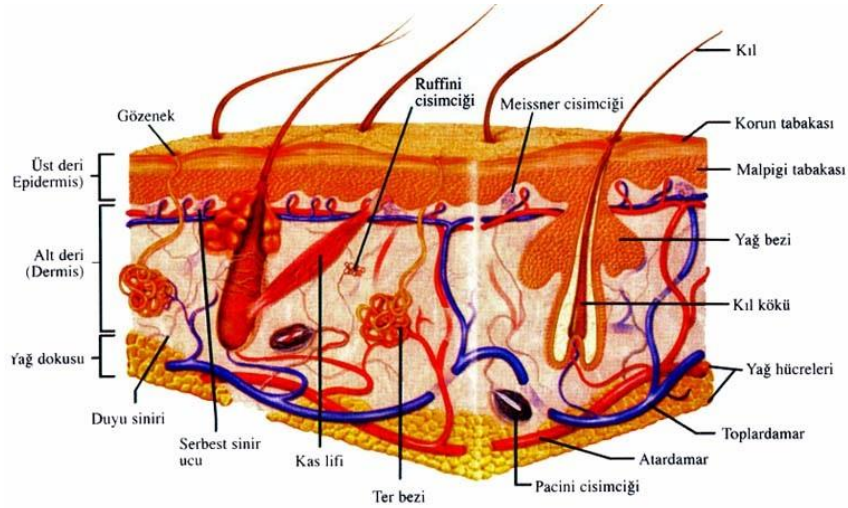
1.4. Dericilik, Derinin Yapısı ve Dericilikte Deri İşleme Basamakları

Hayvan derileri, insanlığın çok eski tarihlerinde soğuk havanın etkilerinden korunma amacıyla giyinme eşyası ve çadır yapımında kullanılmıştır. Deri kullanımının insanlık tarihindeki ilk belgesi, M.Ö. 20.000 yıllarında İspanya'daki Altimira Mağarası'nda çizilmiş duvar resimlerinde insanların sırtlarında görülen hayvan postlarıdır (Yıldız, 1993). Kazılarda bulunmuş bazı kabartma ve yontularda soylu sınıfa ait insanların hayvan postlarını giyindiklerini gösteren çizimler, Anadolu topraklarında deri işlemeciliğinin varlığının M.Ö. 3000 yıllarına dayandığını göstermektedir (Türktaş, 2004).

Osmanlı İmparatorluğu'nun var olduğu yıllarda el emeğine dayanan dericilik zanaati büyük gelişme göstermiştir. 1900'lü yıllarda gelişen teknolojiyle birlikte dericilikte de makinelerin kullanımı Türkiye'nin dericilikte geriden gelmesine sebep olmuş ancak 1990'lı yılların ortalarından itibaren modern teknoloji koşullarını yakalayan Türkiye'de dericilik için Organize Sanayi Bölgeleri açılmıştır. Türkiye'deki başlıca deri üretiminin yapıldığı bölgeler Tuzla (İstanbul), Menemen (İzmir), Çorlu (Tekirdağ), Uşak, Bursa, Gönen (Balıkesir), Gerede (Bolu), Isparta, Hatay, Kula'da (Manisa) bulunan işletmelerdir. Türkiye, küçükbaş hayvanların derilerinin işlenmesi bakımından önemli üreticilerden biri olmuştur. Hayvanlardan elde edilen derilerin hammadde olarak kullanıldığı dericilik

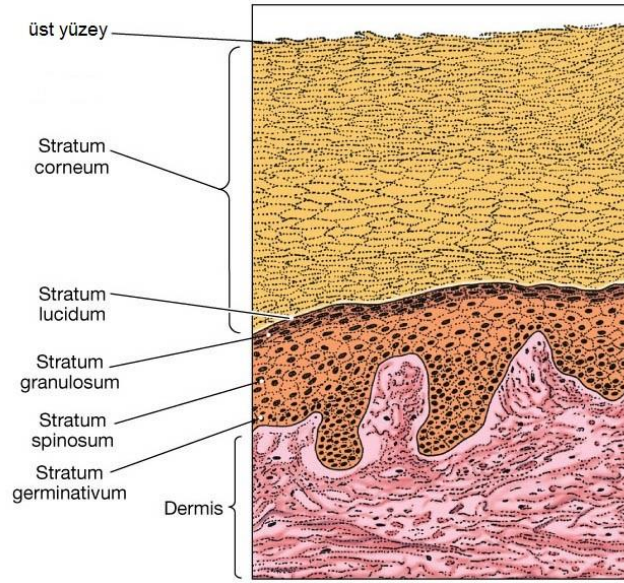
sektöründe hayvan derileri, giyim eşyalarının yanısıra ayakkabı, çanta, kemer, valiz, eldiven ve sandık gibi ürünlerin yapımında kullanılmaktadır (Anonim, 2016).

Deri, organizmaların dış kısmını kaplayan, vücut içerisindeki homeostasiye ısıyı ayarlayarak katkıda bulunan, üzerindeki doğal mikrobiyotası sayesinde canlıyı dışardan gelecek zararlı mikroorganizmalara karşı koruyan örtü tabakasıdır. Derinin yapısını oluşturan dokular; derinin en dış yüzeyini saran ve dermis tabakasındaki kan damarlarınca beslenen çok tabakalı yassı epitel doku; keratin, kollajen ve elastin gibi proteinleri yoğun miktarda içeren düzensiz sıkı bağ doku; derideki yağ ve ter bezlerinin, kılların çevresinde bulunan kas doku ve dermis tabakasında bulunan sinir dokudur (Akay, 2011; Toptaş, 1993).



Şekil 1.1. Derinin Yapısı (<http://www.biyolojisesitesi.net/uniteler/sinirsistemi/derininyapisi.html>)

Deri üç tabakadan (epidermis (üst deri), dermis (öz deri) ve hipodermis (alt deri)) meydana gelir ve bu tabakalar yapısal, fizyolojik işlevler ve kimyasal içerikler açısından farklılıklar göstermektedir. Epidermis tabakası apikal ve bazal olarak iki alt kısımdan oluşur, apikal kısım kendi içinde stratum corneum, stratum lucidum, stratum granulosum katlarına ayrılmaktadır. Bu katmanlarda yeni epitel doku hücreleri oluşur ve hücreler ilerleyerek en dıştaki stratum corneum tabakasını oluşturmaktadır (Anonim, 2007). Bazal kısım (stratum basale) da stratum spinosum ve stratum germinativum katlarından oluşmaktadır. Deri işlentisi sırasında epidermis tabakası uzaklaştırılmaktadır (Toptaş, 1998).



Şekil 1.2. Epidermis Tabakaları

(<http://droualb.faculty.mjc.edu/Lecture%20Notes/Unit%201/Integumentary%20with%20figures.html>)

Dermis, epidermis tabakasının altında bulunan ve bağ doku yapısında olan deri tabakasıdır. Dermis üç tabakadan oluşmaktadır. Bunlar; en iç kısımda bulunan retiküler tabaka, papillar tabaka ve deri işlenerek yapılan ayakkabı gibi ürünlerin dışarıda kalan yüzünü oluşturan sırça tabakasıdır (Toptaş, 1993). Yoğun olarak kollajen tip I proteininden oluşan kollajen fibrilleri içeren dermis tabakasının papillar katmanında kan damarları, sinir lifleri, kıl kökleri, elastin fibrilleri, yağ ve ter bezleri bulunmaktadır. Kollajen tip I proteini birçok aminoasit çeşidinden oluşmaktadır ve içeriğinde en çok bulunan aminoasitler glisin, lizin, prolin ve hidroksprolindir (Toptaş, 1998; Akay, 2011). Kollajen fibrillerinin en önemli özelliği gerilmelere dayanıklı olmasıdır. Kollajen fibriller, kaynatıldığı zaman eriyerek jelatine dönüşmektedir. Dericilikte ağır metal iyonları ve tannik asit ile muamele edilen kollajen yapılar dayanıklı bir hale gelmektedir (Akay, 2011; Anonim, 2007). Derinin işlentisi sırasındaki kimyasal ve mekanik etmenler sebebiyle papillar tabaka, ağ şeklinde kollajen ve elastin fibrilleri ile örülmüş olan retiküler tabakadan ayrılabilir ve buna engel olmak için tabaklama aşamasının doğru bir şekilde yapılması gerekmektedir (Toptaş, 1998).

Hipodermis, derinin en alt kısmında bulunur ve kollajen fibrillerle desteklenmiş olan bu tabaka derinin ete bağlandığı kısmı oluşturmaktadır. Bu tabakada yağ hücreleri de bolca bulunmaktadır. Hayvan derisi yüzülürken hipodermis tabakası ya hayvan üzerinde

bırakılmaya çalışılır ya da deri işlentisi sırasına dermis üzerinden uzaklaştırılmaktadır (Toptaş, 1998).

Derinin kimyasal içeriğinin % 65'i su, % 33'ü proteinler, % 2'si yağlar, % 0.2'si mineraller ve % 2'si karbonhidratlardan oluşmaktadır. Hayvan derilerindeki suyun, yağların, karbonhidratların ve minerallerin büyük bir miktarı deri işlentisi esnasında derilerden uzaklaştırılmaktadır. Deri sanayisinde kullanılan deriler, çoğunlukla büyükbaş ve küçükbaş hayvan derilerinden et üretiminde yan ürün olarak elde edilmektedir. Sığır, koyun ve keçi derileri dericilikte en çok kullanılan deriler olmaktadır (Anonim, 2007; Anonim, 2012).

Hayvan derilerinin, hayvanların kesim işleminden sonra deri işlentisi yapılana kadar saklanmasına konservasyon denir. Konservasyon işlemi, derinin havada kurutulmasıyla ya da tuzla muamele edilmesiyle gerçekleştirilmektedir. Havada kurutma yönteminde herhangi bir kimyasal ya da etken bir madde kullanılmadan deriler hava alan bir ortamda kurumaya bırakılmaktadır. Tuzla konservasyon işleminde ise derideki su uzaklaştırıldıktan sonra üzerine tuz serpilerek kuru tuzlama ya da tuzlu su çözeltisi içine koyularak salamura şeklinde deri konservasyonu yapılmaktadır (Anonim, 2007). Türkiye'deki deri fabrikalarında Şereflikoçhisar Tuz Gölü'nden elde edilen tuzların kullanıldığı bilinmektedir (Birbir ve ark., 2003). Derilerin depolarda saklanması sırasında üzerindeki mikroorganizmalardan korunması için tuzun yanında antiseptik, dezenfektan ve antimikrobiyal maddeler de kullanılmaktadır (Anonim, 2007).

Konservasyon sonrası büyük oranda su kaybeden deri sertleştiği ve kuruduğu için deri işlenti basamaklarının çoğunluğunda su kullanılmaktadır. Islatma sırasında derilerin üzerinde bulunan şekilsiz proteinler, bakteriler, kan, üre, dışkı ve kirler yüzey aktif maddeler, bakterisitler ve % 2-5 oranında NaCl içeren ıslatma sıvısı kullanılarak derilerden uzaklaştırılmaktadır. Islatma işleminin pH'ı 10.5 değerinin üzerine çıktığında derinin iç kısımlarında şişmeler görüleceğinden ıslatma pH'ı en fazla 10.5 olmalıdır (Toptaş, 1993). Islatmanın amacı 20-30 °C'deki sıcaklıklarda, derilerin konservasyon işleminden önce içerdiği suyu geri kazandırmak ve tabaklama için derinin yumuşatılmasını sağlamaktır (Toptaş, 1993; Kumar ve Mani, 2007; Anonim, 2016).

Proteaz enzimleri geçmişte sadece kıl giderme ve sama işlemlerinde kullanılırken artık ıslatma aşamasında da kullanılmaktadır. ıslatma işleminde sırasında albümin ve globülin gibi fibril yapıda olmayan proteinlerin deriden uzaklaştırılması amacıyla alkali proteazlar kullanılmaktadır. Derinin yumuşatılması amacıyla ıslatma suyuna pankreatin de katılmaktadır (Fogarty, 1990; Gerhartz, 1990; Crispim ve Mota, 2003).

ıslatmadan sonra kıl giderme ve kireçlik sırasında hayvan derileri, deri yapısındaki kılların Na_2S , NaH , S ve $\text{Ca}(\text{OH})_2$ gibi kimyasal maddeler ve alkali proteazlar kullanılarak uzaklaştırılması, derinin kollajen yapısının gevşetilmesiyle istenilen deri yumuşaklığın sağlanması ve derideki yağların, fibril yapıda olmayan proteinlerin giderilmesi gibi işlemlere tabi tutulmaktadır. Geleneksel deri kıllarının ve yünün giderilmesi yöntemi, aşırı derecede alkali bir durumun geliştirilmesini ve ardından kıl kökünün proteinlerini çözümdürmek için sülfid ile muameleden ibaret olmaktadır. Kimyasallar kullanılmadan yapılan kıl giderme işleminde kullanılan proteaz enzimleri sayesinde, sodyum sülfid (Na_2S) atık olarak çevreye verdiği zarardan da kurtulmak mümkün olmaktadır (Gerhartz, 1990; Anonim, 2012; Rao, 1998; Ogino ve ark., 2008; Anonim, 2016). Kireçlik işleminde sonra derilerin pH değeri 12-13 gibi yüksek alkali bir değer olmaktadır (Toptaş, 1993; Anonim, 2007).

Kireçlik sonrası deriler üzerinde kalan kılların, kirecin ve kireçlik kimyasallarının giderilmesi sırasında etleme işlemi de yapılarak derilerdeki dermis tabakasından alt deri (hipodermis) tabakası da uzaklaştırılmaktadır. Kireç giderme işleminde deride kirecin sebep olduğu yüksek alkali pH değerinin, zayıf asitler ile magnezyum, amonyum tuzları ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ve boraks kullanılarak düşürülmesi sağlanmaktadır (Toptaş, 1993; Anonim, 2007; Anonim, 2016).

Kireç giderme sonrası sama işleminde proteolitik enzimler kullanılarak derilerdeki kollajen ve elastin fibrillerinin hareketliliği sağlanır, deri üzerinde kalan kıllar ve fibril yapıda olmayan proteinler uzaklaştırılmaktadır (Toptaş, 2004; Toptaş, 1993). Kullanılan proteaz enzimleri sayesinde derinin sırça yüzeyi yumuşak ve pürüzsüz bir hale gelmektedir. Kollajen olmayan proteinlerin uzaklaştırılmaması, deri yapısındaki fibril proteinlerin birbirine yapışmasına ve bu durum da deride sertleşmeye, esnemeyen bir yapıya sahip olmasına neden olmaktadır (Deselnicu ve ark., 1994). Sama aşamasında ortam sıcaklığı 20-

37°C arasında değişmektedir. Kireç giderme sonrası ortamın pH değeri dūşürölüp 8-9'a çekilmekte ve tuz oranı % 5-9 arasında olmaktadır (Toptaş, 1993; Toptaş, 2004).

Yağ giderme veya yağ alma ismiyle bilinen deri işleme basamağı daha çok küçükbaş hayvan derileri için uygulanmaktadır. Derilerdeki yağların giderilmesi sadece solventler kullanıldığında yüzeysel olurken, lipaz ve proteaz enzimleri kullanılarak yapıldığında yağ hücreleri içerisindeki yağlar da deriden uzaklaştırılabilmektedir (Choudhary ve ark., 2004).

Piklaj aşaması ise derilerin sülfirik asit (H_2SO_4), formik asit (CH_2O_2), laktik asit ($C_3H_6O_3$) ve glikolik asit ($C_2H_4O_3$) gibi asitler ve NaCl ile muamele edilerek bir sonraki aşama olan kromla tabaklamaya hazırlanması işlemidir. Küçükbaş ve büyükbaş hayvan derilerinin kromla tabaklanması sırasında, piklaj aşamasında asitle işlem görmüş derilerin pH değeri 3 olmakta ve kromun derilere bağlanması engellenmektedir (Toptaş, 2004).

Tabaklama, ham deri yapısının mikroorganizmaların zararlı etkilerinden korunması, derinin dayanıklılığını arttırarak enzimlerle ve asitlerle kollajen yapısının bozulmasına engel olmak için yapılmaktadır (Dutta, 1999). Tabaklama işlemi, çok farklı şekillerde yapılabilmekte ancak en çok kullanılan ve en önemlisi $Cr(SO_4)_3$ ile yapılan kromlu tabaklamadır. Kromla yapılan tabaklama işlemi, derinin görünümünü iyileştirmektedir. Bu aşamada enzimler kullanılmaz ancak daha önceki basamaklarda yapılan enzimatik işlemler tabaklamanın daha etkili olmasına katkı sağlamaktadır (Choudhary ve ark., 2004).

Retenaj yani ikinci tabaklama, derinin kalitesini arttırmak için tabaklama işleminin tekrar edilmesi ya da farklı tabaklama maddelerinin kombinasyonlarının birlikte kullanılmasıyla derinin tekrar tabaklanması işlemidir. Retenaj sonrası istenilen renk, sertlik, yumuşaklık, esneklik, parlaklık gibi özelliklerin deriye kazandırılması işlemine finisaj denmektedir. Finisaj kaplama, zımparalama ve düzleştirme gibi mekanik yöntemlerle derinin iyileştirilmesini ve dayanıklı hale getirilmesini kapsamaktadır. Bu şekilde kullanılacak derilerin çeşitlendirilmesi, deri görünümünün iyileştirilmesi sağlanmaktadır (Anonim, 2012; Toptaş, 1998; Anonim, 2016).

1.5. Proteaz Enziminin Deri Sektöründeki Önemi

Deri işlenti konservasyon, ıslatma, kıl giderme, kireçlik, kireç giderme, sama, yağ giderme, piklaj, tabaklama, boyama ve finisaj adımlarını içermektedir (Toptaş, 2004; Aslan, 2009; Birbir ve ark., 2016). Geleneksel deri işleme yöntemleri, kirlilik ve atık problemleri yaratan sodyum sülfür gibi tehlikeli kimyasalları içerisinde barındırmaktadır. Enzimlerin kimyasallara alternatif olarak kullanılması, deri kalitesinin iyileştirilmesinde ve çevre kirliliğinin azaltılmasında başarılı sonuçlar oluşturmaktadır (Rao, 1998). Enzimlerin deri endüstrisi açısından önemi, 1910 yılında yapılan pankreatik enzimlerle kıl giderme için yapılan bir çalışma ile ortaya konulmasına rağmen, enzimlerin deri endüstrisinde kullanımları uzun yıllar almıştır. Deri endüstrisinde kaliteli deri üretimi ve endüstriyel atık arıtımı için enzimler kullanılmaktadır (Choudhary ve ark., 2004; Birbir ve ark., 2016). Özellikle proteazlar, lipazlar ve amilazlar deri işlenti basamaklarında kullanılan enzimlerin başında gelmektedir (Rohm, 1910; Choudhary ve ark., 2004).

Deri ve deri kıllarının ana yapı taşları protein içermektedir. Proteazlar, derinin kollajen olmayan bileşenlerinin selektif hidrolizi ve albüminler, globülinler gibi fibril olmayan proteinlerin uzaklaştırılması için kullanılmaktadır (Rao, 1998).

Derileri ıslatmanın amacı deriyi şişirmektir. Geleneksel olarak, bu adım ıslatma sıvısını alkali yaparak gerçekleştirilmektedir. Derilerin ıslatma aşamasında, fibriller olmayan proteinlerin deriden uzaklaştırılmasında alkali pankreatik proteazlar kullanılmaktadır. Derilerin suyu daha hızlı emilmesini sağlamak ve ıslatma için gereken süreyi azaltmak için mikrobiyal alkali proteazlar kullanılmaktadır. Özellikle pH 9-11 ve 28-30 °C'de aktif olarak çalışacak enzimler bu aşamada tercih edilmektedir. ıslatma aşamasında deriyi daha yumuşak ve esnek yapmak için tripsin ve alkali proteazlar da kullanılmaktadır (Choudhary ve ark., 2004; Toptaş, 1998; Rao, 1998; Birbir ve ark., 2016).

Lipazlar da ıslatma ve kireçleme aşamalarında proteazlarla birlikte kullanılabilir. Alkali lipazlar ve proteazların bir arada kullanılmasıyla işlemin süresi oldukça kısalmıştır. Burada kullanılan proteaz enzimi ile yağ hücrelerini kuşatan zarlar açılır ve bu yağlar lipaz enzimine maruz kalır. Bu da yağları daha hareketli hale dönüştürerek parçalanmış ürünlerin oluşmasına neden olur. Parçalanmış serbest bırakılan ürünler monogliseritler

(eriyebilir sabunlar, emülgatörler) olan serbest yağ asitlerinden oluşur (Hasan ve ark., 2006; Birbir ve ark., 2016). Yüzey aktif maddelerine benzerlik gösteren monogliseritler, pH 8-11 gibi alkali ortamlarda yağı deriden kolayca uzaklaştırmaktadır (Hasan ve ark., 2006; Choudhary ve ark., 2004; Toptaş, 1998; Birbir ve ark., 2016).

Deri kıllarının dökülmesi için yağları ve proteinleri parçalayan enzimler bir arada kullanılmaktadır. Bu enzimler sayesinde deri yapısı açılarak deri kılları uzaklaştırılır (Berber, 2009; Aslan, 2009). Kıl dökme aşamasında atık su kalitesini iyileştirmek için alkali ve nötral proteazlar da kullanılmaktadır (Choudhary ve ark., 2004; Birbir ve ark., 2016).

Günümüzde kireç ve sodyum klorür ile birlikte alkali proteazlar, kıl giderme için kullanılmaktadır ve bu da üretilen atık suyun miktarında önemli bir azalmaya neden olmaktadır. Kıl giderme aşamasında % 2-5 oranında *Bacillus licheniformis*'in proteazının kullanılabilceği belirtilmiştir (Rao, 1998; Saran ve ark., 2013; Birbir ve ark., 2016).

Daha önceki sama yöntemleri, proteazların kaynağı olarak hayvan dışkılarının kullanımına dayanmaktaydı; bu sağlık açısından sorun oluşturma potansiyeli olan güvensiz yöntemler pankreatik tripsin içeren yöntemler ile değiştirilmiştir. Günümüzde tripsin, sama için diğer *Bacillus* ve *Aspergillus* proteazlarının kombinasyonu halinde kullanılmaktadır. Enzimin seçimi, elastin ve keratin gibi matriks proteinlerine olan özgüllüğüne bağlıdır ve ihtiyaç duyulan enzim miktarı, üretilecek olan deri tipinin yumuşak veya sert olmasına göre değişmektedir (Rao, 1998).

Sama işleminde pankreas veya bakteri kökenli proteolitik enzimler kullanılır ve bu aşamanın gerçekleşmesinde sıcaklık, pH ve enzim konsantrasyonunun etkisi oldukça önemlidir. Tripsin ve bakteriyel kaynaklı alkali proteazların kullanıldığı göre sama basamağında proteolitik enzimlerin çalışması için 35°C-37.8°C sıcaklık ve 7.5-8.5 pH değerleri sağlanmalıdır (Deselnicu ve ark, 1994; Choudhary ve ark., 2004).

Kıl giderme ve sama için enzimlerin artan kullanımı sadece kirlilik problemlerini engellemekle kalmaz, aynı zamanda enerji tasarrufu konusunda da etkili olmaktadır. Novo

Nordisk firması, deri işlenti aşamalarından sama, kıl giderme ve ıslatmada kullanılmak üzere Pyrase, NUE ve Aquaderm ticari proteazlarını üretmektedir (Rao, 1998).

Yağ giderme aşamasında, yağları uzaklaştırmak için lipazlar ve proteazlar birlikte kullanılmaktadır (Thanikaivelan ve ark., 2004; Mrozik ve ark., 2008; Birbir ve ark., 2016). Atık işleme aşamasında, kromla tabaklanmış atığın işlenmesi için tripsin ve proteolitik enzimler kullanılmaktadır (Choudhary ve ark., 2004; Birbir ve ark., 2016).

Afşar ve Çetinkaya (2008), küçükbaş ve büyükbaş hayvan derilerinin ıslatma, kireçlik, ve piklaj işlemlerinde proteaz enzimlerini kullanmışlardır. Kireçleme safhasında % 0.1-0.2'lik alkali proteazın, ıslatmada % 0.5'lik alkali proteazın, kireçlikte % 0.5'lik alkali lipaz ve alkali proteaz karışımlarının kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Mozersky ve arkadaşları (2002), deri işlenti basamaklarından kireç gidermede ve banyolama basamaklarında, derideki dekorini uzaklaştırmak için alkali proteazın kullanılabilme potansiyelini araştırmışlardır. Alkali proteazla muamele edilmiş derilerin daha yumuşak ve daha esnek olduğu ve derinin fiziksel özelliklerinin bozulmadığı saptanmıştır. Kollajenaz enzimi üretmeyen halofillerden elde edilen proteazın 4M NaCl'de ve hafif alkali pH da aktif olduğunu belirtmişlerdir. 4M NaCl içeren banyolama sıvılarında bu enzim kullanıldığında derilerin fiziksel özelliklerinde bir bozulma görülmediği, dekorini gevşettiği ve böylece proteoglikanın proteaz enzimleriyle derilerden kolayca uzaklaştırılabileceğini açıklamışlardır.

Daha önceki çalışmalarda Tuz Gölü'nden toplanan tuz ve tuzlu su örneklerinden 50 adet aşırı halofil arkenin % 80'inin proteaz; Kaldırım Tuzlası tuz ve tuzlu su örneklerinden izole edilen 20 aşırı halofil arkenin % 70'inin proteaz; Kayacık Tuzlası tuz örneklerinden izole edilen 9 izolatın % 78'inin proteaz ve Tuzköy Tuz Madeninden ayrımı yapılan 15 izolatın % 67'sinin proteaz ürettiği belirlenmiştir (Birbir ve ark., 2004; Birbir ve ark., 2007). Ayrıca deri endüstrisinde kullanılan 40 adet tuz örneğinin tamamından proteaz enzimi üreten (10^2 - 10^4 kob/g) arkeler belirlenmiştir (Berber ve Birbir, 2010).

A.B.D.'de yapılan bir çalışmada tuzlanmış deriden (131 adet) toplam olarak 332 adet aşırı halofil arke izole edilmiştir ve bu izolatların % 94'ünün proteaz enzimi ürettiği

saptanmıştır (Bailey ve Birbir, 1993). Ayrıca, tuzlanmış 35 adet Fransız ve Rus derilerinden 85 adet aşırı halofil arke izole edilmiş ve bu izolatların % 67'sinin proteaz pozitif olduğu saptanmıştır (Birbir, 1997). Diğer bir çalışmada, tuzlanmış 36 adet sığır derisinin %94'ünde proteaz pozitif aşırı halofil ($10^2 - 10^6$ kob/g) arke saptanmıştır (Berber ve Birbir, 2010).

Akpolat ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, tuzlanmış koyun derilerinden izole ettikleri mikroorganizmaların % 43'ünün ılımlı halofil bakteriler ve % 56'sının aşırı halofil arkeler olduklarını göstermişlerdir. Bu çalışmada tuzlanmış küçükbaş hayvan derilerinden izole edilen *Halococcus dombrowskii*, *Natrinema pellirubrum*, *Halorubrum lipolyticum* ve *Halococcus morrhuae* aşırı halofil arke türlerinin proteolitik aktiviteye sahip oldukları saptanmıştır (Akpolat ve ark., 2015).

Yapılan başka bir çalışmada, İngiltere ve Avustralya'dan ithal edilen tuzlanmış derilerden izole edilen ılımlı halofil bakterilerden *Oceanobacillus picturae*, *Thalassobacillus devorans*, *Salimicrobium halophilum* ve *Marinococcus halophilus* türlerinin, aşırı halofil arkelerden ise *Natrinema gari* ve *Natrinema pallidum* türlerinin proteolitik aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Yılmaz, 2010).

Tuzlanmış küçükbaş hayvan derileriyle yapılan bir çalışmada, koyun derilerinden izole edilen ılımlı halofil bakterilerin % 58'inin proteaz enzimini ürettiği saptanmıştır. Bu izole edilen ılımlı halofil mikroorganizmalar 16S rRNA gen analizine göre tanımlanarak *Gracilibacillus dipsosauri*, *Salinivibrio costicola*, *Chromohalobacter japonicus*, *Staphylococcus xylosus*, *Bacillus tequilensis*, *Bacillus safensis*, *Salinicoccus roseus*, *Bacillus licheniformis*, *Chromohalobacter canadensis*, *Bacillus pumilus*, *Halomonas halmophila*, *Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Bacillus siamensis*, *Planococcus rifietoensis*, *Marinococcus luteus*, *Marinococcus tarijensis*, *Halomonas eurihalina*, *Chromohalobacter israelensis* ve *Idiomarina loihiensis* türleri oldukları saptanmıştır. Aynı çalışmadaki keçi derilerinden izole edilen ılımlı halofil bakterilerin % 72'sinin proteaz enzimini ürettiği belirlenmiştir. İzole edilmiş olan ılımlı halofil mikroorganizmalar 16S rRNA gen analizine göre tanımlanarak *Gracilibacillus dipsosauri*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus arlettae*, *Bacillus pumilus*, *Salinicoccus roseus*, *Bacillus licheniformis*, *Staphylococcus xylosus*, *Halomonas eurihalina* ve

Staphylococcus equorum türleri oldukları saptanmıştır (Çağlayan, 2015).

Bu araştırma sonuçları, deri endüstrisinde kullanılan tuzlarda ve tuzlanmış derilerde, deri endüstrisinde kullanılma potansiyeli yüksek olan proteaz üreten halofil bakterilerin ve arkelerin olduğunu göstermektedir. Deri endüstrisinde kullanılan tuzlardan ve tuzlanmış derilerden izole edilen proteaz üreten halofil izolatlar, deri endüstrisi açısından oldukça önemli endüstriyel mikroorganizmalar olabilir.

1.6. İlimli Halofil Mikroorganizmalar ile İlgili Bilgiler

Halofil canlılar tuzlu ortamlarda gelişim gösterebilen organizmalardır. *Bacteria* ve *Archaea* domainlerinde bulunan halofilik mikroorganizmalar, ribozom organellerinin yapısının bütünlüğü için potasyum iyonlarına ve hücre duvarının yapısını korumak için dış ortamda sodyum iyonlarına ihtiyaç duymaktadır. Hücre duvarının yapısında bulunan negatif yüklü glutamat ve aspartat gibi asidik aminoasitler, sodyum iyonlarının eksikliğinde birbirini iterek hücre duvarının parçalanmasına ve hücrenin dağılmasına sebep olmaktadır (Madigan ve ark., 2019).

Kushner ve Kamekura'nın halofil mikroorganizmaların optimal gelişmeleri için, NaCl konsantrasyonu baz alınarak yaptıkları sınıflandırmada; zayıf halofillerin 0.2 ile 0.5 molar ya da % 1 ile % 3 oranları arasında NaCl konsantrasyonuna, ılımlı halofillerin 0.5 ile 2.5 molar ya da % 3 ile % 15 oranları arasında NaCl konsantrasyonuna ve aşırı halofillerin ise 2.5 ile 5.2 molar ya da % 15 ile % 30 NaCl konsantrasyonuna ihtiyaç duydukları belirtilmiştir (Kushner ve Kamekura, 1988). Sıcaklık ve pH ihtiyaçları cinsten cinse değişiklik göstermektedir. Ayrıca bu bakterilerin, kationlar ve iyonlaşmayan bileşikler ile yeri doldurulamayan NaF iyonlarına özel bir gereksinimleri vardır (Kushner ve Kamekura, 1988; Ventosa ve ark., 1998). Bu bakteriler tuzlu topraklarda, tuz göllerinde, sodalı göllerde, tuz madenlerinde, tuzlu soğuk ortamlarda, tuzlanmış gıdalarda yaşama alanı bulmaktadır (Ventosa ve ark., 1998).

Araştırmacılar, ılımlı halofil mikroorganizmalar olan *Ectothiorhodospira* ve *Pseudomonas halosaccharolytica*'nın hücre zarlarının proteinlerinde yüksek oranda asidik aminoasitlerin bulunduğunu bildirmişlerdir (Hiramatsu ve ark., 1980; Imhoff ve ark., 1984; Russell, 1989). Başka bir çalışmada, ılımlı halofil mikroorganizmaların hücre

zarlarında fosfatidilgliserol, difosfatidilgliserol ve fosfatidiletanolamin gibi lipidlerin bulunduğu gösterilmiştir (Carrasco ve ark., 2007).

Halomonas ve *Chromohalobacter* cinsleri halofilik model mikroorganizmalar olarak birçok çalışmada kullanılmıştır. Hatta bazı ılımlı halofil mikroorganizmalar tüm halofilik mikroorganizmalar arasında en halofil olanlarıdır ve geniş aralıktaki tuz konsantrasyonlarına aşırı halofil mikroorganizmalara göre daha fazla adapte olmuşlardır (Ventosa ve ark., 1998). Bu mikroorganizma grubunun araştırılmasındaki etken, biyoteknolojik uygulamalardaki potansiyelleri olmaktadır. Bunlar arasında, sahip oldukları tuzlu ortamlarda hücresel fonksiyonlarının zarar görmesini ve genetik materyal hasarını önleyen çözünen uyumlu maddelerin, yüksek tuz konsantrasyonuna adapte olmuş hücre dışı enzimlerin ve ekzopolisakkaritlerin üretimi bulunmaktadır (Arahal ve Ventosa, 2006).

ılımlı halofil mikroorganizmaların proteaz, amilaz ve lipaz gibi çeşitli hücre dışı enzimler ürettiği belirtilmiştir (Mellado ve ark., 2004; Ventosa, 2006). Toyoda ve arkadaşları (1997), tuzlu bir toprak örneğinden izole edilen ılımlı halofil *Halomonas elongata* suşunun ürettiği çözünen uyumlu bir madde olan ektoinin; proteaz, amilaz, selülaz ve lipaz gibi enzimlerin aktivitelerinin bozulmasını engellediği ve stabilize ettiğini bildirmişlerdir. ılımlı halofil mikroorganizmalardan *Halomonas* cinslerinin, ekzopolisakkarit ürettiği belirlenmiştir (Margesin ve Schinner, 2001). Aşırı halofil mikroorganizmalar tarafından üretilen enzimlerin, düşük tuz içeren ortamlarda aktivitelerini kaybedebilmelerinin aksine ılımlı halofil mikroorganizmaların aşırı tuzlu (4 M NaCl) ortamlarda yaşayabilmek için ürettikleri enzimler, düşük tuz içeren ortamlarda aktif kalabilmektedir. ılımlı halofillerin hidrolaz ve izomeraz sınıflarına ait enzimlerinin, yüksek tuz konsantrasyonuna sahip ortamlarda yapılarının bozulmadığı saptanmıştır (Margesin ve Schinner, 2001; Amoozegar ve ark., 2008).

ılımlı halofil mikroorganizmaların Gram-negatif cinsleri; *Algoriphagus*, *Alteromonas*, *Arhodomonas*, *Chromohalobacter*, *Desulfocella*, *Desulfohalobium*, *Desulfovibrio*, *Halanaerobacter*, *Halanaerobium*, *Halochromatium*, *Roseisalinus*, *Haloicola*, *Halomonas*, *Halorhodospira*, *Thiohalocapsa*, *Halospina*, *Halothermothrix*, *Halothibacillus*, *Halovibrio*, *Idiomarina*, *Marinicola*, *Muricauda*, *Marinobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Methylarcula*, *Methylohalobius*, *Natroniella*, *Nitrincola*, *Orenia*,

Palleronia, *Psychroflexus*, *Psychrobacter*, *Rhodospirillum*, *Rhodothalassium*, *Salegentibacter*, *Salinimonas*, *Selenihalanaerobacter*, *Salinisphaera*, *Salinivibrio*, *Salipiger*, *Spirochaeta*, *Sporohalobacter*, *Staleyia*, *Sulfitobacter*, *Rhodovibrio*, *Aliifodinibius*, *Roseovarius*, *Oceanicola*, *Glycocaulis*, *Ectothiorhodospira*, *Thiohalomonas*, *Thiomicrospira*, *Spiribacter*, *Aquisalimonas* ve *Fodinicurvata* olarak belirtilmiştir (Ventosa, 2006; Wang ve ark., 2013; Castro ve ark., 2018; Huo ve ark., 2014; Lv ve ark., 2014; Gorlenko ve ark., 2009; Sorokin ve ark., 2007; Sorokin ve ark., 2006; Leon ve ark., 2016; Infante-Dominguez ve ark., 2015; Infante-Dominguez ve ark., 2015a).

İlimli halofil mikroorganizmaların Gram-pozitif cinslerinin ise; *Prauserella*, *Clostridium*, *Marinococcus*, *Nocardiopsis*, *Pontibacillus*, *Saccharomonospora*, *Salinibacillus*, *Streptomonospora*, *Tenuibacillus*, *Tetragenococcus*, *Bacillus*, *Thalassobacillus*, *Halobacillus*, *Filobacillus*, *Virgibacillus*, *Lentibacillus*, *Marinibacillus*, *Gracilibacillus*, *Alkalibacillus*, *Jeotgalibacillus*, *Yania*, *Microbacterium*, *Dietzia*, *Desulfotomaculum*, *Salinicoccus*, *Sporosarcina*, *Natronincola*, *Nesterenkonia*, *Salipaludibacillus*, *Aquibacillus*, *Terribacillus*, *Amphibacillus*, *Geomicrobium*, *Salinithrix*, *Aliicoccus*, *Ornithinibacillus*, *Saliterribacillus*, *Alteribacillus*, *Piscibacillus*, *Sediminibacillus*, *Aquisalibacillus* ve *Salsuginibacillus* olduğu belirlenmiştir (Ventosa, 2006; Amoozegar ve ark., 2018; Amoozegar ve ark., 2014; Liu ve ark., 2010; Pugin ve ark., 2012; Echigo ve ark., 2010; Zarparvar ve ark., 2014; Amoozegar ve ark., 2014a; Bagheri ve ark., 2013; Amoozegar ve ark., 2013; Didari ve ark., 2012; Amoozegar ve ark., 2009; Carrasco ve ark., 2008; Marquez ve ark., 2008).

Bu çalışmada kullanılan dört test izolatu *Marinococcus*, *Staphylococcus*, *Chromohalobacter* ve *Halomonas* cinslerine ait mikroorganizmalardır. *Marinococcus tarijensis*, *Staphylococcus equorum*, *Chromohalobacter canadensis* ve *Halomonas eurihalina* türlerine ait tuzlanmış koyun derilerinden izole edilmiş bu izolatlar daha önceki çalışmalarda 16S ribozomal RNA gen analizi metodu ve geleneksel biyokimyasal testlerle tanımlanmıştır (Birbir ve ark., 2015; Çağlayan, 2015; Çağlayan ve ark., 2017).

***Marinococcus* Cinsi**

Marinococcus cinsinin günümüze kadar tanımlanmış 5 türü bulunmaktadır. Bunlar; *Marinococcus halotolerans*, *Marinococcus luteus*, *Marinococcus salis*, *Marinococcus halophilus* ve *Marinococcus tarijensis*'dir (Euzéby, 1997; <http://www.bacterio.net/>, Erişim Tarihi Şubat 2019). Gram-pozitif olan bu bakterilerin, hücre duvarındaki peptidoglikan yapısında mezo-diaminopimelik asit ve izoprenoid kinon (quinone) bulunmaktadır.

Marinococcus tarijensis, Bolivya - Tarija'da bulunan bir tuz madeninden alınan tuz kristalinden (Balderrama-Subieta ve ark., 2013), *Marinococcus halotolerans*, Çin - Qinghai'den alınan tuzlu toprak örneklerinden (Li ve ark., 2005), *Marinococcus luteus*, Çin – Xinjiang 'daki bir tuz gölünden (Wang ve ark., 2009) ve *Marinococcus salis* Surajbari - Hindistan'da bulunan bir tuzludan (Vishnuvardhan ve ark., 2017) izole edilerek tanımlanmıştır.

Marinococcus tarijensis

İlimli halofil *Marinococcus tarijensis* bakterisi, Bolivya - Tarija'da bulunan bir tuz madeninden alınan tuz kristalinden izole edilip tanımlanmıştır. Optimum olarak % 5 NaCl (g/ml) konsantrasyonunda, 37 - 40 °C'de ve pH 7.6' da gelişebilmektedir. Toplam GC oranı % 48.6'dır (Balderrama-Subieta ve ark., 2013). *Marinococcus tarijensis*, % 10 tuz içeren kompleks agar besiyerinde sarı renkte koloniler oluşturan, gram pozitif, kokoid şeklinde morfolojik yapıya sahip, % 10 tuz içeren ortamlarda, 37 °C de ve pH 7' de optimum üreme gösteren, endospor oluşturmeyen, hareketli ve flagellaya sahip, pozitif katalaz reaksiyonu gösteren, oksidaz reaksiyonu ve metil-red reaksiyonu negatif olan mikroorganizmadır. Triptofandan indol oluşturmeyen, Voges-Proskauer reaksiyonu negatif olan, sitratı tek karbon kaynağı olarak kullanamayan, nitratı nitrite indirgeyen fakat N₂ gazı oluşturmeyen, H₂S üretmeyen ancak peptondan amonyak oluşturabilen, D-glukoza kullanabilen, D-galaktoz, D-trehaloz, D-melibiyoz, D-mannoz, L-ramnoz, L-arabinoz, D-sellobiyoz ve metanol gibi farklı karbon kaynaklarını kullanarak asit üretebilen, dulsitol, D-ksiloz, D-sorbitol, riboz, salisin, Myo-inositol, ksilitol, benzoat, propiyonat, fruktoz, D-melezitoz, format, tartarat, propanol, bütanol ve maltoz gibi karbon kaynaklarını kullanamayan, L-arginin, L-glisin ve L-Alanin dekarboksilasyon testleri pozitif, L-sistein L-tirozin, L-prolin ve L-hidroksiprolin dekarboksilasyon testleri negatif olan bakteri

türüdür. *Marinococcus tarijensis*'in amilaz, DNaz, delülaz, kazeinaz, lipaz, üreaz, pullunaz, ksilinaz, lesitinaz, fosfolipaz, β -galaktosidaz enzim reaksiyonları negatif ve proteaz enzim reaksiyonu pozitifdir (Birbir ve ark., 2015; Çağlayan, 2015; Caglayan ve ark., 2017).

***Staphylococcus* Cinsi**

Staphylococcus cinsinin şimdiye kadar tanımlanmış 51 türü bulunmaktadır ve tip suş olarak *Staphylococcus aureus* kabul edilmektedir (Euzéby, 1997; <http://www.bacterio.net/>, Erişim Tarihi Şubat 2019). İlk kez Rosenbach tarafından 1884 yılında tanımlanmıştır (Schleifer ve Bell, 2015). Hücreleri küreseldir ve 0.5 - 1.5 μ m çapındadır. Tekli olarak, çiftler halinde ve tetrat şeklinde bulunabilmektedir. Hücreleri hareketsizdir ve Gram reaksiyonu pozitifdir. Hücre duvarı, peptidoglikan ve teikoik asit içermektedir. Peptidoglikan içinde bulunan diamino asit, L-lizindir. Genellikle kapsül oluşturmaz veya sınırlı kapsül oluşumu görülmektedir. *Staphylococcus* cinsinin DNA içeriğinde G+C miktarı % 27 - 41'dir (Schleifer ve Bell, 2015). *Staphylococcus* cinsine ait türler fakültatif anaerobtur ancak *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* ve *Staphylococcus saccharolyticus* aerobik koşullarda daha hızlı ve bol miktarda üremektedir (Schleifer ve Bell, 2015). *Staphylococcus* cinsine ait türler insanlarda, diğer memelilerde ve kuşlarda deri, deri bezleri ve mukoz membranda yaşayabilmektedir. Konak ve niş tercihleri türlere ve alt türlere göre çeşitlilik göstermektedir. Bazı *Staphylococcus* türleri et, süt, peynir gibi çeşitli hayvansal ürünlerden ve çevresel kaynaklardan (toprak, kum, toz, hava veya su) izole edilebilmektedir. Tuza karşı toleranslıdırlar ve kanlı besiyerinde iyi gelişme gösterirler. Bazı türler insan veya hayvanların fırsatçı patojenleridir (Kloos ve Schleifer 1975; Sneath ve ark., 1986).

Staphylococcus equorum

Staphylococcus equorum iki adet alt türe sahiptir. Bunlar; *Staphylococcus equorum* subsp. *equorum* (Schleifer ve ark., 1985) ve *Staphylococcus equorum* subsp. *linens* 'tir (Place ve ark., 2003). *Staphylococcus equorum* ilk olarak at derisinden izole edilmiştir. *Staphylococcus equorum* subsp. *linens* ise kırmızı lekelere sahip bir peynirin yüzeyinden izole edilmiştir (Schleifer ve Bell, 2015). *Staphylococcus equorum*, katalaz pozitif, 0.5 - 1.8 μ m çapında koloniler oluşturan, kloramfenikol ve novobiyosin antibiyotiklerine karşı dirençli, optimum üreme gösterdiği sıcaklık 30 °C olarak saptanmış mikroorganizmadır

(Schleifer ve ark., 1985). *Staphylococcus equorum*, % 10 tuz içeren kompleks agar besiyerinde krem renkte koloniler oluşturan, gram pozitif, kokoid şeklinde morfolojik yapıya sahip, % 10 tuz içeren ortamlarda, 37 °C de ve pH 7’de optimum üreme gösteren, endospor oluşturmeyen, hareketsiz, pozitif katalaz ve metil-red reaksiyonları gösteren, oksidaz reaksiyonu negatif olan mikroorganizmadır. Triptofandan indol oluşturmeyen, Voges-Proskauer reaksiyonu negatif olan, sitratı tek karbon kaynağı olarak kullanmayan, nitratı nitrite indirgeyen fakat N₂ gazı oluşturmeyen, H₂S üretmeyen ancak peptondan amonyak oluşturabilen laktoz, sukroz ve D-glukoza kullanabilen, D-galaktoz, D-trehaloz, D-melibiyoz, D-mannoz, L-arabinoz, D-ksiloz, D-sellobiyoz ve riboz gibi farklı karbon kaynaklarını kullanarak asit üretebilen, dulcitol, D-sorbitol, metanol, salisin, Myo-inositol, L-ramnoz, ksilitol, benzoat, propiyonat, fruktoz, D-melezitoz, format, tartarat, propanol, bütanol ve maltoz gibi karbon kaynaklarını kullanamayan, L-arginin, L-glisin, L-Alanin, L-prolin ve L-hidroksiprolin dekarboksilasyon testleri pozitif, L-sistein ve L-tirozin dekarboksilasyon testleri negatif olan bakteri türüdür. *Staphylococcus equorum*’un proteaz, üreaz, lesitinaz ve β-galaktosidaz enzim reaksiyonları pozitif, amilaz, DNaz, selülaz, kazeinaz, lipaz, pullunaz, ksilinaz ve fosfolipaz enzim reaksiyonları negatiftir (Birbir ve ark., 2015; Çağlayan, 2015; Çağlayan ve ark., 2017).

***Chromohalobacter* Cinsi**

Chromohalobacter cinsinin günümüze kadar tanımlanmış 8 türü bulunmaktadır. *Chromohalobacter beijerinckii* (Peçonek ve ark., 2006), *Chromohalobacter canadensis* (Huval ve ark., 1996; Arahal ve ark., 2001), *Chromohalobacter israelensis* (Huval ve ark., 1996; Arahal ve ark., 2001), *Chromohalobacter japonicus* (Sánchez-Porro ve ark., 2007), *Chromohalobacter nigrandesensis* (Prado ve ark., 2006), *Chromohalobacter marismortui* (Elazari-Volcani,1940; Ventosa ve ark.,1989), *Chromohalobacter salexigens* (Arahal ve ark.,2001) ve *Chromohalobacter sarecensis* (Quillaguamán ve ark., 2004) türleri *Chromohalobacter* cinsine ait türlerdir (Euzéby, 1997; <http://www.bacterio.net/>, Erişim Tarihi Şubat 2019). *Chromohalobacter* cinsine ait türler Gram negatif, çomak şeklinde hücrelere ve 0.6 – 1.2 µm çapında kolonilere sahip, hareketli ve spor oluşturmeyen ılımlı halofilik mikroorganizmalardır. Üreme için tuz gereklidir, bu cinse ait türler için optimum tuz oranı % 8 - 10 arasındadır. Optimum gelişme koşulları, 30 – 37 °C, 7.5 pH ve % 8 - 10 oranında tuz miktarıdır. *Chromohalobacter* cinsine ait mikroorganizmalar aerobiktir,

katalaz reaksiyonları pozitif, oksidaz reaksiyonları ise negatiftir (Huval ve ark., 1995; Arahal ve ark., 2001). *Chromohalobacter* cinsinin tip suşu *Chromohalobacter marismortui* 'dir (Elazari-Volcani, 1940; Ventosa ve ark., 1989). *Chromohalobacter* cinsine ait çoğu tür jelatini hidrolize edemez ancak bazı türlerin de jelatini sindirebildiği bildirilmiştir (Sanchez-Porro ve ark., 2007).

Chromohalobacter canadensis

Chromohalobacter canadensis'in ilk tip izolatu Kanada'dan izole edilmiştir (Matheson ve ark., 1976). *Chromohalobacter canadensis* türü 15°C - 30°C arasındaki sıcaklık değerlerinde % 3 - 25 NaCl içeren ortamda gelişme gösterirken, 45°C 'de % 8 - 32 NaCl içeren ortamda gelişmektedir. Optimum gelişme koşulları % 7.5 NaCl, 30°C ve pH 5 ile 9 arasındadır (Huval ve ark., 1996; Arahal ve ark., 2001). *Chromohalobacter canadensis*, % 10 tuz içeren kompleks agar besiyerinde beyaz renkte koloniler oluşturan, gram negatif, çomak şeklinde morfolojik yapıya sahip, % 7.5 - 10 tuz içeren ortamlarda, 30°C - 37°C'de ve pH 7'de optimum üreme gösteren, endospor oluşturmeyen, hareketli ve flagellaya sahip, pozitif katalaz reaksiyonu gösteren, oksidaz ve Voges-Proskauer reaksiyonları negatif olan mikroorganizmadır. Triptofandan indol oluşturabilen ve metil-red reaksiyonu pozitif olan, sitratı tek karbon kaynağı olarak kullanmayan, nitratı nitrite indirgeyen fakat N₂ gazı oluşturmeyen, H₂S üretmeyen ancak peptondan amonyak oluşturabilen laktoz ve D-glukozu kullanabilen, D-galaktoz D-melibiyoz, D-mannoz, L-arabinoz, D-ksiloz, metanol, D-melezitoz, D-sellobiyoz ve maltoz gibi farklı karbon kaynaklarını kullanarak asit üretebilen, dulcitol, D-sorbitol, salisin, *Myo*-inositol, L-ramnoz, ksilitol, benzoat, D-trehaloz, propiyonat, fruktoz, format, tartarat, propanol, sukroz, riboz ve bütanol gibi karbon kaynaklarını kullanamayan, L-arginin, L-glisin, L-Alanin, L-tirozin, L-prolin ve L-hidroksiprolin dekarboksilasyon testleri pozitif, L-sistein dekarboksilasyon testi negatif olan bakteri türüdür. *Chromohalobacter canadensis*'in proteaz ve lipaz enzim reaksiyonları pozitif, amilaz, DNaz, β-galaktosidaz, selülaz, üreaz, lesitinaz, kazeinaz, pullunaz, ksilinaz ve fosfolipaz enzim reaksiyonları negatiftir (Birbir ve ark., 2015; Çağlayan, 2015; Çağlayan ve ark., 2017).

***Halomonas* Cinsi**

Halomonas cinsine ait türler, Ölü Deniz ve Kanada'dan (Huval ve ark., 1995), nehir ağzlarından (Hebert ve Vreeland, 1987), Antarktika'dan (Franzmann ve ark., 1987; James ve ark., 1990), Büyük Tuz Gölü, Utah'dan (Fendrich, 1988), Bonaire Adası, Hollanda Antilleri'ndeki bir tuz tesisinden (Vreeland ve ark., 1980) ve Pasifik Okyanusu'ndan (Baumann ve ark., 1983) izole edilmiştir ve şimdiye kadar tanımlanmış 94 türü bulunmaktadır (Euzéby, 1997; <http://www.bacterio.net/>, Erişim Tarihi Şubat 2019). *Halomonas halodenitrificans* türünün kokoid morfolojisi dışında tüm *Halomonas* türleri çomak şeklinde hücrelere sahip, hareketli, beyaz ya da sarı renkli kolonilere sahip Gram negatif, katalaz ve oksidaz reaksiyonları pozitif olan mikroorganizmalardır. Halotolerant ve ılımlı halofil olarak tanımlanan *Halomonas* türleri % 0.1 – 32.5 oranları arasında NaCl içeren ortamlarda gelişme göstermektedir. *Halomonas elongata* türü, ozmotik şoka maruz kaldığında plazmolize uğrayabilmektedir ancak plazmoliz olmuş mikroorganizmalar canlılıklarını kaybetmezler ve sahip oldukları ektoin gibi organik ozmotik bileşiklerin artmasıyla hücre içi dengeyi sağladıktan sonra gelişmeye devam etmektedir (Vreeland, 2005). *Halomonas* cinsine ait türler üretikleri halofilik enzimler, çözünen uyumlu bileşikler ve ekzopolisakkaritler sebebiyle biyoteknolojik açıdan dikkat çeken mikroorganizmalardır (Ventosa ve Nieto, 1995).

Halomonas eurihalina

Halomonas eurihalina, Quesada ve arkadaşları (1990) tarafından İspanya'da Alicante yakınlarında bulunan tuzlu bir kaynaktan izole edildiğinde *Volcaniella eurihalina* olarak isimlendirilmiştir. Ancak Mellado ve arkadaşları (1995) yaptıkları çalışmada, bu mikroorganizmanın *Halomonas* cinsinin genetik özelliklerini taşıdığını 16S rRNA yöntemiyle göstermişlerdir ve adını *Halomonas eurihalina* olarak yenilemişlerdir. İlimli halofil bir mikroorganizma olan *Halomonas eurihalina*, % 7.5 NaCl 32 °C'deki sıcaklıkta 72 saat boyunca üretildiğinde, 4 - 5 mm çapında opak, krem renkli ve mukoid yapıda kolonilere sahip olduğu görülmüştür. Na⁺ iyonlarına gereksinim duyar ve kültür ortamında NaCl, Na₂SO₄ veya NaBr tuzlarından Na⁺ iyonları sağlanabilmektedir (Quesada ve ark., 1990). Quesada ve arkadaşları 1993 yılında yaptıkları bir çalışmada, *Halomonas eurihalina* bakterisinin F2-7 suşunun % 7.5 NaCl ve 32 °C'deki sıcaklık değerinde, yüksek

iyonik dayanıklılığa, termostabiliteye ve asidik pH değerlerinde çözeltilerin viskozitesini artırma kapasitesine sahip ve psödoplastik davranış sergileyen bir ekzopolisakkarit ürettiğini saptamışlardır. Bu özellikler, gıda endüstrisinde özellikle pH'ın genellikle asidik olduğu ortamlarda bir katkı maddesi olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Bejar ve arkadaşları (1998), *Halomonas eurihalina* suşlarından yüksek oranda elde ettikleri ekzopolisakkaritlerin önemli miktarlarda sülfat içerdiğini saptamıştır. Sülfat içeren polisakkaritler, ilaç endüstrisinde için antikoagülan (Nishino ve ark., 1989), antitümoral (Inoue ve ark., 1988) ve antiviral (Okutani, 1992) gibi uygulama alanı bulmaktadır. *Halomonas eurihalina*, % 10 tuz içeren kompleks agar besiyerinde krem renkte koloniler oluşturan, gram negatif, çomak şeklinde morfolojik yapıya sahip, % 10 tuz içeren ortamlarda, 37 °C'de ve pH 7'de optimum üreme gösteren, endospor oluşturmeyen, hareketli ve flagellaya sahip, pozitif katalaz ve oksidaz reaksiyonları gösteren, Voges-Proskauer reaksiyonu negatif olan mikroorganizmadır. Triptofandan indol oluşturmeyen ve metil-red reaksiyonu pozitif olan, sitratı tek karbon kaynağı olarak kullanmayan, nitratı nitrite indirgeyen fakat N₂ gazı oluşturmeyen, H₂S üretebilen ve peptondan amonyak oluşturabilen, laktoz, sukroz ve D-glukoza kullanabilen, D-galaktoz, D-trehaloz, D-mannoz, D-sellobiyoz, L-arabinoz, propiyonat, salisin, metanol, bütanol, fruktoz ve maltoz gibi farklı karbon kaynaklarını kullanarak asit üretebilen, dulcitol, D-sorbitol, D-ksiloz, D-melezitoz, Myo-inositol, L-ramnoz, ksilitol, benzoat, format, tartarat, propanol, D-melibiyoz ve riboz gibi karbon kaynaklarını kullanamayan, L-arginin, L-glisin, L-tirozin ve L-prolin dekarboksilasyon testleri pozitif, L-sistein, L-Alanin ve L-hidroksiprolin dekarboksilasyon testleri negatif olan bakteri türüdür. *Halomonas eurihalina*'nın proteaz, üreaz ve lipaz enzim reaksiyonları pozitif, amilaz, DNaz, β-galaktosidaz, selülaz, lesitinaz, kazeinaz, pullunaz, ksilinaz ve fosfolipaz enzim reaksiyonları negatiftir (Birbir ve ark., 2015; Çağlayan, 2015; Çağlayan ve ark., 2017).



2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Besiyeri, Çözelti ve Kimyasallar

2.1.1. Kullanılan Besiyerleri

%10 Tuz İçeren Kompleks Sıvı Besiyeri, % 10 Tuz İçeren Kompleks Agar, % 5 Tuz İçeren Kompleks Sıvı Besiyeri, % 5 Tuz İçeren Jelatin Agar, % 10 Tuz İçeren Jelatin Agar, % 5 Tuz İçeren Jelatinli Sıvı Besiyeri.

2.1.1.1. % 10 Tuz İçeren Kompleks Sıvı Besiyeri

Maya Özüdü: 5 g
TS10: 1000 ml
pH: 7.0
121°C'de 20 dakika otoklavda steril edilmiştir (Ventosa ve ark., 1982; Caglayan ve ark., 2017).

2.1.1.2. % 10 Tuz İçeren Kompleks Agar

Maya Özüdü: 5 g
Agar: 20 g
TS10: 1000 ml
pH: 7.0
121°C'de 20 dakika otoklavda steril edilmiştir (Ventosa ve ark., 1982; Caglayan ve ark., 2017).

2.1.1.3. % 5 Tuz İçeren Kompleks Sıvı Besiyeri

Maya Özüdü: 5 g
TS10: 500 ml
Distile Su: 500 ml

% 5 tuz içeren Kompleks Sıvı Besiyerlerinin pH değerleri 7, 8 ve 9 olarak ayarlandıktan sonra 121°C'de 20 dakika otoklavda steril edilmiştir (Ventosa ve ark., 1982; Caglayan ve ark., 2017).

2.1.1.4. % 5 Tuz İçeren Jelatin Agar

Maya Özütü	: 5 g
Agar	: 20 g
Jelatin	: 20 g
D-glikoz	: 1 g
TS10	: 500 ml
Distile Su	: 500 ml

% 5 Tuz içeren Jelatin Agar Besiyerlerinin pH' ları 7, 8 ve 9 olarak ayarlandıktan sonra 121°C'de 20 dakika otoklavda steril edilmiştir (Beşe, 1974; Birbir ve ark., 2015; Çağlayan, 2015; Sanchez-Porro, 2015).

2.1.1.5. % 10 Tuz İçeren Jelatin Agar

Maya Özütü	: 5 g
D-glikoz	: 1 g
Agar	: 20 g
Jelatin	: 20 g
TS10	: 1000 ml

% 10 Tuz içeren Jelatin Agar Besiyerlerinin pH' ları 7, 8 ve 9 olarak ayarlandıktan sonra 121°C'de 20 dakika otoklavda steril edilmiştir (Beşe, 1974; Birbir ve Çağlayan, 2015; Çağlayan, 2015; Sanchez-Porro, 2015).

2.1.1.6. % 5 Tuz İçeren Jelatinli Sıvı Besiyeri

Maya Özütü	: 0.5g
Jelatin	: 2 g
D-glikoz	: 0.1 g
TS10	: 50 ml
Distile Su	: 50 ml

% 5 Tuz içeren Jelatinli Sıvı Besiyerlerinin pH' ları 7, 8 ve 9 olarak ayarlandıktan sonra 121°C'de 20 dakika otoklavda steril edilmiştir (Beşe, 1974; Birbir ve ark., 2015; Çağlayan, 2015; Sanchez-Porro, 2015).

2.1.2. Kullanılan Çözelti ve Kimyasallar

% 30 Tuz içeren Tuzlu Su (TS30), % 10 Tuz içeren Tuzlu Su (TS10), 1.8N NaOH Çözeltisi, %10 Triklorasetik Asit Çözeltisi (TCA), 100 mM Tris-HCl Tampon Çözeltisi, % 1 Azokazein Çözeltisi, % 5 NaCl içeren Tuzlu Su Çözeltisi, Frazier Ayıracı, Bradford Reaktif, % 95 Etil Alkol Çözeltisi, İyot Çözeltisi, Safranin Çözeltisi , % 0,25 Kristal Viyole Çözeltisi.

2.1.2.1. % 30 Tuz içeren Tuzlu Su (TS30)

NaCl	: 234 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	: 39 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	: 61 g
CaCl ₂	: 1 g
KCl	: 6 g
NaHCO ₃	: 0.25 g
NaBr	: 0.7 g
Distile su	: 1000 ml

Bütün maddeler çözüldükten sonra tuzlu su çözeltisi filtre kağıdı ile süzülmüştür (Ventosa ve ark., 1982; Sanchez-Porro ve ark, 2003).

2.1.2.2. %10 Tuz içeren Tuzlu Su (TS10)

TS30	: 333 ml
Distile su	: 667 ml

121°C'de 20 dakika otoklavda steril edilmiştir (Ventosa ve ark., 1982; Sanchez-Porro ve ark, 2003).

2.1.2.3. 1.8 N NaOH Çözeltisi

NaOH	: 18 g
Distile Su	: 250 ml

2.1.2.4. % 10 Triklorasetik Asit Çözeltisi (TCA)

Triklorasetik Asit	: 10 ml
Distile Su	: 90 ml

Hazırlanan % 10'luk çözeltiden 10 ml alınarak distile su ile üzeri 100 ml'ye tamamlanmıştır (Secades, P. ve Guijarro J. A., 1999).

2.1.2.5. 100 mM TrisHCl Tampon Çözeltisi

TrisHCl: 15.8 g
MgCl₂.6H₂O: 1.012 g
Distile Su: 1000 ml

Bir miktar distile su içerisinde TrisHCl karıştırılarak çözdürüldükten sonra MgCl₂.6H₂O bu karışıma eklenmiştir. Tampon çözeltilerinin pH' ları 7, 8 ve 9 olarak ayarlandıktan sonra son hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır (Secades, P. ve Guijarro J. A., 1999).

2.1.2.6. % 1 Azokazein Çözeltisi

Azokazein: 1 g
100 mM TrisHCl Tamponu (pH 7,8,9): 100 ml

Üç farklı pH'da hazırlanan tampon çözeltiler içerisinde azokazein çözdürüldükten sonra son hacimleri 100 ml'ye tamamlanmıştır (Secades, P. ve Guijarro J. A. 1999).

2.1.2.7. % 5 NaCl İçeren Tuz Çözeltisi

NaCl: 50 g
Distile Su: 1000 ml

NaCl, distile su içerisinde çözdürüldükten sonra belirli miktarlarda deney tüplerine paylaştırılmıştır ve 121°C'de 20 dakika otoklavda steril edilmiştir.

2.1.2.8. Frazier Ayıracı

HCl:16 ml
HgCl₂:12.4 g
Distile Su: 80 ml

2.1.2.9. % 95 Etil Alkol Çözeltisi

Distile Su: 5 ml
Etil Alkol: 95 ml

2.1.2.10. İyot Çözeltisi

Potasyum iyodür: 2 g

İyot: 1 g

Potasyum iyodür ile iyot toz haline getirilmiştir ve 300 ml distile su içerisinde eritilmiştir (Harley ve Prescott, 2002).

2.1.2.11. Safranin Çözeltisi

% 95 Etil Alkol Çözeltisi: 100 ml

Safranin: 2.5 g

Distile Su: 90 ml

Stok olarak hazırlanmış safranin çözeltisi distile su ile 1:10 oranında sulandırılmıştır (Harley ve Prescott, 2002).

2.1.2.12. % 0,25 Kristal Viyole Çözeltisi

% 85'lik Kristal Viyole: 2 g

% 95 Etil Alkol Çözeltisi: 20 ml

Amonyum oksalat: 0.8 g

Distile Su: 80 ml

Amonyum oksalat distile su içerisinde çözündürüldükten sonra üzerine %85'lik Kristal Viyole ile % 95 Etil Alkol Çözeltisi karışımı eklenmiştir (Harley ve Prescott, 2002).

2.2. Çalışmamızda Kullanılan İlımlı Halofil Mikroorganizmalar

Marmara Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Bitki Hastalıkları ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonunda bulunan, tuzlanmış küçükbaş hayvan derilerinden izole edilip geleneksel ve moleküler yöntemle tanımlanan ılımlı halofil mikroorganizmalar bu çalışmada test izolatları olarak kullanılmıştır (Birbir ve ark., 2015; Çağlayan, 2015).

Tablo 2.1. Çalışmamızda kullanılan ılımlı halofil mikroorganizmaların izolat kodu, 16S rRNA dizisi uzunluğu, benzerliği ve filogenetik olarak benzediği tür.

İzolat Kodu	Uzunluk (bp)	Filogenetik Olarak Benzediği Tür	Benzerlik(%)
GAM3	1400	<i>Marinococcus tarijensis</i>	99.64
GA7	1348	<i>Staphylococcus equorum</i>	100
TR6	1377	<i>Chromohalobacter canadensis</i>	99.85
BL5	1372	<i>Halomonas eurihalina</i>	99.20

2.3. Kullanılan Laboratuvar Ekipmanları

Fen Edebiyat Fakültesi Bitki Hastalıkları ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Laboratuvarında bulunan Distile Su Cihazı (GFL), Terazi (Sartorius Analytic), Etüv (Nüve EN500), Otoklav (Web MLW), Pasteur Fırını (Kermanlar), Vorteks Tüp Karıştırıcısı (Nüve), Mikroskop (Olympus), Santrifüj (Sigma), Buzdolabı (Arçelik), Çalkalamalı Etüv (Edmund Bühler), pH Metre (WTW), Biyogüvenlik Kabini, Helios Zeta UV-Vis Çift Yollu Spektrofotometresi Thermo (Waltham, MA, USA), Su Banyosu ve Çeker Ocak'tan çalışmamız süresince faydalanılmıştır.

2.4. Yapılan Çalışmalar

Çalışmamızın basamakları aşağıdaki aşamalardan oluşmuştur;

1. İlımlı halofil izolatların sıvı besiyerinde üretilmesi,
2. İlımlı halofil izolatların saf kültür olup olmadıklarının incelenmesi,
3. İlımlı halofil izolatlar tarafından üretilen proteaz enzimlerinin aktivitelerinin farklı tuz konsantrasyonlarında, farklı pH ve farklı sıcaklık değerlerinde agarlı besiyerinde araştırılması,
4. Optimum koşullarda sıvı besiyerinde üretilen bakteri izolatlarının proteaz enzimi üretimlerinin spektrofotometrik yöntemle saptanması,
5. Bradford metodu ile protein miktarının belirlenmesi.

2.4.1. İlımlı halofil izolatların sıvı besiyerinde üretilmesi

Fen Edebiyat Fakültesi Bitki Hastalıkları ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonunda skim milk'de -20°C'deki saklanan ılımlı halofil izolatlardan alınarak ayrı ayrı pH'ı 7 olan steril % 10 tuz içeren Kompleks Sıvı

Besiyerlerine ekimleri yapılmış ve 24 saat etüvde bekletilmiştir.

2.4.2. Ilımlı halofil izolatların saf kültür olup olmadıklarının incelenmesi

Sıvı besiyerine ekimleri yapılan test izolatlarının 24 saatlik kültürlerinden pH'ı 7 olan % 10 Tuz İçeren Kompleks Agar Besiyerine azaltma yöntemiyle ekim yapılmıştır ve ekimleri yapılan izolatlar 37°C de 24 saat etüvde bekletilmiştir. İzolatların kontamine olup olmadığı hem besiyerindeki koloniler incelenerek hem de Gram boyama yöntemiyle hazırlanan preparatlarda kontrol edilmiştir. 24 saat etüvde bekletilmiş bakteri kolonilerinden öze ile alınmış ve steril distile su içerisinde sulandırılıp lam üzerine yayılmıştır. Isı ile muamele edilerek bakteriler lam üzerinde sabitlenmiştir. Hazırlanan preparat üzerine kristal viyole dökülmüş ve 1 dakika bekletildikten sonra distile su ile kristal viyole uzaklaştırılmıştır. Daha sonra preparat üzerine iyot çözeltisi dökülüp 1 dakika bekletilmiştir. Distile su ile iyot çözeltisi uzaklaştırıldıktan sonra 20 saniye boyunca % 95 etil alkol çözeltisi ile preparat dekolorize edilmiştir. Distile su ile alkol uzaklaştırılmıştır. Ardından safranin çözeltisi ile 1-2 dakika muamele edilip distile su ile yıkanan preparat havada kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra preparat immersiyon objektif ile mikroskopta incelenmiştir (Madigan ve ark., 2012). Ilımlı halofil mikroorganizmalardan *Marinococcus tarijensis* ve *Staphylococcus equorum* Gram (+), *Chromohalobacter canadensis* ve *Halomonas eurihalina* Gram (-) reaksiyon göstermiştir.

2.4.3. Ilımlı halofil izolatlar tarafından üretilen proteaz enzimlerinin aktivitelerinin farklı tuz konsantrasyonlarında, farklı pH ve farklı sıcaklık değerlerinde agarlı besiyerinde araştırılması

Küçükbaş hayvan derilerinden izole edilen izolatların proteaz enzimi üretimleri, farklı tuz konsantrasyonlarında jelatin agar besiyerinde ayrı ayrı test edilmiştir. Kompleks sıvı besiyerinde izolatlar üretildikten sonra, her bir izolatın bakteri konsantrasyonları 0.5 No'lu McFarland (10^8 kob/ml) tüpüne göre ayarlanmıştır. Bu tüplerden 2 µl alınarak ayrı ayrı % 5 ve % 10 tuz içeren farklı pH değerlerine (7, 8, 9) sahip steril Jelatin Agar besiyerlerine konulmuştur ve bu petriyerler farklı sıcaklıklarda (24 °C, 30 °C ve 37 °C) 120 saat süreyle etüvde inkübe edilmiştir. İzolatların proteaz aktiviteleri, 120 saat süre boyunca 24 saatlik inkübasyon sürelerinin sonunda kontrol edilmiştir. Her kontrolde petrinin üzerini örtecek kadar Frazier ayırıcı dökülmüştür. Ayıraç döküldükten sonra

kolonilerin etrafında gözlenen şeffaf bölgeler pozitif proteolitik aktivite olarak değerlendirilmiştir ve cetvelle bu zon çapları ölçülmüştür (Çağlayan, 2015; Sánchez-Porro ve ark., 2003; Sanchez-Porro, 2005).

2.4.4. Optimum koşullarda sıvı besiyerinde üretilen bakteri izolatlarının proteaz enzimi üretimlerinin spektrofotometrik yöntemle saptanması

Proteaz enzimi üretiminin en yüksek olduğu tuz konsantrasyonu, pH ve sıcaklık koşullarında sıvı jelatin besiyerinde üretilen ılımlı halofil izolatların farklı inkübasyon sürelerinde proteaz enzimi üretimleri spektrofotometrik yöntemle saptanmıştır. Bu amaçla, ılımlı halofil test izolatları ayrı ayrı % 5 tuz içeren ve pH 7, 8, 9 olarak ayarlanmış kompleks agar besiyerlerine özeyle ekilerek 24 saat süreyle 37°C'deki etüvde bekletilmiştir. Agarlı besiyerinde üreyen saf ılımlı halofil test izolatları ayrı ayrı % 5 tuz içeren ve pH 7, 8, 9 olarak ayarlanmış kompleks sıvı besiyerlerine inoküle edilerek 24 saat süreyle 37°C'deki etüvde bekletilmiştir. Daha sonra izolatların bakteri süspansiyonlarından ayrı ayrı alınarak steril % 5 tuzlu su bulunan tüpe konulmuş ve bakteri yoğunluğu 0.5 No'lu McFarland (10^8 kob/ml) tüpüne göre ayarlanmıştır. Bakteri yoğunluğunun ayarlandığı bu bakteri süspansiyonlarından ayrı ayrı 100 µl alınarak 9.9 ml steril jelatin içeren sıvı besiyerlerine konulmuştur. Daha sonra bu bakteri süspansiyonlarından da 10 ml alınarak 90 ml jelatin içeren steril sıvı besiyerlerine konulmuş ve bakteri kültürleri 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Test izolatlarının deney öncesi bakteri sayılarını belirlemek amacıyla, bu besiyerlerinden 100 µl alınarak dilüsyonlar yapıldıktan sonra % 5 NaCl içeren ve pH 7, 8, 9 olarak ayarlanmış steril jelatin agar besiyerlerine ayrı ayrı 3 tekrarlı olarak ekilerek 37 °C' de 24 saat etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda izolatların deney öncesi bakteri sayıları hesaplanmıştır.

Bakteri ekimleri yapılan sıvı jelatin besiyerleri 37°C'de 6, 12, 24, 48, 72, 96 saat süreyle etüvde inkübe edilmiştir. Bu süreçte besiyerlerinden inkübasyon süreleri sonunda 1 ml alınarak ayrı ayrı steril eppendorf tüplerine konulmuştur. Test izolatlarına ait eppendorf tüpleri 1500 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek bakteriler çöktürüldükten sonra ekstraselüler proteaz içeren üst fazlar enzim tayini için ayrılmıştır. Üç ayrı pH'ta (pH 7,8,9) test izolatlarının proteolitik aktivite tayinleri azokazein substratı kullanılarak yapılmıştır. Üç

ayrı pH'ta hazırlanan enzim çalışma çözeltisi (pH 7,8,9) ile yapılan aktivite tayin çalışmalarında 120 µl enzim içeren üst faz ayrı ayrı tüplere konularak üstüne 480 µl azokazein çözeltisi (%1 azokazein (g/ml) ve 5 mM MgCl₂ içeren 100 mM Tris tamponu (pH 7,8,9)) eklenmiş ve 37 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Reaksiyon, ortama 600 µl %10'luk triklorasetik asit eklenerek durdurulmuştur ve 30 dakika buzun üstünde bekletilmiştir. Daha sonra örnekler 14000 rpm'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra 800 µl üst faz alınarak üzerine 200 µl 1.8 N NaOH eklenerek karıştırılmış ve ardından çözeltinin absorbansı spektrofotometrede 420 nm'de okunmuştur. Tüm çalışmalar üç kontrollü olarak yapılmıştır. Bir ünite proteaz aktivitesi 30 dakikada, 37 °C'de ve 420 nm'de 0.01 lik absorbans artışına neden olan miktar olarak tanımlanmıştır (Secades ve Guijarro, 1999).

Tablo 2.2. Proteaz enziminin spektrofotometrik ölçümü için hazırlanan çözeltilerin içeriği.

Proteaz Ölçümü	Bakteri Süpernatantı	Substrat (Azokazein)	Triklorasetik asit	NaOH	Trisma-base
Bakteri Örneği	120 µl	480 µl	600 µl	200 µl	-
Kör	-	480 µl	600 µl	200 µl	120 µl

2.4.5. Bradford metodu ile protein miktarının belirlenmesi

İlımlı halofil bakteriler farklı pH değerlerine sahip (7, 8, 9), % 5 tuz içeren jelatinli sıvı besiyerlerine ayrı ayrı ekilmiş ve 37°C'deki etüve konularak inkübasyona bırakılmıştır. Bu besiyerlerinden 6, 12, 24, 48, 72, 96 saatlik inkübasyon süreleri sonunda 1ml alınarak ayrı ayrı steril eppendorf tüplerine konulmuştur. Test izolatlarına ait eppendorf tüpleri 1500 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek bakteriler çöktürüldükten sonra üst fazlar Bradford metoduyla protein tayini için ayrılmıştır. 798 µl steril distile su içeren tüpler üzerine 200 µl Coomassie Brilliant Blue boyasından (BIO-RAD Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent) konulduktan sonra 2 µl üst faz sıvıları ayrı ayrı tüplere eklenmiştir. Tüpler 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 595 nm'de spektrofotometrede okunmuştur (Bradford, 1976). Tüm çalışmalar üç kontrollü olarak yapılmıştır.

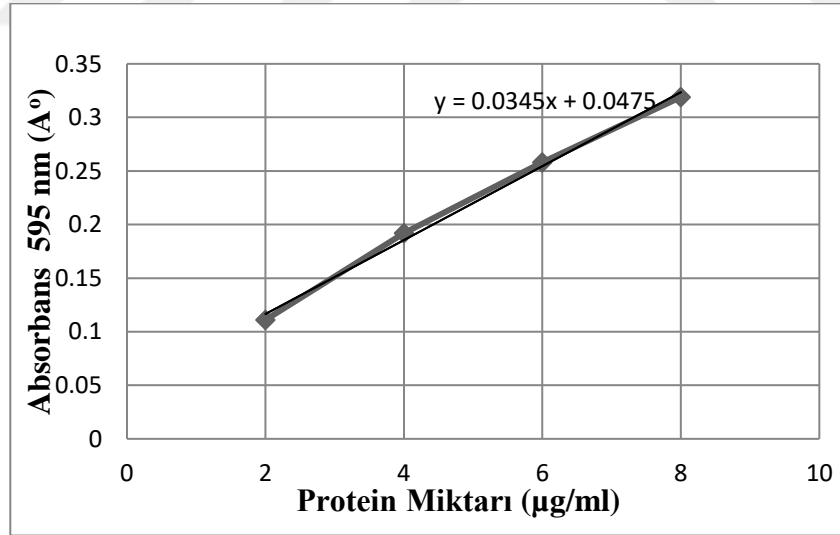
Standart grafik için 2 mg/ml ovalbümin stok çözeltisi distile su kullanılarak aşağıdaki tabloya göre seyreltilmiş ve tüplerin üzerine 200 µl Bradford reaktifi eklenmiştir.

Hazırlanan çözeltiler oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildikten sonra absorbansı spektrofotometrede 595 nm’de ölçülmüştür.

Tablo 2.3. Bradford metodu standardı için hazırlanan çözeltilerin içeriği.

Tüp No.	Ovalbümin Stok Çözeltisi (µl)	Bradford Reaktifi (µl)	Distile Su (µl)	Spektrofotometrede Okunan Absorbans (A°)
1	0	200	800	0
2	20	200	780	0.111
3	40	200	760	0.192
4	60	200	740	0.258
5	80	200	720	0.318

Üstteki tabloya göre hazırlanan çözeltilerin absorbansları spektrofotometrede ölçüldükten sonra protein miktarları ile okunan absorbans değerleri kullanılarak alttaki grafik çizilmiş ve denklem elde edilmiştir.



Şekil 2.1. Ovalbümin (BSA) ile hazırlanan standart grafik.

Üstteki grafikte $y = 0.0345x + 0,0475$ denkleminde bulunan “y” değeri yerine bakteri çözeltilerini içeren örneklerin ölçülen absorbans değerleri konularak besiyerlerindeki protein miktarları (denklemdaki x değeri) µg cinsinden hesaplanmıştır.

3.BULGULAR VE TARTIŞMA

Çalışmamızda ılımlı halofil izolatlar tarafından üretilen proteaz enziminin farklı tuz konsantrasyonlarında (% 5 ve % 10) , farklı pH (7, 8 ve 9) ve farklı sıcaklık değerlerinde (24°C, 30°C ve 37°C) jelatin içeren agarlı besiyerinde aktiviteleri araştırılmıştır. İzolatların proteaz aktiviteleri her inkübasyon periyodu (24, 48, 72, 96, 120) sonunda oluşturdukları zon çapları ölçülerek saptanmıştır.

Proteaz aktivitesinin tayini için kazein ve jelatin maddelerinin sıklıkla kullanıldığı yapılan çalışmalarda görülmektedir (Gupta ve ark., 2005; Hameed ve ark., 1996; Birbir ve ark., 2007; Cui ve ark., 2015; Sanchez-Porro ve ark., 2003; Amoozegar ve ark., 2007; Birbir ve ark., 2004; Birbir ve ark., 2003). Bizim çalışmamızda da test izolatlarının proteaz aktivitelerinin saptanmasında jelatin kullanılmıştır.

İzolatların 24°C’ deki, pH’ı 7 olan ve % 5 tuz içeren jelatin agar besiyerlerindeki sonuçlarına göre *Chromohalobacter canadensis* 120 saatlik periyodun sonunda 4.4 cm ile en büyük zon çapına sahip bakteri olurken, *Halomonas eurihalina*’nın ise 2.7 cm ile en küçük zon oluşturan bakteri olarak tespit edilmiştir. *Marinococcus tarijensis* ve *Staphylococcus equorum* mikroorganizmaları sırasıyla 4.3 cm ve 4.2 cm zon çapı oluşturmuştur. (Tablo 3.1).

İzolatların % 5 tuz içeren, pH değeri 8 olarak ayarlanmış jelatin agar besiyerinde ve 24°C’ deki etüvde 120 saat boyunca bekletildikten sonra zon çapları ölçüldüğünde, *Chromohalobacter canadensis* ve *Marinococcus tarijensis* bakterileri 4.5 cm ile en fazla zon çapına sahipken, *Halomonas eurihalina*’nın ise 2.9 cm zon ile en az zon çapına sahip bakteri olduğu saptanmıştır. *Staphylococcus equorum* bakterisi bu sürenin sonunda 4 cm zon çapına sahip olmuştur (Tablo 3.1)

Marinococcus tarijensis bakterisi 24°C’ deki, pH’ı 9 olan ve % 5 tuz içeren jelatin agar besiyerlerindeki 120 saatlik inkübasyon sonunda 4.8 cm ile en büyük zon çapına sahip olurken, *Halomonas eurihalina* oluşturduğu 2.6 cm zon çapıyla en küçük zon çapına sahip bakteri olmuştur. *Staphylococcus equorum* ve *Chromohalobacter canadensis* sırasıyla 4.3 cm ve 4.2 cm zon oluşturmuşlardır (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. İzolatların % 5 tuz içeren jelatin agar besiyerinde, 24°C’de farklı inkübasyon sürelerinde zon çapları.

pH Değerleri	İzolatlar	İnkübasyon Süreleri (saat) ve Zon Çapları (cm)				
		24	48	72	96	120
pH 7	<i>Marinococcus tarijensis</i> (GAM3)	1.1	2.0	2.6	3.4	4.3
	<i>Staphylococcus equorum</i> (GA7)	1.1	2.1	2.9	3.5	4.2
	<i>Chromohalobacter canadensis</i> (TR6)	1.4	2.4	3.4	3.7	4.4
	<i>Halomonas eurihalina</i> (BL5)	0.3	0.9	2.0	2.2	2.7
pH 8	<i>Marinococcus tarijensis</i> (GAM3)	1.0	2.0	3.0	4.1	4.5
	<i>Staphylococcus equorum</i> (GA7)	1.3	2.2	3.2	3.7	4.0
	<i>Chromohalobacter canadensis</i> (TR6)	1.8	2.5	3.4	3.8	4.5
	<i>Halomonas eurihalina</i> (BL5)	0.6	1.6	2.1	2.6	2.9
pH 9	<i>Marinococcus tarijensis</i> (GAM3)	0.9	1.8	2.9	3.9	4.8
	<i>Staphylococcus equorum</i> (GA7)	1.4	2.3	3.1	4.0	4.3
	<i>Chromohalobacter canadensis</i> (TR6)	1.3	2.3	3.0	3.9	4.2
	<i>Halomonas eurihalina</i> (BL5)	0.5	1.5	2.1	2.4	2.6

Marinococcus tarijensis ve *Staphylococcus equorum* 4.8 cm ve 4.3 cm zon çaplarıyla 24°C ‘deki ve % 5 tuz içeren besiyerindeki sonuçlar içerisinde en fazla proteaz aktivitesini pH 9’da göstermişlerdir. *Halomonas eurihalina* ise tüm pH değerlerinde diğer bakterilere kıyasla daha az proteaz aktivitesine sahip olmuş, en çok proteaz aktivitesini ise 2.9 cm zon çapıyla pH 8’deki besiyerinde göstermiştir. *Chromohalobacter canadensis* izolatı da en çok proteaz aktivitesini pH 8’deki besiyerinde göstermiştir. (Tablo 3.1).

Chromohalobacter canadensis 24°C'deki ve % 10 tuz içeren, pH değeri 7 olarak ayarlanmış jelatin agar besiyerinde 120 saatlik deney periyodunun sonucunda sahip olduğu 3.0 cm zon çapıyla en fazla proteaz aktivitesi gösteren bakteri olmuştur. *Halomonas eurihalina* ise 1.9 cm zon çapına sahip olarak en az proteaz aktivitesi gösteren bakteri olmuştur. *Staphylococcus equorum* ve *Marinococcus tarijensis* sırasıyla 2.8 cm ve 2.4 cm zon çaplarıyla *Chromohalobacter canadensis*'i takip etmişlerdir (Tablo 3.2).

İlımlı halofil izolatlardan *Chromohalobacter canadensis*, % 10 tuz içeren, pH değeri 8 olarak ayarlanmış jelatin agar besiyerinde ve 24°C'lik etüvde 120 saatlik deney periyodunun sonucunda 3.4 cm zon çapı oluşturarak en fazla proteaz aktivitesi gösteren bakteriyken, *Marinococcus tarijensis* 2.6 cm zon çapı oluşturarak en az proteaz aktivitesi gösteren bakteri olmuştur. *Staphylococcus equorum* ve *Halomonas eurihalina* ise sırayla 2.8 cm ve 2.7 cm zon çapı oluşturmuşlardır (Tablo 3.2)

İzolatların % 10 tuz içeren, pH değeri 9 olarak ayarlanmış jelatin agar besiyerinde ve 24°C' deki etüvde 120 saat boyunca bekletildikten sonra zon çapları ölçüldüğünde, *Chromohalobacter canadensis*'in 3.0 cm zon çapıyla en fazla proteaz aktivitesi gösteren, *Staphylococcus equorum*'un ise 1.5 cm zon çapına sahip olarak en az proteaz aktivitesi gösteren bakteriler oldukları görülmektedir. *Marinococcus tarijensis* ve *Halomonas eurihalina* sırasıyla 2.4 cm ve 2.1 cm zon çapı oluşturmuşlardır (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. İzolatların % 10 tuz içeren jelatin agar besiyerinde, 24°C’de farklı inkübasyon sürelerinde zon çapları.

pH Değerleri	İzolatlar	İnkübasyon Süreleri (saat) ve Zon Çapları (cm)				
		24	48	72	96	120
pH 7	<i>Marinococcus tarijensis</i> (GAM3)	0.5	0.8	1.7	2.1	2.4
	<i>Staphylococcus equorum</i> (GA7)	0.5	0.9	1.8	2.3	2.8
	<i>Chromohalobacter canadensis</i> (TR6)	0.5	1.1	2.0	2.5	3.0
	<i>Halomonas eurihalina</i> (BL5)	0.2	0.3	0.6	1.6	1.9
pH 8	<i>Marinococcus tarijensis</i> (GAM3)	0.5	1.2	1.9	2.4	2.6
	<i>Staphylococcus equorum</i> (GA7)	0.4	0.9	1.9	2.4	2.8
	<i>Chromohalobacter canadensis</i> (TR6)	0.7	1.5	2.3	2.7	3.4
	<i>Halomonas eurihalina</i> (BL5)	0.3	0.5	1.4	2.2	2.7
pH 9	<i>Marinococcus tarijensis</i> (GAM3)	0.3	0.6	1.5	2.1	2.4
	<i>Staphylococcus equorum</i> (GA7)	0.5	0.5	0.8	1.0	1.5
	<i>Chromohalobacter canadensis</i> (TR6)	0.6	1.0	2.0	2.6	3.0
	<i>Halomonas eurihalina</i> (BL5)	0.3	0.4	1.2	1.5	2.1

Marinococcus tarijensis, *Halomonas eurihalina* ve *Chromohalobacter canadensis* ılımlı halofil izolatları 24°C ‘deki ve % 10 tuz içeren besiyerindeki sonuçlar içerisinde en fazla proteaz aktivitesini pH 8’de göstermişlerdir. Bununla birlikte *Staphylococcus equorum* izolatı, 120 saatlik inkübasyon süresi sonunda en yüksek proteaz aktivitesini pH 7 ve pH 8 değerlerinde göstermiştir (Tablo 3.2).

İlimli halofil izolatlarından *Chromohalobacter canadensis* ve *Staphylococcus equorum* % 5 tuz içeren, pH değeri 7 olarak ayarlanmış jelatin agar besiyerinde ve 30°C' deki 120 saatlik periyodun sonunda sahip oldukları 4.9 cm ile en fazla proteaz aktivitesi gösteren bakteriler olurken *Halomonas eurihalina* ise 3.1 cm zon çapına sahip olarak en az proteaz aktivitesi gösteren bakteri olmuştur. *Marinococcus tarijensis* izolatu 4.8 cm zon oluşturarak proteaz aktivitesi göstermiştir (Tablo 3.3).

Chromohalobacter canadensis ilimli halofil izolatu 30°C' deki, % 5 tuz içeren ve pH değeri 8 olarak ayarlanmış jelatin agar besiyerinde 120 saatlik deney periyodunun sonunda sahip olduğu 5.2 cm ile en fazla proteaz aktivitesi gösteren bakteri olurken *Marinococcus tarijensis* ise 4.6 cm zon çapına sahip olarak en az proteaz aktivitesi gösteren bakteri olmuştur. *Halomonas eurihalina* ve *Staphylococcus equorum* sırasıyla 5.1 ve 4.8 cm zon çapı oluşturarak proteaz aktivitesi göstermişlerdir (Tablo 3.3).

Marinococcus tarijensis bakterisi, % 5 tuz içeren, pH değeri 9 olarak ayarlanmış jelatin agar besiyerinde ve 30°C' deki etüvde, 120 saatlik deney periyodunun sonunda 4.8 cm ile en fazla proteaz aktivitesi gösteren, *Halomonas eurihalina* ise oluşturduğu 3.5 cm zon çapıyla en az proteaz aktivitesi gösteren bakteri olmuştur. *Staphylococcus equorum* ve *Chromohalobacter canadensis* 4.0 cm çapında zon oluşturarak proteaz aktivitesi göstermişlerdir (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. İzolatların % 5 tuz içeren jelatin agar besiyerinde, 30°C’de farklı inkübasyon sürelerinde zon çapları.

pH Değerleri	İzolatlar	İnkübasyon Süreleri (saat) ve Zon Çapları (cm)				
		24	48	72	96	120
pH 7	<i>Marinococcus tarijensis</i> (GAM3)	1.6	2.3	3.3	4.4	4.8
	<i>Staphylococcus equorum</i> (GA7)	1.6	2.5	2.7	4.3	4.9
	<i>Chromohalobacter canadensis</i> (TR6)	1.7	2.6	3.6	4.4	4.9
	<i>Halomonas eurihalina</i> (BL5)	0.5	1.3	2.1	2.8	3.1
pH 8	<i>Marinococcus tarijensis</i> (GAM3)	1.3	2.7	3.7	4.1	4.6
	<i>Staphylococcus equorum</i> (GA7)	1.6	2.4	3.7	4.0	4.8
	<i>Chromohalobacter canadensis</i> (TR6)	1.7	2.7	4.1	4.5	5.2
	<i>Halomonas eurihalina</i> (BL5)	0.9	1.9	2.2	2.9	5.1
pH 9	<i>Marinococcus tarijensis</i> (GAM3)	0.8	1.9	2.4	4.2	4.8
	<i>Staphylococcus equorum</i> (GA7)	1.5	2.4	3.1	4.0	4.0
	<i>Chromohalobacter canadensis</i> (TR6)	1.0	2.4	3.2	3.4	4.0
	<i>Halomonas eurihalina</i> (BL5)	0.8	1.7	2.3	2.6	3.5

Tüm izolatların 30°C ‘deki ve % 5 tuz içeren besiyerindeki sonuçlar içerisindeki zon çapları değerlendirildiğinde *Halomonas eurihalina* ve *Chromohalobacter canadensis* en iyi proteaz aktivitesini pH 8’de, *Staphylococcus equorum* pH 7’de ve *Marinococcus tarijensis* ise pH 7 ve pH 9 ‘da göstermişlerdir (Tablo 3.3).

Chromohalobacter canadensis 30°C sıcaklıkta, pH 7'de ve % 10 tuz içeren besiyerinde 120 saatlik deney sonunda sahip olduğu 3.3 cm zon çapıyla en fazla proteaz aktivitesi gösteren bakteri olurken *Halomonas eurihalina* ise 1.9 cm zon çapına sahip olarak en az proteaz aktivitesi gösteren bakteri olmuştur. *Staphylococcus equorum* ve *Marinococcus tarijensis* sırasıyla 3.1 ve 2.9 cm zon çaplarıyla proteaz aktivitesi göstermişlerdir (Tablo 3.4).

İzolatlardan *Chromohalobacter canadensis* 30°C sıcaklıkta, pH 8'de ve % 10 tuz içeren besiyerinde 120 saatlik periyodun sonucunda 3.7 cm zon çapı oluşturarak en fazla proteaz aktivitesi gösteren bakteriyken, *Marinococcus tarijensis* ve *Halomonas eurihalina* ise 2.7 cm zon çapı oluşturarak en az proteaz aktivitesi gösteren bakteriler olmuşlardır. *Staphylococcus equorum*'un 2.9 cm zon çapı oluşturduğu görülmektedir (Tablo 3.4).

İzolatların 30°C'de, % 10 tuzda ve pH 9'da 120 saatlik inkübasyon süresince proteolitik zon oluşumları incelendiğinde, *Chromohalobacter canadensis* sahip olduğu 2.9 cm zon çapıyla en fazla proteaz aktivitesi gösteren bakteri olmuştur. *Staphylococcus equorum*'un ise 2 cm zon çapına sahip olarak en az proteaz aktivitesi gösteren bakteri olduğu görülmektedir. *Marinococcus tarijensis* ve *Halomonas eurihalina* sırasıyla 2.7 cm ve 2.5 cm zon çapı oluşturmuşlardır (Tablo 3.4).

Tablo 3.4. İzolatların % 10 tuz içeren jelatin agar besiyerinde, 30°C’de farklı inkübasyon sürelerinde zon çapları.

pH Değerleri	İzolatlar	İnkübasyon Süreleri (saat) ve Zon Çapları (cm)				
		24	48	72	96	120
pH 7	<i>Marinococcus tarijensis</i> (GAM3)	0.8	1.4	1.9	1.9	2.9
	<i>Staphylococcus equorum</i> (GA7)	0.9	1.6	1.7	2.6	3.1
	<i>Chromohalobacter canadensis</i> (TR6)	1.1	1.3	2.1	2.4	3.3
	<i>Halomonas eurihalina</i> (BL5)	0.2	0.5	1.0	1.1	1.9
pH 8	<i>Marinococcus tarijensis</i> (GAM3)	1.0	1.6	2.1	2.7	2.7
	<i>Staphylococcus equorum</i> (GA7)	0.5	1.2	1.8	2.6	2.9
	<i>Chromohalobacter canadensis</i> (TR6)	0.8	1.4	2.3	3.1	3.7
	<i>Halomonas eurihalina</i> (BL5)	0.1	0.9	1.2	2.5	2.7
pH 9	<i>Marinococcus tarijensis</i> (GAM3)	0.5	0.5	1.5	2.5	2.7
	<i>Staphylococcus equorum</i> (GA7)	0.3	0.4	0.7	1.9	2.0
	<i>Chromohalobacter canadensis</i> (TR6)	0.2	1.0	2.0	2.5	2.9
	<i>Halomonas eurihalina</i> (BL5)	0.5	1.0	1.7	2.0	2.5

Tüm izolatların 30°C sıcaklıktaki ve % 10 tuz içeren besiyerindeki sonuçları değerlendirildiğinde *Halomonas eurihalina* ve *Chromohalobacter canadensis* en iyi proteaz aktivitesini pH 8’de, *Staphylococcus equorum* ve *Marinococcus tarijensis* pH 7’de göstermişlerdir (Tablo 3.4).

İzolatların 37°C’de, % 5 tuz içeren ve pH’ı 7 olan besiyerinde 120 saatlik inkübasyon süresince proteolitik zon oluşumları incelendiğinde, *Marinococcus tarijensis* 5.2 cm zon çapı oluşturarak en fazla proteaz aktivitesi gösterirken *Halomonas eurihalina* ise 4.0 cm zon çapına sahip olarak en az proteaz aktivitesi gösteren bakteri olmuştur. *Chromohalobacter canadensis* ve *Staphylococcus equorum* sahip oldukları 5.1 cm zon çapıyla proteaz aktivitesi göstermişlerdir (Tablo 3.5).

Marinococcus tarijensis ve *Staphylococcus equorum* 37°C sıcaklıkta, % 5 tuz içeren ve pH’ı 8 olan besiyerinde 120 saatlik periyodun sonunda sahip oldukları 6.0 cm büyüklükteki zon çaplarıyla en fazla proteaz aktivitesi gösteren bakterilerdir. *Halomonas eurihalina* ise 4.2 cm zon çapına sahip olarak bu koşullarda en az proteaz aktivitesi gösteren bakteri olmuştur. *Chromohalobacter canadensis* oluşturduğu 5.7 cm zon çapıyla proteaz aktivitesi göstermiştir (Tablo 3.5).

İzolatların % 5 tuz içeren ve pH’ı 9 olan besiyerinde, 37°C sıcaklıkta 120 saatlik inkübasyon süresince zon çapları incelendiğinde, *Marinococcus tarijensis* ve *Staphylococcus equorum* bakterileri 5.5 cm zon çaplarıyla en fazla proteaz aktivitesini gösterirken, *Halomonas eurihalina*’nın oluşturduğu 4.1 cm zon çapıyla en az proteaz aktivitesi gösteren bakteri olduğu saptanmıştır. *Chromohalobacter canadensis* 5.4 cm çapında zon oluşturarak proteaz aktivitesi göstermiştir (Tablo 3.5).

Tablo 3.5. İzolatların % 5 tuz içeren jelatin agar besiyerinde, 37°C’de farklı inkübasyon sürelerinde zon çapları.

pH Değerleri	İzolatlar	İnkübasyon Süreleri (saat) ve Zon Çapları (cm)				
		24	48	72	96	120
pH 7	<i>Marinococcus tarijensis</i> (GAM3)	2.4	3.4	4.0	4.5	5.2
	<i>Staphylococcus equorum</i> (GA7)	2.2	3.3	3.9	4.4	5.1
	<i>Chromohalobacter canadensis</i> (TR6)	2.6	3.3	4.6	5.0	5.1
	<i>Halomonas eurihalina</i> (BL5)	1.4	2.1	2.3	3.6	4.0
pH 8	<i>Marinococcus tarijensis</i> (GAM3)	2.2	3.2	4.3	4.7	6.0
	<i>Staphylococcus equorum</i> (GA7)	2.0	2.9	4.1	4.6	6.0
	<i>Chromohalobacter canadensis</i> (TR6)	1.1	3.3	4.1	4.9	5.7
	<i>Halomonas eurihalina</i> (BL5)	1.0	2.1	3.1	3.9	4.2
pH 9	<i>Marinococcus tarijensis</i> (GAM3)	2.0	3.4	4.0	5.5	5.5
	<i>Staphylococcus equorum</i> (GA7)	2.1	3.0	4.0	5.1	5.5
	<i>Chromohalobacter canadensis</i> (TR6)	2.2	3.1	4.1	5.1	5.4
	<i>Halomonas eurihalina</i> (BL5)	1.4	2.1	3.0	3.7	4.1

Marinococcus tarijensis, *Staphylococcus equorum*, *Halomonas eurihalina* ve *Chromohalobacter canadensis* izolatlarının 37°C’deki ve % 5 tuz içeren besiyerindeki sonuçlar içerisinde en iyi proteaz aktivitesini pH 8’de göstermişlerdir (Tablo 3.5).

Staphylococcus equorum 37°C sıcaklıkta, % 10 tuz içeren ve pH'ı 7 olan besiyerinde 120 saatlik periyodun sonunda sahip olduğu 4.7 cm ile en fazla proteaz aktivitesi gösteren bakteri olmuştur. *Halomonas eurihalina* ise 120 saatin sonunda 3.7 cm zon çapına sahip olarak en az proteaz aktivitesi gösteren bakteri olmuştur. *Marinococcus tarijensis* ve *Chromohalobacter canadensis* oluşturdukları sırasıyla 4.4 ve 4.3 cm zon çaplarıyla proteaz aktivitesi göstermişlerdir (Tablo 3.6).

İzolatlardan *Marinococcus tarijensis* % 10 tuz içeren, pH'ı 8 olan besiyerinde ve 37°C'lik etüvdeki 120 saatlik periyodun sonunda 4.7 cm zon çapıyla en fazla proteaz aktivitesi gösteren bakteri olurken *Halomonas eurihalina* ise 4.0 cm zon çapına sahip olarak bu koşullarda en az proteaz aktivitesi gösteren bakteri olmuştur. *Chromohalobacter canadensis* ve *Staphylococcus equorum* 120 saatlik inkübasyon periyodu sonunda sırasıyla oluşturdukları 4.6 ve 4.3 cm zon çaplarıyla proteaz aktivitesi göstermişlerdir (Tablo 3.6).

İzolatların % 10 tuz içeren ve pH'ı 9 olan besiyerinde, 37°C sıcaklıkta 120 saatlik inkübasyon süresince zon çapları incelendiğinde, *Chromohalobacter canadensis* 4.1 cm zon oluşturarak en fazla proteaz aktivitesi gösteren, *Halomonas eurihalina* oluşturduğu 3.5 cm zon çapıyla en az proteaz aktivitesi gösteren bakteri olmuştur. *Marinococcus tarijensis* ve *Staphylococcus equorum* bakterileri sırasıyla 4.0 ve 3.9 cm çapında zon oluşturarak proteaz aktivitesi göstermişlerdir (Tablo 3.6).

Tablo 3.6. İzolatların % 10 tuz içeren jelatin agar besiyerinde, 37°C’de farklı inkübasyon sürelerinde zon çapları.

pH Değerleri	İzolatlar	İnkübasyon Süreleri (saat) ve Zon Çapları (cm)				
		24	48	72	96	120
pH 7	<i>Marinococcus tarijensis</i> (GAM3)	1.0	2.1	3.0	4.1	4.4
	<i>Staphylococcus equorum</i> (GA7)	1.5	2.6	3.3	4.0	4.7
	<i>Chromohalobacter canadensis</i> (TR6)	1.2	2.2	3.2	4.0	4.3
	<i>Halomonas eurihalina</i> (BL5)	1.0	1.8	2.9	3.1	3.7
pH 8	<i>Marinococcus tarijensis</i> (GAM3)	1.5	2.2	3.0	3.5	4.7
	<i>Staphylococcus equorum</i> (GA7)	1.4	2.8	3.1	3.7	4.3
	<i>Chromohalobacter canadensis</i> (TR6)	1.8	2.3	3.3	3.9	4.6
	<i>Halomonas eurihalina</i> (BL5)	1.1	1.8	2.6	3.1	4.0
pH 9	<i>Marinococcus tarijensis</i> (GAM3)	1.2	2.0	3.0	3.4	4.0
	<i>Staphylococcus equorum</i> (GA7)	0.2	1.5	2.6	3.1	3.9
	<i>Chromohalobacter canadensis</i> (TR6)	1.4	2.2	3.1	3.6	4.1
	<i>Halomonas eurihalina</i> (BL5)	1.0	1.6	1.8	3.0	3.5

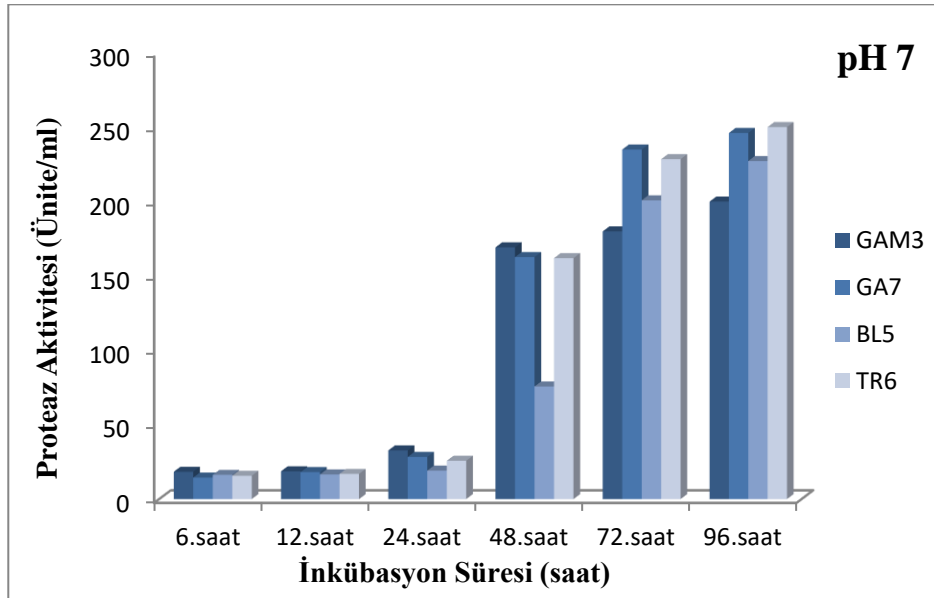
İlımlı halofil izolatların 37°C sıcaklıktaki ve % 10 tuz içeren besiyerlerindeki proteolitik zon oluşumlarına göre *Marinococcus tarijensis*, *Chromohalobacter canadensis* ve *Halomonas eurihalina* en iyi proteaz aktivitesini pH 8’de, *Staphylococcus equorum* ise pH 7’de göstermişlerdir (Tablo 3.6).

Çalışmamıza benzer olarak Çağlayan ve arkadaşları (2018) yaptıkları araştırmada tuzlanmış koyun ve keçi derilerinden izole ettikleri ılımlı halofil bakterilerin proteaz aktivitelerini % 2 jelatin içeren besiyerindeki şeffaf zonları belirleyerek tayin etmişlerdir.

Çalışmamızda ılımlı halofil izolatların % 5 tuz konsantrasyonunda, farklı pH değerlerinde (7, 8 ve 9) ve 37°C sıcaklıkta jelatin içeren sıvı besiyerinde proteaz enzimi aktiviteleri 96 saat süresince spektrofotometrik yöntemle araştırılmıştır. İzolatların proteaz aktiviteleri her inkübasyon periyodu (6, 12, 24, 48, 72, 96) sonunda ölçülmüştür ve ılımlı halofil test izolatların proteaz aktivitelerinin inkübasyon süresi boyunca arttığı gözlenmiştir.

Test izolatlarının % 5 tuz konsantrasyonunda, pH'ı 7 olan sıvı jelatin besiyerinde ve 37°C'de 6, 12, 24 saatlik inkübasyon periyotlarında düşük olan proteaz aktivitelerinin oldukça yavaş arttığı, 48. saat sonunda ise birden artış gösterdiği dikkat çekmektedir. Tüm izolatların proteolitik aktivitelerinin 96. saat sonunda 200.2 – 250.2 (U/ml) arasında değiştiği görülmektedir (Tablo 3.7).

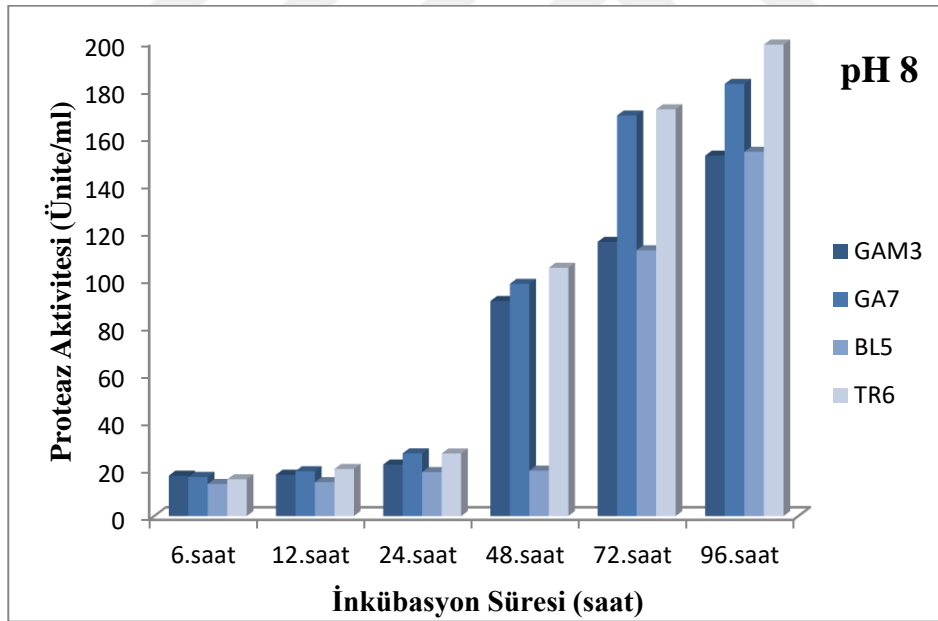
Marinacoccus tarijensis (GAM3), *Staphylococcus equorum* (GA7), *Chromohalobacter canadensis* (TR6) ve *Halomonas eurihalina* (BL5) test bakterilerinin pH 7'deki 96 saatlik deney sonuçlarına göre en fazla proteaz aktivitesi gösteren bakterinin 250.2 U/ml değeriyle *Chromohalobacter canadensis* olduğu, en az proteaz aktivitesi gösteren izolatın ise 200.2 U/ml değeriyle *Marinacoccus tarijensis* bakterisinin olduğu Şekil 3.1'de görülmektedir.



Şekil 3.1. İzolatların % 5 tuz içeren, pH'ı 7 olan sıvı jelatin besiyerinde, 37°C'de 96 saatlik inkübasyon süresince proteaz aktiviteleri (U/ml).

Ilımlı halofil test bakterilerinin % 5 tuz konsantrasyonunda, pH'ı 8 olan sıvı jelatin besiyerinde ve 37 °C' de ölçülen proteaz aktivitelerinin 6, 12, 24 saatlik inkübasyon periyotlarında yavaş arttığı, 48. saat sonunda ise *Halomonas eurihalina* haricindeki izolatların birden artış gösterdiği, *Halomonas eurihalina*'nın proteaz aktivitesinin ise 72. saatin sonunda aniden arttığı Tablo 3.7'de görülmektedir. Bu izolatların 96. saatin sonundaki proteolitik aktivitelerinin 152.1 – 198.8 (U/ml) değerleri arasında değiştiği görülmektedir (Tablo 3.7).

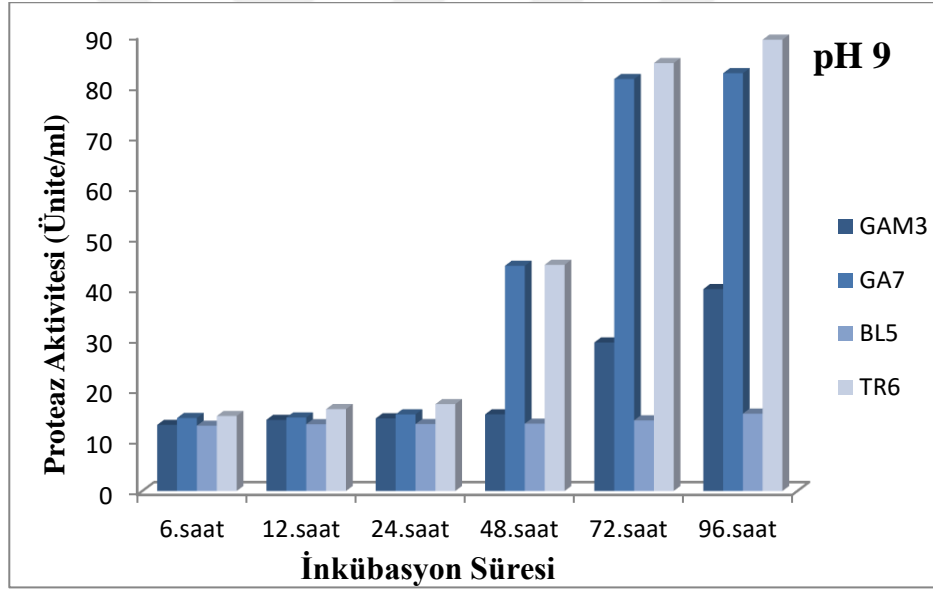
Marinacoccus tarijensis (GAM3), *Staphylococcus equorum* (GA7), *Chromohalobacter canadensis* (TR6) ve *Halomonas eurihalina* (BL5) test bakterilerinin pH 8'deki 96 saatlik deney sonuçlarına göre en fazla proteaz aktivitesi gösteren bakterinin 198,8 U/ml değeriyle *Chromohalobacter canadensis* olduğu, en az proteaz aktivitesi gösteren izolatın ise 152,1 U/ml değeriyle *Marinacoccus tarijensis* bakterisinin olduğu Şekil 3.2'de görülmektedir.



Şekil 3.2. İzolatların % 5 tuz içeren, pH'ı 8 olan sıvı jelatin besiyerinde, 37°C'de 96 saatlik inkübasyon süresince proteaz aktiviteleri (U/ml).

Test izolatlarının % 5 tuz konsantrasyonunda, pH'ı 9 olan sıvı jelatin besiyerinde ve 37°C'deki proteaz enzimi aktivitelerinin 96 saat sonunda en yüksek proteaz aktivitesi *Chromohalobacter canadensis* ve *Staphylococcus equorum* izolatlarında olduğu görülmektedir. Tüm izolatların 96. saatin sonundaki proteolitik aktivitelerinin 15.40 - 89.10 (U/ml) değerleri arasında değiştiği saptanmıştır (Tablo 3.7).

Marinacoccus tarijensis (GAM3), *Staphylococcus equorum* (GA7), *Chromohalobacter canadensis* (TR6) ve *Halomonas eurihalina* (BL5) test bakterilerinin pH 9'daki 96 saatlik deney sonuçlarına göre çizilen grafikte en fazla proteaz aktivitesi gösteren bakterinin 89,10 U/ml değeriyle *Chromohalobacter canadensis* olduğu, en az proteaz aktivitesi gösteren izolatın ise 15,40 U/ml değeriyle *Halomonas eurihalina* bakterisinin olduğu Şekil 3.3'te görülmektedir.



Şekil 3.3. İzolatların % 5 tuz içeren, pH'ı 9 olan sıvı jelatin besiyerinde, 37°C'de 96 saatlik inkübasyon süresince proteaz aktiviteleri (U/ml).

Tablo 3.7. İzolatların %5 tuz içeren sıvı jelatin besiyerinde, 37°C’de farklı inkübasyon sürelerinde proteaz aktiviteleri (U/ml).

pH Değeri	İzolatlar	İnkübasyon Süreleri (saat) ve Proteaz Aktiviteleri (U/ml)					
		6	12	24	48	72	96
pH 7	<i>Marinococcus tarijensis</i> (GAM3)	18.45	18.75	32.86	169.5	180.2	200.2
	<i>Staphylococcus equorum</i> (GA7)	14.55	18.26	28.50	163.0	235.1	246.2
	<i>Chromohalobacter canadensis</i> (TR6)	15.73	17.0	25.90	162.2	228.6	250.2
	<i>Halomonas eurihalina</i> (BL5)	16.36	16.63	19.25	76.0	201.1	227.4
pH 8	<i>Marinococcus tarijensis</i> (GAM3)	17.10	17.53	21.83	90.90	115.8	152.1
	<i>Staphylococcus equorum</i> (GA7)	16.60	19.0	26.55	98.13	169.0	182.3
	<i>Chromohalobacter canadensis</i> (TR6)	15.56	19.95	26.50	104.9	171.6	198.8
	<i>Halomonas eurihalina</i> (BL5)	13.60	14.35	18.60	19.23	112.2	153.7
pH 9	<i>Marinococcus tarijensis</i> (GAM3)	13.16	14.16	14.46	15.26	29.56	40.06
	<i>Staphylococcus equorum</i> (GA7)	14.53	14.63	15.25	44.63	81.35	82.50
	<i>Chromohalobacter canadensis</i> (TR6)	14.93	16.30	17.30	44.83	84.50	89.10
	<i>Halomonas eurihalina</i> (BL5)	13.0	13.30	13.33	13.40	14.06	15.40

İlımlı halofil izolatların en iyi proteaz aktivitesini pH’ı 7 olan jelatinli sıvı besiyerinde gösterdikleri Tablo 3.7’de görülmektedir.

Sanchez-Porro ve arkadaşları (2003a), İspanya'da bulunan bir tuzludan izole ettikleri *Pseudoalteromonas* cinsine ait CP76 izolatıyla yaptıkları çalışmada proteaz aktivitesi tayini için % 50 süt, % 0.5 maya özütü, % 1 pepton içeren ve toplam tuz miktarı % 10 olan besiyeri kullanmışlardır. Çalışmanın sonuçlarına göre ılımlı halofil bir mikroorganizma olan CP76 test izolatının 24 saatlik inkübasyon sonrasında proteaz aktivitesi 69.7 U/ml olarak ölçülmüş ve mikroorganizma bu aktiviteyi 1 M NaCl, pH 8.5 ve 55 °C'deki koşullarda göstermiştir.

Birbir ve arkadaşları (2008), yaptıkları çalışmada Tuz Gölü, Kaldırım Tuzlası, Kayacık Tuzlası ve Tuzköy Tuz Madeni'nden izole edilen pH'ı 7 olan, % 25 tuz içeren jelatinli sıvı besiyerinde ve 40 °C'de 21 gün süreyle üretilen *Haloarcula*, *Halobacterium*, *Halorubrum* ve *Natrinema* cinslerine ait halofilik arke türlerinin proteaz aktivitelerini belirlemişlerdir. Kayacık Tuzlası'ndan izole edilen izolatların proteaz aktiviteleri 83.3 - 84.4 U/ml, Tuz Gölü'nden izole edilen izolatların proteaz aktiviteleri 80.0 - 83.3 U/ml, Tuzköy Tuz Madeni'nden izole edilen izolatların proteaz aktiviteleri 82.0 - 83.4 U/ml ve Kaldırım Tuzlası'ndan izole edilen izolatların proteaz aktiviteleri ise 81.1 - 83.8 U/ml olarak ölçülmüştür.

Cui ve arkadaşları (2015), Çin'deki bir denizden izole ettikleri ılımlı halofil SD11 izolatının proteaz aktivitesini 3 g/l et özütü, 10 g/l pepton ve 7 g/l NaCl içeren ve pH'ı 8.5 olan besiyerinde 37 °C'de 24 saatlik inkübasyon sonrasında 171.9 U/ml olarak tespit etmişlerdir.

2013 yılında İran'daki bir tuz gölünden izole edilen *Salinivibrio* cinsine ait MS-7 test izolatı ile yapılan bir çalışmada, test izolatı 1 litrede 10 g pepton, 5 g maya özütü, 5 g maltoz, 81 g NaCl, 7 g MgCl₂, 9.6 g MgSO₄, 0.36 g CaCl₂, 2 g NaHCO₃ içeren, pH'ı 8 olan besiyerinde ve 50 °C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Bu test izolatının en yüksek proteaz aktivitesi 49.3 U/mg olarak ölçülmüştür (Karbalaie-Heidari ve ark., 2013).

Bacillus cereus MCM B-326 izolatıyla yapılan bir çalışmada, ticari olarak deri işlentisinin sama aşamasında kullanılmak üzere üretilmiş ComBate enzimi ve sığır gübresinin proteaz aktiviteleri farklı substratlarla aktivite ölçümü yapılarak karşılaştırılmıştır. İçerisinde 1 g nişasta, 1 g soya özütü, 0.3 g CaCO₃ içeren ve pH'ı 9 olan besiyerinde 36 saat boyunca

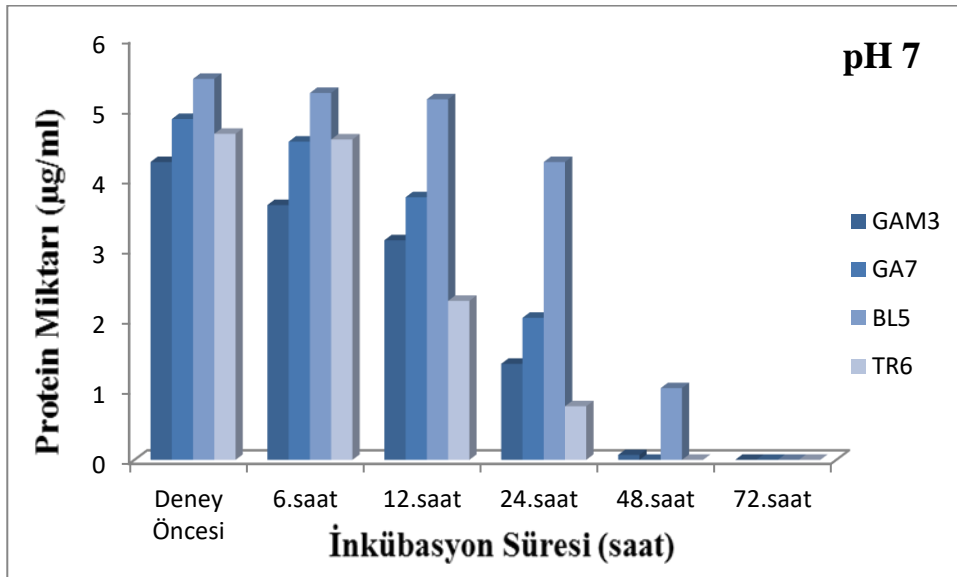
üretilen *Bacillus cereus* MCM B-326 izolatu 13.000 xg'de santrifüj edildikten süpernatant amonyum sülfat ile çöktürölerek kısmen saflaştırılmış ve proteaz aktivitesi kazein, azocoll ve hide powder azure (HPA) substratları ile ölçölmüştür. Azocoll ve HPA substratları elastaz benzeri enzimler için önerilen proteaz substratlarıdır. *Bacillus cereus* MCM B-326 izolatının proteaz aktivitesi kazein substratıyla 947.69 U/g, azocoll ile 1935 U/g ve HPA substratıyla 310 U/g olarak ölçölmüştür. MCM B-326 izolatının proteaz aktivitesi, ComBate enzimi ve sığır gübresinin proteaz aktivitelerinden oldukça yüksek bulunmuştur. Çalışmada *Bacillus cereus* MCM B-326 izolatının ürettiğı proteaz enzimi, 3 cm x 3cm boyutlarında bir bufalo derisine uygulanmıştır. *Bacillus* proteazının deriye uygulanması sonucu yumuşak, pürüzsüz ve düzgün kaygan yapıda bir deri elde edilmiştir (Zambare ve ark., 2010).

Pakistan'daki bir deri imalathanesinin atıklarından izole edilen *Bacillus subtilis*, % 0.48 kazein, % 6 jelatin, 3 ml % 20 gliserol içeren ve pH'ı 8.3 olan besiyerinde ve 37 °C'lik etüvde üretilmiştir. Daha sonra bakteri sayısı 1.9×10^6 (kob/ml) olarak ayarlanıp tekrar 1 litre olarak hazırlanan aynı besiyerinde 72 saat boyunca bekletilmiş ve enzim aktivitesi kazein substratı kullanılarak ölçölmüştür. Optimum proteaz aktivitesi 5.9×10^7 (kob/ml) bakteri sayısı ve pH 8.3 değeri için 112 U/ml olarak 48.saatte saptanmıştır. Saflaştırılmış 900, 1800 ve 2700 U/ml miktarlarındaki *Bacillus subtilis* proteazı, kılları giderilmiş ve kireç giderme işlemleri yapılmış 40 g'lık keçi derilerine sama aşamasında 1 saat boyunca uygulandıktan sonra yapılan incelemede deri dokusunun yüksek oranda kayganlaştığı, deri üzerinde kalan kıl kökleri ve çökmüş proteinlerin uzaklaştırılmasının kolaylaştığı gözlenmiştir. Çekme makinesi kullanılarak yapılan kalite testinde derilerin gerilme mukavemeti, kopma mukavemeti ve yarıлма mukavemeti ölçölüp derilerin uzama yüzdesinin arttığı saptanmıştır (Hameed ve ark., 1996).

Çalışmamızda ılımlı halofil izolatların % 5 tuz konsantrasyonunda, farklı pH değerlerinde (7, 8 ve 9) ve 37°C sıcaklıkta jelatin içeren sıvı besiyerlerindeki protein miktarları Bradford yöntemiyle 96 saat süresince spektrofotometrik olarak incelenmiştir. İzolatları içeren besiyerlerindeki protein miktarları her inkübasyon periyodu (6, 12, 24, 48, 72, 96) sonunda ölçülmüştür (Tablo 3.8).

ılımlı halofil test bakterilerinin % 5 tuz konsantrasyonunda, pH'ı 7 olan sıvı jelatin besiyerinde ve 37°C'de ölçülen protein miktarlarının 6 ve 12 saatlik inkübasyon periyotları boyunca yavaş yavaş azaldığı, 24. saat sonunda ise *Halomonas eurihalina* izolatına ait besiyeri haricindeki besiyerlerinde birden azalma olduğu görülmüştür. *Staphylococcus equorum* ve *Chromohalobacter canadensis* izolatlarına ait besiyerlerindeki proteinlerin 48. saatin sonunda, *Marinococcus tarijensis* ve *Halomonas eurihalina* bakterilerine ait besiyerindeki proteinlerin ise 72. saatin sonunda tamamen tükendikleri Tablo 3.8'de görülmektedir.

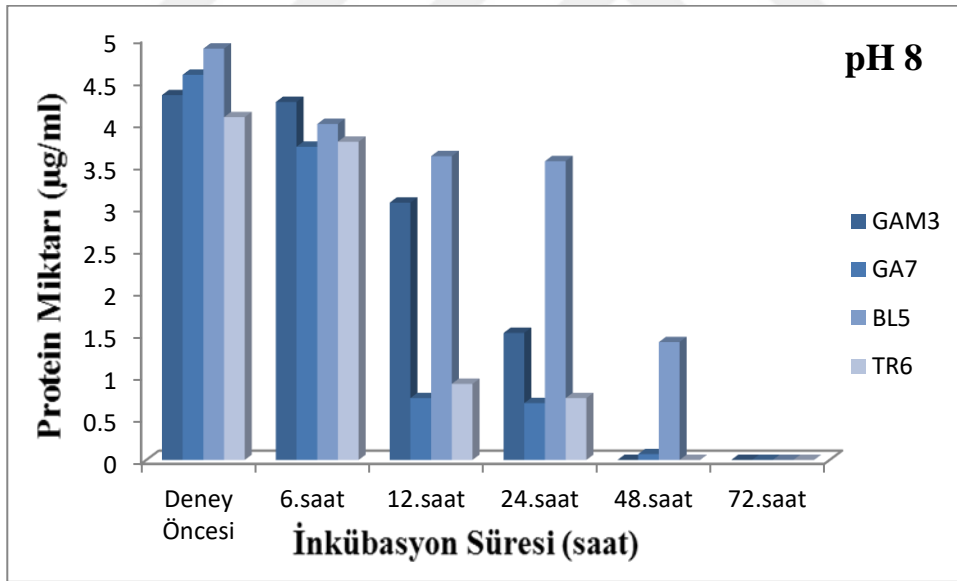
Marinococcus tarijensis (GAM3), *Staphylococcus equorum* (GA7), *Chromohalobacter canadensis* (TR6) ve *Halomonas eurihalina* (BL5) test bakterilerinin pH 7'deki deney sonuçlarına göre çizilen grafikte 72 saatlik periyodun sonunda izolatlara ait besiyerlerinde proteinlerin tükendiği görülmüştür (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. İzolatların % 5 tuz içeren, pH'ı 7 olan sıvı jelatin besiyerinde, 37°C'de 72 saatlik inkübasyon süresince protein miktarları (µg/ml).

Ilımlı halofil test bakterilerinden *Staphylococcus equorum* ve *Chromohalobacter canadensis*'in % 5 tuz konsantrasyonunda, pH'ı 8 olan sıvı jelatin besiyerinde ve 37°C' de ölçülen protein miktarlarının 12 saatlik inkübasyonun sonunda aniden azaldığı, *Halomonas eurihalina* ve *Marinococcus tarijensis* izolatlarına ait besiyerlerinde yavaş yavaş azalma gösterdiği Tablo 3.8' de görülmektedir. *Marinococcus tarijensis* bakterisine ait besiyerindeki protein miktarı ise 24. saatin sonunda birden azalmaya başlamış ve 48. saatin sonunda tamamen bitmiştir.

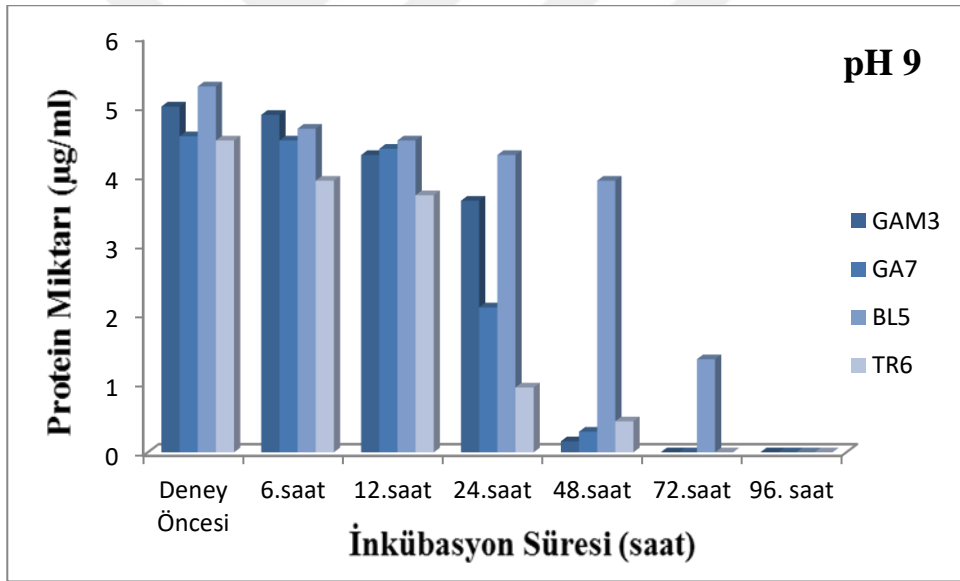
Marinococcus tarijensis (GAM3), *Staphylococcus equorum* (GA7), *Chromohalobacter canadensis* (TR6) ve *Halomonas eurihalina* (BL5) test bakterilerinin pH 8'deki deney sonuçlarına göre 48 saatlik periyodun sonunda *Chromohalobacter canadensis* ve *Marinococcus tarijensis* izolatlarına ait besiyerlerinde proteinlerin tamamen bittiği saptanmıştır. Protein miktarı 72. saatte tekrar ölçüldüğünde tüm besiyerlerindeki proteinlerin proteaz aktivitesinin artışına bağlı olarak tükendiği görülmüştür (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. İzolatların % 5 tuz içeren, pH'ı 8 olan sıvı jelatin besiyerinde, 37°C'de 72 saatlik inkübasyon süresince protein miktarları (µg/ml).

İlimli halofil test bakterilerinin % 5 tuz konsantrasyonunda, pH'ı 9 olan sıvı jelatin besiyerinde ve 37°C'de ölçülen protein miktarlarının 6 ve 12 saatlik inkübasyon periyotları boyunca yavaş yavaş azaldığı, 24. saat sonunda ise *Staphylococcus equorum* ve *Chromohalobacter canadensis* bakterilerine ait besiyerlerinde birden azalma gösterdiği Tablo 3.8'de görülmektedir.

Marinacoccus tarijensis (GAM3), *Staphylococcus equorum* (GA7), *Chromohalobacter canadensis* (TR6) ve *Halomonas eurihalina* (BL5) test bakterilerinin pH 9'daki deney sonuçlarına göre 72 saatlik periyodun sonunda *Halomonas eurihalina* izolatına ait olan besiyeri haricindeki diğer besiyerlerinde proteinlerin tamamen bittiği saptanmıştır. Protein miktarı 96. saatte tekrar ölçüldüğünde tüm besiyerlerindeki proteinlerin proteaz aktivitesinin artışına bağlı olarak tükendiği görülmüştür (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. İzolatların % 5 tuz içeren, pH'ı 9 olan sıvı jelatin besiyerinde, 37°C' de 96 saatlik inkübasyon süresince protein miktarları (µg/ml).

Tablo 3.8. İzolatların % 5 tuz içeren sıvı jelatin besiyerinde, 37°C’de farklı inkübasyon sürelerinde protein miktarları (µg/ml).

pH Değeri	İzolatlar	İnkübasyon Süreleri (saat) ve Protein Miktarları (µg/ml)						
		Deney Öncesi	6	12	24	48	72	96
pH 7	<i>Marinacoccus tarijensis</i> (GAM3)	4.25	3.64	3.14	1.38	0.07	-	-
	<i>Staphylococcus equorum</i> (GA7)	4.86	4.54	3.75	2.04	-	-	-
	<i>Chromohalobacter canadensis</i> (TR6)	4.65	4.57	2.28	0.77	-	-	-
	<i>Halomonas eurihalina</i> (BL5)	5.43	5.23	5.14	4.25	1.03	-	-
pH 8	<i>Marinacoccus tarijensis</i> (GAM3)	4.33	4.25	3.06	1.52	-	-	-
	<i>Staphylococcus equorum</i> (GA7)	4.57	3.72	0.74	0.68	0.07	-	-
	<i>Chromohalobacter canadensis</i> (TR6)	4.07	3.78	0.91	0.74	-	-	-
	<i>Halomonas eurihalina</i> (BL5)	4.88	3.99	3.61	3.55	1.41	-	-
pH 9	<i>Marinacoccus tarijensis</i> (GAM3)	5.00	4.88	4.30	3.64	0.16	-	-
	<i>Staphylococcus equorum</i> (GA7)	4.57	4.51	4.39	2.10	0.30	-	-
	<i>Chromohalobacter canadensis</i> (TR6)	4.51	3.93	3.72	0.94	0.45	-	-
	<i>Halomonas eurihalina</i> (BL5)	5.29	4.68	4.51	4.30	3.93	1.35	-

İlimli halofil bakterilere ait protein tayini sonuçlarına göre pH’ları 7 ve 8 olan jelatinli sıvı besiyerlerindeki proteinlerin, pH’ı 9 olan besiyerlerindeki proteinlerden daha önce tükenmiş olduğu bu sonuçlara bakılarak söylenebilmektedir (Tablo 3.9).

SONUÇ VE ÖNERİLER

Deri işlenti basamaklarından ıslatma aşamasında % 5 oranında tuz içeren ıslatma sıvısı kullanıldığı, ortam pH'ının 7 - 10.5 arasında olduğu ve ıslatmanın 20°C - 30°C arasındaki sıcaklıklarda yapıldığı bilinmektedir (Toptaş, 2004). Dericilikteki kireç giderme sonrası enzimlerle derinin muamele edildiği sama aşaması 20°C - 37°C arasındaki sıcaklıklarda gerçekleşmektedir. Bu aşamada kullanılan tuz oranı % 5 - 9 oranında değişirken, ortam pH'ı 8 - 9 olmaktadır (Toptaş, 2004). Çalışmamızda kullanılan ılımlı halofil bakterilerin % 5-10 tuz konsantrasyonunda, pH 7, 8, 9' da ve 24°C, 30°C, 37°C sıcaklık değerlerinde proteaz enzimi ürettikleri saptanmıştır. Deri işlentisinde tuz kullanılması sebebiyle ılımlı halofil mikroorganizmaların ürettiği proteaz enzimlerinin, tuz içeren ortamlarda aktif olmaları ıslatma ve sama aşamalarında bu enzimlerin kullanım potansiyelleri olduğunu göstermektedir.

Farklı tuz konsantrasyonlarında, farklı pH'larda ve farklı sıcaklıklarda aktif olan ve ılımlı halofil bakterilerden elde edilen proteaz enzimleri deri endüstrisi açısından önemlidir. Bu çalışma, tuzlanmış deriler üzerinde yaşayan ılımlı halofil mikroorganizmaların sahip oldukları proteaz enzimlerinin, endüstriyel üretim açısından uygun olabileceklerini göstermektedir. Bu sebeple, ılımlı halofil türlerin ürettiği proteaz enzimlerinin, deri endüstrisindeki deri işlenti safhalarında kullanılmak üzere endüstriyel olarak üretilebileceği düşünmekteyiz.



KAYNAKLAR

- [1] Afsar, A., Cetinkaya, F. (2008). A Research on Increasing The Effectiveness of Degreasing Process by Using Enzymes, *Tekstil ve Konfeksiyon*, Volume 18, 4, 278-283.
- [2] Akay, T. (2011) Genel Histoloji, Sekizinci Baskı, Palme Yayıncılık, Ankara.
- [3] Akpolat, C., Ventosa, A., Birbir, M. (2015) Molecular Identification of Moderately Halophilic Bacteria and Extremely Halophilic Archaea Isolated From Salted Sheep Skins Containing Red and Yellow Discolorations. *J. Am. Leather Chem. Assoc.* 110 (7), 211-220.
- [4] Amoozegar, M.A., Fatemi, A.Z., Karbalaeei-Heidari, H.R., Razavi, M.R. (2007) Production of an Extracellular Alkaline Metalloprotease From a Newly Isolated, Moderately Halophile, *Salinivibrio* sp. Strain AF-2004. *Microbiological Research*, 162: 369—377.
- [5] Amoozegar, M.A., Salehghamari, E., Khajeh, K., Kabiri, M., and Naddaf, S. (2008) Production of an Extracellular Thermohalophilic Lipase from a Moderately Halophilic Bacterium *Salinivibrio* sp. Strain SA-2, *J. Basic Microbiol.* 48 pp. 160–167.
- [6] Amoozegar, M.A., Shahinpei, A., Makzum, S., Rafieyan, S., Nikou, M.M., Spröer, C., Ventosa, A. (2018) *Salipaludibacillus halalkaliphilus* sp. nov., a Moderately Haloalkaliphilic Bacterium from a Coastal-Marine Wetland. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 68: 2214-2219.
- [7] Amoozegar, M. A., Bagheri, M., Didari, M., Mehrshad, M., Schumann, P., Spröer, C., Sánchez- Porro, C., and Ventosa, A. (2014) *Aquibacillus halophilus* gen. nov., sp. nov., a Moderately Halophilic Bacterium from a Hypersaline Lake, And Reclassification of *Virgibacillus koreensis* as *Aquibacillus koreensis* comb. nov. and *Virgibacillus albus* as *Aquibacillus albus* comb. nov., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 64: 3616-3623.
- [8] Amoozegar, M.A., Bagheri, M., Makhdoumi-Kakhki, A., Didari, M., Schumann, P., Nikou, M.M., Sanchez-Porro, C., Ventosa, A. (2014a) *Aliicoccus persicus* gen. nov., sp. nov., A Halophilic Member of the Firmicutes Isolated from a Hypersaline Lake. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 64:1964–1969.
- [9] Amoozegar, M. A., Bagheri, M., Didari, M., Shahzede Fazeli, S. A., Schumann,

- P., Sanchez-Porro, C. & Ventosa, A. (2013) *Saliterribacillus persicus* gen. nov., sp. nov., a Moderately Halophilic Bacterium Isolated from a Hypersaline Lake. Int J Syst Evol Microbiol, 63, 345–351.
- [10] Amoozegar, M. A., Sanchez-Porro, C., Rohban, R., Hajjghasemi, M. & Ventosa, A. (2009) *Piscibacillus halophilus* sp. nov., a Moderately Halophilic Bacterium from a Hypersaline Iranian Lake. Int J Syst Evol Microbiol, 59, 3095–3099.
- [11] Anonim (2007) T.C. Milli Eğitim Bakanlığı, Mesleki Eğitim ve Öğretim Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi, Giyim Üretim Teknolojisi, Derinin Yapısı, Ankara.
- [12] Anonim (2012) T.C. Çevre ve Şehircilik Bakanlığı, Çevre Yönetimi Genel Müdürlüğü, Türkiye’de Sanayiden Kaynaklanan Tehlikeli Atıkların Yönetiminin İyileştirilmesi, Deri Sektörü Rehber Doküman.
- [13] Anonim (2016) T.C. Çevre ve Şehircilik Bakanlığı, Çevre Yönetimi Genel Müdürlüğü, Sektörel Atık Klavuzları, Deri Sektörü, Ankara.
- [14] Arahal, D.R., García, M.T., Ludwig, W., Schleifer, K.H. ve Ventosa, A. (2001) Transfer of *Halomonas canadensis* and *Halomonas israelensis* to the Genus *Chromohalobacter* as *Chromohalobacter canadensis* comb. nov. and *Chromohalobacter israelensis* comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 51, 1443-1448.
- [15] Arahal, D.R., García, M.T., Vargas, C., Cánovas, D., Nieto, J.J. ve Ventosa, A. (2001) *Chromohalobacter salexigens* sp. nov., a Moderately Halophilic Species That Includes *Halomonas elongata* DSM 3043 and ATCC 33174. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 51, 1457-1462.
- [16] Aslan, E. (2009) Tuzlanmış Derilerde Bulunan Mikroorganizma Türlerinin Saptanması, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 180.
- [17] Bagheri, M., Amoozegar, M. A., Schumann, P., Didari, M., Mehrshad, M., Sproer, C., Sanchez-Porro, C. & Ventosa, A. (2013) *Ornithinibacillus halophilus* sp. nov., a Moderately Halophilic, Gram-stain Positive, Endospore-Forming Bacterium from a Hypersaline Lake. Int J Syst Evol Microbiol., 63, 844–848.
- [18] Bailey, D.G., Birbir, M. (1993) A Study of The Extremely Halophilic Microorganisms Found on Commercially Brine-Cured Cattle Hides, JALCA, 88: 285-293.

- [19] Balderrama-Subieta, A., Guzmán, D., Minegishi, H., Echigo, A., Shimane, Y., Hatada, Y. Ve Quillaguamán, J. (2013) *Marinococcus tarijensis* sp. nov., a Moderately Halophilic Bacterium Isolated from a Salt Mine. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 63, 3319-3323.
- [20] Banerjee, U.C., Sani, R.K., Azmi, W. and Soni, R. (1999) Thermostable Alkaline Protease from *Bacillus brevis* and Its Characterization as a Laundry Detergent Additive. *Process Biochem.*, 35:213–219.
- [21] Barrett, A. J. (1994) Proteolytic Enzymes: Serine and Cysteine Peptidases. *Methods Enzymol.*, 244:1–15.
- [22] Barrett, A. J. (1995) Proteolytic Enzymes: Aspartic and Metallopeptidases. *Methods Enzymol.*, 248:183.
- [23] Baumann, L., Bowditch, R.D. and Baumann, P. (1983) Description of *Deleya* gen. nov. Created to Accommodate The Marine Species *Alcaligenes aestus*, *Alcaligenes pacicus*, *Alcaligenes cupidus*, *Alcaligenes venustus*, and *Pseudomonas marina*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 33: 793–802.
- [24] Béjar, V., Llamas, I., Calco, C. ve Quesada, E. (1998) Characterization of Exopolysaccharides Produced by 19 Halophilic Strains of the Species *Halomonas eurihalina*. *J. Biotechnol.*, 61: 135–141.
- [25] Berber, D. (2009) Tuzlarda, Tuzlanmış ve Islatılmış Ham Derilerdeki Bakteriye Populasyonun İncelenmesi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, 213.
- [26] Berber, D., Birbir, M. (2010) Examination of Bacterial Population in Salt, Salted Hides, Soaked Hides and Soak Liquors, *JALCA*, 105, 320-326.
- [27] Beşe, M., (1974) “Mikrobiyolojide Kullanılan Biyokimyasal Testler ve Besiyerleri”, Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 298.
- [28] Binod, P., Palkhiwala, P., Gaikawari, R., Nampoothiri, K.M., Duggal, A., Dey, K., Pandey, A. (2013) Industrial Enzymes-Present Status and Future Perspectives for India. *JSIR*, Vol.72, 271-286.
- [29] Birbir, M. (1997) Investigation Of Salted-Cured France and Russian Hides for Halophilic Bacteria, *J Turkish Microbiol Society*, 27, 68-73.
- [30] Birbir, M., Sesal, C. (2003) Extremely Halophilic Bacterial Communities in Şereflikoçhisar Salt Lake in Turkey. *Turk J Biol*, 27: 7-22.

- [31] Birbir, M., Ogan, A., Calli, B., Mertoglu, B. (2004) Enzymatic Characteristics of Extremely Halophilic Archaeal Community in Tuzkoy Salt Mine, Turkey. *World J Microbiol Biotechnol*, 20, 613-621.
- [32] Birbir, M., Calli, B., Mertoglu, B., Elevi-Bardavid, R., Oren, A., (2007) Extremely Halophilic Archaea from Tuz Lake, Turkey and the Adjacent Kaldırım and Kayacık Salterns. *World J Microbiol Biotechnol*, 23: 309-316.
- [33] Birbir, M., Ozdogru, Z.B., Birbir, Y., Ogan, A. (2008) Extracellular Protease Activities of Extremely Halophilic Archaea and Their Control via Direct Electric Current. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, Vol.92, p.53.
- [34] Birbir, M., Ventosa, A., Çağlayan, P. (2015) Koyun ve Keçi Derilerinde Bulunan Ilımlı Halofil Bakterilerin Karakterizasyonu. Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu, Proje Numarası, FEN-C-DRP-040712-0281.
- [35] Birbir, M., Çağlayan, P., Ogan, A. (2016) Halofillerden Elde Edilen Proteaz ve Lipazların Deri Sanayiinde Kullanımları. Türkiye Denizleri Bakterilerinin Biyoteknolojik Kullanımı TÜBİTAK ÇAYDAG 114Y690 Proje Çalıştayı, 20 Ekim, İstanbul Üniversitesi Kongre ve Kültür Merkezi, İstanbul.
- [36] Bradford, M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principles of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem.*, 72:248-254.
- [37] Brenner, S. (1988) The Molecular Evolution of Genes and Proteins: A Tale Two Serines. *Nature*, 334:528–530.
- [38] Browner, M. F., Smith, W. W., Castelhana, A. L. (1995) Matrilysin-inhibitor Complexes: Common Themes Among Metalloproteinases. *Biochemistry*, 34:6601–6610.
- [39] Bugg, T. (1996) *An Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry*, Blackwell Science, Oxford, U.K.
- [40] Carrasco, I.J., Márquez, M.C., Xue, Y., Ma, Y., Cowan, D.A., Jones, B.J., Grant, W.D., Ventosa, A. (2007) *Salsuginibacillus kocurii* gen. nov., sp. nov., A Moderately Halophilic Bacterium From Soda-Lake Sediment. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 57: 2381–2386.
- [41] Carrasco, I.J., Marquez, M.C., Xue, Y. et al (2008) *Sediminibacillus halophilus* gen. nov., sp. nov., A Moderately Halophilic, Gram-Positive Bacterium from a

- Hypersaline Lake. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 58:1961–1967.
- [42] Castro, D. J., Cerezo, I., Sampedro, I. and Martinez-Checa, F. (2018) *Roseovarius ramblicola* sp. nov., a Moderately Halophilic Bacterium Isolated from Saline Soil in Spain. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 68, 1851-1856.
- [43] Choudhary, R. B., Jana, A. K., Jha M. K. (2004) Enzyme Technology Applications in Leather Processing, *IJCT*, Vol 11, 659-671.
- [44] Crispim, A., Mota, M. (2003) Unhairing With Enzymes. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 87, No. 5, 198.
- [45] Cui, H., Wang, L., Yu, Y. (2015) Production and Characterization of Alkaline Protease from a High Yielding and Moderately Halophilic Strain of SD11 Marine Bacteria. *J Chem.*, 2015:1–8.
- [46] Çağlayan, P. (2015) Küçükbaş Hayvan Derilerindeki Ilımlı Halofil Bakterilerin Karakterizasyonu. Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye, 435.
- [47] Caglayan, P., Birbir, M., Sanchez-Porro, C., Ventosa, A. (2017) Screening of Industrially Important Enzymes Produced by Moderately Halophilic Bacteria Isolated from Salted Sheep Skins of Diverse Origin. *JALCA*, 112(6), 207-216.
- [48] Caglayan, P., Birbir, M., Sánchez-Porro, C., Ventosa, A., Birbir, Y. (2018) Investigation of Moderately Halophilic Bacteria Causing Deterioration of the Salted Sheep and Goat Skins and Their Extermination via Electric Current Applications. *Journal of the American Leather Chemists Association*, 113:41-52.
- [49] Deselnicu, M., Bratulesco, V., Siegler, M., Anghel, A. (1994) A New Enzyme Process for Improved Yield and Softer Leather: Technical Note. *JALCA*, 89 352.
- [50] Didari, M., Amoozegar, M. A., Bagheri, M., Schumann, P., Sproer, C., Sanchez-Porro, C. & Ventosa, A. (2012) *Alteribacillus bidgolensis* gen. nov., sp. nov., a Moderately Halophilic Bacterium from a Hypersaline Lake, And Reclassification of *Bacillus persepolensis* as *Alteribacillus perseponensis* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 62:2691–2647.
- [51] Dutta, S. S. (1999) Introduction to the Principle of Leather Manufacture. Indian Leather Technologists Association, Calcutta, 130.
- [52] Dutta, J.R. and Banerjee, R. (2006) Isolation and Characterization of a Newly Isolated *Pseudomonas* Mutant for Protease Production. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 49 : 37-47.

- [53] Echigo, A., Minegishi, H., Mizuki, T., Kamekura, M., Usami, R. (2010) *Geomicrobium halophilum* gen. nov., sp. nov., a Moderately Halophilic and Alkaliphilic Bacterium Isolated From Soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60: 990-995.
- [54] Elazari-Volcani, B. (1940) Algae in The Bed of the Dead Sea. *Nature*, 145: 975-975.
- [55] Enache, M., Kamekura, M. (2010) Hydrolytic Enzymes of Halophilic Microorganisms and Their Economic Values. *Rom Biotechnol Lett*, 47:47–59.
- [56] Euzéby, J.P. (1997) List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: A Folder Available on the Internet, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(2), 590-592.
- [57] Fendrich, C. (1988) *Halovibrio variabilis* gen. nov. sp. nov., *Pseudomonas halophila* sp. nov. and a New Halophilic Aerobic Coccoid Eubacterium from Great Salt Lake, Utah, USA. *Syst. Appl. Microbiol.*, 11: 36–43.
- [58] Ferrero, M. A., Casto, G.R., Abate, C. M., Balgori, M. D. and Sinsriz, F. (1996) Thermostable Alkaline Protease of *Bacillus licheniformis* MIR 29: Isolation, Production and Characterization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45: 327-332.
- [59] Fersht, A. (1977) *Enzyme Structure and Mechanism*, Freeman and Company, USA.
- [60] Franzmann, P.D., Burton, H.R. and McMeekin, T.A. (1987) *Halomonas subglaciescola*, A New Species of Halotolerant Bacteria Isolated from Antarctica. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 37: 27–34.
- [61] Gaur, S., Agrahari, S., Wadhwa, N. (2010) Purification of Protease from *Pseudomonas thermaerum* GW1 Isolated from Poultry Waste Site. *Open Microbiol J.*, 4: 67–74.
- [62] Gaur, S., Gupta, V. K. (2012) *Biotechnology of Microbial Enzymes*. Nova Science Publishers, Inc. 69-79.
- [63] Gerhartz, W.(1990) *Enzymes in Industry*, Weinheim, Germany.
- [64] Godfrey, T., West, S. (1996) *Industrial Enzymology*, 2nd Edition. New York: McMillan Publishers Inc.; 3 pp.
- [65] Gorlenko, V.M., Bryantseva, I.A., Rabold, S., Tourova, T. P., Rubtsova, D., Smirnova, E., Thiel, V., Imhoff, J.F. (2009) *Ectothiorhodospira variabilis* sp. nov.,

- an Alkaliphilic and Halophilic Purple Sulfur Bacterium From Soda Lakes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59: 658-664.
- [66] Govind, N. S., Mehta, B., Sharma, M., Modi, V. V. (1981) Protease and Carotenogenesis in *Blakeslea trispora*. *Phytochemistry*, 20:2483–2485.
- [67] Grant, W.D., Gemmell, R.T., McGenity, T.J. (1998) Halophiles, in *Extremophiles: Microbial Life in Extreme Environments*. Editors: Horikoshi, K., Grant, W.D., Wiley-Liss Inc, 93-132.
- [68] Guangrong, H., Tiejing, H., Po, Y. and Jiaying, J. (2006) Purification and Characterization of a Protease from Thermophilic *Bacillus* Strain HS08. *Afr J Biotechnol.*, 5: 2433 –2438.
- [69] Gupta, R., Beg, Q., Lorenz, P., (2002) Bacterial Alkaline Proteases: Molecular Approaches and Industrial Applications. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 59:15–32.
- [70] Gupta, A., Roy, I., Khare, S.K., Gupta, M.N. (2005) Purification and Characterization of a Solvent Stable Protease From *Pseudomonas aeruginosa* PseA. *Journal of Chromatography A*, 1069, 155–161.
- [71] Gupta, A., Khare, S.K. (2007) Enhanced Production and Characterization of a Solvent Stable Protease From Solvent Tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA, *Enzyme and Microbial Technology*, 42, 11–16.
- [72] Haddar, A., Bougatef, A., Agrebi, R., Sellami-Kamoun, A., Nasriv, M. (2009) A Novel Surfactant-Stable Alkaline Serine-Protease from a Newly Isolated *Bacillus Mojavensis* A21 Purification and Characterization. *Process Biochemistry*. 44, 29–35.
- [73] Hameed, A., Natt, M. A., Evans, C. S. (1996) Production of Alkaline Protease by a New *Bacillus subtilis* Isolate for Use as a Bating Enzyme in Leather Treatment. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12 (3), 289-291.
- [74] Hasan, F., Shah, A.A., Hameed, A. (2006) Industrial Applications of Microbial Lipases. *Enzyme Microb. Technol.*, 39, 235-251.
- [75] Hebert, A.M., Vreeland, R.H. (1987) Phenotypic Comparison of Halotolerant Bacteria *Halomonas halodurans* sp. nov., nom., rev., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 37: 347–350.
- [76] Hiramatsu, T., Ohno, Y., Hara, H., Yano, I., Masui, M. (1980) Effects of NaCl Concentration on The Envelope Components in a Moderately Halophilic Bacterium, *Pseudomonas halosaccharolytica*, p. 189–200. In H. Morishita and M.

- Masui (ed.), Saline environments. Proceedings of the Japanese Conference on Halophilic Microbiology. Nakanishi Printing Co., Kyoto, Japan.
- [77] Hou, R.Z., Yang, Y., Li, G., Huang, Y.B., Wang, H., Liu, Y.J., Zhang, X.Z. (2006) Synthesis of A Precursor Dipeptide of RGDS (Arg-Gly-Asp-Ser) Catalysed by the Industrial Protease Alcalase, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 44, 73–80.
- [78] Huo, Y.-Y., Li, Z.-Y., You, H., Wang, C.-S., Post, A. F., OREN, A. and Xu, X.-W. (2014) *Oceanicola antarcticus* sp. nov. and *Oceanicola flagellatus* sp. nov., Moderately Halophilic Bacteria Isolated from Seawater. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 64, 2975-2979.
- [79] Huval, J. H., Latta, R., Wallace, R., Kushner, D. J. ve Vreeland, R. H. (1996) Description of Two New Species of *Halomonas*: *Halomonas israelensis* sp.nov. and *Halomonas canadensis* sp.nov. *Can. J. Microbiol.*, 41: 1124- 1131.
- [80] Imhoff, J., Rodriguez-Valera, F. (1984) Betaine is the Main Compatible Solute of Halophilic Eubacteria. *J. Bacteriol.* 160:478–479
- [81] Infante-Dominguez, C.; Sanchez-Porro, C.; Ventosa, A. (2015) *Aquisalimonas lutea* sp. nov., a Moderately Halophilic 223 Bacterium from a Saltern. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 65, 1354–1359.
- [82] Infante-Dominguez, C., Lawson, P.A., Johnson, C.N., Sanchez-Porro, C., Ventosa, A. (2015a) *Fodinicurvata halophila* sp. nov., a Moderately Halophilic Bacterium from a Marine Saltern. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 65, 766–771.
- [83] Inoue, K., Korenaga, H., Tanaka, N.G., Sakamoto, N., Kadoya, S. (1988) The Sulfated Polysaccharide–Peptidoglycan Complex Potently Inhibits Embryonic Angiogenesis and Tumor Growth in the Presence of Cortisone Acetate. *Carbohydr. Res.*, 81, 135–142.
- [84] James, S.R., Dobson, S.J., Franzmann, P.D., McMeekin, T.A. (1990) *Halomonas meridiana*, a New Species of Extremely Halotolerant Bacteria Isolated from Antarctic Saline Lakes. *Syst. Appl. Microbiol.*, 13: 270–278.
- [85] Jones, B.E. (2004) Halophilic Microorganisms, Industrial Enzymes: Do Halophiles and Alkaliphiles Have a Role to Play? Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 275-284.
- [86] Kamal, S., Rehman, S., Iqbal, H. (2017) Biotechnological valorization of Proteases: From Hyperproduction to Industrial Exploitation – A Review. *Environmental Progress & Sustainable Energy*. Vol. 36 s. 511–522.

- [87] Karbalaeei-Heidari, H.R., Ziaee A.A., Schaller J., Amoozegar, M.A., (2007) Purification and Characterization of an Extracellular Haloalkaline Protease Produced by the Moderately Halophilic Bacterium, *Salinivibrio* sp. strain AF-2004. *Enzyme Microb Technol.*, 40: 266-272.
- [88] Karbalaeei-Heidari, R. H., Shahbazi, M., & Absalan, G. (2013) Characterization of a Novel Organic Solvent Tolerant Protease from a Moderately Halophilic Bacterium and Its Behavior in Ionic Liquids. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 170, 573–586.
- [89] Kirk, O., Borchert, T.V., Fuglsang, C.C. (2002) *Industrial Enzyme Applications. Current Opinion in Biotechnology.* 13:345-351.
- [90] Koolman, J., Röhm, K.H. (2002) *Renkli Biyokimya Atlası. Çev. A. Yeşilkaya, A. Baykal ve Ö. Alper, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.*
- [91] Kruger, N.J. (2002) *The Protein Protocols Handbook, 2nd Edition Edited by: J. M. Walker, Humana Press Inc., Totowa, NJ.*
- [92] Kumar, C.G., Takagi, H. (1999) Microbial Alkaline Proteases from a Bioindustrial Viewpoint. *Biotechnol Adv.*, 17:561–94.
- [93] Kumar, C.G. (2002) Purification and Characterization of a Thermostable Alkaline Protease from Alkalophilic *Boacillus pumilus*. *Lett., Applied Microbiology.*, 34: 13-17.
- [94] Kumar, S.S., Mani, A. (2007) Measurement of Physical and Transport Properties of Tannery Effluent (Soak Liquor). *International Communications in Heat and Mass Transfer*, 34 339-346.
- [95] Kushner, D. J., Kamekura, M. (1988) Physiology of Halophilic Eubacteria, p. 109-141. In F. Rodriguez-Valera (ed.), *Halophilic Bacteria*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
- [96] León, M. J., Vera-Gargallo, B., Sánchez-Porro, C., and Ventosa, A. (2016) *Spiribacter roseus* sp. nov., a Moderately Halophilic Species of the Genus *Spiribacter* from Salterns. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 66, 4218–4224.
- [97] López-Otín, C., Bond, J.S. (2008) Proteases: Multifunctional Enzymes in Life and Disease. *J. Biol. Chem.*, 283, 30433–30437.
- [98] Li, W.J., Schumann, P., Zhang, Y.Q., Chen, G.Z., Tian, X.P., Xu, L.H., Stackebrandt, E., Jiang, C.L. (2005) *Marinococcus halotolerans* sp. nov., Isolated from Qinghai, North-West China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55, 1801-1804.

- [99] Li, Q., Yi, L., Marek, P., Iverson, B.L. (2013) Commercial Proteases: Present and Future. *FEBS Letters*, 587 (2013) 1155–1163.
- [100] Liu, W., Jiang, L., Guo, C., Yang, S.S. (2010) *Terribacillus aidingensis* sp. nov., a Moderately Halophilic Bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60: 2940-2945.
- [101] Lv, X. L., Xie, B. S., Cai, M., Geng, S., Tang, Y. Q., Wang, Y. N., Cui, H. L., Liu, X. Y., Ye, S. Y. & Wu, X. L. (2014) *Glycocaulis albus* sp. nov., a Moderately Halophilic Dimorphic Prosthecate Bacterium Isolated from Petroleum-Contaminated Saline Soil. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 64, 3181–3187.
- [102] Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A., Clark, D. P. (2012) *Brock Biology of Microorganisms*, 13th Edition, Pearson Education Inc., San Francisco, CA.
- [103] Madigan, M. T., Bender, K.S., Buckley, D.H., Sattley, W.M., Stahl, D.A. (2019) *Brock Biology of Microorganisms*, 15th Edition, Pearson Education Limited, New York, USA.
- [104] Mahajan, R., Badgajar, S. (2010) Biological Aspects of Proteolytic Enzymes: A Review. *Journal of Pharmacy Research*, 3(9), 2048-2068.
- [105] Marnett, A.B., Craik, C. (2005) Papa's Got a Brand New Tag: Advances in Identification of Proteases and Their Substrates. *Trends Biotechnol.*, 23, 59–64.
- [106] Margesin, R., Schinner, F. (2001) Potential of Halotolerant and Halophilic Microorganisms for Biotechnology. *Extremophiles*, 5:73–83.
- [107] Márquez, M. C., Carrasco, I. J., Xue, Y., Ma, Y., Cowan, D. A., Jones, B. E., Grant, W. D., Ventosa, A. (2008) *Aquisalibacillus elongatus* gen. nov., sp. nov., a Moderately Halophilic Bacterium of the Family *Bacillaceae* Isolated from a Saline Lake. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58:1922-1926.
- [108] Matheson, A.T., Sprott, G.D., McDonald, I. I., Tessier, H. (1976) Some Properties of an Unidentified Halophile: Growth Characteristics, Internal Salt Concentration and Morphology. *Can. J. Micro-biol.*, 22: 780-786.
- [109] Mellado, E., Moore, E.R.B., Nieto, J.J., Ventosa, A. (1995) Phylogenetic Inferences and Taxonomic Consequences of 16S Ribosomal DNA Sequence Comparison of *Chromohalobacter marismortui*, *Volcaniella eurihalina*, and *Deleya salina* and reclassification of *V. eurihalina* as *Halomonas eurihalina* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 45, 712-716.

- [110] Mellado, E., Sánchez-Porro, C., Martín, S., Ventosa, A. (2004) Extracellular hydrolytic enzymes produced by moderately halophilic bacteria. In: A. Ventosa (Ed.) Halophilic Microorganisms. Springer-Verlag, Berlin, Germany. 285–295.
- [111] Mozersky, S.M., Allen, O.D., Marmer, W.N. (2002) Vigorous Proteolysis: Reliming in the Presence of an Alkaline Protease and Bating (Post Liming) with an Extremophile Protease. JALCA, Vol.97, 4, 150-155.
- [112] Mrozik, A., Hupert-Kocorek, K., Nowak, B., Labuzek, S. (2008) Microbial Lipases and Their Significance in the Protection of the Environment, Post Mikrobiol., 47,43-50.
- [113] Mukherjee, A.M., Adhikari, H., Rai, S.K. (2008) Production of Alkaline Protease by a Thermophilic *Bacillus subtilis* Under Solid State Fermentation (SSF) Condition Using *Imperata cylindrical* Grass and Potato Peel as Low Cost Medium: Characterization and Application of Enzyme in Detergent Formulation. Biochemical Engineering Journal., 39: 353 –361.
- [114] Nishino, T., Yokoyama, G., Dobashi, K., Fujihara, M., Nagumo, T. (1989) Isolation, Purification and Characterization of Fucose Containing Sulfated Polysaccharides from the Brown Seaweed *Ecklonia kurome* and Their Blood-Anticoagulant Activities. Carbohydr. Res., 186, 119–129.
- [115] Okazaki, S.Y., Goto, M., Furusaki, S. (2000) Surfactant–Protease Complex as a Novel Biocatalyst for Peptide Synthesis in Hydrophilic Organic Solvents. Enzyme and Microbial Technology., 26, 159–164.
- [116] Okutani, K. (1992) Antiviral Activities of Sulfated Derivatives of a Fucosamine Containing Polysaccharide of Marine Bacterial Origin. Nippon Suisan Gakkaishi, 58, 927–930.
- [117] Outtrup, H., Boyce, C. (1990) Microbial Proteases and Biotechnology. In: Fogarty WM, Kelly CT, editors. New York: Elsevier Science, 1990:227–54.
- [118] Oyama, H., Fujisawa, T., Suzuki, T., Dunn, B.M., Wlodawer, A., Oda, K. (2005). Catalytic Residues and Substrate Specificity of Recombinant Human Tripeptidyl Peptidase I (CLN2). Journal of Biochemistry, 138, 127–134.
- [119] Ozgen, M., Attar, A., Elalmis, Y., Birbir, M., Yucel, S. (2016) Enzymatic Activity of a Novel Halotolerant Lipase *Haloarcula hispanica* 2TK2, Pol J of Chem Technol., Vol. 18, 20-25.
- [120] Pant, G., Prakash, A., Pavani, J. V. P., Bera, S., Deviram, G. V. N. S., Kumar, A.,

- Prasuna, R. G. (2015) Production, Optimization and Partial Purification of Protease from *Bacillus subtilis*. Journal of Taibah University for Science, 9(1), 50-55.
- [121] Patil, U., Chaudhari, A. (2009) Purification and Characterization of Solvent-Tolerant, Thermostable, Alkaline Metalloprotease from Alkalophilic *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 7926. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 84 :1255-1262.
- [122] Peçonek, J., Gruber, C., Gallego, V., Ventosa, A., Busse, H.J., Kämpfer, P., Radax, C. and Stan-lotter, H. (2006) Reclassification of *Pseudomonas beijerinckii* Hof 1935 as *Chromohalobacter beijerinckii* comb. nov., and Emended Description of the species. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 56, 1953-1957.
- [123] Place, R. B., Hiestand, D., Gallmann, H. R., Teuber, M. (2003) *Staphylococcus equorum* subsp. *linens*, subsp. nov., a Starter Culture Component for Surface Ripened Semi-Hard Cheeses. Syst. Appl. Microbiol., 26:30–37.
- [124] Prado, B., Lizama, C., Aguilera, M., Ramos-Cormenzana, A., Fuentes, S., Campo, V. and Monteoliva-Sánchez, M. (2006) *Chromohalobacter nigrandesensis* sp. nov., a Moderately Halophilic, Gram-negative Bacterium Isolated from Lake Tebenquiche on the Atacama Saltern, Chile. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 56, 647-651.
- [125] Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A. (2002) Laboratory Exercises in Microbiology. McGraw-Hill Companies.
- [126] Puri, S. (2001) An Alkaline Protease from a *Bacillus* sp.: Production and Potential Applications in Detergent Formulation and Degumming of Silk. Doktora Tezi, Delhi Üniversitesi, New Delhi, Hindistan.
- [127] Quesada, E., Valderrama, M. J., Bejar, V., Ventosa, A., Gutierrez, M. C., Ruiz-Berraquero, F., Ramos-Cormenzanal, A. (1990) *Volcaniella eurihalina* gene nov sp. nov. a Moderately Halophilic Nonmotile Gram-negative Rod. International Journal Of Systematic Bacteriology, 261-267.
- [128] Quesada, E., Bejar, V., Calvo, C. (1993) Exopolysaccharide Production by *Volcaniella eurihalina*. Experientia, 49, 1037– 1041.
- [129] Quesada, E., Béjar, V., Ferrer, M. R., Calvo, C., Llamas, I., Martínez- Checa, F., Arias, S., Ruiz-García, C., Páez, R., Martínez-Cánovas, M. J., del Moral, A. (2004) Moderately Halophilic, Exopolysaccharide-Producing Bacteria, Halophilic Microorganisms © Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 297-313.

- [130] Quillaguamán, J., Delgado, O., Mattiasson, B., Hatti-Kaul, R. (2004) *Chromohalobacter sarecensis* sp. nov., a Psychrotolerant Moderate Halophile Isolated from the Saline Andean Region of Bolivia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54, 1921-1926.
- [131] Rahman, R.N.Z.R.A., Geok, L.P., Basri, M., Salleh, A. B. (2006) An Organic Solvent-Stable Alkaline Protease from *Pseudomonas aeruginosa* Strain K: Enzyme Purification and Characterization. *Enzyme and Microbial Technology*, 39: 484–1491.
- [132] Rao, K., Devi, V.P., Narasu, M.L. (2007) A New Acidic Protease from *Bacillus badius*. *Journal of Aquatic Biology*. 22 : 207-212.
- [133] Rao, C.S., Sathish, T., Ravichandra, P., Prakasham, R.S. (2009) Characterization of Thermo and Detergent Stable Serine Protease from Isolated *Bacillus circulans* and Evaluation of Eco-Friendly Applications. *Process Biochemistry*, 44 :262 –268.
- [134] Reed, G. (1993) *Enzymes in Food Processing*, Milwaukee, Wisconsin.
- [135] Rohm, O. (1910) Dehairing and Cleaning of Skins, *Ger Pat.*, 268.837.
- [136] Robyt, J. F., White, B. J. (1987) Analyzing and Reporting Experimental Data in *Biochemical Techniques - Theory and Practice*, eds Robyt, J. F. & White, B. J. Brooks/Cole Publishing Co., CA, USA, pp. 1-20.
- [137] Russell, N. J. (1989) Adaptive Modifications in Membranes of Halotolerant and Halophilic Microorganisms. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 21:93–113.
- [138] Sánchez-Porro, C., Martín, S., Mellado, E., Ventosa, A. (2003) Diversity of Moderately Halophilic Bacteria Producing Extracellular Hydrolytic Enzymes. *J Appl Microbiol*, 94:295-300.
- [139] Sanchez-Porro, C., Mellado, E., Bertoldo, C., Antranikian, G., Ventosa, A. (2003a) Screening and Characterization of the Protease CP1 Produced by the Moderately Halophilic Bacterium *Pseudoalteromonas* sp. Strain CP76. *Extremophiles*, 7:221-8.
- [140] Sanchez-Porro, C. (2005) Caracterización Bioquímica y Molecular de la Haloproteasa CP1 Producida por *Pseudoalteromonas ruthenica*. *Doktora Tezi*, Sevilla Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Mikrobiyoloji ve Parazitoloji Bölümü, İspanya, 102-144.
- [141] Sánchez-Porro, C., Tokunaga, H., Tokunaga, M., Ventosa, A. (2007) *Chromohalobacter japonicus* sp. nov., a Moderately Halophilic Bacterium Isolated from a Japanese Salty Food. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57, 2262-2266.

- [142] Saran, S., Mahajan, R. V., Kaushik, R., Isar, J., Saxena, R. K. (2013) Enzyme Mediated Beam House Operations of Leather Industry: A Needed Step Towards Greener Technology. *J Clean Prod.*, Vol 54, 315- 322.
- [143] Sato, S., Tokuda, H., Koizumi, T., Nakanishi, K. (2004) Purification and Characterization of an Extracellular Proteinase Having Milk Clotting Activity from *Enterococcus faecalis* TUA2495L. *Food Science and Technology Research*, 10: 44-50.
- [144] Schilling, O., Overall, C. (2008) Proteome-derived, Database-searchable Peptide Libraries for Identifying Protease Cleavage Sites. *Nat. Biotechnol.*, 26, 685–694.
- [145] Schleifer, K. H., Klipper-Balz, R., Devriese, L. A. (1984) *Staphylococcus arlettae* sp. nov., *S. equorum* sp. nov., *S. kloosii* sp. nov.: Three Coagulase-negative Novobiocin-resistant Species from Animals. *Systematic and Applied Microbiology*, 5, 501–509.
- [146] Secades, P., Guijarro, J. A. (1999) Purification and Characterization of an Extracellular Protease from the Fish Pathogen *Yersinia ruckeri* and Effect of Culture Conditions on Production. *Applied Environmental Microbiology*, 65(9): 3969–3975.
- [147] Setati, E.M. (2010) Diversity and Industrial Potential of Hydrolase-producing Halophilic/Halotolerant Eubacteria. *Afr J Biotechnol.*, 9:1555–1560.
- [148] Setyorini, E., Kim, Y.J., Takenaka, S., Murakami, S., Aoki, K. (2006) Purification and Characterization of a Halotolerant Intracellular Protease from *Bacillus subtilis* Strain FP133. *Journal of Basic Microbiology*, 46: 294 –304.
- [149] Shivanand, P., Jayaraman, G. (2009) Production of Extracellular Protease from Halotolerant Bacterium, *Bacillus aquimaris* Strain VITP4 Isolated from Kumta Coast. *Process Biochemistry*, 44:10088–10094.
- [150] Shumi, W., Hossain, M.D.T., Anwar, M.N. (2004) Production of Protease from *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Agriculture and Biology*, 6: 1097-1100.
- [151] Sloma, A., Rufo, G. A., Theriault, K. A., Dwyer, M., Wilson S. W., Pero, J. (1991) Cloning and Characterization of the Gene for an Additional Extracellular Serine Protease of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 173: 6889 –6895.
- [152] Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G. (1986) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.

- [153] Sorokin, D. Y., Tourova, T. P., Kolganova, T. V., Spiridonova, E. M., Berg, I. A., Muyzer, G. (2006) *Thiomicrospira halophila* sp. nov., a Moderately Halophilic, Obligately Chemolithoautotrophic, Sulfur-oxidizing Bacterium from Hypersaline Lakes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56: 2375-2380.
- [154] Sorokin, D. Y., Tourova, T. P., Braker, G., Muyzer, G. (2007) *Thiohalomonas denitrificans* gen. nov., sp. nov. and *Thiohalomonas nitratreducens* sp. nov., novel Obligately Chemolithoautotrophic, Moderately Halophilic, Thiodenitrifying *Gammaproteobacteria* from Hypersaline Habitats. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 1582-1589.
- [155] Taylor, A. (1993) Aminopeptidases: Structure and Function: Review. *FASEB J.*, Volume 7, Issue 2, Pages 290-298.
- [156] Thanikaivelan, P., Rao, J.R., Nair, B.U., Ramasami, T. (2004) Progress and Recent Trends in Biotechnological Methods for Leather Processing. *Trends Biotechnol.*, 22, 181-188.
- [157] Toptaş, A. (1993) *Deri Teknolojisi*, ReinLeader-Okkimya, Sade Ofset Matbaacılık, İstanbul, Türkiye, 846.
- [158] Toptaş, A. (1998) *Deride Kalite Tespiti*, Sade Ofset Matbaacılık, İstanbul, Türkiye, 314.
- [159] Toptaş, A. (2004) *Deri İşletisinde Hata Kaynakları*, ReinLeader-Okkimya, Sade Ofset Matbaacılık, İstanbul, Türkiye, 327.
- [160] Toyoda, Y., Oowaya, K., Takano, M., Shibata, S. (1997) Stabilization of Enzyme. Patent JP9143167.
- [161] Türktaş, M. (2004) Denizli’de Debbağlık (Tabaklık-Dericilik). *Geçmişten Günümüze Denizli Yerel Tarih ve Kültür Dergisi*, Sayı, 2: 26.
- [162] Van Qua, D., Simidu, U., Taga, N. (1981) Purification and Some Properties of Halophilic Protease Produced by a Moderately Halophilic Marine *Pseudomonas* sp. *Canadian Journal of Microbiology*, 27(5): 505-510.
- [163] Ventosa, A., Quesada, E., Rodriguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F. & Ramos-Cormenzana, A. (1982) Numerical Taxonomy of Moderately Halophilic Gram-negative Rods. *J Gen Microbiol.*, 128, 1959–1968.
- [164] Ventosa, A., Gutierrez, M.C., Garcia, M.T., Ruiz-Berraquero, F. (1989) Classification of "*Chromobacterium marismortui*" in a New Genus,

- Chromohalobacter* gen. nov., as *Chromohalobacter marismortui* comb. nov., nom. rev. Int. J. Syst. Bacteriol., 39, 382-386.
- [165] Ventosa, A., Márquez, M.C., Garabito, M.J., Arahal, D.R. (1998) Moderately Halophilic Gram-positive Bacterial Diversity in Hypersaline Environments, *Extremophiles*, 2, 297-304.
- [166] Venugopal, M., Saramma, A.V. (2007) An Alkaline Protease from *Bacillus circulans* BM15, Newly Isolated from a Mangrove Station: Characterization and Application in Laundry Detergent Formulations. *Indian Journal of Microbiology*, 47: 298-303.
- [167] Gupta, V. K. (2016). *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Aspergillus System Properties and Applications*: Elsevier.
- [168] Vishnuvardhan Reddy, S., Thirumala, M., Farooq, M., Sasikala, C., Venkata Ramana, C. (2016) *Marinococcus salis*, sp., nov., a Moderately Halophilic Bacterium Isolated from a Salt Marsh. *Arch. Microbiol.*, 198, 1013-1018.
- [169] Vreeland, R.H., Litcheld, C.D., Martin, E.L. and Elliot, E. (1980) *Halomonas elongata*, a New Genus and Species of Extremely Salt-Tolerant Bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 30: 485–495.
- [170] Vreeland, R. H. (2005) Genus *Halomonas*, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1st Edition., In N. R. Krieg and J. G. Nolt Editors., Williams and Wilkins, Baltimore, Md.
- [171] Wang, Y., Cao, L.L., Tang, S.K., Lou, K., Mao, P.H., Jin, X., Jiang, C.L., Xu, L.H. & Li, W.J. (2009) *Marinococcus luteus* sp. nov., a Halotolerant Bacterium Isolated from a Salt Lake, and Emended Description of the Genus *Marinococcus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 59, 2875-2879.
- [172] Wang, Y. X., Liu, J. H., Xiao, W., Ma, X. L., Lai, Y. H., Li, Z. Y., Ji, K. Y., Wen, M. L. & Cui, X. L. (2013) *Aliifodinibius roseus* gen. nov., sp. nov., and *Aliifodinibius sediminis* sp. nov., Two Moderately Halophilic Bacteria Isolated from Salt Mine Samples. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 63, 2907–2913.
- [173] Watson, R. R. (1976) Substrate Specificities of Aminopeptidases: A Specific Method for Microbial Differentiation. *Methods Microbiol.*, 9:1–14.
- [174] Weaver, L. H., Kester, W. R., Matthews, B. W. (1977) A Crystallographic Study of the Complex of Phosphoramidon with Thermolysin. A Model for the Presumed Catalytic Transition State and for the Binding of Structures. *J. Mol. Biol.*, 114:119–

132.

- [175] Wiseman, A. (1995) Introduction to Principles. In: Wiseman A, Editor. Handbook of Enzyme Biotechnology, 3rd Edition. Padstow, Cornwall, UK.
- [176] Yenigün, B. (2000) Domates Filizinden Asit Fosfatazın Kısmi Saflaştırılması ve Özelliklerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 85.
- [177] Yıldız, N. (1993) Eski Çağda Deri Kullanımı ve Teknolojisi, İstanbul: Marmara Üniversitesi Yayınları, 23.
- [178] Yılmaz, P. (2010) Tuzlanmış Derilerden Ilımlı ve Aşırı Halofil Bakterilerin İzolasyonu ve Moleküler Yöntemlerle Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye, 126.
- [179] Zambare, V., Nilegaonkar, S., Kanekar, P. (2010) Application of Protease from *Bacillus cereus* MCM B-326 as a Bating Agent in Leather Processing. IIOAB J., 1 (4) 18-21.
- [180] Zarparvar, P., Amoozegar, M. A., Nikou, M. M., Schumann, P. & Ventosa, A. (2014) *Salinithrix halophila* gen. nov., sp. nov., a Halophilic Bacterium in the Family *Thermoactinomycetaceae*. Int J Syst Evol Microbiol., 64, 4115–4119.
- [181] <http://www.bacterio.net/> , Erişim Tarihi Şubat 2019.
- [182] <http://www.biyolojisesiti.net/uniteler/sinir-sistemi/derininyapisi.html>, Erişim Tarihi: Ocak 2019.
- [183] <http://droualb.faculty.mjc.edu/Lecture%20Notes/Unit%201/Integumentary%20with%20figures.htm> , Erişim Tarihi: Mayıs 2018.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Neslihan ÖZTÜRK
Doğum Yeri ve Tarihi : Üsküdar, 14.09.1992
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : ozturkness@gmail.com

Öğrenim Durumu

Derece	Bölüm/Program	Üniversite/Lise	MezuniyetYılı
Lise	Fen	Türk Kızılayı Kartal Lisesi	2010
Üniversite	Biyoloji	Hacettepe Üniversitesi	2014

Bildiri

Ozturk, N., Birbir, M., Ogan, A., Çağlayan, P. (2018) The Importance of Protease Enzyme in Leather Industry. IV. International Congress for Applied Biological Sciences, 3-5 May, Eskişehir, Turkey.

