



**PROTEAZIN ÜRETİMİNİ ARTTIRMAK İÇİN KİMYASAL MUTAGENEZ  
(ETİDYUM BROMİD, EtBr) ve FİZİKSEL MUTAGENEZ (UV) YOLUYLA  
BACILLUS SUBTILIS E6-5'DEN MUTANT SUŞ GELİŞTİRİLMESİ VE  
ÜRETİM ORTAMININ OPTİMİZASYONU**

**Büşra Özalpar**





T.C.  
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PROTEAZIN ÜRETİMİNİ ARTTIRMAK İÇİN KİMYASAL MUTAGENEZ  
(ETİDYUM BROMİD, EtBr) ve FİZİKSEL MUTAGENEZ (UV) YOLUYLA  
*BACILLUS SUBTILIS* E6-5'DEN MUTANT SUŞ GELİŞTİRİLMESİ VE  
ÜRETİM ORTAMININ OPTİMİZASYONU**

**Büşra ÖZALPAR**

Prof. Dr. Elif DEMİRKAN  
( Danışman )

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA-2018

## TEZ ONAYI

Büşra Özalpar tarafından hazırlanan 'Proteazın üretimini arttırmak için kimyasal mutagenез (Etidyum bromid, EtBr) ve fiziksel mutagenез (Ultraviyole, UV) yoluyla *Bacillus subtilis* E6-5'den mutant suş geliştirmesi ve üretim ortamının optimizasyonu" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman** : Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

**Başkan** : Prof. Dr. Elif DEMİRKAN  
Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi,  
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

**Üye** : Doç. Dr. Ferda ARI  
Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi,  
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

**Üye** : Dr. Öğr. Üyesi Gökçe TANER  
Bursa Teknik Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi  
ve Doğa Bilimleri,  
Biyomühendislik Anabilim Dalı

İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

  
Prof. Dr. Ali BAYRAM

Enstitü Müdürü

5..2..2019

**B.U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;**

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
  - görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
  - başkalarının eserlerinden yararlanması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
  - atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
  - kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
  - ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı
- beyan ederim.**

05/02/19

  
**Büşra ÖZALPAR**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

PROTEAZIN ÜRETİMİNİ ARTTIRMAK İÇİN KİMYASAL MUTAGENEZ (ETİDYUM BROMİD, EtBr) ve FİZİKSEL MUTAGENEZ (UV) YOLUYLA *BACILLUS SUBTILIS* E6-5'DEN MUTANT SUŞ GELİŞTİRİLMESİ VE ÜRETİM ORTAMININ OPTİMİZASYONU

**Büşra ÖZALPAR**

Bursa Uludağ Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

**Danışman:** Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

Bu çalışmada fiziksel mutajen ultraviyole (UV) ve kimyasal mutajen etidyum bromid (EtBr) 2'li kombinasyon ile muamele edilen *Bacillus subtilis* E6-5 suşundan proteaz üreten toplam 200 adet mutant elde edilmiştir. Bu mutantlar içerisinde en büyük zon çapına (25 mm) sahip olan mutant suş seçilerek bu suş *Bacillus subtilis* ATA38 olarak adlandırılmıştır. Elde edilen mutantın sıvı ortamda enzim üretim kapasitesi test edilmiş ve mutant suş ana suştan 18,2 kat daha fazla enzim üretmiştir. En yüksek enzim üretimi 24. saatte elde edilmiştir. Fiziksel ve besinsel faktörlerin enzim üretimi üzerine etkileri incelenmiştir. Besinsel faktörler için farklı karbon ve azot kaynaklarının, metal iyonlarının etkileri incelenmiştir. En iyi karbon kaynağı olarak Buğday nişastası (525 IU/mL), en iyi azot kaynağı olarak et özütü (850 IU/mL) ve metal iyonu olarak KCl+CaCl<sub>2</sub> (548 IU/mL) elde edilirken, fiziksel parametreler içinde en iyi sonuçlar 37°C' de, pH 6.0' da, çalkalama hızı olarak 200 rpm, inokülasyon miktarı %1 ve inokülüm yaşı 18 saat olarak elde edilmiştir.

Proteaz üretimini artırmak amacıyla, çalışmada besinsel ve fiziksel koşulların optimize edilmesi ile oluşturulan modifiye ortamda ATA38 mutantı temel besi ortamına göre %171'lik bir artışla enzim üretimi göstermiştir. Ana suş (60 IU/mL) ile kıyaslandığında mutant ATA38 modifiye ortamda (1096 IU/mL) 18,2 kat verim artışı sağlamıştır. Elde edilen mutant suşun endüstriyel ölçekte proteaz üretimi, büyük bir potansiyele sahip olabilir.

**Anahtar Kelimeler:** *Bacillus*, Proteaz, Mutasyon, UV, EtBr, Besinsel Faktörler, Fiziksel Faktörler

**2018, xi+ 95 Sayfa**

## ABSTRACT

MSc Thesis

MUTANT STRAIN IMPROVEMENT FROM BACILLUS SUBTILIS E6-5 BY PHYSICAL MUTAGENESIS (ULTRAVIOLE, UV) AND CHEMICAL MUTAGENESIS (ETHIDIUM BROMIDE, EtBr) FOR ENHANCED PRODUCTION OF PROTEASE AND OPTIMIZATION OF GROWTH MEDIUM

**Büşra ÖZALPAR**

Bursa Uludağ University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

**Supervisor:** Prof. Dr. Elif DEMIRKAN

In this study, the parent strain *Bacillus subtilis* E6-5 was exposed to UV and EtBr treatment by classical mutation procedure, and total 200 mutants were obtained. Among of these mutants, a mutant strain was selected based on its ability to produce highest zone formation (25 mm), and strain was named as *Bacillus subtilis* ATA38. Obtained mutant was tested for enzyme production capacity in the liquid media, the mutant ATA38 showed 18.2 fold increase in protease production over the parent strain *B.subtilis* E6-5. It was found that mutant strain produced protease on maximum level at 24 th hour. In addition, the effects of nutritional and physical factors on enzyme production were examined. For this purpose, the effects of major medium ingredients (different carbon sources, nitrogen sources and metal ions) on the production of the enzyme were used. The best carbon source was found to be wheat starch (525 IU/mL). Among the organic nitrogen sources, the highest enzyme production was obtained in the presence of meat extract (850 IU/mL), KCl+CaCl<sub>2</sub> (528 IU/mL) was detected as effective as metal ion. In the physical parameters, the best results was obtained at 37°C, pH 6.0, 200 rpm as agitation rate, 1% as inoculum size and 18 hours as inoculum age.

A new medium was obtained by optimizing the incubation conditions (nutritional and physical factors) of protease production from ATA38 mutant. In this medium, enzyme yield was enhanced 171% compared to basal medium. The production of protease by ATA38 was increased 18.2 fold compared to the parental strain. The mutant strain produced may have a prominent potential for protease production on an industrial scale.

**Key words:** *Bacillus*, Protease, Mutagenesis, UV, EtBr, Nutritional Factors, Physical Factors

**2018, xi+95 pages**

## TEŞEKKÜR

Tanıdığım günden bu yana benden hiçbir koşulda bilgisini, deneyimini, sabrını, Őefkatini esirgemeyen, her zaman gŐlen gŐzleriyle bakan, Őđrencisi olduğum için kendimi çok Őanslı hissettiğim, gurur duyduğum hayatımın her alanında yol gŐsterici olan, hayatımda yeni umutlara yol açan çok saygıdeğer sevgili danıŐmanım Prof. Dr. Elif DEMİRKAN'a, tezimin hazırlanma aşamasında desteklerini esirgemeyen, her zaman iyi niyetliyle ve yardımseverliği ile yanımda olan, kendime Örnek aldığım Baran Enes GŐLER'e, desteklerini esirgemeyen diğer ekip arkadaşlarım ArŐ. GŐr. Tuba SEVGİ, Moulida ABDOU, Behice Zeren, KŐbra Özdemir' e ve her koşulda yanımda olup, desteklerini esirgemeyen Aileme çok teŐekkŐr ederim.

BuŐra ÖZALPAR

.../.../...



## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER .....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xii
1. GİRİŞ .....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI .....	4
2.1. Enzimler .....	4
2.2. Proteazların Tarihçesi .....	7
2.3.1.Endopeptidazlar.....	9
2.3.2.Oligopeptidazlar .....	13
2.3.3. Ekzopeptidazlar.....	14
2.3.4.Omegapeptidaz.....	16
2.4. Proteaz Kaynakları .....	17
2.4.1.Bitkisel kaynaklı proteazlar.....	17
2.4.2. Hayvansal Kaynaklı Proteazlar .....	19
2.4.3. Mikrobiyal Kaynaklı Proteazlar.....	20
2.5.Proteazların Endüstriyel Kullanım Alanı .....	23
2.5.1. Deri Endüstrisinde Kullanım Alanları .....	23
2.5.2. Tekstil Endüstrisinde Kullanımı .....	25
2.5.3. Deterjan Endüstrisinde Kullanımı.....	25
2.5.4.Gıda Endüstrisinde Kullanımı .....	27
2.5.5. Kozmetik ve İlaç Endüstrisinde Kullanımı .....	29
2.5.6. Gümüş Eldesinde Kullanımı .....	30
2.5.7. Atıkların İşlenmesinde Kullanımı .....	30
2.6. <i>Bacillus</i> Cinsinin Genel Özellikleri .....	31

2.7. <i>Bacillus</i> Proteazının Genel Özellikleri.....	33
2.8. Mutasyon.....	34
2.9. Mutajenler .....	36
2.9.1. Fiziksel Mutajenler.....	36
2.9.2. Kimyasal Mutajenler .....	37
2.10. UV(Ultraviole) Mutasyonu ve Tamir Mekanizmaları .....	38
2.10.1. UV(Ultraviole) Mutasyonu .....	38
2.10.2. Tamir Mekanizmaları.....	41
2.11. Etidyum Bromid (EtBr) ile Mutasyon ve Tamir Mekanizması .....	45
2.11.1. Etidyum Bromid (EtBr) ile Mutasyon (Çerçeve Kayması Mutasyonu).....	45
2.11.2. Tamir Mekanizması .....	48
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	50
3.1. Materyal .....	50
3. 2. Yöntem.....	50
3.2.1. Fiziksel Mutajen UV İle Yapılan Mutasyon Çalışması .....	50
3.2.2. Kimyasal Mutajen EtBr (Etidyum Bromid) İle Yapılan Mutasyon Çalışması .....	51
3.2.3. Bakteri Üretiminde Kullanılan Besiyerleri ve Bakteri Üretim Koşulları.....	52
3.2.4. Bakteri Üremesinin ve Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi.....	53
3.3. Enzim Üretimi Üzerine Besinsel Faktörlerin Etkisi.....	54
3.3.1. Karbon (C) Kaynaklarının Etkisi .....	54
3.3.2. Azot (N) Kaynaklarının Etkisi .....	54
3.3.3. Metal İyonu Kaynaklarının Etkisi .....	55
3.4. Enzim Üretimi Üzerine Fiziksel Faktörlerin Etkisi .....	55
3.4.1. Sıcaklık Etkisi .....	55
3.4.2. pH Etkisi .....	55
3.4.3. Havalandırmanın Etkisi (Çalkalama hızı).....	56
3.4.4. İnokülasyon Miktarının Etkisi.....	56
3.4.5. İnokülasyon Yaşının Etkisi .....	56
3.5. Optimum Olan Besinsel ve Fiziksel Koşulların Birleştirilmesi İle Modifiye Ortam Eldesi.....	56
3.6. Tirozin Standart Eğrisi Grafiği ve Hazırlanışı .....	56
4. BULGULAR.....	58

4.1. Mutant Bakterilerin Elde Edilmesi .....	58
4.2. Mutantın Kantitatif Proteaz Üretim Kapasitesinin Saptanması .....	63
4.3. Enzim Üretimi Üzerine Etki Eden Besinsel Faktörler .....	64
4.3.1. Karbon Kaynaklarının Etkisi.....	65
4.3.2. Azot Kaynaklarının Etkisi.....	66
4.3.3. Metal İyonu Kaynaklarının Etkisi.....	68
4.4. Enzim Üretimi Üzerine Etki Eden Fiziksel Faktörler .....	70
4.4.1. Sıcaklığın Etkisi .....	70
4.4.2. pH' nın Etkisi .....	71
4.4.3. Havalandırmanın Etkisi (Çalkalanma etkisi) .....	72
4.4.4. İnokülasyon Miktarının Etkisi.....	73
4.4.5. İnokülasyon Yaşının Etkisi .....	75
4.5. Maksimum Proteaz Üretimi İçin Modifiye Ortamın Hazırlanması .....	76
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	77
KAYNAKLAR .....	84
ÖZGEÇMİŞ .....	91

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

%  
(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
°C  
Asp  
Ba<sup>2+</sup>  
C  
Ca<sup>2+</sup>  
CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O  
dk  
Fe<sup>2+</sup>/ Fe<sup>3+</sup>  
FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O  
G  
g  
g/mol  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
His  
HCl  
IU  
K<sup>+</sup>  
kb  
KCl  
kDa  
kg  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
KI  
KNO<sub>3</sub>  
LiSO<sub>4</sub>  
Log  
M  
mg  
Mg<sup>2+</sup>  
MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O  
mL  
mm  
mM  
mmol  
Mn<sup>2+</sup>  
MnSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O  
Na  
Na<sup>2+</sup>  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O  
NaCl  
NaDPH<sub>2</sub>.Na<sub>4</sub>

### Açıklama

Yüzde Orantı  
Amonyum Sülfat  
Santigrat Derece  
Aspartik Asit  
Baryum İyonu  
Sitozin  
Kalsiyum İyonu  
Kalsiyum Klorür Dihidrat  
Dakika  
Demir İyonu  
Demir Sülfat Heptahidrat  
Guanin  
Gram  
Mol Kütleli  
Hidrojen Peroksit  
Histidin  
Hidroklorik Asit  
Uluslararası Enzim Ünitesi  
Potasyum İyonu  
Kilobaz  
Potasyum Klorür  
Kilodalton  
Kilogram  
Potasyum Dihidrojen Fosfat  
Potasyum İyodür  
Potasyum Nitrat  
Lityum Sülfat  
Logaritmik  
Molar  
Miligram  
Magnezyum İyonu  
Magnezyum Sülfat  
Mililitre  
Milimetre  
Milimolar  
Milimol  
Mangan İyonu  
Mangan Sülfat Heptahidrat  
Sodyum  
Sodyum İyonu  
Disodyum Hidrojen Fosfat Heptahidrat  
Sodyum Klorür  
Dihydronicotinamide AdeninDinucleotide

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

$\text{NaHPO}_4$

$\text{NaNO}_3$

$\text{NH}_4\text{Cl}$

$\text{NH}_4\text{NO}_3$

nm

P

pKa

logaritması

$R_2$

(Ser

UV

$\text{Zn}^{2+}$

$\text{ZnCl}_2$

$\text{ZnSO}_4$

$\alpha$

$\beta$

$\mu\text{L}$

$\mu\text{m}$

$\mu\text{M}$

$\mu\text{mol}$

Sodyum Dihidrojen Fosfat Dehidrat

Sodyum Fosfat

Sodyum Nitrat

Amonyum Klorür

Amonyum Nitrat

Nanometre

Fosfor

Asidik iyonlaşma sabitesinin negatif

Regresyon Katsayısı

Serin

Ultraviyole

Çinko İyonu

Çinko Klorür

Çinko Sülfat

Alfa

Beta

Mikrolitre

Mikrometre

Mikromolar

Mikromol

## Kısaltmalar

AMP  
ATP  
DNA  
DTT  
EC  
EDTA  
EMS  
EtBr  
MMS  
His  
IUBMB  
Birliği  
MW  
O.D.  
PMSF  
rpm  
s  
Ser  
sp.  
UV  
TCA  
Vmax

## Açıklama

Adenozin Monofosfat  
Adenozin Trifosfat  
Deoksiribonükleik Asit  
1,4-dithiothreitol  
Enzim Komisyonu  
Etilendiamin tetraasetik asit  
Etil Metansülfonat  
Etidyum Bromid  
Metil Metansülfonat  
Histidin  
Uluslar Arası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji  
Moleküler ağırlık  
Optik Densite  
Phenylmethylsulfonyl Fluoride  
Revolutions Per Minute  
Saniye  
Serin  
Tür  
Ultraviyole  
Trikloro asetik asit  
Maksimum enzim aktivitesi

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. Proteazların sınıflandırılması .....	9
Şekil 2. 2. Endopeptidazların polipeptid üzerindeki etki mekanizması .....	10
Şekil 2. 3. Ekzopeptidazların polipeptid üzerindeki etki mekanizması .....	14
Şekil 2. 4. Aminopeptidazların alt grupları ve etki mekanizmaları .....	15
Şekil 2. 5. Karboksipeptidazların alt grupları ve etki mekanizmaları .....	16
Şekil 2. 6. Omega peptidazların etki mekanizması .....	17
Şekil 2. 7. Endüstriyel enzimlerin endüstride kullanım yüzdeleri ve Dünya çapında proteaz enzimi market payı 2013-2019 arası .....	23
Şekil 2. 8. <i>Bacillus sp.</i> 'in mikroskopik görüntüleri .....	32
Şekil 2. 9. UV ışığı etkisi sonucu dimer oluşumu .....	39
Şekil 2. 10. UV radyasyonu sonucu en toksik ve mutajenik olan DNA lezyonu, siklobütan pirimidin dimerleri oluşumu; (A) timin-timin siklobütan pirimidin dimeri ve tamir mekanizması, (B) timin-sitozin dimeri ve tamir mekanizması .....	39
Şekil 2. 11. Fotoreaktivasyon (fotoreversal) tamir mekanizması .....	41
Şekil 2. 12. Baz eksizyon tamir mekanizması .....	43
Şekil 2. 13. Timin dimerinin T4 fajına özgü baz eksizyon tamir mekanizması.....	44
Şekil 2. 14. Nükleotid eksizyon tamir mekanizması.....	45
Şekil 2. 15. Ethidyum bromid'in kimyasal yapısı.....	45
Şekil 2. 16. Etidyum bromidin DNA çift sarmalının interkalasyonu.....	46
Şekil 2. 17. Çerçeve Kayması Mutasyonu .....	48
Şekil 2. 18. Missmatch (Hatalı Eşleşme) Tamiri .....	49
Şekil 3. 1. UV mutasyonu oluşturma düzeneği.....	51
Şekil 3. 2. Tirozin standart grafiği .....	57
Şekil 4. 1. Ana suş (A: 8mm) ve UV mutantları EB3 (B:13 mm), EB4 (C:14 mm) ve EB7 (D:13 mm)'nin yağsız süt tozlu ortamındaki proteaz zon çapları .....	60
Şekil 4. 2. Ana suş (A: 8mm) ve EtBr mutanlığı ATA38 (B:25 mm)'in yağsız süt tozlu ortamındaki proteaz zon çapları .....	63
Şekil 4. 3. ATA38' in proteaz üretim kapasitesi ve üreme değerlerinin zamana bağlı değişimleri .....	64

Şekil 4. 4. Karbon kaynaklarının mutantın proteaz aktivitesi ve üreme kapasitesi üzerine etkileri.....	66
Şekil 4. 5. Azot kaynaklarının mutantın proteaz aktivitesi ve üreme kapasitesi üzerine etkileri.....	68
Şekil 4. 6. Metal iyonlarının mutantın proteaz aktivitesi ve üreme kapasitesi üzerine etkileri.....	69
Şekil 4. 7. Sıcaklığın proteaz aktivitesi ve üreme kapasitesi üzerine etkisi .....	71
Şekil 4. 8. pH faktörünün mutantın proteaz aktivitesi ve üreme kapasitesi üzerine etkisi .....	72
Şekil 4. 9. Havalandırmamanın mutantın proteaz aktivitesi ve üreme kapasitesi üzerine etkileri.....	73
Şekil 4. 10. İnokülasyon miktarının mutantın proteaz aktivitesi ve üreme kapasitesi üzerine etkisi.....	74
Şekil 4. 11. İnokülasyon yaşının mutantın proteaz aktivitesi ve üreme kapasitesi üzerine etkisi .....	75





## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa

Çizelge 2. 1. Dünya çapında üretilen enzim tabanlı deterjanlar ve enzim kaynağı .....	27
Çizelge 3. 1. Bakterilerin saklanması, geliştirilmesi ve enzim üretim kapasitelerinin ölçülmesinde kullanılan besiyerleri .....	52
Çizelge 4. 1. 5 cm uzaklıktan yapılan UV denemeleri sonucu elde edilen mutant suşların koloni ve proteaz zon çapları (Ana suş proteaz zon çapı 8 mm) .....	59
Çizelge 4. 2. 10 cm uzaklıktan yapılan UV denemeleri sonucu elde edilen mutant suşların koloni ve proteaz zon çapları (Ana suş proteaz zon çapı 8 mm) .....	59
Çizelge 4. 3. 15 cm uzaklıktan yapılan UV denemeleri sonucu elde edilen mutant suşların koloni ve proteaz zon çapları (Ana suş proteaz zon çapı 8 mm) .....	60
Çizelge 4. 4. <i>Bacillus subtilis</i> E6-5'in hayatta kalma oranı üzerindeki UV radyasyonun etkisi .....	61
Çizelge 4. 5. UV mutantlarına farklı EtBr konsantrasyonlarının mutajenik etkileri ile proteaz üretimlerinin kalitatif tespiti .....	62
Çizelge 4.6. Ana suş E6-5 ve mutant ATA38 suşunun proteaz üretim kapasitesi ve üreme değerlerinin zamana bağlı değişim değerleri .....	64
Çizelge 4. 7. Farklı karbon kaynaklarının mutantın enzim üretimi ve üremesi üzerine etkileri .....	66
Çizelge 4. 8. Farklı azot kaynaklarının mutantın enzim üretimi ve üremesi üzerine etkileri .....	67
Çizelge 4. 9. Metal kaynaklarının mutantın proteaz aktivitesi ve üreme miktarı üzerine etkileri .....	69
Çizelge 4. 10. Kontrol ortamındaki metallerle KCI etkisinin belirlenmesi .....	70
Çizelge 4. 11. Sıcaklığın mutantın proteaz aktivitesi ve üremesi üzerine etkileri .....	70
Çizelge 4. 12. pH'nın mutantın proteaz üretim kapasitesi ve üremesi üzerine etkileri ..	72
Çizelge 4. 13. Havalandırmanın mutantın proteaz üretim kapasitesi ve üremesi üzerine etkileri .....	73
Çizelge 4. 15. İnokülasyon miktarının proteaz üretim kapasitesi ve üremesi üzerine etkileri .....	74
Çizelge 4. 16. İnokülasyon yaşının mutantın proteaz üretim kapasitesi ve üremesi üzerine etkileri .....	75

Çizelge 4. 17. Kontrol ortamı ile modifiye ortamın üreme ve enzim üretim kapasitesine etkisi .....	76
--	----



## 1. GİRİŞ

Canlılar, biyolojik yaşam döngülerini sürdürebilmek için birçok biyokimyasal tepkimelere ihtiyaç duyarlar. Bu tepkimeleri gerçekleştirebilmelerini sağlayan biyolojik katalizörlere “enzim” adı verilmektedir. Enzimler canlı organizmalarda oluşan ve tüm tepkimelerin optimum koşullarda gerçekleşmesini sağlamasıyla birlikte bu tepkimeleri düzenleyen, katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu (ribozimler) hariç olmak üzere genellikle protein yapısındaki özelleşmiş biyolojik katalizörlerdir. Enzimler de diğer katalizörler gibi tepkimelerin hızlarını arttırarak çalışırlar. Benzer koşullar altında, enzim varlığında gerçekleşen tepkime oranı, katalizör olmadığı durumdaki tepkime oranına göre bir veya birkaç milyon kat daha yüksek olabilmektedir (Uludağ 2000). Enzim sözcük anlamı olarak eski Yunanca’da ilk kez mayalardan elde edildiği için ‘mayada bulunan’ (in yeast) anlamında kullanılsada, günümüzde enzimler yaşayan tüm hücrelerden; hayvanlardan, bitkilerden ve çoğunlukla mikroorganizmlardan elde edilebilmektedir (Polaina ve MacCabe 2007). Bunun sebebi mikrobiyal enzimlerin bitkisel, hayvansal ya da kimyasal olarak üretilen enzimlere göre daha avantajlı olmalarıdır. Katalitik aktiviteleri fazladır, istenmeyen yan ürün oluşturmamaktadırlar, daha stabil ve ucuzdurlar, ayrıca tek bir üretim aşamasında çok büyük miktarlarda üretimi mümkün olmaktadır (Zeman ve Mcree 1985).

Hücrelerde önemli metabolik faaliyetlere sahip olan enzimler, günümüzde artık çok çeşitli amaçlar için kullanılmak üzere hayata girmişlerdir. Enzimler; meyve suyu, süt, ekmek, peynir, bebek gıdaları üretiminde, alkollü içecek ve temizlik malzemelerinde, tıpta teşhis ve tedavi sürecinde, kağıt, nişasta, kauçuk, fotoğraf endüstrisinde, kimya ve ziraat alanlarında, kontakt lens temizleyicilerinden, biyolojik savaşta kullanıma kadar çok geniş alanlarda kullanılmaktadırlar. Enzimlerin bu kadar alanda kullanılabilir olmasının nedenleri ise in-vitro şartlarda aktif olması, maliyet bakımından ucuz olması, çok farklı alanlarda kullanılabilir olması sebebi ve en önemlisi de enzimin alerjik ya da toksik etkiye sahip olmamasıdır (Wiseman 1987). Endüstriyel enzimlerin dünya pazarındaki payı 1,6 milyar doları aşmaktadır (Ottrup ve Jorgensen 2002, Schallmey ve ark. 2004, Zakaria 2006). Gıda, nişasta ve deterjan endüstrileri, endüstriyel enzim üretiminin %75’ini kullanmaktadır ve amilaz, lipaz, selüloz, pektinaz, proteaz gibi

hidrolazlar en yaygın kullanılan enzim gruplarıdır (Topal ve ark. 2000). Endüstriyel anlamda kullanılan enzimlerin %80'i polimerlerin doğal yapısını bozabilen hidrolazlardır (Kasavi 2006). Endüstriyel enzimler arasında ise proteazlar %60'lık Pazar payı ile en büyük ölçekteki grubu oluşturmaktadır (Genckal ve Tari 2006). Bunu %28 ile karbohidrazlar, %2 ile lipazlar ve %10 ile diğer enzim grupları izlemektedir (Dinçbaş 2009). Proteazlar doğada bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kalıntıların daha küçük parça ve atomlarına parçalanmasında önemli rol oynamaktadır. Böylece besin döngüsünü ve bitkilerin topraktan besinlerin alabilmelerini sağlamaktadır (Aoki ve ark 1995). Proteazlar ayrıca deterjan ve temizlik malzemeleri üretiminde, et, süt, deri, ilaç, bira üretimi, organik sentezler ve atık muamelesinde kullanılmaktadır. (Kıran ve ark. 2006). Günümüzde proteazlar gibi birçok mikrobiyal enzim grupları önemli araştırma konusu haline gelmiş ve dünyanın hemen hemen her yerinde üretilmeye, endüstri ve sanayi alanında kullanılmaya başlanmıştır.

Proteazlar bakteri, küf, maya gibi çeşitli kaynaklardan elde edilebilmesi sağlansa bile *Bacillus* cinsi bakterileri çok çeşitli ortamlardan izolasyonun kolay olması, hem kompleks hem de sentetik besi ortamında gelişebilmeleri sebebi ile biyoteknolojide en fazla kullanılan mikroorganizmalardır (Mabrouk ve ark. 1998).

Genel olarak mikroorganizmalardan yüksek oranda enzim verimi elde etmek için, ya mikroorganizmadan direkt elde edilmekte ya mutasyon ile yeni mutantlar elde edilmekte ya da üretim ortamının değiştirilmesi yoluna gidilmektedir. Özellikle besin ortamında bulunan karbon ve azot kaynakları, inorganik tuzlar ve diğer büyüme faktörleri, bakterilerin enzim üretme kapasiteleri üzerinde önemli etkiye sahiptir (Khalil ve ark. 2003). Birçok araştırmacı endüstriyel öneme sahip proteaz enzimini yüksek verim ile üretebilen yeni suşlar elde edebilmek amacı ile çeşitli mutajenleri mutasyon etkeni olarak kullanmışlardır.

Bu çalışmada Uludağ Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Laboratuvarında daha önceden proteaz enzimi üretimi için topraktan izole edilmiş ve adlandırılmış olan *Bacillus subtilis* E6-5 suşundan mutasyon ile elde edilen EB-4 suşu eldesine gidilmiştir. En verimli bir adet mutant suş seçilerek bu suşun

proteaz enzim üretimi üzerine farklı karbon, azot ve metal iyonları gibi besinsel faktörler, sıcaklık, pH, rpm, inokulasyon yaşı ve inokulasyon miktarı gibi fiziksel faktörlerin etkisi araştırılarak üreme ortamı optimize edilmiştir.



## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. Enzimler

Enzimler, insanlar tarafından, tarih öncesi devirlerden beri şarap, boza, yoğurt, ekmek ve peynir üretimi gibi işlemlerde, enzimleri ve enzimlerin katalitik etkilerinin nasıl olduğunu bilmeden de olsa kullanmışlardır. İlk bulguları eski Mısır tarihine kadar dayanmaktadır. Enzim terimi ilk kez W. Kühne tarafından “maya içinde (in yeast) “anlamında kullanılmıştır. İlk kez 1833 yılında Payen ve Persoz alkol üretimi yapabilmek amacıyla malt ekstresinden nişastayı sindiren enzimi” Presipitasyon” (çökelme) yolu ile ayırt etmiş ve buna “Diyastaz” adını vermişlerdir. 1836’ da Schwan mide suyu içeriğinden Pepsin enzimini elde etmiştir. Doğu ülkelerinde birçok gıda fermentasyonu süreçleri için ipliksi mantarlar enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Batıda 1896’da modern mikrobiyal enzim teknolojisi ‘Takadiastase’ın ticareti ile başlamıştır. Bu Doğu toplumlarından Batı toplumuna önemli bir teknolojik transferi olmuştur (Smith 1996). Kristal halde bulunan ilk enzim olan” Üreaz” 1926 yılında Summer tarafından izole edilebilmiştir. 1930’larda 80 adet enzim tanınırken, 1968’lerde bu rakam 1.300’e 1982’de 2.000’e yükselmiştir. Bu tarihlere kadar 2000 kadar enzimin identifikasyonu yapılmış ve bunlardan 250 kadarı da kristal halde elde edilebilmiştir (Ası 1999). Günümüzde ise 25.000 enzimin varlığı bilinmektedir ve yine enzimlerle ilgili çalışmalar artan bir hızda devam etmektedir (Kıran ve ark. 2006).

Enzimler, tepkimeye girerek aktivasyon enerjisini düşüren ve etkilenmeden çıkan biyolojik katalizörlerdir. Enzimler canlı hücreler tarafından oluşturulan, etkinliğini gösterebilmesi için canlı bir hücrenin varlığını gerektirmeyen, ısıya dayanıksız yapılardır (Ası 1999).

Metabolik reaksiyonların pek çoğunu hızlandıran protein yapısında biyolojik katalizörler olarak da tanımlanan enzimler; besinsel moleküllerin yıkıldığı, kimyasal enerjinin depolandığı ve şeklinin değiştirildiği, basit prekürsörlerden biyolojik makromoleküllerin oluşturulduğu metabolik yollarda, yüzlerce reaksiyon basamağını

katalizleyen maddelerdir. Hücrelerde önemli reaksiyonların gerçekleşebilmesi ve çeşitli metabolizma reaksiyonları enzimlerin katalitik etkisiyle mümkündür (Ası 1999).

Enzimlerin kimyasal katalizörlerden en önemli farkı özgül (spesifik) olmalarıdır. Enzimler tarafından katalizlenen, tepkimeye giren kimyasal moleküllere "substrat" adı verilir. Enzimler spesifik aktiviteye sahip protein yapısındaki moleküller oldukları için, enzimlerin bu özgüllükleri substratlarıyla geçici olarak enzim-substrat komplekslerini kurmalarına olanak sağlar. Bu geçici kompleks yapıları sayesinde ürünler oluşturur ve daha sonra enzim substratından ayrılarak tekrar eski halini alır. Substratın enzimin üzerinde bağlanabildiği aktif bölgeye ise "katalitik bölge" denir. Substratın enzime bağlanması anahtar-kilit uyumu gibi bir uyum gösterir. Enzimler substratlarına karşı çok iyi bir özgüllük gösterdikleri için kendine özgü ve uyumlu tek bir substratla bağlanarak tek bir ürün oluştururlar (Chaplin ve Bucke 1990). Enzimler protein yapısında ve koloidal karakterde oldukları için, fiziksel (ısı, pH, UV-ışınları, osmotik basınç, vs.) ve kimyasal (asit, alkali, metabolitler, mineraller, vs.) faktörlerden etkilenmektedirler.

Katalitik RNA hariç bütün enzimler protein yapısında olan katalizörlerdir. Enzimler, proteinlere ait olan tüm yapısal özellikleri göstermektedirler. 12.000 kDa'dan 1.000.000 kDa'a kadar moleküler ağırlıklara sahiptirler. Enzimlerin katalitik aktiviteleri, doğal protein konformasyonlarının bütünlüğüne bağlıdır; bir enzim denatüre edilmesiyle katalitik aktivitesi yok edilmektedir. Enzim proteinlerinin primer, sekonder, tersiyer ve kuarterner yapıları, katalitik aktiviteleri için esastır (Anonim 2017). Bazı enzimler aktivite gösterebilmeleri için, protein yapıyı oluşturan aminoasit yapılarından başka kimyasal bileşenlere ihtiyaç duymamaktadırlar. Bazı enzimler ise "Kofaktör" (metal grubu bağlamış) veya "Koenzim" (vitamin gibi organik yapıda bir grubu bağlamış) şeklinde adlandırılan kimyasal temel bileşenlere gereksinim duyarlar. Kofaktörü ile birlikte tam, katalitik olarak aktif olan bir enzim, "holoenzim" şeklinde isimlendirilmektedir. Holoenzimin protein yapıda olan kısmı "Apoenzim" veya "Apoprotein" olarak adlandırılmaktadır. Koenzimlerin enzim protein kısmına kovalent olarak bağlı olan ve enzim proteininden ayrılmayan grup "prostetik grup" olarak adlandırılmaktadır. Koenzimlerin enzim protein kısmına nonkovalent olarak bağlı olan

ve enzim proteininden ayrılabilenleri ise kosubstrat şeklinde isimlendirilmektedir (Anonim 2017).

Genel olarak bir literatür çalışması yapıldığında, enzimlerin ele alınış şekilleri çeşitli olarak sınıflandırıldığı görülmektedir (Uhlig 1998). Böyle bir çeşitlilik ve yeni keşfedilen enzimlerin sayısının sürekli olarak artması sebebi ile Uluslararası Enzim Birliği tarafından enzimlerin isimlendirilmesi ve sınıflandırılması için yeni bir sistem öne sürülmüştür (Anonim 2017)

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği Adlandırma Komitesine göre (The Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, IUBMB) belirlenen enzim sınıflandırılma standartına göre enzimler katalizledikleri reaksiyonların tiplerine göre 6 ayrı sınıfa ayrılmışlardır ve bu enzimler arasında proteazlar 3. sırada yer alan hidrolazlar olarak adlandırılan sınıfa dahil edilmiştir.

Enzim Adlandırma Komisyonu'nun raporuna göre enzimler katalizledikleri reaksiyonlara göre 6 ana sınıfa ayrılmaktadırlar. Bunlar;

1. Oksidoredüktazlar: Bu sınıfta bulunan enzimler Oksidasyon-redüksiyon (yükseltgenme-indirgenme) reaksiyonlarını katalize etmektedirler.
2. Transferazlar: Bir fonksiyonel grubun (örneğin fosfat ya da metil grubu) transferini sağlayan enzim grubudur.
3. Hidrolazlar: Hidrolitik reaksiyonların katalizini sağlayan enzim grubudur.
4. Liyazlar: Bu sınıfta bulunan enzimler C-C, C-O ve C-N arasındaki mevcut bağları okside ya da hidroliz reaksiyon süreçlerinden farklı şekilde kırarlar. Kırılan atomlar arasında çift bağ oluşturmaktadırlar.
5. İzomerazlar: Molekül içerisinde hendesi ve konstrüktif farklılıkları katalizleyen sınıf olarak bulunurlar.
6. Ligazlar (Sentetazlar): C-O, C-S, C-N ve C-C atomları arasında bağ oluşmasını katalize eden enzim sınıfıdır. Bu sınıfta yer alan enzimler çoğunlukla ATP'deki veya diğer trifosfatlardaki pirofosfatı hidroliz ederek iki molekülün bağ yapmasını sağlarlar.



Enzimler Sistematik Adlandırılmada Enzim Komisyonu (Enzyme Commission: EC) tarafından verilmiş olan dört rakamdan oluşan kod numarası (EC 1.2.3.4) ile isimlendirilmektedir. Bunlar;

1. İlk rakam, enzimin bulunan altı sınıftan hangisinde bulunduğunu göstermektedir.
2. İkinci rakam, enzimin alt sınıfını (Subclass) belirtmektedir.
3. Üçüncü rakam, ikinci alt grubunu (Sub-Subclass) belirtmektedir.
4. Dördüncü rakam ise enzimin sub-subclass içindeki seri numarasını göstermektedir (Anonim 2017).

Örneğin *Bacillus* sp.'den elde edilen proteaz enziminin kod numarası EC 3.4.21.14 ile ifade edilmektedir (Anonim 2017).

## 2.2. Proteazların Tarihçesi

Proteinlerin enzimatik hidroliz reaksiyonlarından çok eski dönemlerden beri çeşitli amaçlarla bilinçli olmadan fayda sağlanılmıştır. 1700'lü yılların sonlarına doğru buzağuların mide mukoza dokularında bulunan bir maddenin etleri yumuşattığı görülmüş olup, peynirleri olgunlaştırdığı fark edilince bu mukoza dokusu genel olarak bu işlemler için kullanılmıştır (D'Reaumur 1752). Fakat proteazlarla ilgili ayrıntılı araştırmalar, 1783 yılında, Spallanzani ile başlamıştır. Spallanzani, mide sıvısında bulunan bu maddenin proteinleri parçalama görevi üstlendiğini bulmuştur (Hoffmann-Ostenhof 1954, Aunstrup 1973). 1800'lü yıllarda ise, çeşitli kaynaklardan proteolitik enzimler elde edilmiş olup ve mideden salgılanmakta olana 'pepsin enzimi', pankreas tarafından salgılanmakta olana 'tripsin enzimi', bağırsak mukoza dokusundan elde edilene ise 'erepsin enzimi' adı konulmuştur (Keay ve ark. 1972). 1930'lu yılların ortalarında ise J. Northrop pepsin, kimotripsin ve tripsin enzimlerini kristalize edebilmiş ve enzimlerin proteinlerden oluşmakta olduğunu ifade etmiştir. 1938 yılında ise Northrop ve Stanley, 'Kristalize Enzimler' adlı makalelerinde pepsinojen, ribonukleaz, pepsin inhibitörleri, heksokinaz karboksipeptidaz, birkaç farklı enzimi saflaştırıp, kristalize ettiklerini açıklamışlardır ve bu yaptıkları çalışmaları ile 1946 Nobel Kimya Ödülü'nü almaya hak kazanmışlardır (Anonim 1946).

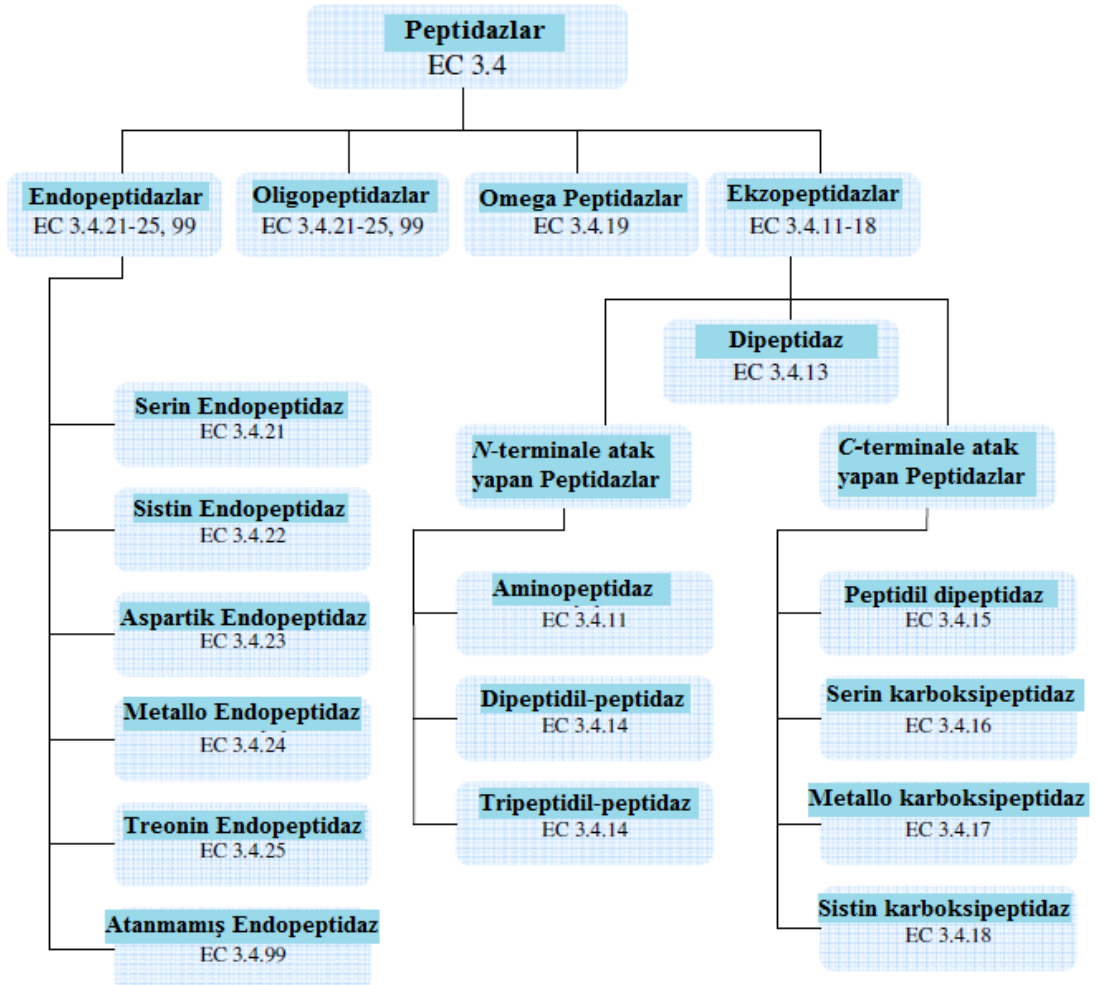
Singh ve ark. (1999), Himalaya Dağı topraklarından izole ettikleri alkalofilik *Bacillus sphaericus* suşundan proteaz elde etmişlerdir. Ürettikleri enzimin 50–55 °C’de ve pH 10.5’ de en iyi aktiviteyi gösterdiğini bildirmelerinden sonra, üretilen bu enzim 500 mg/L klor içeren ortamda aktivitesini korumuş ve deterjanlarda kullanılabilir bir katkı maddesi olduğunu ifade etmişlerdir. Proteazların endüstriyel olarak kullanımına başlandıktan sonra özellikle alkali proteazların önümüzdeki yıllarda büyük bir gelişme göstermeleri beklenmektedir (Rai 2010).

### 2.3. Proteazların Sınıflandırılması

Proteazlar (peptidazlar/ proteolitik enzimler) proteinlerdeki peptid bağlarının hidrolize edilmesini katalizleyen enzim grubudur (Polgar 1989). Proteazların karakterizasyonu yapılarında bulunan biyokimyasal çeşitlilikten dolayı çok zor olmaktadır. Proteazlar ilk olarak, moleküler büyüklükleri, yükleri ve substrat spesifikliğine göre sınıflandırılmış olup, daha sonra katalitik aktif bölgelerine, aksiyon mekanizmalarına ve 3 boyutlu yapılarına göre sınıflandırılmıştır (Beynon ve ark. 1989, Barrett 1994, Rao ve ark. 1998).

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği Adlandırma Komitesi (The Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, IUBMB) tarafından yapılan enzim sınıflandırılma standartına göre enzimler katalizledikleri reaksiyonun tipine göre 6 ayrı sınıfa ayrılmışlardır ve proteazlar 3. sırada yer alan hidrolazlar sınıfına dahil edilmiştir (Uhlir 1998).

Proteazların sınıflandırılması yapılırken benzer gruptaki hidroliz için göreceli seçicilik esasına dayanarak daha geniş kapsamlı sınıflandırılma çalışmasına gidilmiştir. Bunlar; iki büyük sınıf olan “Endopeptidazlar” (büyük proteinlerin uç bölgelerinden uzağa atak yapanlar) ve “Ekzopeptidazlar” (polipeptidin uç bölgesine atak yapanlar), iki küçük sınıf olan “Oligopeptidazlar” (küçük proteinlerin uç bölgelerinden uzağa atak yapanlar) ve “Omega-peptidazlar” (proteinlerin uç bölgelerine hareket edenler) olarak ayrılabilirler. Proteazların terminolojisinin genel detayları Şekil 2.1’ de verilmiştir (Ather 2009).



Şekil 2. 1. Proteazların sınıflandırılması (Ather 2009)

### 2.3.1. Endopeptidazlar

Endopeptidazlar; polipeptid zincirinin uç bölgelerinde bulunan C ve N atomlarına gösterdikleri seçilimli reaksiyonlar veya polipeptit zincirinin iç tarafında bulunan bağlar üzerindeki etkileri ile karakterize edilmektedirler. Polipeptid zincirinde yer alan serbest karboksi veya serbest amino gruplarının enzimin aktivesi üzerine negatif etkisi bulunmaktadır. Bu serbest uçların çıkarılması durumunda endopeptidazlar sınırlı ve özgül role sahiptirler (Barrett ve Rawlings 1991).

Endopeptidazlar; Aktif bölgelerinde bulunan fonksiyonel grup ve bunların katalitik mekanizmasına dayanarak gruplara ayrılmaktadırlar. Serin proteazlar (EC 3.4.21), aspartik proteazlar (EC 3.4.23), sistein proteazlar (EC 3.4.22) ve metallo proteazlar

(3.4.24) olmak üzere dört farklı gruba ayrılmaktadırlar (Alpan 2008). Bunların yanı sıra katalitik mekanizması tam olarak bilinmeyen endopeptidaz olarak belirlenmiş ve EC 3.4.99 numarası ile kodlanmıştır (Sevinç 2010). Endopeptidazların etki mekanizması genel olarak Şekil 2.2’de şematize edilmiştir. Canlı organizmalarda dört sınıf endopeptidaz saptanmış olup ve endopeptidazın dört sınıfından üç tanesi bakterilerden izole edilmiş ve saflaştırılmıştır. Bunlar; Serin proteazları, sistein proteazları ve metalloproteazlardır (Liao ve McCallus 1998).



Şekil 2. 2. Endopeptidazların polipeptid üzerindeki etki mekanizması (Sevinç 2010)

### 2.3.1.1. Serine Proteazlar (E.C. 3.4.21)

Serin proteazlar, ticari bir öneme sahip olan, proteaz grupları içerisinde en geniş çaplı araştırılması yapılan ve en iyi olarak bilinen proteaz sınıfı olarak bulunmaktadır. Bakterilerden, mayalardan, küflerden, mantarlardan elde edilebilen serin proteazlar karboksil uç bölgelerindeki ayrılmalarda, tirozin, fenilalanin veya lizinin bulunduğu bölgelerden hidroliz işlemini gerçekleştirmektedirler (Govind ve ark. 1981). Aktif bölgelerinde serin (Ser), histidin (His) ve aspartik (Asp) aminoasitleri içermektedirler (Garcia-Carreno 1993). Yapısında bulunan serin (Ser) aminoasiti katalitik metabolizma sırasında substratlarla ve aktivatörlerle veya inhibitörlerle bağ kurma eğilimindedir. Serin proteazlar, üç boyutlu yapılarına, aminoasit dizilerine ve aktif bölge konfigürasyonlarındaki benzerliklere ve farklılıklara göre yirmi aileye ve altı klanına

ayrılmıştır (Barett 1994, Zeigler 2001). Subtilisin ve kimotripsin familyası (kimotripsin, memeli elastazları ve birkaç bakteriyel proteaz) serin proteazlar içerisinde en iyi bilinen alt gruplardır. Subtilisin ailesi mekanizmalarında SH grubunu, termitaz ve proteinaz K'yı içermektedir (Zeigler 2001). Subtilisin ailesinde bulunan proteazlar hidrofobik ya da aromatik aminoasitler dışında kalan tüm aminoasit peptid bağlarını hidrolizlerler. Subtilisin ailesinin katalitik üçlü dizilişi Asp-32, His-64 ve Ser-221 şeklindedir (Bond 1989). Bugüne kadar karakterize edilmiş olan tüm mantar subtilisinleri, *Tritirachium album*'den üretilen proteinaz K ile homologturlar. Subtilisin benzeri proteazlar için çeşitli fizyolojik görevler ileri sürülmüştür (Seger ve ark. 1999).

Kimotripsin familyası, triptofan, fenilalanin, tirozin gibi hidrofobik aminoasitlerden daha sonra yer alan peptid bağlarını hidrolizleme görevinde bulunurlar. Tripsin, lisin ve arjinin gibi pozitif yüklü olarak bulunan aminoasitleri takip eden peptid bağlarını hidrolize etmektedirler (Bond 1989). Ayrıca, Serin proteazların moleküler ağırlıkları genellikle 18 kDa ve 35 kDa arasında olmaktadır. Ancak *Blakeslea trispora* adlı mikroorganizmadan izole edilen serin proteazın 126 kDa moleküler ağırlığına sahip olduğu da bildirilmiştir (Govind ve ark. 1981).

Serin proteazlar çoğunlukla pH 7.0 ile 11.0 arasında aktivite göstermektedirler. İzoelektrik noktaları pH 4.0 ile 6.0 arasında farklılık gösterebilmektedir. Alkali pH değerlerinde etkinlik gösteren serin alkalen proteazlar ve subtilisinler iki önemli serin proteaz grubu olarak bulunur (Deshpande ve ark. 1998).

### **2.3.1.2. Aspartik Proteazlar (E.C. 3.4.23)**

Aspartik proteazlar, düşük pH derecelerinde de aktivite gösterebildikleri için genel bilinen isimleri olan asidik proteazlar, katalitik aktivite gösterebilmeleri için aspartik asit köküne ihtiyaç duyan endopeptidaz grubudur. Aspartik proteazlar, pepsin, retropepsin ve pararetrovirüslerdeki enzimler olmak üzere üç aileye ayrılmaktadırlar. İlk isimlendirilmesi yapılan ve en iyi bilineni aspartik proteaz pepsindir (Fersht 1998). Aspartik proteazlar çeşitli sayıda substrat özgülüğü gösterebilselerde özellikle iki hidrofobik aminoasit kalıntısı içeren peptid bağlarının hidrolize edilmesinde ve en

yüksek aktiviteyi göstermektedirler. Aspartik proteazların molekül ağırlıkları genellikle yaklaşık 35 kDa'dur ve 323 ila 340 aminoasit dizisinden oluşmaktadırlar. Birçok aspartik proteaz düşük pH aralıklarında maksimum aktivite gösterebilir ve izoelektrik noktaları ise pH 3.0-4.5 aralığında değişim göstermektedir. Ayrıca aspartik proteazlar pepstatin, diazoasetil norlösin metil ester (DAN) ve 1,2-epoxy-p-nitrofenoksi propan (EPNP) tarafından inhibe edilirler (Rao ve ark. 1998, Zeigler 2001).

### **2.3.1.3. Sistein/Tiyol Proteazlar (E.C. 3.4.22)**

Sistein proteazlar hem prokaryot canlılar hem de ökaryot canlılar tarafından üretilebilmektedir. Sistein proteazların aktif bölgelerinde sistein (SH-) ve histidin grupları bulunmaktadır (Garcia-Carreno ve ark. 1993). Tiyol proteazlar sadece HCN (hidrosiyamik asit) varlığında ve ortamda sistein bulunması durumunda aktif olarak görev görürler. Sistein proteazlar, sistein ve histidin kalıntıları arasındaki düzen farklılıklarına bağlı olarak yirmi aileye ayrılırlar (Barett 1994). Diğer bir taraftan, papain benzeri, tripsin benzeri, glutamik asit benzeri ve diğerleri şeklinde de aktif merkezlerinin özgülüğüne göre dört gruba ayrılabilirler. Sistein proteazlar genellikle nötral koşullarda oluşturulmaktadırlar. Moleküler ağırlıkları 32 kDa'dan 52 kDa'ya kadar değişmekte olup, izoelektrik noktaları pH 4.9 ile 8.4 arasında değişim göstermektedir. (Rao ve ark. 1998). Papain benzeri endoproteazlar en geniş çaplı bilinen gruptur (Gençkal 2004). Sistein proteazlar ayrıca 'kaspazlar' olarak da bilinmekte olup ve apoptozis olayında görev almaktadırlar. Birbirlerini aktifleştirerek bir şelale şeklinde reaksiyon dizisine neden olmaktadır (Ulukaya 2003). Sistein proteazlar, peptid bağlarına üzerinde bir nükleofil ve bir proton verici baz taşıyan bir sistein kalıntısının -SH grubu tarafından atak yapmaktadır. Proton verici olarak peptid bağlarına, serin proteaz enzimi üzerinde bir nükleofil ve bir proton verici / genel baz taşıyan bir Sistein kalıntısının -SH grubu tarafından saldırı yapmaktadır. Diğer bir taraftan, katalitik mekanizmada nükleofilik atak olarak adlandırılmaktadırlar. Proton verici, imidazolium halkasını içeren bir histidin kalıntısı bulunmaktadır (Supuran ve ark. 2002).

#### **2.3.1.4.Metalloproteazlar (E.C. 3.4.24)**

Metalloproteazlar, iki değerlikli bir metal iyonu (katalitik çinko, manganez, kobalt, nikel veya bakır) ile aktifleştirilmiş olan metalik bir merkezde köprülenmiş olarak bir su molekülünün nükleofilik saldırısı ile peptid bağlarını parçalayan enzimlerdir. Enzimin aktif merkezinde metal iyonu korunmuş olan glutamik asit (Glu), aspartik asit (Asp), histidin (His) veya lizin (Lys) olabilen üç tane korunmuş aminoasit kalıntısı ile birlikte kompleks oluşturmaktadır (Hase ve Finkelstein 1993, Supuran ve ark. 2002, Mansfeld 2007). Katalitik ve yapısal olarak metal bağlama bölgelerinin özellikleri, X-ışını kristalografik analizleri ile tanımlanmaktadır. En çok çalışılan metalloproteaz olarak bilinen çinko içeren metalloproteazlar kristalize yapılarında bir katalitik çinko atomuna (üç aminoasit kalıntısıyla düzenlenmiş olan) ve bir aktif su molekülüne sahiptir. Metalloproteazlar 30 aileye ayrılmaktadır ve bunlardan 17'si endopeptidazlara, 12 ailesi ekzopeptidazlara ve sadece 1 ailesi endopeptidaz ve ekzopeptidazlara dahildir. Ayrıca metalloproteazlar aminoasit dizilimleri ve aminoasitlerle metal bağlanma bölgelerinin ilişkisine göre 14 farklı klana ayrılmış halde bulunmaktadır (Mansfeld 2007). Metalloproteazlar genellikle nötralize olan ortamlarda üretilmektedirler ve optimum aktivite aralıkları pH 5.0 ile pH 9.0 arasında değişmektedir (Zeigler 2001, Rao ve ark. 1998). *Pseudomonas aeruginosa* ve *Serratia* spp.'nin ürettiği metalloproteazlar pH 7.0-9.0 aralığında optimum aktivite aralığına sahip olmakla birlikte ve moleküler ağırlıkları 45 ile 60 kDa arasında değişim göstermektedir. Metalloproteazların hepsi EDTA gibi şelat ajanı tarafından inhibe edilebilmekte ancak DFP veya sülfidril ajanlar tarafından inhibe edilememektedirler.

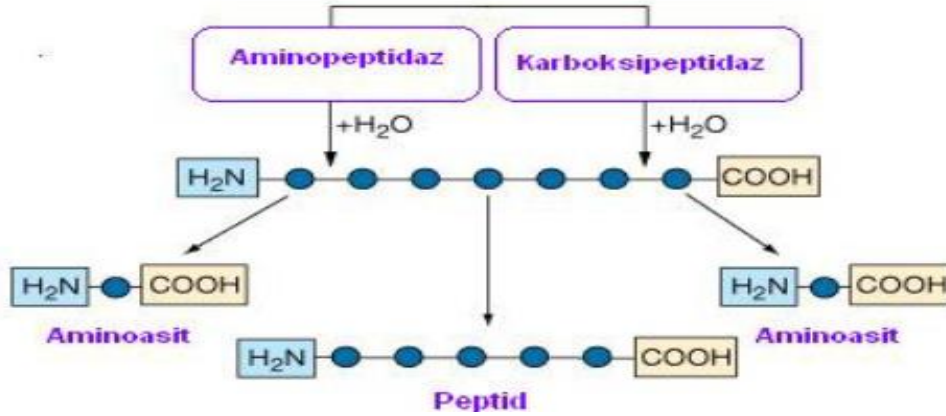
#### **2.3.2.Oligopeptidazlar**

Oligopeptidazlar, protein yapılarından küçük olan substratların peptid bağlarını parçalamaya eğilim gösteren ancak proteinleri parçalayamayan bir enzim grubudur. Örneğin; Thimet Oligopeptidaz (Barrett, Brown ve ark. 1995, Knight, Dando ve ark. 1995). Bu durum enzimin aktif bölgesinin sadece peptidler tarafından ulaşılabilir kadar küçük bir boşluğa sahip olmasından dolayıdır. Yaklaşık olarak 30 aminoasit uzunluğunda bulunan bu oligopeptidler patojen canlıların tespitinde ve nörolojik

durumlarda görev almaktadır. Bu nedenle, bu moleküllerin sürekli olarak üretilmesi ve inaktif hale getirilmesi gerekmektedir; bunun gerçekleştirilmesi ise ekzopeptidazların görevidir (Anonim 2017b).

### 2.3.3. Ekzopeptidazlar

Ekzopeptidazlar uzun polipeptid zincirlerinde bulunan uç bölgelere etki ederek aktivite gösterirler. Etki ettikleri uç N terminalindeyse ‘‘Amino peptidaz’’, C terminalindeyse ‘‘Karboksi peptidaz’’ ismini almaktadırlar. Ekzopeptidazların genel çalışma mekanizması Şekil 2.3’de şematize edilmiştir.



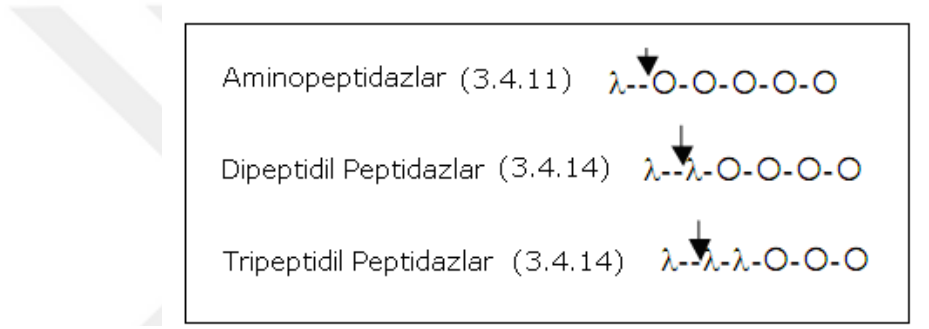
Şekil 2. 3. Ekzopeptidazların polipeptid üzerindeki etki mekanizması (Sevinç 2010)

Ekzopeptidazlar, sadece peptid zinciri sonunda bulunan kısımlara etkinlik göstermektedirler (Barrett, Brown ve ark. 1995, Knight, Dando ve ark. 1995). Serbest N-terminal amino grubu ile C-terminal karboksi grubu ya da her ikisinde ihtiyaç duyan ve uç bölgeden üç peptid bağından fazlası olmaması suretiyle bağları hidroliz etmektedirler (Hasegawa 1960, Nardi 1960, Rao ve ark. 1998). Uluslararası Enzim Komisyonuna göre 74 tane ekzopeptidazı listelerine almışlardır. Karboksi peptidazlar CP, amino peptidazlar AP ile sembolize edilmektedir (Sarı 2011).



### 2.3.3.1. Aminopeptidazlar (E.C 3.4.11)

E.C 3.4.11 grubunda bulunan aminopeptidazlar, polipeptidlerin serbest N-terminal ucuna atak yapmaktadırlar ve bu atak sonucu yalnızca bir aminoasit kalıntısı, iki aminoasit kalıntısı ya da üç aminoasit kalıntısı bırakmaktadırlar. Aminopeptidazların ifade edilmiş proteinlerde N- terminal Metiyonini (Met) uzaklaştırdığı bilinmektedir. E.C. 3.4.14 grubunda bulunan Dipeptidil-peptidaz N-terminal dipeptidini hidroliz ederek uzaklaştırmaktadır. E.C 3.4.14 grubunda bulunan Tripeptidil peptidaz ise, polipeptidin N-terminal ucundaki tripeptidi hidroliz ederek uzaklaştırmaktadır (Şekil 2.4).



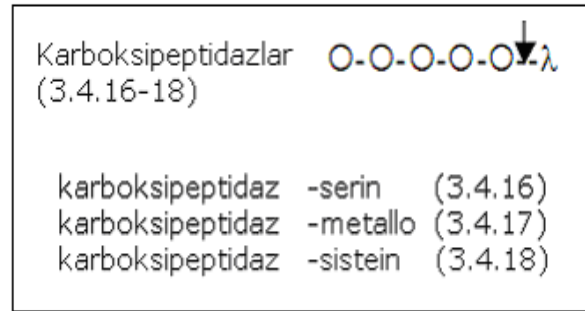
Şekil 2. 4. Aminopeptidazların alt grupları ve etki mekanizmaları (Tanksale 2001)

Aminopeptidazlar genellikle hücrenin içersinde metabolik faaliyetlerde kullanılmak üzere sentezlenen enzimlerdir, ancak *Aspergillus oryzae* ile yapılan çalışmalarda organizmanın ekstraselüler aminopeptidaz ürettiği ortaya çıkarılmıştır (Labbe ve ark 1977).

Aminopeptidazlar, metallo aminopeptidaz, serin aminopeptidaz ve sistein aminopeptidaz olmak üzere üç gruba ayrılmaktadırlar. Bu sınıflandırma da aktif bölgelerinin özgül proteaz inhibitörlerine göre yapılmaktadır. (Rao ve ark. 1998, Tekin 2008, Sarı 2011). *Escherichia coli*'den elde edilmiş olan aminopeptidazlar yaklaşık 40 kDa moleküler ağırlığına sahiptir. Bu peptidazın  $Mg^{+2}$  veya  $Mn^{+2}$  iyonlarına ihtiyaç duyduğu, pH 7.5 ile 10.5 aralığında aktivite göstermiş olduğu belirlenmiştir. *Bacillus licheniformis*'in 34 kDa moleküler ağırlığına sahip aminopeptidazının mol başına 1g/atom  $Zn^{+2}$  içerdiği ve aktivitesinin  $Co^{+2}$  varlığında artabildiği tespit edilmiştir.

### 2.3.3.2. Karboksipeptidazlar

Karboksipeptidazlar, polipeptid zincirindeki karboksi (C-) ucuna etki etmekte ya da dipeptitin hidrolize etmesini katalizlemektedirler. Hidroliz sonucu bir aminoasit veya dipeptid polipeptitten ayrılmaktadır (Şekil 2.5). Karboksipeptidazların aktivitede bulunabilmesi için hidroliz edecekleri C-terminalde  $\alpha$ -karboksi grubuna ihtiyaçları bulunmaktadır (Rao ve ark. 1998, Sarı 2011). Karboksipeptidazlar aktif bölgelerinde buldukları aminoasit kalıntılarına göre üç ana gruba ayrılmaktadırlar. Bunlar; şekil 2.7'de gösterilmiş olduğu gibi Metallo-karboksipeptidazlar (E.C 3.4.17), Serin-karboksipeptidazlar (E.C 3.4.16) ve Sistein-karboksipeptidazlar (E.C 3.4.18)'dir (Rawlings ve Barrett 1997). Metallo karboksipeptidazlar aktif bölgelerinde  $Zn^{+2}$  atomu içermektedirler. Kofaktör olarak bir çinko atomu bulunmaktadırlar. Serin karboksipeptidazlar ise aktif bölgelerinde Asp, His ve Ser aminoasitlerinden oluşan katalitik olarak aktif olan bir üçlü grup içermektedir (Tanksale 2001).

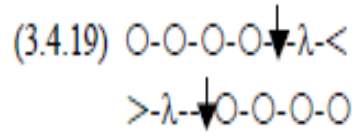


Şekil 2. 5. Karboksipeptidazların alt grupları ve etki mekanizmaları (Tanksale 2001)

### 2.3.4.Omegapeptidaz

Omegapeptidazlar, ekzopeptidazların işlevlerinin aksine serbest olarak bulunan N- veya -C terminal uçlarına ihtiyaç duymamaktadırlar, ancak terminal uca yaklaşıldıkça hareket alanları artış göstermektedir (Şekil 2.6).

## Omega peptidaz



**Şekil 2. 6.** Omega peptidazların etki mekanizması (Tanksale 2001)

Farklı özelliklerde bulunan omegapeptidazlar bulunmaktadır. Bu omegapeptidazlara örnek olarak ubiquitinil hidrolazlar, gama-glutamil hidrolazlar ve piroglutamil peptidazlar verilebilir.

### 2.4. Proteaz Kaynakları

Proteazlar bitkisel ve hayvansal kaynaklardan ve mikroorganizmalardan fermantasyon yoluyla elde edilerek ticari anlamda kullanılabilirler (Gençkal 2004). Bitkiler yapılarında %44 oranında proteaz bulundurmalarıyla en iyi proteaz kaynaklarından biri olarak görülmektedir. %18 oranında proteaz içermeleriyle bakteriler ikinci sırada yer alırken, %15 oranıyla mantarlar üçüncü sırada yer almaktadır (Mahajan ve Badgular 2010).

#### 2.4.1. Bitkisel kaynaklı proteazlar

Bitkilerin proteaz kaynağı olarak kullanımlarını bitkinin gelişim gösterebildiği iklim koşulları ve toprak yapısının uygunluğu belirlemektedir. Bitkilerden elde edilebilen proteaz enzimleri aktif bölgelerinde bulunan sülfidril grupları ile karakterize edilmektedir (Uhlir 1998). Bitkisel kaynaklı proteazlar özellikle tropikal bitkilerden elde edilmektedir. Bitkisel kaynaklı proteazlardan en yaygın olarak bilinen türleri papain, bromolein, fisin ve keratinazdır (Rao ve ark. 1998). Papain, Batı ve Orta Afrika ile Hindistan'ın tropikal bölgelerinde gelişim gösteren *Carica papaya* meyvesinin öz suyundan izole edilmiştir. Katalitik yapısı sistein<sup>25</sup>, histidin<sup>159</sup>, asparajin<sup>158</sup>'ten oluşurken, molekül ağırlığı 23 kDa'dur. pH 5.0 ile 9.0 arasında aktivite gösterirken, 80 ile 90°C aralığındaki sıcaklıklarda kararlılığını koruyabilen bir proteaz olarak

bilinmektedir. Endüstriyel olarak en çok et endüstrisinde etin yumuşatılması işlemlerinde kullanılmasının yanı sıra, hayvan derisinin işlenmesi, ilaç üretimi, içeceklerin berraklaştırılması ve tad uygunluğunun yapılması gibi yaygın kullanım alanına sahiptir (Anonim 2017).

1892 yılında, ananas öz suyu içeriğinde proteolitik enzim varlığının araştırılması ile 'bromelain' bulunmuştur. Bromelain ilk kez terapötik bir ajan olarak 1957'de tanıtılmış olup, o zaman diliminden beri pek çok bilimsel araştırmalarda yerini almış ve birçok hastalığa önemli faydaları olduğu kanıtlanmıştır (Anonim 2017). Bromelainin vücutta bulunan proteinleri ayrıştırıcı ve sindirici bir enzim olduğu fark edilmiştir. Dolayısıyla bu enzimin sindirimi veya hazmı kolaylaştıran bir molekül olduğu da kanıtlanmıştır. Bu nedenle gıda sanayinde ve bazı kültürlerde et yumuşatıcı madde olarak kullanılmaktadır. Bunların yanı sıra bromalein, mide asidinin yapmış olduğu göreve yardımcı olmakla kalmayıp, bağırsaklardaki alkalen ortamı korumada olumlu etkileri bulunmaktadır. Enzim, bir sistein proteaz olarak karakterize edilmektedir ve pH 5.0 ile 9.0 arasında aktivite göstermektedir. İnaktivasyon sıcaklığı 70°C olup, papainin inaktivasyon sıcaklığından daha düşük olduğu görülmektedir (Rao ve ark. 1998).

Fisin, yüksüz ve aromatik aminoasitler içeren bağlara etki gösteren, optimum pH derecesi 6.5 olması ile birlikte pH 4.0 ile 9.5 arasında aktivite gösteren bir enzimdir. Endüstride ise bira imalatı, et, yem ve deniz ürünlerinde kullanılmaktadır. Fisin enzimi, incir (*Ficus glabrata*) bitkisinden izole edilebilen çok yüksek düzeyde proteaz aktivitesi ile papain ve bromalaine benzer bir sülfhidril proteazıdır. Enzimin, antik çağda peynir mayası olarak kullanılması ve sütün kestirilmesi işlemlerinde kullanıldığı da bilinmektedir. 10-15 g arasında bulunan bitkiden 100-150 mg fisin elde edilebilmektedir (Uhling 1998).

Saçı ya da kılları ağartma işleminde etkili olan keratinaz enzimi ise bazı bitkiler tarafından üretilmektedir. Saç ve yünün ayrıştırılması lizin gibi esansiyel aminoasitlerin üretilmesi konusunda da önem taşımaktadır. Bu nedenle bu enzimin kozmetik sanayiinde kullanımı yaygın olmaktadır. Atık su sistemlerinde bulunan bu tür doğal

olarak açığa çıkan atıkların parçalanması açısından da önem arz eden bir enzimdir (Rao ve ark. 1998).

#### **2.4.2. Hayvansal Kaynaklı Proteazlar**

Hayvanlardan elde edilen proteazların en bilinen grupları; Tripsin, pepsin, rennin ve kimotripsindir. Hayvansal kaynaklı proteazların elde edilebilmesi, çok miktarda hayvanın kesim işlemini gerektirdiği için bir takım siyasal ve tarımsal kurallar tarafından kontrol altında yapılmaktadır (Mahajan ve Badgular 2010). Tripsin enzimi sindirim olayında görev alan başlıca proteazlar arasındadır. Gıda maddesi olarak kullanılan proteinlerin hidrolizi ise bu enzim tarafından sağlanmaktadır. Tripsin, serin proteaz ailesinde bulunmaktadır ve arjinin, lisin türevlerinin dahil olduğu karboksil gruplarındaki peptid bağlarını hidrolize etmektedirler. Proteaz inhibitörlerinin böcek bağırsağında bulunan enzimi inhibe etme özelliklerinden dolayı, bu enzim zararlı haşerelerin biyolojik kontrolü için ilgi odağı olmuştur. Enzimin meydana getirmiş olduğu protein hidrolizatlarının çok acı bir tad yapısına sahip olması sebebiyle gıda endüstrisinde fazla bir kullanım alanı bulamamaktadır, ancak bunun yanı sıra bakteriyel ortamların oluşturulmasında ve kristalize veya saf konfigürasyonlarının yara tedavisi süreçlerinde kullanımı mümkün olmaktadır (Mahajan ve Badgular 2010).

Saf formu bir hayli yüksek pahalı olan kimotripsin ise hayvanların pankreas ekstratlarından elde edilmekte olan bir enzimdir. Pahalı olmasından dolayı sadece analitik uygulamalarda ve teşhis süreçlerinde kullanılmaktadır. Kimotripsin enzimi özellikle fenilalanin, triptofan veya tirozin aromatik aminoasitlerinden birisinin bulunduğu karboksil gruplarındaki peptid bağlarını hidrolize etmekte özgüllük göstermektedir. Kimotripsin, önce aktif olmayan formda yani kimotripsinojen olarak pankreasta salgılanmakta ve depolanmaktadır, birkaç basamaklı kimyasal tepkimelerle tripsin enzimi tarafından aktive edilmektedir (Mahajan ve Badgular 2010).

Pepsin, 1836'da Ch. Schwann tarafından keşfedilmiş olup, ortaya çıkarılmış olan ilk hayvansal kaynaklı proteazdır. Mide içerisinde inaktif bir durumda olan proenzim olarak sentezlenmektedir ve pepsinojen adını almaktadır. Mide asidinin etkisiyle aktif

durumda olmaktadır. Aspartik proteazlar grubunda bulunan pepsin enzimi, insan immün sistem yetmezliğine yol açan HIV1 virüsünün olgunlaşmasından sorumlu olan enzime benzemektedir. Optimum aktiviteyi pH 2.0 ile pH 4.0 arasında göstermektedir. Ortam pH'sı 6.0 ya yaklaştığında ise inaktif forma dönüşmektedir. Enzim, özellikle aromatik aminoasitler arasındaki peptidlere atakta bulunmakta, glutamik asit, sistin ve sistein peptidlerinin hidrolizini sağlamaktadır (Rao ve ark. 1998).

Renin ise, bütün memeli türlerinin midelerinde inaktif halde bulunan "Prorenin" olarak üretilmekte olan pepsin enzimine benzetilen bir proteazdır. Hayvanlardan elde edilen renin için en geniş çapta kullanılan kaynak ise, yeni doğan ve süt ile beslenen buzağı şirdenidir (Sevinç 2010, Sarı 2011). Prorenin olarak sentezlenen enzim, pepsin veya kendi yapısıyla aktif renine dönüşmektedir (Rao ve ark. 1998). Enzimin aktif hale geçmesi için pH 5.0'in altında bulunan H<sup>+</sup> iyonlarının derişimine ihtiyaç durulmaktadır. Renin enzimi temelde peynir eldesinde kullanılmaktadır. Renin enzimi aktif bölgelerinde Asp215 ve Asp32 adında iki adet aspartik asit kalıntısı bulundurmaktadır. Renin enzimi kazein proteinindeki Phe105 ve Met106' yı birbirine bağlayan peptid bağımlı hidroliz ederek, çözünmez "para-kapa-kazein" oluşturur ve bu sayede sütün pıhtılaştırılması işleminde kullanılır (Ulus 2012). Yüksek miktarda saf hale getirilmiş olan enzim, 10 dakika gibi kısa bir süre içerisinde 72 milyon birim sütünü çöktürebilmektedir (Uhling 1998).

### **2.4.3. Mikrobiyal Kaynaklı Proteazlar**

Enzim araştırmalarının başlangıcından günümüze kadar karakterizasyonu yapılan hidrolitik proteazların en önem arz eden grubunu mikrobiyal proteazlar oluşturmaktadır. Bu enzimler hücrel metabolik tepkimelerde önem bulmasının yanı sıra endüstriyel çalışmalarda da ilgi odağı olması sayesinde çok fazla araştırılan bir konu haline gelmiştir. Mikrobiyal enzimler 1914 yılından beri deterjan ve temizlik ürünlerine katkı yapılarak, endüstrinin bu alanında yaygın olarak kullanılmaktadır. Hücre içi proteazlar hücrel ve metabolik yollarda farklılaşma, sporulasyon, proteinlerin katlanması, enzimlerin olgunlaşması gibi çoğu metabolik aktivasyonda öneme sahip olmaktadır. Hücre dışı proteazlar ise hücrenin etkin formda olduğu ve çevresel şartlarda proteinlerin

hidrolizini katalizleyerek absorbe olmasında ve bunlardan faydalanılma süreçlerinde rol oynamaktadırlar (Kalizs 1988). Ayrıca hücre dışı proteazların birçoğu endüstriyel etkinlikte proteinlerin hidrolizinde ticari bir öneme sahiptirler (Kumar ve Takagi 1999). Günümüzde en fazla kullanım alanına sahip olan proteaz kaynaklarını, bakteriyel, viral ve fungus kökenli mikrobiyal proteazlar oluşturmaktadır. Mikrobiyal kaynaklı proteazlar bitkisel ve hayvansal kaynaklı proteazlara göre daha fazla tercih edilmektedir. Bunun sebebi ise, biyoteknoloji uygulamalarında mikroorganizmalar istenildiği bir şekilde yönlendirilebilmekte, daha saf bir şekilde elde edilebilmekte ve uygun bir kültür ortamında üretilmektedir (Kıran ve ark. 2006). Mikrobiyal proteazların sınıflandırılmasında aktif merkezleri göz önünde bulundurulmaktadır. En önemli mikrobiyal proteaz grupları ise; Serin-, metallo- ve karboksil proteazlarıdır. Ayrıca literatürde ‘keratinaz’, ‘jelatinaz’, ‘kazeinaz’ şeklindeki sınıflandırmaları da bulunmaktadır (Novel ve ark. 1963).

Mantarlar fungus kökenli proteazları üretebilirler ve bakterilere göre daha geniş çapta enzim üreticileri olarak bulunmaktadır. Örneğin, *Aspergillus oryzae* nötral, asit ve alkalin proteazların tamamının üretimini gerçekleştirebilmektedirler. Fungal proteazlar geniş bir pH aralığında aktivite göstermektedirler (pH 4.0 ile 11.0). Ancak fungal proteazlar, bakteriyel proteazlara göre daha düşük sıcaklık toleransları ve daha düşük reaksiyon hızlarına sahiptirler. Fungal kaynaklı enzimler ‘‘Katı hal fermentasyonu’’ işlemleriyle elde edilmektedir. Fungal asit proteazlar pH 4.0 ile 4.5 aralığında maksimum aktiviteye sahip olmakla birlikte, ayrıca pH 2.5 ile 6.0 arasında kararlı halde bulunurlar. En çok da peynir üretim endüstrisinde dar bir pH ve sıcaklık spesifitesi ile çok tercih edilmektedir. Nötral olan fungal proteazlar ya da metalloproteazlar pH 7.0’ de aktivite göstermektedirler ve şelatlayıcı ajanlar aracılığıyla inhibe edilmektedirler. Fungal alkalin proteazlar gıda proteinlerinin modifikasyonu için de kullanılmaktadırlar (Rao ve ark. 1998, Uhlig 1998). Fungal proteazlar endopeptidazlar ve ekzopeptidazlar olup, farklı çeşitlerde üretilmektedirler (Gripon 2003).

Viral kökene sahip proteazlar ise, viral proteinlere karşı oldukça hassas oldukları için oldukça önemli görülmektedirler. Viral proteazlar, viral replikasyon ve birleşimi sentezlemek ve düzenlemek üzere hareket etmektedirler. Viral proteazların en önemli

noktasının üç boyutlu yapısı ve sentetik inhibitörler ile olan etkileşimi olduğu yapılan araştırmalar ile saptanmıştır. Farklı virüslerde serin, aspartik ve sistein peptidazlar bulunmaktadır. Tüm virüs kaynaklı peptidazlar endopeptidazdırlar (Babe ve Craik 1997).

Bakteriyel kaynaklı proteazlar, büyük polipeptidlerin daha küçük peptidlere ve aminoasitlere hidrolizlerini sağlamaktadırlar. Bundan kaynaklı, onların hücre tarafından absorpsiyonunu kolaylaştırmaktadırlar. Hücre dışı enzimler, onların depolimerleşme aktivitesinden kaynaklı beslenmede büyük bir öneme sahiptirler. Hücre içi proteazlar hücrede uygun protein dönüşümüne katkılarıyla bilinmektedirler. Örneğin *Echericha coli* bakterisinde, *lon* geni tarafından sentezlenmekte olan ATP-bağlı proteaz *La*, anormal proteinlerin hidrolizinden sorumlu olan bir enzimdir (Çelik 2006).

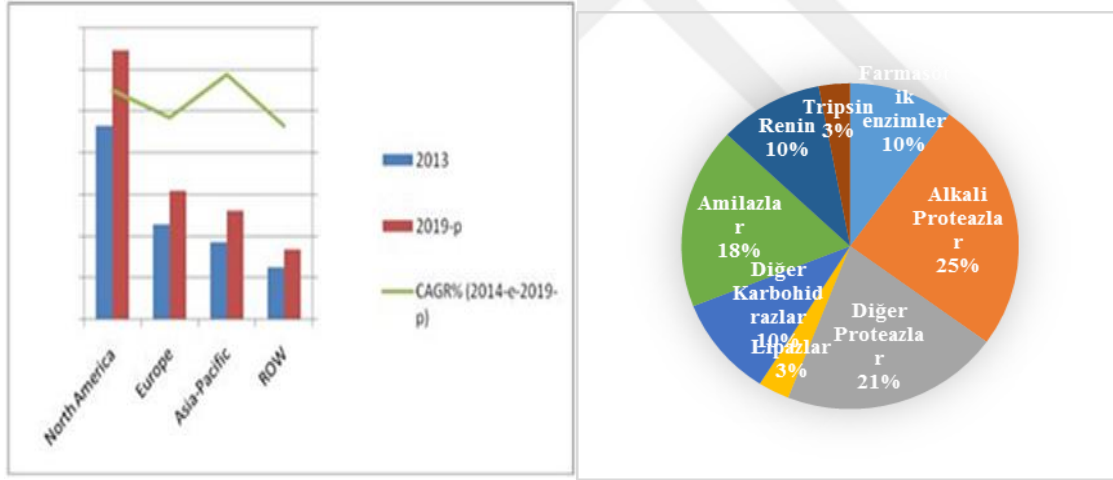
Spor oluşturabilen bakteri türlerinde ise sporların, mayalarda askosporların, cıvık mantarlardaki sporların, funguslara ait olan konidial boşalım gibi olayların hepsinde dönüşümleri gerçekleşmektedir. Tüm bu canlılarda proteaz enziminin sporlaşma için gerekli olduğu proteaz inhibitörleri kullanılarak kanıtlanmıştır. Maya diploidlerinde asko spor oluşabilmesi sürecinde proteaz A enziminin aktivitesinde meydana gelen artışa bağlı olarak gerçekleştiği saptanmıştır.

Endüstriyel proteazların çok büyük bir kısmının üretiminin nötral ve alkalin şeklinde *Bacillus* bakterileri ile gerçekleştiği bilinmektedir (Denizci 2004). Bakteriyel nötral proteazlar pH 5.0 ile 8.0 arasında, düşük sıcaklık değerlerinde aktivite göstermektedirler. Gıdaları hidrolizlediklerinde ise oluşan hidrolizatlardaki acı tadın daha az hissedilmesi gıda endüstrisinde hayvansal proteazlara göre daha çok tercih edilme sebeplerinden biri olmuştur. Sıcaklık toleranslarının düşük olması sebebi ile gıda hidrolizatlarının üretim sürecinde reaktivite kontrolünde avantaj sağlamaktadır (Rao ve ark. 1998).



## 2.5. Proteazların Endüstriyel Kullanım Alanı

Proteazlar, ticari önemleri bakımından endüstriyel alanlarda kullanılan en önem arz eden gruptur. Geniş substrat özgüllükleri olması nedeniyle genellikle farmasötik, gıda, deterjan ve temizlik maddeleri üretimi endüstrilerinde, deri sanayiinde, peptid sentezi, protein hidrolizati oluşturma, atıkların işlenmesi, biyolojik iyileştirme- dönüştürme, tıpta teşhis ve X ışını filmleri üzerinde bulunan jelatinin bozunması gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır ve endüstriyel enzim grubundan elde edilen gelir, dünya çapındaki satış gelirinin yaklaşık olarak %60'lık kısmını oluşturmaktadır (McGrath 2005, Shankar ve ark. 2011). Endüstriyel enzimlerin endüstride kullanım yüzdeleri (Ahmad 2013) ve Dünya çapında proteaz enzimi market payı (2013-2019 arası) (Anonim 2016) şekil 2.7'de verilmiştir. Proteaz enziminin 2021 yılına kadarki süreçte dünya çapındaki enzim piyasasındaki yıllık değerinin 2,21 milyar \$ olarak öngörülmekte olduğu ve yıllık büyüme oranının %6'ya ulaşması tahmin edilmektedir (Anonim 2011).



Şekil 2. 7. Endüstriyel enzimlerin endüstride kullanım yüzdeleri (Ahmad 2013) ve Dünya çapında proteaz enzimi market payı 2013-2019 arası (Anonim 2016)

### 2.5.1. Deri Endüstrisinde Kullanım Alanları

Deri endüstrisi, çeşitli kimyasalların kullanımı ve çevre kirliliğine neden olacak zararlı maddelerin (hidrojen sülfid vb.) kullanılması nedeniyle çevre kirliliğine neden olmaktadır (Pvanakrishnan ve Dhar 1986, Meraz ve ark. 2006). Deri işleme süreçlerinde; emdirme, tüy alma, yıkama, samalama ve atık prosesi gibi birtakım

süreçlerden oluşmaktadır. Emdirme safhasında proteolitik enzimlerin kullanımı interfibriler proteinlerin çözünmelerini hızlandırmakta iken, su emilimini kolaylaştırmakta ve emdirme aşamasının gerçekleşme süresini kısaltmaktadır. Geleneksel yöntemler kullanılarak tüylerin alınması işlemi çeşitli çevre sorunları oluşturmaktadır. Endüstriyel kullanımlarda enzimatik tüy alma işlemi genellikle az miktarlarda kireç maddesi kullanılması ile tüy alma işleminin verimini arttırmaktadır ve tüy alma işleminin maliyetinin düşmesi bakımından kazanç sağlamaktadır (Thanikaivelan ve ark. 2004). Bunun yanı sıra, son zamanlarda uygulanan mikrobiyal alkalın proteazların kullanımı kireç gereksiniminin ve tüy alma işleminin süresinin kısaltılması, atık arıtma maliyetini düşürme, deri yüzeyini arttırmakta ve boyama işleminin iyileştirmesi gibi birçok sebepten kaynaklı değer görmüştür. Alkalın proteazları tüy alma sürecini hızlandırmaktadır. Bunun nedeni, alkalın koşullar tüy köklerinin genişlemesini kolaylaştırmaktadır ve sonrasında saç bezciği proteinindeki proteazların atağı tüylerin alınmasında çok büyük bir kolaylık sağlamaktadır (Gupta ve ark. 2002). Varela ve ark. (1996). *B. subtilis* IIQDB32 alkalın proteazının koyun derisindeki tüylerin alınması işlemi için kullanıldığını rapor etmişlerdir. George ve ark. (1995) hayvanlardaki post ve derideki tüylerin alınması için *B. amyloliquefaciens* alkalın proteazlarını kullanmışlardır. Tüylerin bütünüyle alınması işlemi kimyasal maddelere ihtiyaç duymadan enzimler vasıtasıyla alınmıştır (Thangam ve ark. 2001, Dayanandan ve ark. 2003, Macedo ve ark. 2005). Tüy alma işlemi hakkındaki benzer bulgular *B. pumilus* BA06' nın mutant türüyle üretilen alkalın proteazlar ile de raporlara geçirilmiştir (Wang ve ark. 2007).

Günümüzde, bakteriyel proteazlar kimyasal maddelerin yerine temizleme ajanı olarak kullanılmaktadır. Hameed ve ark. (1996 ve 1999) *B. subtilis* k2 alkalın proteazını temizleme ve deri sürecinde kullanmışlardır. Proteazlar ayrıca, deri artığı sürecinde de yararlı olmaktadır. Dalev ve Simeonova (1992) deri endüstrisi atıklarının tam kullanımı için alkalın proteaz içeren bir teknik geliştirmişlerdir.

### **2.5.2. Tekstil Endüstrisinde Kullanımı**

Tekstil endüstrisinde kullanılan proteazlar, protein ihtiva eden ürünlerin enzimatik olarak ön terbiyesi işleminde kullanılmaktadır. Kumaş üretimi için gerekli olan maddeler lifsi yapıda olmaktadır. İpek, angora, kaşmir doğal protein lifleri halinde bulunmaktadır (Duran ve ark. 2007). Protein içeren liflerin özelliklerini; içerdikleri aminoasit miktarı, cinsi yerleşim konumları belirlemektedir. Bu özelliklerine göre yün esaslı ürünler pronaz, pepsin ve papain gibi proteazlarla muamele edilerek esneklik ve doğal olarak bulunan kirlerinden uzaklaştırılması sağlanmaktadır. Proteazların görev aldığı işlemler kimyasal maddeler kullanılarak yapılanlara göre daha az maliyet oluşturmuştur ve iyi sonuçlar göstermiştir (Karmakar 1999). İpek lifinde tekstil materyali olarak kullanılabilmesi için proteazlarla muamele edilmesi gerekmektedir. Ham ipek kesiksiz ve ince protein yapılı bir maddedir. İçeriğinde fibrin ve serisin bulundurmaktadır. Ham ipekte bulunan %25 oranında serisin ipek ipliklerinin etrafını çevrelemektedir. İpeğe koruyuculuk sağlamakla görevli olan serisin denilen bu tabakanın ipeğin boyanma işleminden önce uzaklaştırılması gerekmektedir. Geleneksel olarak kullanılan yöntemlerde nişasta polimeri kullanılmaktadır ve ipek iplikleri çekilerek serisinden uzaklaştırılmaktadır. Ayrıca ham ipek ipliklerindeki ipek özütünü yani serisini uzaklaştırmak amacıyla pişirme denilen işlem de uygulanmaktadır. Geleneksel olan yöntemde sabun maddesi içeren alkalın olan ortamlarda pişirme işlemi yapılmaktadır (Kanehisa 2000). Ancak bu yöntemler pahalı olmakla birlikte ve ipeğe zarar veren yöntemlerdir. Bu nedenlerden dolayı boyama işleminin öncesinde enzimlerin kullanılması alternatif bir yol olarak ortaya çıkarılmıştır (Puri 2001). Bununla birlikte, proteolitik enzimlerin kullanılması, geleneksel yöntemlere nazaran daha iyi bir yöntem olarak görülmektedir. Çünkü ipek özünü lifli proteine hasar vermeden temizlemektedir.

### **2.5.3. Deterjan Endüstrisinde Kullanımı**

Dünya enzim üretim piyasasının yaklaşık %30'unu deterjanlar için enzim üretimi oluşturmaktadır (Horikoshi 1996). Proteazlar; protein moleküllerini parçalayabildikleri

için çamaşırlardaki lekeleri çıkarabilecektir veya deterjan içerisindeki diğer maddelerle birlikte çözünebilecek duruma getirmektedir. İdeal deterjan proteazları, yiyecek, kan ve diğer vücut salgılarındaki proteinlerden dolayı lekelerin önemli bir kısmının yok edilmesini kolaylaştırmak için, geniş substrat özgüllüğüne sahip olması istenilmektedir. Deterjan içinde bir proteazın en mükemmel aktiveyi gösterebilmesi için en önemli faktör proteazların izoelektrik nokta (pI) değerleridir (Çelik 2006). Deterjan çözeltisinin pH'ı ile pI'sı birbirine uygunluk gösteriyor ise proteazın bu uygulama için çok uygun olduğu kabul edilmektedir. Ayrıca bir proteazın pI değeri ne kadar yüksekse, o proteaz o kadar yüksek pH'larda etki gösterebildiği görülmektedir (Çelik 2006). Günümüzde proteazların tüm dünyada çamaşır deterjanlarında katkı maddesi olarak kullanımı mevcut olarak görülmektedir. Bu alanda proteaz kullanımının yüksek olmasının nedeni ise çevre ile ilgili oluşan kaygılardan kaynaklanmaktadır. Sıcak sayabileceğimiz derecelerde yıkamalarda kullanılmak üzere üretilmiş olan deterjanlar sodyum fosfat ve 60°C üzerine çıkan sıcaklıklarda aktifleşebilen beyazlatıcı bir madde olan sodyum perbonat içermektedir. Ancak fosfat kirlenmesinin önüne geçebilmek amacıyla polyester kumaşların kullanımında bir artış olmuştur ve bu sebepten dolayı bu içeriğe sahip olan deterjanlar önce azaltılmıştır, sonra da piyasadan kaldırılmıştır (Kasavi 2006).

Bu olgulardan sonrada bakteriyel kökenli enzim kullanımında artış gözlenmiştir (Orhan 2003). Yıkama veriminde artış sağlayan proteazlar, enzimin karakteristik özelliklerine bağlı olarak daha düşük sıcaklıklarda ve daha düşük sürelerde daha iyi bir temizliğe ya da leke çıkarımına olanak sağlayabilmektedirler. Özellikle kan ve çim gibi lekeleri çıkarma işleminde proteazların önemli etkileri oldukları bilinmektedir. Yiyecek lekelerinin çıkartılmasında ise proteazlar, amilaz ve lipazlarla birlikte kullanıldığında daha yüksek performans veren sonuçlar vermektedir. Ayrıca, deniz solucanı canlısından elde edilen proteazlar lens yıkama solüsyonlarında kullanılmaktadır ve düşük sıcaklıklarda kontak lenslerin temizlenebilmesini sağlamaktadır (Orhan 2003, Öztürk 2004, Aehle 2004). Çamaşır deterjanları içerisinde bulunduran enzimlerden yüksek verim elde edilebilmesi için, 1 saat süresince 95°C'ye kadar çıkan sıcaklıklarda pH 9.0 ile 11.0 aralığında etkinliğini koruyabilmesi, beyazlatıcı ve yüzey temizleyicilerin varlığında da kararlı olması vede deterjan içerisinde en az 1 sene aktivitesini

kaybetmemesi gerekmektedir. Son yıllarda deterjan üretiminde kullanılan tüm proteazlar *Bacillus* türleri aracılığıyla üretimi sağlanan serin ve alkali proteazlardır. Çamaşır deterjanlarında kullanılan proteazlar; *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* veya *Bacillus* sp. bakterilerinden sağlanmaktadır (Uhlir 1998, Aehle 2004). *Bacillus* suşları farklı olarak ise *Conidiobolus coronatus*'tan elde edilmiş olan bir alkali proteazın da Hindistan'da ticari deterjan üretiminde kullanıldığı saptanmaktadır (Maurer 2004). Endüstriyel alanda etkinlik gösteren birçok firma katalitik etkinliğini arttıracak yeni enzimleri keşfetmeye, onları tanımlamaya ve büyük ölçekli işlemlerde kullanmaya çabalamaktadırlar. Ayrıca protein mühendisliği yöntemleri kullanılarak ana suşların özelliklerinin üstün performans gösterecek düzeyde geliştirilmesiyle de deterjan sanayisi için yeni proteazların üretilmesi amaçlanmaktadır. Birçok firma tarafından ticari olarak üretilen ve ticari adı ile bilinen proteazlar Çizelge 2.1.' de verilmiştir.

**Çizelge 2. 1.** Dünya çapında üretilen enzim tabanlı deterjanlar ve enzim kaynağı

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

#### 2.5.4. Gıda Endüstrisinde Kullanımı

Gıda endüstrisinde proteaz kullanımı çok eski zamanlara dayanmış olmakla beraber günümüzde de oldukça çeşitli kullanım alanları mevcuttur. Bu kullanım alanları; rutin olarak peynir üretimi, fırıncılıkta, soya hidrolizatlarının hazırlanması süreçlerinde ve et yumuşatma işlemleri gibi alanlardır.

Protein hidrolizatları enzimler aracılığıyla elde edilmiş olduğunda çoğunlukla acı bir tada neden olmaktadır. Bu acılığın oranı ise bulunan aminoasitin türüne ve peptit uzunluğuna göre değişkenlik göstermektedir. Eğer hidrofobik aminoasit içeriği daha fazla ise tat acı, hidrofilik aminoasit içeriği daha fazla ise tatlı peptidler oluşmaktadır. Kazein ve hemoglobinden elde edilen hidrolizatlar; et, balık ve jelatinden üretilen hidrolizatlardan daha acı bir tada sahip olmaktadır (Aehle 2004).

Gıda endüstrisinde en çok kullanım alanına sahip proteaz enzimi papaindir. Papainin en önemli uygulama bulunduğu alanlardan biri yapay olarak gerçekleştirilen etin gevrek bir hal alması için gevrekleştirilmesi, diğeri ise biranın soğuk durumda saklanmasıdır. Etin gevrekleştirilmesinde enzimin eti parçalamadan, ette dağılımının sağlanmasına dikkat edilmesi gerekmektedir. Ayrıca enzim bir veya birden çok kas dokusuna ait yapıyı parçalayabileceği için kullanılan enzim derişiminin miktarı çok iyi ayarlanmalıdır (Fadıloğlu ve Erkmen 2004). Buğday unu, fırıncılık alanında kullanıma sahip en önemli bileşenlerden biridir. Hamur yapımında kullanılan ve fırın hamurlarının özelliklerini belirlemede etkin olan madde gluten, suda çözünemeyen protein yapısındadır. *Aspergillus oryzae* türünden üretimi yapılan endo ve ekso proteazlar sınırlı bir proteoliz yeteneğiyle birlikte buğday gluteninde modifikasyon sağlayabilmek için kullanılmaktadır. Beyaz ekmek yapımı ve poğaçaya üretiminde de fungal proteazların sürekli şekilde kullanımı mevcuttur. Eğer fungal proteazlar yüksek miktarlarda kullanılırsa ekmeğın hamurumsu yumuşak bir hal almasına neden olmaktadır. Bu yüzden, bu işlemlerde enzimin kullanılması özellikle sert ve elastik haldeki hamurlar için daha uygun görülmektedir. Hamurun enzim ile muamelesi el ya da makine ile üretimde kolaylık sağlamaktadır, bu sayede daha geniş aralıkta ürünler elde edilebilmektedir. Proteazların katkısı ile artan somun hacimlerinde karışma zamanını yaklaşık %25 oranında azaltmaktadır. Özellikle *Bacillus subtilis* proteazları kek, bisküvi ve kraker yapımında uygun kullanım alanına sahiptir. Bu proteazlar hamurların yumuşamasını geciktirmek için kullanılmaktadır ve özellikle kraker üretiminde çok önemli olmaktadır (Fadıloğlu ve Erkmen 2004, Çelik 2006). Ayrıca bu uygulama alanında asidik mantar proteazların amilazlar ile birlikte kullanılması ürünün tadında ve aromasında farklılık sağlamaktadır (Uhlıg 1998, Krajewska 2003). Peynir yapımında sütün kesilmesi işleminde veya pıhtılaşması için kullanılan sığır kimosin (rennin),

aspartik proteaz grubuna dahildir. Kaynağından dolayı rennin pahalı bir maddedir ve buna alternatif olarak domuzdan üretilen pepsin de kullanılmaktadır. Ancak pepsinin yüksek proteolitik aktivitesinden kaynaklı peynir özü için çok fazla istenmeyen bir durum olmaktadır. Bu yüzden, süt kesme enziminin çeşitli mikrobik kaynakları araştırılmıştır. Sığır kimosinin içerdiği aktiviteye yakın olarak sayılan peynir mayalarının mikrobiyal kaynakları, *Rhizomucor miehei*, *Mucor pusillus* ve *Endothia parasitica*'dır. İlk iki organizma termofilik mantar türüdür, üçüncüsü ise bir mayadır (Orhan 2003). Soya fasüyesinin yüksek miktarda ve kaliteli bir protein içeriğine sahip bir besin kaynağı olması nedeniyle onun yüzyıllardır kullanımını sağlamıştır. Birçok soya ürününün ve soya sosunun hazırlanmasında proteaz enzimi kullanılmaktadır. Soya sosu üretiminde fungal ve nötral proteazlar önem arz eden enzimlerdir. Soya proteinlerinin proteolitik modifikasyonu ise onların fonksiyonel özelliklerini düzenlemeye yardımcı olmaktadır. pH 8.0'de alkalaz ile soya proteinleri muamelesi yüksek çözünürlük, iyi protein ürünü ve düşük derecede acılıkta çözünür olan hidrolizatlar ile sonuçlanmaktadır (Çelik 2006). Yağ eldesinde de yine proteolitik enzimlerin kullanım alanları mevcut olmaktadır. Örneğin Nijerya kavun çekirdeğinden elde edilen yağ eldesinde proteolitik enzim kullanılmaktadır. Kavun çekirdeği %30 yağ, %50 protein içermekte olup, ancak yağın tamamı bilinen çözümlerle ekstraksiyonu yapılamamaktadır. Çekirdeklere proteolitik enzimlerin uygulanması sayesinde ekstrakte olabilen yağ miktarında bir artış gözlenmektedir. Ayrıca proteazlar meyve sularının, alkolsüz içecekleri kuvvetlendirmede ve proteince zengin diyet yiyeceklerin üretiminde de kullanılmaktadırlar (Çelik 2006).

### **2.5.5. Kozmetik ve İlaç Endüstrisinde Kullanımı**

Proteazlar, kozmetik endüstrisinde saç bakımı ürünlerinde, diş macunlarının içeriğinde, istenmeyen tüylerin yok edilmesini sağlayan ürünlerde ve kontak lens solusyonlarında kullanılmaktadır. Cilt ve saç bakım ürünlerinde kullanılan kolajenoz hidrolizat ve elastin maddeleri sığır tendonlarının proteolitik hidrolizleriyle elde edilmektedir (Langmaier ve ark. 2002). Proteazların geniş özgüllüğe sahip olması ve çeşitliliğinden kaynaklı tedavi edici ajanların gelişiminde büyük bir avantajlı madde olarak kullanılmaktadır. Subtilisin ya da kollejenaz yanık ve yara tedavisinde, antibiyotiklerin

geniş bir aralıkta kullanımıyla kombine edilerek kullanılmaktadır. *E. coli*'den izole edilen asparajinaz lenfositik lösemilerin çeşitli formlarında da kan akışından asparajini elimine etmek için kullanılmaktadır (Rao ve ark. 1998, Kurdya ve Simonenko 1994, Gupta ve ark. 2002). Diyabet hastalarında ise yaraların geç iyileşmesine karşı ‘‘proteaz absorban örtü tedavisinde’’ metalloproteaz inhibitörleri kullanılarak, yaraların kronik halden akut hale geçmesi sağlanmaktadır (Lobmann ve ark. 2005).

### **2.5.6. Gümüş Eldesinde Kullanımı**

Alkalin proteazlar, kullanılmış X-ışını filmleri ya da fotoğraf filmlerinden gümüş eldesi amacıyla gerçekleştirilen süreçlerde geniş kullanım alanına sahiptir. Kullanılmış filmler jelatin tabakalarında ortalama olarak %1,5 ile 2 gümüş içermektedir. Gümüşün geri kazanılabilmesi için ise, jelatin tabakasının filmden ayrılmış olması gerekmektedir. Geleneksel olan uygulamalarda, filmin yakılarak gümüşün geri kazanılması çevre kirliliğine yol açtığından kaynaklı olarak, jelatin tabakanın enzimatik hidrolizi yolu tercih edilmektedir ve bu yolla elde edilen gümüşün yanında polyester filmin de geri kazanımı da sağlanmaktadır. Bu işlemlerde bakteriyel proteazların yanında pankreatik proteazlar kullanılabilir (Horikoshi 1999).

### **2.5.7. Atıkların İşlenmesinde Kullanımı**

Proteazlar, gıda endüstrisinden açığa çıkan ve evlerden çıkan atıkların işlenmesinde de uygulama alanına sahip olmaktadır. Ayrıca, proteazların doğada atık olarak bol miktarlarda bulunan boynuz, kıl, tırnak ve saç gibi lifli proteinleri de yararlı bir biyokütle haline dönüştürebilmektedirler. Bu konuda yapılan çalışmalarda, 1989 yılında Venugopal ve çalışma arkadaşları *B. megaterium* türünün hücrelerini kalsiyum aljinat üzerine immobilize etmiştir ve immobilize hücrelerle hücre dışında bulunan proteazları sararak balık etinin çözündürülmesini sağlamıştır (Venugopal ve ark. 1989). 1992 yılında Dalev ve Simeonova deri endüstrisindeki temel atıkları işlemek üzere *B. subtilis* 'ten ürettikleri alkalin proteazla, atıklardan hayvansal tutkal gibi yararlı ürünler elde etmişlerdir (Dalev ve Simenova 1992). Ayrıca, Dalev 1994 yılında *B. subtilis* 'ten üretilen alkalin proteazların, kümes hayvanlarının kesim yerlerindeki kuş tüyü



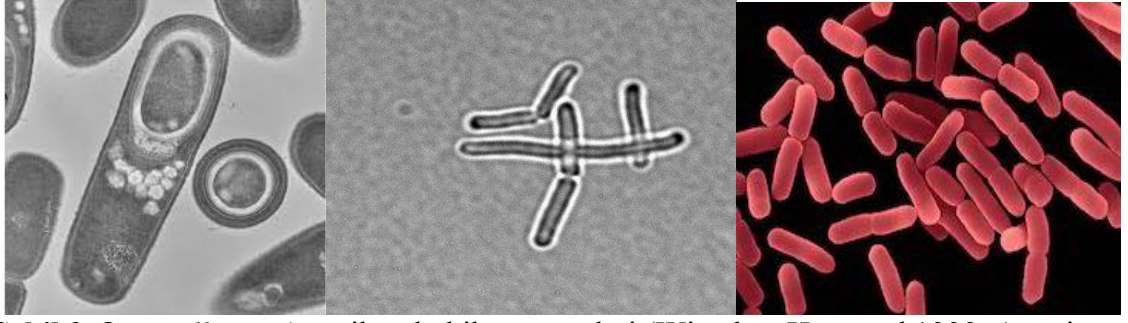
artıklarının işlenmesindeki uygulamalarda kullanımını da açıklamıştır (Dalev1994). Kümes hayvanlarının toplam ağırlığının %5'ini oluşturan tüyler ve sert keratin olan yapının tamamen parçalanması sonucunda oluşan ürün önemli bir protein kaynağı olarak değerlendirilmektedir. Bu ürün yüksek protein içeriği nedeniyle yem katkısı olarak kullanılmaktadır (Anwar ve Saleemuddin 1997, Öztürk 2004).

## **2.6. *Bacillus* Cinsinin Genel Özellikleri**

*Bacillus* türü bakteriler, en temel olarak kolay üretimlerinin yapılabilmesi ve bu özelliğinin yanı sıra antibiyotik, enzim, toksin üretebilmesi gibi metabolik özelliklerinin endüstriyel alanlarda büyük çapta öneme sahip olması sebebiyle dikkatleri üzerine çeken mikroorganizmalardır (Rosovitz ve ark. 1998).

Nötrofilik ve alkalofilik *Bacillus* 'lar özellikle yüksek oranlarda alkali proteaz üreticisi konumunda olmalarından kaynaklı önem arz eden organizmalardır. Bu üretilen enzimlerin, yüksek katalitik aktivite göstermeleri, yüksek substrat özgüllüklerinin olması ve artan ürün kapasiteleri gibi özelliklerinin olması nedeniyle geniş bir uygulama alanında bulunmasını sağlamaktadır (Rao ve ark. 1998, Kumar ve Takagi 1999).

*Bacillus* türlerinin özellikle elde edilen taze kültürleri, gram pozitif boyanmaktadırlar. Bu türlerin vejetatif formları ise düz, kenar kısımları birbirine paralel, uçları yuvarlak veya kesik biten, yaklaşık 0,5 ila 1,2 µm boyutlarında olan basillerdir. Mikroskopta uzun zincirler halinde ya da tek tek veya uzun görünürler (Şekil 2.8). Genellikle çoğunluğunun katalaz testi de pozitif sonuç göstermektedir. *Bacillus* türleri çevre şartlarının kötü olduğu durumlarda ise dış etkenlere karşı korunma gösterebilmek için spor üretmektedirler (Wipad ve Harwood 1999, Gerçeker 1999).



**Şekil 2. 8.** *Bacillus sp.*'in mikroskopik görüntüleri (Wipad ve Harwood 1999, Anonim 2013)

*Bacillus* türleri, farklı karbon kaynakları kullanarak, yüksek pH ve sıcaklıklarda kararlılığı yüksek ürünler üretebilmektedirler. Bunun yanı sıra, diğer mikroorganizmalara göre de daha kolay genetik olarak izole edilebilmektedirler. *Bacillus*' ların çoğalması için gereken maksimum sıcaklık 25 ile 75 °C arasında değişim gösterirken, minimum sıcaklık -5'den 45°C'a kadar değişmektedir. pH aralığı ise 7.5 ile 8.0'den pH 2.0 düzeyine kadar değişiklik göstermektedir (Kalender 1999).

Çoğunlukla saprofit olarak görülen *Bacillus* türleri doğada yaygın olarak toprakta yaşamaktadır ve toz partikülleri ile sulara, bitki ve hayvan materyallerine bulaşmaktadır. Bu cinse ait türlerin çoğu proteaz üretimi sağlamaktadır ve bu da rekombinant proteinleri yıkabilmektedir. Örneğin *B. subtilis* 7 farklı proteaz üretimi göstermektedir. Bunlardan 5'i ekstraselüler olarak bulunmaktadır (Barredo 2005).

Alkali proteazlar, bakteri, küf, maya gibi çeşitli kaynaklardan elde edilse bile (Singh 2000), alkalifilik *Bacillus* biyoteknolojide yoğun olarak kullanılan mikroorganizmalardır. Çünkü çok çeşitli ortamlardan izolasyonu daha kolay yapılabilmektedir. Aynı zamanda *Bacillus*, kompleks ve sentetik ortamlarda da gelişebilmektedir. Termofilik ve alkalifilik *Bacillus* türleri tarafından üretilen alkalifilik proteazlar yüksek sıcaklık ve yüksek pH'ya dayanıklıdır (Aunstrup 1981, Jhonvesly ve Naik 2001). Ayrıca *Bacillus* türleri durgunluk fazlarında da hücre dışı proteazlar üretebilmektedir (Mabrouk ve ark 1998). *Bacillus* lar çoğunlukla hücre dışı proteaz üreticisidirler ama nadiren de olsa hücre içi proteaz üreten ve saflaştırılan çalışmalar da yapıldığı görülmüştür (Setyorini ve ark. 2006).

## 2.7. *Bacillus* Proteazının Genel Özellikleri

*Bacillus* türündeki mikroorganizmalar, proteaz tiplerinden çoğunlukla alkali-serin proteazları üretmektedirler. Bu nedenle *Bacillus* proteazları daha çok alkali özellikte olmaktadır. Alkali proteazların optimum pH aralığı pH 9.0 ile 11.0 arasında olmakla birlikte, optimum pH değerleri pH 11.5, pH 11.0-12.0, pH 12.3 ve pH 12.0-13.0 olabilen birkaç istisnai durum da bulunmaktadır. Alkali proteazlar yüksek izoelektrik noktalarına sahiptirler ve genellikle pH 6.0 ile 12.0 arasında kararlı halde bulunurlar. Optimum sıcaklık değerleri ise genellikle 50 ile 70°C arasındadır. Alkalofilik *Bacillus* sp. B 18'den izole edilen enzim istisna olarak 85°C gibi yüksek optimum sıcaklığa sahiptir. *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp. ve *Thermus* sp.'den izole edilen alkali proteazlar da yüksek sıcaklıklarda bir miktar daha termostabilite göstermekle birlikte, ortama Ca<sup>+2</sup> iyonlarının ilave edilmesi ile birlikte enzim termostabilitesinde artış gözlenmektedir (Kumar ve Takagi 1999).

Alkali proteazların moleküler ağırlıkları genellikle 15-30 kDa arasında bilirse de, birkaç yayında 31.6 kDa, 33 kDa, 36 kDa ve 45 kDa gibi daha yüksek moleküler ağırlığa sahip olan enzimlerin de var olduğu yayınlanmıştır. Bazı *Bacillus* türlerinden izole edilen alkali proteazların çoklu elektroforetik formlara sahip olduğu da gözlenmektedir. Bu enzimlerin çoklu formları protein molekülündeki glutaminye da asparagin aminoasitlerinin geri dönüşümsüz bozunması gibi enzimatik olmayan bir yolla ya da protein molekülünün oto proteolizi ile oluşmaktadır (Kumar ve Takagi 1999).

Alkali proteazlar maksimum aktivite gösterebilmek için Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup>, Mn<sup>+2</sup> gibi iki değerlikli katyonlara veya bu katyonların bir kombinasyonuna ihtiyaç duymaktadırlar. Bu katyonların *Bacillus* alkali proteazlarının termal stabilitesini arttırdığı da gösterilmiştir. Bu katyonlar enzimi termal denatürasyona karşı korumaktadır ve yüksek sıcaklıklarda da enzimin aktif konformasyonunu korumasında önemli bir rol oynamaktadırlar (Çelik 2006). Çeşitli inhibitörlerle yapılan inhibisyon çalışmaları ise enzimin doğası, aktif merkezinin yapılanması ve enzimin kofaktör ihtiyacı konusunda

bilgi verebilmektedir. Alkalen proteazlar genellikle PMSF (Fenilmetilsulfonyl florur) ve DFP (Diizopropilflorofosfat) ile tamamen inhibe olabilmektedirler. PMSF aktif bölgedeki serin aminoasitlerini sülfolar ve aktivite tamamen kaybolmaktadır Bu inhibisyon şekli, proteazları serin hidrolazlar olarak da tanımlamaktadır. Bu bilgilere ek olarak da, bazı metallo alkalenproteazların EDTA (Etilendiamin tetraasetikasit) ile inhibe olduğu da bulunmuştur. Alkalen proteazlar doğal proteinleri hidrolizlerinde gösterdikleri başarı ile bazı sentetik substratları da hidrolizleyebilmektedir. Alkalen proteazların ve subtilisinlerin kazeine karşı hemoglobin ya da sığır serum albümine olduğundan daha aktif oldukları da bulunmuştur. Alkalen proteazlar tirozin, fenilalanin gibi aromatik ya da hidrofobik aminoasit birimlerinin yer aldığı peptid bağlarının hidrolize edilmesine karşı spesifiktirler (Rao ve ark. 1998, Kumar ve Takagi 1999).

## **2.8. Mutasyon**

Mutasyon genetik materyalde oluşan kalıtsal değişimlerdir. Bazı mutasyonların organizmalara etkileri olumlu veya nötr olabilir, ancak mutasyon genellikle önemli bir hücre fonksiyonunun kaybına veya değişikliğine neden olmasından kaynaklı çoğu zaman zararlı sayılabilmektedir. Mutasyonlar bakterilerde spontan olarak yani doğal olarak meydana gelir ve bu oran mutajen bir madde varlığında da kayda değer bir ölçüde artabilmektedir. Mutajenler; ya fiziksel formda örneğin elektromanyetik radyasyon formunda ya da kimyasal formda olabilir. Mutasyona uğramış organizma ya da hücreye mutant denir. Görünüş, fizyolojik işlemler veya davranışlardaki farklılıklar ile yabani=mutasyona uğramamış organizmalardan ayırt edilirler (Anonim 2012).

Mutasyonlar iki gruba ayrılmaktadır;

- Spontan mutasyonlar (kendiliğinden)
- İndüklenen mutasyonlar (yapay-yönlendirilmiş)

Spontan mutasyonlar (kendiliğinden); DNA'daki doğal değişikliklerden kaynaklanan mutasyonlardır. DNA replikasyonunda gözlenir ( $10^6$  veya  $10^9$  'da 1). Hatalar hücre bölünmesinden hemen önce DNA replikasyon sırasında ortaya çıkar. Bu DNA polimerazın doğal hata oranıdır. Ayrıca DNA molekülündeki nükleotidlerin

kendiliğinden değişimi sonucu da oluşabilmektedir. Bu mutasyonun sıklığı düşüktür (Anonim,2011).

İndüklenmiş mutasyonlar; Mutajen adı verilen fiziksel veya kimyasal etkenlerle meydana gelen mutasyonlardır. Bu etkenlerin kullanılması sonucu mutasyonların meydana gelme olasılığı artar ( $10^3$  veya  $10^5$  'de 1), Mutajenler genler üzerinde hiç fark gözetmeksizin etkili olurlar.

Fiziksel mutajenler; pH değişimi, sıcaklık, manyetik ve elektriksel alan, UV, X ışınları gibi.

Kimyasal mutajenler; Nitröz asit, hidroksil amin, alkilleyici maddeler gibi (Anonim, 2016).

Protein mühendisliği adı verilen yeni bir alt bilim dalı ile fonksiyonel ve yapısal öneme sahip aminoasitlerin yapılarının ve görevlerinin aydınlatılmasında DNA dizisi bilinen gen üzerinde olan değişiklikler yani mutasyonlar yapılması ile ve fonksiyonel olarak mutant proteinin aydınlatılabilmesi mümkün hale getirilmiştir. Mutagenез olarak da adlandırılan bu yöntemler, tesadüfi olarak bir defada sayısı veya tam yeri belirsiz farklı bölgeleri kapsayan rastgele mutagenез (Random mutagenesis) teknikleri ve sadece belirli hedef aminoasitlerin delesyonu, insersiyonu ve değişimini ifade eden bölge hedefli mutasyonlar (Site-directed mutagenesis) teknikleri olarak ikiye ayrılabilir.

Rastgele Mutagenез Teknikleri; mutagenез hakkındaki önceki yaklaşımlar, mutasyon üretiminde tamamen rastgele yöntemlere dayanmaktaydı. Hücreler veya organizmalar UV radyasyonu veya mutajenik kimyasal maddeler gibi mutajenlere maruz bırakılmak üzere istenilen özelliklere sahip mutantlar olarak seçilmektedir. Hermann Muller, X-ışınlarının meyve sinekleri üzerinde genetik mutasyonlara yol açtığını keşfetmiştir (Muller 1927) ve genetik üzerine yaptığı çalışmalarında *Drosophila* mutantlar kullanma yoluna gitmiştir. *Escherichia coli* için, ilk olarak UV radyasyona maruz edildikten sonra mutantlar agarlı bir ortam üzerinde seçilebilmektedir. Kolonilerin biri zengin olan ortam, diğeri minimal olan ortamda olmak üzere kopya petrilere alınır ve özel besinsel gereksinimlere sahip olan mutantlar, minimal olan ortamda gelişim için yetersizlik düzeyi sayesinde tespit edilebilir. Benzer prosedürler diğeri hücre tipleri ile ve seçim için

farklı bir ortam ile tekrar denenebilir. Belirli proteinlerde rastgele mutasyonlar elde edilebilmesi için bir dizi yöntem, ilgi çekici veya daha iyi özelliklere sahip mutantlar için taranması için geliştirilmiştir (Anonim 2016). Hayvan çalışmalarında, N-ethyl-N-nitrosourea gibi alkilleyici ajanlar mutant fareler üretmek için kullanılmaktaydı (Hrabé ve Balling R 1998, Flibotte ve ark.2010).

Bölge hedefli mutagenез tekniği (Site-directed mutagenesis) ise bir gende olan özgül değişimlerin oluşabildiği işlemlerdir. Bu teknikle protein yapısı, görevi ve işleyişi hakkında araştırmalar yapılmaktadır. Bu mutasyon ile bir gende olan baz değişimi ve dizi delesyon ve insersiyonu yapılabilir. Bu yöntem aynı zamanda vektördeki restriksiyon alanların değiştirilmesi, vektör elementlerin insersiyon veya delesyonu, promotor eklenmesi veya değiştirilmesi gibi DNA yapılarının modifiye edilmesinde kullanılır (Anonim 2006).

## **2.9. Mutajenler**

DNA'nın (genomun) yapısında meydana gelen spontan veya indüklenebilen değişiklikleri sağlayan, mutasyona neden olan fiziksel veya kimyasal ajanlara mutajen denilmektedir.

### **2.9.1. Fiziksel Mutajenler**

Fiziksel mutajen iyonize olmayan radyasyon olan Ultraviyole (UV), mutasyonları indükleyen, DNA'da hasar oluşturan ve en kötü ihtimalle tümör gelişimine neden olan güçlü genotoksik etkilere sahiptir. Fiziksel mutajenler; X ışınları ve UV ışınlarıdır.

X ışınları, gama ışınları, kozmik ışınlar, hücrenin suyunu iyonize ederek hidroksil serbest radikal (OH) salgılayan iyonlaştırıcı radyasyonlardır. Hidroksil radikali güçlü bir oksitleyici ajandır. Hidroksil radikali DNA'nın fosfodiester bağını okside eder. Yüksek dozda X-ışınları bir organizmanın ölümüne neden olabilir.

UV ışığı, iyonize olmayan bir radyasyondur. Timin dimerinin (Pirimidin dimer) oluşumuna neden olur. İki timin birlikte bir DNA zincirinde meydana gelirse, UV ışığı timin dimeri oluşturmak için füzyona neden olur. Azotlu bazlar UV ışıklarını emer ve emilim 260 nm'de maksimumdur. Timin alanında DNA'nın dimer teyidi değişir, bu nedenle DNA replikasyonu sırasında hata oranı yüksektir.

### 2.9.2. Kimyasal Mutajenler

DNA' da etkisini gösteren organik bileşenlere kimyasal mutajen denir. Kimyasal mutajenler DNA'ya dahil olan bir tabanı değiştirebilen ve böylece hidrojen-bağlama özgünlüğünü değiştirebilen maddelerdir. Kimyasal mutajenler, mutasyon sıklığını artırır ve daha kolay işlenebilirler. Bu mutajenler, genomik iplikçiklerdeki delesyon, ekleme ve nokta mutasyonları nedeniyle fenotipi değiştirebilirler (Greene ve ark. 2003, Flibotte ve ark. 2010). Kimyasal ajanlar; Baz Analogları, Alkilleyici Ajanlar, Deaminasyon, Hidroksilamin, Oksidatif reaksiyonlar ve İnterkalasyon ajanları olarak gruplandırılabilir (Anonim, 2010).

Baz Analogları; DNA'nın dört standart bazından herhangi birine benzer yapıya sahip kimyasallardır. DNA polimerazlar, bu analogları standart DNA bazlarından ayırt edemezler, bu nedenle, bir baz analogu replikasyon sırasında ortamda ise bu analoglar yeni sentezlenen DNA zinciri içerisine katılabilirler. Örneğin: 2-aminopurin Adenin'e benzerdir, 5-bromür kuyruğu, timine analogdur.

Alkilleyici Ajanlar; alkil grubu veren kimyasallardır. Bu ajanlar metil ve etil gruplarını içerir. Bunlar bazı kimyasallar tarafından nükleotid bazlarına ilave edilir. Örneğin Etil Metansülfonat (EMS) gunaine bir etil grubu ekleyerek timin ile çiftleşen 6 etilguanin üretmektedir.

Deaminasyon; kendiliğinden oluşabilmelerinin yanı sıra, deaminasyon kimyasallar tarafından da indüklenebilirler. Örneğin; Nitroz asit sitozini deaminasyona uğratarak urasil bazı oluşturmaktadır ki bu; bir sonraki replikasyonda adenin bir CG: TA transisyon mutasyonu üreten çiftlerle eşleşmesine yol açar .

Hidroksilamin; sitozine bir hidroksil grubu ekleyen çok spesifik bir baz değiştirici mutajendir. Sitozini hidroksilaminsitozine dönüştürür. Bu dönüşüm, nadir bir tautomerin frekansını artırır. Tautomer, guanine yerine adenin ile eşleşir ve CG: TA transisyonuna yol açar. Hidroksilamin sadece sitosine etki ettiği için TA: GC transisyonunu oluşturmaz.

Oksidatif Reaksiyonlar; oksijenin reaktif formları DNA'ya zarar verir ve DNA'da kimyasal değişiklikler meydana getirerek mutasyonları tetikler. Reaktif Oksijen Formları; Süperoksit radikalleri, Hidrojen peroksit, Hidroksil radikalleridir. Bu reaktif oksijen türleri, normal aerobik metabolizma ile oluşabileceği gibi, radyasyon, ozon, peroksitler ve belirli ilaçlarla da oluşabilmektedir.

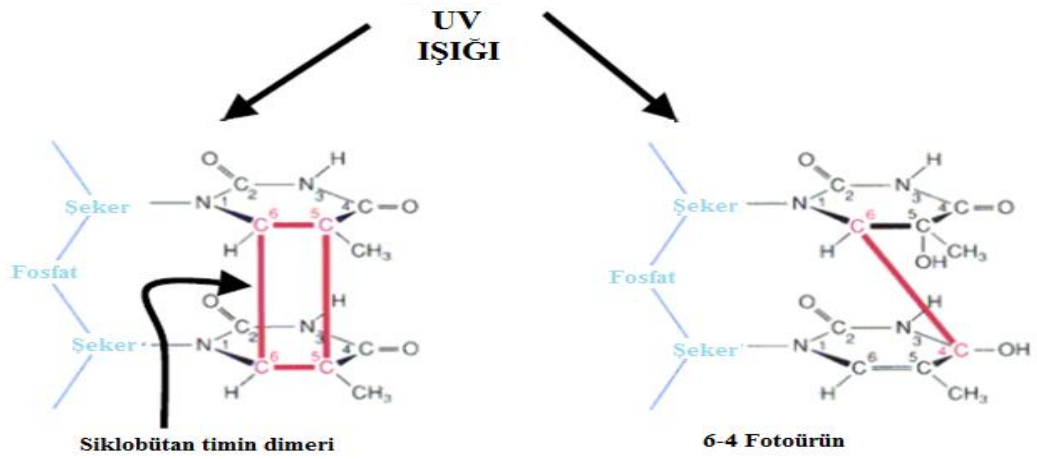
İnterkalasyon ajanları; çift katlı DNA sarmalında iki baz çifti arasında kimyasal madde araya girer veya kayar ve bu nedenle DNA'nın o konumdaki morfolojisini değiştirir. Çoğaltma sırasındaki hata olasılığı, mutasyona neden olan bu pozisyonda daha yüksektir. Örnekler; Akridin oranj, etidyum bromid, proflavin gibidir.

## **2.10. UV(Ultraviole) Mutasyonu ve Tamir Mekanizmaları**

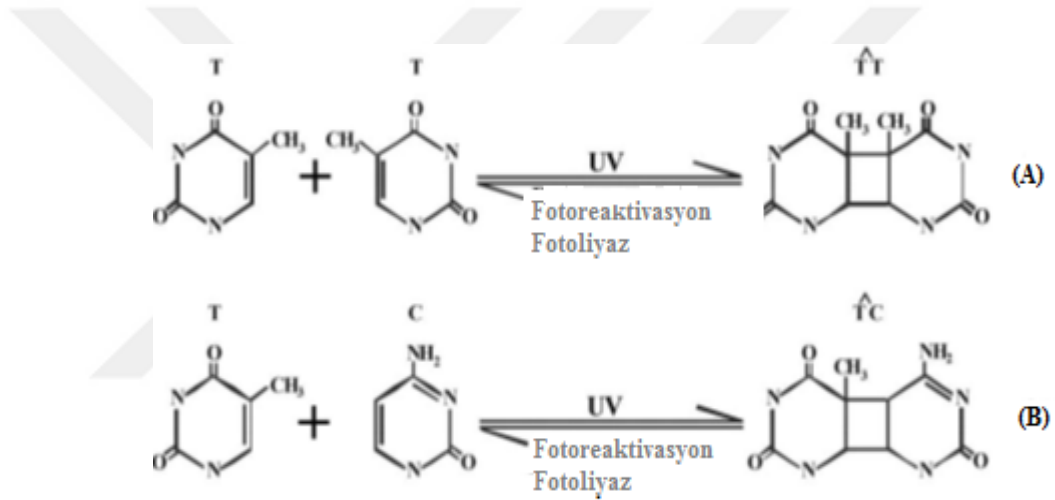
### **2.10.1. UV(Ultraviole) Mutasyonu**

Ultraviole radyasyonuna özgü olarak DNA'da iki farklı mutajenik ve sitotoksik DNA hasarı meydana gelir. UVB ya da UVC tarafından uyarılan en sık lezyonlar, siklobütan pirimidin dimerleri ve 6-4 fotorn oluşumudur (Anonim 2004). (şekil 2.9). Siklobtilin halkasal yapısı, komşu olan iki pirimidin bazının 5,6 bağları arasında oluşurken, 6-4 fotorn yapısı komşu iki pirimidinin 6. ve 4. pozisyonları arasındaki kovalent bağın oluşumu ile karakterize edilmektedir (oğunlukla 5'CC3' ve 5'TC3'), (Hader ve Sinhab 2005), (şekil. 2.10). 6-4 fotorn oluşumu, siklobütan pirimidin dimerlerine göre karşılaştırıldığında, gerçekleşme oranı çok daha düşük seviyelerde meydana gelmektedir (Mitchell ve Nairn 1989, Yoon ve ark. 2000).





**Şekil 2. 9.** UV ışığı etkisi sonucu dimer oluşumu (Anonim 2004)



**Şekil 2. 10.** UV radyasyonu sonucu en toksik ve mutajenik olan DNA lezyonu, siklobütan pirimidin dimerleri oluşumu; (A) timin-timin siklobütan pirimidin dimeri ve tamir mekanizması, (B) timin-sitozin dimeri ve tamir mekanizması (Hader ve Sinhab 2005)

Bu UV sonucu oluşan lezyonların, etkinliği dalga boyu ve bunu takiben DNA bazlarının direkt UV enerji absorpsiyonuna bağlı olarak gerçekleşen fotokimyasal reaksiyonlar yoluyla oluşmaktadır (Markovitsi ve ark. 2010). Siklobütal halkası ve 6-4 fotoürünleri oluşumu yaklaşık olarak 260 nm dalga boyunda en yüksektir ve oluşumlarının etki spektrumları DNA'nın absorpsiyon spektrumuna paralellik göstermektedir.

Dimer oluşumu; DNA'nın heliks yapısını bozmakla birlikte, replikasyonu ve transkripsiyonu bloke eder, hücre bölünmesini durdurmaktadır. Bu durumda hücrede

sorunlar çıkabilir. Bu sorunlar; Hücre bölünmeleri hücrenin onarımı sırasında durdurulabilir, oluşan hata düzeltildiğinde ise tekrar başlayabilmektedir (Bakteriyostatik etki). Hücre canlılığını kaybetmesiyle birlikte artık replikasyon yapamaz (Bakteriyosidal etki) (Kirchner 2016). Ayrıca UV radyasyonu, hücrel oksijeni etkinleştirebilen (Peak 1987, Tyrrell 2000) porfirin , triptofan ve riboflavin gibi bazı küçük molekülleri aktive ederek (Krasnovsky 1979, Peak 1984), reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu ile uyarılmış olan hücrelerde oksidatif strese neden olmaktadır. ROS, DNA molekülüne atak yapar ve DNA'nın yapısında timin glikol ve 8-hidroksiguanin (8OH-G) gibi oksidatif baz hasarları oluşturabildiği gibi DNA zincir kırıkları yapabilmektedir (Kielbassa ve ark. 1997, Kino ve Sugiyama 2005). Ayrıca, ROS DNA replikasyonu için nükleotid öncül maddeleri olarak kullanılabilen ve 8-hidroksideoksiganosin-trifosfat (8OH-dGTP) gibi oksitlenmiş nükleotidleri üretebilen (Sekiguchi ve Tsuzuki 2002), hücrel nükleotid havuzlarına atak yapabilir. Oksidatif DNA ve nükleotid hasarlarının bazılarının mutajenik etki gösterdiği bilinmemektedir (Grollman ve Moriya 1993, Kino ve Sugiyama 2005). Bu nedenden dolayı; UV ışığı dolaylı bir mekanizma yoluyla genom yapısında oksidatif kaynaklı mutasyonlara neden olabilmektedir.

UV, dipirimidin bölgelerinde sitozin (C) → timin (T) nükleotitlerinin değişimini ve çok düşük seviyede meydana gelmesine rağmen CC → TT baz değişimi gibi özelleşmiş mutasyonlara da neden olabilmektedir. Ayrıca bu iki tip mutasyon ayrıca UV signatürü olarak da adlandırılır (Brash ve ark.1991) ve bu mutasyonların algılanmaları UV'ye maruz kaldıktan sonra meydana gelmektedir. Bu şekilde oluşan UV mutasyon oluşum mekanizmalarının siklobütan pirimidin dimerinde, sitozin bazlarının deaminasyonu ile ilgili olduğu düşünülmektedir (Tessman ve Kennedy 1991, Tessman, Liu ve Kennedy 1992).

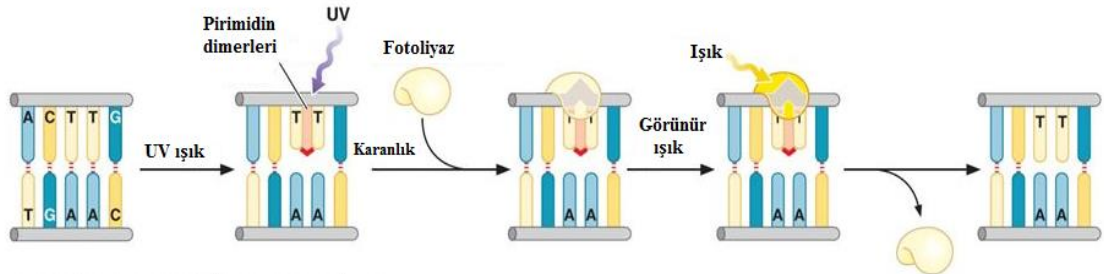
İnsan hücreleri UV ile indüklenmiş dipirimidin DNA fotoürünlerini uzaklaştıran nükleotid eksizyon tamir mekanizması (NER) adı verilen bir tek mekanizmaya sahipken, bakteri, bakteriofaj ve bazı ökaryotik virüsler gibi basit organizmalarda UV ile indüklenen dipirimidin onarılması fotoreaktivasyon (fotoreversal), nükleotid ve baz eksizyon tamir mekanizması olmak üzere 3 farklı mekanizmaya sahiptir (Llyod 2005).

## 2.10.2.Tamir Mekanizmaları

### 2.10.2.1.Fotoreaktivasyon (Fotoreversal) Tamir Mekanizması

UV ışını kaynaklı oluşan siklobütan pirimidin dimerleri ve 6-4 fotoürünlerin uzaklaştırılması fotoreaktivasyonda kullanılan fotoliyaz enzimleri tarafından gerçekleştirilmektedir. Fotoreaktivasyon ile yapılan onarım sistemi bakterilerde, mantarlarda, bitkilerde ve birçok omurgalı canlıda bulunmasına rağmen, insan da dahil pek çok ökaryotik canlıda bulunmamasından kaynaklı evrensel olan bir onarım sistemi değildir (Anonim, 2018). UV ile meydana gelen mutasyonları bulunduran hücreler mavi spektrum denilen (300-500 nm) görünür ışığa maruz kaldıklarında, geriye dönüşüm yapıp ,oluşan hasar düzeltilebilmektedir. 1949 yılında Kellner, UV ile ışınlanmış olan bakterilerin hayatta kalmasının, ışlandıktan sonra yoğun bir mavi ışık spektrumuna maruz bırakılmasıyla büyük oranda onarımın arttırılabildiğini gözlemlemiştir (Kellner,1949).

Karanlık ortamda, fotoliyaz enzimi spesifik olarak Ultraviöle ile ışınlanmış olan DNA molekülünde oluşan timin dimerleri üzerinde enzim-substrat kompleksi oluşturmak amacıyla bağlanır. Bu oluşturulan kompleks 320-410 nm aralığında ışığın absorpsiyonu ile aktive edilmektedir. Pirimidin dimerleri monomerik pirimidinlere dönüştürülmekte ve enzim serbest bırakılmaktadır (Anonim 2008a), (Şekil 2.11) Belirli deneysel şartların oluşturulması ile, 254 nm dalga boyunda UV radyasyonun düşük ışınımlarıyla birlikte bakterilerde oluşan letal hasarın %80 kadarı fotoreaktivlenebilmektedir (Setlow 1966).



Şekil 2. 11. Fotoreaktivasyon (fotoreversal) tamir mekanizması (Anonim 2008a).

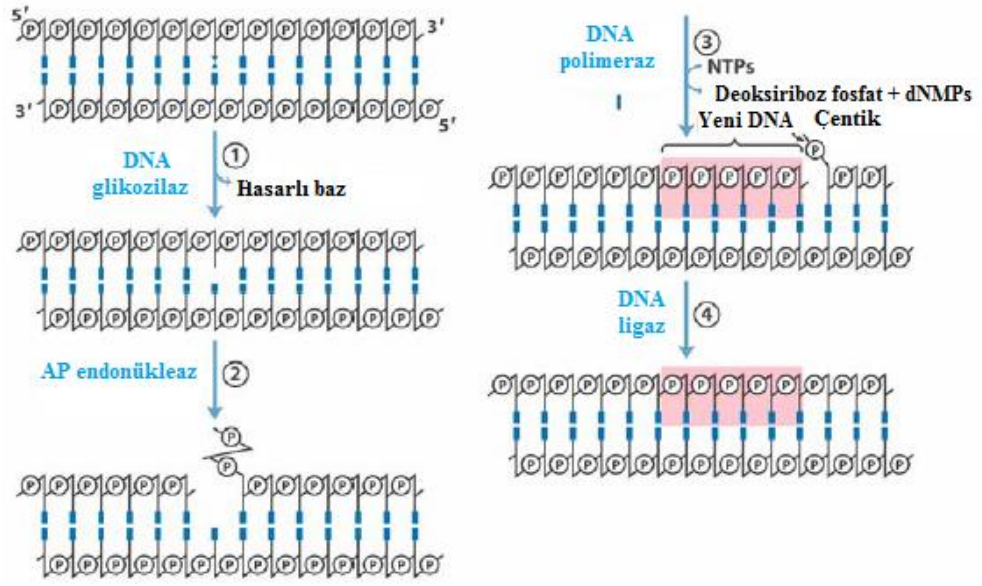
### **2.10.2.2. Eksizyon Tamir mekanizmaları**

Işıktan bağımsız olarak gerçekleşen tamir mekanizmaları fotoreaktivasyonun aksine daha çok komplekstir. Bu mekanizmalar, DNA'nın yapısında oluşan hasarı doğrudan onaramaz ve bunun yerine hasarlı bölgede bulunan nükleotidleri, hasarsız yeni nükleotidlerle değiştirir (Prakash 1993, Seeberg 1995, Britt 1996, Lindahl ve Wood 1999). Eksizyon tamir mekanizmasının baz eksizyon ve nükleotid eksizyon tamir mekanizması olmak üzere iki ana tamir yolu vardır.

#### **2.10.2.2.1. Baz Eksizyon Tamir Mekanizması**

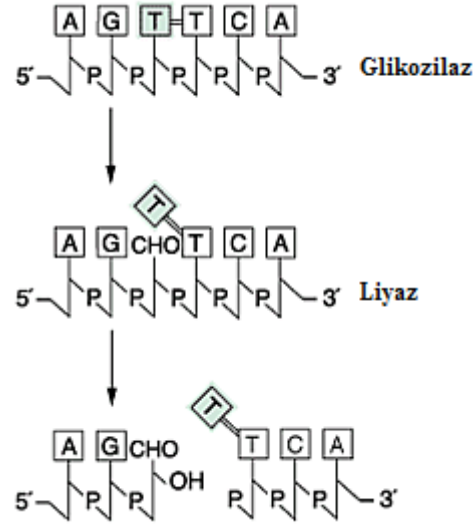
Alkilasyon, deaminasyon, oksidasyonun ve DNA replikasyon hatalarının neden olduğu küçük DNA modifikasyonları için önemli DNA tamir mekanizmalarından birisi olan Baz eksizyon ile tamir edilmektedir. Baz eksizyon tamir mekanizması DNA glikozilaz, AP endonükleaz ya da AP DNA liyaz, DNA polimeraz ve DNA ligazı içeren enzimlerin fonksiyonunu gerektirmektedir.

Baz eksizyon tamir mekanizması yoluna katılan en önemli enzimler baz ve nükleotid rezidülerinin 2-deoksiriboz bölgeleri arasında bulunan N-glikosidik bağları koparılmasını sağlayarak, modifiye ya da hasarlı bazların farklı tiplerinin uzaklaştırılmasını sağlayan DNA glikosilazlardır. Hasarlı olan baz uzaklaştırıldıktan sonra, apürinik/apirimidinik (AP) bir bölge oluşur ve bu bölge DNA ipliğinin 5' veya 3' ucunda çentikler açılmasına yol açan AP endonükleaz ya da AP liyaz tarafından uzaklaştırılır. Geriye kalan deoksiriboz fosfat rezidü fosfodiesteraz enzimi tarafından kaldırılır;bu ortadan kaldırılmayla oluşan bu boşluk DNA polimeraz enzimi tarafından doldurulur. DNA ligaz enzimi iplikleri birleştirir (Sakumi ve Sekiguchi 1990, Seeberg ve ark.1995), (Anonim 2005), (Şekil 2.12).



**Şekil 2. 12.** Baz eksizyon tamir mekanizması (Anonim 2005)

Birçok DNA glikozilazlara ek olarak, bazı organizmalar daha çok pirimidin dimer oluşumlarının bulunduğu bölgede, zincir kırıklarına neden olan ve UV-endonükleaz olarak bilinen enzimler içermektedirler. UV endonükleazlar, dimeri 5'-pirimidin N-glikosidik bağından ayırır ve bu durumu AP liyazın zincirden ayrılması takip eder (Anonim 2016) (Şekil 2.13). Bu enzimin yapısı X-ışını kristalografik yöntem ile resmedilmiş olup (Morikawa ve ark. 1995) ve reaksiyonun mekanizma yapısı bölge hedefli mutagenез deneyleri ile açıklanmıştır (Dodson ve ark. 1993). Bu enzimler normalde sadece *Micrococcus luteus* gibi UV ışınına karşı dirençli olabilen organizmalarda bulunur (Dodson ve ark. 1994). Bununla birlikte, benzer bir enzim bakteriyofaj T4'ün *denV* geni tarafından kodlanmış olup ve bu duruma benzer bir aktivite *S. cerevisiae*'de de saptanmıştır (Hamilton ve ark. 1992).

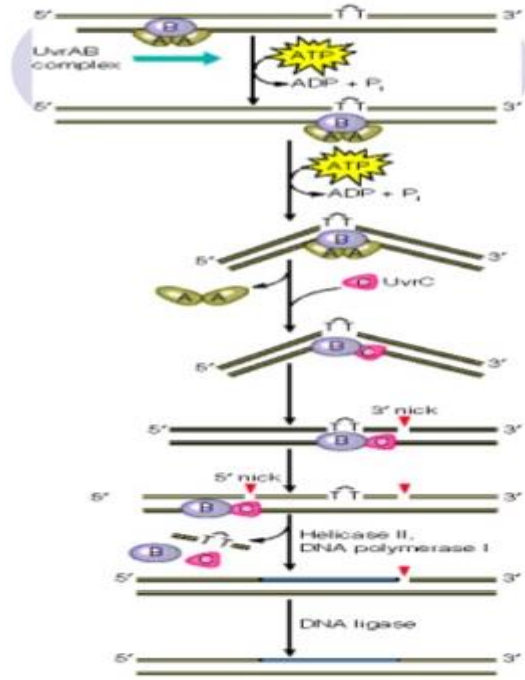


**Şekil 2. 13.** Timin dimerinin T4 fajına özgü baz eksizyon tamir mekanizması (Anonim 2016)

#### 2.10.2.2.2. Nükleotid Eksizyon Tamir Mekanizması

Nükleotid eksizyon tamir mekanizması, çift zincir olarak bulunan DNA'nın normal heliks yapısını bozabilen, UV ile indüklenmiş olan pirimidin dimerlerini ya da çoğunlukla mutajen etki gösteren kimyasalların ve kemoterapötik ajanların oluşturmuş olduğu DNA eklentilerinden kaynaklanan hasarların onarımını yapmaktadır .

Nükleotid eksizyon tamir mekanizmasında, hasarlı olan bazlar oligonükleotid olarak kesilip çıkartılmaktadır. Bu işlem "ekzinükleaz" adı verilen enzim kompleksi tarafından gerçekleştirilmektedir. Trimetrik protein (UvrA2 + UvrB)+ ATP tarafından DNA taranmaktadır. UvrA2 DNA'daki hasarı algılayıp, uzaklaştırmaktadır. UvrB DNA'nın tek ipliğinde kabarcık oluşturmak suretiyle DNA'yı bükmektedir. Daha sonra UvrC bağlanıp, UvrB-UvrC kompleksi oluşturulur. UvrC oluşun hasarın 3' ucuna 4 ya da 5 bazlık, 5' ucuna 8 bazlık kadar olan uzaklıktan çentikler açmaktadır. DNA helikaz ise (UvrD) bu 12–13 bazlık parçayı uzaklaştırmaktadır. DNA polimeraz I UvrB'yi uzaklaştırılmasını sağlayıp, boşlukları doldurmakta ve zincir ligazla kapatılmaktadır (Şekil 2.14), (Anonim 2005).

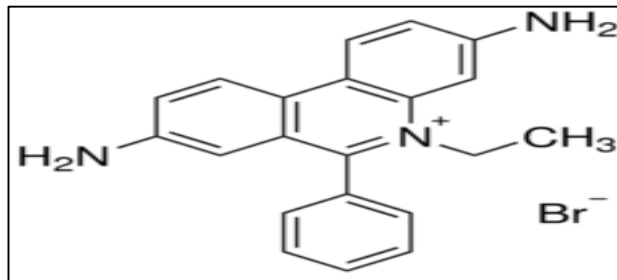


**Şekil 2. 14.** Nükleotid eksizyon tamir mekanizması (Anonim 2005)

## 2.11. Etidyum Bromid (EtBr) ile Mutasyon ve Tamir Mekanizması

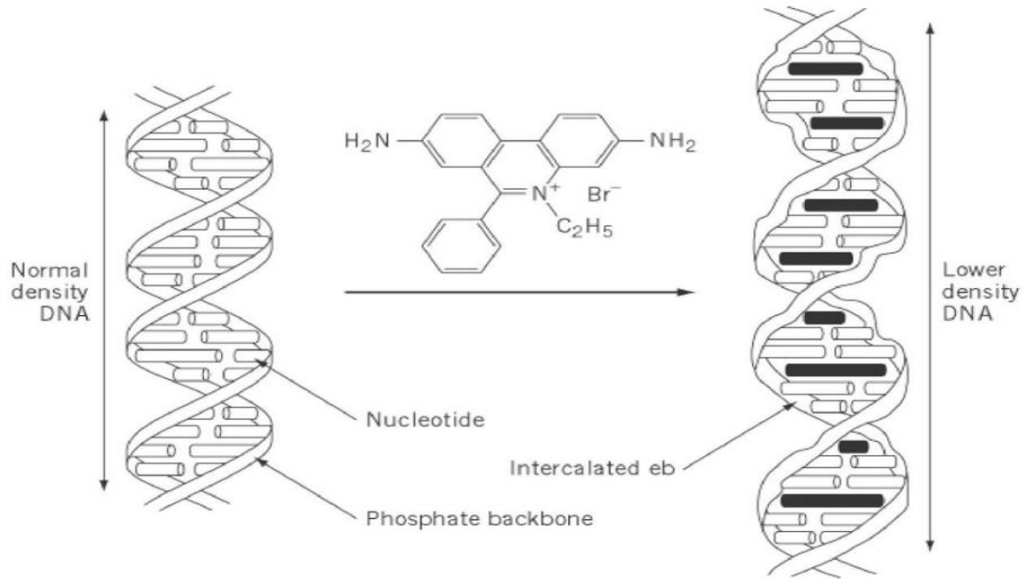
### 2.11.1. Etidyum Bromid (EtBr) ile Mutasyon (Çerçeve Kayması Mutasyonu)

Etidyum Bromid, (Phenanthridinium, 3,8-diamino-5-ethyl-6-phenyl-, bromide 2,7-Diamino-10-ethyl-9-phenylphenanthridinium bromide, Homidium bromide) şeklinde bilinen bir kimyasal mutajendir (Şekil 2.15). Kapalı formülü “C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>” şeklinde bilinmektedir. Moleküler Ağırlığı: 394.4 mol/gr’ dır. Etidyum bromürün maruziyet yolları inhalasyon, yutma ve cilt emilimidir. Etidyum bromid genotoksik, potansiyel bir çerçeve-kayması mutajeni ve teratojenidir (Anonim 2015).



**Şekil 2. 15.** Etidyum bromid’in kimyasal yapısı (Anonim 2015)

İnterkalasyon ajanlardan proflavin ve etidiyum bromid güçlü kansorejen ve tetrajen ajanlar olarak bilinmektedir. İnterkalasyon; düzlemsel bir halka sistemine sahip olan bazı maddelerin DNA baz çiftleri arasına yerleşerek, güçlü bir şekilde bağlanması olayıdır. Maddenin yapısına bağlı olarak, bu etkileşim dönüşümlü ya da dönüşümsüz şekilde gerçekleşmektedir. İnterkalasyon, DNA' da zincir kırılmasına yol açarak ve DNA senteziyle DNA'ya bağımlı RNA sentezini bozmaktadır. Etidyum Bromid, çift zincirli DNA'nın istiflenmiş baz çiftleriyle etkileşime girebilen trisiklik fenantridin halka sistemini içermektedir. Etidyum, baz çiftleri ile yakın van der Waals kontakları oluşturabilir ve DNA molekülünün hidrofobik iç kısmına bağlanabilir. Periferal fenil ve etil grupları, DNA sarmalının ana oluğuna doğru uzanmaktadır (Bütiner,2006). Düşük dansiteli DNA oluşumuna neden olmaktadır, ardışık baz çiftlerinin aralıklarını arttırmakta, düzenli fosfat omurgasını bozmakta ve sarmalın eğimini azalmaktadır (Şekil 2.16).



**Şekil 2. 16.** Etidyum bromidin DNA çift sarmalının interkalasyonu

Mutajenik interkalasyon ajan olan Etidyum bromid DNA replikasyonu sırasında çerçeve kaymasına (Frameshift mutasyon) sebep olabilir. Çerçeve kayması mutasyonu,  $(3n \pm 1)$  nükleotitlerin eklenmesi veya silinmesinden ( $n$ 'nin bir tam sayı olduğu varsayılarak)



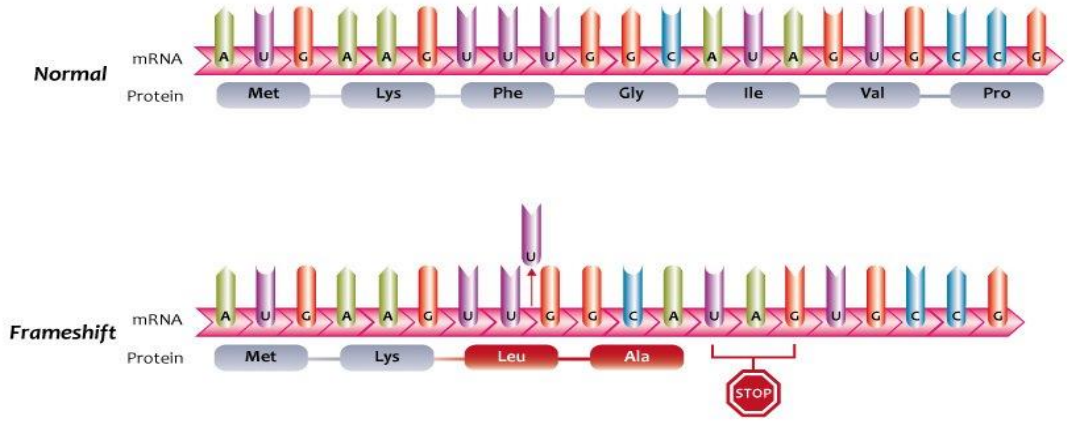
kaynaklanan bir tür mutasyon türüdür. Üçün katları olmayan nükleotidlerin eklenmesi veya silinmesi, genin üçlü okuma çerçevesini bozar.

Teknik olarak tanımlanmış bir çerçeve kayması mutasyonu genin kodlama kısmı içindedir, ancak terim birkaç bazın herhangi bir sokulması veya silinmesi için yaygın olarak kullanılır. Çerçeve kayması mutasyonları ilk olarak Crick ve arkadaşları (1958 ) tarafından bu mutasyon türünü genetik kodun üçlü doğasını çözmek için kullanmışlardır. Nokta mutasyonları sadece bir (veya hiç) amino asidi değiştirmemekle birlikte (missesens mutasyon), çerçeve kaymaları, translasyon sırasında anlamsız kodon ile karşılaşılıncaya kadar polipeptit zinciri sonlandırılıncaya kadar mutasyonun hemen hemen tüm amino asitlerini değiştirirler.

Çerçeve kayması mutasyonları, okuma çerçevesini bozan bir genin kodlama bölgesi içinde meydana gelen baz insersiyonları veya delesyonlarıdır. Böylelikle insersiyon veya delesyon ile üçlü kodonlar değiştirilir (Şekil 2.17), (Benzer, 1958)

DNA molekülünün bir zincirindeki bir dizi bazın, diğer zincirde yanlış fakat tamamlayıcı bir kodon ile eşleştirilmesi yolu ile tekrarlayan baz veya baz çiftlerinin bulunduğu bir bölgede meydana gelmektedir (Streisinger ve ark, 1966).

Birçok durumda, insersiyonlar veya delesyonlar, ürünü kesen çerçeve içi sonlandırma dizilerinin ortaya çıkmasına neden olur. Çerçeve kayması mutasyonları, protein ürünlerinde sessiz ya da konservatif değişiklikler ile sonuçlanan baz değişikliklerinin genelinden daha şiddetli fenotipik etkilere yol açabilir. Nükleik asit seviyesinde ise kod kaymaları, kodlama bölgelerinin değişimi ile sonuçlanmaktadır.



Adapted from Campbell NA (ed). Biology, 2nd ed, 1990.

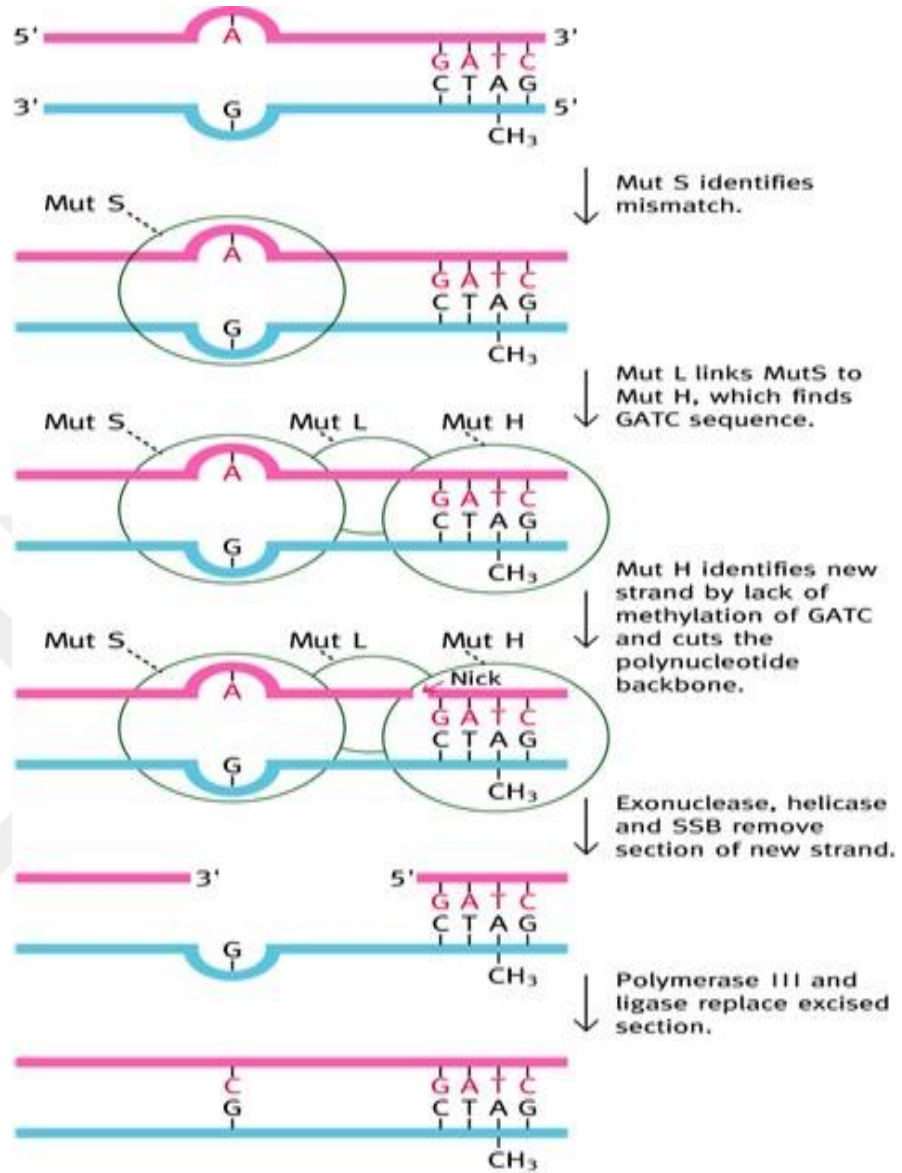
**Şekil 2. 17.** Çerçeve Kayması Mutasyonu (Campbell,1990).

## 2.11.2. Tamir Mekanizması

### 2.11.2.1.Mismatch (Hatalı Eşleşme) Tamiri

DNA mismatch onarımı, DNA replikasyonu ve rekombinasyon sırasında bazların hatalı insersiyonu, delesyonu ve yanlış yerleşimini tanımlayan ve bunları onaran bir sistemdir (Bütiner, 2006).

DNA üzerinde GATC dizileri defalarca tekrar etmektedir. Bu dizide bulunan olduğundan karşı yeni zincirdeki GATC’de metillenme eğilimindedir. Fakat bu yeni zincirdeki dizi metilleninceye kadar zaman geçer, bu zaman içinde hata bulunur ve tamir edilir. Bu onarımda 4 protein görev yapar. Mut S, Mut L, Mut H ve Mut U’ dur. Mut S, hatayı arar ve hatayı içeren DNA’ yı kuşatır. Mut L, Mut H’ yi aktive eder. Mut H, kırık oluşumunu sağlar. Mut U, görevi bilinmemektedir ancak DNA helikaz II’ nin kesip çıkarma işleminde yardımcı olduğu ifade edilmektedir. Mut S, DNA’ daki uyumsuzluğu tanır ve ona bağlanır. Bu tamiri başlatır. Mut H ve Mut L’ den oluşan kompleks metillenmemiş (nonmetille) zincirde kırık oluşturur. Bir ekzonükleaz metillenmiş bölge ile hatalı bölge arasındaki nükleotitleri uzaklaştırır. Kesme işlemi boyunca DNA pol III enzimi metillenmiş zinciri kalıp olarak kullanarak aktivite gösterir ve DNA, ligaz enzimi ile bağlanma işlemini yerine getirerek boşluklar doldurulmuş olur ve tamir işlemi biter (Şekil 2.18).



Şekil 2. 18. Missmatch (Hatalı Eşleşme) Tamiri (Anonim,2017)

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

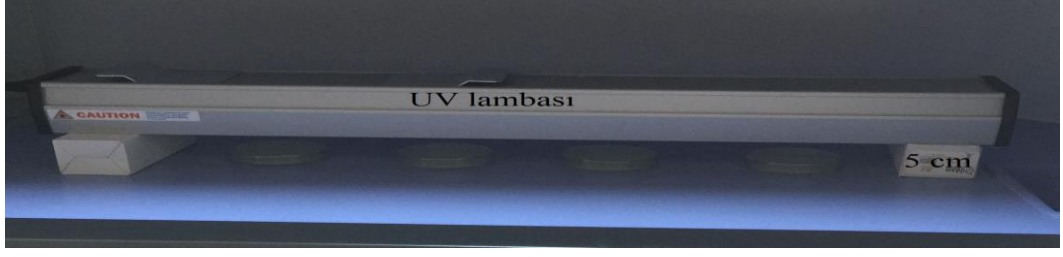
#### 3.1. Materyal

Uludağ Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Laboratuvar'ında daha önceden proteaz enzimi üretimi için topraktan izole edilmiş ve adlandırılmış olan *Bacillus subtilis* E6-5 şusu kullanılmıştır.

#### 3.2. Yöntem

##### 3.2.1. Fiziksel Mutajen UV İle Yapılan Mutasyon Çalışması

UV ile yapılan denemeler, Ultraviyole lambası (UltraViole 254 nm, Intensity ( $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ) 60, Lamba- VL-130.G, 1x30W Germination Lamp, Vilber) kullanılarak yapılmıştır (Şekil 3.1). Kültür saklama ortamından alınan bakteri kültürü 18 saat süre ile önkübasyona tabii tutulmuştur. Bu süre sonunda % 0.85'lik steril fizyolojik tuzlu su (FTS) ile uygun dilüsyonlar kullanılarak katı besiyeri içeren petrilere yayma yöntemi ile ekim yapılmıştır. Bakterilerin üreme ortamına adaptasyonu için petriler belirli sürelerde (6, 8 ve 10 saat) inkübatörde bekletilmiştir. Her bir sürenin sonunda petri kaplarının kapakları açılarak farklı zaman aralıklarında ( 5, 10, 15 ve 20 dakikalarda) UV ışınları besiyeri yüzeyindeki bakterilere direkt olarak uygulanmıştır. UV lambasının besiyeri üzerine olan uzaklığı her bir deneme için 5, 10 ve 15 cm olarak seçilmiştir. UV mutasyonu sırasında fotoreaktivasyonun önlenmesi amacıyla UV çalışmaları karanlıkta yapılmıştır ve tüm petriler karanlık odada bulunan inkübatörde 48 saat süre ile inkübasyona tabii tutulmuştur. İnkübasyon sonucunda canlılık gösteren koloniler mutant olarak seçilmiştir. Her bir deneme için 2 paralel çalışma yapılmıştır. Elde edilen mutanların proteaz aktiviteleri kalitatif olarak skim milk içeren agarlı ortamda zon çapları cetvel ile mm olarak ölçülerek saptanmıştır. En geniş proteaz zonu gösteren bir adet mutant suş seçilip ve diğer çalışmalarda kullanılmıştır.



**Şekil 3.1.** UV mutasyonu oluşturma düzeneği

### **3.2.2. Kimyasal Mutajen EtBr (Etidyum Bromid) İle Yapılan Mutasyon Çalışması**

EB denemeleri için kullanılan kimyasal madde Sigma firmasının E7637-1G katalog numaralı ürünü toz halinde satın alınmıştır.

% 99 ölüm oranı veren EtBr konsantrasyonunu saptayabilmek üzere 10-500 mg/mL arası ve 0,005-0,1 µg/ml arası, 0.05-1 pg/ml arası EtBr konsantrasyonları kullanılmıştır. Ölüm oranı aşağıdaki formül ile saptanmıştır (Pellzor, 1965).

% Ölüm oranı :  $\text{Kontroldeki koloni sayısı} / \text{Mutasyon uygulaması sonrası koloni sayısı}$

EtBr mutajeni bakterilerin 24 saatlik kültüründen % 1 aşılmanın olduğu devrede üreme ortamına katılmıştır ve bakteriler EtBr' li ortamda 37° C'de, 150 rpm çalkalama hızına sahip inkübatörde 18 saat boyunca üretilmiştir. Her iki saatte bir bakteri örnekleri alınmıştır. Üretim sonucunda örnekler santrifüjlenmiş (6000 rpm'de 10 dak.) ve hücrelerin bulunduğu pelet kısmından EtBr' nin uzaklaştırılması için pelet steril 0.04 M Na-fosfat tamponu (pH 7.0) ile yıkanmıştır ve % 0,85' lik steril FTS ile uygun dilüsyonlar hazırlanarak yağsız süt tozu içeren agarlı petri kaplarına ekilmiştir (Çizelge 3.1). Petriler 37°C' de 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda koloni etrafında zon oluşturan bakteriler proteaz pozitif olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen mutanların proteaz aktiviteleri kalitatif olarak yağsız süt tozu içeren agarlı ortamda zon çapları cetvel ile mm olarak ölçülerek saptanmıştır. Ana suş (kontrol)'a göre en geniş proteaz zonu gösteren bir adet mutant suş seçilmiş ve diğer çalışmalarda kullanılmıştır. Her bir deneme için 2 paralel çalışma yapılmıştır.

### 3.2.3. Bakteri Üretiminde Kullanılan Besiyerleri ve Bakteri Üretim Koşulları

Çalışmada mutant bakterilerin saklanması (kültür saklama), geliştirilmesi (öninkübasyon) ve enzim üretim kapasitelerinin ölçülmesinde farklı içerikli besiyerleri kullanılmıştır. Tüm besiyerleri pH'ları 7.0 derecesine ayarlandıktan sonra 120° C'de 15 dk süre ile otoklav cihazında sterilize edilmiştir. Çalışmada kantitatif olarak proteaz enzim aktivitesini belirlemek üzere Çizelge 3.1'deki besi yeri kullanılmıştır (Qadar ve ark. 2009).

Kültür saklama ortamından (Çizelge 3.1) alınan bakteri kültürü 18 saat boyunca ön inkübasyona (Çizelge 3.1) tabii tutulmuş olup, bu süre sonunda bakteri kültürlerinin 600 nm'deki optik yoğunlukları (OD) spektrofotometre kullanılarak steril fizyolojik tuzlu su ile 0.3'e ayarlanmıştır. Bu yöntemle ayarlanan kültürden, içerisinde 150 ml enzim üretim ortamı bulunan 500 ml'lik erlenlere % 1 oranında aşılama yapılmıştır ve 37° C'de 150 devir/dk çalkalama hızına sahip inkübatörde 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. Bakteri üremesi ve enzim aktivite tayinleri 18, 24, 28, 30, 32, 40, 44, 48, 64, ve 72. saatlerde yapılarak bakterinin gelişim grafiği çıkarılmıştır. Böylece maksimum enzim üretim zamanı saptanmıştır.

**Çizelge 3.1.** Bakterilerin saklanması, geliştirilmesi ve enzim üretim kapasitelerinin ölçülmesinde kullanılan besiyerleri

Besiyeri İçeriği (% g)	Kültür Saklama Besiyeri (Sevinç 2010)	Bakteri Geliştirme Besiyeri (Sevinç 2010)	Enzim Üretim Besiyeri (Qadar ve ark. 2009)	Kalitatif Proteaz Tayin Besiyeri (Qadar ve ark. 2009)
Nutrient Broth	0.8	0.8	-	-
NaCl	0.8	-	-	0.5
Agar	2.0	-	-	2
Glukoz	-	-	0.1	-
Pepton	-	-	1.0	0.1
Maya Özütü	-	-	0.02	-
MgSO <sub>4</sub>	-	-	0.01	-
CaCl <sub>2</sub>	-	-	0.01	-
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	-	0.05	-
Skimmilk	-	-	-	1
pH	7.0	7.0	7.0	7.0

### 3.2.4. Bakteri Üremesinin ve Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

Bakteri üremesinin miktarı, 18 saat boyunca sıvı nütrient broth içeren besiyeri içerisinde 37°C sıcaklıkta ve 150 rpm çalkalama hızında üretilen bakterilerin besiyerlerinin bulanıklılığı spektrofotometrik olarak ölçülerek bulunmuştur. İnkübasyon ortamından alınacak olan örneklerin 600 nm dalga boyunda optik yoğunluk (OD) değerleri alınarak bakteri üreme miktarı belirlenmiştir.

Bakteriler 6000 rpm çalkalama hızında 10 dk. süre ile santrifüjlenerek, süpernatant enzim çözeltisi olarak kullanılmıştır. Proteaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla, substrat olarak %2' lik kazein çözeltisi hazırlanmıştır. 2 gram kazein ve 20 mL 0.1 M NaOH içerisinde tamamen çözülünceye kadar sürekli karıştırılarak ısıtılmıştır. Bu şekilde hazırlanan kazein çözeltisinin hacmi 0.05 M fosfat tamponu (pH 7.0) ile hacmi 100 mL'ye tamamlanmış olup ve pH'sı 1/3 oranında seyreltilmiş olan fosforik asit ile pH 7.0 olacak şekilde ayarlanmıştır.

Deneylede 1 adet kör tüp ve her bir enzim örneği için 1 adet örnek tüpü kullanılmıştır. Her bir örnek tüpüne 1'er mL substrat çözeltisi, kör tüpüne ise 2 mL Trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi aktarılmış ve tüpler 37°C sıcaklıkta olan su banyosunda 10 dakika süre ile bekletilerek reaksiyon sıcaklığına getirilmiştir. Daha sonraki adımda substrat içeren tüplere 1'er mL enzim çözeltisi, kör tüpe ise 1 mL sodyum-fosfat tamponu (pH 7.0) ilave edilerek 37°C sıcaklıkta 10 dakika süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda reaksiyon, örnek tüpler içerisine, reaksiyonu durdurabilmek amacıyla 2 mL 0.4 M TCA eklenmiştir ve kör tüpüne de 1 mL substrat eklenmiştir. Bu karışım, 37°C sıcaklıkta 20 dakika süre bekletildikten sonra oluşan pütürlü yapıyı gidermek amacıyla 6000 devir/dakika'da 10 dakika süre ile santrifüjlenerek süpernatant kısımdan alınan 1 mL'lik örneklere, 5 mL 0.4 M NaCO<sub>3</sub> ve 1 mL 1/3 oranında seyreltilmiş folin çözeltisi eklenmiştir, karışım vorteksleme işlemi yapıldıktan sonra 20 dakika süre ile oda sıcaklığında, karanlık bir ortamda bekletilmiştir. Bu süre sonunda çözeltinin optik yoğunluğu, enzim aktivitesinin belirlenmesi için 660 nm'de köre karşı okunmuştur.

Proteaz aktivitesi ölçümlerinde, standart eğri 0-60 µg/ml tirozin içeren çözeltiler ile hazırlanmıştır. Yönteme göre 1 µg/ml tirozin, 2 UI/mL enzim aktivitesine karşılık gelmektedir. Enzim aktivitesi standart koşullarda, 1µg/mL tirozin açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Keay ve Wildi 1970).

### **3.3. Enzim Üretimi Üzerine Besinsel Faktörlerin Etkisi**

Bu çalışmada, besinsel parametrelerin (karbon ve azot kaynakları, metal iyonları) proteaz üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Bakteri maksimum enzim üretiminin saptandığı saate kadar üretilmiştir ve bu saatlerde bakteri üremesi ve enzim aktivite deneyleri yapılmıştır. Üretim ortamında bulunan karbon, azot kaynakları ve metal iyonlarının yerine aynı oranlarda olmak üzere farklı karbon, azot ve metal kaynakları denenmiştir. Tüm deneyler 3 kez yapılmıştır ve ortalama değerler alınmıştır.

#### **3.3.1. Karbon (C) Kaynaklarının Etkisi**

Mikroorganizmaların üremelerinde karbon kaynaklarının önemi göz önüne alınarak farklı karbon kaynakları ile çalışılmıştır. Bu amaçla Çizelge 3.1’de içeriği verilen enzim üretim besiyerinde bulunan ve karbon kaynağı olarak kullanılan glikoz yerine, aynı oranda (% 0.1) gliserol, fruktoz, sükroz, buğday nişastası, mısır nişastası, patates nişastası, maltoz ve buğday kepeği kullanılarak proteaz enzimi üzerine etkileri araştırılmıştır. Bakterinin aşılama işlemi ve üretimi Çizelge 3.1’de belirtildiği gibi yapılmış olup ve belirlenmiş olan örneklerde üreme ve proteaz aktivite tayinleri yapılmıştır.

#### **3.3.2. Azot (N) Kaynaklarının Etkisi**

Azot kaynaklarının bakteri üreme kapasiteleri ve enzim üretimi üzerine olan etkilerinin araştırılması amacıyla çeşitli azot kaynaklarının, enzim üretimine olan etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla Çizelge 3.1’de içeriği verilen enzim üretim besiyerinde azot kaynağı olarak kullanılan pepton ve maya özütü çıkartılarak yerine aynı toplam oranında (%1.02) mısır ıslatma suyu (corn step-liquor), tripton, yağsız süt tozu



(skimmilk), ve et özütü (meat ekstrakt), maya özütü (yeast ekstrakt), inorganik azot kaynağı olarak ise  $KNO_3$ ,  $NH_4NO_3$ ,  $NaNO_3$ ,  $NH_4Cl$  ve  $(NH_4)_2SO_4$  kullanılmıştır ve proteaz enzimi aktivitesi üzerine etkisine bakılmıştır. Bakterinin aşılama işlemi ve üretimi Çizelge 3.1’de belirtildiği gibi yapılmıştır ve belirlenmiş olan örneklerde üreme ve proteaz aktivite tayinleri yapılmıştır.

### **3.3.3. Metal İyonu Kaynaklarının Etkisi**

Besiyerinde bulunan metal iyonlarının bakteri gelişmesi ve enzim aktivitesi üzerine etkisini araştırmak amacıyla, Çizelge 3.1’de içeriği verilen enzim üretim besiyerinde bulunan  $CaCl_2$  ve  $MgSO_4$  çıkarılarak yerine bunların toplam miktarlarında (% 0.02)  $MnSO_4$ ,  $MgSO_4$ ,  $CaCl_2$ ,  $LiSO_4$ ,  $FeSO_4$ ,  $KCl$  ve  $NaCl$  kullanılmıştır. Bakterinin üremesi ve proteaz aktivitesi üzerine etkisi üzerine tayinleri yapılmıştır.

## **3.4. Enzim Üretimi Üzerine Fiziksel Faktörlerin Etkisi**

### **3.4.1. Sıcaklık Etkisi**

Sıcaklığın bakteri üremesi ve proteaz üretimi üzerine etkisini belirlemek amacıyla, besi ortamının sıcaklığı 30, 37 (kontrol) 40 ve 50 °C gibi farklı derecelerde ayarlanmıştır ve proteaz üretimi için optimum sıcaklık değeri saptanmıştır.

### **3.4.2. pH Etkisi**

pH’nın bakteri üremesi ve proteaz üretimi üzerine etkisini belirlemek amacıyla, besi ortamının pH’sı 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 7.0 (Kontrol), 8.0 gibi farklı değerlerde ayarlanmıştır ve proteaz üretimi için optimum pH değeri saptanmıştır.

### **3.4.3. Havalandırmanın Etkisi (Çalkalama hızı)**

Havalandırmanın bakteri üremesi ve proteaz üretimi üzerine etkisini belirlemek amacıyla, inkübatörün çalkalanma hızının (devir/dakika) 0, 50, 100, 150 (kontrol) ve 200 rpm'e getirilmesi ile saptanmıştır.

### **3.4.4. İnokülasyon Miktarının Etkisi**

Bakteri üremesi ve proteaz üretimi üzerine inokülasyon miktarının etkisini belirlemek amacıyla, bakterinin optik yoğunluğu  $OD_{600} = 0.3$  olan öninkübasyon kültüründen % 0.5, % 1 (kontrol), % 2, % 3, % 4 olacak şekilde enzim üretim ortamına ekim yapılmıştır.

### **3.4.5. İnokülasyon Yaşının Etkisi**

Bakteri üremesi ve proteaz üretimi üzerine inokülasyon yaşının etkisini belirlemek amacıyla, 18 saat (kontrol), 1, 2 ve 3 gün olarak farklı inokülüm yaşları kullanılmıştır.

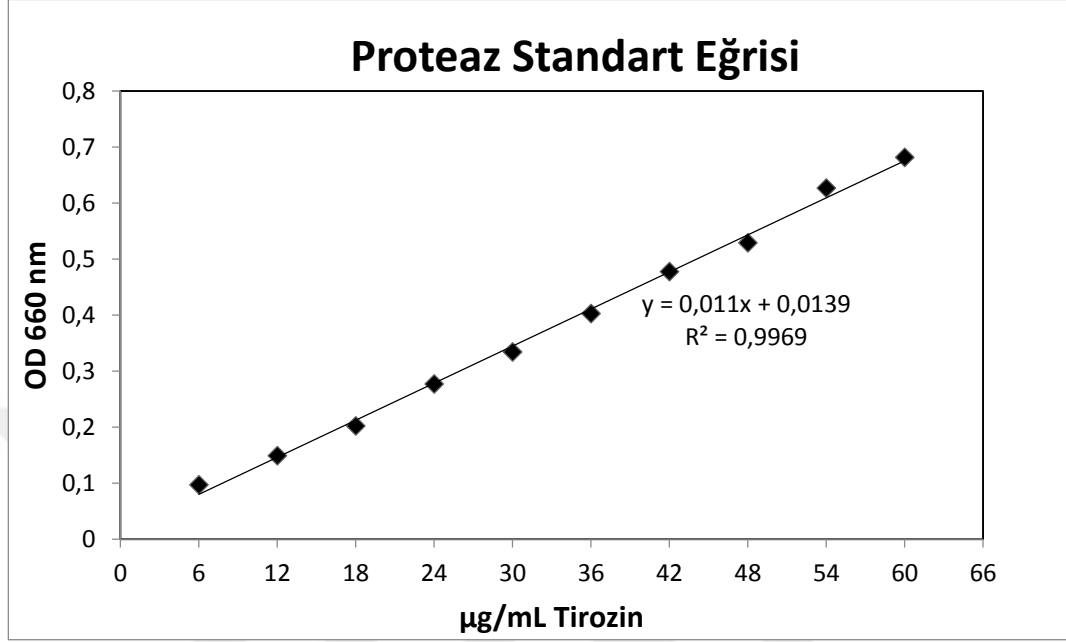
## **3.5. Optimum Olan Besinsel ve Fiziksel Koşulların Birleştirilmesi İle Modifiye Ortam Eldesi**

En yüksek enzim üretiminin görüldüğü besinsel ve fiziksel koşulların birleştirilmesi ile yeni oluşturulacak olan modifiye ortamda enzimin en yüksek aktivite veriminin sağlanması yoluna gidilecektir. Bakterinin üreme ve proteaz aktivite tayinleri yapılarak temel besiyerindeki verimi ile karşılaştırılması yapılmıştır.

## **3.6. Tirozin Standart Eğrisi Grafiği ve Hazırlanışı**

Enzim aktivitesinin hesaplanmasında, standart eğri için 0-60  $\mu\text{g/mL}$  tirozin çözeltileri hazırlanmıştır. Tirozin miktarı, daha önce tarif edildiği gibi spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Konsantrasyona karşı absorban grafiği lineer regresyon analiziyle çizilerek konsantrasyonu bilinmeyen örneğin tirozin konsantrasyonu, standart

grafiğinden elde edilen doğru denkleminin formülünden hesaplanmıştır (Şekil 3.2). Doğrunun denklemi  $y = 0,009x + 0,0161$  regresyon katsayısı  $R^2 = 0,9987$ 'dir.



Şekil 3.2. Tirozin standart grafiği

## 4. BULGULAR

### 4.1. Mutant Bakterilerin Elde Edilmesi

Mutant suşların elde edilmesi amacıyla bakterilerin besiyerine adaptasyon süreleri ve fiziksel mutajen UV'ye maruz kalma zaman aralıkları her bir deneme için sabit tutulmuş olup, UV ışığının petri yüzeyine olan uzaklığı farklılaştırarak çalışmalar yapılmıştır. Çalışmalar sonucunda, bakteriler UV ışığına maruz bırakılmadan önce besiyerine adaptasyonları için 6, 8 ve 10 saatlik petrielerde üretimleri sağlanmıştır. Her bir adaptasyon süresinin bakteri üzerinde olumlu etkisi görülmüştür. Fiziksel mutajen etkeni olan UV ışını ile yapılan çalışmalarda farklı zaman aralıkları (5, 10, 15 ve 20. dakikalarda) ve UV ışığının petri yüzeyine farklı uzaklıkları (5, 10 ve 15 cm olarak) seçilmiştir. Besiyerine adaptasyon süresinin 10. saatin mutasyona uğrayacak bakterilerin gelişimi için uygun olduğu saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda en iyi mutasyon oluşturma zaman aralığı farklılık gösterirken, en iyi uzaklık olarak 10 cm bulunmuştur.

Mutasyon çalışmaları her bir deneme için iki tekrarlı olarak yapılmış ve çizelge 4.1, 4.2 ve 4.3'de toplam koloni sayısı verilmiştir. Çizelgelerde en geniş proteaz zon çapına sahip mutantlar gösterilmiştir. *Bacillus subtilis* E6-5 şusu ile yapılan UV mutasyonu sonucu toplam olarak yaklaşık 150 mutant suş elde edilmiştir (Çizelge 4.1, 4.2 ve 4.3). Tüm çalışmalar sonucunda enzim üretimine sahip kolonilerin etrafında açık berrak zonlar cetvel ile ölçülmüş olup ve kontrol olan ana suşa yakın ve geniş zon gösteren koloniler seçilmiştir. Bu mutant suşların zon çapları ana suşun zon çapı (8 mm) ile karşılaştırılmış olup, zon çapı ana şustan büyük olan 3 adet mutant suş elde edilmiştir ve bu mutantlar EB3 (13 mm), EB4 (14 mm) ve EB7 (13 mm) olarak adlandırılmıştır (Şekil 4.1 ve 4.2). EB3 mutatinin UV 'ye maruz kalma koşulları 10 cm uzaklık ve 10 dakika ışınlama süresi ile elde edilirken, EB4 10 cm uzaklık ve 15 dakika ışınlama süresi ve EB7 15 cm uzaklık ve 15 dakika ışınlanma süresi ile elde edilmiştir. Her üç mutantın koloni zon çapları ve proteaz zon çapları farklı çıkmıştır (Çizelge 4.3). Ana suşun koloni zon çapı 4 mm iken elde edilen mutantların kolonilerinin daha küçük

boyutta olduğu saptanmıştır. Buna karşın mutantların proteaz zon çapların daha geniş olduğu görülmüştür.

**Çizelge 4. 1.** 5 cm uzaklıktan yapılan UV denemeleri sonucu elde edilen mutant suşların koloni ve proteaz zon çapları (Ana suş proteaz zon çapı 8 mm)

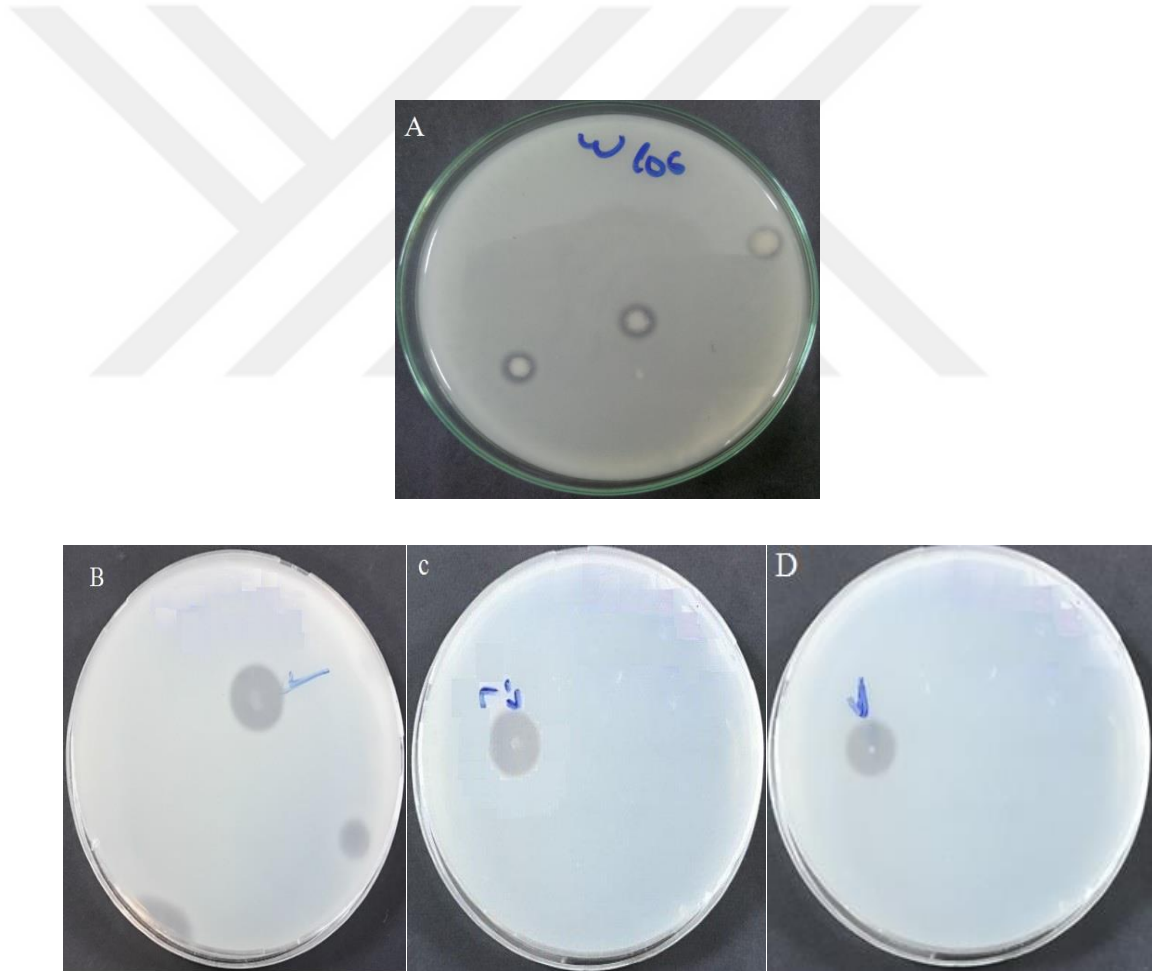
Adaptasyon Süresi									
6 Saat				8 Saat			10 Saat		
Zaman	Toplam Mutant Sayısı	Zon Çapı (mm)	Koloni Çapı (mm)	Toplam Mutant Sayısı	Zon Çapı (mm)	Koloni Çapı (mm)	Toplam Mutant Sayısı	Zon Çapı (mm)	Koloni Çapı (mm)
5 dk	>20	8	5	15	8	6	9	10	6
10 dk	18	6	4	10	7	5	8	8	6
15 dk	15	6	4	10	8	4	8	8	3
20 dk	Koloni Gözlenmedi			Koloni Gözlenmedi			Koloni Gözlenmedi		

**Çizelge 4. 2.** 10 cm uzaklıktan yapılan UV denemeleri sonucu elde edilen mutant suşların koloni ve proteaz zon çapları (Ana suş proteaz zon çapı 8 mm)

Adaptasyon Süresi									
6 Saat				8 Saat			10 Saat		
Zaman	Toplam Mutant Sayısı	Zon Çapı (mm)	Koloni Çapı (mm)	Toplam Mutant Sayısı	Zon Çapı (mm)	Koloni Çapı (mm)	Toplam Mutant Sayısı	Zon Çapı (mm)	Koloni Çapı (mm)
5 dk	15	10	2	15	10	2	11	13	3
10 dk	15	10	2	15	10	2	10	14	0,4
15 dk	15	11	2	15	10	3	5	13	3
20 dk	Koloni Gözlenmedi			Koloni Gözlenmedi			Koloni Gözlenmedi		

**Çizelge 4. 3.** 15 cm uzaklıktan yapılan UV denemeleri sonucu elde edilen mutant suşların koloni ve proteaz zon çapları (Ana suş proteaz zon çapı 8 mm)

Adaptasyon Süresi									
6 Saat				8 Saat			10 Saat		
Zaman	Toplam Mutant Sayısı	Zon Çapı (mm)	Koloni Çapı (mm)	Toplam Mutant Sayısı	Zon Çapı (mm)	Koloni Çapı (mm)	Toplam Mutant Sayısı	Zon Çapı (mm)	Koloni Çapı (mm)
5 dk	10	12	2	7	11	2	6	12	2
10 dk	10	12	2	6	10	1	6	13	2
15 dk	10	11	2	4	8	1	5	13	1
20 dk	Koloni Gözlenmedi			Koloni Gözlenmedi			Koloni Gözlenmedi		



**Şekil 4. 19.** Ana suş (A: 8mm) ve UV mutantları EB3 (B:13 mm), EB4 (C:14 mm) ve EB7 (D:13 mm)'nin yağsız süt tozlu ortamındaki proteaz zon çapları

UV ışığına bağlı mutasyon letal (ölüm) oranı aşağıdaki denkleme göre değerlendirilmiştir (Zong ve ark. 2011);

$$\text{Letal (ölüm) oran (\%)} = \frac{K - M}{K} \times 100$$

Bu formülde;

**K:** UV uygulanmayan ana suşun petrideki toplam koloni sayısı,

**M:** UV'den sonra mutant suşun petrideki toplam koloni sayısını temsil eder.

Çizelge 4.4'de ana suş ile mutantlar kıyaslandığında EB3 ve EB7'de %90 oranında ölüm saptanırken, EB4'te bu oran %94 olarak bulunmuştur.

**Çizelge 4. 4.** Bacillus subtilis E6-5'in hayatta kalma oranı üzerindeki UV radyasyonun etkisi

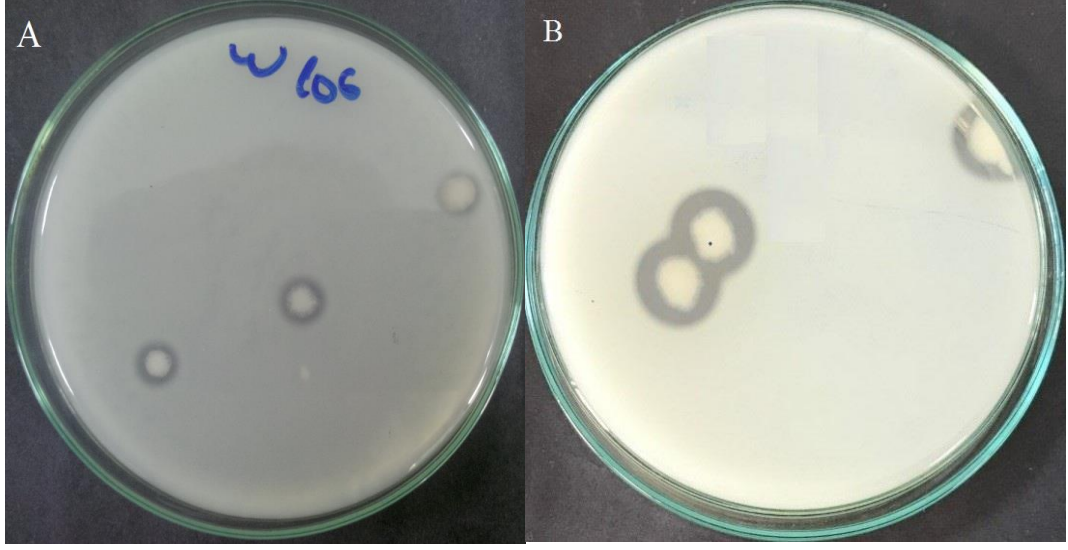
Bakteriler	Koloni Sayısı	Canlılık Oranı (%)	Ölüm Oranı (%)
Ana suş E6-5	50	100	0
EB3	5	10	90
EB4	3	6	94
EB7	5	10	90

Fiziksel mutasyondan elde edilen EB3, EB4, EB7 mutant suşlar EtBr ile kimyasal mutasyona tabii tutulmuştur. Mutant suşların elde edilmesi amacıyla kullanılan EtBr 10-500 mg/mL arası konsantrasyonlarının % 100 öldürücü doz olduğu belirlenmiştir. 0,005-0,1 µg/ml arasında konsantrasyon hazırlandığında üremeler tespit edilmiştir. EtBr'nin 0,015-07 µg/ml arası kullanılan konsantrasyonlarda zon çapları ana suşa göre daha geniş olan mutantlar elde edilmiştir (Çizelge 4.5). Elde edilen zon çapları 19-25 mm arasındadır. Bunlardan 25 mm ile en geniş proteaz zonu gösteren 0.5 µg/ml EtBr'den elde edilen mutant ATA38 olarak isimlendirilmiştir (Şekil 4.2). Çalışmalara bu suş ile devam edilmiştir.

**Çizelge 4. 5.** UV mutantlarına farklı EtBr konsantrasyonlarının mutajenik etkileri ile proteaz üretimlerinin kalitatif tespiti

EtBr Doz ( $\mu\text{g/ml}$ )	Mutant EB3			Mutant EB4			Mutant EB7		
	Toplam Koloni	Koloni Çapı (mm)	Zon Çapı (mm)	Toplam Koloni	Koloni Çapı (mm)	Zon Çapı (mm)	Toplam Koloni	Koloni Çapı (mm)	Zon Çapı (mm)
0,005	23	8	15	>25	8	16	20	8	16
0,015	20	5	19	20	5	16	25	5	14
0,5	25	6	19	10	9	<b>25</b>	20	6	14
0,7	20	4	16	9	6	9	20	6	12
0,1	20	5	15	15	5	5	20	5	15





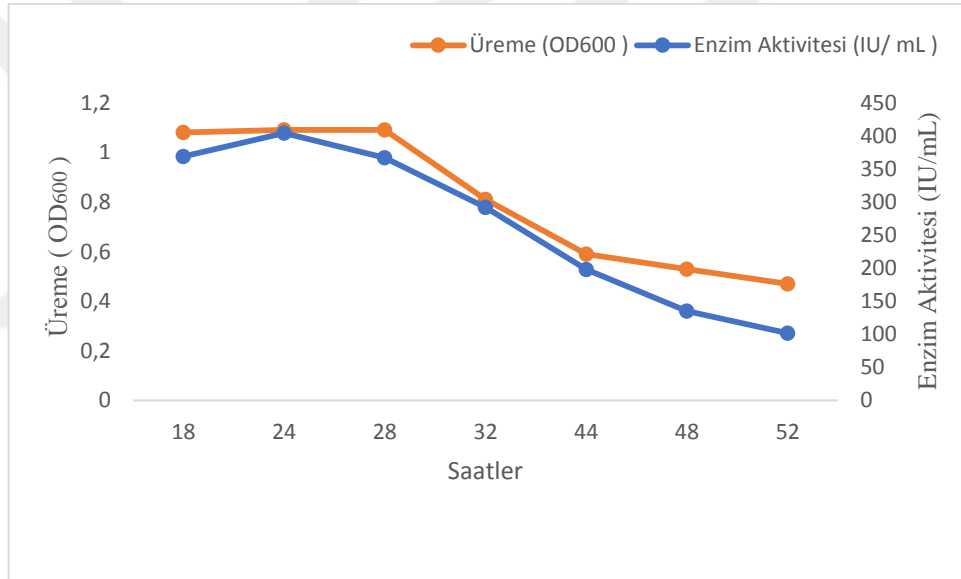
**Şekil 4. 20.** Ana suş (A: 8mm) ve EtBr mutanı ATA38 (B:25 mm)'in yağsız süt tozlu ortamındaki proteaz zon çapları

#### **4.2. Mutantın Kantitatif Proteaz Üretim Kapasitesinin Saptanması**

Yapılan ikili mutasyon denemeleri sonucunda elde edilen mutantın üreme eğrisi çıkarılmak üzere denemeye alınmıştır. Denemeye alınan bu mutant suş Çizelge 3.1'deki içeriği verilen besi ortamında 16-72 saatler arasında üretilmesi planlanmıştır. Ancak, yapılan çalışma sonucunda en yüksek enzim üretimi 24.saat sonunda elde edildiğinden ve bu saat sonrası aktivitede düşüş gözlemlendiğinden dolayı üremeye 52 saat boyunca devam edilmiştir. Ana suş için en yüksek enzim aktivitesi 32. saatte 60 IU/ml ve üreme  $OD_{600}$  0,29 olarak tespit edilirken, mutant ATA38 için en yüksek enzim aktivitesi 24. saatte 404 IU/mL ve üreme  $OD_{600}$  1,29 olarak saptanmıştır (Çizelge 4.6). Mutantta enzim veriminin ana suşa göre 6,7 kat arttığı tespit edilmiştir. Ana suş ve mutant suşların üremelerine bakıldığında üremenin enzim üretimi ile birlikte paralellik gösterdiği saptanmıştır. Maksimum enzim üretimi durağan fazda elde edilmiştir (Şekil 4.3).

**Çizelge 4.6.** Ana suş E6-5 ve mutant ATA38 suşunun proteaz üretim kapasitesi ve üreme değerlerinin zamana bağlı değişim değerleri

Saat	E6-5 Ana Suşu		Mutant ATA38	
	Enzim Aktivitesi (IU/ mL)	Üreme (OD <sub>600</sub> )	Enzim Aktivitesi (IU/ mL)	Üreme (OD <sub>600</sub> )
18	45	0,23	369	1,08
24	48	0,33	404	1,09
28	55	0,32	367	1,09
32	60	0,29	292	0,81
44	53	0,23	198	0,59
48	51	0,17	135	0,53
52	47	0,14	102	0,47



**Şekil 4. 21.** ATA38' in proteaz üretim kapasitesi ve üreme değerlerinin zamana bağlı değişimleri

### 4.3. Enzim Üretimi Üzerine Etki Eden Besinsel Faktörler

Bakterilerin buldukları ortama bağlı olarak enzim üretim kapasiteleri değişmektedir. Bu nedenden dolayı ortam şartlarının değiştirilmesi enzim üretim miktarına etki etmektedir. Enzim üretim besiyerindeki karbon (C), azot (N) ve metal iyonu kaynakları değiştirilmiş olup, değişen ortam şartlarının ATA38 mutant suşunun proteaz enzimi üretimi üzerine olan etkileri belirlenmiştir.

Yapılan çalışmalarda her deney 2 kez tekrarlanmış olup, grafik ve çizelgelerde ortalama değerler verilmiştir.

#### **4.3.1. Karbon Kaynaklarının Etkisi**

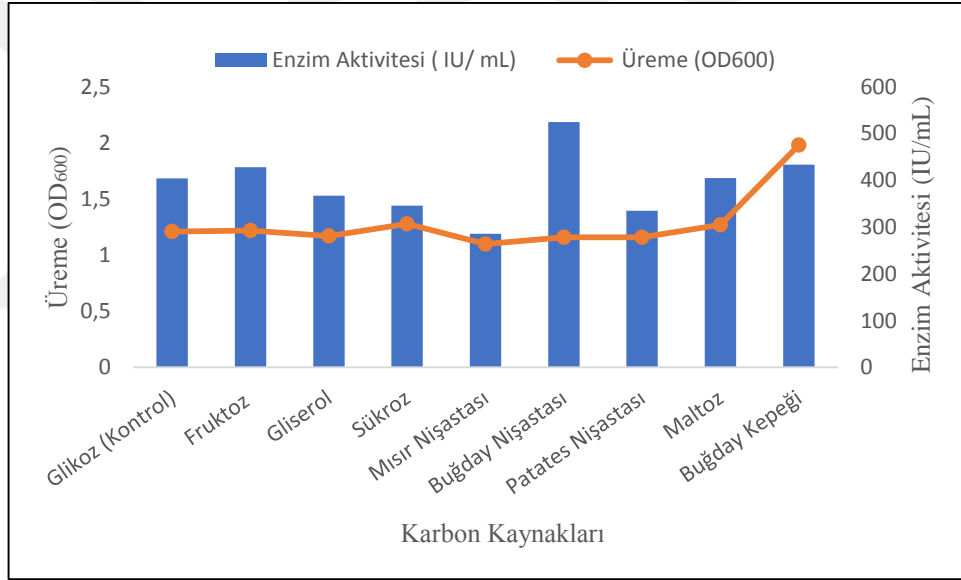
Üreme ortamında bulunan karbon kaynaklarının bakteri gelişmesi ve enzim üretimi üzerine etkilerini belirlemek amacıyla, Çizelge 3.1'de içeriği verilen besiyerindeki karbon kaynağı yerine aynı oranlarda (% 0,1) Fruktoz, Gliserol, Sükroz, Mısır nişastası, Buğday nişastası, Patates nişastası, Maltoz ve Buğday kepeği kullanılmıştır. Farklı karbon kaynağı içeren besiyerinde mutant suş 24 saat boyunca inkübe edilmiş ve 24. saatte alınan örneklerde proteaz aktivitesi ve üreme değeri tayinleri yapılmıştır (Çizelge 4.7.).

*Bacillus subtilis* ATA38 'in enzim üretimi açısından karbon kaynağı tercih sıralaması sırasıyla Buğday Nişastası > Buğday Kepeği > Fruktoz > Maltoz = Glukoz (Kontrol) > Gliserol > Sükroz > Patates Nişastası > Mısır Nişastası şeklinde belirlenmiştir. Maksimum bakteri üremesinin ise sırasıyla Buğday Kepeği > Sükroz > Maltoz > Fruktoz > Glukoz (Kontrol) > Gliserol > Buğday Nişastası > Patates Nişastası > Mısır Nişastası ortamlarında gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmada maksimum enzim üretiminin elde edildiği Buğday Nişastası olan ortamdaki enzim üretimi, Glukoz bulunan kontrol ortamına göre 1,29 kat artmıştır (Çizelge 4.7).

Mutant suş (525 IU/mL) Buğday Nişastası ortamında ana suşa (60 IU/mL) göre de 8,75 kat verim artışı göstermiştir.

**Çizelge 4. 7.** Farklı karbon kaynaklarının mutantın enzim üretimi ve üremesi üzerine etkileri

Karbon Kaynakları	Enzim Aktivitesi (IU/ mL)	Üreme (OD <sub>600</sub> )	Kat Artışı
Glukoz (Kontrol)	404	1,21	1
Fruktoz	428	1,22	1,05
Gliserol	367	1,17	0,9
Sükroz	346	1,28	0,85
Mısır Nişastası	286	1,1	0,7
<b>Buğday Nişastası</b>	<b>525</b>	<b>1,16</b>	<b>1,29</b>
Patates Nişastası	335	1,16	0,82
Maltoz	405	1,27	1
Buğday Kepeği	434	1,98	1,07



**Şekil 4.4.** Karbon kaynaklarının mutantın proteaz aktivitesi ve üreme kapasitesi üzerine etkileri

#### 4.3.2. Azot Kaynaklarının Etkisi

Azot kaynaklarının bakteri üremesi ve enzim aktivitesi üzerine etkilerinin araştırılması amacıyla kontrol ortamındaki pepton ve maya özütü (yeast ekstrakt) yerine sırasıyla; %1.02 oranında mısır ıslatma suyu (corn step-liquor), tripton, skimmilk (yağsız süt tozu), pepton, yeast ekstrakt ve meat ekstrakt (et özütü); inorganik azot kaynağı olarak da KNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, NaNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kullanılmıştır. Farklı azot kaynakları

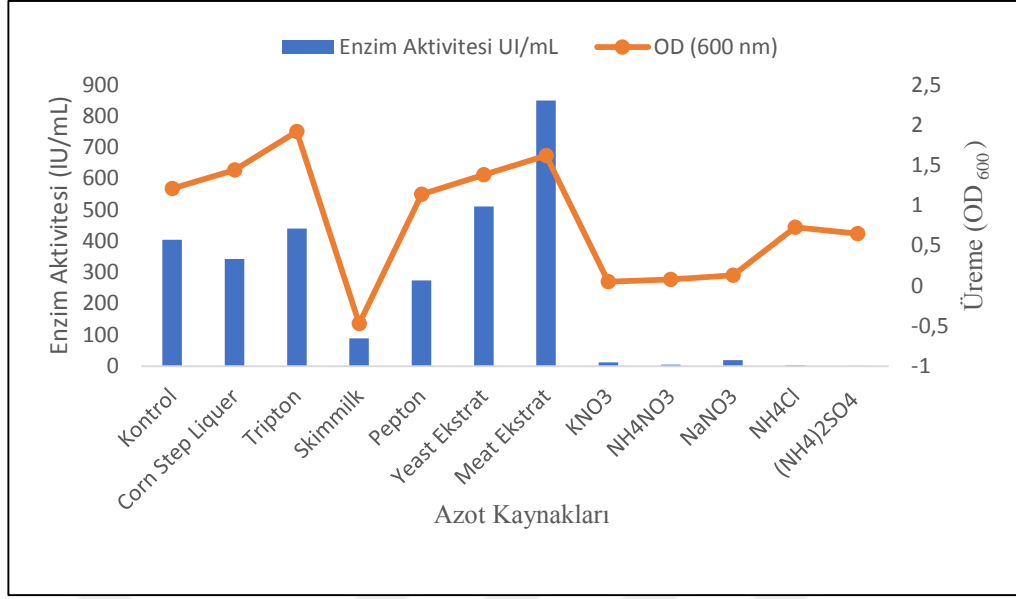
içeren besiyerlerinden 24. saatte alınan örneklerin üreme değerleri ve enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar grafik ve çizelge şeklinde verilerek, en yüksek enzim aktivitesinin meat ekstrakt (et özütü) varlığında olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.8, Şekil 4.5). *Bacillus subtilis* ATA38'in enzim aktivitesi açısından organik ve inorganik azot kaynağı sırası Meat Ekstrakt > Yeast Ekstrakt > Tripton > Kontrol (pepton ve yeast ekstrakt > Corn step liquer > Pepton > Skimmilk şeklindedir. Yapılan çalışmada en yüksek enzim üretiminin elde edildiği Meat Ekstrakt bulunan ortamdaki enzim üretimi, %1,02 oranında Pepton ve Yeast ekstrat bulunan kontrol ortamına göre 2,1 kat artmıştır (Çizelge 4.8).

Mutant suş (850 IU/mL) Meat Ekstrat ortamında ana suşa (60 IU/mL) göre de 14,1 kat verim artışı göstermiştir.

İnorganik azot kaynaklarının enzim üretimi üzerinde etkili olmadığı, buna karşın organik azot kaynaklarının yüksek etkiye sahip olduğu saptanmıştır.

**Çizelge 4.8.** Farklı azot kaynaklarının mutantın enzim üretimi ve üremesi üzerine etkileri

<b>Azot Kaynakları</b>	<b>Enzim Aktivitesi (UI/mL)</b>	<b>Üreme (OD<sub>600</sub>)</b>	<b>Kat Artışı</b>
Kontrol(Pepton+Yeast extract)	404	1,21	1
Corn Step Liquer	343	1,44	0,84
Tripton	440	1,92	1,08
Skimmilk	89	0,47	0,22
Pepton	274	1,14	0,67
Yeast Ekstrat	511	1,38	1,26
<b>Meat Ekstrat</b>	<b>850</b>	<b>1,62</b>	<b>2,1</b>
KNO <sub>3</sub>	12	0,05	0,02
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	5	0,08	0,01
NaNO <sub>3</sub>	19	0,13	0,04
NH <sub>4</sub> Cl	3	0,73	0,007
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	0,65	0,002



**Şekil 4.5.** Azot kaynaklarının mutanın proteaz aktivitesi ve üreme kapasitesi üzerine etkileri

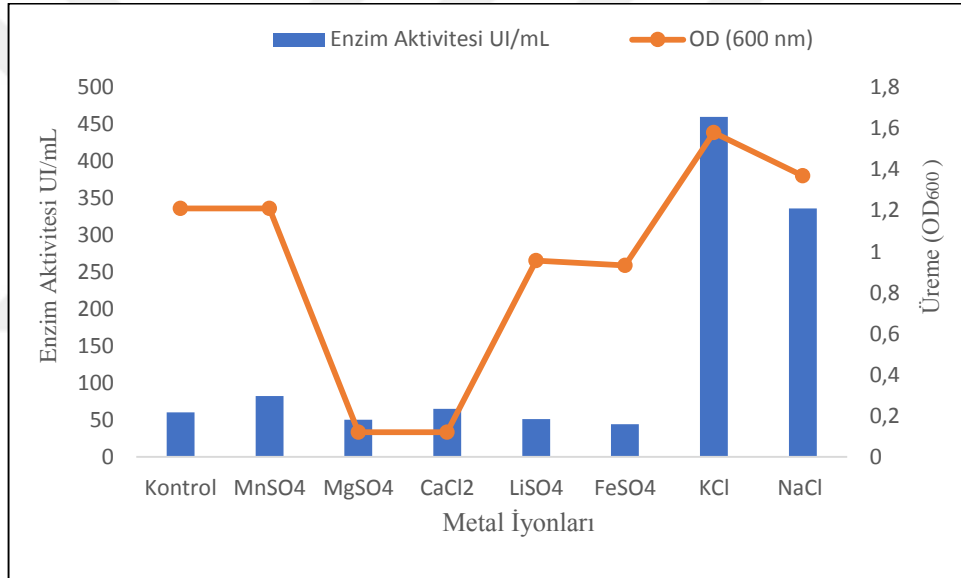
### 4.3.3. Metal İyonu Kaynaklarının Etkisi

Metal iyonlarının bakteri üremesi ve enzim üretimi üzerine etkisini araştırmak üzere yapılan çalışmalarda kontrol ortamındaki % 0,02 oranında kullanılan MgSO<sub>4</sub> + CaCl<sub>2</sub> yerine sırasıyla MnSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, LiSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, KCl ve NaCl kullanılmıştır. Farklı metal kaynakları içeren besiyerlerinden 24. saatte alınan örneklerde üreme değerleri ve enzim aktivite tayinleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.9 ve Şekil 4.6 de de görülebileceği gibi kontrole göre daha yüksek verimli aktivite değeri metal kaynağı KCl varlığında elde edilmiştir. Mutanın enzim üretiminde metal kaynağını sırası ile KCl > Kontrol (MgSO<sub>4</sub>+CaCl<sub>2</sub>) > NaCl şeklinde tercih ettiği görülmüştür. MnSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, LiSO<sub>4</sub> ve FeSO<sub>4</sub>'ın enzim üretimi üzerinde inhibitör etki yarattığı belirlenmiştir. Yapılan çalışmada, en yüksek enzim üretiminin elde edildiği KCl varlığında enzim üretimi, MgSO<sub>4</sub> ve CaCl<sub>2</sub> bulunan kontrol ortamına göre 1,13 kat artmıştır (Çizelge 4.9).

Mutant suş (460 IU/mL) KCl varlığında ana suşa (60 IU/mL) göre de 7,6 kat verim artışı göstermiştir. Kontrol ortamında bulunan MgSO<sub>4</sub> ve CaCl<sub>2</sub> ayrı ayrı denemeye alındığında enzim üretiminde etkili olmadığı saptanmıştır.

**Çizelge 4.9.** Metal kaynaklarının mutantın proteaz aktivitesi ve üreme miktarı üzerine etkileri

<b>Metal İyonları</b>	<b>Enzim Aktivitesi (IU/ mL)</b>	<b>Üreme (OD<sub>600</sub>)</b>	<b>Kat Artışı</b>
Kontrol	404	1,21	1
MnSO <sub>4</sub>	82	1,21	0,2
MgSO <sub>4</sub>	50	0,12	0,12
CaCl <sub>2</sub>	65	0,12	0,16
LiSO <sub>4</sub>	51	0,956	0,12
FeSO <sub>4</sub>	44	0,932	0,1
<b>KCl</b>	<b>460</b>	<b>1,58</b>	<b>1,13</b>
NaCl	336	1,37	0,83



**Şekil 4. 22.** Metal iyonlarının mutantın proteaz aktivitesi ve üreme kapasitesi üzerine etkileri

Çalışmada kontrol ortamında birlikte bulunan CaCl<sub>2</sub> ve MgSO<sub>4</sub> ayrı ayrı denemeye alınmış olup, ancak enzim üretiminde verimli bir etkiye sahip olamadıkları saptanmıştır (Çizelge 4.9). En yüksek aktivitenin elde edildiği KCl, CaCl<sub>2</sub> ve NaCl ile birlikte ayrı ayrı denemeye alındığında ise KCl+CaCl<sub>2</sub> varlığında enzim aktivitesinde artış elde edilmiştir (Çizelge 4.10).

**Çizelge 4. 10.** Kontrol ortamındaki metallerle KCl etkisinin belirlenmesi

<b>Metal İyonları</b>	<b>Enzim Aktivitesi (IU/mL)</b>	<b>Üreme (OD<sub>600</sub>)</b>	<b>Kat Artışı</b>
Kontrol (MgSO <sub>4</sub> + CaCl <sub>2</sub> )	404	1,21	1
KCl	460	1,58	1,13
KCl+ NaCl	352	1,19	0,87
<b>KCl+ CaCl<sub>2</sub></b>	<b>548</b>	<b>1,23</b>	<b>1,35</b>

#### 4.4. Enzim Üretimi Üzerine Etki Eden Fiziksel Faktörler

##### 4.4.1. Sıcaklığın Etkisi

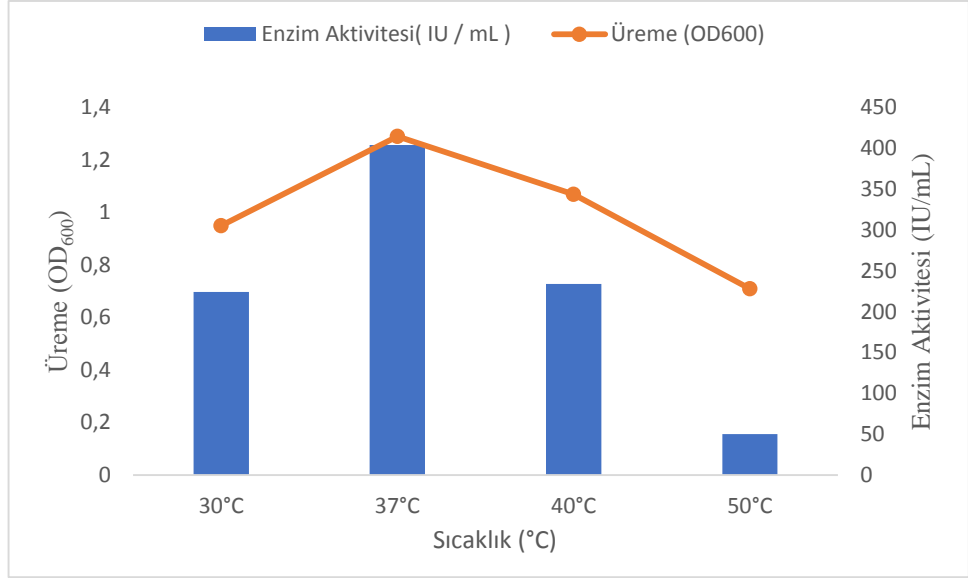
Sıcaklığın bakteri üremesi ve enzim üretimi üzerine etkisinin araştırılması amacıyla 30°C, 37°C (kontrol), 40°C ve 50°C sıcaklıkları kullanılarak optimum sıcaklık değeri saptanmıştır. Yapılan çalışmada maksimum enzim üretiminin elde edildiği kontrol sıcaklığı olan 37°C sıcaklıkta olduğu saptanmış ve yüksek sıcaklık olan 50°C'nin enzim üretimini dramatik olarak azalttığı ve üremenin de sıcaklık artışı ile birlikte düştüğü görülmüştür (Çizelge 4.11).

Mutant suş (404 IU/mL) 37°C'de ana suşa (60 IU/mL) göre 6,7 kat verim artışı göstermiştir.

**Çizelge 4. 2.** Sıcaklığın mutantın proteaz aktivitesi ve üremesi üzerine etkileri

<b>Sıcaklık (°C)</b>	<b>Enzim Aktivitesi (IU / mL)</b>	<b>Üreme (OD<sub>600</sub>)</b>	<b>Kat Artışı</b>
30	224	0,95	0,55
<b>37 (kontrol)</b>	<b>404</b>	<b>1,29</b>	<b>1</b>
40	234	1,07	0,57
50	50	0,71	0,12





**Şekil 4.7.** Sıcaklığın proteaz aktivitesi ve üreme kapasitesi üzerine etkisi

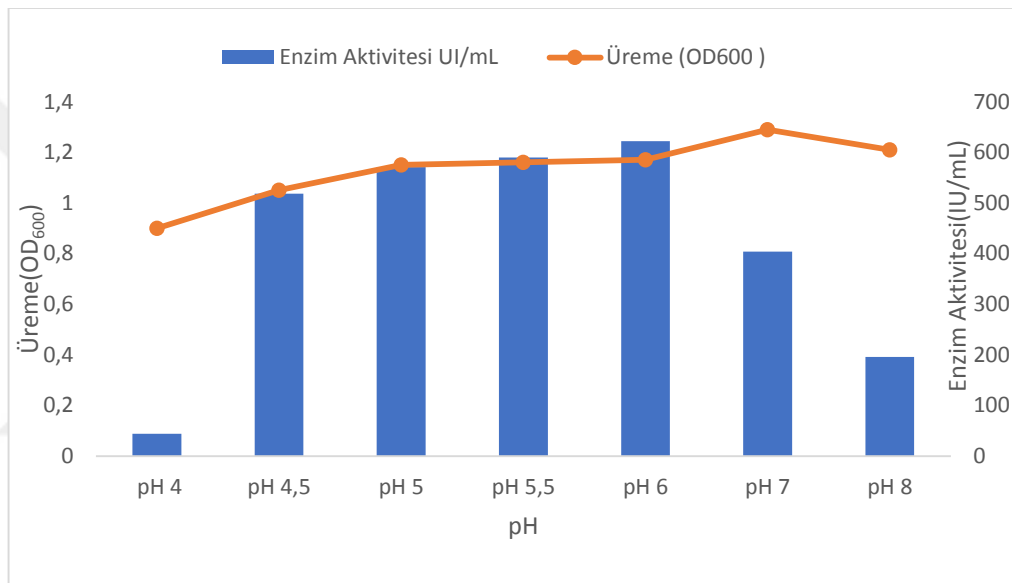
#### 4.4.2. pH' nın Etkisi

pH etkisinin bakteri üremesi ve enzim aktivitesi üzerine etkisinin araştırılması amacıyla 4.0, 4,5, 5.0, 5,5, 6.0, ve 8.0 şeklinde değiştirilen pH değerleri kullanılarak optimum pH değeri saptanmıştır. Yapılan çalışmada maksimum enzim üretiminin elde edildiği pH 6.0' da, pH 7.0 olan kontrol ortamına göre 1,53 kat artmıştır. Enzim üretimi bazik ortama nazaran asidik koşulda elde edilmiştir (Şekil 4.8). pH 4,5'da da kontrole göre 1,28'lik bir enzim artışı saptanmıştır (Çizelge 4.12).

Mutant suş (622 IU/mL) pH 6.0'da ana suşa (60 IU/mL) göre de 10,3 kat verim artışı göstermiştir.

**Çizelge 4.12.** pH'nın mutantın proteaz üretim kapasitesi ve üremesi üzerine etkileri

pH	Enzim Aktivitesi (U/mL)	Üreme (OD600)	Kat Artışı
4	44	0,9	0,10
4,5	518	1,05	1,28
5	571	1,15	1,41
5,5	590	1,16	1,46
<b>6</b>	<b>622</b>	<b>1,17</b>	<b>1,53</b>
7 (kontrol)	404	1,29	1
8	196	1,21	0,48



**Şekil 4. 23.** pH faktörünün mutantın proteaz aktivitesi ve üreme kapasitesi üzerine etkisi

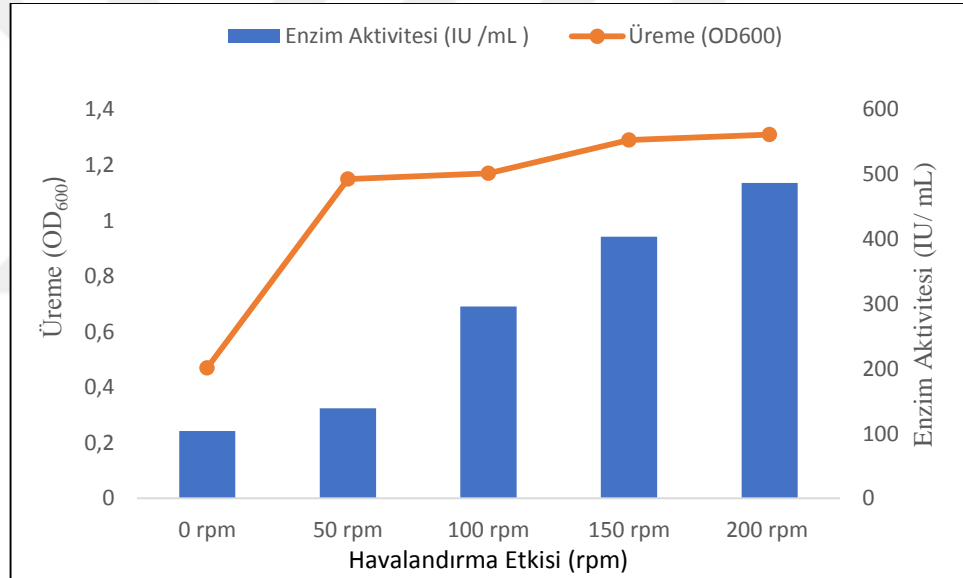
#### 4.4.3. Havalandırmanın Etkisi (Çalkalanma etkisi)

Havalandırmanın etkisi inkübatörün çalkalanma hızının 0, 50, 100, 150 (kontrol), 200 rpm şeklinde değiştirilerek optimum rpm değeri saptanmıştır. Yapılan çalışmada en yüksek enzim üretimi için gerekli çalkalama hızı 200 rpm olarak belirlenmiştir. Bu rpm ile kontrol ortamına göre 1,2 kat verim artışı saptanmıştır (Çizelge 4.13). Enzim üretiminde yüksek havalandırma koşullarında üremenin de arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.9).

Mutant suş (487 IU/mL) 200 rpm’de ana suşa (60 IU/mL) göre de 8,11 kat verim artışı göstermiştir.

**Çizelge 4. 13.** Havalandırmanın mutantın proteaz üretim kapasitesi ve üremesi üzerine etkileri

Havalandırma Etkisi (rpm)	Enzim Aktivitesi (IU /mL )	Üreme (OD <sub>600</sub> )	Kat Artışı
0	104	0,47	0,25
50	139	1,15	0,34
100	296	1,17	0,73
150 (kontrol)	404	1,29	1
<b>200</b>	<b>487</b>	<b>1,31</b>	<b>1,2</b>



**Şekil 4.24.** Havalandırmanın mutantın proteaz aktivitesi ve üreme kapasitesi üzerine etkileri

#### 4.4.4. İnokülasyon Miktarının Etkisi

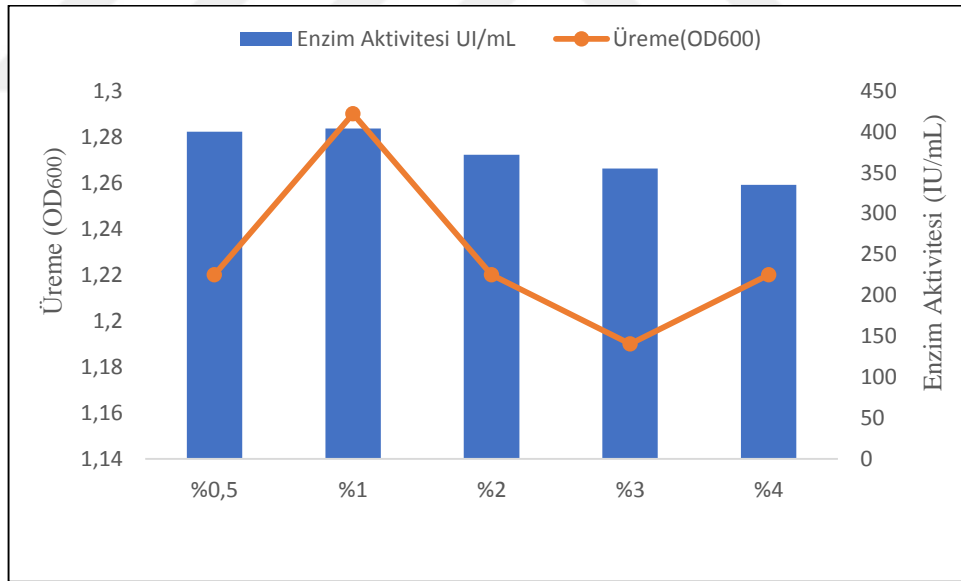
Bakteriler OD<sub>600</sub> = 0,3 olan ön inkübasyon kültüründen % 0,5 ,1 (kontrol), 2, 3, 4 olacak şekilde enzim üretim ortamına ekilmiştir ve optimum inokülasyon miktarı saptanmıştır. Yapılan çalışmada maksimum enzim üretiminin elde edildiği inokülasyon miktarı %1

olarak belirlenmiş ve üremenin enzim üretimi ile paralellik gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.14, Şekil 4.10).

Mutant suş (404 IU/mL) %1 inokülasyon varlığında ana suşa (60 IU/mL) göre de 6,7 kat verim artışı göstermiştir.

**Çizelge 4. 14.** İnokülasyon miktarının proteaz üretim kapasitesi ve üremesi üzerine etkileri

İnokülasyon Miktarı (%)	Enzim Aktivitesi (IU/mL)	Üreme (OD600)	Kat Artışı
0,5	400	1,22	0,99
<b>1</b>	<b>404</b>	<b>1,29</b>	<b>1</b>
2	372	1,22	0,92
3	355	1,19	0,87
4	335	1,22	0,82



**Şekil 2. 25.** İnokülasyon miktarının mutantın proteaz aktivitesi ve üreme kapasitesi üzerine etkisi

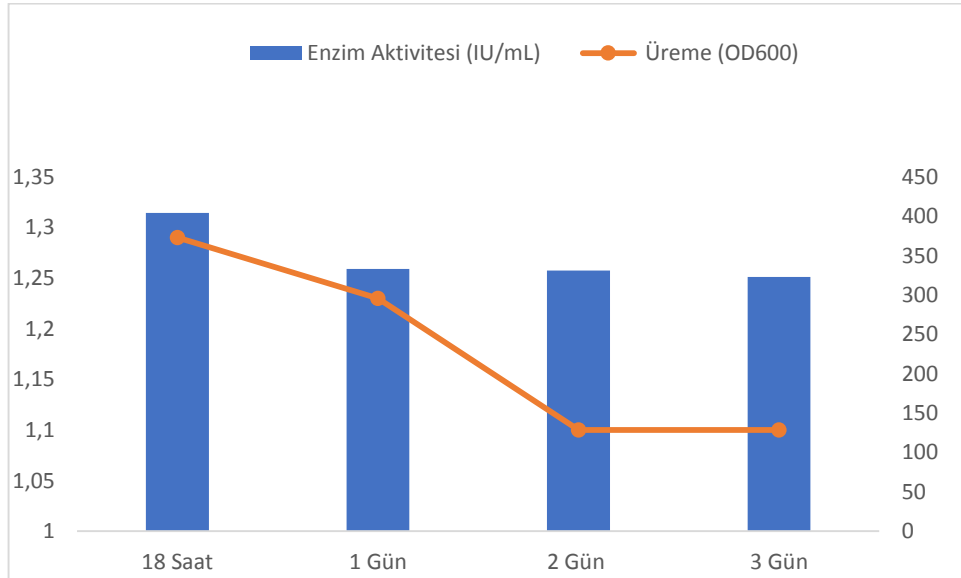
#### 4.4.5. İnokülasyon Yaşının Etkisi

İnokülasyon yaşının enzim aktivitesi üzerine etkisinin araştırılması amacıyla bakterilerin 18 saat'lik (kontrol), 1, 2 ve 3 gün şeklindeki inokülüm yaşları kullanılarak optimum inokülasyon yaşı saptanmıştır. Yapılan çalışmada maksimum enzim üretiminin elde edildiği inokülasyon süresi 18 saat olarak belirlenmiştir. Genç kültürün yaşlı kültüre göre daha etkili olduğu görülmüştür (Çizelge 4.15, Şekil 4.11).

Mutant suş (404 IU/mL) 18 saatlik inokülasyon yaşı kullanıldığında ana suşa (60 IU/mL) göre de 6,7 kat verim artışı göstermiştir.

**Çizelge 2. 15.** İnokülasyon yaşının mutantın proteaz üretim kapasitesi ve üremesi üzerine etkileri

İnokülasyon Yaşı	Enzim Aktivitesi (IU/mL)	Üreme (OD <sub>600</sub> )	Kat Artışı
18 Saat	404	1,29	1
1 Gün	333	1,23	0,82
2 Gün	331	1,1	0,81
3 Gün	323	1,1	0,79



**Şekil 2. 26.** İnokülasyon yaşının mutantın proteaz aktivitesi ve üreme kapasitesi üzerine etkisi

#### 4.5. Maksimum Proteaz Üretimi İçin Modifiye Ortamın Hazırlanması

Maksimum proteaz sentezinin saptandığı karbon, azot ve metal iyonları şeklinde besinsel faktörler ve aynı zamanda sıcaklık, pH, havalandırma, inokülasyon yaşı, inokülasyon miktarı gibi fiziksel faktörleri içeren yeni oluşturulacak bir modifiye ortamda enzim veriminin artırılmasının sağlanması yoluna gidilmiştir. Modifiye ortamda maksimum verimi sağlayan karbon kaynağı olarak elde edilen % 0,1 oranında kullanılan Buğday Nişastası, azot kaynağı olarak % 1,02 oranında Meat Ekstrakt (et özütü) ve metal iyonları olarak % 0,02 oranında KCl+CaCl<sub>2</sub> olarak saptanmıştır. Fiziksel faktörlerde ise optimal koşullar olarak sıcaklık için 37°C, pH için 6,0, havalandırma için 200 rpm, inokülasyon miktarı için % 1 ve inokülasyon yaşı 18 saat olarak alınmış ve bu yeni oluşturulan modifiye ortamda enzim üretimi yoluna gidilmiştir. Modifiye ortamda kontrol ortamına göre 2,7 kat enzim verimin arttığı saptanmıştır (Çizelge 4.16).

Mutant suş (1096 IU/mL) yeni oluşturulan modifiye ortamda ana suşa (60 IU/mL) göre de 18,2 kat verim artışı göstermiştir.

**Çizelge 4. 16.** Kontrol ortamı ile modifiye ortamın üreme ve enzim üretim kapasitesine etkisi

<b>Kontrol Ortam</b> (Quadar ve ark.2009)	<b>Enzim Aktivitesi</b> (IU/mL)	<b>Üreme</b> (OD <sub>600</sub> )	<b>Modifiye Ortam</b>	<b>Enzim Aktivitesi</b> (IU/mL)	<b>Üreme</b> (OD <sub>600</sub> )
% 1 Glukoz % 1,02 Pepton + Yeast Ekstrat % 0,02 MgSO <sub>4</sub> + CaCl <sub>2</sub>  37°C pH 7 150 rpm % 1 Aşılama Ön İnkübasyon 18 Saat	404	1,09	% 1 Buğday Nişastası % 1,02 Meat Ekstrakt % 0,02 KCl + CaCl <sub>2</sub>  37°C pH 6 200 rpm % 1 Aşılama Ön İnkübasyon 18 Saat	1096	2,13

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Endüstriyel üretim süreçlerinde, kimyasal yöntemler yerine çevre dostu biyolojik yöntemlerin kullanılması mümkündür. Enzimler kullanılarak pek çok endüstriyel sürecin çevre dostu olma özelliği arttırılmaktadır. Enzimlerin kullanıldığı süreçler daha temiz, daha güvenli ve çoğunlukla da daha ekonomiktir. Biyoteknolojik yöntemler ile geliştirilen yeni ürünlerin çevre üzerindeki olumsuz etkileri daha azdır (Özgen ve ark. 2007).

Genel olarak mikroorganizmalardan yüksek miktarda enzim verimi elde edilebilmesi için, ya mutasyona uğratarak yeni mikroorganizmalar oluşturulmakta ya mikroorganizmalar doğrudan izole edilmekte ya da üretim ortamının değiştirilmesi gibi işlemler gerçekleştirilmektedir. Özellikle besin ortamında var olan karbon ve nitrojen kaynakları, inorganik tuzlar ve diğer büyüme faktörlerinin, bakterilerin enzim üretim verimi üzerinde önemli etkisi bulunmaktadır (Khalil ve ark. 2003).

Çoğu araştırmacı endüstriyel öneme sahip olan proteaz enzimini yüksek verimde üretebilen yeni suşlar elde edebilmek amacıyla çeşitli mutajenleri mutasyon etkeni olarak kullanılmışlardır. Çeşitli mutasyon teknikleri ile de maksimum verimde enzim üreten yeni suşlar geliştirmek mümkündür (Chand ve ark. 2005). Rao ve arkadaşları (1998), mutagenезin geleneksel yöntemlerle veya rekombinant DNA teknolojiyle proteaz veriminin artırılmasında önemli rol oynadığını vurgulamıştır. Bakteriyel suşların genetik manüplasyonu için kimyasal mutajenlerden biri de Etidyum bromiddir (Haq ve ark. 2010).

Bu çalışmada fiziksel bir mutajen olan UV kullanılarak EB4 adı verilen bir mutant elde edilmiştir. Bu mutant ana suşa göre (8 mm) daha geniş proteaz zon çapına sahiptir (14 mm). Bu mutant için en uygun mutasyon koşullu 10 saat adaptasyon süresi, 10 cm uzaklık ve 15 dakika ışınlama süresi olarak saptanmıştır. 6 ve 8 saatlik adaptasyon süresinde bakterilerin ortama alışması geç olmuş ve yavaş üreme göstermesinden dolayı uygulanan UV bakterilerin çoğunun ölümüne neden olmuş olabilir. 10 saat süresinde koloni içindeki bakteriler sayı olarak arttığından uygulanan UV ışınına dirençli

bakterilerin hayatta kalma olasılığı daha fazladır. Diğer yandan, UV maruz kalma zaman aralığının artması ile UV dirençli bakterilerin sayısında azalma saptanmıştır. Bu beklenen bir durumdur. Çünkü zaman arttıkça daha yoğun UV ışığına maruz kalındığından dolayı bakterinin DNA'sında dimerler oluşmakta ve bunlar ise onarım mekanizmalarınca tamir edilememektedir. Bakteride letal sonuçlar ortaya çıkmaktadır. UV mutasyonu sonu elde edilen EB4 mutantını ikili bir mutasyona tabii tutmak amacıyla kimyasal mutajen EtBr (Etidyum bromid) kullanılmıştır. 0.5 µg/ml EtBr varlığında %94 oranında ölüm saptanan çalışma sonrası elde edilen mutant ATA38 olarak adlandırılmış ve bu mutant ana suşa (8 mm) göre yüksek enzim zonuna (25 mm) sahip olduğu saptanmıştır. Ana suş 32. saatte maksimum enzim üretimi gösterirken mutant maksimum enzim üretimine 24. saatte ulaşmış olup ve ana suşa göre 6.7 kat enzim verim artışı göstermiştir. 8 saatlik bir zaman kazancı sağlanmıştır.

Birçok araştırmacı endüstriyel öneme sahip olan proteaz enzimini yüksek verimde üreten yeni mutant şuşlar elde etmek için fiziksel ve kimyasal mutajenler kullanmışlardır.

Solaiman ve ark. (2005) *B. Pumilus* ile yaptıkları Ultraviyole ile mutasyon çalışmalarında, UV' ye maruz kalma süresi olarak 20 dakika ve uzaklık olarak ise 5 cm' de en iyi mutant şuşları elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Dutta ve Banerjee (2006) UV ile elde edilen mutant *Pseudomonas* sp. JNGR242 tarafından alkali proteaz üretiminde 2.5 kat artış olduğu da gözlenmiştir.

Shikha ve Darmwal (2007) tarafından *Bacillus pantotheneticus*' un ana suşa göre alkali üretimde 1.44 kat artışa sahip olduğu rapor edilmiştir.

Nadeem ve ark. (2010) *Bacillus licheniformis* N-2 şuşunu UV ile mutasyon denemelerinde en iyi maruz kalma süresini 15 dakika olarak saptamışlardır.

Nadeem ve ark. (2010) *Bacillus licheniformis* N-2 şuşunu UV , NTG(N-metil-N-nitro-N-nitrosogunidin) ve MMS (metil metan sulfonat) 3'lü kombinasyonu ile muamele ettiklerinde 9 adet proteaz mutantları elde etmişlerdir, bunların arasından en iyi



proteolitik mutant suşun, aynı ortamda ana suştan 1.4 kat daha yüksek proteaz aktivitesi göstermiştir.

Nadeem ve ark. (2011) *Bacillus pumilus* ana suşunu 30-120 dakika süre aralığında UV'ye maruz bırakmıştır. %1,95 minimum yaşam oranı 120 dakika maruz kaldıktan sonra gözlenmiştir. Çeşitli mutantlar arasından seçilen mutant, ana suşa göre 1,95 kat daha fazla enzim üreten en iyi mutant *Bacillus pumilus* M15 seçilmiş olup ve 90 dk UV'ye maruz bırakıldıktan sonra en geniş zon 26 mm, proteaz aktivitesi 67,84 U/mL olarak bulunmuştur.

Wang ve ark. (2016) UV ile mutasyon çalışmalarında elde ettikleri *Bacillus subtilis* S1-4 mutasını 24 saat inkübasyon süresi olan besi ortamında üretimi sonunda ana suştan 2.5 kat daha yüksek proteaz üretimi elde etmişlerdir.

Fiziksel ve kimyasal mutajenler kullanarak indüklenmiş mutasyonların oluşturulması önemlidir. Farklı bilim insanlarının yaptıkları çalışmalarda mutasyon sıklığı organizmalar arasında büyük farklılık gösterdiği görülmektedir. Bu durum aynı tür içinde bile mutasyon sıklığının genden gene değiştiğini göstermekte ve organizmalar arasındaki bu değişkenliğin onların hata okuma ve onarım sistemlerinin göreceli etkinliklerinden dolayı olabilir.

Üretim ortamı içeriği enzim üretimi üzerinde arttırıcı bir etkiye sahiptir (Gulati, 2007). Çünkü kültür ortamının içeriği ve fermantasyon koşulları enzim üretimini etkileyen önemli faktörlerdir. Ortam içeriğinin optimize edilmesi amacıyla farklı kaynaklı karbon, azot ve metal iyon kaynakları gibi besinsel faktörler ya da ortamın pH'sı, sıcaklığı, çalkalanma hızı, inokülasyon yaşı ve miktarı gibi fiziksel faktörler kullanılmaktadır (Lan 2002). Bu amaçla elde ettiğimiz yeni mutant ATA38'in proteaz üretim kapasitesini arttırmak için üretim ortamında farklı besinsel ve fiziksel faktörler denenmiş ve elde edilen sonuçlara göre yeni bir modifiye ortam oluşturulmuştur. Bu amaçla yapılan çalışmada en iyi karbon kaynağı olarak Buğday nişastası bulunmuştur. Buğday nişastası bulunan besiyerinde proteaz aktivitesinde ana suşa göre 8,75 katlık verim artışı elde edilmiştir. En organik iyi azot kaynağı meat extract (et özütü) olarak saptanmış ve ana

suşa göre 14.1 kat verim artışı gözlemlenmiştir. Metal iyonları içerisinde en iyi kaynak KCl olarak bulunmuştur ve ana suşa göre enzim üretimi 7,6 kat verimi artmıştır. Bu çalışmada kontrol ortamında birlikte bulunan CaCl<sub>2</sub> ve MgSO<sub>4</sub> ayrı ayrı denemeye alınmış, ancak enzim üretiminde verimli bir etkiye sahip olamadıkları saptanmıştır. En yüksek aktivitenin elde edildiği KCl, CaCl<sub>2</sub> ve NaCl ayrı ayrı denemeye alındığında KCl+CaCl<sub>2</sub> varlığında enzim aktivitesinde artış elde edilmiştir. Metal iyonlarının tek başına kullanıldığı ortamdaki enzim üretimi ile birlikte oldukları ortamdaki enzim üretimi kıyaslandığında, birlikte bulduklarında enzim üretiminin de arttığı belirlenmiş olup, bu durum ise metal iyonlarının birbiri üzerine sinerjik etki yarattığı şeklinde açıklanabilir.

Fiziksel faktörlerin etkisine bakıldığında en iyi enzim verimi için sıcaklık 37°C olarak saptanmıştır ve ana suşa göre enzim üretimi 6,7 kat artış göstermiştir. Optimum pH değeri 6.0 olarak bulunmuş ve enzimin asidik karakterde olduğu tespit edilmiş, ana suşa göre verim artışı ise 10,3 kat olarak saptanmıştır. Havalandırma etkisi ise 200 rpm çalkalama hızında en iyi enzim verimini göstermiş ve mutant suş ana suşa göre 8,1 kat verim artışı saptanmıştır. İnokülasyon miktarı %1 kullanıldığında en iyi enzim üretimini sağlamıştır ve ana suşa göre 6,7 kat verim artışı göstermiştir. İnokülasyon yaşı için 18 saat en iyi sonucu vermiştir ve ana suşa göre yaklaşık 6,7 kat enzim üretiminde artış olmasını sağlamıştır. Çalışmada besinsel ve fiziksel koşulların optimize edilmesi ile oluşturulan modifiye ortamda ATA38'in temel besi ortamına göre %171'lik (2.7 kat artış) bir artışla enzim üretimi göstermiştir. Ana suş (60 IU/mL) ile kıyaslandığında mutant ATA38'in (1096 IU/mL) 18,2 kat verim artışı sağlamıştır.

Çeşitli araştırmacılar fiziksel mutajen ve farklı kimyasal mutajenler kullanarak elde ettikleri mutantlardan yüksek düzeyde enzim üretimi için farklı karbon, azot kaynakları ve metal iyonları kullanmışlar ve bu araştırmalar neticesinde birbirinden farklı sonuçlara ulaşmışlardır.

Dutta ve ark. (2006) mutant *Pseudomonas* sp. RAJR 044'dan elde ettikleri maksimum aktiviteyi; %2 dekstroz, %2 maltoz , %2 amonyum sülfat ve %2 potasyum nitrat

varlığında bulunurken, ana bakteride %2 sükröz ve %2 amonyum nitrat kullanıldığında bulunmuştur.

Raju (2013) endüstriyel olarak önemli proteaz üretimini arttırmak için *Bacillus cereus* bakterisine rastgele mutasyon yöntemi uygulamıştır. Bunun için UV, EMS ve Ethidyum Bromid kullanmıştır. Çalışmasında farklı karbon kaynağı, azot kaynağı, maksimum proteaz üretimini 1% fruktoz, %1 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, azot kaynağı olarak %1 pepton ortamlarında saptamıştır.

Raju ve Divakar (2013) rekombinant olmayan *Bacillus cereus*'un fibrinolitik proteaz üretimi ile ilgili çalışmalarında UV, EMS ve EtBr kullanarak *Bacillus cereus* GD55 olarak isimlendirdikleri mutantın en iyi proteaz üretimini karbon kaynağı olarak fruktoz, organik azot kaynağı olarak pepton ve inorganik azot kaynağı olarak ise NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> şeklinde rapor etmişlerdir.

Mukhtar ve Haq (2013) *Bacillus subtilis* türünü kullanarak su altında (batık) ve katı formda fermentasyonda ana ve mutant suşların alkali proteaz üretimi için tarımsal endüstride yan ürünlerinin karşılaştırılmasını gerçekleştirmişlerdir. Batık fermentasyon sırasında, farklı agro-endüstriyel yan ürünler, işlenmemiş gıdalar, guar, ayçiçeği, gluten, pamuk, soya fasülyesi ve buğday eklenmiştir. Bu öğünlerin yanı sıra pirinç kepeği, buğday kepeği ve buğday unu da proteaz üretimi için değerlendirilmiştir. Enzimde maksimum üretime yani ana suştan mutant suşa 1,7 kat artış göstermiştir.

Mukhtar ve Haq (2012) *Bacillus subtilis* mutant suşları tarafından üretilen alkalın proteazın saflaştırılması ve karakterizasyonu ile ilgili çalışma yapmışlardır. Enzim aktivitesinin optimum pH'ı 8.5 bununla birlikte enzim 24 saatlik inkübasyondan sonra pH 10'a kadar stabil kalmıştır. Benzer şekilde enzim aktivitesi için optimum sıcaklık 40°C iken, büyük ölçüde azaltılmış aktivite ile 90°C'ye kadar stabil kalmıştır. Alkalın proteaz kazeine karşı en yüksek spesifite göstermiştir. Proteazın raf ömrü de belirlenmiş ve enzimin aktivitesinin oda sıcaklığında saklandığı ikinci haftadan sonra sona erdiği bulunmuştur.

Raju (2013) endüstriyel olarak önemli proteaz üretimini arttırmak için *Bacillus cereus* bakterisine UV, EMS ve Ethidyum Bromür uyguladığı rastgele mutasyon yöntemi uyguladığı çalışmada inkübasyon süresi, aşılama, pH, sıcaklık gibi faktörlerin enzim üretimine etkisini incelemiştir. En iyi verimi karbon kaynağı olarak %1 olarak kullanılan fruktoz, % 2 aşılama, pH 8.0, 35°C sıcaklık ve inkübasyon süresini 48 saat olarak saptamıştır. Ana suşa göre 2-4 kat daha fazla enzim ürettiğini bulmuşlardır.

Shikha ve Darmwal (2007) tarafından *Bacillus pantotheneticus*'un ana suşa göre alkali üretimde 1.44 kat artışa sahip olduğu rapor edilmiştir.

Gopinath (2009) UV ve etidyum bromid kullanarak ana suş olan *Bacillus sp.* rasgele mutagenез ile yeni mutant suşlar elde edilmiştir. En iyi verimi optimum pH 7,0 ve sıcaklığı ve 37° C olarak bulmuştur. Elde edilen mutant türler ile enzim üretiminin yaklaşık % 53 arttığı bulunmuştur.

Zeng ve ark. (2017) *Bacillus amyloliquefaciens* ile yapılan mutasyon çalışmalarında proteazın maksimum üretiminin 50°C'de ve pH 8' de gerçekleştiğini belirtmişlerdir.

Özdemir (2018) tarafından yapılan çalışmalarda Mutant KE20 suşunun en verimli enzim aktivitesini 30 °C'de 8.12 kat artış ile görülürken ve aynı mutant için pH 8.0' de 4,6 kat artış olduğu belirtilmiştir.

Karbon, azot kaynakları ve metal iyonları ile yapılan çalışmalardan farklı sonuçların elde edilmesi mutantların çeşidine ve ortamdaki diğer bileşenlerin etkileşimlerine bağlı olarak değişmektedir. Dolayısıyla bu da göstermektedir ki mutantların kullandığı metabolik yollar farklı olabilmektedir. Aynı durum fiziksel faktörler için de geçerlidir.

Yapılan bu çalışmada mutantın üreme ortamlarının optimize edilmesi ile enzim verim daha da artırılma yoluna gidilmiş ve yeni bir modifiye ortam oluşturularak bu ortamda kontrol ortama göre %171'lik yüksek bir enzim verim artışı elde edilmiştir. Ana suşa göre ise 18,2 kat verim artışı sağlamıştır. Dolayısıyla, rastgele mutasyon çalışmaları sonucunda elde edilen ve oldukça verimli bir mutant olan *Bacillus subtilis* ATA38'in proteaz enziminin endüstriyel alanda kullanılabilirliği olabilir. Dış ülkelerden ithal edilen

bu enziminin ülkemizde geniş çapta üretilmesi ve böylece ülke ekonomisine katkıda bulunulması olasıdır. Çünkü proteaz enzimi farklı endüstri dallarında kullanımı olan ve her geçen gün kullanım oranında artış gözlenen bir enzimdir.



## KAYNAKLAR

- Aehle, W. 2004.** Enzymes in Industry Production and Application, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, s. 484.
- Aehle, W. 2004.** Enzymes in Industry Production and Applications, Wiley- VCH, Weinheim. 28: 335- 340.
- Ahmad, J., Ansari, T.A. 2013.** Alkaline Protease Production Using Proteinaceous Tannery Solid Waste. *J Pet Environ Biotechnol* 4: 136.
- Anonim, 1994.** <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC34/>, (Erişim tarihi:2018).
- Anonim, 2006.** <http://www.refgen.com/egitim.asp>, (Erişim tarihi:2018).
- Anonim, 2008.** <https://bitesizebio.com/252/8-approaches-to-random-mutagenesis/>- (Erişim tarihi: 2018)
- Anonim, 2012.** <https://genecell11.files.wordpress.com/2012/10/3.pdf>- (Erişim Tarihi: 2018).
- Anonim, 2013.** <http://en.wikipedia.org/wiki/Papain#Structure>- (Erişim Tarihi: 2018)
- Anonim, 2013.** <http://www.herbaextractsplus.com/bromelain.html>- (Erişim Tarihi: 2018)
- Anonim,2015.** <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/ethyl-methanesulfonate>- (Erişim tarihi:2018).
- Anonim,2016.**[https://en.wikipedia.org/wiki/Mutagenesis\\_\(molecular\\_biology\\_technique\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Mutagenesis_(molecular_biology_technique))- (Erişim tarihi:2018).
- Anonim, 2016.**[http://www.researchandmarkets.com/research/17qrqp/proteases\\_market](http://www.researchandmarkets.com/research/17qrqp/proteases_market)- (Erişim tarihi:2018),.
- Anonim, 2017.**<http://www.biyologlar.com/enzimlerin-yapisal-ozellikleri>- (Erişim tarihi:2018).
- Anonim, 2017.**<http://docplayer.biz.tr/67959264-Enzimler-enzim-tanimi-ve-enzim-arastirmalarinin-tarihcesi-substrat.html>- (Erişim tarihi:2018).
- Anonim, 2017.** <http://en.wikipedia.org/wiki/Papain#Structure>- (Erişim tarihi:2018).
- Anonim, 2017.** <https://genecell11.files.wordpress.com/2012/10/3.pdf>- (Erişim tarihi: 2018).
- Anonim, 2017.** <http://www.herbaextractsplus.com/bromelain.html>- (Erişim tarihi: 2018).
- Anonim,2017.**[http://myweb.ttu.edu/daray/Genetics/BIOL3416\\_Ch12\\_DNA\\_mutation\\_&\\_repair.ppt](http://myweb.ttu.edu/daray/Genetics/BIOL3416_Ch12_DNA_mutation_&_repair.ppt)- (Erişim tarihi: 2018).
- Anonim, 2017.** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22004/>, 2017- (Erişim tarihi: 2018).
- Anonim, 2017.** <http://www.sivabio.50webs.com/dam.htm>- (Erişim tarihi: 2018).
- Anonim,2017.**<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p0029?lang=en&region=TR>- (Erişim tarihi: 2018).
- Anonim, 2017.** <https://www.slideshare.net/aljeirou/mutation-and-dna-repair-mechanisms>-(Erişim tarihi: 2018).
- Anonim, 2017.** <http://what-when-how.com/molecular-biology/06-methylguanine-dna-methyltransferase-mgmt-molecular-biology/>- (Erişim tarihi: 2018).

- Anonim,2017.**<http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:6mOrUmciKBAJ:www.pitt.edu/~super7/50011-51001/50501.ppt+&cd=2&hl=en&ct=clnk&gl=tr> (Erişim tarihi: 2018).
- Anonim, 2017.**<http://www.biyologlar.com/enzimlerin-yapisal-ozellikleri-> (Erişim Tarihi: 2017).
- Anonim, 2017.**<http://docplayer.biz.tr/67959264-Enzimler-enzim-tanimi-ve-enzim-arastirmalarinin-tarihcesi-substrat.html-> (Erişim Tarihi: 2018).
- Anonim, 2018.** [https://www.ameriresearch.com/product/global-enzyme-market-2024-depth-market-view-key-product-categories-technologies-product-pipeline-top-players-company-share-competitive-dynamics-end-market-mix-technology-outlook/-](https://www.ameriresearch.com/product/global-enzyme-market-2024-depth-market-view-key-product-categories-technologies-product-pipeline-top-players-company-share-competitive-dynamics-end-market-mix-technology-outlook/) (Erişim tarihi: 2018).
- Anonim, 2018.** <http://bektastepe.net/course-slides/15-gen-mutasyonu-dna-onarm.pdf-> (Erişim tarihi: 2018).
- Anonim,2018.**<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p0029?lang=en&region=TR->(Erişim Tarihi: 2018).
- Anonim, 2018.**<http://what-when-how.com/molecular-biology/06-methylguanine-dna-methyltransferase-mgmt-molecular-biology/-> (Erişim tarihi: 2018).
- Afşar, A. 2008.** A Research on Increasing The Effectiveness Of Degreasing Process By Using Enzymes: Microbiol Res, s: 45-53.
- Anwar, A., Saleemuddin, M. 1997.** Alkaline Proteases: A Review, Bioresource Technology, 64: 175-183.
- Ather, A. 2009.** Identification, Cloning and Expressions of Proteases from a Cold Adapted Organism *Aliivibrio salmonicida*. Master thesis in structural Biology Faculty of science University of Tromsø ,24-26.
- Appak, S. 2006.** Farklı Kaynaklardan Ğzole Edilen Ekstraselüler Enzim Üreten Stafilokokların Biyokimyasal ve Moleküler Karakterizasyonu. *Yüksek Lisans Tezi*, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 89.
- Ası, T. 1999.** Enzimler: Tablolarla Biyokimya Cilt 2,Ankara, s. 39-69.
- Ather, A. 2009.** Identification, Cloning and Expressions of Proteases from a Cold Adapted Organism *Aliivibrio salmonicida*. *Master thesis in structural Biology Faculty of science University of Tromsø* s. 24-26.
- Aunstrup, K. 1973.** Industrial production of proteolytic enzymes. B. Spencer (Editor), Industrial aspects of biochemistry: Federation of European Biochemical Societies, 30 (1):23-46.
- Aunstrup, K. 1981.** “Industrial Aspects of Biochemistry”, (B. Spencer editör), *Febs*, Dublin, 23-29.
- Axelrod, S., Saez L., Young M. 2015.** Studying Circadian Rhythm and Sleep Using Genetic Screens in *Drosophila*, *Methods in Enzymology*, Volume 551, 2015, s. 3-27.
- Babe, L., Craik C. 1997.** Viral Proteases: Evolution of diverse structural motifs to optimize function, *Cell*, 91: s. 427- 430.
- Balkan, B. 2008.** Katı Substrat Fermentasyonu ile Ham Nişastayı Parçalayan Yeni Bir Fungal Amilaz Üretimi Safılaştırılması ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi. *Doktora Tezi*, T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne, 85.
- Barredo, J.L. 2005.** Microbial Enzymes and Biotransformations. Humana Pres, Totowa, New Jersey.
- Barrett, A. J. 1995.** Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Enzyme nomenclature.

Recommendations 1992. Supplement 2: corrections and additions (1994). *Eur J Biochem.*,232(1): 1-6.

**Barrett, A. J., Rawlings, N.D., Woessner, J.F. 1998.** Handbook of Proteolytic Enzymes. London, Academic Press.

**Bell, J. 2006.** Davies Laboratory, Proteases, Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Williams and Wilkins, University of Richmond. Baltimore, Maryland, USA, s. 559.

**Bulut, Ş. 2007.** Marinal Bakteri *Teredinobacter Turnirae* 'den Proteaz Üretimi. *Doktora Tezi*, Elazığ Üniversitesi- Fen Bilimleri Enstitüsü, Fırat, s. 176 (yayınlanmamış).

**Chaplin, M.F., BUCKE, C., 1990.** Enzyme Technology, Cambridge University Cambridge, s. 20-35.

**Cheng, Z., Rongbin, Z., Maomao, M., Zheling, Z., Deming, G. 2017.** Mutagenesis and characterization of a *Bacillus amyloliquefaciens* strain for *Cinnamomum camphora* seed kernel oil extraction by aqueous enzymatic method, *AMB Expr* s. 7:154.

**Celep, S.G. 2010.** Siirt I. Ulusal El Sanatları Sempozyumu: Enzimler Tekstil Endüstrisindeki Yeri ve Önemi.

**Çelik, N. 2006.** *Bacillus clausii* GMBAE 42' den saflastırılan Alkalin Proteazın termal inaktivasyon kinetiğinin belirlenmesi ve Cu<sup>2+</sup> iyonları ile termostabilizasyonu. *Yüksek Lisans Tezi*, KOÜ, Kocaeli. S. 11-56.

**Dalev, P. G. 1994.** Utilization of waste feathers from poultry slaughter for production of a protein concentrate. *Bioresour. Technol*, 48: 265–267.

**Deshpande, V.V., Rao, M., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S. 1998.** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3): s. 597-635

**Duarte TR., Oliveira S.S., Macrae A., Cedrola S.M.L., Mazotto A.M., Souza E.P. 2011.** Increased expression of keratinase and other peptidases by *Candida parapsilosis* mutants. *Braz J Med Biol Res* 44(3): 212–216.

**Duran, K., E, Bozacı., Karahan A.H. 2007.** Protein Esaslı Mamüllerin Enzimatik Ön Terbiyesi, Ege Üniversitesi, Tekstil Mühendisliği Bölümü, s. 1-8.

**Duran, K., Bozacı E.A., Karahan, H.A. 2007.** Protein Esaslı Mamüllerin Enzimatik Ön Terbiyesi, Ege Üniversitesi Tekstil Mühendisliği Bölümü. Tekstil ve Konfeksiyon Araştırma Uygulama Merkezi Yayını, s. 17-3.

**Dutta, J.R., Banerjee, R. 2006.** Isolation and characterization of a newly isolated *Pseudomonas* mutant for protease production, *Brazil Archiv Biol Biotech* 49: 37-47.

**Erkan, S., 1992.** Moleküler Biyoloji, Ege Ü. Yay., Bornova / İzmir, 30-52.

**Fadıloğlu, S., Eerkmen, O. 2004.** Gıda sanayinde enzimlerin önem, Gaziantep Üniversitesi, Bilimsel Yayınlar Kataloğu, s: 1-16.

**Fawzi, E. 2011.** Comparative study of two purified inulinases from Thermophile *Thielavia terrestris* NRRL 8126 and mesophile *Aspergillus foetidus* NRRL 337 grown on *Cichorium intybus*, *Braz J Microbiol* 42: 633-649.

**Fersht, A. 1998.** Structure and Mechanism in Protein Science, Freeman and Company, USA.

**Flibotte S., Edgley, M.L., Chaudhry, I., Taylor, J., Neil, S.E. 2010.** Wholegenome sequencing profiling of mutagenesis.



- Flores, M., Aristoy, M.C., Toldra, F. 1999.** Hydrolysis of alanine oligopeptides by porcine muscle alanyl aminopeptidase, *Eur. Food Res. Technol.*, 208(4): 264.
- Gerçeker, D., Ustaçelebi, Ş. 1999.** *Bacillus*, *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, Güneş Kitapevi, Ankara, s. 411-418.
- Godfrey, T., West, S. 1996.** Introduction to Industrial Enzymology, Industrial Enzymology, Stockton Pres, New York.
- Greene E.A., Codomo C.A., Taylor, N.E., Henikoff, J.G., Till, B.J. 2003.** Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale, *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Academic Press, s. 410-406.
- Gulati, H.K., Chadha, B.S., Saini, H.S. 2007.** Production of feed enzymes (phytase and plant cell wall hydrolyzing enzymes) by *Mucor indicus* MTCC 6333: Purification and characterization of pythase. *Folia Microbiol.*, 52859:491-497.
- Gupta, R., Qasim, K., Beg., Lorenz, P. 2002. **Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications.** *Applied Microbiology and Biotechnology*. **59: 15-32.**
- Gupta, R., Gırgas, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., Chauhan, B. 2003.** Microbial a-amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochem*, s. 1-18.
- Gupta, R., Beg, Q. K., Khan, S., Chauhan, B. 2002.** An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Applied Microbial Biotechnology* 60: 381 –395.
- Haq, I., Ali, S., Javed, M. M., Hameed, U., Saleem, A., Adnan, F., Qadeer, M. A. 2010.** Production of alpha amylase from a randomly induced mutant strain of *Bacillus amyloliquefaciens* and its application as a desizer in textile industry, 42 (1): 473-484.
- Horikoshi, K. 1996.** Alkaliphiles from an industrial point of view. *FEMS Microbiology Reviews*, s. 18-259.
- Horikoshi, K., 1999.** Enzymes of alkalophilies. In: *Microbial Enzyme and isolation, production and characterization*. *Appl. Microbiol*, 12: 34-39.
- Novel, J.J., NICKERSON, W.j., ROBINSON, R.S. 1963.** Screening for a new *Streptomyces* strain capable of efficient keratin degradation *Biochim. Acta*, s. 77-73.
- Hedstrom, L. 2002.** Serin Protease Mechanisim and Specificity, *Chem. Rev.*,102:4501-4523.
- Johnvesly, B., Naik, G.R. 2001.** Studies On Production Of Thermostable Alkaline Protease From Thermophilic *Bacillus* sp. JB-99 in a Chemically defined medium, *Process Biochemistry*,37 : 139- 144.
- Kalender, N. 1999.** Biyoteknolojik Üretim İçin Rekombinant Mikroorganizma Geliştirilmesi”, *Yüksek Lisans Semineri*, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Kalisz, H.M. 1988.** Microbial proteinases. *Advance Biochem Eng Biotechnol* 36:1- 65.
- Kalpana Devi, M., Banu, A., Gnanaprabhal, G.R., Pradeep, B.V., Palaniswamy, M. 2008.** Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *J Sci Technol* 1(7):18–22.
- Karmakar, S.R. 1999.** *Chemical Technology in The Pretreatment Process of Textiles*, Elsevier Science B.V. s.18-24.
- Kacasi, C. 2006.** Kovalent bağlanma ve fiziksel adsorbsiyon metodları ile proteaz enziminin immobilizasyonu, *Yüksek Lisans Tezi*, İstanbul.
- Kıran, E., Ö., Çömlekçiöglü,U., Dostbil, N. 2006.** Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Endüstrideki Kullanım Alanları, *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9(1) 12-18.

- Kirk, O., Borchert, T.V., Fuglsang, C.C. 2002.** Industrial Enzyme Applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 345-351.
- Knight, C. G., Dando, P. M. 1995.** Thimet oligopeptidase specificity: evidence of preferential cleavage near the C-terminus and product inhibition from kinetic analysis of peptide hydrolysis. *Biochem J.*, 308 (1): 145-50.
- Krajewska, B. 2003.** Application of Chitin and Chitosan Based Materials for Enzyme Immobilizations: A Review, *Enzyme and Microbial Technology*, 35:126-139.
- Kumar, C.G., Takagi, H. 1999.** 'Microbial Alkaline Proteases: From a Bioindustrial Viewpoint', *Biotechnology Advances*, (17): 561-594.
- Kudrya, V. A., Simonenko, I. A., 1994.** Alkaline serine proteinase and lectin isolation from the culture fluid of *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 41: 505–509.
- Laan, J.C.V., Gerritse G., Mulleners L.J., Hoek R.A.V., Quax, W. J. 1991.** Cloning, characterization, and multiple chromosomal integration of a *Bacillus* alkaline protease gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57:901-909.
- Lai, Y.P., Huang, J., Wang, L.F., Wu, Z.R. 2004.** A new approach to random mutagenesis in vitro, *Biotechnol Bioeng*, 86(6): 622- 7.
- Langmaier, F., Mladek, M., Kolomaznik, K., Sukop, S. 2002.** Isolation of elastin and collagen polypeptides from long cattletendons as raw material for the cosmetic industry, Czech Republic, s. 1- 9.
- Laxman, R.S., Sonawane, A.P., More, S.V., Rao, B.S., Rele, M.V., Jogdand, V.V. 2005.** Optimization and scale up of production of alkaline protease from *Conidio boluscoronatus*, *Process Biochemistry* (40): 3152- 3158.
- Leng, X.W., Xu, Y. 2011.** Improvement of acid protease production by a mixed culture of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* using solid state fermentation technique. *Afr J Biotechnol*, 10 (35): 6824- 6829.
- Lobmann, R., Zemlin, C., Motzkau, M., Reschke, K., LEHNERT, H. 2005.** Proteaz absorban örtü ile tedavi edilmiş diyabetik ayak yaralarında matriksmetalloproteinazlar ve büyüme faktörlerinin ekspresyonu, Department of Endocrinology and Metabolism, Published by Magdeburg University Medical School, Germany, s.1-4.
- Lowe, D.A. 2001.** Basic Biotechnology. (Ed: Ratledge C. and Kristionsen B.), Second Edition, Cambridge University Pres.
- Mabrouk., S.S., Hashem., A.M., EL-Shayeb, A., Ismail, M.S., Abdel-Fattah, A.F. 1998.** Optimization of Alkaline Protease Productivity by *Bacillus licheniformis* ATCC 21415, *Bioresource Technology*, (69) :155- 159.
- Maurer, K.H. 2004.** Detergent Proteases, El Sevier. Germany, s. (3) :25- 33.
- Mukhtar, H., Haq, I. 2008.** Production of alkaline protease by *Bacillus subtilis* and its application as a depilating agent in leather processing.
- Meraz, I.M., Choudhary, T., Hoq, M. M. 2005.** Optimization of Mutation conditions of *Bacillus* sp. To increase the yield of alkaline protease, *FEMS Microbiol. Lett.* (66): 239- 244.
- Mrunmaya K.P., Mahesh, K.S., Kumananda T. 2013.** Isolation and characterization of an Odisha, India. *Int J Microbiol* (5) :159- 165.
- Nadeem, M., Qazi, J. I. 2010.** Enhanced production of alkaline protease by a mutant of *Bacillus licheniformis* N-2 for dehairing, Department of Zoology, University of the Punjab, Pakistan.

- Nadeem, M., Syed, Q. 2011.** Study on biosynthesis of alkaline protease by mutagenized culture of *Bacillus pumilus*, Pakistan.
- Orhan, E. 2003.** *Bacillus subtilis* ve *Bacillus cereus* Bakterilerinden Proteaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması ve Özelliklerinin İncelenmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, s. 24-38.
- Özgen, Ö., Emiroğlu, H., Yıldız, M., Tag, A.S., Puruçcuoğlu E. 2007.** Tüketiciler Ve Modern Biyoteknoloji: Model Yaklaşımlar, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Yayınları No:1, Ankara.4
- Özdemir, A. 2013.** *Streptomyces* sp. MC10 Suşunun Alfa Amilaz Üretim Kapiliyetinin Belirlenmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, CBÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Manisa.
- Özdemir, K. 2018.** Proteazın Üretimini Arttırmak İçin Kimyasal Mutageniz Etil Metil Sülfonat, EMS Yoluyla *Bacillus subtilis* E6-5' den Mutant Suş Geliştirilmesi ve Üretim Ortamının Optimizasyonu, *Yüksek Lisans Tezi*, Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa, s.70-78.
- Öztürk, M.H. 2004.** Partial Purification and Characterization of Alkaline Proteases from Isolated *Bacillus* Strains, *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.U. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C. R., Nigam, P. 1999.** Solid state fermentation for the production of industrial enzymes, *Current science*, 77 (1): 149- 162.
- Polgar, L. 1989.** **Mechanisms of Protease Action. Boca Raton, CRC Press Inc.**
- Qadar, S. A., Shireen, E., Iqbal, S., Anwar, A., 2009.** Optimization of protease and lipase production by *Bacillus pumilus* SG 2 isolated from an industrial effluent. *Indian Journal of Biotechnology*, Vol:8, 286-290.
- Rakariyatham, N., Butr-Indr, B., Niamsup, H. and Shank, L. 2006.** Improvement of myrosinase activity of *Aspergillus* sp.NR4617 by chemical mutagenesis, *Electr. J. Biotechnol*, 9 (4): 379- 385.
- Raksakulthai, R., Haard, F. N. 2003.** Exopeptidases and Their Application to Reduce Bitterness in Food, A Review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43 (4): 401–445.
- Rao, B. M., Tanksale, M. A., Ghathe, S. M., Deshpande, V.V. 1998.** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology*, 62: 597-635.
- Rao, C.S., Sathish, T., Ravihandra, P., Parakasham, R. S. 2009.** Characterization of Thermo- and Detergent Stable Serine Protease from Isolated *Bacillus scirculans* and Evaluation of Eco-Friendly. *Process Biochemistry*, (44): 262- 268.
- Rao, B. M., Tanksale, M. A., Ghathe, S. M., Deshpande, V.V. 1998.** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology*, 62: 597-635.
- Reed, G., 1993.** *Enzymes In Food Processing*, Milwaukee, Wisconsin.
- Ribeiro, O., Magalhaes, F., Q Aguiar, T., Wiebe, M., Penttila, M., Domingues, L. 2013.** Random and direct mutagenesis to enhance protein secretion in *Ashbya gossypii*, 4 (5): 322–331.
- Rosovitz, M.J., Voskuil, M.I., Chambliss, G. H. 1998.** *Bacillus*, Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Systematic Bacteriology, 9nd Edition, by edited Collier L., Balows, A. and Susman, M., Oxford University Pres, New York, 2:709-730.
- Salleh, A.B. 2006.** Protease: Introduction. Editörler: Salleh, A.B., Rahman, R.N.Z.R.A., Basri, M. *New Lipases and Proteases*, Nova Bimedical, 23-39, New York

- Schallmeyer, M., Singh, A., Ward, O.P. 2004.** Developments in the Use of *Bacillus* Species for Industrial Production. *Canadian Journal of Microbiology*, 50: 1-17.
- Shimogaki, H., Takeuchi, K., Nishino, T., Ohdera, M., Kudo, T., Ohba, K., Iwama, M. Irie, M. 1991.** Purification and properties of a novel surface-active agent and alkaline-resistant protease from *Bacillus sp.*, *Y. Agric. Biol. Chem.* 55(9): 2251-8.
- Shikha, S.A., Darmwal, N.S. 2007.** Improved production of alkaline protease from a mutant of alkalophilic *Bacillus pantotheneticus* using molasses as a substrate, *Bioresour Technol* 98: 881- 885.
- Sivakumar, T.V., Ramasubramanian, T., Shankar, P. 2011.** Screening of keratinolytic bacteria *Bacillus cereus* from the feather dumping soil of sivakasi. *J. Basic and Appl Biol*, 5: 305-314.
- Sikora, P., Chawade, A., Larsson, M., Olsson, J., Olsson, O. 2012.** Mutagenesis as a tool in plant genetics, functional genomics.
- Setyorini, E., Kim, Y.-J., Takenaka, S., Murakami, S., Aoki, K. 2006.** Purification and characterization of a halotolerant intracellular protease from *Bacillus subtilis* strain FP-133, *J. Basic Microbiol.*, 46(4): 294-304.
- Sega, G.A. 1984.** A review of the Genetic Effects of thymethansulfonate, *Mutation Res.* p. 134: 113-142.
- Singh, J., Batra, N., Sobti, R.C. 2000.** Serine Alkaline Protease From a Newly Isolated *Bacillus sp.* SSR1, *Process Biochemistry*, 36 : 781-785.
- Smith, J.E. 1996.** Biotechnology. Chambridge University Pres, Chambridge, s. 233.
- Taylor, J.M., Richardson, T. 1979.** Applications of microbial enzymes in food systems and in biotechnology. *Advances in Applied Microbiology*. 25: 7-31.
- Tipton, K. F. 1994.** Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Enzyme nomenclature. Recommendations 1992. Supplement: corrections and additions. *Eur J Biochem* 223(1): 1-5.
- Tozser, J., Toth, F., Andras, J. 2013.** Research Applications of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology *Biomolecules*, 3, 923-942.
- Tosun, Y. 2006.** Biyoteknolojide Enzimler. [www.bayar.edu.tr](http://www.bayar.edu.tr). (online). (Erişim Tarihi:2018).
- Uhling, H. 1998.** Industrial Enzymes and Their Applications, *John Wiley and Sons*, England, s. 1-144.
- Venugopal, V., Alur, M.D., Nerkar, D.P. 1989.** Solubilization of fish proteins using immobilized microbial cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 3: 1098- 1103.
- Wang, H.Y., Liu, D.M., Liu, Y., Cheng, C.F., Ma, Q.Y., Huang, Q., Zhang, Y.Z. 2007.** Screening and mutagenesis of a novel *Bacillus pumilus* strain producing alkaline protease. *Lett Appl Microbiol* 44 (1) :1-6.
- Wipat, A., Harwood, C.R. 1999.** The *Bacillus subtilis* genome sequence: the molecular blueprint of a soil bacterium, *FEMS Microbiology Ecology*, 28: 1- 9.
- Woodley, J.M. 2000.** Advances in Enzyme Technology-UK Contributions. (Thscheperi editör). *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, s. 94- 107.
- Yağcı, C. 2007.** Türkiye’de Farklı Bölgelerden İzole Edilen *Bacillus sp.*’nin Alkalen Proteaz Üretimi, *A.Ü.,Yüksek Lisans Tezi*, s. 76. (yayınlanmamış).
- Yıldırım, S. 2010.** Endüstride Proteazların Kullanım Alanlar

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Büşra ÖZALPAR  
Doğum Yeri : Bursa  
Doğum Tarihi : 27.03.1991

### Eğitim Durumu

Lise : Bursa Cumhuriyet Anadolu Lisesi  
Lisans : Gazi Üniversitesi  
Yüksek Lisans : Uludağ Üniversitesi

Çalıştığı Kurumlar : --  
İletişim (e-posta) : busra\_ozlpr@hotmail.com

### YAYINLAR:

**Özalpar B., Sevgi T., Zeren B., Guler B.E., Demirkan E.,** Investigation of antibiotic production potentials of *Bacillus* sp. Isolated from Turkey's soils. IVEK 3. International Congress of Pharmaceuticals and Pharmacy, 26-29 April 2017, İstanbul, TURKEY (Poster Presentation)

**Zeren B., Ozalpar B., Guler B. E., Demirkan E.,** Determination of temperature stability and pH values of newly isolated *Bacillus* sp. 10-2  $\alpha$ -Amylase and commercial  $\alpha$ -Amylase enzymes as animal feed additives, 6<sup>th</sup> Information and R & D Days Uludag University, 15-16 March 2017, Bursa, TURKEY (Poster Presentation)

**Özalpar B., Sevgi T., Ak U. A., Demirkan E.,** Türkiye Topraklarından izole edilen *Brevibacillus laterosporus* EA62'den elde edilen yeni antibiyotiğin MİK değerlerinin saptanması. İVEK 3. Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi, 26-29 Nisan 2017, (Poster sunum)

**Özalpar B., Sevgi T., Zeren B., Güler B. E., Demirkan E.,** Türkiye topraklarından *Bacillus* sp. suşlarının antibiyotik üretim potansiyellerinin araştırılması. İVEK 3. Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi, 26-29 Nisan 2017, (Poster sunum)

**Sevgi T., Aykut Y., Demirkan E., Guler B. E., Ozalpar B.,** Use of spontaneous fibrous structures in commercial protease enzyme immobilization, International Fiber and Polymer Research Symposium Atatürk Congress Culture Center, 13-14 May 2016,Bursa, TURKEY (Oral Presentation)

**Sevgi T., Aykut Y., Demirkan E., Güler B. E., Özalpar B.,** Ticari Proteaz Enzim İmmobilizasyonunda Kendiliğinden Lifsi Yapıların Kullanımı, Uluslararası Lif ve Polimer Araştırmaları Sempozyumu, Merinos Atatürk Kongre Kültür Merkezi, Bursa, 13-14 Mayıs 2016 (Sözlü Sunum)

**Elif Demirkan, Tuba Sevgi, Behice Zeren, Baran Enes Güler, Büşra Özalpar** Türkiye topraklarından izole edilmiş *Bacillus* sp. suşlarının petrol parçalama yeteneklerinin saptanması Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Komisyonu. Proje no: HDP(F)-2016/57 Pr Başlangıç-Bitiş: 14.11.2016-21/11/2017 (Yardımcı Araştırmacı).

Yeni izole *Bacillus megaterium* EBR9-1' den üretilen termostabil fitaz enziminin yumurtacı ve etlik piliç rasyonlarından kullanım etkinliğinin araştırılması . TÜBİTAK Proje No: 217O127 Başlangıç-Bitiş :01.12.2018- 01.01.2019 (Bursiyer)