



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PROTEAZIN ÜRETİMİNİ ARTTIRMAK İÇİN KİMYASAL MUTAGENEZ
(ETİL METAN SÜLFONAT, EMS) YOLUYLA *BACILLUS SUBTILIS* E6-5'DEN
MUTANT SUŞ GELİŞTİRİLMESİ VE ÜRETİM ORTAMININ
OPTİMİZASYONU**

Kübra ÖZDEMİR

Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA-2018

TEZ ONAYI

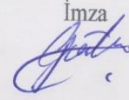
Kübra ÖZDEMİR tarafından hazırlanan "Proteazın üretimini arttırmak için kimyasal mutagenез (etil metan sülfonat, EMS) yoluyla *Bacillus subtilis* E6-5'den mutant suş geliştirmesi ve üretim ortamının optimizasyonu" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

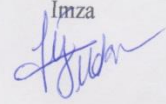
Başkan: Prof. Dr. Elif DEMİRKAN
Uludağ Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Anabilim Dalı


İmza


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


İmza

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Figen ERSOY
Uludağ Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi,
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı


İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım



Prof. Dr. Ali BAYRAM

Enstitü Müdürü

11...9...2018

U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- 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.**

11.09.2018


Kübra ÖZDEMİR

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

PROTEAZIN ÜRETİMİNİ ARTTIRMAK İÇİN KİMYASAL MUTAGENEZ (ETİL METAN SÜLFONAT, EMS) YOLUYLA *BACILLUS SUBTILIS* E6-5'DEN MUTANT SUŞ GELİŞTİRİLMESİ VE ÜRETİM ORTAMININ OPTİMİZASYONU

Kübra ÖZDEMİR

Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

Bu çalışmada EMS ile muamele edilen *Bacillus subtilis* E6-5 suşundan proteaz üreten 82 adet mutant elde edilmiştir. Bu mutantlar içerisinde en büyük zon çapına (15 mm) sahip olan mutant suş seçilerek bu suş *Bacillus subtilis* KE20 şeklinde adlandırılmıştır. Elde edilen mutantın sıvı ortamda enzim üretim kapasitesi test edilmiş ve mutant suş ana suştan 9.2 kat daha fazla enzim üretmiştir. En yüksek enzim üretimi 48. 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 mısır nişastası (560 IU/mL), en iyi azot kaynağı olarak skimmilk (624 IU/mL) ve metal iyonu olarak CaCl₂ (196 U/mL) elde edilirken, fiziksel parametreler içinde en iyi sonuçlar 30°C'de, pH 8.0'de, çalkalama hızı olarak 100 rpm, inokülasyon miktarı %3 ve inokülüm yaşı 3 gün olarak elde edilmiştir.

Proteaz üretimini artırmak amacıyla, çalışmada besinsel ve fiziksel koşulların optimize edilmesi ile oluşturulan modifiye ortamda EK20 mutanı temel besi ortamına göre %79'luk bir artışla enzim üretimi göstermiştir. Ana suş (60 U/mL) ile kıyaslandığında mutant KE20 modifiye ortamda (992 U/mL) 16.5 kat verim artışı sağlamıştır. Elde edilen mutant suşun endüstriyel ölçekte proteaz üretimi, büyük bir potansiyele sahip olabilir.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus*, Proteaz, Mutasyon, EMS, Besinsel Faktörler, Fiziksel Faktörler

2018, ix+ 75

ABSTRACT

MSc Thesis

MUTANT STRAIN IMPROVEMENT FROM BACILLUS SUBTILIS E6-5 BY CHEMICAL MUTAGENESIS (ETHYL METHANE SULFONATE, EMS) FOR ENHANCED PRODUCTION OF PROTEASE AND OPTIMIZATION OF GROWTH MEDIUM

Kübra ÖZDEMİR

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 EMS by classical mutation procedure, and 82 mutants were obtained. Among of these mutants, a mutant strain was selected based on its ability to produce highest zone formation (15 mm), and strain was named as *Bacillus subtilis* KE20. Obtained mutant was tested for enzyme production capacity in the liquid media, the mutant KE20 showed 9.2 fold increase in protease production over the parent strain *Bacillus subtilis* E6-5. It was found that mutant strain produced protease on maximum level at 48th 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 corn starch (560 IU/mL). Among the organic nitrogen sources, the highest enzyme production was obtained in the presence of skim milk (624 IU/mL), CaCl₂ (196 U/mL) was detected as effective as metal ion. In the physical parameters, the best results was obtained at 30°C, pH 8.0, 100 rpm agitation rate, 3% as inoculum size and 3 days as inoculum age.

A new medium was obtained by optimizing the incubation conditions (nutritional and physical factors) of protease production from KE20 mutant. In this medium, enzyme yield was enhanced 79% compared to basal medium. The production of protease by KE20 was increased 16.5 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, EMS, Nutritional Factors, Physical Factors

2018, ix+ 75

TEŞEKKÜR

Baştan en sona kadar tüm tez çalışmalarım süresince benden hiçbir koşulda bilgisini, deneyimini, sabrını ve hatta yeri geldiğinde şefkatini esirgemeyen, tanıdığım için kendimi çok şanslı hissettiğim, her anlamda yol gösterici olan canım gibi sevdiğim sevgili danışmanım Prof. Dr. Elif DEMİRKAN'a teşekkür ediyorum.

Hem laboratuvar çalışmaları hem de fazlasıyla motive eden psikolojik destekleri için çok sevgili hocam Arş. Gör. Tuba SEVGİ'ye teşekkür ediyorum.

Tezimin hazırlanma aşamasında desteklerini esirgemeyen, her zaman iyi niyetli ve yardımsever tavırlarından laboratuvar arkadaşlarım Baran Enes GÜLER, Büşra ÖZALPAR ve Behice ZEREN'e teşekkür ediyorum.

Her zaman yanımda olup, desteğini esirgemeyen, dostluğuyla en bunaldığım anlarda beni tekrardan motive eden canım arkadaşlarım Ender Deniz ASMAZ, Ebru AKIN, Elif AKIN, Kerem TOPRAKHİSAR ve Hakan AYDOĞAN'a teşekkür ediyorum.

Tüm hayatım boyunca yanımda olan, hiçbir konuda desteklerini esirgemeyen, her zaman sevgilerini hissettiren canım AİLEM'e teşekkür ediyorum.

Kübra Özdemir

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. Enzimler.....	3
2.2. Mikrobiyal Enzimler.....	7
2.3. Proteazlar.....	9
2.3.1. Proteazların Sınıflandırılması.....	11
2.3.1.1. Endopeptidazlar.....	13
2.3.1.2. Serin Proteazlar.....	13
2.3.1.3. Sistein/Tiyol Proteazlar.....	14
2.3.1.4. Aspartik Proteazlar.....	14
2.3.1.5. Metalloproteazlar.....	15
2.3.2. Oligopeptidazlar.....	15
2.3.3. Ekzopeptidazlar.....	15
2.3.3.1. Aminopeptidazlar.....	15
2.3.3.2. Karboksipeptidazlar.....	16
2.3.4. Omegapeptidazlar.....	16
2.4. Proteaz Kaynakları.....	17
2.4.1. Bitkisel Proteazlar.....	17
2.4.2. Hayvansal Proteazlar.....	18
2.4.3. Mikrobiyal Proteazlar.....	19
2.4.4. Proteazın Kullanım Alanları.....	21
2.4.4.1. Deterjan sanayisinde proteazlar.....	23
2.4.4.2. Deri sanayisinde proteazlar.....	24
2.4.4.3. Gıda sanayisinde proteazlar.....	26
2.4.4.4. Kozmetik ve ilaç sanayisinde proteazlar.....	27
2.4.4.5. Tekstil sanayisinde proteazlar.....	28
2.4.4.6. Gümüş eldesinde proteazlar.....	28
2.4.4.7. Atık işlemede proteazlar.....	29
2.5. <i>Bacillus</i> Genel Özellikleri.....	29
2.6. <i>Bacillus</i> Proteazının Genel Özellikleri.....	31
2.7. Mutasyon.....	32
2.7.1. EMS (Etil Metan Sülfonat) ile Mutagenizasyon.....	34
2.8. EMS Mutasyonu Tamir Mekanizması.....	36
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	38
3.1. Materyal.....	38
3.2. Yöntem.....	38
3.2.1. Kimyasal Mutajen EMS (Etil Metal Sülfonat) İle Yapılan Mutasyon çalışmaları.....	38

3.2.2. Bakteri Üretiminde Kullanılan Besiyerleri ve Bakteri Üretim Koşulları	39
3.2.3. Üremesinin ve Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi.....	40
3.3. Enzim Üretimi Üzerine Besinsel Faktörlerin Etkisi.....	41
3.3.1. Karbon (C) Kaynaklarının Etkisi	41
3.3.2. Azot (N) Kaynaklarının Etkisi	41
3.3.3. Metal İyonu Kaynaklarının Etkisi	42
3.4. Enzim Üretimi Üzerine Fiziksel Faktörlerin Etkisi	42
3.4.1. Sıcaklığın Etkisi	42
3.4.2. pH' nın Etkisi	42
3.4.3. Havalandırmanın Etkisi.....	42
3.4.4. İnokülasyon Miktarının Etkisi.....	42
3.4.5. İnokülasyon Yaşının Etkisi	43
3.5. Optimum Besinsel ve Fiziksel Koşulların Birleştirilmesi İle Modifiye Ortam Eldesi.....	43
4. BULGULAR.....	44
4.1. Mutant Bakterilerin Elde Edilmesi	44
4.2. Mutantların Kantitatif Olarak Proteaz Üretim Kapasitelerinin Saptanması	46
4.3. Tirozin Standart Grafiği ve Hazırlanışı.....	50
4.4. Enzim Üretimi Üzerine Etki Eden Besinsel Faktörler	50
4.4.1. Karbon Kaynaklarının Etkisi.....	51
4.4.2. Azot Kaynaklarının Etkisi.....	52
4.4.3. Metal İyonu Kaynaklarının Etkisi	53
4.5. Enzim Üretimi Üzerine Etki Eden Fiziksel Faktörler.....	55
4.5.1. Sıcaklığın Etkisi	55
4.5.2. pH'nın Etkisi	56
4.5.3. Havalandırmanın Etkisi (Çalkalama etkisi)	57
4.5.4. İnokülasyon Miktarının Etkisi.....	58
4.5.5. İnokülasyon Yaşının Etkisi	58
4.6. Maksimum Proteaz Üretimi İçin Modifiye Ortamın Hazırlanması	59
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	61
KAYNAKLAR	68
ÖZGEÇMİŞ	75

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde
(NH ₄) ₂ SO ₄	Amonyum Sülfat
°C	Santigrat Derece
Asp	Aspartik Asit
Ba ²⁺	Baryum İyonu
C	Sitozin
Ca ²⁺	Kalsiyum İyonu
CaCl ₂ .2H ₂ O	Kalsiyum Klorür Dihidrat
dk	Dakika
Fe ²⁺ / Fe ³⁺	Demir İyonu
FeSO ₄ .7H ₂ O	Demir Sülfat Heptahidrat
G	Guanin
g	Gram
g/mol	Mol Kütlesi
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
His	Histidin
HCl	Hidroklorik Asit
IU	Uluslararası Enzim Ünitesi
K ⁺	Potasyum İyonu
kb	Kilobaz
KCl	Potasyum Klorür
kDa	Kilodalton
kg	Kilogram
KH ₂ PO ₄	Potasyum Dihidrojen Fosfat
KI	Potasyum İyodür
KNO ₃	Potasyum Nitrat
LiSO ₄	Lityum Sülfat
Log	Logaritmik
M	Molar
mg	Miligram
Mg ²⁺	Magnezyum İyonu
MgSO ₄ .7H ₂ O	Magnezyum Sülfat
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
mmol	Milimol
Mn ²⁺	Mangan İyonu
MnSO ₄ . 7H ₂ O	Mangan Sülfat Heptahidrat
Na	Sodyum
Na ²⁺	Sodyum İyonu
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	Disodyum Hidrojen Fosfat Heptahidrat
NaCl	Sodyum Klorür
NaDPH ₂ .Na ₄	Dihyronicotinamide AdeninDinucleotide
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	Sodyum Dihidrojen Fosfat Dehidrat
NaHPO ₄	Sodyum Fosfat

NaNO₃
NH₄Cl
NH₄NO₃
nm
P
pKa
logaritması
R₂
Ser
UV
Zn²⁺
ZnCl₂
ZnSO₄
α
β
μL
μm
μM
μmol

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
Biyoloji 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
Etidiyum Bromid
Metil Metansülfonat
Histidin
Uluslar Arası Biyokimya ve Moleküler

Moleküler ağırlık
Optik Densite
Phenylmethylsülfonil Fluoride
Revolutions Per Minute
Saniye
Serin
Tür
Ultraviyole
Trikloro asetik asit
Maksimum enzim aktivitesi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Küresel enzim pazarının 2015- 2024 yılları arasındaki değişimi ..	7
Şekil 2.2. Proteazların katalitik mekanizması	9
Şekil 2.3. Proteazların sınıflandırılması	11
Şekil 2.4. Omega peptidazların etki mekanizması	16
Şekil 2.5. Proteazların endüstride kullanım yüzdeleri	22
Şekil 2.6. Coğrafi olarak dünya çapında proteaz enzimi market payı 2013-2019 arası	22
Şekil 2.7. <i>Bacillus</i> sp.'nin mikroskopik görüntüsü	30
Şekil 2.8. EMS yapısı.....	34
Şekil 2.9. EMS Guanin ve Timin bazı üzerine etki mekanizması	35
Şekil 2.10. MGMT tarafından katalize edilen "intihar mekanizması" reaksiyonu	37
Şekil 2.11. Hasarın doğrudan geri döndürülmesi.....	37
Şekil 4.1. Ana suş <i>Bacillus subtilis</i> E 6-5'in yağsız süt tozlu ortamındaki proteaz zon çapı (8 mm)	45
Şekil 4.2. Mutantların yağsız süt tozlu ortamdaki proteaz zon çapları	46
Şekil 4.3. <i>Bacillus subtilis</i> E6-5 'in proteaz üretim kapasitesi ve üreme değerlerinin zamana bağlı değişimleri.....	47
Şekil 4.4. KE20'nin proteaz üretim kapasitesi ve üreme değerlerinin zamana bağlı değişimleri.....	48
Şekil 4.5. KE35-1'in proteaz üretim kapasitesi ve üreme değerlerinin zamana bağlı değişimleri.....	48
Şekil 4.6. KE35-2'nin proteaz üretim kapasitesi ve üreme değerlerinin zamana bağlı değişimleri.....	49
Şekil 4.7. KE35-3'ün proteaz üretim kapasitesi ve üreme değerlerinin zamana bağlı değişimleri.....	49
Şekil 4.8. Tirozin standart grafiği	50
Şekil 4.9. Karbon kaynaklarının 48. saatte, KE20'nin proteaz üretim kapasitesi üzerine etkileri.....	52
Şekil 4.10. Azot kaynaklarının 48. saatte KE20'nin proteaz üretim kapasitesi üzerine etkileri	53
Şekil 4.11. Metal iyonların 48. saatte KE20'nin proteaz üretim kapasitesi üzerine etkileri	54
Şekil 4.12. Sıcaklık faktörünün 48. saatte, KE20'nin proteaz üretim kapasitesi üzerine etkileri.....	55
Şekil 4.13. pH faktörünün 48. saatte KE20'nin proteaz üretim kapasitesi üzerine etkileri.....	56
Şekil 4.14. Havalandırma faktörünün 48. saatte KE20'nin proteaz üretim kapasitesi üzerine etkileri.....	57
Şekil 4.15. İnokülasyon miktarının48. saatte KE20'nin proteaz üretim kapasitesi üzerine etkileri.....	58
Şekil 4.16. İnokülasyon yaşının 48. saatte KE20'nin proteaz üretim kapasitesi üzerine etkileri.....	59

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Katalitik mekanizmalarına göre proteaz sınıfları.....	13
Çizelge 2.2. Hayvansal proteazların özgünlüğü.....	18
Çizelge 2.3. Dünya çapında üretilen enzim tabanlı deterjanlar ve enzim kaynağı olan bakteri türleri.....	24
Çizelge 2.4. Deri sanayisinde kullanılan bazı <i>Bacillus</i> türleri	25
Çizelge 3.1. Bakterilerin saklanması, geliştirilmesi ve enzim üretim kapasitesinin ölçülmesinde kullanılan besiyerleri.....	39
Çizelge 4.1. <i>Bacillus subtilis</i> E 6-5'in hayatta kalma oranı üzerine EMS etkisi..	44
Çizelge 4.2. Farklı konsantrasyonlardaki EMS denemeleri sonucu elde edilen mutant suşların koloni ve zon çapları.....	45
Çizelge 4.3. Ana suş ve bunun mutant suşlarının proteaz üretim..... kapasitelerinin zamana bağlı karşılaştırılması	47
Çizelge 4.4. Farklı karbon kaynaklarının 48. saatte, KE20'nin enzim üretimi ve üreme üzerine etkileri.....	51
Çizelge 4.5. Farklı azot kaynaklarının 48. saatte KE20'nin enzim üretimi ve üreme üzerine etkileri.....	53
Çizelge 4.6. Metal kaynaklarının 48. saatte KE20'nin proteaz aktivitesi ve üreme miktarı üzerine etkileri	54
Çizelge 4.7. Sıcaklığın 48. saatte KE20' nin proteaz üretim kapasitesi üzerine etkileri	55
Çizelge 4.8. pH'nın 48. saatte KE20' nin proteaz üretim kapasitesi üzerine etkileri	56
Çizelge 4.9. Havalandırmanın 48. saatte KE20' nin proteaz üretim kapasitesi üzerine etkileri	57
Çizelge 4.10. İnokülasyon miktarının 48. saatte KE20' nin proteaz üretim kapasitesi üzerine etkileri.....	58
Çizelge 4.11. İnokülasyon yaşının 48. saatte KE20' nin proteaz üretim kapasitesi üzerine etkileri.....	59
Çizelge 4.12. Kontrol ortamı ile modifiye ortamın üreme ve enzim üretim kapasitesi üzerine etkileri.....	60

GİRİŞ

Enzimler bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmaların yaşamı için temel olan protein yapısında biyomoleküllerdir ve metabolik yollara ve süreçlere katkılarından dolayı yoğun bir şekilde çalışılmaktadır. Enzimler günümüzde endüstriyel uygulamalarda önemli yer tutmaktadır ve enzim teknolojisi adı altında yeni bir teknoloji doğmuştur. Enzim teknolojisi; ekonomik, etkili ve biyoteknolojik tekniklere olan büyük ihtiyaç nedeniyle önem kazanmıştır. Böylece yeni tür enzimlerin büyük ölçekte ve ekonomik üretilmesi sağlanmıştır. Bir enzimin endüstride kullanılabilir olması için maliyet bakımından ucuz olması, çok farklı alanlarda kullanılabilmesi ve en önemlisi de alerjik ya da toksik etkiye sahip olmaması gerekmektedir (Özdemir 2013). Endüstriyel üretim süreçlerinde, kimyasal yöntemler yerine çevre dostu bir yöntem olarak enzimlerin kullanılması enzim teknolojisinin önemini arttırmaktadır.

Mikroorganizmalardan elde edilen ekstrasellüler enzimler endüstride birçok amaç için kullanılmaktadır (Appak 2006). Ekstrasellüler enzimler hücre içinde sentezlendikten sonra dışarı salınarak buradaki gıda moleküllerinin ayrışmalarını ve hücre duvarından geçebilecek düzeye inmelerini katalize ederler. Bu tarz aktivite gösteren enzimler başlıca proteazlar (peptidaz, jelatinaz, kollajenaz, kazeinaz, fibrinolizin), karbohidrazlar (sellülaz, amilaz, maltaz, laktaz, sükröz, hiyaluronidaz), lipazlar ve nükleazdır.

Proteaz enzimi, tüm canlı varlıklarda bulunan, büyüme ve çoğalma için gerekli olan bir enzimdir. Proteazlar; proteinlerdeki peptid bağlarının hidrolizini katalizleyen enzimdir (Salleh ve ark 2006). Proteinlerin hidrolizinde spesifik olarak katalitik rol oynayan, fizyolojik ve ticari açıdan oldukça önemli enzimlerden biridir (Taylor ve ark. 1979). Proteazlar biyoteknoloji ve endüstrinin birçok sektöründe yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle farmasötik, gıda, tekstil, deri ve yem endüstrileri gibi çeşitli sektörlerde geniş kullanım potansitellerine sahiptir. Dünya genelinde endüstriyel enzim pazarı 1.4 milyar USD dolayında olup, yılda %10'un üzerinde pazar ağı artışı ve % 4-5 oranında satış artışı ile önemli bir pazar payına sahiptir. Proteazlar, toplam endüstriyel enzim ticaretinin yaklaşık %60'ını oluşturmaktadır (Kıran ve ark. 2006).

Genel olarak mikroorganizmalardan yüksek miktarda enzim verimi elde edilebilmesi için ya mutasyona uğratarak yeni suşlar oluşturulmakta ya mikroorganizmalar doğrudan izole edilmekte ya da üretim ortamının değiştirilmesi gibi işlemler gerçekleştirilmektedir. Özellikle besin ortamında var olan karbon ve nitrojen kaynaklarının, inorganik tuzlar ve diğer büyüme faktörlerinin, bakterilerin enzim üretim verimi üzerinde önemli etkisi bulunmaktadır (Khalil ve ark. 2003). Klasik mutasyon yöntemleriyle yeni mutantların elde edilmesi ve bu sayede ana suştan daha verimli enzim üretimi yapılması mümkündür. Çoğu araştırmacı endüstriyel öneme sahip olan proteaz enzimini yüksek verimde üretebilen yeni suşlar elde edebilmek amacıyla çeşitli mutajenleri mutasyon etkeni olarak kullanılmışlardır.

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 şusu kullanılarak, kimyasal mutajen kaynağı olan EMS ile verimli mutant suşların 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, inokülasyon yaşı ve inokülasyon miktarı gibi fiziksel faktörlerin etkisi araştırılarak üreme ortamı optimize edilmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1 Enzimler

Enzimler, tepkimeye girerek aktivasyon enerjisini düşüren ancak kendisi etkilenmeden çıkan biyolojik katalizörlerdir. Enzimler canlı hücreler tarafından meydana getirilen, ancak etkisini gösterebilmesi için hücrenin varlığını gerektirmeyen, ısıya dayanıksız maddelerdir (Ası 1999).

Metabolizma reaksiyonlarının pek çoğunu hızlandıran protein yapısında biyolojik katalizörler olarak da tanımlanan enzimler; besleyici moleküllerin yıkıldığı, kimyasal enerjinin depolandığı ve şeklinin değiştirildiği, basit prekürsörlerden biyolojik makromoleküllerin oluşturulduğu metabolik yollarda, yüzlerce reaksiyon basamağını katalizlerler. Hücrelerde önemli faaliyetler çeşitli metabolizma reaksiyonları enzimlerin katalitik etkisiyle mümkün olmaktadır (Ası 1999).

Enzimler, binlerce yıldır içecek, ekmek ve peynir yapımı gibi işlemlerde varlığı ve görevi bilinmeden kullanılmıştır. İlk bulgular eski Mısır'a kadar dayanmaktadır. Yakın tarihte ise doğu ülkelerinde birçok gıda fermentasyonu için ipliksi mantarlar enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Batıda 1896'da gerçek modern mikrobiyal enzim teknolojisi 'takadiastase'in ticareti ile başlamıştır. Bu doğudan batı toplumuna önemli bir teknolojik transferdir (Smith 1996).

Enzim terimi ilk kez W. Kühne tarafından 'in yeast' (maya içinde) anlamında kullanılmıştır. İnsanlar çok eski tarihlerden beri enzimatik reaksiyonlardan yararlanmışlardır ve şarap, ekmek, yoğurt, boza vb. üretimleri yapmışlardır. Ancak, bu maddeleri üretebilmek için enzimleri ve enzimlerin katalitik etkilerinin nasıl olduğunu bilmeden faydalanmışlardır. İlk kez 1833 yılında Payen ve Persoz alkol kullanmak suretiyle malt ekstresinden nişastayı sindiren enzimi presipitasyon (çökelme) yolu ile ayırt etmiş ve buna Diyastaz adını vermişlerdir. 1836'da Schwan mide suyundan Pepsin enzimini elde etmiştir. Fakat kristal halde bulunan ilk enzim olan Üreaz ancak 1926 yılında Summer tarafından izole edilmiştir. 2000 kadar enzimin identifikasyonu yapılmış bunlardan 250 kadarı da kristal halde elde edilmiştir (Ası 1999). 1930'larda 80

adet enzim tanınırken, 1968’lerde bu rakam 1.300’e 1982’de 2.000’e yükselmiştir. Günümüzde 25.000 enzimin olduğu bilinmektedir ve yine enzimlerle ilgili çalışmalar hızlı bir şekilde devam etmektedir (Kıran ve ark. 2006).

Enzimlerin kimyasal katalizörlerden en önemli farkı özgül (spesifik) olmalarıdır. Enzimler spesifik aktiviteye sahip proteinler oldukları için, enzimin bu özelliği substratla geçici olarak enzim-substrat kompleksini kurmasına olanak sağlar. Bu geçici kompleks sayesinde ürünler oluşur, daha sonra enzim substrattan ayrılarak tekrar eski haline geri döner. Substratın enzimin üzerinde bağlandığı aktif bölgeye ise katalitik bölge denir. Substratın enzime bağlanması anahtarın kilide uyması gibi bir uyum gösterir. Enzimler substratlarına çok yüksek özgünlük gösterdikleri için kendine uyumlu tek bir substratla bağlanarak tek bir ürün oluştururlar (Chaplin ve Bucke 1990). Enzimler protein yapısında ve kolloidal karakterde olduklarından, fiziksel (ısı, pH, UV-ışınları, osmotik basınç, vs.) ve kimyasal (asit, alkali, metabolitler, mineraller, vs.) faktörlerden etkilenirler.

Katalitik RNA hariç bütün enzimler protein yapısındadırlar. Enzimler, proteinlere ait olan tüm yapısal özellikleri gösterirler. 12.000 kDa’dan 1.000.000 kDa üzerine kadar moleküler ağırlıklara sahiptirler. Enzimlerin katalitik aktiviteleri, doğal protein konformasyonlarının bütünlüğüne bağlıdır; bir enzim denatüre edilirse katalitik aktivitesi yok olmaktadır. Enzim proteinlerinin primer, sekonder, tersiyer ve kuarterner yapıları, katalitik aktiviteleri için esastır (Anonim 2017). Bazı enzimler aktivite için, protein yapıyı oluşturan aminoasit kalıntılarında başka kimyasal bileşenlere ihtiyaç duymazlar. Bazı enzimler ise kofaktör (metaller) veya koenzim (vitaminler) şeklinde adlandırılan kimyasal bileşenlere gereksinim duyarlar. Kofaktörü ile birlikte tam, katalitik olarak aktif bir enzim, holoenzim şeklinde isimlendirilmektedir. Holoenzimin protein kısmı apoenzim veya apoprotein olarak adlandırılır. Koenzimlerin enzim proteinine kovalent olarak bağlı olan ve enzim proteininden ayrılmayanlar prostetik grup olarak adlandırılmaktadır. Koenzimlerin enzim proteinine nonkovalent olarak bağlı olan enzim proteininden ayrılabilenleri ise kosubstrat şeklinde isimlendirilir (Anonim 2017).

Enzimlerler tarafından katalizlenen, tepkimeye giren kimyasal moleküllere substrat adı verilir. Birçok enzim, substratlarının adını veya aktivitelerini tanımlayan bir kelime veya sözcük grubuna “az” son eki eklenerek adlandırılırlar. Üreaz, amilaz, arjinaz, proteaz ve lipaz, substratı tanımlayan; DNA polimeraz, laktat dehidrojenaz ve adenilat siklaz, tepkimeyi tanımlayan adlandırmalardır. Karışık isimlendirmelerden dolayı bazen aynı enzim için iki veya daha fazla isim kullanılabilirken; bazen de iki farklı enzim için aynı isim kullanılma yoluna gidilmiştir. Böyle belirsiz anlamsızlıklar ve yeni keşfedilen enzimlerin sayısının sürekli artması nedeni ile uluslararası enzim birliği tarafından enzimlerin isimlendirilmesi ve sınıflandırılması için yeni bir sistem benimsenmiştir (Anonim 2017)

Enzim komisyonunun raporuna göre enzimler katalizlemiş oldukları reaksiyonlara göre 6 ana sınıfa ayrılmaktadırlar. Bunlar;

1. Oksidoredüktazlar: Bu sınıftaki enzimler Oksidasyon-redüksiyon (yükseltgenme-indirgenme) reaksiyonlarını katalize ederler.
2. Transferazlar: Bir fonksiyonel grubun (örneğin fosfat ya da metil grubu) transferini sağlayan enzimlerdir.
3. Hidrolazlar: Hidrolitik reaksiyonların katalizini sağlayan enzimlerdir.
4. Liyazlar: Bu sınıfta yer alan enzimler C-C, C-O ve C-N arasındaki mevcut bağları okside ya da hidroliz reaksiyonlarından farklı şekilde kırarlar. Kırılan atomlar arasında çift bağ oluştururlar.
5. İzomerazlar: Optik veya geometrik izomerlerin rasemizasyonu tepkimelerini katalize eden enzim grubudur.
6. Ligazlar (Sentetazlar): C-O, C-S, C-N ve C-C atomları arasında bağ oluşturulmasını katalize eden enzim sınıfıdır. Bu sınıfta yer alan enzimler çoğunlukla ATP'deki veya diğer trifosfatlardaki pirofosfatı hidrolizleyerek iki molekülün bağlanmasını sağlarlar.

Enzimler sistematik adlandırmada enzim komisyonu (Enzyme Commission: EC) tarafından verilmiş dört rakamdan oluşan kod numarası (EC 1.2.3.4) ile isimlendirilmektedir. Bunlar;

1. İlk rakam, enzimin altı sınıfından hangisinde bulunduğunu gösterir,
2. İkincisi, enzimin alt sınıfını (Subclass) belirtir,

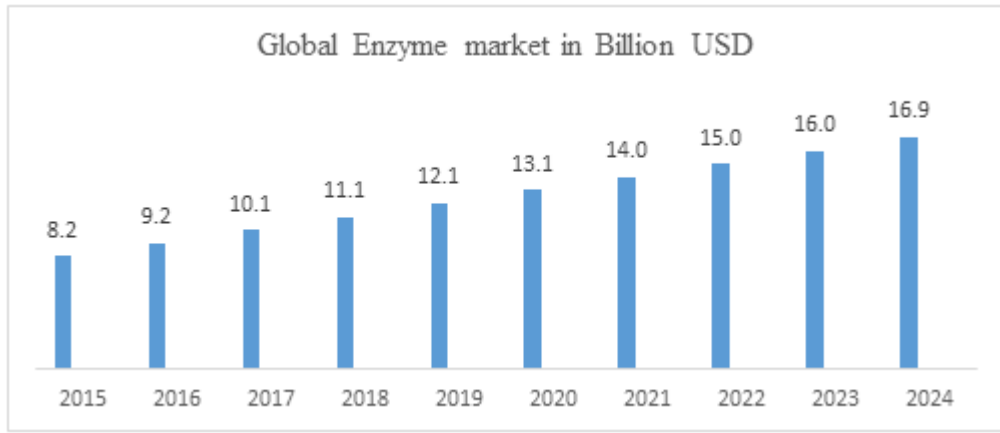
3. Üçüncü rakam, ikinci alt gubunu (Sub-Subclass),
4. Dördüncü rakam ise enzimin sub-subclass içindeki seri numarasını gösterir (Anonim 2017).

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

Enzimlerin dokulardaki ve hücrelerdeki derişimi çok düşük miktarlarda olduğundan ölçümünü sağlamak oldukça güçtür. Bu yüzden enzimin katalitik aktivitesini ölçmek en doğru yoldur. Bu nedenle enzim miktarı, enzim derişimiyle doğru orantılı bir şekilde oluşan ürün miktarının ölçülmesiyle saptanır. Biyolojik reaksiyonlarda görev alan birçok enzim "Enzim Ünitesi" birimiyle ifade edilmekte ve Uluslararası Ünite =IU şeklinde gösterilmektedir. Enzim ünitesi 1 mikromol substratın normal şartlar altında değişmesini katalizleyen enzim miktarı şeklinde ifade edilir. Enzimlerle yürütülen endüstriyel işlemler daha hesaplı ve nitelikli ürün oluşmasını sağlamaktadır. Bugün, endüstriyel alanda kullanımı olan birçok enzim mikrobiyal kökenlidir ve ekonomik olarak da hesaplıdır. Bundan dolayı endüstriyel enzim üretiminde mikroorganizmaların kullanılması yaygınlaşmıştır. Biyoteknolojik gelişmelerle orantılı olarak üretimde zamandan kazanç sağlanması, yönlendirilmiş mutasyonları basit ve hızlıca yanıtlamaları ve daha kaliteli enzim üretebilmeleri sebebiyle mikroorganizmalar kusursuz enzim kaynaklarıdır. Özellikle son yıllarda rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak enzim üretiminde oldukça yüksek boyutlara ulaşılmış ve kullanımı da hızla yaygınlık göstermiştir (Aehle 2004).

Bazı araştırmacılar yeni enzimlerin doğal kaynaklardan saflaştırılması ve karakterizasyonu ile ilgili çalışmalar yürütürken, bir grup araştırmacılar da enzimlerin dinamik üretimi ve kullanıldığı alanlarla ilgili çalışmalara yönelmektedirler. Enzimler biyokimya dalının önemli çalışma alanlarından biri olduğundan dolayı bilhassa biyokimyacılar tarafından fazlaca çalışılmakta, bununla birlikte günümüzde farklı alanlarda da önem kazanmaktadır. Bu alanlardan bazıları tekstil mühendisliği, kimya mühendisliği, gıda mühendisliği, biyomühendislik, kimya, biyoloji, mikrobiyoloji ve biyoteknolojidir (Celep 2010). Ticari olarak kullanılan enzimlerin %60'ı proteazlar,

%28'i karbohidrazlar, %3'ü lipazlar ve %10'u ise diğerk enzimlerdir. Küresel enzim pazarı 2015 yılında 8.2 milyar dolar olarak saptanmıştır. Proteaz enzimleri en önemli endüstriyel enzimlerdir ve tahmini değeri 2016-2024 yılları arasında % 6.6 CAGR (The compound annual growth rate: Bileşik yıllık büyüme oranı) ile 16.9 milyar dolara ulaşacağı tahmin edilmektedir. Enzimin sınırlı enerji tüketimi ve katalitik doğası (daha iyi substrat aktivitesi) nedeniyle maliyet düşüşlerinin pazar büyümesi için önemli bir faktör olarak kalması beklenmektedir (Anonim 2018), (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Küresel enzim pazarının 2015- 2024 yılları arasındaki değışimi (Anonim 2018)

2.2. Mikrobiyal Enzimler

Tarihsel gelişim süreci yönünden bakıldığında enzimlerin çok farklı kaynaklardan elde edildiğı görülmektedir. Bunlar bitkisel, hayvansal ya da endüstriyel anlamda ihtiyacı karşılayabilen mikrobiyal kaynaklı enzimler şeklindedir (Gupta ve ark 2003).

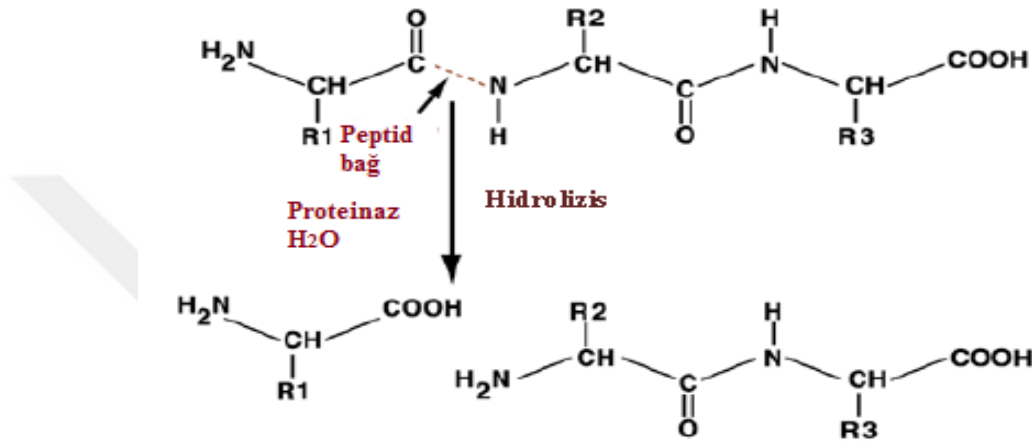
Endüstrinin neredeyse her alanında kullanılan enzimler çoğunlukla mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bunun sebebi mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve hesaplı olmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleridir (Kıran ve ark 2006). Bazı özel uygulamalar için bitkisel ve hayvansal kaynaklı enzimler özel önemlerini korumakla birlikte son 30 yıldan beri teknik uygulamalar için mikrobiyal kaynaklar ağırlık kazanmaya başlamıştır (Tosun 2006).

Mikroorganizmalar, biyokimyasal çeşitlilikleri ve genetik yönlendirmelere uygunlukları gibi nedenlerden dolayı mükemmel bir enzim kaynağı olarak değerlendirilmektedir (Rao ve ark 2009).

Günümüzde endüstride kullanılan enzimlerin yaklaşık %90'ı mikroorganizmaların fermantasyonu ile üretilmektedir (Godfrey ve West 1996). Mikrobiyal enzimlerin kaynakları, doğal ortamlarından izole edilmiş olan organizmalardır. Bu organizmalar aynı zamanda birden farklı enzim üretme yeteneğine sahip olabilirler. Bu mikroorganizmalar sadece enzim üretimlerine bakılarak değil aynı zamanda toksik veya patojen özellikte olmamalarına göre de seçilirler. Bu sebeple de endüstriyel alanda kullanılacak suşların, mutant özellikte olmaları ve yeteneklerini uzun süre korumaları arzu edilir. Ticari öneme sahip olan enzimler genellikle hidrolazlardır ve bunlar da mikrobiyal kökenlidir. Bu enzimler genellikle ekstrasellüler şekilde bulunur ve yüksek moleküler ağırlığa sahip olan substratlarla çalışırlar. Ekstrasellüler enzimler, besiyeri ve hücre duvarının dışı ile bağlantılı olan enzimler diye geçerler (Kıran ve ark. 2006). Mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin tüm dünya genelinde yıllık kullanım oranlarına bakıldığında % 25 alkalın proteaz, % 21 diğer proteazlar, % 18 amilaz, % 10 renin, % 3 tripsin, % 3 lipaz, % 10 diğer karbohidrat parçalayan enzimler (selülaz ve ksilenaz gibi) ve % 10 kadar ise analitik ve farmasötik enzimlerdir (Rao ve ark. 1998). Bu enzimlerin endüstriyel kullanımda farklı alanlara yönelik dağılımına bakıldığında, % 29'unun gıda sektöründe, % 15'inin hayvan yem sektöründe, % 56'sının ise genel teknik alanlarda kullanımı olduğu saptanmaktadır (Kirk ve ark. 2002, Schallmey ve ark. 2004). Endüstriyel alanda kullanılan enzimler farklı biyolojik kaynaklardan üretilmektedirler. Bunların yaklaşık % 60'ı filamentöz fungi, %24'ü bakteriler, %6'sı hayvanlar, %4'ü mayalar ve %2'si *Streptomyces* tarafından üretilmektedir (Lowe, 2001).

2.3. Proteazlar

Proteazlar, polipeptit veya protein zincirlerinin hidrolizini katalizleyen, proteinaz ya da peptidaz şeklinde tanımlanan enzimlerdir. Proteazlar, proteinin polipeptit zincirindeki amid bağlarını hidrolize ederek parçalanmasını sağlar. Proteazlar, sindirim sistemi içerisinde fazla miktarda var olması sebebiyle ilk keşfedilen enzimlerin arasındadır (Fersth 1998), (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Proteazların katalitik mekanizması (Polgar 1989)

Farklı hidroliz işlemlerine göre proteazlar farklı etkinlik göstermektedirler. Örneğin, bir aspartil proteaz hidroliz işlemini genel asit-baz mekanizmasıyla gerçekleştirir ve su direkt tepkimeye katılırken, sistein proteazların aktivite gösterebilmeleri açılasyon-deaçilasyon mekanizmalarına bağlıdır (Bell 2006).

Proteazların peptid bağını hidroliz etmeleri sırasında gerçekleşen üç olay mevcuttur. Birincisi, amid nitrojeninin karbonil grubuna elektron transfer ederek oldukça kararlı amid bağı oluşturmalarıdır. İkincisi, genel baz mekanizması ile zayıf bir nükleofil olan suyu aktive etmeleridir. Üçüncüsü ise proteazların amin grubunu yapıdan ayrılmadan önce protonize etmeleridir (Hedstrom 2002).

Proteazların değişik kaynaklardan izole edilebilen bazı sınıflarının, nötral pH'nın üzerindeki bazı pH değerlerinde de kataliz etme yetenekleri endüstriyel alanda önem kazanmalarına neden olmuştur (Kumar ve Takagi 1999).

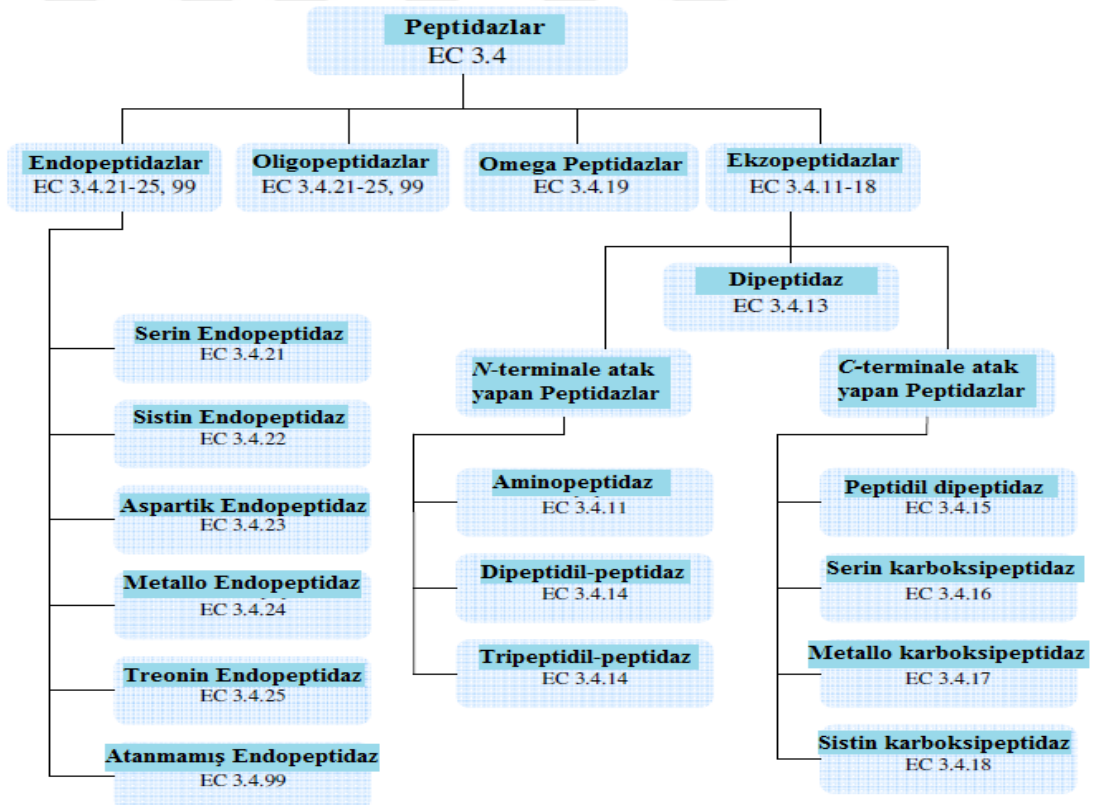
Proteazlar üzerinde ilk çalışmalar, 1783 yılında, Spallanzani ile başlamıştır. Bu araştırmacı mide sıvısının protein parçalama özelliğinde olduğunu saptamıştır (Aunstrup1973). 1836 yılında ise Schwann, pepsinin de benzer etkiyi gösterdiğini ortaya koymuş ve bu enzimi yüksek oranda saflaştırabilmiştir. Aynı yıllarda çeşitli kaynaklardan proteolitik enzimler izole edilmiş ve mide sıvısından elde edilene ‘pepsin’, pankreastan salgılanan ‘tripsin’, bağırsak mukozasından elde edilene ise ‘erepsin’ adı verilmiştir. 1913 yılında, Boidin ve Effront, bir *Bacillus subtilis* spp.’den amilaz ve çok az da proteaz içeren enzim preparatı hazırlamışlardır. 1930’larda Bergman ve arkadaşları, proteinlerin peptid bağlarının enzimlerle parçalandığını bildirmişlerdir. 1940-42 yıllarında ise, enzimlerin spesifikliği üzerine yapılan çalışmalarda, her enzimin belirli etkileri olduğu açıklanmış ve pepsin, tripsin, kimotripsin, papain gibi hayvansal ve bitkisel orjinli proteazları saflaştırma çalışmaları yapılmıştır. *Bacillus* ve *Aspergillus* sp.’ler tarafından sentezlenen mikrobiyal proteazlar ise, 1950-52 yılları arasında izole edilmiştir (Bulut 2007). Proteaz sentezinin hücresel kontrolünde sorumlu mekanizma henüz tam olarak bilinmemekle birlikte proteazların üretimi aminoasit veya amonyum gibi hızlı bir şekilde metabolize edilebilen azot kaynakları ile baskılanmaktadır (Yıldırım 2010).

Endüstriyel talepler, araştırmacıları proteolitik enzimlerin; spesifik ve kararlı şekilde devam eden, metal iyonlarına, yüksek sıcaklığa, yüksek pH’a, organik çözücülere dayanıklı yeni enzim kökenleri araştırmaya teşvik etmektedir. Bu beklentiler doğrultusunda; yüksek alkali şartlarda kararlı ve yüksek aktiviteye sahip, yüksek sıcaklıklara dayanıklı olan biyomühendislik ve biyoteknoloji için uygulanabilir enzim gubu olan proteazlar karşımıza çıkar (Yağcı 2007). Toplam endüstriyel enzim ticaretinin %59’unu kapsayan proteazların 1994 yılında 400 milyon dolar olan endüstriyel enzim gelirinin 112 milyon dolarlık kısmını deterjan katkı maddesi olarak kullanılan proteazlar oluşturmuştur (Kumar ve Takagi 1999). Bu rakam 2009 yılında 220 milyar dolara ulaşmıştır (Rao ve ark. 2009).

2.3.1. Proteazların sınıflandırılması

Proteazlar sınıflandırılırken hidroliz için göreceli seçicilik esası üzerinden daha geniş kapsamlı sınıflandırılmaya gidilmiştir. Bunlar; iki büyük sınıf olan endopeptidazlar (büyük proteinlerin uçlarından uzağa atak yapanlar) ve ekzopeptidazlara (polipeptidin ucuna atak yapanlar), iki küçük sınıf olan oligopeptidazlar (küçük proteinlerin uçlarından uzağa atak yapanlar) ve omega-peptidazlara (proteinlerin uçlarına hareket edenler) ayrılmışlardır. Bu iki büyük sınıf etkinlik gösterme şekillerine, etki mekanizmalarına ve etkinlik sağlanan bölgeye göre ayrılırlar (Barrett 1998). Sınıflandırmanın yapılış şekli Enzim Komisyonları Adlandırma Komitesi (IUBMB) tarafından ileri sürülmüştür (Anonim 1994).

Bu terminolojinin genel detayları Şekil 2.3' de verilmiştir (Ather 2009).



Şekil 2.3. Proteazların sınıflandırılması (Ather 2009)

Proteazlar katalitik etkinlikleri göz önüne alınarak Endoproteazlar ve Ekzoproteazlar şeklinde kısımlara ayrılırlar. Ekzoproteazlar bir peptit substratı ile bölünmüş olduğu ucuna göre aminopeptidazlar ve karboksipeptidazlar şeklinde incelenirken,

Endopeptidazlar substrata ait peptit zincirini uç kısımdan uzaktaki bir yerden ayırmaktadırlar. Ekzopeptidazların etkinliğini; polipeptid uçlarında yer alan spesifik amino asitler, ayrılacak olan peptid bağının yakınında bulunan polipeptid zincirinin sahip olduğu konformasyon ve peptidin sahip olduğu uzunluk belirlemektedir (Chaplin ve Buckle 1990).

Aminopeptidazlar, polipeptid zincirindeki serbest amino grubunun hidrolizini katalizler ve tek bir amino asitin, dipeptidin veya tripeptidin ayrılmasını sağlar. Aminopeptidazlar çoğunlukla bakteri veya mantar ihtiva eden mikrobiyal türlerde bulunmaktadır. Farklı bakteri türlerinden elde edilmiş olan aminopeptidazlar, farklı molekül kütlelerine sahip olabilirler ve gereksinimleri olan optimum pH dereceleri ve hassaslık gösterdikleri iyonlar da farklılıklara sahip olabilmektedir (Rao ve ark. 1998).

Karboksipeptidazlar polipeptid zincirindeki serbest karboksi grubundan hidroliz reaksiyonunu gerçekleştirirler ve tek bir aminoasitin ya da bir dipeptidin ayrılmasını sağlar. Karboksipeptidazlar (CP) ; serin, metalloproteaz, sistein, dipeptidil dipeptidaz ve dipeptidaz şeklinde alt sınıflara ayrılmaktadırlar (Duran ve ark. 2007). Serin karboksipeptidazlar karakteristik olarak bulunan ve aktif bölgelerinde yer alan; Ser, Asp ve His amino asitlerinden meydana gelmiş katalitik üçlüyü içerirken metallo karboksipeptidazlar ise yapısına güçlü bir şekilde bağlanmış olan çinko atomuna sahiptirler (Raksakulthai ve ark. 2003).

Endopeptidazlar polipeptid zincirindeki belli peptit bağlarıyla hidrolize olmaktadır (Flores ve ark 1999). Katalitik etkinlikleri baz alınarak serin proteaz (E.C.3.4.21), sistein proteaz (E.C.3.4.22), metallo proteazlar (E.C.3.4.24) ve aspartik proteaz (E.C.3.4.23) şeklinde sınıflandırılmaktadırlar (Çizelge 2.1.).

Çizelge 2.1. Katalitik mekanizmalarına göre proteaz sınıfları (Shimogaki ve ark. 1991)

Sınıf	Katalitik kısım	örnek
Serin	Ser ¹⁹⁵ (His ⁵⁷ , Asp ¹⁰²)	kimotripsin, tripsin, elastaz, trombin, proteinaz 3, faktor Xa, katepsin G,
Sistein	Sis ²⁵ (His ¹⁵⁹)	katepsin B,L,S
Aspartik	Asp ³² (Asp ²¹⁵)	pepsin HIV proteaz, rennin, katepsin D
Metallo	Zn ²⁺	anjiotensin dönüştürücü enzim (ACE) , MMP-2, MMP-9

2.3.1.1. Endopeptidazlar

Endopeptidazlar polipeptit zinciri iç tarafındaki peptit bağları üzerine etkileri veya polipeptit zincirindeki N ucu ve C ucuna uzaktaki peptit bağlarına olan etkilerine bakılarak gruplandırılmaktadırlar. Enzim etkinliklerine negatif etki eden faktörlerden biri ortamda serbest halde bulunan amino ya da karboksil grupları olmasıdır.

Endopeptidazlar; serin proteaz, sistein proteaz, aspartik proteaz ve metalloproteazlar şeklinde dört alt gruba ayrılarak incelenmektedirler.

2.3.1.2. Serin proteazlar (EC 3.4.2.1)

Aktif bölgelerinde serin grubu varlığına sahip olmalarıyla karakterize edilmektedirler. Virüsler, bakteriler, ökaryotlar hem çeşitli ve hem de yaygın şekilde bulunmalarından dolayı organizmalar açısından fazlasıyla önemli oldukları düşünülür. Serin proteazlar 20 adet familyaya ayrılırlar ve bunlar 6 farklı klana ayrılmaktadır. Bu gruplandırma serin proteazların yapısal benzerlikleri göz önüne alınarak yapılmaktadır. Kimotripsin (SA), subtilisin (SB), karboksipeptidaz C (SC) ve *Escherichia* D-Ala-D-Alapeptidaz A (SE) klanlarına mensup canlılar arasında akrabalık yoktur. Yani serin proteazların evrimsel kökeninde en az dört ayırım mevcuttur. (Deshpande ve ark. 1998). Serin proteazlar 3,4-cischloroisocoumarin (3,4-DCI), L-3-carboxytrans 2,3-epoxypropyl-leuclamido (4-guanidine) butane (E.64), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) ve tosyl-L-lysine

chloromethyl ketone (TLCK) ile geri dönüşümü olmayan şekilde inhibe olmaları ile de bilinirler. Serin proteazlar çoğunlukla pH 7.0-11.0 arasında aktiflik göstermektedirler. İzoelektrik noktaları pH 4.0-6.0 arasında farklılık göstermektedir. Alkali pH değerlerinde etkinlik gösteren serin alkalin proteazlar ve subtilisinler iki önemli serin proteaz grubudur (Deshpande ve ark. 1998).

2.3.1.3. Sistein/Tiyol proteazlar (EC 3.4.22)

Sistein proteazlar prokaryot ve ökaryot canlıların her ikisinde de mevcuttur. Yaklaşık olarak 20 adet familyaya sahiptirler. Sistein proteazların tümünün katalitik etkinliği histidin ve sistein aminoasitlerini ihtiva eden katalitik diadlar üzerindedir. Sistein ve histidin aminoasitlerinde Cys-His ya da His-Cys şeklindeki sıralama familyaların farklılıklarına sahip olmasına neden olur. Sistein proteazlardan en iyi şekilde bilineni papain'dir. Çoğunun optimum aktivitesi nötral pH değerinde iken, az bir kısmı (lizozomal proteazlar gibi) da asidik pH seviyelerinde aktiflik gösterirler (Deshpande ve ark. 1998).

2.3.1.4. Aspartik proteazlar (EC 3.4.23)

Aspartik proteazlara düşük pH değerlerinde de aktiflik gösterebildikleri için asit proteazlar da denilmektedir. İlk isimlendirilen ve en iyi bilinen aspartik proteaz pepsindir (Fersht 1998). Aspartik proteazlar, aspartik asit köklerine etki eden katalitik etkinliğe sahiptirler. Aspartik proteazların aktiviteleri genellikle pH 3.0-4.0 aralığındaki düşük pH değerlerinde değişkenlik gösterir. Sahip oldukları moleküler ağırlık 30-45 kDa arasındadır. Aspartik proteazlar pepstain ile inhibe edilebilirler. Diazoacetyl-DL-norleucine methyl ester (DAN) ve 1,2-epoxy-3-(p-nitrophenoxy) propane (EPNP) tarzında bakır iyonu ihtiva eden diazoketon şeklindeki bileşiklere karşı hassas olabilmektedirler. Mikrobiyal olan aspartik proteazlar *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* ve *Neurospora* tarafından üretilmekte olan pepsin benzeri enzimlerdir ve *Endothia* ve *Mucor* spp.'nin ürettiği renine benzeyen enzimler şeklinde iki büyük gruptan oluşmaktadır (Deshpande ve ark. 1998).

2.3.1.5. Metalloproteazlar (EC 3.4.24)

Aktivitelerini gösterebilmeleri için divalent metal iyonları ihtiyaç duymaktadırlar. Çinko proteazlar şeklinde de adlandırılmaktadırlar. Metalloproteazlar nötr pH değerlerinde aktiviteye sahiptirler (Fersht 1998).

Metalloproteazlar yüksek yapılı canlılarda kollogenaz, yılan zehirinde bulunan hemorhagic toksini ve bakterilerdeki termolizin gibi proteazlar şeklinde geniş bir yayılıma sahiptirler. Metalloproteazların yaklaşık olarak 30 adet familyaya ayrıldığı saptanmıştır. Bu familyalardan 17'si endopeptidaz, 12'si ekzopeptidaz ve 1 tanesi de hem endo- hem de ekzopeptidaz familyalarına aittir. Metalloproteazlar gruplara ayrılırken metal bağlanma bölgesi ile birlik oluşturmuş olan aminoasit kökü baz alınur. Etkinliklerine göre metalloproteazlar nötral, alkali, *Myxobacter I* ve *Myxobacter II* şeklinde dört farklı gruptan oluşmaktadırlar. Nötral olan metalloproteazlar hidrofobik aminoasitlere karşı etkinlik göstermektedirler. Alkalen olanlar ise geniş bir substrat farklılığına sahiptirler (Deshpande ve ark. 1998).

2.3.2. Oligopeptidazlar

Oligopeptidazlar sınıfı proteinlerden küçük olan substrat yüzeylerine karşı aktivite göstermeye meyillidirler. Örneğin; Thimet Oligopeptidaz (Barrett, Brown ve ark. 1995, Knight, Dando ve ark. 1995).

2.3.3. Ekzopeptidazlar

Ekzopeptidazlar yalnızca peptit zinciri sonunda bulunan kısımlara etkinlik göstermektedirler. Peptit ve proteinlerin N ve C ucundan etkinlik göstermelerine göre sırayla, aminopeptidazlar ve karboksipeptidazlar şeklinde sınıfa ayrılarak incelenirler (Barrett, Brown ve ark. 1995, Knight, Dando ve ark. 1995).

2.3.3.1. Aminopeptidazlar

Peptid zinciri üzerinde serbest olan N-ucunu etkileyerek tek bir amino asit, dipeptit ya da tripeptidin çıkarılmasını katalizlerler. Aminopeptidazlar farklı bakteri ve fungus türlerinden üretilmektedirler. Aminopeptidaz grubu enzimleri çoğunlukla hücre içinde aktivite gösterirler (Deshpande ve ark. 1998). *Streptomyces griueus*'tan izole edilen

ticari değeri olan enzim Pronaz endopeptidaz, aminopeptidaz ve karboksipeptidaz aktivitelerini içeren bir enzimdir. Pronaz, genel olarak, proteinlerin hatasız ve tam bir şekilde hidrolizini elde edebilmek amacıyla laboratuvarlarda kullanılmaktadır (Reed 1993).

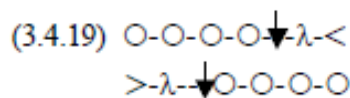
2.3.3.2. Karboksipeptidazlar

Polipeptit zincirindeki C- ucunu etkileyerek tek bir aminoasit ya da dipeptitin çıkarılmasını katalize ederler. Karboksipeptidazlar aktif bölgelerinde var olan aminoasitlere göre serin karboksipeptidaz, sistein karboksipeptidaz ve metallo karboksipeptidazlar şeklinde üç gruba ayrılmaktadırlar. Serin karboksipeptidazların *Penicillium* spp., *Saccharomyces* spp. ve *Aspergillus* spp. gibi farklı türlerden ayrıştırılması ve substrat eğilimlerinin benzemesine rağmen maksimum aktivite gösterdikleri pH değerleri, stabiliteleri, moleküler ağırlıkları ve inhibitörlerin etkisi gibi yönlerden ise farklılıkları olabilmektedir. *Saccharomyces* spp. ve *Pseudomonas* spp.'nin ürettiği metallokarboksi peptidazların etkinlikleri için Zn^{2+} ya da Co^{2+} iyonlarına ihtiyaçları olduğu bilinmektedir (Deshpande ve ark.1998).

2.3.4. Omegapeptidazlar

Omegapeptidaz grubundaki enzimler substratların serbest bulunan N veya C terminal ucuna ihtiyaç duymamaktadırlar. Fakat terminal uca yakın bulunan hareket bölgelerinde aktivite artış gözlenir (Şekil 2.4). Hareket bölgeleri alfa karboksilin alfa amino grubuyla yaptığı bağ haricindeki bölgededir. Bundan dolayı endopeptidaz ve ekzopeptidazlardan tamamen farklılıkları mevcuttur. Omegapeptidazlar siklize terminal kalıntılar üzerine ya da izopeptid bağlarla bağlı kısımlara hareket edebilmektedirler. İzopeptid bağlar: alfa karboksilin alfa amino grubuyla yaptığı bağların dışındaki peptit bağlarıdır (Tanksale 2001)

Omega peptidaz



Şekil 2.4. Omega peptidazların etki mekanizması (Tanksale 2001)

2.4. Proteaz Kaynakları

2.4.1. Bitkisel proteazlar

Bitkilerin proteaz kaynağı olarak kullanılmasını, bitkinin yetiştiği iklim şartları ve kültivasyon toprağının uygunluğu gibi farklı faktörler etkilemektedir. Bitkisel kaynaklı proteazlar özellikle tropikal bitkilerden elde edilmektedir. Bitkisel kaynaklı proteazlardan en yaygın olarak bilinenleri papain, bromolein, fisin ve keratinazdır (Rao ve ark. 1998). Papain, Batı ve Orta Afrika ile Hindistan'ın tropikal bölgelerinde yetişen *Carica papaya* meyvesinin öz suyundan izole edilmiştir. Katalitik yapısı sistein 25, histidin 159, asparajin 158'ten oluşurken, molekül kütlesi 23 kDa'dur. pH 5.0-9.0 arasında aktiftir ve 80-90°C sıcaklıkta kararlılığını koruyabilen bir proteaz türüdür. Endüstriyel olarak en çok et endüstrisinde etin yumuşatılması için kullanılmasının yanı sıra, hayvan derisinin işlenmesi, ilaç üretimi, meşrubatların berraklaştırılması ve acılığın giderilmesi gibi yaygın kullanım alanına sahiptir (Anonim 2017).

1892'de, ananas öz suyunda proteolitik enzim varlığının keşfi ile 'bromelain' bulunmuştur. Bromelain ilk kez terapötik destek olarak 1957'de tanıtılmış (Anonim 2017) ve o zamandan beri pek çok bilimsel literatürde yerini alarak çeşitli hastalıklara karşı önemli faydaları olduğu kanıtlanmıştır. Bromelainin vücuttaki proteinleri ayrıştırıcı ve sindirici bir enzim olduğu fark edilmiş dolayısıyla enzimin sindirimi veya hazmı kolaylaştıran bir molekül olduğu kanıtlanmıştır. Bu yüzden gıda sanayinde ve bazı kültürlerde et yumuşatıcı olarak kullanılmaktadır. Bunların yanı sıra bromalein, mide asidine yardımcı olmakla kalmayıp, bağırsaklardaki alkalin ortamda olumlu tesirleri bulunmaktadır. Enzim, bir sistein proteaz olarak karakterize edilir ve pH 5.0-9.0 arasında aktiftir. İnaktivasyon sıcaklığı 70°C olup papainin inaktivasyon sıcaklığından daha düşüktür (Rao ve ark. 1998).

Fisin, yüksüz ve aromatik aminoasitler içeren bağlara etki eden, optimum pH'ı 6.5 olmasının yanı sıra pH 4.0 -9.5 arasında aktif olan bir enzimdir. Endüstride ise biracılık, et, yem ve deniz ürünlerinde kullanılmaktadır. Fisin enzimi, incirden izole edilen çok yüksek proteaz aktivitesine sahip papain ve bromalaine benzer bir sülfhidril proteazıdır.

Enzimin, antik çağda peynir mayası olarak sütün pıhtılaştırılmasında kullanıldığı bilinmektedir. 10-15 g bitkiden 100-150 mg fisin elde edilebilmektedir (Uhling 1998). Saçı ya da kılları ağartan keratinaz enzimi ise bazı bitkiler tarafından üretilir. Saç ve yünün parçalanması lizin gibi esansiyel aminoasitlerin üretilmesi açısından önem taşır. Bu nedenle bu enzimin kozmetik sanayinde kullanımı yaygındır. Atık su sistemlerinde bulunan bu tür doğal atıkların parçalanması açısından da bu enzim önemlidir (Rao ve ark. 1998).

2.4.2. Hayvansal proteazlar

Hayvansal kaynaklı proteazlardan en bilinenler pankreatik tripsin, kimotripsin, pepsin ve rennindir. Çizelge 2.2' de hayvansal proteazların özgünlük gösterdiği peptid bağları gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Hayvansal proteazların özgünlüğü (Rao ve ark. 1998)

Enzim	Spesifik olduğu bağ
Tripsin	Lys (yada Arg)-----
Kimotripsin	Trp (yada Tyr, Phe, Leu)-----
Pepsin	Phe (yada Tyr,Leu)---Trp (yada Phe,Tyr)
Rennin	Küçük nötral residüler (Ala, Gly,Val)

Noktalı çizgiler proteazın etki ettiği bölgeyi gösterir.

Katalitik üçlü yapısı serin, histidin ve aspartattan oluşan Tripsin (EC.3.4.21.4) molekül kütlesi 23,3 kDa olan ve gıda proteinlerinin sindirimi için kullanılan pankreas kaynaklı, ince bağırsakta proteinleri parçalayan; temel bir hayvansal proteazdır. Optimum pH'sı 8.0 ve optimum sıcaklığı da 37 °C'olan enzim, serin proteaz grubuna dahildir.

Kimotripsin (EC.3.4.21.1), 23,8 kDa molekül kütlesine sahiptir. Proteolizi gerçekleştirebilen hayvansal pankreatik ekstraktlarında bulunan sindirim enzimidir. Peptid bağlarını fenilalanin, tirozin ve triptofan rezidülerinden sonraki karboksil gruplarından hidrolizleyen bir serin proteazdır. Kimotripsinin optimum pH'sı 8.0-9.0; optimum sıcaklığı 40-45°C'dir. Saf kimotripsin pahalı bir enzim olmakla birlikte yalnızca diagnostik ve analitik uygulamalarda kullanılır. Süt protein hidrolizatlarının deallerjenasyonunda sık kullanılır.

Pepsin, 1836'da Theodor Schwann tarafından keşfedilen ilk hayvansal enzimdir. 34,5 kDa molekül kütlesine sahip olan pepsin (EC.3.4.23.1) gıda proteinlerini peptidlere parçalamak için hemen hemen tüm omurgalıların midelerinde ana hücreler tarafından salgılanan asidik proteazdır. Pepsin pH 1.0-2.0 arasında optimum aktivite gösterir ve pH 6.0'nın üzerinde inaktive olur. Bu enzim iki hidrofobik aminoasit arasındaki peptid bağlarının hidrolizini katalizler (Rao ve ark. 1998).

Renin, anne sütünü sindirmek için memelilerin midesinde üretilen sütü pıhtılaştırıcı doğal, kompleks bir enzimdir. Yeni doğan, sütle beslenmiş buzağının kesilen şirdeni hayvansal bazlı renin (rennet) için en yaygın kaynaktır. Renin, bütün süt veren memelilerin midelerinde inaktif pro-renin olarak bulunur. Pepsin işleviyle ya da kendi kendine katalizle aktif renine dönüşür. Süt endüstrisinde süt kazeininin çöktürülmesinde ve lor üretiminde sıkça kullanılmaktadır (Rao ve ark. 1998).

2.4.3. Mikrobiyal proteazlar

Enzimoloji çalışmalarının en başından günümüze bütünüyle araştırılan hidrolitik proteazların en önemli grubunu mikrobiyal proteazlar oluşturmaktadır. Bu enzimler hücre metabolik aktivitelerde önemli olmasının yanında endüstriyel alanlarda da önem kazanması sayesinde ilgilenilen bir konu haline gelmiştir. Mikrobiyal enzimler 1914 yılından beri deterjanlara eklenerek bu endüstri alanında yaygın olarak kullanılmaktadır. Hücre içi proteazlar hücre metabolik yollarda farklılaşma, sporulasyon, protein katlanması, enzimlerin olgunlaşması gibi çoğu metabolik aktivitede öneme sahiptirler. Hücre dışı proteazlar ise hücrenin etkin durumda olduğu çevresel şartlarda proteinlerin hidrolizini katalizleyerek absorbe edilmesinde ve bunlardan faydalanılmasında rol oynamaktadırlar (Kalizs 1988). Ayrıca hücre dışı proteazlar çoğu endüstriyel etkinlikte proteinlerin parçalanmasında ticari olarak 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. Çünkü biyoteknolojik uygulamalarda mikroorganizmalar istenilen yönde yönlendirilebilmekte, daha saf elde edilebilmekte ve uygun bir kültür ortamında üretilmektedir (Kıran ve ark. 2006). Mikrobiyal proteazların sınıflandırılmasında aktif merkezleri göz önüne alınmaktadır. En önemli

mikrobiyal proteaz grupları; serin-, metallo- ve karboksil proteazlardır. Ayrıca literatürde ‘jelatinaz’, ‘keratinaz’, ‘kazeinaz’ şeklindeki sınıflandırmalar da yapılmaktadır (Novel ve ark. 1963).

Mantarlar fungus orjinli proteazları üretirler ve bakterilere göre daha geniş kapsamlı enzim üreticileri olarak bilinmektedirler. Örneğin, *Aspergillus oryzae* nötral, asit ve alkalen proteazların tamamının üretimini gerçekleştirmektedirler. Fungal proteazlar geniş bir pH aralığında aktivite gösterirler (pH 4.0-11.0). Fakat fungal proteazlar bakteriyel proteazlara göre daha düşük sıcaklık toleransı ve daha düşük reaksiyon hızına sahiptirler. Fungal kaynaklı enzimler katı hal fermentasyonu işlemleriyle elde edilmektedir. Fungal asit proteazlar pH 4.0-4.5 aralığında maksimum aktiviteye sahiptirler ve ayrıca pH 2.5-6.0 arasında kararlıdır. En çok peynir endüstrisinde dar pH ve sıcaklık spesifisitesi ile tercih edilmektedir. Nötral olan fungal proteazlar ya da metalloproteazlar pH 7.0’ de aktiflik göstermektedirler ve şelatlayıcı ajanlar aracılığıyla inhibe olmaktadır. Fungal alkalen proteazlar gıda proteinlerinin modifikasyonu için kullanılmaktadır (Rao ve ark. 1998, Uhlig 1998). Fungal proteazlar endopeptidazlar ve ekzopeptidazlar olup, farklı çeşitlilikte üretilmektedirler (Gripon 2003).

Viral kökene sahip proteazlar viral proteinlerine karşı hassas oldukları için oldukça önemlidirler. Viral proteazlar, viral replikasyon ve birleşimi ayarlamak ve düzenlemek üzere hareket ederler. Viral proteazların en önemli noktasının üç boyutlu yapıları ve sentetik inhibitörler ile olan etkileşimleri olduğu yapılan araştırmalar ile ortaya konmuştur. Farklı virüslerde serin, aspartik ve sistein peptidazlar bulunmaktadır. Tüm virüs kaynaklı peptidazlar endopeptidazlardır (Babe ve Craik 1997).

Bakteriyel kökene sahip proteazlar, büyük polipeptidlerin daha küçük peptidlere ve aminoasitlere hidrolizini sağlarlar. Bu sayede onların hücre tarafından absorpsiyonunu kolaylaştırırlar. Hücre dışı enzimler onların depolimerleşme aktivitesinden dolayı beslenmede büyük öneme sahiptirler. Hücre içi proteazlar hücrede uygun protein dönüşümüne katkılarıyla bilinmektedirler. Örneğin *Echericha coli* bakterisinde, *lon* geni tarafından üretilmekte olan ATP-bağlı proteaz *La*, anormal proteinlerin hidrolizinden sorumlu enzimdir (Çelik 2006).

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

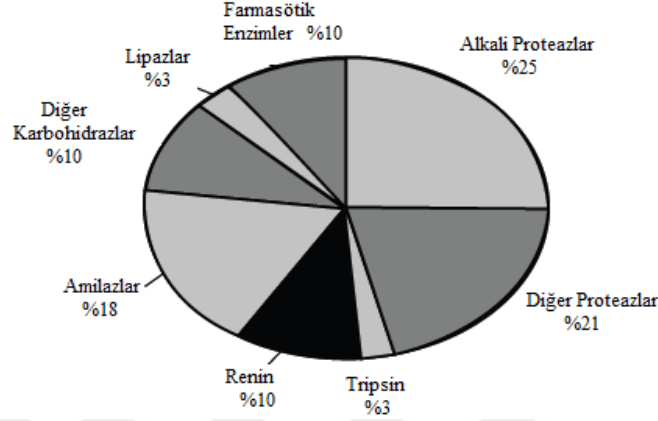
Ticari proteazların çoğunun üretiminin nötral ve alkaleen şeklinde *Bacillus* bakterileri ile gerçekleştirildiği bilinmektedir (Denizci 2004). Bakteriyel nötral proteazlar pH 5.0-8.0 arasında, düşük sıcaklık değerlerinde aktiflik göstermektedirler. Gıdaları hidrolizlediklerinde oluşan hidrolizatlardaki acı tadın daha az olması gıda endüstrisinde hayvansal proteazlara oranla tercih edilme sebeplerindendir. Termotoleranslarının düşük olması gıda hidrolizatlarının üretiminde reaktivite kontrolünde avantaj sağlamaktadır (Rao ve ark. 1998).

2.4.4. Proteazın kullanım alanları

Proteazlar endüstriyel enzim üretiminin en önemli grubudur ve toplam enzim üretiminin dünya çapındaki satışının yaklaşık olarak %60'ına sahiptir (Laxman ve ark.2005). Proteazlar çamaşır deterjanlarında, deri ve tekstil sanayisinde, gıda, kozmetik, ilaç sanayisinde, atıkların işlenmesinde, tıbbi teşhis ve X ışını filmleri üzerindeki jelatinin bozunması amacıyla kullanılmaktadır. Proteaz enzimi kontak lens solüsyonları, yüz maskeleri, cilt temizleyicileri, saç bakım kremleri, diş temizleme macunu, peeling özellikleri nedeniyle potansiyel olarak kozmetik uygulamalarında kullanılmaktadır. Deri endüstrisinde, deriden kıl gideriminde, derideki proteinleri çözmede, kuruma özelliklerini iyileştirmek için deri kalıntılarını açmayı hızlandırmada, deriyi esnek, yumuşak ve daha temiz yapmakta kullanılır (Ather 2009). Diğer yandan, Klenow fragmentlerinin üretimi dahil olarak, peptid sentezi, nükleik asit saflaştırması sırasında istenmeyen proteinlerin parçalanması, doku ayrışmasında ve hücre kültürü deneylerinde proteazların kullanılması, araştırılması, teşhisi ve terapisi için rekombinant antikor fragmanlarının hazırlanması, peptid sekansları ve proteomiklerdeki proteinlerin

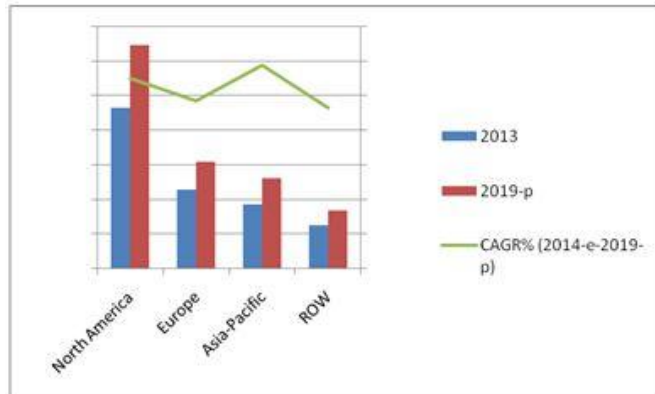
proteolitik sindirimi gibi birçok araştırmalarda proteazların kullanımına ihtiyaç duyulmaktadır (Tözsér ve ark. 2013).

Proteazların tüm dünya genelinde yıllık kullanım oranlarına bakıldığında % 25 alkalın proteazlar, % 21 diğer proteazlar, % 10 renin, % 3 tripsindir (Ahmad 2013), (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Proteazların endüstride kullanım yüzdeleri (Ahmad 2013)

Endüstriyel enzimler arasında önemli bir pazar payı bulunan proteaz enziminin, 2019 yılına kadar pazar payının global enzim piyasasındaki toplam yıllık değeri 2.767 \$ milyon olarak tahmin edilmekte ve 2014-2019 global proteaz piyasası yıllık bileşik büyüme oranı %5.3 olarak öngörülmektedir (Şekil 2.6). Enzim piyasası Kuzey Amerika, Avrupa, Asya-Pasifik ve diğer dünya ülkeleri gibi önemli bölgelerdeki enzim uygulamaları ve kaynakları baz alınarak bölümlere ayrılmakta ve piyasa değerleri tahmin edilmektedir (Anonim 2016).



Şekil 2.6. Coğrafi olarak dünya çapında proteaz enzimi market payı 2013-2019 arası (Anonim 2016).

2.4.4.1. Deterjan sanayisinde proteazlar

Dünya enzim üretiminin yaklaşık %30'unu deterjan enzimi üretimi oluşturmaktadır (Horikoshi 1996). Proteazlar; protein moleküllerini parçalayarak çamaşırlardaki lekeleri çıkarabilecek veya deterjan içerisindeki diğer maddelerle çözünebilecek hale getirmektedir. İdeal deterjan proteazları, yiyecek, kan ve diğer vücut salgılarından dolayı lekelerin büyük bir kısmının yok edilmesini kolaylaştırmak için, geniş substrat özgüllüğüne sahip olmalıdır. Deterjan içinde bir proteazın en iyi performansı için en önemli faktör onun izoelektrik nokta (pI) değeridir (Çelik 2006). Deterjan çözeltisinin pH'ı ile pI'sı birbirine uyumlu ise proteazın bu uygulama için çok uygun olduğu kabul edilir. Ayrıca bir proteazın pI değeri ne kadar yüksekse, o proteaz o kadar yüksek pH'larda etki gösterebilmektedir (Çelik 2006). Günümüzde proteazların tüm dünyada çamaşır deterjanlarında katkı maddesi olarak kullanımı mevcuttur. Bu alanda proteaz kullanımının yüksek olmasının nedeni çevre ile ilgili kaygılardan kaynaklanır. Sıcak yıkamalarda kullanılmak üzere üretilmiş olan deterjanlar sodyum fosfat ve 60°C üzerine çıkan sıcaklıklarda aktifleşen beyazlatıcı madde olan sodyum perbonat içermektedir. Ancak fosfat kirlenmesinin azaltabilmek amacıyla polyster kumaşların kullanımında artış olması sebebiyle bu içeriğe sahip olan deterjanlar azaltılıp, sonra da kaldırılmıştır (Kasavi 2006).

Bunun sonucunda da 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 temizliğe olanak sağlayabilmektedirler. Özellikle kan ve çim gibi lekeleri çıkarmada proteazların oldukça etkili oldukları bilinmektedir. Yiyecek lekelerinin çıkarılmasında ise proteazlar amilaz ve lipazlarla beraber kullanıldığında daha başarılı sonuçlar vermektedir. Ayrıca, deniz solucanlarından elde edilen proteazlar lens yıkama solüsyonlarında kullanılmakta ve düşük sıcaklıklarda kontak lenslerin temizlenmesini sağlamaktadırlar (Orhan 2003, Öztürk 2004, Aehle 2004). Çamaşır deterjanları içerisinde kullanılan enzimlerden yüksek verim elde edilebilmesi için, 1 saat süresince 95°C'ye kadar çıkan sıcaklıklarda pH 9.0-11.0 aralığında etkinliğini koruması, beyazlatıcı ve yüzey temizleyicilerin varlığında kararlı olması ve de deterjan içerisinde en az 1 sene aktivitesini kaybetmemesi gerekmektedir. Son yıllarda deterjan üretiminde kullanılan tüm

proteazlar *Bacillus* türleri aracılığıyla üretimi sağlanan serin ve alkalin proteazlardır. Çamaşır deterjanlarında kullanılanı olan proteazlar; *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* veya *Bacillus* sp. bakterilerinden sağlanmaktadır (Uhlig 1998, Aehle 2004). *Bacillus* suşları dışında ise *Conidiobolus coronatus*'tan elde edilmiş olan bir alkalin proteazın da Hindistan'da ticari deterjan üretiminde kullanıldığı saptanmıştır (Maurer 2004). Endüstriyel alanda etkinlik gösteren çoğu firma katalitik etkinliği artıracak yeni enzimleri keşfetmeye, onları tanımlamaya ve büyük ölçekli işlemlerde kullanmaya gayret etmektedir. Ayrıca protein mühendisliği yöntemleri kullanılarak ana suşların özelliklerinin geliştirilmesiyle de deterjan sanayisi için yeni proteazların üretilmesi amaçlanmaktadır. Birçok firma tarafından ticari olarak üretilen ve ticari adı ile bilinen proteazlar Çizelge 2.3.' de verilmiştir.

Çizelge 2.3. Dünya çapında üretilen enzim tabanlı deterjanlar ve enzim kaynağı olan bakteri türleri (Maurer 2004)

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

2.4.4.2. Deri sanayisinde proteazlar

Bakteriyel proteazlar deri sanayisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu alanlar; derinin kollajen olmayan yapılarının seçimli hidrolizi, globulinler ve albuminler gibi fibril yapıda olmayan proteinlerin uzaklaştırılması, deriden kılların ayrıştırılması ve derinin yumuşatılması gibi işlemlerdir. Günümüzde deri ile ilgili işlemler; ıslatma, sepileme, kireçlik, kireç giderme, sama ve kıl giderme gibi bazı adımlar içerir. Fakat bu işlemler gerçekleştirilirken yüksek miktarda kimyasal madde ve atık su açığa çıkmaktadır. Son yıllarda çevrenin daha az kirlenmesi amacıyla ham derilerde bulunan doğal yağın yok edilmesinde enzimlerden faydalanılması, işleme etkinliğinin artırılması

ve yağ gidermede kullanılan kimyasal maddelerin azaltılması yoluna gidilmiştir (Öztürk 2004). Enzimlerin zararlı kimyasal maddeler yerine kullanılması sayesinde çevresel kirlenmenin azalması, deri kalitesinin artması ve deri sanayisi uygulamalarının daha hesaplı olması sağlanmıştır (Afşar 2008). Proteazlar hayvan postlarını deriye dönüştürmede ıslatma, kireçleme, kıldan arındırma, yünden arındırma ve ayırma aşamalarında sıklıkla kullanılmakta ve yapılan araştırmalara göre kimyasal maddelere göre daha yüksek aktivite göstermektedirler. Geleneksel sama işlemi, deri üretim işlemlerinden kireç giderme işlemi sonrasında alkali proteazların kullanımıyla gerçekleştirilmektedir. Ham deri yapısında bulunan globüler proteinleri parçalanmakta ve strüktür açılımı sağlanmaktadır (Mukhtar ve Haq 2008).

Günümüzde tıp, farmakoloji ve gıda sanayinde büyük ölçüde kullanımı mevcut olan enzimler, aslında deri sanayinde dericilik sanatının başladığı günden beri kullanılmıştır. Ancak enzimlerden hazır ticari preparat şeklinde faydalanılmaya 1909 yılında Otto Rohm'un pankreas enzimini izole etmesi ve bu preparatı sama maddesi olarak kullanılmasıyla başlanmıştır (Uhlig 1998). Daha sonraki dönemlerde farklı canlı kültürlerinden elde edilebilen çeşitli tür ve özellikteki enzimlerden deri sanayinde; yumuşatma, kireçlik, kıl ve yağ giderme, pikle ve kromlu deri strüktürünün açılması, etleme, kromlu deri atıklarının saflaştırılması ve atık suların temizlenmesine gibi çok sayıda işlemde kullanılmaya başlanıp giderek de yaygınlaşmıştır (Uhlig 1998, Aehle 2004). Özellikle *Bacillus* sp. tarafından üretilen proteaz enzimi ticari anlamda önem kazanmıştır ve Çizelge 2.4.'de deri sanayisinde kullanılan bazı *Bacillus* türleri gösterilmiştir. Enzim uygulanması, derilerin dikişe ve günlük kullanımdan kaynaklanan darbelere karşı dayanıklılığını etkilediğinden kullanım miktarı ve süresine oldukça dikkat edilmelidir.

Çizelge 2.4. Deri sanayisinde kullanılan bazı *Bacillus* türleri (Mukhtar ve Haq 2008).

Türler	Optimum pH	
<i>Bacillus</i> sp. (AH-101)	12.0-13.0	Deri endüstrisinde
<i>Bacillus subtilis</i>	8.5	Deri sanayisinde ıslatma aşamasında

2.4.4.3. Gıda sanayisinde proteazlar

Gıda endüstrisinde proteaz kullanımı çok eski zamanlara dayanmakla beraber günümüzde oldukça çeşitli kullanım alanı da mevcuttur. Bu alanlar; rutin olarak peynir yapımı, fırıncılık, soya hidrolizatlarının hazırlanması ve et yumuşatma vb. alanlardır.

Protein hidrolizatları enzimler aracılığıyla elde edildiğinde çoğunlukla acı bir tada sebep olur. Bu acılığın oranı aminoasitin türüne ve peptit uzunluğuna göre değişkenlik göstermektedir. Eğer hidrofobik aminoasit içeriği fazla ise tat acı, hidrofilik aminoasit içeriği 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 endüstrisi uygulamalarında en çok kullanıma sahip proteaz enzimi ise papaindir. Papainin en önemli uygulama alanlarından biri yapay olarak etin gevrekleştirilmesi, diğeri ise biranın soğukta saklanmasıdır. Etin gevrekleştirilmesinde enzimin eti parçalamadan ette dağılımının sağlanmasına dikkat edilmesi gerekir. Ayrıca enzim bir veya birden çok kas dokuya ait yapıyı parçalayabileceği için kullanılan enzim derişiminin miktarı iyi ayarlanmalıdır (Fadıloğlu ve Erkmn 2004). Buğday unu fırıncılık alanında kullanıma sahip en önemli bileşendir. Hamurlarda kullanılan ve fırın hamurlarının özelliklerini belirlemede etkin olan gluten, suda çözünmeyen protein yapısındadır. *Aspergillus oryzae* türünden üretimi sağlanan endo ve eksoproteinazlar sınırlı bir proteoliz yeteneğiyle buğday gluteninde modifikasyon sağlamak için kullanılmaktadır. Beyaz ekme yapımı ve poğaçaya üretiminde de fungal proteazların verimli şekilde kullanımı mevcuttur. Eğer fungal proteazlar yüksek miktarlarda kullanılırsa ekmeğin hamurumsu bir hal almasına sebep olmaktadır. Bu yüzden enzimin kullanılması özellikle sert ve elastik haldeki hamurlar için daha uygun olmaktadır. Hamurun enzim ile muamelesi elle ya da makine ile üretimde kolaylık sağlar, bu sayede daha geniş aralıkta ürün elde edilir. Proteazların ilavesi ile artan somun hacimlerinde karışma zamanını yaklaşık %25 oranında azaltmaktadır. Özellikle *Bacillus subtilis* proteazları kek, bisküvi ve kraker yapımında kullanım alanına sahiptir. Bu proteazlar hamurların yumuşamasını geciktirmek için kullanılır ve özellikle kraker üretiminde çok

önemlidir (Fadıloğlu ve Erkmen 2004, elik 2006). Ayrıca bu alanda asidik mantar proteazların amilazlarla beraber kullanılması ürünün tadında ve aromasında farklılık sağlamaktadır (Uhlig 1998, Krajewska 2003). Peynir yapımında sütün kesilmesi 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 aktivitesi peynir özü için istenmeyen bir durumdur. Bu yüzden, süt kesme enziminin çeşitli mikrobik kaynakları araştırılmıştır. Sığır kimosin'in içerdiği aktiviteye yakın olan peynir mayalarının mikrobik 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 protein içeriğine sahip bir besin kaynağı olması onun yüzyıllardır kullanımını sağlamıştır. Birçok soya ürününün ve soya sosunun hazırlanmasında proteaz enzimi kullanılmaktadır. Soya sosu üretiminde fungal ve nötral proteazlar öneme sahip enzimlerdir. Soya proteinlerinin proteolitik modifikasyonu onların fonksiyonel özelliklerini düzeltmeye yarar. pH 8.0' de alkalaz ile soya proteinleri muamelesi yüksek çözünürlük, iyi protein ürünü ve düşük acılıta çözünür hidrolizatlar ile sonuçlanmaktadır (elik 2006). Yağ eldesinde de yine proteolitik enzimlerin kullanım alanı mevcuttur. Örneğin Nijerya kavun çekirdeğinden yağ eldesinde proteolitik enzim kullanılmaktadır. Kavun çekirdeği %30 yağ, %50 protein içermekte ancak yağın tamamı bilinen çözümlerle ekstrakte edilememektedir. Çekirdeklere proteolitik enzimlerin uygulanması sayesinde ekstrakte olablen yağ miktarında artış gözlenmektedir. Ayrıca proteazlar meyve sularını, alkolsüz içkileri kuvvetlendirmede ve proteince zengin diyet yiyeceklerin üretiminde kullanılmaktadırlar (elik 2006).

2.4.4.4. Kozmetik ve ilaç sanayisinde proteazlar

Proteazlar, kozmetikte saç bakımı ürünlerinde, diş macunlarında, istenmeyen tüylerin yok edilmesini sağlayan ürünlerde ve kontak lens solusyonlarında kullanılmaktadır. Cilt ve saç bakım ürünlerinde kullanılan kolajenaz hidrolizat ve elastin maddeleri sığır tendonlarının proteolitik hidroliziyle elde edilmektedir (Langmaier ve ark. 2002). Proteazların geniş özgünlüğe sahip olması ve çeşitliliği tedavi edici ajanların gelişiminde büyük bir avantaj olarak kullanılır. Subtilisin ya da kolajenaz yanık ve yara

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

2.4.4.5. Tekstil sanayisinde proteazlar

Tekstil sanayisinde protein içerikli ürünlerin enzimatik ön terbiyesi işlemlerinde proteazlar kullanılmaktadır. Kumaş üretiminde gerekli olan maddeler çok çeşitli lif yapılarına sahiptir. Yün, ipek, angora, kaşmir doğal protein lifleridir, soya fasulyesi, mısır lifleri ve kazein ise rejenere protein liflerindedir (Duran ve ark. 2007). Protein esaslı liflerin özelliklerini aminoasitlerin cinsi, miktarı ve yerleşme şekli belirlemektedir. Bu özelliklere göre yün esaslı mamullere papain, pronaz ve pepsin ile muamele edilerek liflerin esnekliği sağlanıp, doğal kirlilerden arındırılması ve daha beyaz bir renk elde edilmesi sağlanmıştır. Bu işlemlerde enzimlerin kullanılması kimyasal madde kullanımına göre hem zaman tasarrufu hem de daha verimli ürün eldesi sağladığı tespit edilmiştir (Karmakar 1999). Yün gibi ipeğin de tekstilde kullanılabilmesi için proteazlarla muamele edilmesi gerekmektedir. Ham ipek ince, kesiksiz protein esaslı bir lifdir. Ancak ham ipekte fibroin ve serisin adı verilen protein yapısında maddeler bulunmaktadır. Serisin maddesi ipeğin kaygan ve parlak bir görünümde olmasını engellediği için kullanımı istenmeyen bir maddedir ve proteolitik enzimlerle giderilmesi gerekmektedir. Bu amaçla en çok pepsin, tripsin ve papain enzimleri kullanılmaktadır (Duran ve ark. 2007).

2.4.4.6. Gümüş eldesinde proteazlar

Alkalin proteazlar, kullanılmış X-ışını filmleri ya da fotoğraf filmlerinden gümüş eldesi amacıyla gerçekleştirilen proseslerde geniş kullanım alanına sahiptir. Kullanılmış filmler jelatin tabakalarında ortalama olarak %1.5-2 gümüş içermektedir. Gümüşün geri kazanılabilmesi için ise, jelatin tabakasının filmde ayrılması gerekmektedir. Geleneksel uygulamalarda, filmin yakılarak gümüşün geri kazanılması çevre kirliliğine

yol açtığından, jelatin tabakanın enzimatik hidrolizi tercih edilmekte ve bu yolla gümüşün yanında polyester filmin de geri kazanımı sağlanmaktadır. Bu işlemde bakteriyel proteazların yanında pankreatik proteazlar kullanılabilir (Horikoshi 1999).

2.4.4.7. Atık işleme işleminde proteazlar

Proteazlar, gıda endüstrisinden gelen ve evlerden çıkan atıkların işlenmesinde uygulama alanına sahiptir. Ayrıca, proteazların doğada atık olarak bol miktarda bulunan boynuz, kıl, tırnak ve saç gibi lifli proteinleri de yararlı biyokütle haline dönüştürebilmektedirler. Bu konuda yapılan çalışmalarda, 1989 yılında Venugopal ve çalışma arkadaşları *B. megaterium* hücrelerini kalsiyum aljinat üzerine immobilize etmiş ve immobilize hücrelerle hücre dışı proteazları sararak balık etinin çözündürülmesini sağlamıştır (Venugopal ve ark. 1989). 1992 yılında Dalev ve Simeonova deri endüstrisindeki temel atıkları işlem üzere *B. subtilis*'ten ürettikleri alkalin proteazla, atıklardan hayvansal tutkal gibi yararlı ürünler üretmişlerdir (Dalev ve Simenova 1992). Ayrıca, Dalev 1994 yılında *B. subtilis*'ten üretilen alkalin proteazların, kümes hayvanlarının kesim yerlerindeki kuş tüyü atıklarının işlenmesindeki kullanımını açıklamıştır (Dalev 1994). Kümes hayvanlarının ağırlığının %5'ini oluşturan tüyler ve sert keratin yapının tamamen parçalanması sonucu oluşan ürün önemli bir protein kaynağı olarak değerlendirilmektedir. Bu ürün yüksek protein içeriği nedeniyle yem olarak kullanılmaktadır (Anwar ve Saleemuddin 1997, Öztürk 2004).

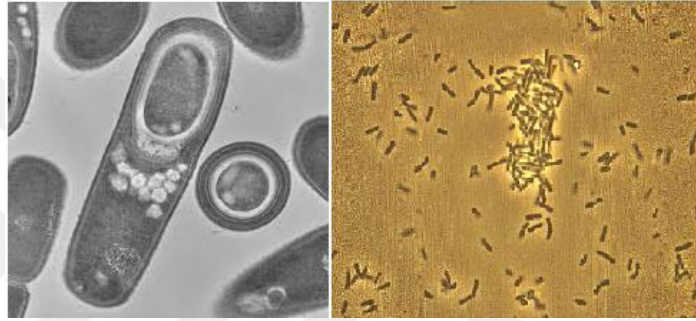
2.5. Bacillus Genel Özellikleri

Bacillus türü bakteriler, en başta kolay üretilibilmeleri nedeniyle, bunun yanı sıra antibiyotik, enzim, toksin üretmesi gibi metabolik özelliklerinin endüstriyel alanda büyük öneme sahip olmasıyla dikkat çeken mikroorganizmalardır (Rosovitz ve ark. 1998).

Nötrofilik ve alkalofilik *Bacillus* 'lar özellikle yüksek oranlarda alkali proteaz üreticisi olmaları nedeniyle büyük öneme sahiptir. Bu enzimlerin, yüksek katalitik aktiviteleri,

yüksek substrat özgülükleri ve artan ürün kapasiteleri gibi özelliklerinin olması geniş bir uygulama alanı bulmasını sağlamaktadır (Rao ve ark. 1998, Kumar ve Takagi 1999).

Bacillus türlerinin özellikle taze kültürleri, gram pozitif boyanırlar. Bu türlerin vejetatif formları düz, kenarları birbirine paralel, ucu yuvarlak veya kesik biten, yaklaşık 0,5-1,2 µm boyunda basillerdir. Uzun zincirler şeklinde ya da tek tek veya uzun görölürler (Şekil 2.7). Genellikle çoğunun katalaz testi pozitifdir. *Bacillus*'lar çevre koşullarının kötü olduğu durumlarda dış etkenlere karşı korunabilmek için spor üretirler (Wipad ve Harwood 1999, Gerçeker 1999).



Şekil 2.7. *Bacillus sp*'in mikroskopik görüntüsü (Wipad ve Harwood 1999)

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

Çoğunlukla saprofit olan *Bacillus* türleri doğada yaygın olarak toprakta bulunur ve toz partikülleri ile sulara, bitki ve hayvan materyallerine bulaşır. Bu cinse ait türlerin çoğu proteaz üretirler ve bu da rekombinant proteinleri yıkabilir. Örneğin *B. subtilis* 7 farklı proteaz üretmektedir. Bunlardan 5'i ekstraselülerdir (Barredo 2005).

Alkali proteazlar, bakteri, küf, maya gibi çeşitli kaynaklardan elde edilse de (Singh 2000), alkalifilik *Bacillus* biyoteknolojide en çok kullanılan mikroorganizmadır. Çünkü

çeşitli ortamlardan izolasyonu daha kolaydır. Aynı zamanda *Bacillus*, kompleks ve sentetik ortamlarda gelişebilmektedir. Termofilik ve alkalifilik *Bacillus* tarafından üretilen alkalifilik proteazlar yüksek sıcaklık ve 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 ancak nadiren hücre içi proteaz üreten ve saflaştırılan çalışmalar da yapılmıştır (Setyorini ve ark. 2006).

2.6. *Bacillus* Proteazının Genel Özellikleri

Bacillus türündeki mikroorganizmalar, proteaz tiplerinden çoğunlukla alkalin serin proteazları üretmektedirler. Bu nedenle *Bacillus* proteazları daha çok alkali özellik göstermektedir. Alkalin proteazların optimum pH aralığı pH 9.0-11.0 arasında olmakla beraber, optimum pH değerleri pH 11.5, pH 11.0-12.0, pH 12.3 ve pH 12.0-13.0 olan birkaç istisna durum da bulunmaktadır. Alkalin proteazlar yüksek izoelektrik noktalarına sahiptirler ve genellikle pH 6.0-12.0 arasında kararlıdır. Optimum sıcaklık değerleri genellikle 50-70°C'dir. 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 alkalin proteazlar da yüksek sıcaklıkta bir miktar termostabilite göstermekle birlikte, ortama Ca⁺² iyonlarının ilavesi ile enzim termostabilitesinde artış gözlenmektedir (Kumar ve Takagi 1999).

Alkalin proteazların moleküler ağırlıkları genellikle 15-30 kDa arasında ise de, birkaç yayında 31.6 kDa, 33 kDa, 36 kDa ve 45 kDa gibi daha yüksek moleküler ağırlığa sahip olan enzimlerin de var olduğu bildirilmiştir. Bazı *Bacillus* türlerinden izole edilen alkalin proteazların çoklu elektroforetik formlara sahip olduğu gözlenmiştir. Bu enzimlerin çoklu formları protein molekülündeki glutamin ya da asparagin aminoasitlerinin geri dönüşümsüz deaminasyonu gibi enzimatik olmayan bir yolla ya da protein molekülünün oto proteolizi ile oluşur (Kumar ve Takagi 1999).

Alkalin proteazlar maksimum aktivite gösterebilmek için Ca⁺², Mg⁺², Mn⁺² gibi iki değerlikli katyonlara veya bu katyonların bir kombinasyonuna ihtiyaç duyarlar. Bu katyonların *Bacillus* alkalin proteazlarının termal stabilitesini arttırdığı da bulunmuştur. Bu katyonlar enzimi termal denatürasyona karşı korumakta ve yüksek sıcaklıklarda

enzimin aktif konformasyonunu korumada önemli bir rol oynamaktadırlar (Çelik 2006). Çeşitli inhibitörlerle yapılan inhibisyon çalışmaları enzimin doğası, aktif merkezinin yapılıması ve enzimin kofaktör ihtiyacı konusunda bilgi vermektedir. Alkalen proteazlar genellikle PMSF (Fenilmetilsulfonyl florür) ve DFP (Diizopropilflorofosfat) ile tamamen inhibe olurlar. PMSF aktif bölgedeki serin aminoasitlerini sülfolar ve aktivite tamamen kaybolur. Bu inhibisyon profili, proteazları serin hidrolazlar olarak tanımlamaktadır. Buna ek olarak, bazı metalo alkalen proteazların EDTA (Etilendiamin tetraasetikasit) ile inhibe olduğu bulunmuştur. Alkalen proteazlar doğal proteinleri hidrolizledikleri gibi bazı sentetik substratları da hidrolizleyebilmektedir. Alkalen proteazların ve subtilisinlerin kazeine karşı hemoglobün ya da sığır serum albümine olduğundan daha aktif oldukları bulunmuştur. Alkalen proteazlar tirozin, fenilalanin gibi aromatik ya da hidrofobik aminoasit birimlerinin yer aldığı peptid bağlarının hidrolizine karşı spesifiktirler (Rao ve ark. 1998, Kumar ve Takagi 1999).

2.7. Mutasyon

Mutasyon, genetik materyalde meydana gelen ve kalıtsal olan değişikliklerdir. Bu değişiklikler gamet hücrelerinde ya da somatik hücrelerde meydana gelebilir. Gamet hücrelerinde meydana gelen mutasyonlar, gelecek nesillere aktarılması nedeniyle, somatik hücrelerde oluşan mutasyonlar ise kansere sebep olabileceği için öneme sahiptirler. Normal bir insan hücresinde replikasyon sırasında oluşan hata (DNA polimerazın yanlış nükleotid yerleştirmesi) oranı 10^{-10} , hata okuma (proofreading) mekanizmasına rağmen ortaya çıkan hata oranı ise 10^{-8} 'dir (Debeleç ve Kantarcı, 2006). Mutasyonlar bakterilerde ilk replikasyon sırasında baz çifti başına 10^{-7} - 10^{-8} oranında spontan olarak oluşur ve bu oran mutajene maruz kalındığında büyük ölçüde artış gösterebilmektedir. Mutajen, DNA yapısında veya dizisinde değişim oluşturabilen, doğal veya insan yapımı olabilen, fiziksel ya da kimyasal etkenlere denir.

Fiziksel bir mutajen olan iyonize olmayan radyasyon türü Ultraviyole (UV), mutasyonları indükleyen, DNA'da hasar oluşturan ve en kötü ihtimal olarak tümör gelişimine neden olan güçlü bir genotoksik ajandır.

Kimyasal mutajenler DNA'ya dahil olan bir tabanı değiştirerek hidrojen-bağlama 6zg6nlnlę6n6 değiştirebilen maddelerdir. Kimyasal mutajenler, mutasyon sıklığını artırırklar ve daha kolay işlenebilirler. Bu mutajenler, DNA iplik6iklerindeki delesyon, ekleme ve nokta mutasyonları nedeniyle fenotipi değiştirebilirler (Greene ve ark. 2003, Flibotte ve ark. 2010). Yaygın olarak kullanılan 6nemli kimyasal mutajenler nitr6z asit, hidroksil amin ve etil metan s6lfonattır.

Nitr6z asit; deaminasyon ile C→U, meC→ T, A→hipoksantin d6n6ř6m6ne ve transisyonel mutasyona neden olur.

Hidroksile edici ajanlar; hidroksilamin, sitozinin 4. pozisyonundaki amino grubuna bir hidroksil grubu ekleyerek, G yerine A bazının girmesine neden olur. CG yerine TA yer değiştirniş olur (transisyon mutasyon).

Alkilleyici ajanlar; n6kleotitlerdeki amino ve keto gruplarına CH₃- veya CH₃-CH₂- gibi bir alkil grubu eklerler. K6k6rt, nitrojen, etilenoksit ve daha az toksik olan etil-metan-s6lfonat (EMS) ve etil etan s6lfonat (EES) gibi bazı alkilleyici ajanlar p6rinlere alkil grupları ekleyerek, yanlış eşleşmeye neden olabilir ve aynı zamanda p6rin ve deoksiribin arasındaki bağı destabilize eder ve apurinik b6lgelerin oluşumuna neden olur. DNA replikasyonu sırasında herhangi bir bazın sokulması ile hatalı eşleşmeye neden olur. Bu sıklıkla transisyondan ziyade transversiyonlara yol a6ar (Debele6 ve Kantarcı 2006).

Mutagenез, tesad6fi olarak bir defada sayısı ve tam yeri belli olmayan farklı b6lgeleri de i6ine alan rastgele mutagenез (random mutagenesis) ve sadece belirli hedef aminoasitlerin delesyonu, insersiyonu ve değişimini g6steren b6lge hedefli mutasyonlar ya da y6nlendirilmiş mutagenез (site-directed mutagenesis) şeklinde ikiye ayrılabilir (Anonim 2016).

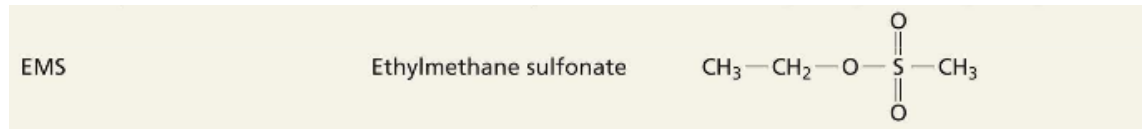
Rastgele mutasyon; DNA'nın bir ekzojen etkenle ya da mutajenle etkileşmesi sonucu oluşur. Ayrıca, DNA replikasyonundaki hatalardan da kaynaklanabilir. Rastgele mutajenez, belirli bir DNA dizisinin ve kodlanmış 6r6nlerinin 6ok sayıda yer değiştirme

etkilerini incelemek için güçlü bir araçtır (Lai ve ark. 2004). Rastgele mutagenizasyonu yoluyla mutantlar geliştirmek için rutin bir uygulamadır. Rastgele mutagenizasyon ile suş iyileştirilmesi başarılı bir yöntemdir, ancak esas olarak zahmetli işlemleri içeren bir deneme-yanılma sürecidir. Üstelik birçok durumda geliştirilmiş performans bir kara kutudur ve mekanizma kolayca tanımlanamamaktadır. Mutajenik ajanların (X-ışınları, UV-ışınları, nitroz asit, dimetil sülfonat, etil metansülfonat (EMS) ve akrinin hardalları ana etkisi, DNA molekülünün baz dizisinde bir lezyon veya modifikasyon yaratmaya dayanır. Bu lezyon tamir edilmezse bir mutasyon meydana gelir. Farklı mikroorganizmalarda rastlantısal mutasyonları tanıtmak için nitrojen, hidroksilamin, UV radyasyonu, transpozonlar ve EMS kullanılarak mutagenizasyon dahil olmak üzere farklı yöntemler kullanılmıştır. Mutajenik işlemler, mutajen, doz ve sıcaklık tipi açısından optimize edilebilir (Ribeiro ve ark. 2013).

Bölge hedefli mutasyonlar ya da yönlendirilmiş mutagenizasyon; bir gendeki özgül değişimlerin yapıldığı işlemlerdir. Bu teknikle protein yapısı ve görevi ile ilgili araştırmalar yapılmaktadır. “Site Directed Mutagenesis Uygulamaları” ile bir gendeki baz değişimi ve dizi delesyonu ve insersiyonu yapılabilir (Anonim 2006).

2.7.1. EMS (Etil Metan Sülfonat) ile Mutagenizasyon

Etil metansülfonat (EMS) mutajenik, teratojenik ve muhtemelen kanserojen olan bir organik bileşiktir (Şekil 2.8). EMS mutagenizasyonu, gen fonksiyonunu analiz etmek için 50 yıldan fazla bir süredir kullanılmaktadır (Axelrod ve ark.2015).



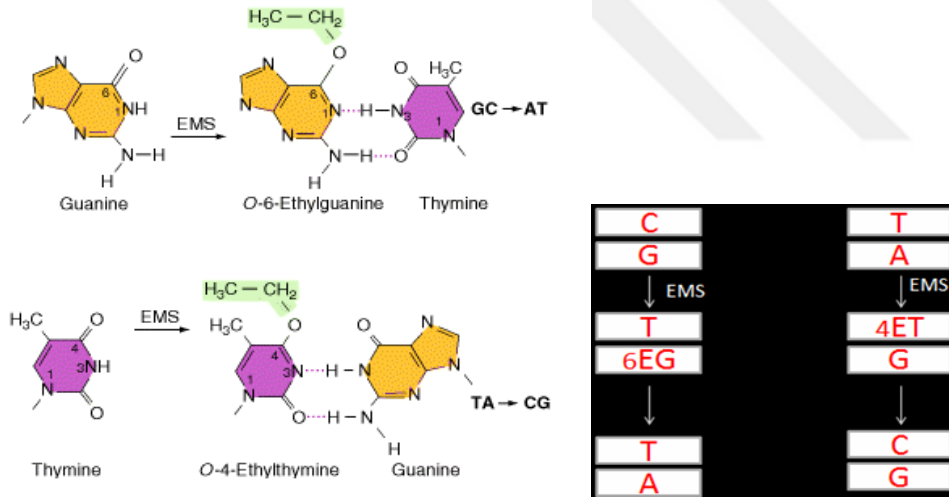
Şekil 2.8. EMS yapısı (Anonim 2017)

Etil metansülfonat (EMS) tek fonksiyonlu alkilleyici ajandır, nükleotitlerin kimyasal modifikasyonunu indükler, bu da yanlış eşleşme ve baz değişikliklerine yol açar. Güçlü olarak Guanin rezidüsü (6 no’lu keto grubu) ile alkilasyon yaparak O6-etilguanin oluşturur, timinile de eşleşebilir fakat sitozinle eşleşemez. Çoğu zaman (% 99), EMS C’yi T’ye indükleyerek ve C/G →T/A değişimine neden olurken, metil metansülfonat

T/A→G/C transversiyonuna yol açar, A/ T → G/ C transisyonuna neden olur. Düşük bir sıklıkta, EMS 7-etilguanin hidrolizi ile G/ C→ C/ G'ye veya G/ C→ T / A'ya dönüşümleri sağlar ya da 3-etiladenin eşleştirme hataları ile A/ T→ G/ C yer değiştirmesine neden olur (Anonim 2008).

EMS bir etil grubunu Guaninin O₆ oksijenine vermekte ve O₆- etilguanin oluşturmaktadır. Böylece oluşan bu baz sitozin yerine timinle baz çifti yapmaktadır (Anonim 2017), (Şekil 2.13). Hardal gazı (sülfür hardal) en iyi bilinen örnektir ve 1. Dünya savaşı sırasında kullanılmıştır.

Timinde ise 4 no'lu pozisyonundaki keto gruplarını alkiler. Bu etki sonucu DNA'daki deoksiriboz bağı gevşer ve baz ayrılır. Sonuçta DNA'da oluşan boşluğa 4 bazdan herhangi birisi gelebilir. Hem transisyon hem de transversiyon tipi mutasyon görülebilir (Şekil 2.9), (Erkan 1992).



Şekil 2.9. EMS Guanin ve Timin bazı üzerine etki mekanizması (Anonim 2017)

EMS, virüslerden memelilere kadar çok çeşitli genetik test sistemlerinde mutajenik olduğu bulunan tek fonksiyonlu bir etken maddedir. Memelilerde de kanserojen olduğu gösterilmiştir. EMS ile hücresel, nükleofilik sahaların alkilasyonu, karışık bir SN1/ SN2 (nükleofilik yer değiştirme reaksiyonları) reaksiyon mekanizması yoluyla gerçekleşir. SN1 / SN2 reaksiyonu ile EMS, guaninin N7 veya O6'sında alkilasyona neden olur ve sitosini timin baz çifti ile değiştirir (Sikora ve ark. 2012). DNA'nın etilasyonu esas

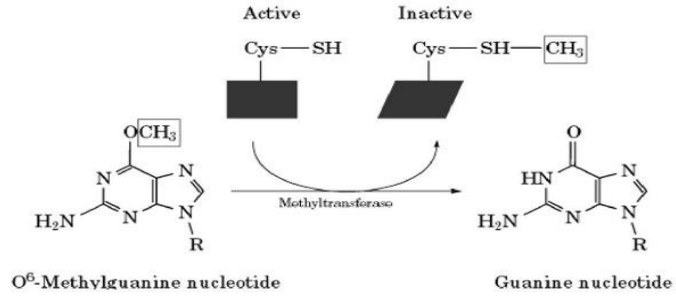
olarak bazlardaki azot pozisyonlarında meydana gelirken, reaksiyonun kısmi SN1 karakterinden ötürü, EMS aynı zamanda guaninin O6 ve DNA fosfat gruplarındaki gibi oksijenlerde önemli seviyelerde alkilasyon üretebilir. Mikroorganizmalar kullanılarak elde edilen genetik veriler, EMS'nin hem GC'den AT'ye hem de AT'den GC'ye geçiş (transisyon) mutasyonlarına neden olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca EMS'nin baz çifti ekleme veya delesyonlara ve daha geniş intragenik delesyonlara neden olabileceğine dair bazı kanıtlar vardır. Daha yüksek organizmalarda, söz konusu mekanizmalar iyi anlaşılmamış olsa da, EMS'nin kromozomları parçalayabildiğine dair net kanıtlar vardır. Sıkça atfedilen bir hipotez, EMS ile elde edilen DNA bazlarının (çoğunlukla guaninin N-7 pozisyonu) yavaş yavaş, stabil olmayan ve tek iplikçik üzerinde apuridik veya muhtemelen bir apirimidik bölgelerin oluşmasına neden olmaktadır (Sega 1984).

Bakteriyel suşların genetik manüplasyonu için kimyasal mutajenlerden en fazla kullanılanı ise EMS'dir (Haq ve ark. 2010). Bu mutajenik ajan, glikoz oksidaz aktivitesini, proteaz, fitaz, pektinaz, katalaz, lipaz, lakkaz ve sitrik asit üretimini arttırmak için farklı mikroorganizmalarda kullanılmıştır (Ribeiro ve ark. 2013). EMS ile yapılan çalışmalarda mutant suşun ana suştan 1,4 ve 3 kat daha fazla enzim ürettiği rapor edilmiştir (Pandey ve ark. 1999).

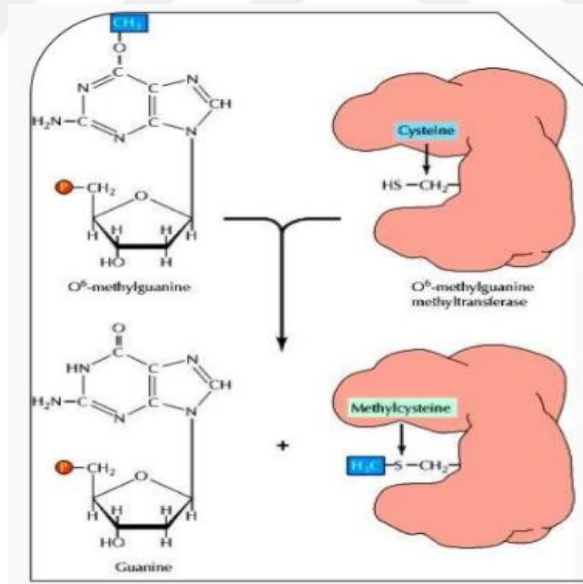
2.8. EMS Mutasyonu Tamir Mekanizması

Alkilleyici ajanlar; azot, sülfür hardal, metil ve etil metan sülfonat (MMS ve EMS), metil veya etil gruplarının eklenmesi (alkilasyon), transisyon, transversiyon veya çerçeve kayması mutasyonlarına ve kromozom değişimlerine yol açan etmenlerdir. 6-O-metilguanin-DNA metiltransferaz (MGMT) ya da O-6-metilguanin-DNA-alkiltransferaz olarak bilinen transferazlar lezyonların doğrudan tersine çevrilmesinde rol alan enzimlerdir. Dolayısıyla, MGMT DNA tamirinin önemli bir enzimidir. Bu enzim grubu, 6-O-metilguanin DNA metiltransferaz aktivitesi ile bağlantılı bir N-terminal ribonükleaz benzeri alana sahip olarak karakterize edilir. Alkillenmiş DNA'nın, DNA grubundaki oksijen atomlarından alkil grubunun enzim üzerindeki bir sistein kalıntısına aktarılmasıyla doğrudan onarılmasını gerçekleştirir. Bu reaksiyon geri dönüşümsüzdür, reaksiyon sonunda enzim inaktive olur, bu nedenle MGMT'nin bir "intihar" enzimi

olduğu söylenir (Şekil 2.10). Enzimin aktif bölgesindeki -Pro-Cys-His-Arg-Val-imza dizisi içinde aktif bölge sistein kalıntısını içerir (Anonim 2017). DNA'daki lezyon, metil grubunu O6-metilguaninden enzimin aktif bölgesindeki sistein kalıntısına transfer eden O6-metilguanin metiltransferaz tarafından tamir edilebilir ve orijinal guanin tamir edilmiş olur (Şekil 2.11). Bu doğrudan onarım reaksiyonu insanlar da dahil ökaryotlar ve prokaryotlarda yaygındır (Anonim 2017).



Şekil 2.10. MGMT tarafından katalize edilen "intihar mekanizması" reaksiyonu (Anonim 2017)



Şekil 2.11. Hasarın doğrudan geri döndürülmesi (Anonim 2017)

MGMT tarafından tamir edilen üç lezyon, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) gibi metilasyon ajanları tarafından indüklenen O6-metilguanin, O4-metiltimin ve metilfosfotriesterlerdir. Enzim, daha düşük bir verimde de olsa, O6-etilüridin ve O6-bütül-guanin gibi diğer alkil guaninleri de onarır (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. Kimyasal Mutajen EMS (Etil Metansülfonat) İle Yapılan Mutasyon Çalışması

Denemeleri için kullanılan EMS (Sigma firmasının M-0880 katalog numaralı ürünü) sıvı halde satın alınmıştır.

% 99 oranında ölüme neden olan EMS konsantrasyonunu saptamak üzere 50- 500 µg/ml arası ve 4- 400 mg/ml arası konsantrasyonları kullanılmıştır. Ölüm oranı aşağıdaki formül ile saptanmıştır (Pellzor, 1965).

% Ölüm oranı : Kontroldeki koloni sayısı / Mutasyon uygulaması sonrası koloni sayısı

EMS mutajeni bakterilerin gecelik kültüründen % 1 aşılmanın yapıldığı devrede üreme ortamına katılmıştır ve bakteriler EMS' 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 rmp'de 10 dak.) ve hücrelerin bulunduğu pelet kısmından EMS'nin uzaklaştırılması için pelet steril 0.04 M Na-fosfat tamponu (pH 7.0) ile yıkanmıştır. Buradan % 0.85'lik steril FTS ile uygun dilasyonlar yapılarak yağsız süt tozlu içeren agarlı petri kaplarına ekilmiştir (Çizelge 3.1). Petriyer 37°C'de 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda koloni etrafında zon oluşturan bakteriler proteaz pozitif olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen mutantların proteaz aktiviteleri kalitatif olarak,yağsız süt tozu içeren agarlı ortamda zon çapları cetvel ile mm değerinden 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.

3.2.2. Bakteri Üretiminde Kullanılan Besiyerleri ve Bakteri Üretim Koşulları

Çalışmada mutant bakterilerin saklanması (kültür saklama), geliştirilmesi (ön inkübasyon) ve enzim üretim kapasitelerinin ölçülmesinde farklı içerikli besiyerleri kullanılmıştır. Tüm besiyerleri pH'ları 7.0'ye ayarlandıktan sonra otoklavda 120° C'de 15 dk süre ile sterilize edilmiştir.

Çalışmada kantitatif olarak proteaz enzim aktivitesini belirlemek üzere çizelge 3.1'deki besiyeri kullanılmıştır (Qadar ve ark. 2009).

Kültür saklama ortamından (Çizelge 3.1) alınan bakteri kültürü 18 saat boyunca ön inkübasyona (Çizelge 3.1) tabii tutulmuş, bu süre sonunda bakteri kültürlerinin 600 nm'deki optik yoğunlukları (OD) spektrofotometre kullanılarak steril fizyolojik tuzlu su ile 0.3'e ayarlanmıştır. Bu şekilde ayarlanan kültürden, içerisinde 150 ml enzim üretim ortamı bulunan 500 ml'lik erlenlere % 1 oranında aşılama yapılmış ve 37° C'de 150 devir/dk çalkalama hızına sahip inkübatörde 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. Bakteri üremesi ve enzim aktivite tayinleri 18., 24., 32., 44., 48., 52., 56., ve 72. saatlerde yapılarak bakterinin gelişme 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 ₄	-	-	0.01	-
CaCl ₂	-	-	0.01	-
K ₂ HPO ₄	-	-	0.05	-
Skimmilk	-	-	-	1
pH	7.0	7.0	7.0	7.0

3.2.3. Bakteri Üremesinin ve Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

Bakteri üremesinin miktarı, 18 saat sıvı nütrient broth besiyeri içerisinde 37°C'de 150 rpm'de üretilen bakterilerin besiyerlerinin bulanıklılığı spektrofotometrik olarak

ölçülerek bulunmuştur. İnkübasyon ortamından alınan örneklerin (600 nm dalga boyunda) optik yoğunluk (OD) değerleri okunarak bakteri üreme miktarı belirlenmiştir.

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

Deneyleerde 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 Triklor asetik asit (TCA) çözeltisi aktarılmış ve tüpler 37°C'lik su banyosunda 10 dakika bekletilerek reaksiyon sıcaklığına getirilmiştir. Daha sonra substrat içeren tüplere 1'er mL enzim çözeltisi, kör tüpe ise 1 mL fosfat tamponu (pH 7.0) ilave edilerek 37°C'de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda tepkime, örnek tüpler içerisine, 2 mL 0.4 M TCA çözeltisi konarak durdurulmuş ve kör tüpüne ise 1 mL substrat eklenmiştir. Bu karışım, 37°C'de 20 dakika bekletildikten sonra oluşan pütürlü yapıyı gidermek için 6000 devir/dakika'da 10 dakika santrifüjlenerek süpernatant kısmından alınan 1 mL'lik örneklere, 5 mL 0.4 M NaCO₃ ve 1 mL 1/3 oranında seyreltilmiş folin çözeltisi eklenmiş, karışım vortekslendikten sonra 20 dakika oda sıcaklığında, karanlıkta 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 U/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, azot, metal iyonları) proteaz üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Bakteri maksimum enzim üretiminin saptandığı saate

kadar üretilmiş ve bu saatte bakteri üremesi ve enzim aktivite deneyleri yapılmıştır. Üretim ortamında bulunan karbon, azot ve metal iyonlarının yerine aynı oranlarda olmak üzere farklı karbon, azot ve metal kaynakları denenmiştir. Tüm deneyler 3 kez yapılmış ve ortalama değerler alınmıştır.

3.3.1. Karbon (C) Kaynaklarının Etkisi

Mikroorganizmaların üremesinde 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) fruktoz, gliserol, sükröz, mısır nişastası, buğday nişastası, patates nişastası, maltoz, buğday kepeği kullanılarak proteaz enzimi üzerine etkisine bakılmıştır.

Bakterinin aşılınması ve üretimi Çizelge 3.1’de belirtildiği gibi yapılmış 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 çıkarılarak yerine aynı oranda (% 1.02) mısır ıslatma suyu (corn steep-liquor), tripton, yağsız süt tozu (skimmilk), ve et özütü (meat ekstrakt), inorganik azot kaynağı olarak ise NH_4NO_3 , KNO_3 , $(NH_4)_2SO_4$, $NaNO_3$ ve NH_4Cl kullanılmış ve proteaz enzimi üzerine etkisine bakılmıştır.

Bakterinin aşılınması ve üretimi 3.1’ de belirtildiği gibi yapılmış 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 miktarında (% 0.02)

LiSO₄, FeSO₄, KCl, NaCl, MnSO₄ ve ZnSO₄ kullanılmıştır. Üreme ve proteaz aktivite tayinleri yapılmıştır.

3.4. Enzim Üretimi Üzerine Fiziksel Faktörlerin Etkisi

3.4.1. Sıcaklığın Etkisi

Sıcaklığın bakteri üremesi ve proteaz üretimi üzerine etkisini belirlemek amacıyla, besi ortamının sıcaklığı 30, 37 (kontrol) 40, 45 ve 50 °C' gibi farklı değerlerde ayarlanmış ve proteaz üretimi için optimum sıcaklık değeri saptanmıştır.

3.4.2. pH'nın Etkisi

pH'nın bakteri üremesi ve proteaz üretimi üzerine etkisini belirlemek amacıyla, besi ortamının pH'sı 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 (Kontrol), 8.0 gibi farklı değerlerde ayarlanmış 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 çalkalama hızının 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 OD₆₀₀ = 0.3 olan ön inkübasyon kültüründen % 0.5, 1 (kontrol), 2, 3, 4 olacak şekilde enzim üretim ortamına ekilmiştir.

3.4.5. İnokülasyon Yaşının Etkisi

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

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

Maksimum enzim sentezinin görüldüğü besinsel ve fiziksel koşullar birleştirilerek yeni oluşturularak modifiye ortamda enzim veriminin sağlanması yoluna gidilecektir. Üreme ve proteaz aktivite tayinleri yapılarak temel besiyeri ile kıyaslama yapılmıştır.



4. BULGULAR

4.1. Mutant Bakterilerin Elde Edilmesi

Mutant suşların elde edilmesi amacıyla kullanılan EMS 50-500 µg/mL arası konsantrasyonların bakteri ölümü üzerine bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir. EMS 4-400 mg/ml arası konsantrasyon seviyesine çıkarılmıştır. 4 mg/ml konsantrasyonda bakteri ölümü üzerine bir etkisi olmadığı saptanmıştır. 400 mg/ml konsantrasyonda ise %100 ölüm gerçekleşmiştir. 20-60 mg/ml konsantrasyon arasında yüksek ölüm oranları elde edilmiştir. Mutasyon çalışmaları her bir deneme için iki paralel olarak yapılmıştır. Paralel çalışmalarda genellikle aynı sonuçlar elde edilmiştir. Çizelge 4.1’de ana suş ile mutantlar kıyaslandığında 20 mg/ml EMS varlığında elde edilen KE20 için %90 oranında ölüm saptanırken, 35 mg/ml EMS varlığında elde edilen KE35-1, KE35-2, KE35-3 mutantlarında bu oran %94 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.1. *Bacillus subtilis* E 6-5’in hayatta kalma oranı üzerine EMS etkisi

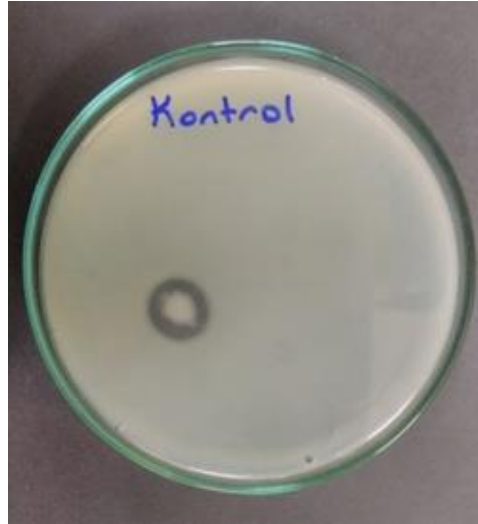
Bakteriler	Koloni Sayısı	Canlılık Oranı (%)	Ölüm Oranı (%)
Ana suş E6-5	50	100	0
Mutant KE20	5	10	90
Mutant KE35-1	3	6	94
Mutant KE35-2	3	6	94
Mutant KE35-3	3	6	94

4.2 Çizelgesinde en geniş proteaz zon çapına sahip mutantlar gösterilmiştir. *Bacillus subtilis* E6-5 şusu ile yapılan EMS mutasyonu sonucu toplam olarak yaklaşık 82 mutant suş elde edilmiştir (Çizelge 4.2). Tüm çalışmalar sonucunda enzim üretimine sahip kolonilerin etrafında açık berrak zonlar cetvelle ölçülmüş ve kontrol olan ana şuşa yakın ve geniş zonlu olanlar seçilmiştir. Bu mutant suşların zon çapları ana şuşun zon çapı (8 mm) (Şekil 4.1) ile karşılaştırılmış, zon çapı ana şuştan büyük olan KE20 (15 mm), KE35-1 (15 mm), KE35-2 (14 mm), KE35-3 (14 mm) olarak adlandırılan 4 adet mutant suş seçilmiştir (Şekil 4.2).

Zon çapları birbirine yakın olduğundan dolayı 4 mutant suş enzim üretim kapasitelerini kantitatif olarak saptamak üzere denemeye alınmışlardır. Zon apı ana suştan büyük olan mutant suş seçilerek KE20 (15mm) olarak adlandırılmıştır (Şekil 4.2). KE20 nolu mutant, 20µl seyreltmesiz EMS dozu kullanılıp, 48 saat üremeye tabii tutulmuőtur. Ardından koloni ve zon çapı ölçümleri yapılarak enzim üretim kapasitesini kantitatif olarak saptamak için denemeye alınmıştır.

Çizelge 4.2. Farklı konsantrasyonlardaki EMS denemeleri sonucu elde edilen mutant suşların koloni ve zon çapları

EMS Doz (mg/mL)	Koloni Sayısı	Koloni apı (mm)	Zon apı (mm)
Kontrol	50	5	8
20	17	4	15
25	15	3	13
30	10	4	11
35	10	5	14-15
40	10	3	13
50	8	4	13
55	7	3	12
60	5	4	13



Şekil 4.1. Ana suş *Bacillus subtilis* E 6-5'in yağsız süt tozlu ortamındaki proteaz zon çapı (8 mm)



Şekil 4.2. Mutantların yağsız süt tozlu ortamındaki proteaz zon çapları

A:KE20 (15 mm); B:KE35-1 (15 mm); C: KE35-2 (14 mm); D: KE35-3 (14 mm)

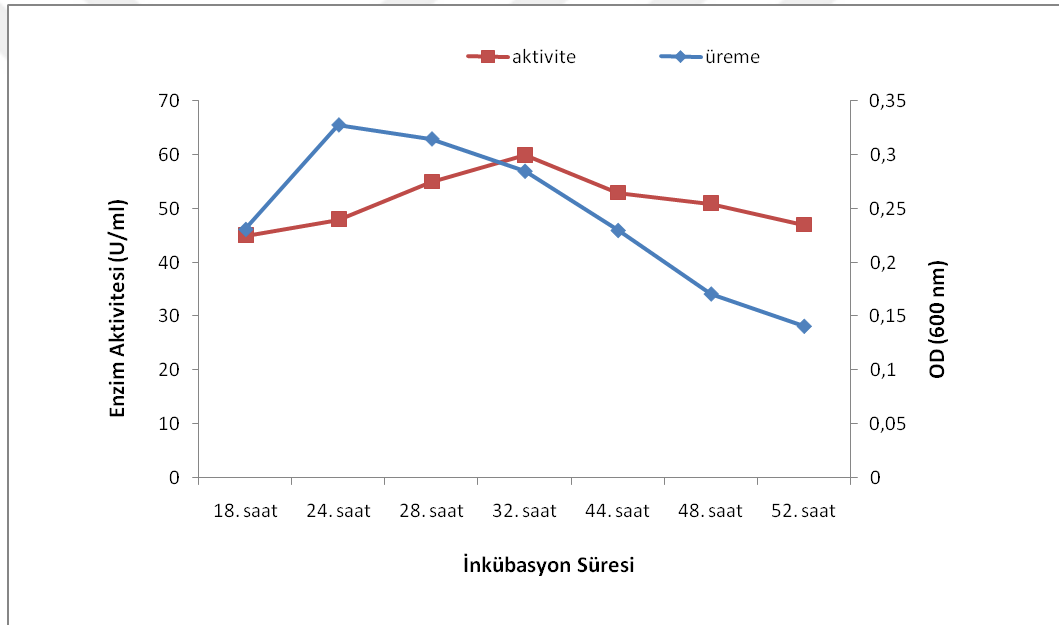
4.2. Mutantların Kantitatif olarak Proteaz Üretim Kapasitelerinin Saptanması

Yapılan EMS mutasyon denemeleri sonucunda zon çapları dikkate alınarak seçilen mutant suşların üreme eğrileri çıkarılmak üzere denemeye alınmışlardır. Denemeye alınan bu mutant suşlar Çizelge 3.1'deki içeriği verilen besi ortamında 18-96 saatler arasında üretilmeleri planlanmıştır. Ancak, yapılan çalışma sonucunda en yüksek enzim üretimi ana suş için 32. saat, mutant suşlar için 48 saat sonunda elde edildiğinden üremelere 52 saat boyunca devam edilmiştir. Enzim üretimleri ana suş için 60 IU/ml ve üreme OD₆₀₀ 0,29; mutant KE20 için 553 IU/mL ve üreme OD₆₀₀ 1,14; mutant KE35-1 için 354 IU/mL ve üreme OD₆₀₀ 1,11, mutant KE35-2 için 88 IU/mL ve üreme OD₆₀₀1,1; mutant KE35-3 için de 358 IU/mL ve üreme OD₆₀₀ 0,70 olarak saptanmıştır (Çizelge 4.3). Mutant KE20'de enzim veriminin ana suşa göre 9.2 kat arttığı, mutant KE35-1 ve mutant KE35-3 için 6, mutant KE35-2 için 1.5 kat artış gösterdiği tespit edilmiştir.

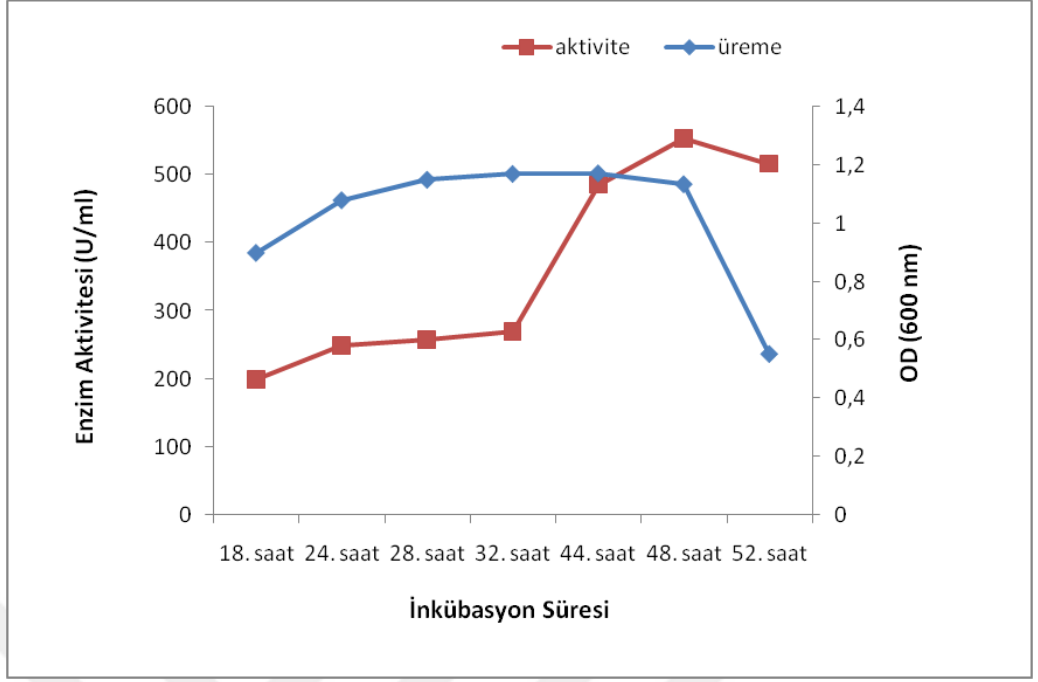
Ana suş ve mutant suşların üremelerine bakıldığında üremenin enzim üretimi ile birlikte paralellik göstermediği saptanmıştır. Maksimum enzim üretimi ana ve mutant suşlarda logaritmik fazın ortasında elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre KE20 mutant suşu ana suşa ve diğer mutant suşlara göre yüksek enzim aktivitesi saptandığından deneylere bu mutant suş ile devam edilmiştir.

Çizelge 4.3. Ana suş ve bunun mutant suşlarının proteaz üretim kapasitelerinin zamana bağlı karşılaştırılması

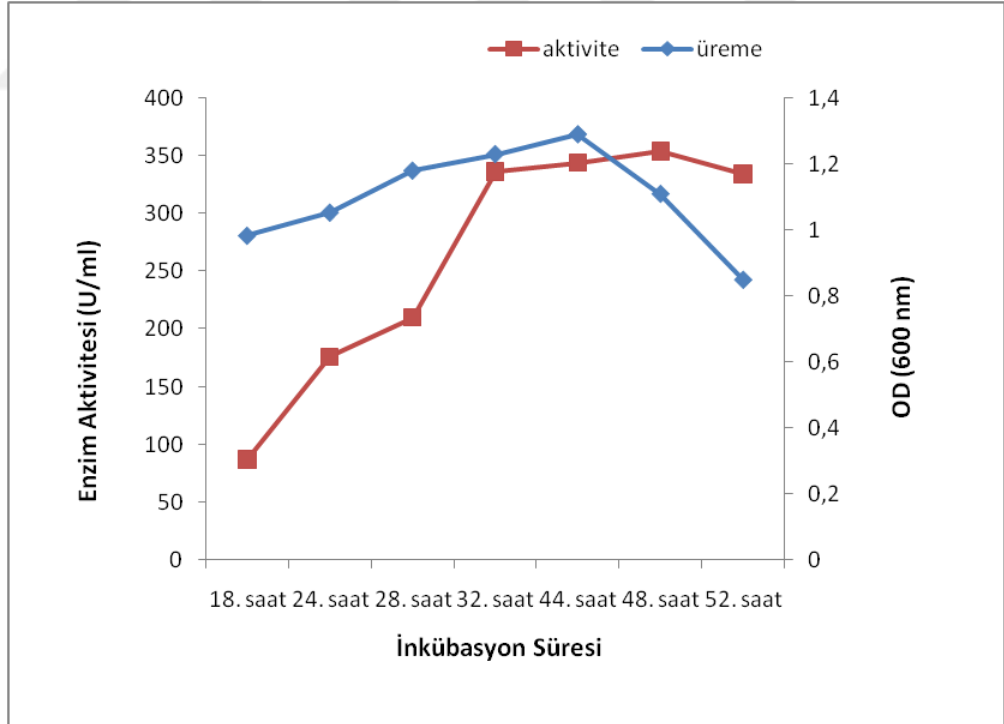
Saat	E6-5 ana suşu		KE20 mutant suşu		KE35-1 mutant suşu		KE35-2 mutant suşu		KE35-3 mutant suşu	
	IU/mL	OD600	IU/mL	OD600	IU/mL	OD600	IU/mL	OD600	IU/mL	OD600
18.	45	0,23	199	0,9	87	0,99	53	0,7	162	0,71
24.	48	0,33	249	1,08	176	1,05	57	0,8	243	0,99
28.	55	0,32	258	1,15	210	1,18	62	0,95	254	1,1
32.	60	0,29	270	1,17	336	1,23	71	1,23	260	1,21
44.	53	0,23	485	1,17	344	1,29	82	1,19	322	1,07
48.	51	0,17	553	1,14	354	1,11	88	1,1	358	0,7
52.	47	0,14	516	0,56	334	0,85	84	0,96	272	0,48



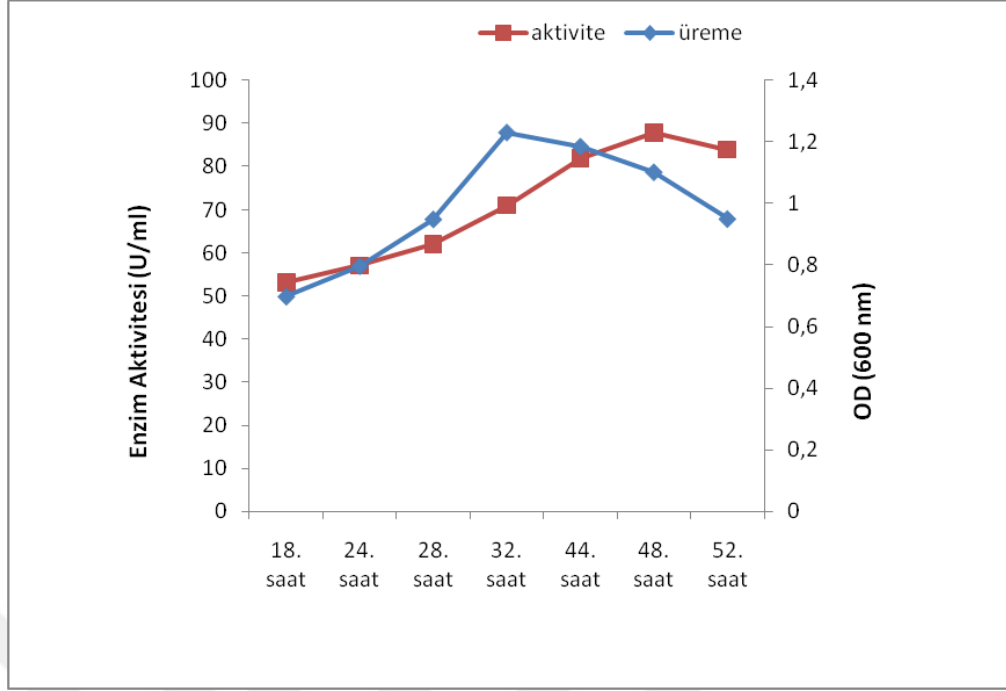
Şekil 4.3. *Bacillus subtilis* E6-5 'in proteaz üretim kapasitesi ve üreme değerlerinin zamana bağlı değişimleri



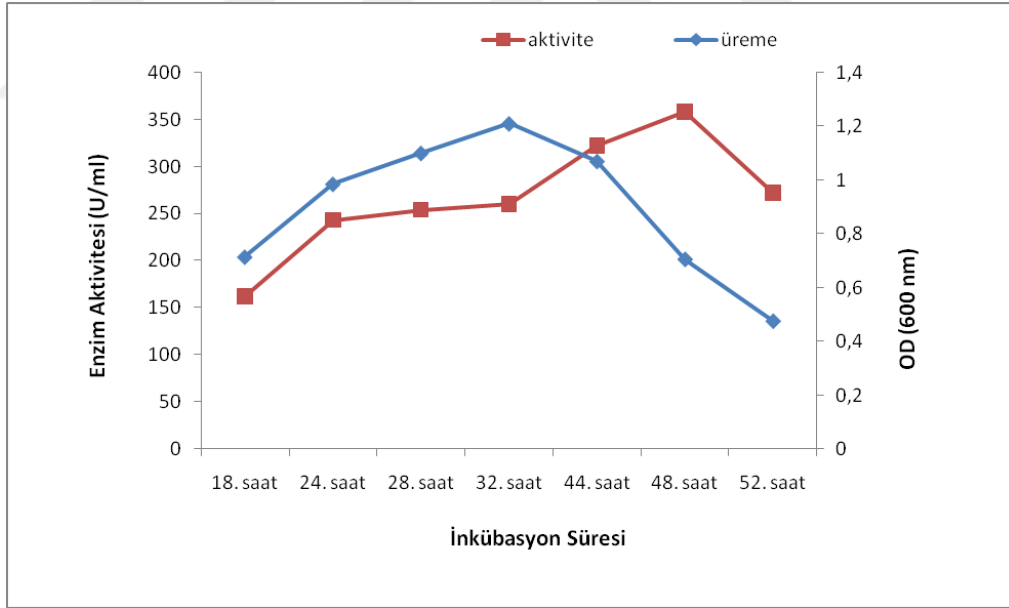
Şekil 4.4. KE20' nin proteaz üretim kapasitesi ve üreme değerlerinin zamana bağlı değişimleri



Şekil 4.5. KE35-1'in proteaz üretim kapasitesi ve üreme değerlerinin zamana bağlı değişimleri



Şekil 4.6. KE35-2'nin proteaz üretim kapasitesi ve üreme değerlerinin zamana bağlı değişimleri

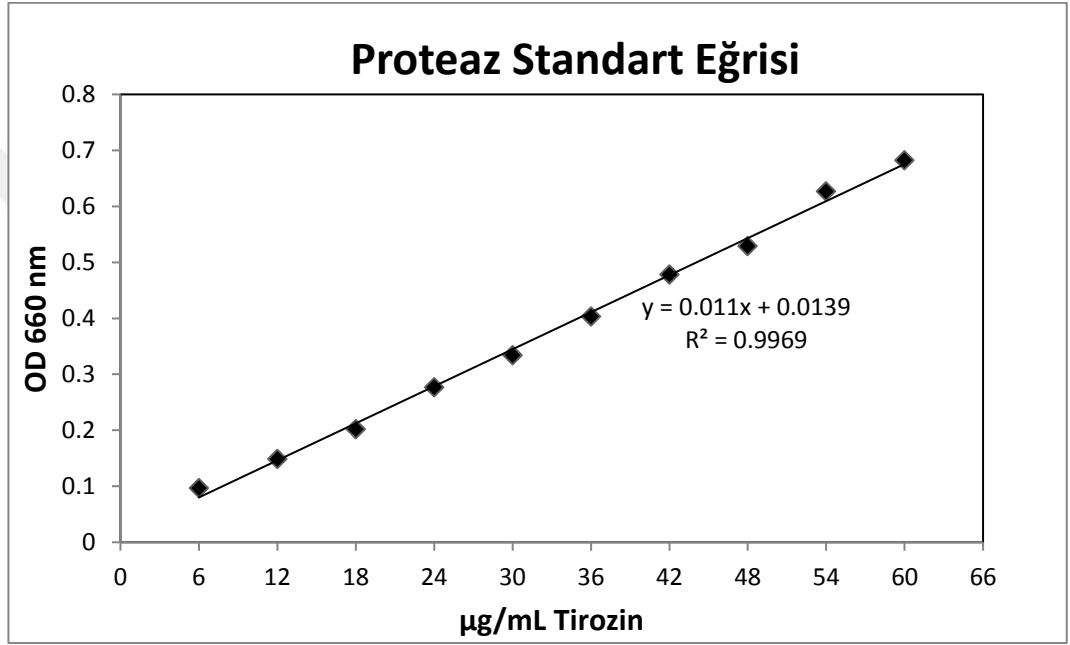


Şekil 4.7. KE35-3'ün proteaz üretim kapasitesi ve üreme değerlerinin zamana bağlı değişimleri

Mutant suşlardan en iyi proteaz enzim aktivitesine sahip olan suş *Bacillus subtilis* KE20 olarak adlandırılmıştır. Çalışmalara bu suş ile devam edilmiştir.

4.3. Tirozin Standart Grafiği ve Hazırlanışı

Enzim aktivitesinin hesaplanmasında, standart eğri için 0-60 µg/mL tirozin çözeltileri hazırlanmıştır. Tirozin miktarı, daha önce tarif edildiği gibi spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Konsantrasyona karşı absorbans grafiği lineer regresyon analiziyle çizilerek konsantrasyonu bilinmeyen örneğin tirozin konsantrasyonu, standart grafiğinden elde edilen doğru denkleminin formülünden hesaplanmıştır (Şekil 4.8). Doğrunun denklemi $y = 0,009x + 0,0161$ regresyon katsayısı $R^2 = 0.9987$ 'dir.



Şekil 4.8. Tirozin standart grafiği

4.4. Enzim Üretimi Üzerine Etki Eden Besinsel Faktörler

Bakterilerin buldukları ortama bağlı enzim üretim kapasiteleri değişir, bu nedenle ortam şartlarının değiştirilmesi enzim üretim miktarına etki etmektedir. Enzim üretim besiyerindeki karbon (C), azot (N) ve metal iyonu kaynakları değiştirilmiş, değişen ortam şartlarının *Bacillus subtilis* KE20 mutattuşunun proteaz üretimi üzerine olan etkileri belirlenmiştir.

Çalışmalarda her deney 3 kez tekrarlanmış olup, grafik ve çizelgelerde ortalama değerler verilmiştir.

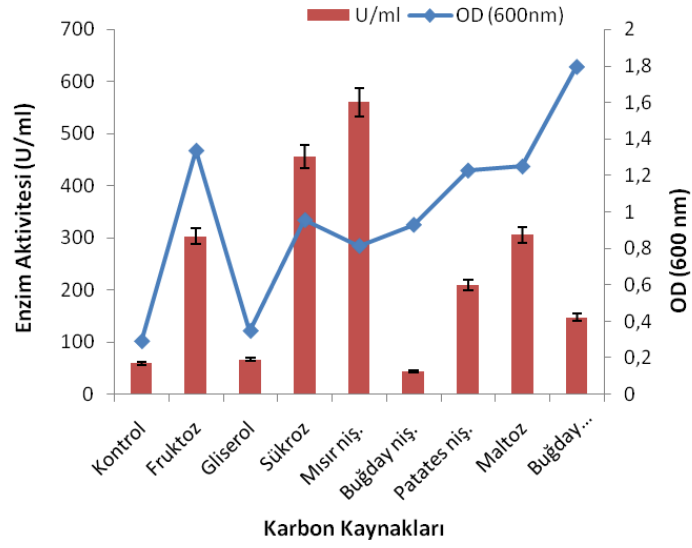
4.4.1. Karbon Kaynaklarının Etkisi

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 oranda Fruktoz, Gliserol, Sükroz, Mısır nişastası, Buğday nişastası, Patates nişastası, Maltoz ve Buğday kepeği kullanılmıştır. Farklı karbon kaynağı içeren besiyerinde mutant suş 48 saat boyunca inkübe edilmiş ve 48. saatte alınan örneklerde proteaz aktivitesi ve üreme değeri tayinleri yapılmıştır (Çizelge 4.4.).

Bacillus subtilis KE20’ nin enzim üretimi açısından karbon kaynağı tercih sıralaması sırasıyla Mısır nişastası> Sükroz> Maltoz> Fruktoz> Patates nişastası> Buğday kepeği> Gliserol> Glukoz (Kontrol)> Buğday nişastası şeklinde belirlenmiştir. Maksimum bakteri üremesinin ise sırasıyla Buğday kepeği> Fruktoz> Maltoz> Patates nişastası> Sükroz> Buğday nişastası > Mısır nişastası > Gliserol> Glukoz (Kontrol) ortamlarında gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Maksimum enzim üretiminin gerçekleştiği Mısır nişastalı ortamda ana suşa göre 9.33 verim artışı saptanmıştır (Şekil 4.9.).

Çizelge 4.4. Farklı karbon kaynaklarının 48. saatte, KE20’nin enzim üretimi ve üreme üzerine etkileri

Karbon Kaynakları	Enzim Aktivitesi (IU/mL)	Üreme (OD ₆₀₀)	Kat Artışı
Glukoz (Kontrol)	60	0,29	1
Fruktoz	303	1,34	5.05
Gliserol	67	0,35	1.12
Sükroz	456	0,96	7.6
Mısır Nişastası	560	0,81	9.33
Buğday Nişastası	44	0,93	0.73
Patates Nişastası	209	1,23	3.5
Maltoz	306	1,25	5.1
Buğday Kepeği	148	1,8	2.5



Şekil 4.9. Karbon kaynaklarının 48. saatte KE20' nin proteaz üretim kapasitesi üzerine etkileri

4.4.2. Azot Kaynaklarının Etkisi

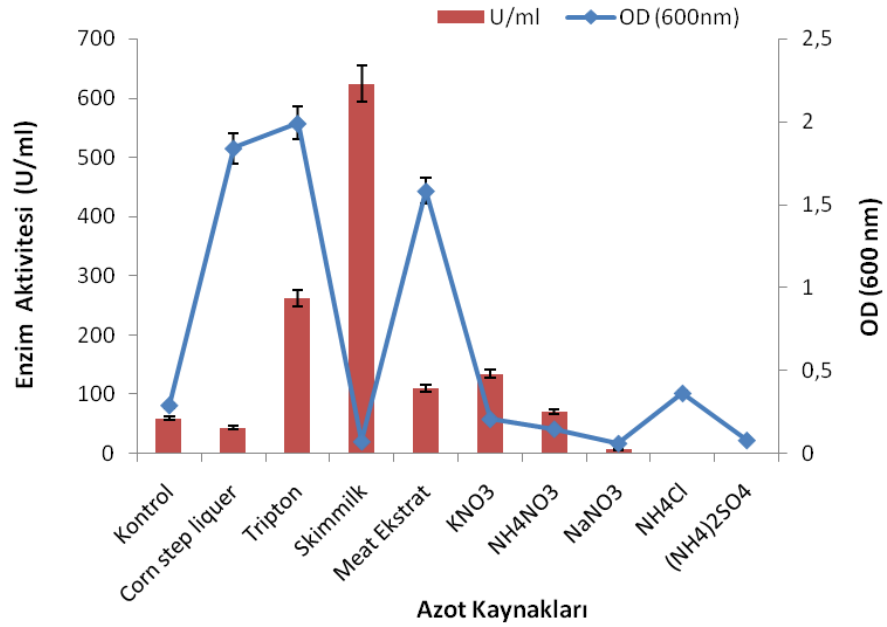
Azot kaynaklarının bakteri üremesi ve enzim aktivitesi üzerine etkilerinin araştırılması amacıyla kontrol ortamındaki pepton ve maya özütü (yeast ekstrakt) yerine sırasıyla mısır ıslatma suyu (corn step- liquer), tripton, skimmilk (yağsız süttozu), pepton, yeast ekstrakt ve meat ekstrakt (et özütü); inorganik azot kaynağı olarak da KNO_3 , NH_4NO_3 , $NaNO_3$, NH_4Cl , $(NH_4)_2SO_4$ kullanılmıştır. Farklı azot kaynakları içeren besiyerlerinden 48. saatte alınan örneklerin üreme değerleri ve enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Ulaşılan sonuçlar grafik ve çizelge şeklinde verilerek, en yüksek enzim aktivitesinin Skimmilk (yağsız süttozu) varlığında olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.5).

Bacillus subtilis KE20'nin enzim aktivitesi açısından organik ve inorganik azot kaynağı sırası Skimmilk > Tripton > KNO_3 > Meat ekstrat > NH_4NO_3 > Kontrol (pepton ve yeast ekstrat) > Corn step liquer > $NaNO_3$ > $(NH_4)_2SO_4$ şeklindedir. En yüksek enzim üretiminin gerçekleştiği Skimmilk ortamında ana suşa göre 10.4 kat verim artışı saptanmıştır (Şekil 4.10).

NH_4NO_3 (71 IU/mL) varlığında kontrolden fazla aktivite gözlemlenirken, $(NH_4)_2SO_4$ varlığında ise enzim aktivitesi gözlemlenmemiştir. Organik azot kaynaklarının inorganiklere göre enzim üretimi üzerinde yüksek etkiye sahip olduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.5. Farklı azot kaynaklarının 48. saatte KE20'nin enzim üretimi ve üreme üzerine etkileri

Azot Kaynakları	Enzim Aktivitesi (IU/mL)	Üreme (OD ₆₀₀)	Kat Artışı
Kontrol	60	0,29	1
Corn step liquer	44	1,84	0.73
Tripton	262	1,1	4.37
Skimmilk	624	0,07	10.4
Meat Ekstrat	110	1,59	1.83
KNO ₃	135	0,2	2.3
NH ₄ NO ₃	71	1,48	1.2
NaNO ₃	7	0,06	0.12
NH ₄ Cl	2	0,36	0.03
(NH ₄) ₂ SO ₄	0	0,08	0



Şekil 4.10. Azot kaynaklarının 48. saatte KE20'nin proteaz üretim kapasitesi üzerine etkileri

4.4.3. Metal İyonu Kaynaklarının Etkisi

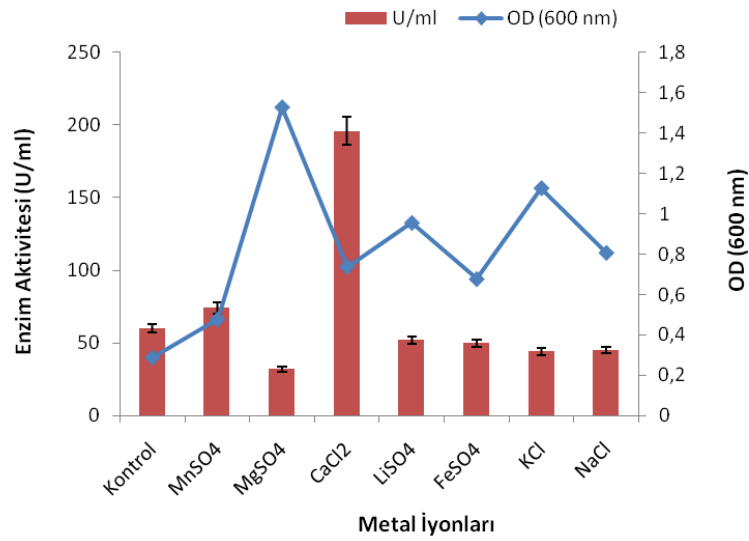
Metal iyonlarının bakteri üremesi ve enzim üretimi üzerine etkisini araştırmak üzere yapılan çalışmalarda kontrol ortamındaki MgSO₄+CaCl₂+ K₂HPO₄ yerine sırasıyla MgSO₄, LiSO₄, FeSO₄, CaCl₂, KCl, NaCl ve MnSO₄ kullanılmıştır. Farklı metal kaynakları içeren besiyerlerinden 48. saatte alınan örneklerde üreme değerleri ve enzim

aktivite tayinleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar grafik ve çizelge olarak ayrı ayrı verilmiş olup, buralarda da görülebileceği gibi kontrole en yakın aktivite değeri metal kaynağı LiSO₄ varlığında elde edilmiştir (Çizelge 4.6).

KE20'nin enzim üretiminde metal kaynağını sırası ile CaCl₂>MnSO₄>Kontrol (MgSO₄+CaCl₂+ K₂HPO₄) > LiSO₄> FeSO₄>NaCl > KCl > MgSO₄ şeklinde tercih ettiği görülmüştür. Belirtilen tercih sıraları incelendiğinde, kullanılan metal kaynakları içerisinde kontrol (60 IU/mL)'e göre sadece MnSO₄ (1,23 kat) ve CaCl₂ (3,27 kat) verim artışı olduğu saptanmıştır (Şekil 4.11).

Çizelge 4.6. Metal kaynaklarının 48. saatte KE20'nin proteaz aktivitesi ve üreme miktarı üzerine etkileri

Metal İyonları	Enzim Aktivitesi (IU/mL)	Üreme (OD ₆₀₀)	Kat Artışı
Kontrol	60	0,29	1
MnSO ₄	74	0,48	1.23
MgSO ₄	32	1,53	0.53
CaCl ₂	196	0,73	3.27
LiSO ₄	52	0,96	0.87
FeSO ₄	50	0,68	0.83
KCl	44	1,13	0.73
NaCl	45	0,8	0.75



Şekil 4.11. Metal iyonlarının 48. saatte KE20'nin proteaz üretim kapasitesi üzerine etkileri

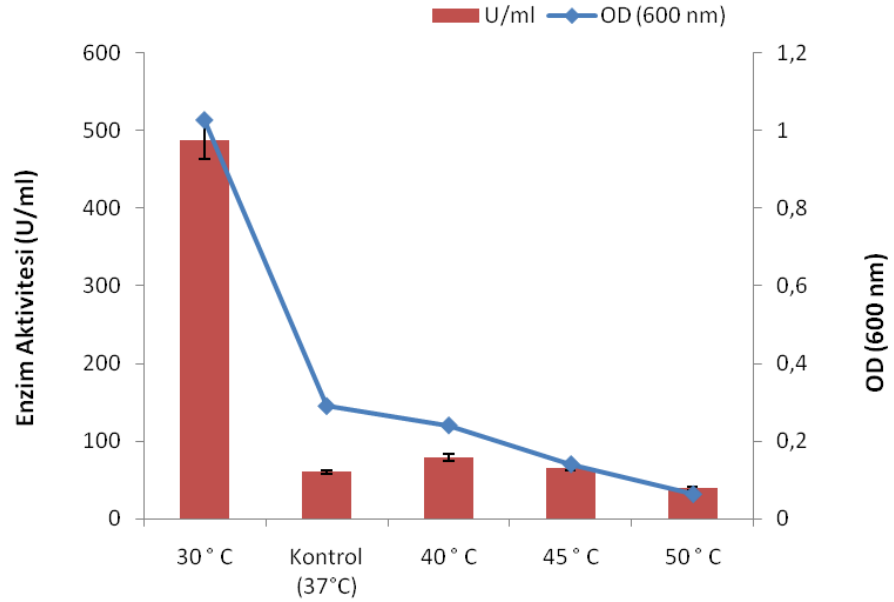
4.5. Enzim Üretimi Üzerine Etki Eden Fiziksel Faktörler

4.5.1. Sıcaklığın Etkisi

Sıcaklığın bakteri üremesi ve enzim aktivitesi üzerine etkisinin araştırılması amacıyla 30°C, 40°C, 45°C, 50°C sıcaklıkları kullanılarak kontrol (60 IU/mL) grubuna göre verim artışı incelenmiştir. Mutant KE20 (487 IU/mL) suşunun en verimli enzim aktivitesini 30 °C’de 8.12 kat artış gerçekleştirdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.7, Şekil 4.12).

Çizelge 4.7. Sıcaklığın 48. saatte KE20’ nin proteaz üretim kapasitesi üzerine etkileri

Sıcaklık °C	Enzim Aktivitesi (IU/mL)	Üreme (OD ₆₀₀)	Kat Artışı
Kontrol (37)	60	0,29	1
30	487	1,03	8.12
40	65	0,24	1.1
45	79	0,14	1.31
50	39	0,06	0.65



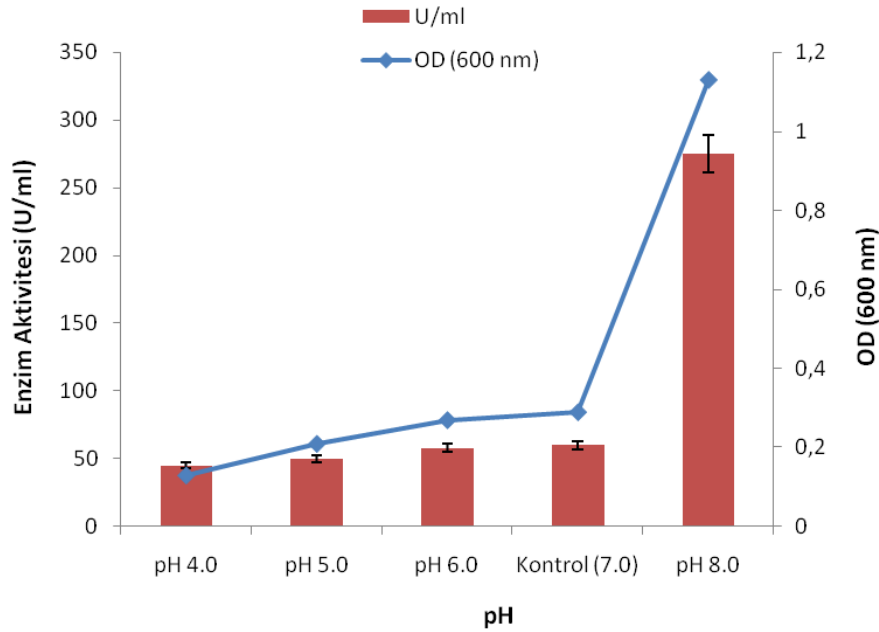
Şekil 4.12. Sıcaklık faktörünün KE20'nin enzim üretimi üzerine etkisi

4.5.2. pH' nın Etkisi

pH' nın bakteri üremesi ve enzim aktivitesi üzerine etkisinin araştırılması amacıyla 4.0, 5.0, 6.0, 8.0 şeklinde değiştirilen pH değerleri kullanılarak kontrol (pH 7.0)'e göre enzim üretimi gözlemlenmiştir. En verimli enzim aktivitesi pH 8.0'de ana suşa oranla 4,6 kat farkla gözlenmiştir (Çizelge 4.8, Şekil 4.13).

Çizelge 4.8. pH'nın 48. saatte KE20' nin proteaz üretim kapasitesi üzerine etkileri

pH	Enzim Aktivitesi (IU/mL)	Üreme (OD ₆₀₀)	Kat Artışı
Kontrol (7.0)	60	0,29	1
4.0	45	0,13	0.75
5.0	172	0,21	2.87
6.0	61	0,27	1.02
8.0	275	1,13	4.6



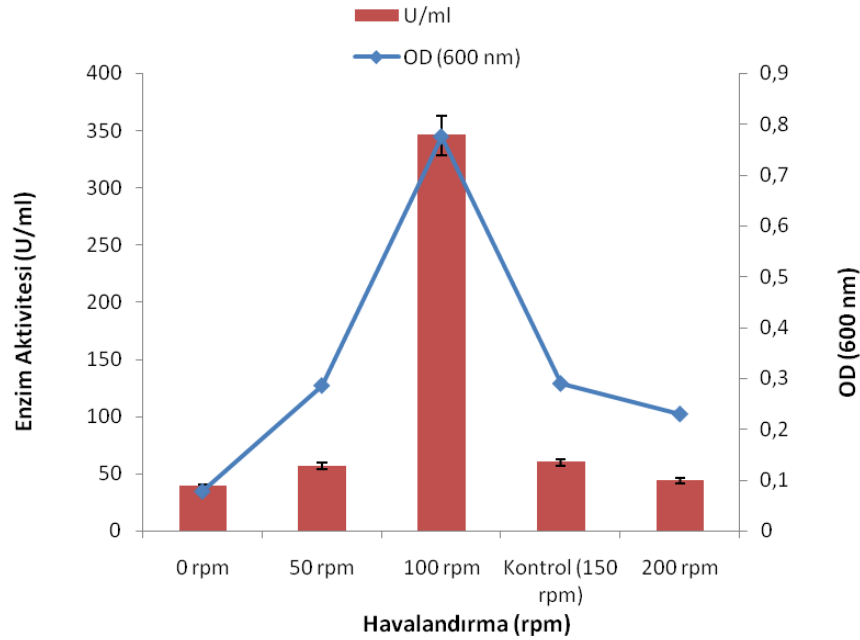
4.13. pH faktörünün KE20'nin enzim üretimi üzerine etkisi

4.5.3. Havalandırmanın Etkisi (Çalkalanma etkisi)

Havalandırma şartlarının etkisi inkübatörün çalkalanma hızının 0 rpm, 50 rpm, 100 rpm, 200 rpm şeklinde değiştirilen hızlar kullanılarak kontrol (150 rpm)'e göre enzim üretimi gözlemlenmiştir. En iyi çalkalama hızı 100 rpm olarak belirlenmiştir. Bu rpm ile ana suşu oranla 5,77 kat enzim verimi artmıştır (Çizelge 4.9, Şekil 4.14). Enzim üretimi ile bakteri üremesinin paralel olmadığı, yüksek çalkalanma etkisi altında üremesinin arttığı gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.9. Havalandırmanın 48. saatte KE20' nin proteaz üretim kapasitesi üzerine etkileri

Havalandırma (rpm)	Enzim Aktivitesi (IU/mL)	Üreme (OD ₆₀₀)	Kat artışı
Kontrol (150)	60	0,29	1
0	39	0,08	0.7
50	57	0,29	0.96
100	346	0,78	5.77
200	44	0,23	0.7



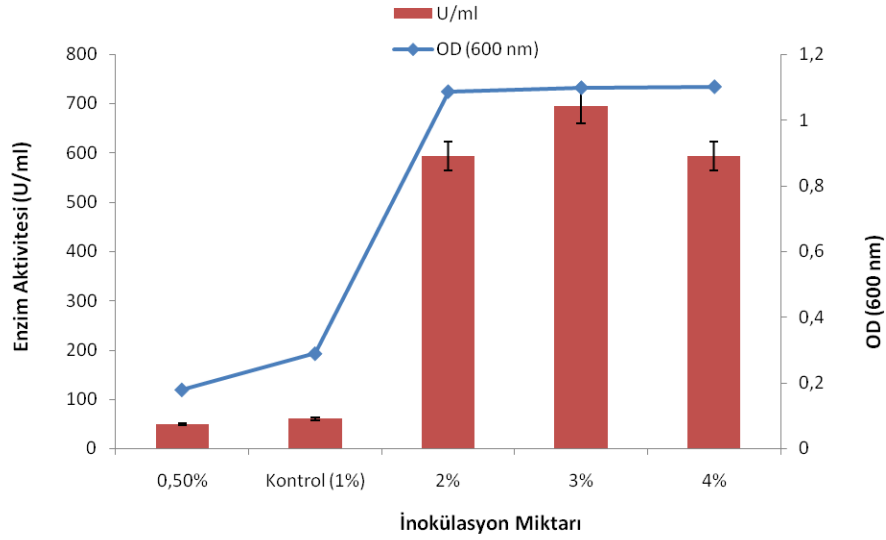
Şekil 4.14. Havalandırma faktörünün KE20'nin enzim üretimi üzerine etkisi

4.5.4. İnokülasyon Miktarının Etkisi

Bakteriler OD₆₀₀ = 0,3 olan ön inkübasyon kültüründen % 0,5, 2, 3, 4 olacak şekilde enzim üretim ortamına ekilmiştir. Kontrol (%1)'e göre enzim üretimi gözlemlenmiştir. En iyi inokülasyon miktarı %3 olarak belirlenmiştir. Bu inokülasyon miktarı ile ana suşa göre 11,6 kat enzim veriminin arttığı saptanmıştır (Çizelge 4.10, Şekil 4.15).

Çizelge 4.10. İnokülasyon miktarının 48. saatte KE20'nin proteaz üretim kapasitesi üzerine etkileri

İnokülasyon Miktarı (%)	Enzim Aktivitesi (IU/mL)	Üreme (OD ₆₀₀)	Kat Artışı
Kontrol (1)	60	0,29	1
0,5	49	0,18	0.8
2	593	1,087	9.88
3	695	1,099	11.6
4	593	1,102	9.88



Şekil 4.15. İnokülasyon miktarının KE20'nin enzim üretimi üzerine etkisi

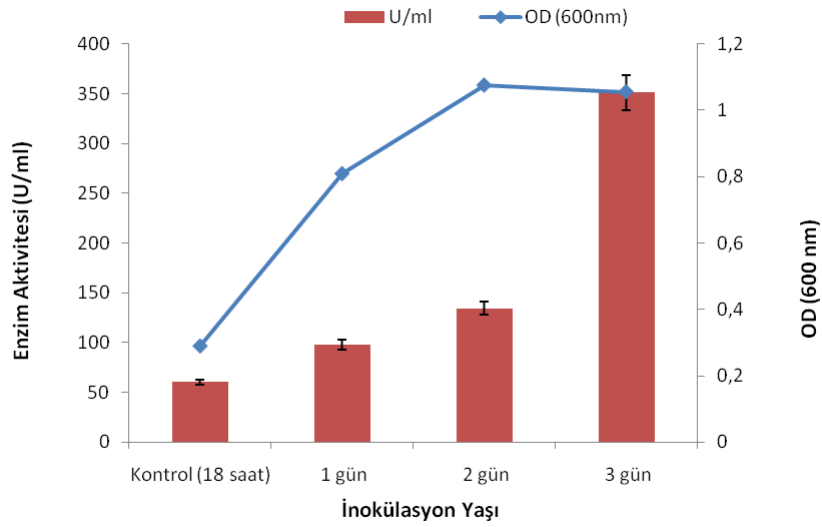
4.5.5. İnokülasyon Yaşının Etkisi

İnokülasyon yaşının enzim aktivitesi üzerine etkisinin araştırılması amacıyla bakterilerin 1, 2 ve 3 gün şeklindeki inokülasyon yaşları kullanılarak kontrol (18 saat)'e göre enzim üretimi gözlemlenmiştir. En iyi inokülasyon süresi 3 gün olarak

belirlenmiştir. Bu inokülasyon süresi ile ana suşa göre 5,85 kat enzim veriminde artış saptanmıştır (Çizelge 4.11, Şekil 4.16).

Çizelge 4.11. İnokülasyon yaşının 48. saatte KE20' nin proteaz üretim kapasitesi üzerine etkileri

İnokülasyon Yaşı (gün)	Enzim Aktivitesi (IU/mL)	Üreme (OD ₆₀₀)	Kat Artışı
Kontrol (18 saat)	60	0,29	1
1	98	0,81	1.63
2	134	1,077	2.23
3	351	1,057	5.85



Şekil 4.16. İnokülasyon yaşının KE20'nin enzim üretimi üzerine etkisi

4.6. 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 sağlanması yoluna gidilmiştir. Modifiye ortamda en iyi karbon kaynağı olarak elde edilen Mısır nişastası, azot kaynağı olarak Skimmilk ve metal iyonları olarak CaCl₂, fiziksel faktörlerde ise sıcaklık 30°C, havalandırma 100

rpm, inokülasyon miktarı %3 ve inokülasyon yaşı 3 gün şeklinde kullanılmıştır (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12. Kontrol ortamı ile modifiye ortamın üreme ve enzim üretim kapasitesine etkisi

Kontrol Ortam	Enzim Aktivitesi (IU/mL)	Üreme (OD ₆₀₀)	Modifiye Ortam	Enzim Aktivitesi (IU/mL)	Üreme (OD ₆₀₀)
Glukoz Pepton+ Yeast ekstrat MgSO ₄ + CaCl ₂ + K ₂ HPO ₄ 37 °C pH 7.0 150 rpm 1% aşılama ön inkübasyon 18 saat	553	1,14	Mısır nişastası Skimmilk CaCl ₂ 30 °C pH 8.0 100 rpm 3% aşılama ön inkübe 3 gün	992	1,2

Modifiye ortamda kontrole göre KE20'nin bağıl aktivitesi %79'luk bir artış gösterirken ana şuşa göre 16.5 kat enzim üretimi sağlanmıştır.

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), mutagenizin geleneksel yöntemlerle veya rekombinant DNA teknolojiyle proteaz veriminin artırılmasında önemli rol oynadığını vurgulamıştır. Bakteriyel suşların genetik manüplasyonu için kimyasal mutajenlerden en fazla kullanılanı ise etil metan sülfonat (EMS) dir (Haq ve ark. 2010).

Bu çalışmada yüksek oranda proteaz üreten yeni bir mutant elde edilmesi amacıyla kimyasal mutajen EMS kullanılmıştır. 20 mg/ml EMS varlığında %90 oranında ölüm saptanan çalışma sonrası elde edilen KE20 mutantının ana suşa göre yüksek enzim zonuna sahip olduğu saptanmıştır. Bu mutantın üreme eğrisinde en yüksek enzim üretiminin 48. saatte ana suşa göre 9.2 kat artış gösterdiği belirlenmiştir. Enzim üretiminde en iyi verimi almak için hazırlanan modifiye ortamda ise ana suşa göre 16.5 kat enzim verimi saptanmıştır.

Rakariyatham ve arkadaşları (2006) UV ve EMS ile üretilen mutantının stabil bir proteaz ürettiğini saptamışlardır. Meraz ve arkadaşları (2005) ise *Bacillus* sp. mutant suşunun 60 dakikalık inkübasyon döneminde 8 kat yüksek enzim üretimi gerçekleştirdiğini belirtmişlerdir.

Wang ve arkadaşları (2007) *Bacillus pumilus* suşuna gama radyasyonu uygulayarak mutant suşlar elde ederek proteaz aktivitesini incelemişlerdir. Elde edilen mutant suş ana suşa oranla proteaz üretiminde 2 kat verim göstermiştir. Duarte ve arkadaşları (2011) *Candida parapsilosis*'den EMS ile mutant suş geliştirerek proteaz üretiminde verim elde etmişlerdir.

Shikha ve Darmwal (2007) *Bacillus pumilus* ana suşu üzerinde farklı zaman aralıklarında EMS ve MMS (metil metansülfonat) kullanılarak geliştirdikleri mutant suşların ana suşa oranla 1.95 kat fazla proteaz ürettiğini saptamışlardır. Bu araştırmacıların aynı mutagenез yöntemi kullanılarak *Bacillus pantotheneticus* ile yaptıkları çalışmada ise alkali proteaz üretiminde ana suşa göre 1.44 kat artış elde etmişlerdir. Dutta ve Banerjee (2006) UV ile mutasyona uğratılan *Pseudomonas* sp.'den elde edilen mutant suşlarda proteaz üretiminin ana suşa göre 2.5 kat yüksek olduğunu göstermişlerdir.

Nadeem ve ark. (2011) *Bacillus pumilus* EMS uygulaması yapılan mutant suşunu kullanarak alkalın proteaz biyosentezi üzerine çalışma yapmışlardır. Çalışmanın amacı kombine mutajenik tedaviler kullanılarak üretim alkalın proteazını arttırmaktır. Ana suş *Bacillus pumilus*, UV ışınlamasına maruz bırakılmış, ardından alkali proteaz verimini arttırmak için EMS (Etil metan sülfonat) ve MMS (Metil metan sülfonat) eklenmiştir. Her bir muameleden sonra mutantlar en iyi proteolitik mutantın seçimi için yağsız süt agar plakaları üzerinde taranmıştır. En iyi pozitif mutantın benzer kültür koşullarında ana suşun 1.95 kat daha fazlası enzim ürettiği gözlemlenmiştir. Enzim aktivitesinde yaklaşık 2.1 kat artış, %83.6 enzim geri kazanımı ile %70 doygunluk seviyesinde başlangıç kültür besiyerinden elde edilmiştir.

Mukhtar ve Haq (2012) *Bacillus subtilis* mutant suşları tarafından üretilen alkalın proteazın saflaştırılması ve karakterizasyonu ile ilgili çalışma yapmışlardır. Enzim %70 doygunlukta % 81.5 verimle 2.64 kat saflaştırma sağlayan amonyum sülfat çökeltmesi kullanılarak saflaştırılmıştır.

Raju (2013) proteaz üretimini arttırmak için *Bacillus cereus* bakterisini EMS ve Etidyum bromide tabi tuttuğunda ana suşa oranla 48. Saatte 2-4 kat arası enzim üretiminde artış sağlamıştır.

Raju ve Divakar (2013) rekombinant olmayan *Bacillus cereus*'un fibrinolitik proteaz üretimi ile ilgili çalışma yapmışlardır. Rekombinant olmayan *Bacillus cereus* UV, EMS ve EtBr kullanılarak mutasyona uğratılmıştır. Mutantlar spektrofotometre kullanılarak enzim analizine göre taranmıştır. Mutasyon çalışmalarında ana şuştan 2 kat daha fazla proteaz üretimi elde etmişlerdir.

Birçok araştırmacı endüstriyel öneme sahip olan proteaz enzimini yüksek verimde üreten yeni mutant şuşlar elde etmek için çeşitli yöntemler kullanmışlardır. Kimyasal ve UV mutasyona uğramış *Bacillus pumilis* ve *Bacillus licheniformis* proteaz üretimini arttırmış (Nadeem ve ark. 2010). *Bacillus amyloliquefaciens* ayrıca proteaz aktivitesini de göstermiştir (Mrunmaya ve ark. 2013).

Zeng ve ark. (2017) ultraviyole ışınlama ve N-metil-N'-nitro-N-nitroso guanidin muamelsi sonucu *Bacillus amyloliquefaciens*'den elde etikleri mutantın ana suşa göre % 31.9 daha fazla proteaz ürettiğini rapor etmişlerdir.

Bir klasik mutasyon tekniği olan EMS ile spontan mutasyonların oluşturulması önemlidir. Spontan mutasyon sıklığı organizmalar arasında büyük farklılık göstermektedir. Aynı tür içinde bile spontan mutasyon sıklığı genden gene değişmektedir. Organizmalar arasındaki bu değişkenlik, onların hata okuma ve onarım sistemlerinin göreceli etkinliklerinden dolayı oluşabilmektedir.

Üretim ortamı içeriği enzim üretimi üzerinde arttırıcı bir etkiye sahiptir (Gulati, 2007). Çünkü kültür ortamının içeriği ve fermantasyon koşulları enzim üretimini etkileyen önemli parametrelerdendir. Ortam içeriğinin optimize edilmesi amacıyla farklı kaynaklı

karbon, azot ve metal iyon kaynakları kullanılmaktadır (Lan 2002). Bu amaçla elde ettiğimiz yeni mutant *B.subtilis* KE20'nin proteaz üretim kapasitesini arttırmak için üretim ortamında farklı karbon, azot ve metal iyonları gibi besinsel faktörler, sıcaklık, pH, havalandırma, inokülasyon miktarı ve inokülasyon yaşı gibi fiziksel faktör kaynakları denenmiş ve elde edilen sonuçlara göre yeni bir modifiye ortam oluşturulmuştur. Bu amaçla yapılan çalışmada en iyi karbon kaynağının Mısır nişastası olduğu belirlenmiştir. Mısır nişastası bulunan besiyerinde proteaz aktivitesinde kontrole göre 9.33 katlık verim artışı elde edilmiştir. Organik azot kaynaklarının en iyi olanı skimmilk olarak saptanmış ve kontrole göre skimmilkli ortamda 10.4 kat verim artışı gözlemlenmiştir. Metal iyonları içerisinde en iyi kaynak CaCl_2 bulunmuştur ve kontrole göre enzim üretimi 3.27 kat artmıştır.

Çeşitli araştırmacılar en iyi enzim üretimi için farklı karbon, azot kaynakları ve metal iyonları kullanmışlar ve bu araştırmalar neticesinde birbirinden farklı sonuçlara ulaşmışlardır.

Mehrotra ve ark. (1999) mutant *Bacillus* sp. suşunun glukoz, Mabrouk ve ark. (1999) da laktoz ve glukoz varlığında en yüksek seviyede proteaz üretimi rapor etmişlerdir.

Mukhtar ve Haq (2007) alkali proteaz üretimini arttırmak amacıyla *Bacillus subtilis* suşunu EMS mutasyonuna maruz bırakmışlardır. Pozitif mutasyon gösteren 14 adet en güçlü mutantları izole edip enzim üretimini gözlemlenmişlerdir. Soyu unu, polipepton, maya özü, glukoz, NH_4SO_4 ve Na_2CO_3 kullanılarak yaklaşık %100 verim elde etmişlerdir.

Yousaf ve ark. (2010) *Aspergillus oryzae*'de gerçekleştirdikleri EMS mutasyonunda elde ettikleri mutantların proteaz üretiminde hemen hemen tüm organik azot takviyeleri enzim üretimini desteklerken, sukrozun en iyi karbon kaynağı olduğunu kanıtlamışlardır.

Sivakumar ve ark. (2011) kimyasal mutajenler kullanarak elde ettikleri *Bacillus cereus* mutantının glukoz ve fruktozlu ortamda proteaz üretiminin arttığını rapor etmişlerdir.

Leng ve Xu (2011) proteaz üretimi için en iyi azot kaynağını pepton olarak bulmuşlardır ve bunu soya unu ile maya özü takip etmiştir. Fawzi (2011) ise enzim üretiminde organik azot kaynaklarının inorganik azotlardan daha üstün olduğunu saptamıştır.

Afifi ve arkadaşları (2012) *Penicillium chrysogenum* ile yaptıkları çalışmada EMS mutasyonu uygulamışlardır ve en iyi proteaz üretimini %1 kazein ve 2,5 mM MgSO₄ içeren ortamda saptamışlardır.

Raju (2013) endüstriyel olarak önemli proteaz üretimini arttırmak için *Bacillus cereus* bakterisine rastgele mutasyon yöntemi uygulamıştır. Bunun için UV, EMS ve Ethidyum Bromür kullanmıştır. Çalışmasında farklı karbon kaynağı, azot kaynağı, Maksimum proteaz üretimini %1 fruktoz, %1 NH₄NO₃, 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 NH₄NO₃ şeklinde rapor etmişlerdir.

Mukhtar ve Haq (2013) *Bacillus subtilis* türünü kullanarak su altında (batık) ve katı halde fermantasyonda 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.

Bu çalışmada en iyi üretim sıcaklığı 30°C olarak saptanmış ve kontrole göre enzim üretimi 8.12 kat artış göstermiştir. Optimum pH değeri 8 bulunmuş, kontrole göre elde edilen verim artışı ise 4,6 kat olarak belirlenmiştir. Havalandırma etkisi 100 rpm çalkalama hızında en iyi sonucu vermiştir ve kontrole göre 5.77 kat verim artışı gözlemlenmiştir. İnokülasyon miktarında %3'lük aşılama maksimum enzim üretimini sağlamıştır ve kontrole göre 11,6 kat verim artışı göstermiştir. Son olarak inokülasyon

yaşı için 3 gün en iyi sonucu vermiştir ve kontrole göre yaklaşık 5.85 kat enzim üretiminde artış olmasını sağlamıştır. Çalışmada besinsel ve fiziksel koşulların optimize edilmesi ile oluşturulan modifiye ortamda EK20 mutanti temel besi ortamına göre %79'luk bir artışla enzim üretimi göstermiştir. Ana suş (60 U/mL) ile kıyaslandığında mutant KE20 (992 U/mL) 16,5 kat verim artışı sağlamıştır.

Mukhtar ve Haq (2007) alkali proteaz üretimini arttırmak amacıyla *Bacillus subtilis* suşunu EMS mutasyonuna maruz bıraktıkları çalışmada en iyi enzim üretimini pH 8.5'da olan ortamda yaklaşık %100 verimle elde etmişlerdir.

Kalpana ve ark. (2008) *Aspergillus niger* tarafından üretilen alkalın proteaz enziminin 40°C'de 60 dakikaya kadar kararlı olduğunu bulmuşlardır.

Nadeem ve ark. (2010) *Bacillus pumilus* EMS uygulaması yapılan mutant suşunu kullanarak alkalın proteaz biyosentezi yaptıkları çalışmada maksimum proteaz aktivitesi pH 10.0'da, 60°C'de elde edilmiştir. Bu özellikler deterjan formülasyonu ve deri işlemede potansiyel uygulamasını göstermektedir.

Afifi ve arkadaşları (2012) *Penicillium chrysogenum*'u EMS mutasyonuna maruz bırakarak mutant suş geliştirmişlerdir. Bu mutantlar en iyi proteaz üretimini pH 9, sıcaklık 30 °C iken ve 7 gün inkübasyon süresi ile elde etmişlerdir.

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 olarak belirlenmiş 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* bakterisini UV, EMS ve Ethidyum Bromür ile muamele ederek rastgele mutasyon yöntemi uyguladığı çalışmasında inkübasyon süresi, aşılama, pH, sıcaklık gibi

faktörlerin enzim üretimine etkisini incelemiştir. En iyi verimi 2% aşılama, pH 8, 35°C sıcaklık ve 48 saat inkübasyon şartlarında saptamıştır.

Narasımhan ve ark. (2013) *Bacillus subtilis* türünü kullanarak EMS mutasyonu yoluyla mikolitik aktiviteyi arttırmayı amaçlamışlardır. Mutantları meyve bitkilerinde antraknoz hastalığının geçici ajanı olan *Colletotrichum gloesporioides*'e karşı çift plaka deneyi üzerindeki antifungal yeteneğine göre taramışlar ve 60 adet mutant bakteri izole etmişlerdir. 2 adet mutant suşta aktivite artışının en iyi şekilde olduğu bildirilmiştir.

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

Latif ve arkadaşları (2018) *Bacillus subtilis*'in proteaz üretimini arttırmak için kimyasal mutajenez EMS'yi kullanarak çalışma yapmışlardır. Aynı zamanda maksimum enzim üretimi için gerekli ortam koşullarında değerlendirmişlerdir. Maksimum enzim aktivitesi şartlarını pH 10.0, sıcaklık 35 °C, 4 ml inokülasyon miktarı olarak belirlemişlerdir. Elde edilen sonuçlar, kimyasal mutajenez tekniğinin, alkali proteaz enziminin üretimini arttırmak için *Bacillus*'un iyileştirilmesinde önemli bir araç olduğunu doğrulamıştır.

Bu araştırmada çalışılan proteaz enzimi, farklı endüstri dallarında kullanımı olan ve her geçen gün kullanım oranında artış gözlenen bir enzimdir. Çalışma sonucunda elde edilen oldukça verimli ve yeni bir mutant olan *Bacillus subtilis* KE20 proteaz enziminin endüstriyel alanda kullanılabilirliği olabilir. Bu şekilde dış ülkelerden ithal edilen proteaz enziminin, ülkemizde geniş çapta üretilmesi ve böylece ülke ekonomisine katkıda bulunulması olasıdır.

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.
- Afşar, A. 2008.** A Research on Increasing The Effectiveness Of Degreasing Process By Using Enzymes: Microbiol Res, s: 45-53.
- Anonim, 1994.** <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC34/>, (Erişim tarihi:2018).
- Anonim, 2006.** <http://www.refgen.com/egitim.asp>, (Erişim tarihi:2016).
- 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: 2017)
- Anonim, 2013.**<http://www.herbaextractsplus.com/bromelain.html>- (Erişim Tarihi: 2017)
- 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:2016).
- Anonim,2016.**http://www.researchandmarkets.com/research/17qrqp/proteases_market- (Erişim tarihi:2016).
- 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- (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®ion=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®ion=TR->(Erişim Tarihi: 2018).
- Anonim, 2018.**<http://what-when-how.com/molecular-biology/06-methylguanine-dna-methyltransferase-mgmt-molecular-biology/-> (Erişim tarihi: 2018).
- Anwar, A., Saleemuddin, M. 1997.** Alkaline Proteases, *Bioresource Technology* Reviews, 64: 175-183.
- Appak, S. 2006.** Farklı Kaynaklardan İzole 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 Saflaştırılması 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 Turnira* '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 saflaştırılan Alkalin Proteazın termal inaktivasyon kinetiğinin belirlenmesi ve Cu^{+2} 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 önemi, 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.** Whole genome 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., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., Chauhan, B. 2003.** Microbial α -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 alkalophilicities. In: *Microbial Enzyme and isolation, production and characterization. Applied Microbiology and Biotechnology*, 12: 34-39.
- 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.
- Kalpna 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., Çömlekçiöğlü,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, *Enzyme and Microbial Technology Review*, 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, *Biotechnology 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.
- 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.
- 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 Kabiliyetinin Belirlenmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, CBÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Manisa.
- 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. Biotechnology*, 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 *Bacilluscirculans* 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 ssystems and in biotechnology. *Advences 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. (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. (Th. scheperi 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 Alanları.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Kübra Özdemir
Doğum Yeri : Bursa
Doğum Tarihi : 12.06.1992

Eğitim Durumu

Lise : Osmangazi Lisesi / 2006 - 2010
Lisans : Uludağ Üniversitesi / 2012 - 2015
Yüksek Lisans : Uludağ Üniversitesi / 2015 - 2018

İletişim (e-posta) : kubraozdemir@gmail.com