



GİRESUN
ÜNİVERSİTESİ



FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AKTİNOMİSETDEN İZOLE EDİLEN EKSTRASELLÜLER
PROTEAZIN KARAKTERİZASYONU

Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi
Serap ERTOP
20152102004

2019

GİRESUN

**T.C.
GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AKTİNOMİSETDEN İZOLE EDİLEN
EKSTRASELLÜLER PROTEAZIN
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Serap ERTOP

Enstitü Anabilim Dalı : Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Hatice KATI

Haziran 2019

**T.C.
GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

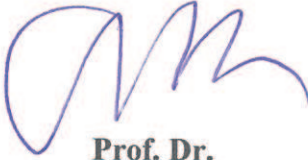
**AKTİNOMİSETDEN İZOLE EDİLEN EKSTRASELLÜLER
PROTEAZIN KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Serap ERTOP

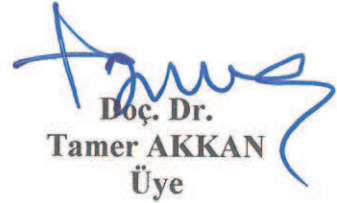
Enstitü Anabilim Dalı : Biyoloji Anabilim Dalı

Bu tez 24.06.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.



**Prof. Dr.
Sabriye ÇANAKÇI
Jüri Başkanı**

**Prof. Dr.
Hatice KATI
Üye**



**Doç. Dr.
Tamer AKKAN
Üye**

**Doç.Dr.
Bahadır KOZ
Enstitü Müdürü**

BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

Serap ERTOP
24/06/2019

TEŞEKKÜR

Tez alıŐma konumun belirlenmesi, tezimin yürütölmesi ve her aşamasında bana yardımcı olan Sayın Hocam Prof. Dr. Hatice KATI'ya teŐekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Maddi ve manevi desteklerini eksik etmeyen sevgili aileme ve laboratuvar çalıŐmamda yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatım boyunca her zaman yanımda olan tek destekçim sevgili kardeŐim Songöl Bekar'a ayrıca teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	IV
ŞEKİLLER LİSTESİ	V
TABLolar LİSTESİ	VI
ÖZET.....	VII
SUMMARY	VIII
BÖLÜM 1. GİRİŞ.....	1
1.1. Aktinomisetlerin Tarihsel Gelişimi.....	3
1.2. Aktinomisetlerin Anatomik ve Fizyolojik Özellikleri	3
1.3. Aktinomisetlerin Sınıflandırılması.....	5
1.4. Aktinomisetlerin Ekolojileri.....	7
1.5. Aktinomisetler Tarafından Üretilen Biyoürünler	9
1.5.1. Aktinomisetler tarafından üretilen enzimler	11
1.6. Proteazlar.....	12
1.6.1. Proteaz enzim yapısı ve özellikleri	12
1.6.2. Proteaz enziminin sınıflandırılması	14
1.6.2.1. Katalitik bölgedeki işlevine göre proteazlar	14
1.6.2.2. Kaynağına göre proteazlar	16
1.6.3. Proteaz enziminin kullanım alanları.....	18
BÖLÜM 2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	19
BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM	23
3.1. Materyal	23
3.1.1. Cihazlar	23
3.1.2. Kullanılan besiyerler	23
3.1.3. Kullanılan tamponlar.....	24
3.1.4. Kullanılan kimyasal maddeler.....	24

3.1.5. Enzim aktivitesi ölçümünde kullanılan solüsyonlar	25
3.1.6. SDS PAGE ve zimogram analizinde kullanılan solüsyonlar	25
3.2. Yöntem	26
3.2.1. Proteaz aktivitesinin kantitatif olarak belirlenmesi.....	26
3.2.2. Tirozin standart grafiği.....	26
3.2.3. Enzim karakterizasyonu	27
3.2.3.1. Enzim aktivitesine sıcaklığın ve sıcaklık stabilitesinin etkisi.....	27
3.2.3.2. Enzim aktivitesine pH ve pH stabilitesinin etkisi	28
3.2.3.3. Enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi.....	28
3.2.3.4. Enzim aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkisi	29
3.2.3.5. Enzim aktivitesi üzerine deterjan, denatüranların ve oksidanların etkisi.....	29
3.2.4. Enzimin kısmi saflaştırılması.....	30
3.2.4.1. Amonyum sülfat ile çöktürme	29
3.2.4.2. Diyaliz işlemi	30
3.2.4.3. Ultrafiltrasyon	30
3.2.4.4. SDS-PAGE ve zimogram analizi	30
BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI	32
4.1. Tirozin Standart Eğrisi	32
4.2. Enzimin Sıcaklık ve Sıcaklık Stabilitesi	32
4.3. Enzimin Optimum pH ve pH Stabilitesi	34
4.4. Enzim Üzerine Metal İyonlarının Etkisi	36
4.5. Enzim Üzerine Organik Çözücülerin Etkisi.....	36
4.6. Enzim Üzerine Detarjan, Denatüran ve Oksidanların Etkisi	37
4.7. Amonyum Sülfat İle Kısmi Saflaştırma.....	38
4.8. Enzimin SDS-PAGE ve Zimogram Analizi.....	39
BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ	40
KAYNAKLAR.....	47
ÖZGEÇMİŞ	64

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

°C	: Santigrat derece
µl	: Mikrolitre
BSU	: Black Sea <i>Ulva lactuca</i>
Dak	: Dakika
DMF	: Dimetil formamid
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DTT	: Dithiothreitol
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
G	: Gram
kDa	: kilodalton
L	: Litre
M	: Molarite
ml	: Mililitre
Mm	: Milimolar
PMSF	: Fenilmetilsülfonil florür
Rpm	: (Revolution Per minute) Dakikadaki devir sayısı
SCA	: Starch Casein Agar
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
TCA	: Trikloroasetik asit
w/v	: Ağırlık/Hacim

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Actinobacteria şubesinde bulunan sınıflar	6
Şekil 1.2. <i>Actinomyces israelii</i> ve aktinomikozun sebep olduğu doku hasarı	9
Şekil 4.1. Tirozin standart eğrisi	32
Şekil 4.2. Enzim sıcaklık aktivitesi	33
Şekil 4.3. Enzim sıcaklık çalışması	33
Şekil 4.4. Enzim sıcaklık stabilitesi	34
Şekil 4.5. Enzim pH grafiği	35
Şekil 4.6. Enzim pH stabilite grafiği	35
Şekil 4.7. Enzim üzerine metal iyonlarının etkisi	36
Şekil 4.8. Enzim üzerine organik çözücülerin etkisi	37
Şekil 4.9. Enzim üzerine deterjan, denatüran ve oksidanların etkisi	38
Şekil 4.10. BSU-1 izolatından elde edilen proteazın SDS-PAGE ve zimogram analizi	39

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.1. Actinobacteria sınıfının taksonomik sınıflandırılması.....	7
Tablo 1.2. Farklı mikrobiyal kaynaklardan proteaz üretimi	14



AKTİNOMİSETDEN İZOLE EDİLEN EKSTRASELLÜLER PROTEAZIN KARAKTERİZASYONU

ÖZET

Bu çalışmada *Streptomyces* sp. BSU-1 izolatından ekstrasellüler olarak üretilen proteaz enziminin karakterizasyonu yapılmıştır. *Streptomyces* sp. BSU-1 izolatu glukoz içeren besiyeride 30 °C’de 3 gün süresince çoğaltılmıştır. Enzimin optimum reaksiyon sıcaklığı ve pH’sı sırasıyla 60 °C ve pH 10 olarak bulunmuştur. Proteaz enzim aktivitesini 120 dakika 50 °C’de ve pH 8-12 aralığında %80’nin üzerinde koruduğu bulunmuştur. Na⁺¹, Ca⁺², Zn⁺² ve Mg⁺²,nin aktiviteyi koruduğu, Mn⁺² ve Cu⁺² iyonları nın aktiviteyi artırdığı görülürken, Hg⁺² metal iyonunun ise yaklaşık %50 azalttığı tespit edilmiştir. Enzim aktivitesi üzerine çözücülerin etkisi incelendiğinde aktivitenin yüksek oranda korunduğu gözlemlenmiştir. Tween-80 ve Triton X-100 konsantrasyonu aktiviteyi artırırken, H₂O₂ aktivite kaybına neden olmuştur. Enzimin, zimogram analizi sonucu tek bant görülmüş ve molekül ağırlığı yaklaşık 48 kDa olarak tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Aktinomiset, proteaz, zimogram, alkali

CHARACTERIZATION OF EXTRACELLULAR PROTEASE ISOLATED FROM ACTINOMYCETES

SUMMARY

In this study, characterization of extracellularly produced protease enzyme from *Streptomyces* sp. BSU-1 isolate was performed. *Streptomyces* sp. BSU-1 isolates were grown in glucose-containing medium for 3 days at 30 °C. The optimum reaction temperature and pH of the enzyme were found 60 °C and pH 10. It has been found that the protease enzyme maintains its activity over 80% at 50 °C and pH 8-12 for 120 minutes. It was detected that Na⁺¹, Ca⁺², Zn⁺² and Mg⁺² retained the activity, Mn⁺² and Cu⁺² ions increased the activity, while Hg⁺² metal ion decreased about 50%. When the effect of solvents on enzyme activity are examined, it is observed that activity is highly preserved. Tween-80 and Triton X-100 increased activity, while H₂O₂ caused loss of activity. The zymogram analysis of the enzyme showed single band and its molecular weight was found to be approximately 48 kDa.

Keywords: Actinomycetes, protease, zymogram, alkaline

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Dünya yüzeyinin yaklaşık %80'i sularla kaplıdır. Dünyadaki bütün suların %97'sini deniz ve okyanuslar oluşturmaktadır. Denizel ortam birçok canlı için vazgeçilmez bir yaşam alanı olmuştur. Mikroskopik canlılar içinde, deniz ortamı farklı kimyasal özelliklere sahiptir. Deniz ortamı filogenetik olarak farklı aktinomisetlerin varlığını desteklemektedir. Deniz aktinobakterileri sedimanlarda, su içindeki canlılar üzerinde bulunur. Bu organizmalar ürettikleri metabolitler ve enzimler ile önemli olmaktadır (Sivakumar ve ark., 2007). Bu mikroorganizmalar düşük besleyici maddeler kullanılarak kültüre edilebilir ve farmasötik ilaç keşfi için kaynak oluşturabilir (Jensen ve ark., 2005a). Deniz mikroorganizmaları, antimikrobiyal aktivitelere sahip doğal ürün üretiminde kaynak olarak kullanılmaktadır (Liu ve ark., 2010). Aktinomisetler Gram (+) olup, G+C bakımından zengin olmaları, aktinomisetleri diğer organizmalardan ayıran en önemli özelliğidir (Çiğdem, 2015). Deniz ortamında yaşayan formları olduğu gibi toprakta da yaşayan birçok aktinomiset türü bulunmaktadır. Organik maddenin zengin olduğu topraklarda bol miktarda bulunur. Nemli topraklardan ziyade kuru topraklarda daha fazla yayılım gösterirler. Farklı ortamlardan izole edilen aktinomiset türleri genetik olarak değişiklik gösterse bile aynı sekonder bileşikler üretebilir. Bu sebeple bazen yeni ve farklı biyolojik moleküller bulma şansı azalabilir (Baltz, 2006; Busti ve ark., 2006). Denizden izole edilen aktinomisetlerin ürettiği sekonder metabolik bileşikler sağlık, tarım, sanayi ve endüstriyel alanlarda da kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarla yeni ve doğal biyoaktif ürün araştırmalarında deniz aktinomisetlerinin doğal ürün üretme kapasitesinin oldukça yüksek olduğu belirtilmiştir (Bull ve Stach, 2007). Bazı aktinomiset türleri uygun ortam ve şartlarda biyoluminesans özelliği göstermektedir. Kültür ultraviyole ışık altında bu özelliği gösterebilir. Işık şiddeti ve hızı, ortam koşullarına ve kültürün yaşına göre değişiklik göstermektedir. Yapılan bir araştırma sonucu aktinomiset türüne ait olan *Streptomyces rimasus*'un ultraviyole ışık altında ışık verme şiddeti ile antibiyotik üretme özelliği arasında bir bağlantı olduğu

gözlemlenmiştir. Bu mikroorganizmaların yararlı olabileceği gibi zararlı yönleri de vardır. Aktinomisetin bazı türleri de insan ve hayvan da hastalığa sebep olmaktadır (Gökmen ve Demirci, 2016).

Aktinomisetler bitkiler ile ortak yaşayabildiği gibi saprofit olarak da yaşam göstermektedir. Aktinomisetlerin bitki büyümesini destekleyici etkisinden dolayı kimyasal böcek ilacı ve gübre kullanımına alternatif olarak görülmektedir (Palaniyandi ve ark., 2013). Aktinomisetler; toprakta hayvan ve bitki dokularının ayrışmasını, humus oluşumunu ve hayvan gübrelerinin oluşumunu sağlamaktadır. Bitkilere zarar veren bazı mantar ve bakterilerin gelişimini engellediği bilinmektedir. Aktinomisetler toprak ekosisteminde kitin ve lignoselüloz gibi yapıların ayrışmasını sağlamaktadır (Goodfellow ve Williams, 1983). *Streptomyces* cinsine ait türlerin kloramfenikol, eritromisin, klortetrasiklin, streptomisin gibi antibiyotiklerin üreticisi olduğu bilinmektedir (Aksoy, 2014). Günümüze kadar bilinen antibiyotiklerin birçoğu *Streptomyces* cinsine ait türler tarafından üretilmektedir. Şimdiye kadar keşfedilen en büyük antibiyotik üreten cinstir (Karaboyun, 2018). Üretimi yapılan 1000 antibiyotiğin yaklaşık %55-65'i *Streptomyces* cinsine ait üyeler tarafından gerçekleştirilir (Oskay ve Tamer, 2009). Aktinomisetlerin antibiyotik üretimi dışında selüloz, amilaz, pektinaz, lipaz, kitinaz ve proteaz gibi enzim aktivitelerinde olduğu bilinmektedir (Gulve ve Deshmukh, 2011). Bu enzimlerin en yüksek aktiviteyi göstermesi için besi ortamı, belli sıcaklık ve pH şartlarının uygun olması gerekir. Bu şartlar sağlandığında izole edilen enzimler uygun koşullarda muhafaza edilip endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır. Bu enzimlerin lignoselüloz gibi doğal polimerlerin parçalanmasını ve patojenik mikroplara karşı direnç göstermede etkin oldukları bilinmektedir (Meiji ve ark., 2017). En fazla çalışılan enzimlerden biri olan proteaz enzimi deterjan, gıda, ilaç ve deri enstrüsünde kullanılmaktadır (Sharma ve ark., 2017). Mikroorganizma ve enzimler gıdaların uzun süre muhafaza edilmesinde kullanılır, gıda da farklı tat ve aroma değişikliği meydana getirmez. Bisküvi, gofret ve kraker gibi ürünlerde de son yıllarda sodyum metabisülfite (SMS) yerine proteaz enzimi tercih edilmektedir. Proteaz enzimi pişme sırasında denatüre olması ve toksisite etkisinin olmaması nedeniyle sodyum metabisülfite göre daha avantaj sağlamaktadır (Erem ve Certel, 2006).

1.1. Aktinomisetlerin Tarihsel Gelişimi

Aktinomycetes adı hem bakteri hem de mantarların karakteristik özelliklerine sahip olup, Yunanca 'atkis' (bir ışın) ve 'mykes' (mantar)'den türetilmiştir (Embley ve Stackebrandt, 1994). Aktinomisetler 1870'li yıllardan 1950'li yıllara kadar bakteri ile mantar arasında bir geçiş formu olarak kabul edilmiştir (Hopwood, 2006).

1875'de Ferdinand Chon, insan gözyaşı kanalında ipliksi bir organizma tespit etmiş ve onu '*Streptothrix foersteri*' olarak adlandırmıştır. 1890 yılında Gasperini ve Lancker-Sandoval bu organizmaya 'actinomycetes' adını vermiştir (Yücel, 2007). Hiltner adlı bir araştırmacı jelatin plak yöntemiyle aktinomiset sayımını yapmış ve sonbahar, ilkbahar aylarında mevcut sayılarında artış fakat kış ve yaz aylarında azalma olduğunu gözlemlemiştir. 100 yıl önce Graefe adlı bilim insanı tarafından göz enfeksiyonuna sebep olan aktinomiset türlerinden *Streptothrix canaliculitis* keşfedilmiştir (Ellis ve ark., 1961). 1877 yılında 'Hars' adlı araştırmacı 'Lumpy dav' adı verilen hastalıkta bir sığırın iltihaplı bölgesinden izole edilen mikroba aktinomiset adını vermiştir. Merkezden çevreye doğru iplikçik şeklinde yayılım gösterdiğini ve bu iplikçiklerin sonunda parmak şeklinde şişkinlikler olduğunu gözlemlemiştir. Fakat araştırmacı organizmayı o günkü tekniklerle izole edememiştir. Araştırmacılar başta aktinomisetleri bakteriyel form olarak ifade etmişlerdir, fakat botanikçi araştırmacılar aktinomisetleri funguslara benzetmişlerdir. Karakterize edilmiş olarak bilinen ilk deniz aktinomiseti *Rhodococcus marinonassen*'dir (Helmke ve Weyland, 1984).

1.2. Aktinomisetlerin Anatomik ve Fizyolojik Özellikleri

Aktinomisetler fungus ve bakteriler arasında geçiş formunda olup, ipliksi yapıda prokaryotik canlılardır. Aktinomisetlerin hif yapıları, spor çapları (0,5-1 µm), şekil ve büyüklük bakımından, mitokondri ve kloroplasta sahip olmamaları, aktinomiset hücrelerinin selüloz ve kitin ihtiva etmemeleri ve doymamış yağ oranları bakteriler

ile benzerlik göstermektedir. Aktinomisetler arasında liziz ve faj hassasiyeti, bakteriler ile yakın akraba olduklarını göstermektedir.

Aktinomisetler fungal antibiyotiklere karşı, bakteriyel antibiyotiklere daha duyarlıdır. Aktinomisetler funguslar gibi havasal misel ve spor oluşturma özelliğine sahiptir (Waksman, 1989). Katı veya sıvı ortamda büyüme şekilleri, pellet oluşturmaları funguslar ile benzerlik göstermektedir.

Aktinomisetler, aerobik ve Gram (+) bakterilerdir. Toprakta veya suda yaşamaktadır. Alkali ve nötral topraklarda bol miktarda bulunmaktadır. Aktinomiset çeşitliliği ve sayısı mevsimsel olarak değişiklik göstermektedir. Kuru ve ılık mevsimlerde sayı ve çeşit bakımından en yüksek değere sahip olduğu belirtilmiştir (Ghanem ve ark., 2000). Spor oluşturan miselsel yapıları dallanmış, düz veya spiral şekilde olabilir (Ersal, 2018). Aktinomisetlerin bilinen en geniş türlerini *Streptomyces* türü bakteriler oluşturmaktadır (Bhattacharyya ve ark., 1998). İlk kez 1943 yılında Waksman ve Henrici tarafından *Streptomyces* cinsi tanımlanmıştır (Williams ve ark., 1983). *Streptomyces* cinsi Waksman ve Henrici tarafından 660'ın üzerinde tür tanımlanmıştır (Guo ve ark., 2015). Yüksek miktarda G+C içeriğine sahiptirler. Bu özelliği de aktinomisetleri diğer organizmalardan ayırmaktadır. Karbon kaynağı olarak; protein, yüksek moleküllü organik asitler, polisakkarit, şeker, lipid ve alifatik hidrokarbonları kullanırlar. Aktinomisetlerden özellikle de *Streptomyces* türleri birçok ortamda üreme göstermelerine rağmen spor oluşturmaları için yüksek miktarda karbon ve azot ihtiva eden özel ortamlara gereksinim duyarlar (Kutzner, 1981).

Aktinomisetler spor oluşturma özelliğine sahiptir. Bu sporlar kuraklığa, sıcaklığa, dış etkenlere karşı direnç göstermektedir. Koloni morfolojileri farklılık göstermektedir. Siyah, gri, beyaz, yeşil olmak üzere farklı renklerde koloni görmek mümkündür (Waksman, 1989).

Aktinomisetler sıvı ve katı besiyerinde kümeler halinde üreme göstermektedir. Sıvı besiyerinde dipte veya yüzeyde koloni halinde gelişme gösterirken, mikroorganizmalar bakterilerde olduğu gibi sıvı kültürde ortamı bulanıklaştırmayıp pellet oluşturmaktadır. Koloni şekilleri bakteri şekillerine benzerlik göstermektedir. Buldukları besi ortamına, inkübasyon süresine göre farklı renklerde koloni oluştururlar. Aktinomisetler, yavaş üreme eğiliminde olan ipliksi bakterilerdir.

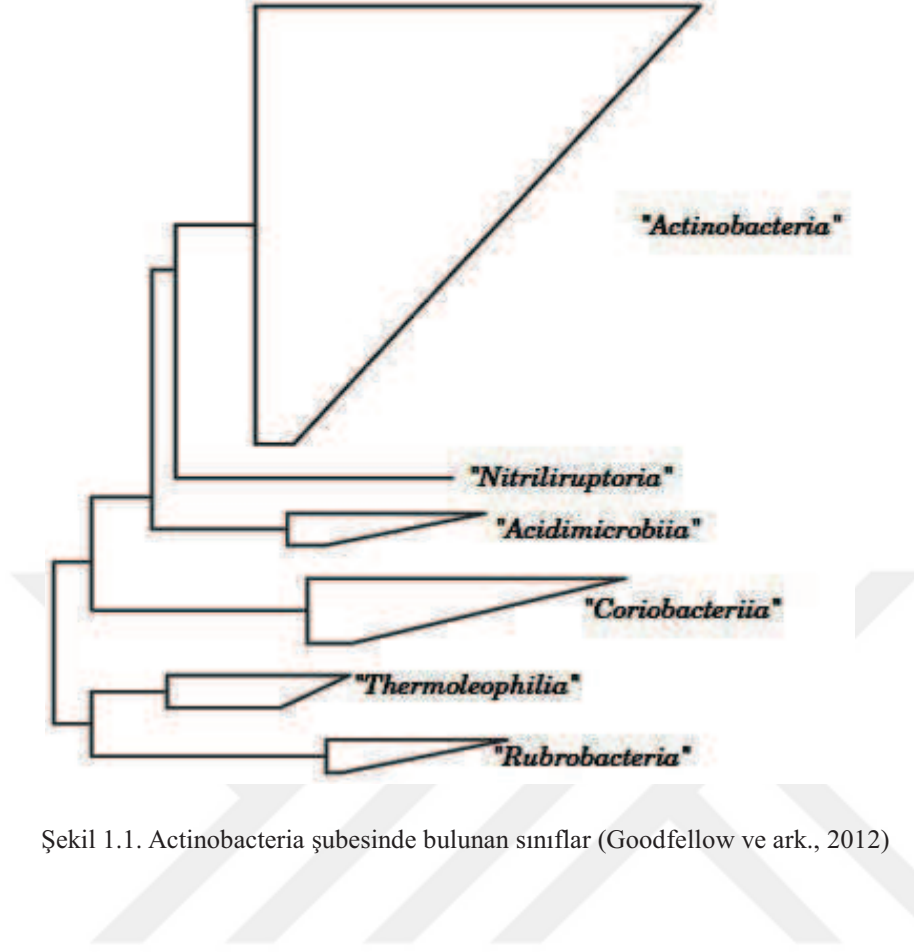
Ortalama inkübasyon süresi 4-5 gün arasında değişiklik göstermektedir (Öner, 1989; Özcan, 2012).

Aktinomisetler kültüre edildikleri ortamda substrat ve havasal miseller oluşturmaktadır. Örneğin; aktinomisetlerden *Streptomyces* cinsi hava miselleri meydana getirmekte ve bu hava miselleri de toz halinde spor formuna dönüşebilmektedir (Waksman, 1950).

Aktinomisetler alkali koşullarda, pH 5,0-9,0 aralığında, 25-30 °C de optimal büyüme gösterdikleri gibi çok yüksek sıcaklıklarda da üreme gösteren termofilik türleri mevcuttur (Goodfellow ve Williams, 1983). Aktinomisetler granül oluşturmaktadır (Lacey, 1997).

1.3. Aktinomisetlerin Sınıflandırılması

Günümüzde ortalama 1,6 milyon organizmanın varlığı bilinmektedir. Fakat sadece bir kısmı teşhis edilmiştir. Bu canlıları; morfolojik özelliklerine, spor özelliklerine, anatomik yapısına, beslenme şekline ve kimyasal yapısına göre sınıflandırmak mümkündür. Aktinomisetleri, 1943 yılında Waksman ve Henrici taksonomik olarak sınıflandırmıştır. Lechevalier ve Lechevalier 1965 yılında aktinomisetlerin morfolojik ve kimyasal özelliklerine göre sınıflandırılabilceğini söylemişlerdir (Hasegawa ve ark., 1983). Aktinomisetlerin tanımlamasında 16S rDNA dizi analizi yapılmaktadır (Soria-Mercadove ark., 2012). Actinobacteria şubesinde bulunan bazı sınıflar Şekil 1.1' de gösterildiği gibidir (Goodfellow ve ark., 2012).



Şekil 1.1. Actinobacteria şubesinde bulunan sınıflar (Goodfellow ve ark., 2012)

Sınıflandırma yapılırken kimyasal özellikler kıstas alındığında hücre duvarındaki şeker ve amino asit dizilimine bakılmaktadır. Kimyasal sınıflandırmada, hücrede bulunan DAP (diaminopimelik asit)'nin varlığı önemli yer tutmaktadır (Mei, 2015). Havasal misel oluşumu, şeker olarak ksiloz ve arabinoz bulundurması, hücrede de L-DAP formunun bulunması streptomiset türüne özgü bir özelliktir. Aktinomisetler 6 sınıf, 23 alt sınıf, 53 aile, 222 cins ve 3000 türden oluşmaktadır ve bakterilerin Eubacteriales takımında yer almaktadırlar. Aktinomisetlerin taksonomik olarak sınıflandırılması Tablo 1.1'de gösterildiği gibidir (Dworkin ve ark., 2006).

Tablo 1.1. Actinobacteria şubesinin taksonomik sınıflandırılması (Dworkin ve ark., 2006).

Familya	Cins
Streptomycetaceae	Streptomyces
Actinomycetaceae	Actinomyces, Actinobaculum, Arcanobacterium, Mobilunes
Micromonosporaceae	Micromonospora, Catenuloplanes, Pilimelia, Couchioplanes, Spirilliplanes, Latellatospora
Acidimicrobiaceae	Acidimicrobium
Dermatophilaceae	Dermatophilus
Actinocoralliaceae	Actinocorallia, Sarracenospora
Streptosporangiaceae	Streptosporangium, Microbispora, Planomospora, Planotetraspora, Herbidospora, Planobispora, Sebekia,
Nocardiaceae	Nocardia, Rhodococcus

Actinomycetes filumu, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'ye göre 6 sınıfa ayrılmıştır. Bunlar; Nitrospirales, Acidimicrobia, Thermoleophilia, Cariobacteria, Rubrobacteria ve Actinobacteria. Bunlardan Actinobacteria sınıfı 16 ordodan oluşmaktadır. Bu ordolar; Frankiales, Micromonosporales, Bifidobacteriales, Glycomycetales, Pseudonocardiales, Actinopolysporales, Jiangellales, Micrococcales, Propionibacteriales, Streptosporangiales, Actinomycetales, Corynebacteriales, Catenulesporales, Kineosporiales, Streptomycetales ve Incertae'dır (Chaudhary ve ark., 2013).

1.4. Aktinomisetlerin Ekolojileri

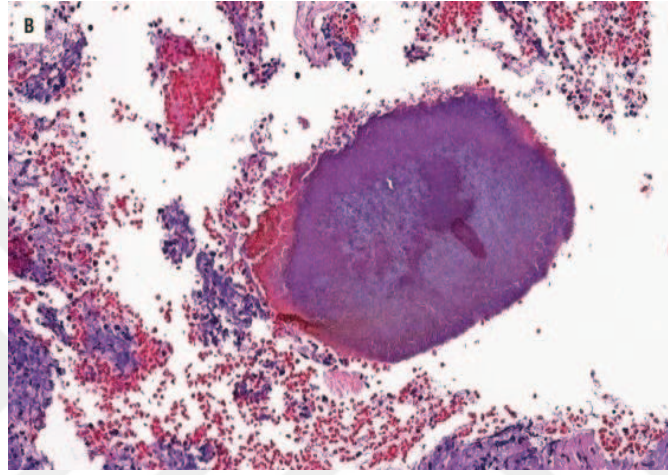
Aktinomisetler; deniz, toprak, bitki, hayvan, mağara ve bataklık gibi değişik ortamlardan izole edilebilirler. Toprakta bulunan aktinomisetler buldukları ortamın özelliklerine göre farklı yapılarda olabilir. Organik maddenin yoğun olduğu topraklarda bol miktarda aktinomiset bulunmaktadır. Örneğin; *Streptomyces* türleri toprakta bol miktarda bulunur. Aktinomisetler bakterilere göre nemi daha az

toprakları sever. Kuru hava aktinomisetin misel oluşturması için daha uygundur. Aktinomisetler, toprakta spor veya misel halinde bulunabilirler. *Thaermoactinomyces* gibi bazı termofilik aktinomisetler ahır gübresi ve yüksek sıcaklıkta yaşamaktadır. Yapılan bir çalışmada, toprak aktinomisetlerinin izolasyonu ve sayımı için, karbon ve azot kaynağı olarak humik asit içeren HV (humik asit-vitamin) agar geliştirilmiş ve aktinomiset türlerinden özellikle *Micromonospora* cinsinin bu agarda çok fazla ürediğı gözlemlenmiştir (Qiu ve ark., 2008). Humik asit agar ile hazırlanmış bir ortamda *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Streptosporangium*, *Microtetraspora*, *Microbispora*, *Dactylosporangium*, *Nocardio* ve *Thermomonospora* cinslerinin iyi bir büyüme gösterdiği belirtilmiştir (Hayakawa ve Nonomura, 1987).

Deniz ekosisteminde ve okyanuslarda aktinomisetlerin yaygın olarak bulunduğu tespit edilmiştir. *Micromonospora*, *Rhodococcus* ve *Streptomyces* türlerinin deniz ortamında bulunduğu belirtilmiştir (Maldonado ve ark., 2005). Aktinomisetler deniz ekosisteminde genellikle alglerden izole edilmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda denizden izole edilen aktinomisetlerin de sekonder metabolit ürettiğı bulunmuştur. Üretilen bu metabolik ürünler biyolojik aktiviteye sahip olmakla beraber, endüstriyel alanda da kullanımı mevcut olduğu gözlemlenmiştir. Bilim insanlarının 50 yıldan fazladır deniz aktinomisetleri üzerine çalışmalar yaptığı bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda *Actinomyces*, *Nocardia*, *Micromonospora* ve *Mycobacterium* türlerinin su ekosisteminde yaygın olarak bulunduğu tespit edilmiştir (ZoBell, 1946; Grein ve Mayers, 1958). Özellikle tatlı sularda *Micromonospora* cinsinin bol miktarda bulunduğu tespit edilmiştir. Bu cinse ait türlerin petri kabında genellikle pembemsi veya turuncumsu renkte oluştuğı gözlemlenmiştir. Ayrıca deniz suyunun petrol ile birleşimi *Nocardia* ve *Micromonospora* türlerinin de daha fazla yayılış göstermesini sağlamaktadır. Bu tür aktinomisetlerin petrolü parçalama özelliğı vardır. Karadeniz bölgesinde de yapılan çalışmalar sonucunda dip çamurlarında *Actinomyces pelonogenes* türünün bol miktarda olduğu tespit edilmiştir. Aktinomisetler havada spor veya misel oluşturabilirler.

Aktinomisetlerin bazı türleri konak olarak insan ve hayvanları tercih edebilir. Aktinomisetlerin insan ve hayvanda sebep olduğu kronik hastalığa aktinomikoz denir. Hastalığa sebep olan aktinomisetler genelde anaerobik türlerdir. En yaygın olarak bilinen hastalık yapan tür *Actinomyces israelii*'dir (Çakır ve ark., 2011). Bu

aktinomiset, insanlarda gastrointestinal sistemde, genital bölgede ağız boşluğunda bulunmaktadır (Çakır ve ark., 2011). Bu tür insanlarda genellikle doku şişmesine, iltihaplanmasına, apse oluşumuna, dokuda delik veya topaklı sızıntıya ve doku hasarına sebep olmaktadır (Akyol ve ark., 2016). *Actinomyces israelii*'nin hasara sebep olduğu dokunun mikroskop görüntüsü Şekil 1.2'de görüldüğü gibidir (Bell, 2019).



Şekil 1.2. Aktinomikoza sebep olan *Actinomyces israelii*'nin mikroskop görüntüsü (Bell, 2019).

1.5. Aktinomisetler Tarafından Üretilen Biyoürünler

Mikroorganizmalar biyolojik ürün üretiminde aktif rol oynamaktadır. Mikrobiyal ürünler modern ilaç firmalarının temelini oluşturmaktadır. Geçmişten günümüze yapılan çalışmalar henüz keşfedilmemiş potansiyel terapötik uygulamalara sahip birçok ürünün olduğunu göstermektedir (Singh ve Pelaez, 2008). Aktinomisetler deniz bakterileri içinde güçlü biyoaktif moleküllere sahip etkileyici bir kaynak olmuştur (Subramani ve Aalbersberg, 2013). Aktinomiset bakterileri tıbbi amaçlı ve çeşitli biyolojik aktiviteleri olan metabolit üretimi yapmaktadır (Bredholdt ve ark., 2007). Aktinomisetlerin ürettiği ürünler değişik safhalara ayrılmak istenirse bunları primer, sekonder, biyolojik dönüşüm ürünler, aktinomiset hücreleri ve rekombinant ürünler olarak sıralamak mümkündür. Enzim, karbonhidrat, lipit, protein ve organik asit gibi bileşikler ilk safhada üretilen primer metabolitlerdir. Aktinomisetlerin

sekonder metabolit üretimi yüksek olup, ticari olarak antitümör, farmasötik ve nötrasötik ajanları ile enzim inhibitörleri biyoteknolojide kullanılmaktadır (Özcan ve Çorbacı, 2017). Mangrov ormanları sekonder metabolit üretme potansiyeline sahip aktinomisetler için önemli bir kaynak olmaktadır (Hong ve ark., 2009). Üretilen en önemli sekonder metabolit ürün antibiyotiktir. Sekonder metabolitler, biyoaktif doğal ürünlerin en önemli grubunu oluşturmaktadır. Kimyasal yapıları ve biyolojik aktivitelerinden dolayı makromoleküllerden farklılık göstermektedir (Cannell, 1998). Deniz aktinomisetlerinden yeni ve farklı ikincil metabolit ürünlerinin keşfedilmesiyle, bu mikroorganizmaların doğal ürün araştırmalarına yeni bir boyut kattığını göstermektedir (Jensen ve ark., 2005b). Biyolojik dönüşüm ürünü olarak aktinomisetler, bakteriler ve mantarlarla birlikte katı atıkların kompostlanmasını sağlamaktadır. Deniz aktinomisetlerinden üretilen sekonder metabolitlerin birçoğu biyolojik aktiviteye sahip olmasıyla birlikte terapötik etkisi de mevcuttur (Gorajana ve ark., 2005; Lam, 2006). Mikrobiyal kaynaklı doğal ürünler ilaç keşfinde önemli kaynak oluşturmaktadır. Modern ilaç firmalarının temelini mikrobiyal ürünlerden geliştirilen ilaçlar oluşturmaktadır. Hala keşfi yapılmamış birçok mikroorganizma vardır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda deniz aktinomisetlerinin keşfinin hızla artmasıyla, bakteriyel kaynaklı mikrobiyal ürünlerinin araştırmalarına yeni boyut kazandırılmıştır.

Antibiyotik kullanımı ilk olarak penisilinin keşfiyle başlamış olup daha sonra Selman ve arkadaşları tarafından streptomisin keşfiyle de artış göstermiştir (Bali, 2011). Waksman ve arkadaşları 1940 yılında topraktan izole ettikleri aktinomiset türünü *Actinomyces antibioticus* olarak adlandırmışlar ve bu aktinomisetten izole edilen antibiyotikde aktinomisin olarak isimlendirmişlerdir (Temel, 2015). Aktinomisetlerden izole edilen ilk antibiyotik olan aktinomisinden sonra streptomyses türlerinden de benzer kimyasal özellikler gösteren antibiyotikler üretilmiştir. Bazı streptomiset türleri aminoglikozit değiştirici enzimlere sahiptir (Benveniste ve Davies, 1973).

Aktinomisetlerin bazı türleri sitotoksik etkiye sahiptir. Çin'de mangrov ekosisteminden izole edilen aktinomisetlerin yapılan çalışmalar sonucunda anti-enfeksiyon, anti-tümör bileşiklerinin, nörodejeneratif hastalıkların ve diyabet tedavisinde kullanılabileceği görülmüştür (Yang ve Song, 2018). Aktinomisetlerden

Aktinomadura cinsisinin antibiyotik üretme özelliği olduğu bilinmektedir. Bu cins aktinomiset jelatin, lignoselüloz ve kazeini parçalama özelliğine sahiptir. Actinomadura türlerinden antibiyotik üretme özelliği en fazla bilinen *Actinomadura kijaniata*, *Actinomadura oligospora*, *Actinomadura macra* ve *Actinomadura hibisca*'dır (Huang, 1980; Tomitave ark., 1990; Çil, 2011). Denizde bulunan Salinispora cinsi aktinomisetin yapılan çalışmalar sonucu ilaç benzeri kaynak olabileceği görülmüştür (Udwary ve ark., 2007). Salinispora cinsinin üyeleri güçlü proteozom inhibitörü olan Salinisporamid A içeriğine sahip olmasıyla kanser tedavisi için umut olabileceği tahmin edilmektedir (Teicher ve Tomaszewski, 2015). Proteozom inhibitörünün multipl myeloma ve solid tümörlerin tedavisinde kullanılmak üzere farklı çalışmalar yapılmıştır (Frankland-Searby ve Bhaumik, 2012). Birçok proteozom inhibitörü geliştirilmiş ve bu inhibitörler farklı tümör tiplerinde antitümör fonksiyonu göstermiştir (Engür ve Dikmen, 2015).

1.5.1. Aktinomisetler tarafından üretilen enzimler

Aktinomisetlerin, mikrobiyal kaynaklı doğal ürün üretiminde önemli bir payı vardır. Aktinomisetler, yaklaşık olarak doğal ürün üretiminin %42'sini oluşturmaktadır (Oskay ve Tamer, 2009). Üretilen bu ürünler arasında selülaz, amilaz, pektinaz, üreaz ve proteaz gibi enzimler yer almaktadır (Kar ve Ray, 2008; Gulve ve Desmukh, 2012). Yapılan çalışmalar sonucu bir aktinomiset suşunun β -glukozidaz ürettiği tespit edilmiştir (Imada ve Okami, 1995). Bengal körfezinin farklı yerlerinden toplanan 288 deniz örneği toplanarak, nişasta kazein agar ortamında aktinomiset izolatu izole edilmiş ve bu izolatların bazılarının lipaz, kazeinaz, jelatinaz, selülaz ve amilaz enzimi ürettiği belirlenmiştir (Ramesh ve ark., 2009). Streptomyces cinsi bakterilerinde proteaz, amilaz ve ksilinaz gibi enzim aktiviteleri olduğu belirtilmiştir (Awla ve ark., 2017). Bu enzimlerin optimum aktivite göstermesi için uygun sıcaklık, pH ve tuzluluk gibi belirleyici etkenler vardır.

Selülaz enzimi, selülozun glikozidik bağlarını parçalayan hidrolitik enzim grubudur. Bu enzim, selüloz içeren yemlere ilave edilerek, yemlerin daha kolay sindirilmesini sağlar (Gado ve ark., 2007; Azzaz, 2009; Murad ve Azzaz, 2010). Tohum yağlarının

çıkartılmasında (Che Man ve ark., 1996), ekmek yapımında macun kıvamının azaltılmasında (Godfrey ve West, 1996), bitki hücre duvarlarının uzaklaştırılmasında (Bhat ve Bhat, 1997), içecek endüstrisinin saflaştırma aşamasında ve tekstil endüstrisinde kullanılmaktadır. Amilaz enzimi sindirimde görev alır ve tükürük bezleri, pankreas, ince bağırsak, karaciğer ve yumurtalıklarda bulunur. Kağıt endüstrisinde nişastanın düşük viskoziteye indirerek kağıdın daha kolay şekillenip katlanmasını sağlar. Pektinaz enzimi; gıda, kağıt, tekstil alanında ve atık suların arıtılmasında kullanılmaktadır. Gıda endüstrisinde meyve sularının ve şarapların berraklaştırılmasında; tekstil endüstrisinde keten için selüloz liflerinin hazırlanmasında kullanılmaktadır. *Streptomyces* sp. türü keratinaz enzimi üretir ve bu enzimin 44 kDa olduğu, optimal aktivite sıcaklığının 45 °C ve pH'ının 11 olduğu belirtilmiştir (Tatineni ve ark., 2008).

Proteaz enzimi; peptid bağlarının hidrolizi ile reaksiyon yıkımını kataliz eder. Proteolitik enzimlerin %60'ını alkalın proteazlar oluşturur. Bu enzim grubu deterjan, tekstil, organik sentez, peynir yapımı ve atık su arıtımı gibi alanlarda kullanılan endüstriyel enzimlerdir (Moorman ve ark., 1993; Abd El-Nasser, 1995; Böckle ve ark., 1995). Aktinomisetlerin yanı sıra bakteri ve mantarlardan da izole edilmektedir. *Streptomyces griseus* (Nomoto ve Narahashi, 1959), *Saccharopolyspora* sp. (Raut ve ark., 2013), *Bacillus subtilis* (Özden, 2014) ve *Streptomyces fungicidius* MML1614 (Ramesh ve ark., 2009) adlı bakterisinde proteaz enzimini ürettiği belirtilmiştir. Proteaz inhibitörü olan antipain, leupeptin, kimostatin, pepstatin, phosoramidon aktinomisetler tarafından üretildiği bilinmektedir (Umezawa ve ark., 1973).

1.6. Proteazlar

1.6.1. Proteaz enzim yapısı ve özellikleri

Proteaz enzimi endüstriyel enzimlerin en önemli gruplarından biridir. Ortalama enzim satışlarının %40-60'ını oluşturmaktadır. Proteaz enzimleri yani peptidazlar peptid bağlarının kırılmasını sağlar (Aehle, 2007). Canlı organizma yapısında mevcut protein sayısının %2'sini oluşturmaktadır (Yıldırım, 2014). Bitki, hayvan, bakteri,

fungus ve aktinomisetlerden elde edilmektedir. Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği tarafından yapılan enzim adlandırmasında proteazlar; hidrolazlar (3) ve alt sınıf peptidazlar (3.4) olarak gruplandırılmıştır (Yılmaz, 2014). GÜNÜMÜZDE EN FAZLA, mikroorganizmalardan elde edilen proteaz enzimi kullanılmaktadır. Proteaz enziminin çalışması için optimum bir pH ve sıcaklık değeri vardır. Canlı yapısında proteaz enzimi genellikle mide ve pankreas da üretildiği gibi spesifik reaksiyonlar için vücudun diğer kısımlarında da üretilmektedir. Endüstriyel alanda ticari enzimlerin en geniş sınıfını proteolitik enzimler oluşturmaktadır. Ticari olarak üretimi yapılan proteaz enzimlerinin 2/3'si mikrobiyal kökenlidir. Genelde endüstriyel amaçlı olarak bakteriyel proteaz enzimleri tercih edilir. Endüstriyel veya biyoteknolojik amaçlı kullanılan proteaz enzimlerinin optimum pH ve sıcaklıkta yüksek aktivite gösterebildiği gibi çok yüksek sıcaklıkta da aktivite gösteren grupları mevcuttur. Ticari yönden en önemli proteazlar hidrolaz grubu enzimlerdir (Joshi ve Satyanarayana, 2013). Proteaz enzimlerinin; yüksek katalitik aktiviteye sahip olmaları, yüksek derecede substrat özgülüğü, büyük miktarlarda üretilmeleri, ekonomik açıdan uygun olmaları ve bitki veya mikroorganizmalardan kolay izole edilmeleri endüstriyel alanda tercih edilme sebeplerindedir. Biyoteknoloji açısından da büyük öneme sahip olan proteazların, canlılığın devamı için de önemli bir yeri vardır. Mutagenез veya rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak ticari statüde enzim verimliliği artırılabilir.

Proteazlar; amaşır deterjanları, kontakt lens temizleyicisi, gıda endüstrisi, bira, ipek, deri gibi endüstriyel alanlarda sıklıkla kullanılmaktadır. Endüstriyel alan dışında bu enzimler; kan pıhtılaşmasında, protein yıkımında, dokuları regüle etmede, membranlardaki protein geçişi gibi görevleri de mevcuttur (Rao ve ark., 1998). Son yıllarda gelişen teknoloji ve tıpla beraber farklı hastalıklarda kullanılan terapötik ajanlarda proteaz enzim kullanımı giderek artmıştır. Bugüne kadar kullanılan bu enzim; bakteri, küf ve mantarlardan izole edilmiştir. Fakat yapılan çalışmalarda aktinomisetlerin de proteaz enzim üretimi yadsınmayacak derecede hız kazanmıştır. Aktinomisetlerin hem karada hem suda bol miktarda bulunması, bu enzimin elde edilmesinde kolaylık sağlamıştır. Bakteri, fungus ve aktinomisetlerden elde edilen proteaz enzimlerinin, birlikte kullanımında daha etkin bir şekilde aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir (Banerjee ve ark., 1999). Proteaz enzimi aktinomisetlerden üretildiği

gibi farklı kaynaklardan da üretimi yapılmaktadır. Bazı örnekler Tablo 1.2’de gösterilmiştir.

Tablo1.2. Farklı mikrobiyal kaynaklardan proteaz üretimi

Mikroorganizma	Optimum pH	Optimum Sıcaklık °C	Kaynak
<i>Bacillus mojavensis</i>	10,5	60	Beg ve Gupta, 2003
<i>Vibrio fluvialis VM10</i>	8,0	33,5	Venugopal ve Saramma, 2006
<i>Bacillus licheniformis</i>	10,0-11,0	65-70	Sellami-Kamoun ve ark., 2008
<i>Bacillus subtilis</i>	10,0	45	Pant ve ark., 2015
<i>Caldicoprobacter guelmensis</i>	10,0	70	Bouacem ve ark., 2015
<i>Pleurotus sajor caju CTM10057</i>	9,5	70	Benmrad ve ark., 2019
<i>Halobacterium sp.</i>	6,0-11,0	60	Elbanna ve ark., 2015
<i>Exiguobacterium profundam sp.</i>	9,0	35	Sudha ve ark., 2018
<i>Bacillus</i>	9,0	50	Dorra ve ark., 2018

1.6.2. Proteaz enziminin sınıflandırılması

1.6.2.1. Katalitik bölgedeki işlevine göre proteazlar

1. Endopeptidazlar

Protein molekülündeki polipeptid zincirinin iç bölgelerindeki peptid bağlarını hidrolize eden gruptur. Endopeptidazlar; serin, sistein, aspartat ve metallo olarak 4 farklı şekilde gruplandırılmıştır (Reed, 1993).

a. Serin proteaz (EC 3.4.21)

Histidin, serin ve aspartik asitten oluşan yapı ile karakterize edilmektedir. Buradaki serin, substratla birlikte kovalent bağ ile bir tepki oluşturur (Nduvimana ve ark., 1995). Serin proteaz enzim grubu fenilmetilsulfonilflorid (PMSF),

diizopropilflorofosfat (DFP), 3,4 dikloroizokumarin (3,4-DCI), tosil-L-lizinkloro metil keton (TLCK) ile inhibe edilebilir (Özden, 2014). Serin proteaz; fosfoproteinlerin ve glikoproteinlerin bağ yapısında bulunur ve fosfolipit, sifingolipit sentezinde görev alır. Ayrıca kan pıhtılaşmasında, bağışıklık sisteminde de etkin bir şekilde çalışmaktadır. Ester ya da amid substratların hidrolizini sağlar. Serin proteaz enzim yapısının bilinmesinde; sindirimden sorumlu tripsin ve aminoasit zincirlerini inhibe eden kompleks yapılarının bilinmesi kolaylık sağlamıştır. Serin tipi proteazlar bitki virüslerinde Potyviridae familyası üyelerinde ve Polerovirus cinsinde bulunur. Serin benzeri proteazlar ise Comoviridae ve Sequiviridae familyasında bulunduğu bildirilmiştir (Dougherty ve Semler, 1993).

b. Sistein proteaz (EC 3.4.22)

Sistein proteaz diğer adıyla tiyol proteazlar; aspartik asit, histidin ve sisteinden oluşan enzim grubudur. Sistein proteazlar ağır metal iyonları ve okside edici ajanlarla kolaylıkla inhibe edilebilmektedir. Bu proteaz grubu bitki ve mikroorganizmalardan elde edilebilir. Doğadan elde edilen tiyol proteazlar, mikroorganizmalardan elde edilen proteazlara göre daha elverişli ve homojendir. Papayadan elde edilen papain, kividen elde edilen aktinidin, incirden elde edilen fisin yapısal olarak tiyol proteaz grubuna benzerlik göstermektedir (Gerze, 2003). Tiyol proteaz grubu hücrel proteinlerin dönüşüm evresinde kullanılmaktadır. Helper component (yardımcı bileşen) sistein proteaza örnek olarak verilebilir. Bu bileşen potyvirusler tarafından kodlanır. Sistein proteaz potyviruslerin genomik RNA'sında yardımcı bileşen (helper component) tarafından kodlanmaktadır (Dougherty ve Semler, 1993; Huet ve ark.,1994; Agrios, 2005). Yardımcı bileşen (HC-Pro) viral döngüde pek çok fonksiyonu gerçekleştirir ve multifonksiyonel bir proteindir (Ertunç ve Topkaya, 2018).

c. Aspartat proteaz (EC 3.4.23)

Asit proteazlar olarak da bilinir. İki asparjin residülerinin katalitik iki molekülünden oluşmaktadır. Düşük pH değerinde aktivite gösterir. En iyi bilinen aspartat proteaz pepsin enzimidir. Bütün aspartat proteazlar, reaksiyon mekanizması en karışık olan iki aspartat tortusu içerir (Fersht, 1977).

d. Metallo proteaz (EC 3.4.24)

Proteaz grubunun bilinen en eski sınıfıdır. Aktiviteleri için çinko iyonuna gereksinim duymalarından dolayı, çinko proteaz olarak da bilinir. Çinko bazen, aktivitesini etkilemeyecek derecede, nikel ya da kobalt gibi metallerle yer değiştirebilir. Metallo proteazlar bitki patojeni virüslerinde bulunmaktadır (Dougherty ve Semler, 1993).

2. Ekzopeptidazlar

Protein zincirinde uçta bulunan amino veya karboksildeki peptid bağlarını hidroliz eder. Zincirin uç kısmındaki C-karboksil kısma etki ederse karboksipeptidaz, N-amino kısma etki ederse aminopeptidaz olarak adlandırılmaktadır (Duran ve ark., 2007).

a. Aminopeptidazlar

Bitki veya hayvanlardan elde edilmektedir. Amino uçtaki bölgeden bir aminoasit kesimi yapar. Eğer amino uçta iki kalıntı varsa dipeptidil peptidaz, üç kalıntı varsa tripeptidil peptidaz olarak sınıflandırılır. Aminopeptidazlar hücre içi enzimlerdir, fakat *A. Oryzae* adlı türden üretilen aminopeptidaz hücre dışı enzimdir (Rao ve ark., 1998).

b. Karboksipeptidaz

Karboksil uçtaki tek ve son peptid bağını hidroliz eden enzim grubudur. Karboksipeptidazlar; sistein karboksipeptidaz, serin karboksipeptidaz ve metallo karboksipeptidaz olarak aktif bölgelerine göre üçe ayrılır (Rao ve ark., 1998).

1.6.2.2. Kaynağına göre proteazlar

1. Bitkisel kaynaklı proteazlar

Bitkisel kaynaklı proteaz enzimleri daha çok tropikal bölge bitkilerinden elde edilir. Bu bölgede bulunan bitkilerde enzim üretimi olması için belli bir süre geçmesi gerekir. Bu süreçte bitkinin bulunduğu ortam şartları, iklim gibi özellikler, enzim üretimini etkilemektedir. Bu enzimi ihtiva eden bazı bitkiler; *Orchis anatolica*

(Parlak ve ark., 2008), *Crocus biflorus* (Çelik, 2018), *Primula veris* (Güngör ve ark., 2006).

2. Hayvansal kaynaklı proteazlar

En yaygın olarak bilinen hayvansal kaynaklı proteazlar pepsin, tripsin, kimotripsin ve renin enzimleridir. Rennin; memelilerin midesinde anne sütünü sindirmeye yarayan bir enzimdir. Pepsin bilinen ilk hayvansal enzimdir. Rennet enzimi sığırlardan elde edilmektedir (Alaylı ve ark., 2004).

3. Mikrobiyal kaynaklı proteazlar

Mikrobiyal kaynaklı proteazlar genel olarak fungus, bakteri ve aktinomisetlerden elde edilir. Mikroorganizmaların üremesinin daha kolay ve hızlı olması, bitki ve hayvanlardan elde edilen proteazlara göre daha çok tercih edilmesine neden olur (Kıran ve ark., 2006). Enzim satışlarının %40'ı mikrobiyal kaynaklı proteazlar aracılığıyla sağlanmaktadır. Mikrobiyal proteazlar; ilaç, gıda, tekstil, deri ve deterjan gibi çok yönlü kullanımları ile enzim pazarında geniş yer tutmaktadır. Endüstriyel uygulamalarda kullanılacak olan proteazlar farklı ortam ve yüksek sıcaklıklarda aktiviteye sahip olmalıdır (Singh ve Bajaj, 2017). Bakteriye proteazlardan *Bacillus* türleri ekstrasellüler proteazların en önemli üreticisidir (Nascimento ve Martins, 2004). Hücre içi proteazların metabolik ve düzenleyici sistemde, hücre dışı proteazların ise protein hidrolizinde önemli görevi vardır (Kalisz, 1988; Kumar ve Takagi, 1999; Gupta ve ark., 2002). Son zamanlarda hücre içi ve hücre dışı proteazların metabolik süreçlerde önemli rolleri araştırılmıştır (Zeigler, 2001).

Actinomycetes, Streptomyces ve Nocardia gibi mikroorganizmaların proteaz enzimi üreticisi olduğu bilinmektedir (Wietzorrek ve Bibb, 1997). Alkalen proteazların yüksek ısıya karşı gösterdikleri tolerans sebebiyle deterjan endüstrisinde kullanımı oldukça yaygındır (Rao ve ark., 1998). Bu proteazların deterjanlarda leke çıkarımı için eklendiği bilinmektedir (Nilegaonkar ve ark., 2007). Ayrıca tedavi edici uygulamalarda da proteazların kullanıldığı rapor edilmiştir (Nelson ve Cox, 2005).

1.6.3. Proteaz enziminin kullanım alanları

Proteaz enzimi endüstriyel enzim kullanımının ortalama %60'ını oluşturmaktadır (Sharma ve ark., 2017). Endüstriyel işlemleri daha az maliyetle yapabilmek için proteaz ve diğer enzim türlerinin kullanımı giderek artmaktadır. Alkali proteazlar yıllık %25 ve diğer proteazlar %21 oranında pazar payına sahiptir (Rao ve ark., 1998).

Mikrobiyal kaynaklı proteaz enzimleri genelde temizlik ürünlerinde, yağların ve kirlerin uzaklaştırılmasında kullanılır. Bakterilerden özellikle *Bacillus* türlerinden elde edilen proteaz enzimleri deterjan endüstrisinde kullanımı daha fazladır (Ahmetoğlu, 2011). Bisküvi gibi gıda ürünlerinde sindirimin kolaylaştırılmasını sağlar. Alkol endüstrisinde biranın muhafaza edildiği süreçte olabilecek bulanıklığın önüne geçer. Fotoğraf endüstrisinde, fotoğraf filmlerinin içindeki gümüşü elde edebilmek için jelatinin çözünmesini sağlar. Eczacılıkta hazmı kolaylaştıran bazı ilaçların bileşiminde de bulunmaktadır. Saç ve cilt bakımı, kozmetik ürünlerinde proteaz enziminin belli ölçülerde kullanımı vardır. Doğada hayvansal, mikrobiyal ve bitkisel kalıntıların dekompozisyonunu sağlamaktadır. Deri endüstrisinde deriden kılların ayrılmasında ve derinin daha yumuşak kıvama getirilmesinde yardımcı olur. Balık yemlerinde katkı maddesi olarak kullanılarak, yemin sindirilebilirliğinin artmasına yardımcı olacağı belirtilmiştir (Özcan, 2015). Balık, hayvan ve bitki proteinlerini hidrolizlemede alkalın proteazların önemi oldukça fazladır. Kontakt lens solüsyonlarında temizleyici ajan olarak kullanılmaktadır. Bu solüsyonda kullanılan proteaz, daha çok hayvan ve bitki proteazlarından elde edilmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar mikrobiyal kaynaklı proteazlarında kontakt lens solüsyonlarında kullanılabileceğini göstermiştir. Özellikle *Bacillus* sp.'den elde edilen proteazın bu konuda daha çok etkili olduğu görülmüştür (Pawar ve ark., 2009).

Bu tezde *Streptomyces* sp. BSU-1 izolatından izole edilen proteaz enziminin karakterizasyonun yapılması amaçlanmıştır.

BÖLÜM 2. LİTERATÜR ÖZETİ

Aktinomisetler, önceki yıllarda daha çok toprak ve bitki köklerinden izole edilip kullanılıyordu. Fakat son yıllarda sucul ekosistemde de aktinomiset varlığı tespit edilmiş ve endüstriyel alanda kullanımının oldukça verimli olduğu bulunmuştur.

İzmir körfezi sediment örneklerinden izole edilen alkolofilik aktinomisetler incelenmiştir. MA1-1 suşu yağsız süt ve kazein besiyeri kullanılarak, suşun proteaz enzimi üreticisi olduğu bulunmuştur (Hameş ve Uzel, 2007).

Nocardiosis dassonvillei OPC-210 adlı aktinomiset türünden iki tip serin proteaz enzimi (I ve II olarak) üretimi gerçekleştirdiler. Üretilen bu enzimlere kolon kromatografisi ile saflaştırma işlemi yapmışlardır. Molekül ağırlıkları tespit edilip, uygun sıcaklık ve pH çalışması yapılarak, enzimleri aseton çökeltme, DEAE-Sephadex A-50, CM-Sephadex CL-6B, Sephadex 6-7S ve fenil-Toyopearl 650 M kolon kromatografisi ile saflaştırma işlemi gerçekleştirmişlerdir. Saflaştırılan enzimler SDS PAGE ile tek bant halinde tespit edilmiştir. İki proteaz için 21000 ve 36000 olarak molekül ağırlıkları tespit etmişlerdir. Proteaz I için optimum pH 10-12 ve proteaz II için ise 10,5 olarak, proteaz I için optimum sıcaklık 70 °C, proteaz II için ise 60 °C ifade etmişlerdir (Tsuji ve ark., 1990).

Andaman denizi ve Tayland körfezinden 101 deniz aktinomiseti izole edilmiştir. İzole edilen aktinomisetler üzerinde 16S rDNA gen taraması, antimikrobiyal aktivite belirlenmesi, proteolitik aktivite tayini ve morfolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla çeşitli çalışmalar yapmışlardır (Leetanasaksakul ve Thamchaipenet, 2018). Hindistan'ın Kuzey Himalaya bölgesinden 46 aktinomiset türü izole edilmiştir. İzolasyon işlemi seri seyreltme plaka tekniği ile yapılmış ve bu aktinomisetlerin kültür karakterizasyonları, proteaz üretimi ve kanser hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Proteaz enzim üretimi için yağsız süt agar kullanmışlardır. Farklı pH, sıcaklık ve metal iyonlarının (β -mercaptoetanol, DTT, iyodoasetamid,

MgSO₄CaC₂ ve EDTA) etkisi araştırılmıştır. ERIA-31 ve ERIA-33 izolatlarının değiştirilmiş besin agar ortamlarda diğer kültürlerle göre daha fazla proteaz aktivitesi gösterdiği rapor edilmiştir (Balachandran ve ark., 2012).

Hindistan'da Bengal körfezi, Pulicat gölü ve Pichavaran mangrov ortamlarından 256 örnek alınarak, 191 farklı aktinomiset izole etmişlerdir. İzole edilen aktinomisetlerin 108'inin proteaz enzim üreticisi olduğu bulunmuştur. Elde edilen aktinomisetlerden MML1614 izolatının yüksek proteolitik aktivite gösterdiği bildirilmiştir. MML1614 suşuna ait 16S rDNA dizilimi yapılarak *Streptomyces fungicidius* olduğu tanımlanmıştır. *Streptomyces fungicidius*'un uygun şartlarda proteaz enzimi üretimi için farklı çalışmalar yapmışlardır (Ramesh ve ark., 2009).

Erzurum ili sıcak su kaynaklarından bakteri izolasyonu yapmışlardır. Yapılan genetik tarama ile bu bakterinin *B. pumilus* olduğu ifade edilmiştir. Bakteri ile yapılan çalışmalar sonucunda proteaz aktivitesi tespit etmişlerdir (Gülmüş ve Görmez, 2018).

Kore Inchon'da ki Batı deniz sedimetlerinden kirlenmiş gelgit çamurundan aktinomiset izolasyonu yapmışlardır. Yapılan çalışma ile *Bacillus clausii* I-52 izolatından proteaz aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir. Enzim üzerine metal iyonlarının etkisini araştırıp, Diaion HPA75, Fenil-Sepharose ve DEAE-Sepharose kolon kromatografisi ile saflaştırma işlemleri yapmışlardır (Joo ve Chang, 2004).

Kirlenmiş deniz ortamından toplanan örneklerden aktinomiset izolasyonu ile *Nocardiosis* sp. elde etmişlerdir. Yapılan çalışma ile bu aktinomisetin hücre dışı proteaz enzim üreticisi olduğunu ifade etmişlerdir (Dixit ve Pantolonu, 2001).

Batı Anadolu'dan kaplıca sedimenti ve toprak örneklerinden alınan mikroorganizmaların Actinomycetes olup olmadığını araştırmışlardır. 55 °C'de Actinomyces izolasyon agar (AIA), nişasta kazein agar ve gliserol maya ekstratı kullanılarak izolasyon yapmışlardır. İzolatların hücre dışı proteaz aktivitesi, kolonileri çevreleyen hidroliz bölgelerine göre AIA %1 kazein kullanılarak tarama yapmışlardır. İzolatlar üzerine antimikrobiyal aktivite çalışmaları yapmışlardır. İzolatların tanımlanması kültürel, fizyolojik özellikler ve 16S rDNA dizi benzerliği ile yapılarak, 67 termofilik Actinomycetes izolatı, *Thermoactinomyces thalophilus*

ve *T. sacchari* türlerinde sınıflandırmışlardır. Bunlardan %62'sinin hücre dışı proteaz üreticisi olduğunu rapor etmişlerdir (Uzel ve ark., 2011).

Hindistan'da ki Jakhau sahilinden 26 proteolitik bakteri izole etmişlerdir. Bunların arasında *Bacillus tequilensis* (JQ904626) izolatının tanımlamasını yapmışlardır. Yaptıkları çalışma ile bu izolatın hücre dışı proteaz ürettiğini söylemişlerdir (Bose ve ark., 2014).

Bengal körfezinin farklı yerlerinden toplanan 288 deniz örneğinden, nişasta kazein agar besi ortamında 208 deniz aktinomiseti izole etmişlerdir. İzolatların büyüme paternleri, miselyel renklenme ve ekzopolisakkaritlerin üretilmesi bu izolatın *Streptomyces* spp. olduğunu ifade etmişlerdir. Deniz aktinomisetleri arasında *Streptomyces* spp. %88 oranında bulunduğunu belirtmişlerdir. 208 deniz aktinomiseti arasında 111 izolatın insan patojenlerine karşı antimikrobiyal aktivite, 151 izolatın da iki bitki patojenine karşı antifungal aktivite gösterdiğini söylemişlerdir. Ayrıca yaptıkları çalışmalarla bu izolatların enzim üreticisi olduğunu ifade etmişlerdir (Ramesh ve Mathivanan, 2009).

Güney Hindistan'daki deniz tuzundan aktinomiset izolasyonu yapmışlardır. Yapılan sistematik tarama ile halofilik suşun *Actinopolyspora* sp. VITSDK2 olduğunu ifade etmişlerdir. Bu suş üzerine proteaz enzim çalışması, amonyum sülfat ile çöktürme işlemi ve DEAE selüloz kolon kromatografisi yapılarak kısmen saflaştırma işleminden sonra yapmışlardır. Proteaz enzimini HPLC kullanarak daha saf hale getirip, molekül ağırlığı SDS-PAGE analizi ile 22 kDa olarak ifade etmişlerdir (Suthindhiran ve ark., 2013).

Gram pozitif aktinomisetlerin çeşitli biyolojik aktiviteleri ve farklı kimyasal bileşikler ürettiği bilinmektedir. Maharashtra Konkan kıyılarından 5 bölgedeki deniz sedimentlerinden 107 farklı aktinomiset izolasyonu yapmışlardır. Aktinomisetlerden 90'ının genel seviyesi belirlenmiş ve bu izolatların *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Intrasporangium*, *Saccharopolyspora*, *Streptosporangium*, *Rhodococcus*, *Saccharomonospora* ve *Nocardia* olduğunu tespit etmişlerdir. Tanımlanan 90 aktinomiset için enzimatik aktivite tayini yaparak, bu izolatların proteaz, jelatinaz, amilaz, lesitinaz, selülaz ve üreaz üreticisi olduğunu ifade etmişlerdir (Gulve ve Desmukh, 2011).

Hindistan'da yengeçden aktinomiset izolasyonu için birtakım çalışmalar yapmışlardır. Bunun için Hindistan'ın Güneydoğu kıyılarından *Scylla serrata* (çamur yengeci) tür yengeçler toplanarak, steril polietilen poşetlerde muhafaza etmişlerdir. Önce yengecin vücut yüzeyi %70 etanol ile steril pamuk kullanılarak temizlemişler ve yengecin vücut yüzeyinden 1 gr alıp steril olarak homojenize etmişlerdir. Numuneyi seri olarak süzüp, %50 deniz suyu ile sterilize etmişlerdir. Seri olarak seyreltilen numunenin 1 ml'si Kuster agar içeren besi ortamında 7 gün boyunca 35 °C'de inkübasyona bırakmışlardır. Örneklerden daha sonra 7 farklı aktinomiset izolasyonu yapmışlardır. Potansiyel proteaz üreticisi olan suşlar UV ve sodyum azid kullanılarak mutasyona uğratmışlardır. Bu çalışma ile aktinomisetin proteaz enzim üretim etkinliğinin artmasına yönelik gelişme gösterdiği ifade etmişlerdir (Karthik ve ark., 2010).

Hindistan'ın Manipur eyaletinde topraktan aktinomiset izolasyonu yapmışlardır. Yapılan izolasyon sonucu seçilen bir izolatın *Nocardiopsis prasina* HA-4 olduğunu söylemişlerdir. Yaptıkları çalışma ile bu izolattan proteaz enzimi üretmişlerdir. Bu enzim ile sıcaklık, pH ve farklı metal iyonları kullanarak, enzim üzerine etkisini araştırmışlardır (Ningthoujam ve ark., 2009).

Hindistan Buldhana bölgesindeki Lonar soda gölünden *Bacillus licheniformis* izole etmişlerdir. İzole ettikleri bakteriden proteaz enzim üretimi için uygun besiyeri de büyütürük, sıcaklık, pH ve çeşitli yüzey aktif maddelerinin enzim üzerine etkisini araştırmışlardır (Pathak ve Deshmukh, 2012).

BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu tez çalışmasında Giresun Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarında FEN-BAP-A-140316-52 nolu proje çalışması kapsamında izole edilen aktinomisetler arasında en yüksek proteaz aktivitesi gösteren izolatlardan biri olan *Streptomyces* sp. BSU-1 izolatu kullanıldı.

3.1.1. Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar aşağıdadır.

Hassas terazi, çalkalamalı su banyosu, buzdolabı, pH metre, mikropipet, dikey jel elektroforez cihazı, manyetik karıştırıcı, spektrofotometre, soğutmalı santrifüj, etüv, vorteks, saf su cihazı, steril kabin ve otoklav.

3.1.2. Kullanılan besiyerler

Nişasta Kazein Besiyeri (SCA) sıvı ve katı olarak iki farklı şekilde hazırlandı. Bu besiyeri *Streptomyces* sp. BSU-1 izolatının çoğaltılması ve enzim çalışmaları için kullanıldı (Jeffrey, 2008).

Besiyeri 1: Nişasta Kazein AgarBesiyeri (SCA)

Çözünür nişasta	10,0 gr
Kazein hidrolaz	0,3 gr
KNO ₃	2,0 gr
NaCl	2,0 gr
K ₂ HPO ₄	2,0 gr

MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05 gr
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 gr
Agar	18,0 gr
Saf su	1000 ml, pH7,5

Yukarıda belirtilen besiyeri 1,1 basınç altında 121 °C'de 15 dakika otoklavlanılarak steril hale getirildi.

Besiyeri 2:Ramesh ve ark. (2009) göre geliştirilen besiyeri modifiye edilerek kullanıldı.

Pepton	10 gr
Glukoz	10 gr
K ₂ HPO ₄	0,5 gr
MgSO ₄ .7H ₂ O ₄	0,5 gr
NaCl	0,5 gr
CaCl	0,5 gr
Saf su	1000 ml

Bu besiyeri *Streptomyces* sp. BSU-1 izolatından proteaz enzimi üretmek amacıyla kullanıldı.

3.1.3. Kullanılan tamponlar

50 mM Sodyum asetat pH 3, 4 ve 5

50 mM Potasyum fosfat pH 6 ve 7

50 mMTris-HCl pH 8

Glisin-NaOH pH 9, 10, 11 ve 12

3.1.4. Kullanılan kimyasal maddeler

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar aşağıdadır.

Na⁺¹, Cu⁺², Mn⁺², Mg⁺², Zn⁺², Hg⁺², Ca⁺², pepton, glikoz, K₂HPO₄, MgSO₄.7H₂O, jelatin, kazein hidrolaz, KNO₃, Tris-HCl, TCA, Folin-ciocalteu'sphenol, Na₂CO₃, β-merkaptotanol, DMF, DMSO, metanol, etanol, aseton, asetonitril, izopropanol, üre,

SDS, Tween 20, Twen 80, Tripton X100, H₂O₂, amonyum sülfat, NaHCO₃, akrilamid, tris, SDS, amonyum persulfat, TEMED, tris, gliserol, SDS, boya, bromofenol, metanol, asetik asit, Triton-X100, Coomassie Brilliant Blue R-250 ve G-250.

3.1.5. Enzim aktivitesi ölçümünde kullanılan solüsyonlar

Uygun tampon içerisine %0,65 kazein ilave edilip ve karışım berraklaşana kadar iyice manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Kazeinin tamamen çözünmesi için karışım 80 °C'yi geçmeyecek şekilde ısı uygulandı. 110 mM Trikloroasetik asit (TCA) solüsyonu, Folin-Ciocalteu reaktifi (1:1 oranda seyreltilmiş) ve 0,5 M Sodyum karbonat (Na₂CO₃) solüsyonları hazırlandı.

3.1.6. SDS PAGE ve zimogram analizinde kullanılan solüsyonlar

Akrilamid Solüsyonu: 29,2 g akrilamid ve 0,8 g bisakrilamid çözüldükten sonra son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandı (Bollag ve ark, 1996).

Amonyum Persülfat: Amonyum persülfat %10 olacak şekilde saf su içerisinde çözülerek taze olarak hazırlandı (Bollag ve ark, 1996).

Örnek Yükleme Tamponu: Yükleme tamponu 62,5 mM Tris (pH 6,8), %2 SDS, %5 β-merkaptöetanol, %10 Gliserol ve %0,002 Bromfenol mavisi kullanılarak hazırlandı (Zhang ve ark, 2009).

Jel Boyama Solüsyonu: Coomassie Brilliant Blue R-250 % 0,25, metanol %40 ve asetik asit %10 olacak şekilde boyama solüsyonu hazırlandı.

Yıkama 1 solüsyonu: %50 metanol ve %10 glisial asetik asit olacak şekilde hazırlandı.

Yıkama 2 solüsyonu: %5 metanol ve %7 glisial asetik asit olacak şekilde hazırlandı.

Triton-X100 çözeltisi: %2.5 Triton-X100 hazırlandı (Böckle ve ark, 1995).

3.2. Yöntem

Daha önceki proje ve tez çalışmasında kalitatif olarak yüksek proteaz aktivitesi gösterdiği tespit edilen *Streptomyces* sp. BSU-1 izolatından proteaz enzimi izole edilerek karakterizasyon çalışmaları yapıldı. *Streptomyces* sp. BSU-1 izolatı 2 nolu besiyerinde 30 °C’de 150 rpm’de 2 gün inkübe edildi. Hazırlanan bu ön kültürden %3 olacak şekilde 2 nolu besiyerine ekim yapıldı ve 30 °C’de 150 rpm’de 3 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası 6000 rpm’de 20 dak. santrifüj yapıldıktan sonra elde edilen süpernatant ham enzim olarak değerlendirilmiş olup karakterizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere +4 °C’de muhafaza edildi.

3.2.1. Proteaz aktivitesinin kantitatif olarak belirlenmesi

Ham enzimin aktivitesinin kantitatif olarak belirlenmesi için 50 mM uygun tampon içinde %0,65 (w/v) kazein solüsyonu hazırlandı. Hazırlanan kazein solüsyonundan 800 µl alınıp, 320 µl ham enzim ile karıştırılıp su banyosunda uygun sıcaklıkta 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 800 µl 110 mM TCA solüsyonu ilave edilip oda sıcaklığında 30 dak. inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında 8000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi ve filtratdan 500 µl alınıp, 1,25 ml 0,5 M Na₂CO₃, 250 µl folin-ciocalteu'sphenol (1:1 v/v seyreltik) ilave edilip, oda sıcaklığında karanlık ortamda 30 dakika bekletildi. Daha sonra spektrofotometrede OD₆₅₅ nm de ölçüm yapıp aktivite sonuçları kantitatif olarak belirlendi. Bir ünite proteaz aktivitesi (U), hidroliz reaksiyonu sonucu enzimin substrattan bir dakikada açığa çıkarttığı tirozinin µmol cinsinden miktarı olarak ifade edildi.

$$U/ml = \frac{(\text{Salınan } \mu\text{mol tirozin eşdeğeri}) \times (\text{Reaksiyonun toplam hacmi}) \times (\text{Seyreltme faktörü})}{(\text{Reaksiyondaki örnek hacmi}) \times (\text{Reaksiyon süresi})} \quad (3.1)$$

3.2.2. Tirozin standart grafiği

Aktivite hesaplamasında kullanılacak olan tirozin standart grafiğinin belirlenmesi için 50 mM uygun tamponda 10 mM L-tirozin stok çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan

bu stok çözülden 0,05-0,5 µmol konsantrasyonlardan 500 µl alınıp, 1,25 ml 0,5 M Na₂CO₃ ve 250 µl folin-ciocalteu'sphenol ile karıştırılıp, oda sıcaklığında 30 dak. karanlık bir ortamda bekletildi. Daha sonra spektrofotometrede OD₆₅₅ nm'de ölçümü yapılarak sonuçlar doğrultusunda tirozin standart grafiği çizildi. Bu grafik aktivite hesabında kullanıldı.

3.2.3. Enzim karakterizasyonu

Proteaz enziminin karakterizasyonunu belirlemek amacıyla farklı sıcaklık, pH, metal iyonları ve organik çözücüler kullanıldı. Daha sonra proteaz enziminin kısmi saflaştırma işlemi yapılarak enzim karakterize edildi.

3.2.3.1. Enzim aktivitesine sıcaklığın ve sıcaklık stabilitesinin etkisi

Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisinin araştırılması için 10-120 °C aralıklarında sıcaklık değerleri kullanıldı. Hazırlanan 50 mM Tris-HCl pH 8 tamponu kullanılarak %0,65'lik (w/v) kazein substrat solüsyonu hazırlandı. Aktivite çalışması 3.2.1'de belirtildiği şekilde yapıldı. Negatif kontrolde enzim yerine saf su kullanıldı. Her bir sıcaklık değeri üç tekrarlı yapıldı. En yüksek enzim aktivitesi gösteren sıcaklık 100 olarak kabul edilip ve enzimlerin aktiviteleri oransal olarak kalan aktivite olarak verildi.

Isı stabilite çalışması için ham enzim 50, 60 ve 70 °C sıcaklıklarında 15, 30, 45, 60 ve 120 dakika inkübasyona maruz bırakıldı. Negatif kontrolde enzim yerine saf su, pozitif kontrolde ön inkübasyona bırakılmamış ham enzim kullanıldı. Aktivite çalışması 3.2.1'de belirtildiği şekilde yapıldı. Her bir deney üç tekrarlı yapıldı. Pozitif kontrol 100 olarak kabul edilip ve enzimlerin aktiviteleri oransal olarak kalan aktivite olarak verildi.

3.2.3.2. Enzim aktivitesine pH ve pH stabilitesinin etkisi

Enzimin en iyi aktivite gösterdiği pH aralıklarının belirlenmesi için, 50 mM'lık pH tamponları hazırlandı. pH 3-4-5 için sodyum asetat, pH 6-7 için potasyum fosfat, pH 8 için Tris-HCl, pH 9-12 için glisin-NaOH tamponu kullanıldı. Bu tamponlar kullanılarak %0,65'lik (w/v) kazein substrat solüsyonu hazırlandı. Enzimin göstermiş olduğu aktivite 3.2.1'de belirtildiği şekilde optimum sıcaklık değerinde belirlendi. Her bir deney üç tekrarlı yapıldı. Muamele görmeyen enzime ait aktivite 100 olarak kabul edilmiş ve muamele görmüş enzimlerin aktiviteleri oransal olarak kalan aktivite olarak verildi. Daha sonraki çalışmalarda, en yüksek enzim aktivitesinin görüldüğü pH değerindeki tampon kullanıldı.

pH stabilitesinin belirlenmesi için enzim karışımı 1:1 oranında pH 8, 9, 10, 11 ve 12 tamponları ile karıştırılmış ve oda sıcaklığında 1, 2 saat ve +4 °C'de 24 saat ön inkübasyona maruz bırakıldı. Enzimin göstermiş olduğu aktivite 3.2.1'de belirtildiği yöntem ile optimum sıcaklık değerinde belirlendi. Pozitif kontrolde ön inkübasyona bırakılmamış enzim, negatif kontrolde saf su ve tampon kullanıldı. Her bir deney üç tekrarlı yapıldı.

3.2.3.3. Enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi

Enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisini belirlemek amacıyla Cu^{+2} , Mg^{+2} , Zn^{+2} , Hg^{+2} , Mn^{+2} , Na^{+1} ve Ca^{+2} metal iyonları kullanıldı. Tampon içinde %0,65 kazein substrat solüsyonu hazırlandı. Metal iyonlarının 1 ve 5 mM'lık konsantrasyonlardaki çözeltileri tampon ile hazırlandı. Daha sonra ham enzim ve tampon ile hazırlanmış metal iyonlarının çözeltileri karıştırılarak, 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Pozitif kontrol olarak ham enzim ile tampon karıştırılmış, ortama herhangi bir metal iyonu eklenmedi. Negatif kontrolde enzim yerine saf su kullanıldı. Her bir deney üç tekrarlı yapıldı. İnkübasyon sonrası aktivite çalışması 3.2.1'de belirtildiği şekilde yapıldı. Sonuçlara göre pozitif kontrol 100 olarak kabul edildi ve proteaz enzim aktivitesi üzerine metallerin etkisi değerlendirildi.

3.2.3.4. Enzim aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkisi

Proteaz aktivitesine organik çözücülerin etkisini belirlemek için farklı organik çözücüler kullanıldı. Ham enzim ve organik çözücüler karıştırılarak uygun sıcaklık ve sürelerde inkübe edildi. Bu çalışmada çözücü olarak son konsantrasyon %10 olacak şekilde metanol, etanol, asetonitril, izopropanol, DMF ve DMSO kullanıldı. Oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Negatif kontrolde çözücü ve saf su, pozitif kontrolde saf su ile ham enzim kullanıldı. Aktivite çalışması 3.2.1'de belirtildiği şekilde yapıldı. Enzim aktivitesi üzerine çözücü maddelerin etkisinde pozitif kontrol 100 olarak kabul edilip sonuçlar değerlendirildi.

3.2.3.5. Enzim aktivitesi üzerine deterjan, denatüran ve oksidanların etkisi

Enzim aktivitesi üzerine çeşitli deterjan ve denatüranların etkisini belirlemek için %0,1 ve %1'lik SDS, Tween 20, Tween 80 ve Triton X-100, %1 ve %5'lik H₂O₂ ve 0,5 ve 1 M'lık üre kullanıldı. Oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı. Negatif kontrolde deterjan, denatüran ve saf su kullanıldı. Pozitif kontrolde ham enzim kullanıldı. İnkübasyon sonrası aktivite çalışması 3.2.1'de belirtildiği şekilde yapıldı, pozitif kontrol 100 olarak kabul edildi. Deterjan, denatüran ve oksidanların enzim üzerine etkisi değerlendirildi.

3.2.4. Enzimin kısmi saflaştırılması

3.2.4.1. Amonyum sülfat ile çöktürme

Enzimin kısmi saflaştırılması amonyum sülfat (NH₄)₂SO₄ çöktürmesi ile yapıldı. Çöktürme işlemi için manyetik karıştırıcıda +4 °C'de %40, 60 ve 80 doygunlukta amonyum sülfat kullanıldı. %80 doygunluk için 1 gün +4 °C'de bekletildi. Çöktürme işlemi sonrası 10000 rpm'de 30 dak. santrifüj edilip, süpernatant kısmı uzaklaştırıldı.

Elde edilen pelletler steril saf suda çözüldü. Enzim aktivite çalışması 3.2.1’de belirtildiği şekilde yapıldı.

3.2.4.2. Diyaliz işlemi

Bu işlem için diyaliz membranı %2 NaHCO₃ ve %0,05 EDTA’lı solüsyon içinde hazırlandı. Diyaliz membran bu karışımın içinde 10 dakika kaynatıldı, steril saf suya aktarılarak 10 dak. daha kaynatıldı. Bu işlem 2 kez tekrarlandı. Diyaliz membran içinde amonyum sülfat çözünmesinden elde edilen örnek saf su içerisinde manyetik karıştırıcıda +4 °C’de 2 gün bırakıldı. Her gün iki kere suyu değiştirilerek 2. gün sonunda enzim aktivite çalışması 3.2.1’de belirtildiği şekilde yapıldı.

3.2.4.3. Ultrafiltrasyon

Diyaliz işleminden sonra elde edilen örnek 10000 Da’lik ultrafiltrasyon tüpüne aktarılıp ve 6000 rpm’de 5 dak. santrifüj edildi. Elde edilen alt ve üst sıvılar ayrı falcon tüplerine konularak enzim aktivite çalışması 3.2.1’de belirtildiği şekilde yapıldı.

3.2.4.4. SDS-PAGE ve zimogram analizi

Kısmi saflaştırma işleminden elde edilen proteinler %0,1 jelatin içeren %10’luk SDS-PAGE (Laemmli ve ark., 1970) ile belirlendi. Hazırlanan jelle elde edilen örneklerden yüklendi. Yürütme işlemi 50 V’da başlatılmış daha sonra 100 V’da çıkarıldı. Yürütme işleminden sonra jel iki kısma ayrıldı. Marker içeren kısım coomassie brilliant blue R-250 boyası ile yaklaşık 3 saat boyandı. Boyama işlemi sonrası yıkama 1 solüsyonunda yaklaşık 2 saat bekletildi. Jel yıkama 2 solüsyonuna alınarak değerlendirildi. Jelin diğer kısmı %2,5’lik Triton X-100’de 1 saat bekletildikten sonra tampon içinde oda sıcaklığında yaklaşık 12 saat bekletildi. İnkübasyon sonrası coomassie brilliant blue R-250 ile yaklaşık 3 saat boyama işlemi

gerçekleştirildi. Daha sonra yıkama 1 solüsyonuna alınarak yaklaşık 3 saat bekletildi. Beyaz bantların görünmesi proteaz enzimi için pozitif olarak değerlendirildi.

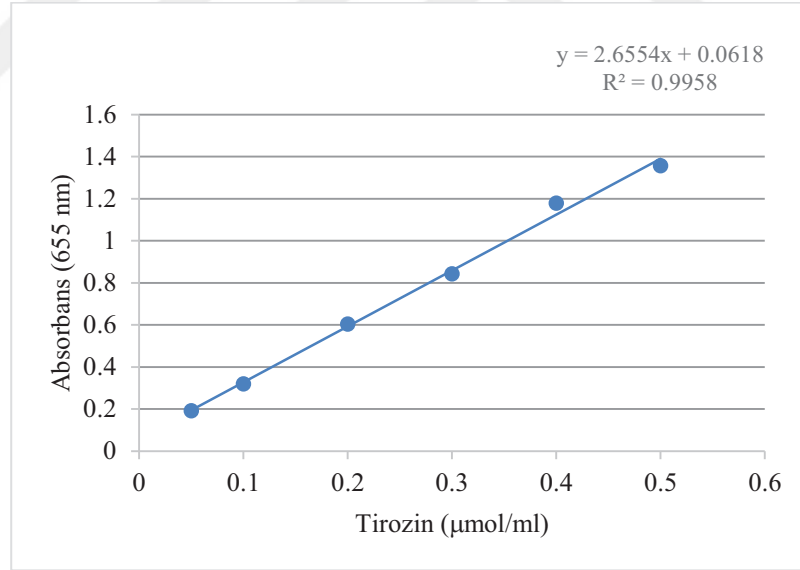


BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu tez çalışmasında *Streptomyces* sp. BSU-1 izolatından elde edilen proteazın karakterizasyonu yapıldı.

4.1. Tirozin Standart Eğrisi

Streptomyces sp. BSU-1 izolatının proteaz aktivitesi, kantitatif olarak spektroskopik yöntemlerle ölçüldü. Tirozin standart eğrisi Şekil 4.1’de verildi.

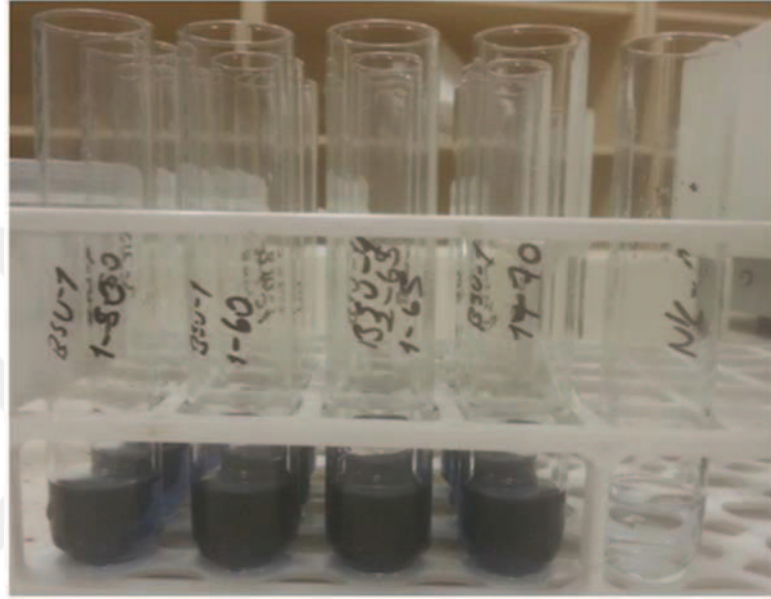


Şekil 4.1. Tirozin standart eğrisi

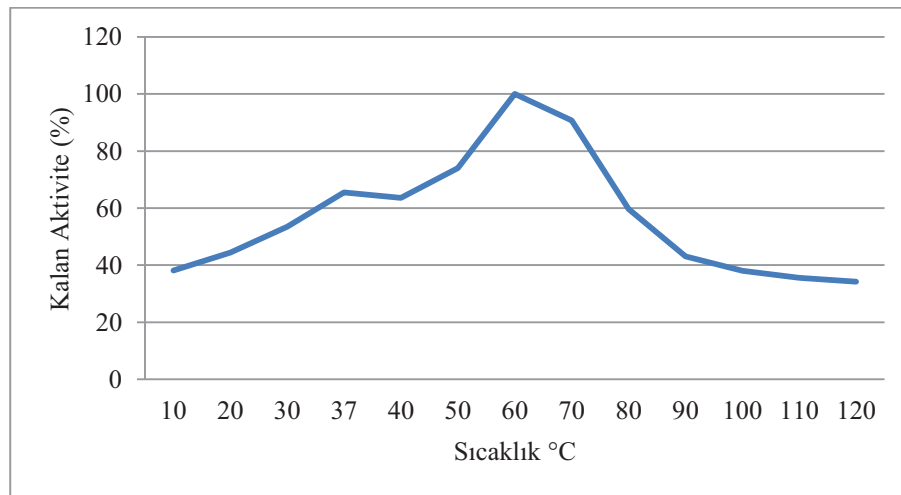
4.2. Enzimin Sıcaklık ve Sıcaklık Stabilitesi

Proteaz sıcaklık aktivite ve sıcaklık stabilitesi belirlendi (Şekil 4.2). Optimum sıcaklığın belirlenmesi için; 50 mM Tris-HCl pH 8 tamponu ile hazırlanmış

%0,65'lık (w/v) kazein substratı farklı sıcaklıklarda inkübe edilerek proteaz aktivitesi yöntemine göre reaksiyon gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar şekil 4.3'de verildi. Buna göre proteaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık 60 °C olarak ölçüldü. Enzim aktivitesinin 70 °C üzerinde ciddi oranda azaldığı görüldü.

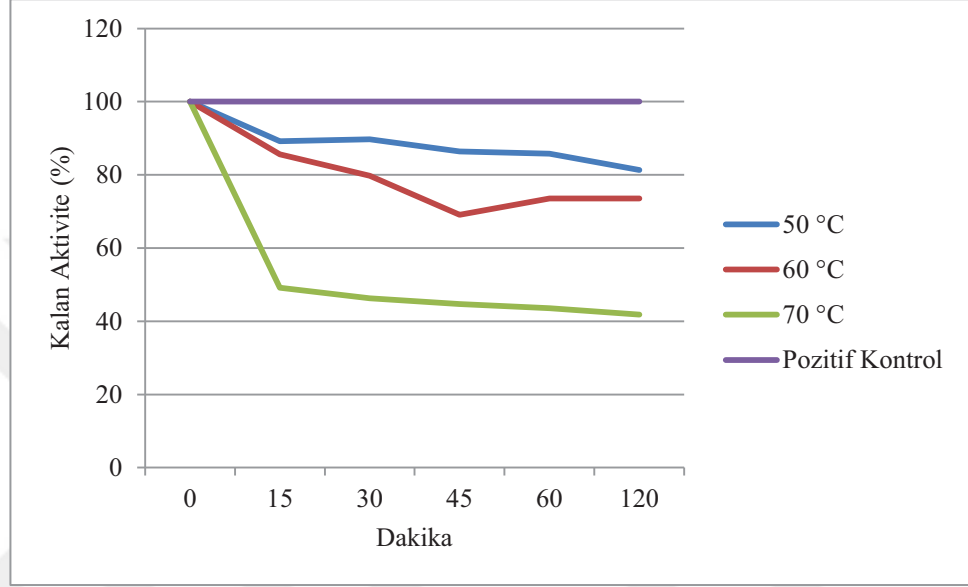


Şekil 4.2. Enzim üzerine sıcaklığın etkisi



Şekil 4.3. Enzimin sıcaklık aktivite grafiği

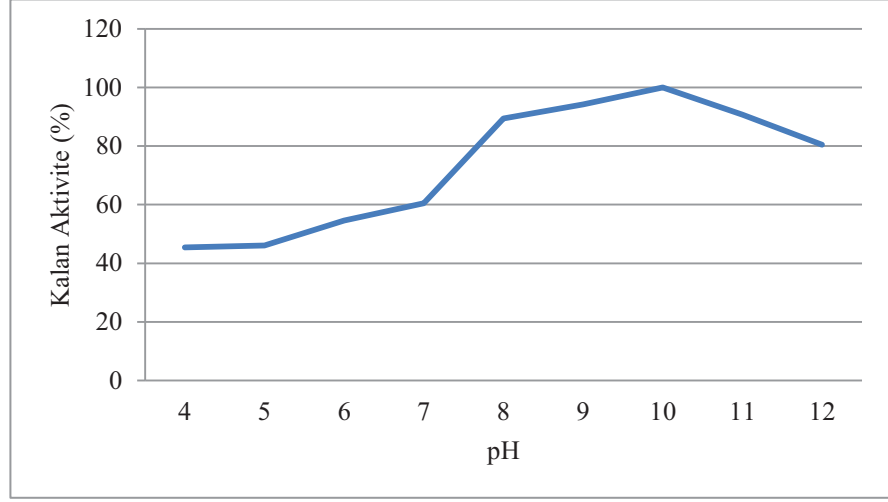
Proteaz sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi için, aktivitenin yüksek olduğu 50, 60 ve 70 °C sıcaklık değerleri kullanıldı ve farklı sürelerde inkübe edildi. Daha sonra optimum sıcaklık değerinde aktivite tayini yapıldı. Buna göre elde edilen değerler Şekil 4.4’de verildi.



Şekil 4.4. Enzimin sıcaklık stabilite grafiği

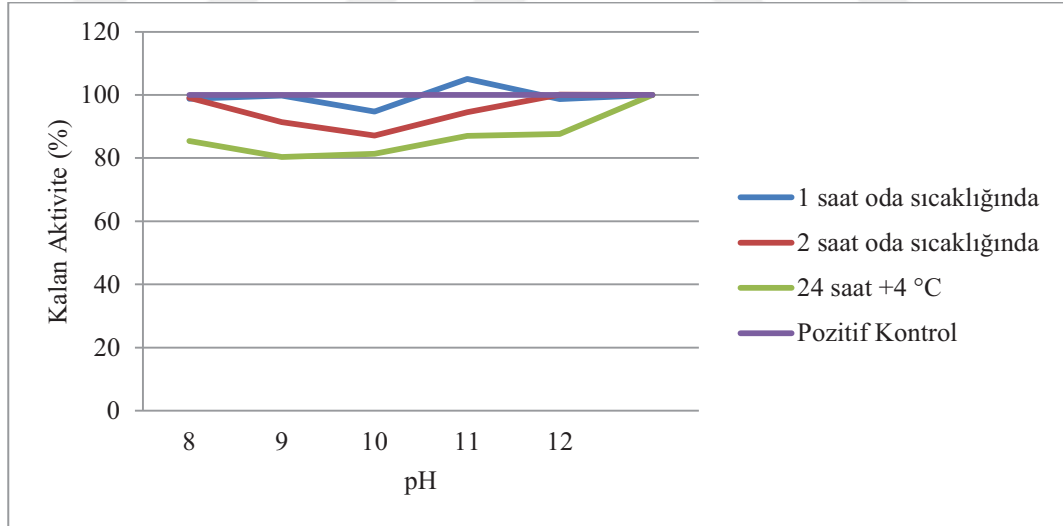
4.3. Enzimin Optimum pH ve pH Stabilitesi

Proteazın en yüksek aktivite gösterdiği pH değeri 10 olarak ölçüldü. Proteaz enzimin pH profili Şekil 4.5’te verildi.



Şekil 4.5. Enzimin optimum pH grafiği

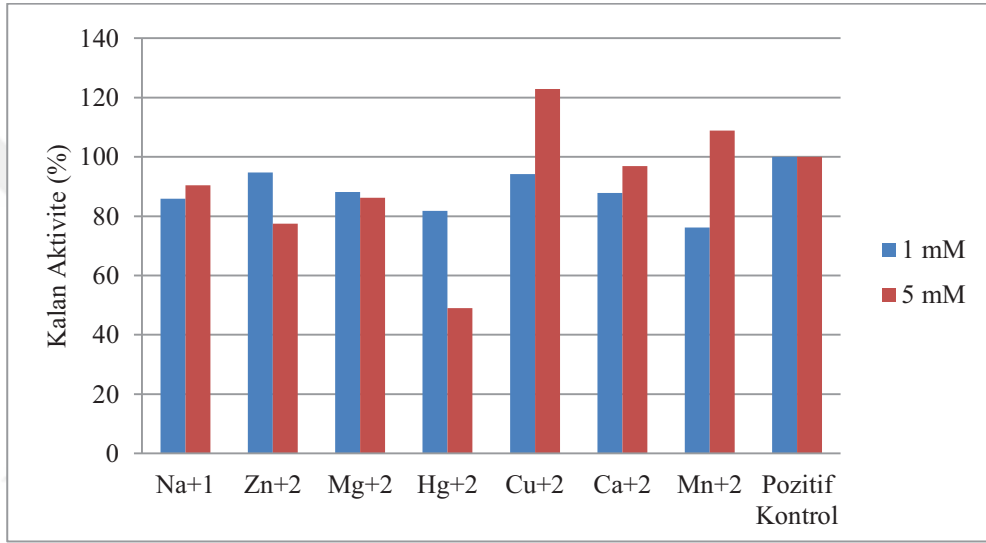
Enzimin pH stabilitesi Şekil 4.6'da verildi. Enzimin kararlılığını büyük oranda koruduğu görüldü.



Şekil 4.6. Enzimin pH stabilite grafiği

4.4. Enzim Üzerine Metal İyonlarının Etkisi

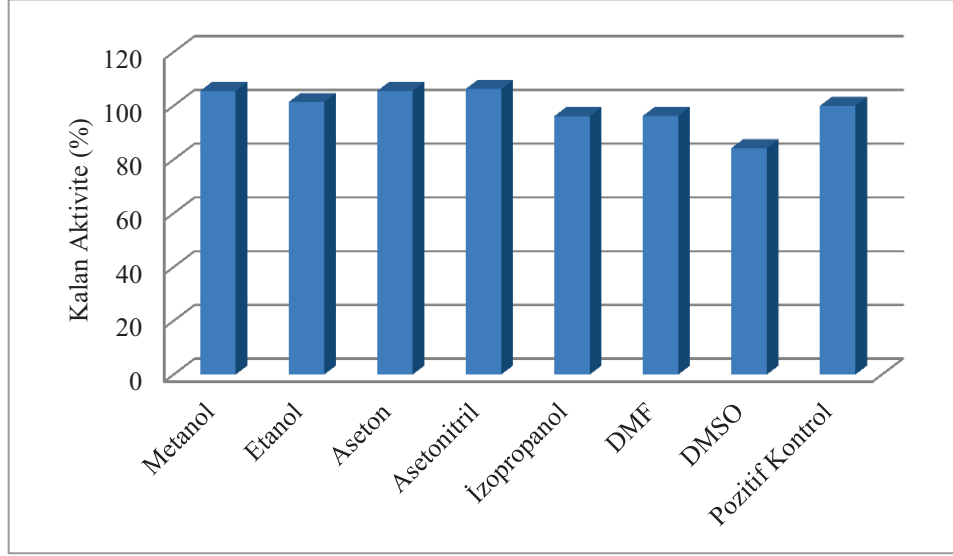
Çalışmada kullanılan ham enzime farklı metal iyonlarının etkisini belirlemek için yapılan çalışma sonucu elde edilen veriler Şekil 4.7’de verildi. Sonuçlara göre 5 mM Cu^{+2} ve Mn^{+2} iyonları enzim aktivitesini arttırırken 5 mM Hg^{+2} varlığında yaklaşık %50 aktivite kaybı gözlemlendi.



Şekil 4.7. Enzim üzerine metal iyonlarının etkisi

4.5. Enzim Üzerine Organik Çözücülerin Etkisi

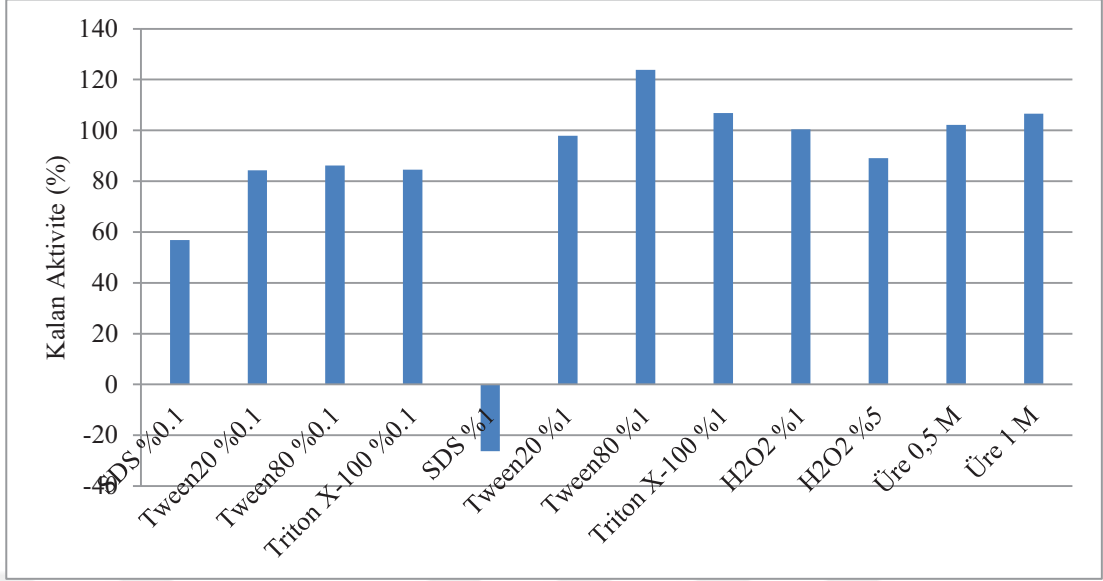
Çalışmada kullanılan proteaz enzimine organik çözücülerin etkisini belirlemek için kullanılan çözücülerin etkisi ile ilgili veriler Şekil 4.8’de verildi. Sonuçlara göre DMSO varlığında enzim aktivitesinde diğer çözücülere göre yaklaşık %16 aktivite kaybı gözlemlendi. İzopropanol ve DMF varlığında enzim aktivitesi ortalama %96 korundu. Diğer çözücülerde bir miktar artış oldu.



Şekil 4.8. Enzim üzerine organik çözücülerin etkisi

4.6. Enzim Üzerine Deterjan, Denatüran ve Oksidanların Etkisi

Enzim üzerine deterjanların etkisini belirlemek için yapılan deney sonuçları şekil 4.9'da verildi. Sonuçlara göre Tween 80 ve Triton X-100 varlığında enzim aktivitesinde artış gözlenirken, SDS varlığında enzim aktivitesinde düşüş gözlemlendi. H₂O₂'de ise %1 konsantrasyonunda enzim aktivitesinin korunduğu gözlenirken, %5 konsantrasyonunda enzim aktivitesinde az miktarda düşüş gözlemlendi. 0,5 ve 1 M'lık üre ise az miktarda aktivite artışına sebep oldu (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Enzim üzerine deterjan, denatüran ve oksidanların etkisi

4.7. Amonyum Sülfat İle Kısmi Saflaştırma

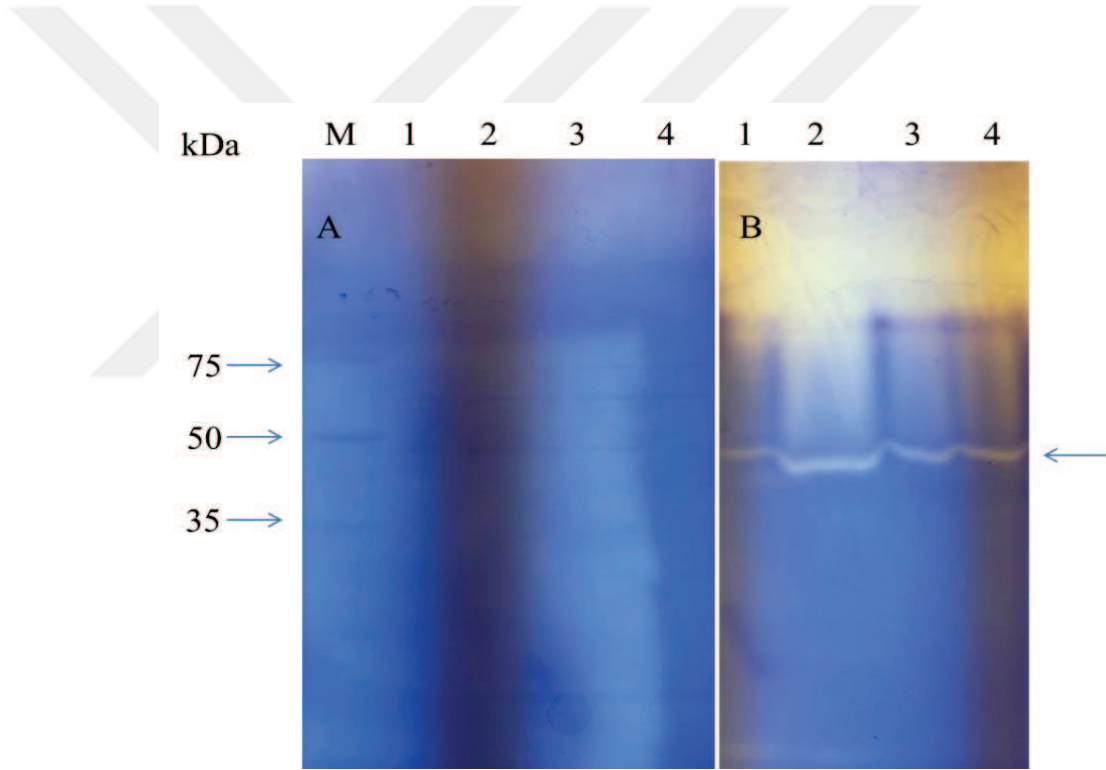
İki nolu besiyerinde 2 gün boyunca aktive edilen kültürden %3 olacak şekilde inokülasyon yapıldı ve 30 °C'de 150 rpm'de 3 gün boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kültür, 6000 rpm'de 20 dak. santrifüj edilerek hücreler uzaklaştırıldı ve kültür süpernatantı alındı. Ham enzimin aktivitesi 217,2 U/ml olarak hesaplandı. Alınan kültür süpernatantı içerisinde yer alan proteaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesi ile kısmi olarak saflaştırıldı. Proteaz enziminin kısmi olarak saflaştırma işlemi amonyum sülfat yöntemi kullanılarak %40, 60 ve 80 konsantrasyonlarında konsantre edilerek gerçekleştirildi. Elde edilen amonyum sülfat çöktürmelerinde proteaz enzim aktivitesi hesaplandı. Buna göre %60'lık amonyum sülfat doyumluğunda 470,8U/ml ve %80'lik de 520,4U/ml aktivite bulundu.

Amonyum sülfat ile çöktürmede %80 doyumlukta elde edilen örnek diyaliz membranı kullanılarak +4 °C'de 2 gün boyunca diyaliz edildi. Elde edilen diyaliz örneğinde proteaz enzim aktivitesi hesaplandı. Diyaliz örneğinin 246,5 U/ml aktivite bulundu.

Elde edilen diyaliz örneği ultrafiltrasyona tabii tutuldu. Elde edilen ultrafiltrasyon örneğinde proteaz enzim aktivitesi hesaplandı. Bu örneğin aktivitesi 228,1 U/ml olarak elde edildi.

4.8. Enzimin SDS-PAGE ve Zimogram Analizi

Enziminin molekül ağırlığı SDS-PAGE ile görüntülendi. Zimogram analizi sonucu yaklaşık 48 kDa civarındaki tek bir bant belirgin olarak gözlemlendi. Enzimin SDS-PAGE ve zimogram görüntüsü Şekil 4.10'da verildi.



Şekil 4.10. BSU-1 izolatından elde edilen proteazın SDS-PAGE ve zimogram analizi. A. SDS-PAGE analizi M: Markır, 1: Ham ekstrakt, 2: %80 doygunlukta amonyum sülfat, 3: Diyaliz, 4: Ultrafiltrasyon. B. Zimogram analizi 1: Ham ekstrakt, 2: %80 doygunlukta amonyum sülfat, 3: Diyaliz, 4: Ultrafiltrasyon.

BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada FEN-BAP-A-140316-52 no'lu proje kapsamında *Ulva lactuca* alg kompost örneklerinden izole edilen ve yüksek proteaz aktivitesi gösteren izolatlardan biri olan *Streptomyces* sp. BSU-1 izolatı kullanılmıştır. *Streptomyces* sp. BSU-1 izolatının ürettiği enzimin karakterizasyonu için; sıcaklık ve pH değerlerinin saptanması, sıcaklık stabilite ve pH stabilitelerinin belirlenmesi, çeşitli metal iyonları, organik çözücü, deterjan, denatüran ve oksidanların enzim aktivitesine etkisi araştırılmıştır.

Çalışmada *Streptomyces* sp. BSU-1 izolatının ürettiği enzimin karakterizasyonu için önemli bir kriter olan sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Bunun için 10-120 °C arasındaki sıcaklık değerleri kullanılmıştır. Genel olarak BSU-I proteazı 50-70 °C sıcaklık aralığında aktivite göstermiştir. Enzimin optimum sıcaklık aktivitesi 60 °C'de gerçekleşmiştir. Enzimin sıcaklık stabilitesi ham enzim solüsyonunun farklı sıcaklıklarda tutulması ve ardından aktivitenin ölçülmesiyle gerçekleştirilmiştir. Bunun için ham enzim 50, 60 ve 70 °C'de farklı inkübasyon sürelerinde tutulmuştur, daha sonra kontrole karşı kalan aktivite değerlendirilmiştir. İzolatın 50-60 °C sıcaklıklarında 2 saat sonunda aktivitenin %70'in üzerinde korunduğu görülmüştür. İzolatın 70 °C'de 2 saat sonunda yaklaşık %60 aktivitesini kaybettiği görülmüştür. Literatürde de enzimlerin sıcaklıkla ilgili birçok çalışması bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada *Streptomyces* sp.'den izole edilen bir enzimin yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık aralığı 55-70 °C olarak ifade edilmiştir (De Azeredo ve ark., 2004). Başka bir çalışmada *Streptomyces clavuligerus* suşu Mit-1 proteazın optimum sıcaklığını 70 °C olarak belirtmişlerdir. *Streptomyces clavuligerus* Mit-1 suşu proteazının 60 dakikada, 50 °C'de kararlı olduğu görülmüş fakat aynı sürede 60 °C'de %50 oranında aktivitesini kaybettiği görülmüştür (Thumar ve Singh, 2007). Sellami-Kamoun ve arkadaşlarının 2008

yılında *Bacillus licheniformis* NH1 proteazı ile ilgili yaptığı çalışmada aktif olarak çalıştığı sıcaklık değerini 50-75 °C ve optimum sıcaklığı ise 65-75 °C olarak rapor etmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada ise *B. licheniformis* NH2 suşunun proteazının en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık değeri 60 °C olarak bildirmişlerdir (Nadeem ve ark., 2007). *B. licheniformis* RP1 alkalen proteazı ile yapılan başka bir çalışmada alkalen proteazın 1 saat 60 °C’de aktivitesinin sadece %45’ini koruyabildiği rapor edilmiştir (Sellami-Kamoun ve ark., 2008). Alkalem proteaz grubunun kullanımı genel olarak deterjan endüstrisinde olduğu için, bu enzimlerin yüksek oranda termostabiliteye sahip olması beklenmektedir (Rao ve ark., 1998). Enzimlerin yüksek sıcaklığa karşı kararlı olmalarında enzimlerin primer yapısının ve molekülü stabilize eden yapılarında bulunan polisakkarit ve divalent katyonların etkisi vardır (Gençkal, 2004). Suthindhiran ve arkadaşları, 2013 yılında *Actinopolyspora* spp. VITSDK2 suşu üzerinde yaptıkları sıcaklık stabilite çalışmasında 25-80 °C arasında enzimin stabil olduğunu, en yüksek ativitenin de 60 °C’de olduğunu ifade etmişlerdir. İzmir körfezinden toplanan örneklerden elde edilen MA1-1 suşu üzerinde yapılan sıcaklık stabilite çalışmasında, optimum sıcaklığı 50 °C ve en yüksek aktiviteyi gördükleri sıcaklık değerinin 35-50 °C aralığında olduğunu rapor etmişlerdir (Hameş-Kocabaş ve Uzel, 2007). Yapılan başka bir çalışmada *S. fungidious*’e ait sıcaklık stabilite değeri 60 °C olarak belirtilmiştir (Ramesh ve ark., 2009). Bengal körfezinden izole edilen aktinomisetlerden üretilen proteaz enzimi 45 °C’de yüksek aktivite göstermiştir (Manivasagan ve ark., 2010). Yapılan başka bir çalışmada *Streptomyces* spp. türüne ait sıcaklık çalışmasında proteaz enziminin 60 °C’de en yüksek aktivite gösterdiği bulunmuştur (Ramesh ve ark., 2009). Pulicat körfezi ve 256 farklı deniz örneğinden 191 farklı deniz aktinomiseti izole edilmiştir. İzole edilen bu aktinomisetlerden 180’nin proteaz enzimi ürettiği görülmüştür. Yapılan DNA sekans analiziyle bazı türlerin *S. fungidious* olduğu belirtilmiştir. Enzim üzerine yapılan sıcaklık çalışmasında optimum aktivite sıcaklığı 40 °C olarak ifade etmişlerdir (Ramesh ve ark., 2009). Hindistan’ın Güneydoğu bölgesinden toplanan sediment örneklerinden 28 aktinomiset izole edilmiştir. Denizden izole edilen *Streptomyces* sp. D1 izolatının proteaz aktivite çalışmasında yapılan sıcaklık uygulamasında maksimum aktivite 45 °C’de görülmüştür (Mane ve Kokare, 2013).

Enzim karakterizasyonu için gerçekleştirilen çalışmalardan biri, pH'nın enzim aktivitesine olan etkisinin belirlenmesidir. Bu çalışmada enzimin 8-12 alkali pH aralığında aktivite gösterdiği ve optimum enzim aktivitesinin pH 10'da olduğu görülmüştür. Alkalen proteazların tipik olarak aktif oldukları pH 7-11 arasındadır. Ticari olarak endüstride kullanılan alkalen proteazlarının bu pH aralığında kullanıldığı bilinmektedir (Rawlings ve ark., 2007). Enzimin pH stabilitesi, ham enzim solüsyonunun farklı pH'larda (8-12) tutulması ve ardından aktivitenin ölçülmesiyle gerçekleştirilmiştir. Bunun için ham enzim oda sıcaklığında 1-2 saat ve +4 °C'de 24 saat tutulmuş, daha sonra kontrole karşı kalan aktiviteler değerlendirilmiştir. pH stabilite çalışması sonucunda enzimin geniş bir pH aralığında aktif olduğu belirlenmiştir. Enzimin pH 8-12 aralığında %80 üzerinde kararlılıkta stabilite göstermiştir. Endüstride özellikle deterjan alanında *Bacillus* suşlarının kullanımı fazladır. *Bacillus licheniformis*'den izole edilen proteaz enzimi ile ilgili yapılan karakterizasyon çalışmasında optimum pH 10 olarak belirtilmiştir (Öztürk, 2007). *Bacillus* suşlarından özellikle *Bacillus stearothermophilus*'in 9,5, *B. firmus*'un 8 ve *Bacillus* sp. (P-001A) suşunun ise 9,5 pH derecesinde maksimum aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Anwar ve Saleemuddin, 1998). Ticari olarak kullanılabilen proteazların pH aralığı 8-12'dir (Gupta ve ark., 2002). İzmir körfezinden toplanan deniz örneklerinden izole edilen aktinomiseteye ait MA1-1 suşundan izole edilen proteaz enzimi ile ilgili pH çalışmasında en yüksek aktivite pH 8-13 arasında, optimum pH 9 olarak rapor edilmiştir (Hameş-Kocabaş ve Uzel, 2007). Yapılan başka bir çalışmada *Actinopolyspora* spp. VITSDK2'ya ait optimum pH 10 olarak bildirilmiştir (Suthindhiran ve ark., 2013). Bengal körfezinden izole edilen aktinomisetten elde edilen proteaz enzimi için yapılan çalışmada pH 7 de yüksek aktivite olduğunu ifade etmişlerdir (Manivasagan ve ark., 2010). Denizden elde edilen aktinomisetlerden izole edilen proteaz enzimi için yapılan çalışmada *Streptomyces* sp. D1 izolatının proteaz enzim aktivitesine pH etkisi araştırılmıştır. pH stabilite değeri 8-10 arasında ve optimum pH 10 olarak ifade edilmiştir (Kokare ve ark., 2013). *Streptomyces roseiscleroticus* ile yapılan çalışmada yüksek derecede proteaz aktivitesi gösterdiği rapor edilmiştir. Maksimum aktivitenin sağlandığı pH 7 olarak ifade edilmiştir. Ayrıca enzim aktivitesine etkisini araştırmak için sıcaklık ve diğer çalışmalarda yapılmıştır (Vonothini ve ark., 2008). Yapılan başka bir

çalışmada *Thermoactinomyces* sp. 21E suşundan elde edilen alkalın proteazın pH 7,5-12,5 aralığında stabil olduğu rapor edilmiştir (Petrova ve ark., 2006). Çeşitli alkalofilik bakterilerden elde edilen alkalın proteazların da pH 7-12 aralığında stabil olduğu bildirilmiştir (Kanekar ve ark., 2002).

Çeşitli metal iyonlarının proteaz aktiviteleri üzerine olan etkisi araştırılmıştır. Mn^{2+} ve Cu^{+2} iyonları enzim aktivitesinde artış meydana getirmiştir. 5 mM konsantrasyonunda Hg^{+2} iyonları aktivitede yaklaşık %50 oranında azalmaya neden olmuştur. Yapılan diğer çalışmalarda da Hg^{+2} aktivitede düşüşe sebep olmuştur (Patke ve Dey, 1997; Thumar ve Singh, 2007). Mn^{+2} iyonlarının aktivitede artışa etki etmesi yapılan birçok çalışma ile benzerlik göstermektedir (Manachini ve ark., 1988; Ghorbel ve ark., 2003).

Endüstride kullanılacak olan proteaz enziminin pH ve sıcaklık değerinin yanı sıra deterjanda kullanılacak olan ağartıcılar ve sürfaktanlar gibi ajanlar ile uyumlu olması gerekmektedir (Gupta ve ark., 1999; Kumar ve Takagi, 1999; Beg ve ark., 2002). Bu nedenle çalışmada çeşitli denatüranların, oksidan ve deterjanların da enzim aktivitesi üzerinde olan etkileri araştırılmıştır. Ham enzim çeşitli konsantrasyonlardaki SDS, üre, triton-X100, tween 20, tween 80 ve H_2O_2 mevcudiyetinde bekletildikten sonra kalan aktivite ölçülmüştür. SDS %0.5 ve %1(v/v)'lik konsantrasyonlarda önemli derecede inhibisyona neden olmuştur. Farklı mikroorganizmadan elde edilen proteazlarda da SDS ile yapılan inhibisyon görülmektedir (Hadj-Ali ve ark., 2007, Selami-Kamoun ve ark., 2008). *Bacillus pumilus* N14 izolatından elde edilen proteaz enziminin SDS varlığında %65 üre ile %88 oranında aktivite kaybı olduğunu rapor etmişlerdir (Gülmüş ve Görmez, 2018). Farklı konsantrasyonlardaki üre ile yapılan çalışmada, kalan aktiviteler ölçülmüş ve 0,5M üre varlığında enzim aktivitesini hafif bir şekilde artırdığı bulunmuştur. *Geobacillus* sp. YMTC 1049'den elde edilen termostabil proteaz enzimi 4-6 M üre varlığında aktivitede artış olduğu bildirilmiştir (Zhu ve ark., 2007). Bu çalışmada tween 80 varlığında enzim aktivitesini %23 artırdığı bulunmuştur. Yapılan bir çalışmada *Bacillus licheniformis* RP1 alkalın proteazının %1 ve 5(v/v) tween 20 varlığında aktivitesinde değişiklik olmadığı, *Bacillus licheniformis* NH1 alkalın proteazı aynı konsantrasyonlarda tween 20 varlığında aktivitenin %98,5 ve %93'ünü koruyabildiği rapor edilmiştir (Hadj-Ali ve

ark., 2007). Enzimin triton X-100 varlığında kararlı olduğu aktiviteyi az miktarda arttığı bulunmuştur. Farklı çalışmalarda triton X-100 varlığında enzim aktivitesinin değişmediği görülmüştür (Hadj-Ali ve ark., 2007). H₂O₂ muamelerinde izolatın aktivitesi %1 oranında korunurken ve %5 oranında aktivitede hafif bir düşüş göstermesine rağmen, aktivite korunmuştur.

Proteaz enzimi üzerine organik çözücülerin etkisi incelenmiştir. Organik çözücülerden DMSO varlığında çok az aktivite kaybı gözlenmiştir. Diğer çözücülerde aktivite kaybı hemen hemen hiç olmamıştır. *B. pumilus* MCAS8 izolatından elde edilen proteaz enzimi organik çözücü ile muamele edildiğinde, % 5'lik DMSO ve aseton da 60 dk. inkübasyon sonrasında, enzim başlangıç aktivitesini % 50 oranında koruduğu belirtilmiştir (Jayakumar ve ark., 2012). Yapılan başka bir çalışmada *Bacillus* sp.' den izole edilen proteaz enzimiyle % 15 ve % 25'lik konsantrasyonlaraki aseton ve DMSO varlığında 15 gün boyunca kararlı oldukları ifade edilmiştir. Fakat % 50 'lik konsantrasyondaki aseton ve DMSO'nun enzim aktivitesinde azalmaya neden olduğu belirtilmiştir. Enzimin organik çözücülerle uyumlu olması, deterjan endüstrisinde kullanılabilir olduğunu göstermektedir (Deepti ve ark., 2012). *B. lehensis* 'den izole edilen proeaz enzimi % 5'lik metanol ile muamele edildiğinde aktivitenin kararlı olduğunu, % 10'luk etanol, metanol ve izopropanol de aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir (Joshi ve Satyanarayana, 2013). *B. halodurans* CAS6 izolatı ile yapılan çalışmada izole edilen proteaz enzimi % 5'lik izopropanol ile dört saat sonunda 50 °C'de kararlı olduğunu ifade etmişlerdir (Annamalai ve ark., 2013).

Proteaz enziminin kısmi saflaştırma işlemleri sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve ultrafiltrasyon işlemleri ile yapılmıştır. Güney Hindistan'da yapılan bir çalışmada deniz tuzundan bir aktinomiset türü izole edilmiştir. Yapılan gen taraması ile *Actinopolyspora* spp. VITSDK2 suşu olduğu tespit edilmiştir. Bu suştan izole edilen enzimin amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE ve selüloz kolon kromatografi yöntemiyle kısmen saflaştırma işlemi yapılmıştır. Enzim HPLC kullanılarak daha da saflaştırılarak SDS-PAGE ile molekül ağırlığı 22 kDa olarak rapor edilmiştir (Suthindhiran ve ark., 2013). Deniz ortamından elde edilen *Streptomyces* sp. D1 izolatı izole edilerek karakterize edilmiştir. İzolattan elde edilen proteaz enzimi

amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve Sephadex-G100 jel kromatografisi kullanılarak saflaştırma işlemleri yapılmıştır. Moleküler ağırlık SDS-PAGE ile belirlenerek 28 kDa olarak rapor edilmiştir (Mane ve Kokare, 2013). Genel olarak, mikrobiyal proteazların moleküler kütleleri, 15 ila 40 kDa arasında değişmektedir (Gupta ve ark., 2002; İbrahim ve ark., 2015). *Bacillus licheniformis* ile ilgili yapılan çalışmada izole edilen proteaz enziminin molekül ağırlığı 40 kDa olarak ifade edilmiştir (Gonçalves, 2017). Uttatree ve Charoenpanich 2016 yılında 32 kDa moleküler ağırlığa sahip yeni bir *Bacillus subtilis* suşu tarafından üretilen bir serin proteaz tanımlarken, 90 kDa'nın *Bacillus subtilisnatto* ve 98 kDa'nın *Stenotrophomonas maltophilia*'sından alkalın proteazlarda rapor etmişlerdir (İbrahim ve ark., 2015). *Bacillus* sp. S17110 izolatından proteaz enzimi 75 kDa molekül ağırlığına sahip olduğu ifade etmişlerdir (Jung ve ark., 2007). Bu çalışmada kısmi olarak saflaştırılmış proteazın zimogram analizi sonucu tek bir aktivite bantı elde edilmiştir. SDS-PAGE analizinde bu aktivite bantı yaklaşık 48 kDa karşılık gelmektedir. Proteazın doğal haldeki moleküler ağırlığının monomerik veya multimerik yapıda bir protein olup olmadığını tespit edilebilmesi için jel filtrasyonu gibi ilave saflaştırma yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Sonuç olarak yapılan çalışmada *Streptomyces* sp. BSU-1 izolatından elde edilen proteaz enziminin 60 °C'de, pH 10'da yüksek aktivite gösterdiği bulunmuştur. Enzimin 50-60 °C sıcaklıklarında 2 saat sonunda aktivitesini %70 üzerinde koruduğu, 70 °C'de 2 saat sonunda yaklaşık %60 aktivitesini kaybettiği görülmektedir. Enzim pH 8-12 aralığında %80 üzerinde kararlılıkta stabilite göstermiştir. Na⁺¹, Ca⁺², Zn⁺² ve Mg⁺² metal iyonlarının aktiviteyi koruduğu, Mn⁺² ve Cu⁺² iyonlarının aktiviteyi artırdığı, Hg⁺² metal iyonu ise %50 aktivite kaybına neden olmuştur. Organik çözücülerden DMSO varlığında enzim aktivitesinde diğer çözücülere göre yaklaşık %16 aktivite kaybı gözlemlendi. İzopropanol ve DMF varlığında enzim aktivitesi ortalama %96 korunmuştur. Diğer çözücülerde bir miktar artış olmuştur. Tween 80 ve Triton X-100 varlığında enzim aktivitesinde artış gözlenirken, SDS varlığında enzim aktivitesinde düşüş gözlenmiştir. H₂O₂'de ise %1 konsantrasyonunda enzim aktivitesi korunurken, %5 konsantrasyonunda enzim aktivitesinde az miktarda düşüş gözlenmiştir. Amonyum sülfat çöktürmesinde %80'likte 520,4U/ml ile en yüksek aktivite bulunmuştur. Diyaliz örneğinde aktivite

246,5 U/ml, ultrafiltrasyon da 228,1 U/ml bulunmuştur. Yapılan zimogram analizi sonucu molekül ağırlığı yaklaşık 48 kDa karşılık gelen tek bir aktivite bant tespit edilmiştir.



KAYNAKLAR

- Abd El-Nasser, N.H. 1995. Proteolytic activities by some mesophilic *Streptomyces* species. J. Agric. Sci, 20: 2913-2923.
- Aehle, W. 2007. Enzymes in Industry: Production and Applications, Germany, 109.
- Agrios, G.N. 2005. Plant pathology, Elsevier Academic Press., USA, 922.
- Ahmetoğlu, N. 2011. *Bacillus cereus* KG5'in Proteaz Enzimi Üzerine Çalışmalar. Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Aksoy, S.Ç. 2014. Denizel Sediment Örneklerinden Biyoaktif Metabolit Üretici Aktinomisetlerin Kültürel ve Moleküler Yöntemlerle Karakterizasyonu ve Biyoaktif Metabolitlerin Saflaştırılması. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- Akyol, D., Taşbakan, M.I., Taşbakan, M.S., Pullukçu, H., Ceylan, N., Yamazhan, T. 2016. Difficult diagnosis easy treatment: Actinomycosis. Flora, 21(4): 169- 175.
- Alaylı, A., Yıldırım, S., Demir, Y., Demir, N. 2004. *Euphorbia amygdaloides*'in Sütünde Proteaz Enziminin Aranması ve Karakterize Edilmesi. Ulusal Kim. Kong., Erzurum, 45.
- Annamalai, N., Rajeswari, M.V., Thavasi, R., Vijayalakshmi, S., Balasubramanian, T. 2013. Optimization, purification and characterization of novel thermostable, haloalkaline, solvent stable protease from *Bacillus halodurans* CAS6 using marine shellfish wastes: a potential additive for detergent and antioxidant synthesis. Bioprocess. Biosyst. Eng, 36(7): 873-83.
- Anwar, A., Saleemuddin, M. 1998. Alkaline proteases: a review. Bioresour. Technol, 64-175.
- Awla, F.M., Özdemir, K., Ertaş, M. 2017. Irak Erbil'den Alınan Bazı Toprak Numunelerinden *Streptomyces* Bakterilerinin İzolasyonu, Ekstrasellüler Hidrolitik Enzim Kabiliyetlerinin Belirlenmesi ve 16S rDNA Analizi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bil. Enst. Derg, 22(2): 132-138.

- Azzaz, H.H. 2009. Effect of cellulytic enzymes addition to diets on the productive performance of lactating goats. Faculty of Agriculture, Cairo University, Egypt, M.Sc. Thesis.
- Balachandran, C., Duraipandiyam, V., Ignacimuthu, S. 2012. Purification and characterization of protease enzyme from actinomycetes and its cytotoxic effect on cancer celline (A549). *Asian Pac. J. Trop. Biomed*, 2(1): 5392-5400.
- Bali, B. 2011. Karasal Ortamlardan İzole Edilen *Streptomyces* Türlerinin Sekonder Metabolit Biyosentez Genlerinin Taranması, Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Baltz, R.H. 2006. Marcel faber roundtable: is our antibiotic pipeline unproductive because of starvation, constitution or lack of inspiration. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*, 33: 507-513.
- Banerjee, V., Saani, K., Azmi, W., Soni, R. 1999. Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry additive. *Proc. Biochem*, 35: 213-219.
- Beg, Q.K., Saxena, R.K., Gupta, R. 2002. Kinetic constants determination for an alkaline protease from *Bacillus mojavensis* using response surface methodology. *Biotechnol. Bioeng*, 78: 289-295.
- Beg, Q.K., Gupta, R. 2003. Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*. *Enzyme Microb. Tech*, 32(2): 294-304.
- Bell, D. 2019. Non-Neoplastic lesions of the neck (soft tissue, bone and lymph node). *Head and Neck Pathology*.
- Benmrad, M.O., Mechri, S., Jaouadi, N.Z., Elhoul, M.B., Rekik, H., Sayadi, S., Bejar, S., Kechaou, N., Jaouadi, B. 2019. Purification and biochemical characterization of a novel thermostable protease from the oyster mushroom *Pleurotus sajor-caju* strain CTM10057 with industrial interest. *BMC Biotechnol*, 19:43.
- Benveniste, R., Davies, J. 1973. Aminoglycoside antibiotic inactivating enzymes in actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibiotic resistant bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70(8): 2276-2280.

- Bhat, M.K., Bhat, S. 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial application. *Biotechnol. Adv*, 15(3-4): 583-620.
- Bhattacharyya, B., Pal, S., Sen, S. 1998. Antibiotic production by *Streptomyces hygroscopicus* D1.5, cultural effect. *Rev. Microbiol*, 29(3): 254-257.
- Bollag, D.M., Rozycki, M.D., Edelstein, S.J. 1996. Protein methods (2ndEdt). Wiley-Liss Press, USA, 414.
- Bose, A., Chawdhary, V., Keharia, H., Subramanian, R.B. 2014. Production and characterization of a solvent-tolerant protease from a novel marine isolate *Bacillus tequilensis* P15. *Ann. Microbiol*, 64(1): 343-354.
- Bouacem, K., Bouanane-Darenfed, A., Laribi-Habchi, H., Elhoul, M.B., Hmida-Sayari, A., Bejar, S., Hacene, H., Ollivier, B., Fardeau, M.L., Jaouadi, B. 2015. Biochemical characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from *Caldicoprobacter guelmensis*. *Int. J. Biol. Macromol*, 81: 299-307.
- Böckle, B., Galunsky, B., Müller, R. 1995. Characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DSM 40530. *Appl. Environ. Microbiol*, 61(10): 3705-10.
- Bredholdt, H., Galatenko, O.A., Engelhardt, K., Fjaervik, E., Terekhova, L.P., Zotchev, S.B. 2007. Rare actinomycete bacteria from the shallow water sediments of the Trondheim fjord, Norway; isolation diversity and biological activity. *Environ. Microbiol*, 9(11): 2756-2764.
- Bull, A.T., Stach, J.E.M. 2007. Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. *Trends. Microbiol*, 15(11): 491-499.
- Busti, E., Monciardini, P., Cavetti, L., Bamonte, R., Lazzarini, A., Sosio, M., Donadio, S. 2006. Antibiotic-producing ability by representatives of newly discovered lineage of actinomycetes. *Microbiol*, 152: 675-683.
- Cannell, R.J.P. 1998. How to approach the isolation of natural product. *Humana Press*, 25: 1-51.
- Chaudhary, H.S., Soni, B., Shrivastava, A.R., Shrivastava, S. 2013. Diversity and versatility of actinomycetes and its role in antibiotic production. *J. Appl. Pharm. Sci*, 3(8): 83-94.

- Che Man, Y.B., Suhardiyono Asbi, A.B., Azudin, M.N., Wei, L.S. 1996. Aqueous enzymatic extraction of coconut oil. *J. American Oil Chemists Society*, 73(6): 683-686.
- Çakır, N., Berктаş, M., Yaman, G., Alkış, İ., Özer, T.T. 2011. Servikal Örneklerden *Actinomyces israeli* İzolasyonu ve Antibiyotiklere Direnç Oranının İncelenmesi. *Van Tıp Derg*, 18(4): 197-200.
- Çelik, S.Y. 2018. Çiğdem (*Crocus biflorus*) Yumrularından Proteaz Enziminin Saflaştırılması ve Saflaştırılan Enzimin Kazeinin Koagülasyonunda Kullanılabilirliğinin Araştırılması. *Gıda Der. P*, 43(2): 231-239.
- Çiğdem, U. 2015. Aktinomisetlerin Biyoteknoloji, Genetik Mühendisliği ve Nanoteknolojik Kullanımı. Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, 2-3.
- Çil, E. 2011. Farklı Habitatlardan İzole Edilen Actinomadura, Micromonospora, Nocardia ve *Streptomyces* Suşlarının Moleküler Taksonomisi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Doktora Tezi.
- De Azeredo, L.A.I., Freire, D.M.G., Soares, R.M.A., Leite, S.G.F., Coelho, R.R.R. 2004. Production and partial characterization of thermophilic proteases from *Streptomyces* sp. Isolated from Brazilian cerrado soil. *Enzyme Microb. Technol*, 34: 354-358.
- Deepti, J., Imran, P., Sanjiv, K.M., Anupama, S., Sandhya, M. 2012. Purification and characterization of haloalkaline thermoactive, solvent stable and SDS-induced protease from *Bacillus* sp.: A potential additive for laundry detergents. *Bioresour. Technol*, 115: 228-36.
- Dixit, V.S., Pantolonu, A. 2001. Hydrocarbon degradation and protease production by *Nocardiopsis* sp. NCIM 5124. *Lett. Appl. Microbiol*, <http://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2000.00665.x>.
- Dorra G., Ines K., Imen B.S., Laurent C, Sana A., Olfat T., Pascal C., Thierry J., Ferid L. 2018. Purification and characterization of a novel high molecular weight alkaline protease produced by an endophytic *Bacillus halotolerans* strain CT2. *Int. J. Biol. Macromol*, 111: 342–351.

- Dougherty, W., Semler, B.L. 1993. Expression of virus encoded proteinases: functional and structural similarities with cellular enzymes. *Microbiological Reviews*, 781-822.
- Duran, K., Bozacı, E., Karahan, H.A. 2007. Protein Esaslı Mamüllerin Enzimatik Ön Terbiyesi. *Dergi park*, 187.
- Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Sclifer, K.H., Stackebrandt, E. 2006. The prokaryotes (3rd ed., vol 3). *Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes, USA*, 297-299.
- Elbanna, K., Ibrahim, I.M., Revol-Junelles, A.M. 2015. Purification and characterization of halo-alkali-thermophilic protease from *Halobacterium* sp. strain HP25 isolated from raw salt, Lake Qarun, Fayoum, Egypt. *Extremophiles*, 19(4): 763-774.
- Ellis, P.P., Bausor, S.C., Fulmer, J.M. 1961. *Streptothrix canaliculitis*. *AJO*, 52(1): 36-43.
- Embley, T.M., Stackebrandt, E. 1994. The molecular phylogeny and systematics of the Actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol*, 48, 257-289.
- Engür, S., Dikmen, M. 2015. Kanser Tedavisinde Proteozom İnhibitörlerinin Önemi. *Erciyes Üni. Fen Bil. Ent. Derg*, 31(4): 1012-2354.
- Erem, F., Certel, M. 2006. Fırın Ürünlerinde Enzim Uygulamaları. *Türkiye 9. Gıda Kong.*, Bolu, 526.
- Ersal, M. 2018. Sucul Çevreden İzole Edilen Aktinomisetlerden Biyoaktif Bileşiklerin Taranması, İzolasyonu ve Üretim Ortamının Optimizasyonu. *Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*.
- Ertunç, F., Topkaya, Ş. 2018. Bitki Patojeni Virüslerde Proteaz Tipleri ve Fonksiyonları. *Selçuk Üniv. Fen Fak. Fen Derg*, 44(2): 175-186.
- Fersht, A. 1977. *Enzyme structure and mechanism*. Freeman and Company, USA.

- Frankland-Searby, S., Bhaumik, R.S. 2012. The 26S proteasome complex: an attractive target for cancer therapy. *Biochimica. et Biophysica. Acta*, 1825: 64-76.
- Gado, H.M., Metwally, H.M., Soliman, H., Basiony, A.Z.L., El-Galil, E.R. 2007. Enzymatic treatments of bagasse by different sources of cellulose enzymes. In: the 11th World Conf. An. Nut, 10: 607-603.
- Gençkal, H. 2004. Studies on alkaline protease production from *Bacillus* sp. İzmir Yüksek Teknoloji, Yüksek Lisans Tezi.
- Gerze, A. 2003. Proteaz Enziminin *Bacillus subtilismegatherium* ve *Bacillus polymxa* Bakteri Türlerinden Kısmi Saflaştırılması ve Özelliklerinin İncelenmesi. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği, Yüksek Lisans Tezi.
- Ghanem, N.B., Sabry, S.A., El-Sherif, Z.M., El-Ela, G.A.A. 2000. Isolation and enumeration of marine actinomycetes from seawater an sediments in Alexandria. *J. G. Appl. Microbiol*, 46(3): 105-111.
- Ghorbel, B., Sellami-Kamoun, A., Nasri, M. 2003. Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. *Enzyme Microb. Technol*, 32: 513-8.
- Godfrey, T., West, S. 1996. *Industrial enzymology*. Macmillan Publishers, Inc, NY. ISBN 0-33359464-9.
- Gonçalves, S.J. 2017. Protease from *Bacillus licheniformis*; production, purification, characterization and application of the enzyme in the hydrolysis of rice and pea proteins. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP.
- Goodfellow, M., Williams, S.T. 1983. Ecology of actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol*, 37: 189-216.
- Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.J., Trujillo, M.E., Suzuki, K., Ludwig, W., Whitman, W.B. 2012. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., The Actinobacteria, 2083.
- Gorajana, A., Kurada, B.V., Peela, S., Jangam, P., Vinjamuri, S., Poluri, E., Zeeck, A. 2005. 1-Hydroxy-1-norresistomycin, a new cytotoxic compound from a marine actinomycete, *Streptomyces chibaensis* AUBN1/7. *J. Antibiot*, Tokyo, 58(8): 526-9.

- Gökmen, A.A., Demirci, M. 2016. Mikoloji- Bölüm İki Aktinomisetler. Microbiology and Immunology On-line.
- Grein, A., Mayers, S.P. 1958. Growth characteristics and antibiotic production of actinomycetes isolated from littoral sediments and suspended in sea water. J. Bacteriol, 76: 457-463.
- Gulve, R.M., Desmukh, A.M. 2011. Enzymatic activity of actinomycetes isolated from marine sediments. Rec. Res. Sci. Technol, 3(5): 2076-5061.
- Gulve, R.M., Deshmukh, A.M. 2012. Antimicrobial activity of the marine Actinomycetes. Inter. Multidiscip. Resp. J, 2(3): 16-22.
- Guo, X., Li, X., Ruan, J., Zhang, L., Gao, Y., Huang, Y. 2015. *Streptomyces rubrisoli* sp. nov., neutrotolerant acidophilic actinomycetes isolated from red soil. Chinese Academy of Sciences, Int. J. Syst. Evol. Microbiol, 65(9): 3103-8.
- Gupta, R., Gupta, K., Saxena, R.K., Khan, S. 1999. Bleach-stable, alkaline proteases from *Bacillus* sp. Biotechnology Letters, 135-138.
- Gupta, R., Beg, Q.K., Lorenz, P. 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. Appl. Microbiol. Biotechnol, 59(1): 15–32.
- Gülmüş, E.Ö., Görmez, A. 2018. *Bacillus pumilus* NK14 izolatının Proteaz Enzim Aktivitenin Belirlenmesi ve Enzimin Leke Çıkarıcı Etkisinin Tespiti. Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Erzurum Fen Fakültesi, Erzurum Teknik Üniversitesi, IJMST, 2(2): 7-12.
- Güngör, A.A., Öztürk, S.B., Demir, Y., Demir, N. 2006. Yabani Çuha Çiçeği (*Primulaveris*)’den Proteaz Enziminin Saflaştırılması ve Besin Üretimindeki Kullanımlarının Araştırılması. Ulusal Kim. Kong., Erciyes Üniversitesi, Kayseri, 454.
- Hadj-Ali, N.E., Agrebi, R., Ghorbel-Frikha, B., Sellami-Kamoun, A., Kanoun, S., Nasrı, M. 2007. Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline serine protease from a newly isolated *Bacillus licheniformis* NH1. Enzyme Microb. Technol, 40: 515-523.

- Hameş-Kocabaş, E.E., Uzel, A. 2007. Alkaline protease production by an actinomycete MA1-1 isolated from marine sediments. *Ann. Microbiol*, 57(1): 71-75.
- Hasegawa, T., Takizawa, M., Tanida, S. 1983. A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes. *The J. Gene. Appl. Microbiol*, 29(4): 319-322.
- Hayakawa, M., Nonomura, H. 1987. Humic acid vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J. Ferment. Tech*, 65(5): 501-509.
- Helmke, E., Weyland H. 1984. *Rhodococcus marinonascens* sp. nov., an actinomycete from the sea. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 34: 127-138.
- Hong, K., Gao, A., Xie, Q.Y., Gao, H., Zhuang L., Lin, H.P., Yu, H.P., Li, J., Yao, X.S., Goodfellow, M., Ruan, J.S. 2009. Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China. *Mar. Drugs*, 7(1): 24-44.
- Hopwood, D.A. 2006. Soil to genomics: the *Streptomyces* chromosome. *Annu. Rev. Genet*, 40: 1-23.
- Huang, L.H. 1980. *Actinomadura macra* sp. nov. the producer of antibiotics CP. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 30: 565-568.
- Huet, H., Gal-On Meir, E.A., Lecoq, H., Raccach, B. 1994. Mutation in the helper component protease gene of zucchini yellow mosaic virus affect its ability to mediate aphid transmissibility. *J. Gene. Virol*, 75: 1407-1414.
- Imada, C., Okami, Y. 1995. Characteristics of marine actinomycete isolated from a deep-sea sediment and production of β -glucosidase inhibitor. *J. Mar. Biotechnol*, 2: 109-113.
- İbrahim, A.S., Al-Salamah, A.A., El-Badawi, Y.B., El-Tayeb, M.A., Antranikian, G. 2015. Detergent, solvent and salt compatible thermoactive alkaline serine protease from halotolerant alkaliphilic *Bacillus* sp. NPST-AK15: purification and characterization. *Extremophiles*, 19(5): 961-971.
- Jayakumar, R., Shanmugam, J., Balumuri, A., Sundaram, S. 2012. Characterization of thermostable serine alkaline protease from an alkaliphilic strain *Bacillus pumilus* MCAS8 and its applications. *Appl. Biochem. Biotechnol*, 168: 1849-1866.

- Jeffrey, L.S.H. 2008. Isolation, characterization and identification of actinomycetes from agriculture soils at Semongok, Sarawak. *Afr. J. Biotechnol*, 7(20): 3700-3705.
- Jensen, P.R., Gontang, E., Mafnas, C., Mincer, T.J., Fenical, W. 2005a. Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pasific Ocean sediments. *Environ. Microbiol*, 7(7): 1039-1048.
- Jensen, P.R., Mincer, T.J., Williams, P.G., Fenical, W. 2005b. Marine actinomycete diversity and natural product discovery. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 87(1): 43-8.
- Joo, H.S., Chang, C.S. 2004. Oxidant and sds-stable alkaline protease from a halo-tolerant *Bacillus clausii* 1-52: enhanced production and simple purification. *J. Appl. Microbiol.*, <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02464.x>.
- Joshi, S., Satyanarayana, T. 2013. Characteristics and applications of a recombinant alkaline serine protease from a novel bacterium *Bacillus lehensis*. *Bioresour. Technol*, 131: 76-85.
- Jung, S.C., Paik, H., Kim, M.S., Baik, K.S., Lee, W., Seong, C.N., Choi, S.K. 2007. InhA like protease secreted by *Bacillus* sp. S17110 inhabited in turban shell. *J. Microbiol*, 45: 402-408.
- Kalish, H.M. 1988. Microbial enzymes. *Advanced Biochemical in Engineering, Biotechnology*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 36: 3-61.
- Kanekar, P.P., Nilegaonkar, S.S., Sarnaik, S.S., Kelkar, A.S. 2002. Optimization of protease activity of alkaliphilic bacteria isolated. *Bioresour. Technol*, 85: 87-93.
- Kar, S., Ray, R.C. 2008. Statistical optimization of alpha amylase production by *Streptomyces erumpens* MTCC 7317 cells in calcium alginate beads using response surface methodology. *Polish J. Microbiol*, 57: 49-57.
- Karaboyun, M. 2018. Kahramanmaraş İlinin Belirli Bölgelerinden Elde Edilen *Streptomyces* İzolatlarının Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Karthik, L., Kumar, G., Rao, K.V.B. 2010. Mutational effects on the protease producing marine actinomycetes isolated from *Scylla serrata*. *Pharmacologyonline*, 1: 221-227.

- Kıran, E.Ö., Çömlekçioğlu, U., Dostbil, N. 2006. Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Endüstrideki Kullanım Alanları, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen ve Müh. Derg, 9(1): 12-18.
- Kumar, C.G., Takagi, H. 1999. Microbial alkaline proteases from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnol. Adv*, 17(7): 561-94.
- Kutzner, H.J. 1981. The family *Streptomycetaceae*, the prokaryotes: a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria. Springer Verlag, Berlin, 2028-2090.
- Lacey, J. 1997. Actinomycetes in composts. *Ann. Agric. Environ. Med*, 4: 113-121.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature Inter. J. Sci*, 227: 680-685.
- Lam, K.S. 2006. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Curr. Opin. Microbiol*, 9(3): 245-51.
- Lechevalier, H.A. and Lechevalier, M.P. 1965. Classification des actinomycetes aerobes bosce sur leur morphologie et leur composition chimique, *Ann. Inst. Pasteur*, 108: 662-673.
- Leetanasaksakul, K., Thamchaipenet, A. 2018. Potential anti-biofilm producing marine actinomycetes isolated from sea sediments in Thailand. *Agriculture and Natural Resources*, 228-233.
- Liu, X., Ashforth, E., Ren, B., Song, F., Dai, H., Liu, M., Wang, J., Xie, Q., Zhang, L. 2010. Bioprospecting microbial natural product libraries from the marine environment for drug discovery. *J. Antibiot*, 63(8): 415-22.
- Maldonado, L.A., Stach, J.E.M., Pathom, W., Ward., A.C., Bull, A.T., Goodfellow, M. 2005. Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. *Antonie van Leeuwenhoek*, 87(1): 11-18.
- Manachini, P.L., Fortina, M.G., Parini, C. 1988. Thermostable alkaline protease produced by *Bacillus thermoruber* a new species of *Bacillus*. *Appl. Microbiol*, 28: 409-13.
- Mane, M.N., Kokare, K.M.C. 2013. Purification, characterization and applications of thermostable alkaline protease from marine *Streptomyces* sp. D1. *Semantic Scholar*, 889-890.

- Manivasagan, P., Gnanam, S., Sivakumar, K., Thangaradjou, T., Vijayalakshmi, S., Balasubramanian, T. 2010. Isolation identification and characterization of multiple enzyme producing actinobacteria from sediment samples of Kodyakarai coast, the Bay of Bengal. *Afr. J. Microbiol. Res*, 4(14): 1550-1559.
- Mei, S.Y. 2015. Isolation and characterization of metal tolerant actinomycetes from a Karstic Cave in Malaysia. University of Malaya, Masters thesis.
- Meiji, A., Worsley, S.F., Hutchings, M.I., Wezel, G.P. 2017. Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. *FEMS Microbiol. Rev*, 41(3): 392-416.
- Moorman, M., Schlochtermeyer, A., Schrempf, H. 1993. Biochemical characterization of a protease involved in the processing of a *Streptomyces reticuli* cellulose (Avicellase). *Appl. Environ. Microbiol*, 59: 1573-1578.
- Murad, H.A., Azzaz, H.H. 2010. Cellulase and dairy animal feeding. *Biotechnology*, 238-256.
- Nadeem, M., Qazi, J.I., Baig, S.J., Syed, Q.A. 2007. Studies on commercially important alkaline protease from *Bacillus licheniformis* N-2 isolated from decaying organic soil. *Turk J. Biochem*, 32: 171-177.
- Nascimento, W.C.A., Martins, M.L.L. 2004. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian J. Microbiol*, 35: 91-96.
- Nelson, D.L., Cox, M.M. 2005. Principles of biochemistry. Fourth edition, W.H. Freeman and company, New York, 192.
- Nilegaonkar, S.S., Zambare, V.P., Kanekar, P.P., Dhakephalkar, P.K., Sarnaik, S.S. 2007. Production and partial characterization of dehairing protease from *Bacillus cereus* MCMB-326. *Biores. Technol*, 98: 1238-1245.
- Ningthoujam, D.S., Kshetri, P., Sanasam, S., Nimaichand, S. 2009. Screening identification of best producers and optimization of extracellular proteases from moderately halophilic alkali thermotolerant indigenous actinomycetes. *World Appl. Sci. J*, 7(7): 907-916.
- Nomoto, M., Narahashi Y. 1959. A proteolytic enzyme of *Streptomyces griseus*: I. purification of a protease of *Streptomyces griseus*. *J. Bio*, 46(5): 653-667.

- Nduvimana, J., Guenet, L., Dorval, I., Blayau, M., Lee Gal, J.Y., Le Treut, A. 1995. Proteases. *Ann. Bio. Clin.*, 53: 251-264.
- Oskay, M., Tamer, A. 2009. *Streptomyces* Kökenli Antibiyotiklerin Dünü Bugünü ve Yarını. *J. New World Sci. Academy*, 4: 48-60.
- Öner, M. 1989. *Actinomycetes* (Selman A. Waksman 1967'den çeviri). Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi Kitaplar Serisi, No:89. Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, İzmir, 328.
- Özcan, F. 2015. Lipaz ve Proteaz Enzimleri Katkılı Yemlerin Cipura (*sparus aurata*, Linnaeus, 1758)' ların Gelişme Performansı, Vücut Kimyasal Kompozisyonu ve Sindirim Enzimlerine Etkisi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı, Doktora Tezi.
- Özcan, K. 2012. Türkiye'de ki Bazı Denizel Sedimentlerin Prokaryotik Çeşitliliğinin Metagenomik Analizle Belirlenmesi ve Denizel Aktinomisetlerin Antimikrobiyal Bileşiklerin İzolasyonu. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- Özcan, K., Çorbacı, C. 2017. *Streptomyces sp.* K22 ve K30 Suşlarının Lipaz ve Proteaz Enzim Üretimi. *Karadeniz Fen Bil. Derg.*, 7(2): 128-135.
- Özden, S. 2014. *Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'den Proteaz Enziminin Saflaştırılması, Aktivitesinin Tayini ve Karakterizasyonu. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya, Ankara, Yüksek Lisans Tezi.
- Öztürk, S. 2007. Ülkemizden İzole Edilen *Bacillus licheniformis* BA17'den Elde Edilen Alkalen Proteaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Palaniyandi, S.A., Yang, S.H., Zhang, L., Suh, J.W. 2013. Effects of actinobacteria on plant disease suppression and growth promotion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97(22): 9621-36.
- Pant, G., Parakash, A., Pavani, J.V.P., Bera, S., Deviram, G.V.N.S., Kumar, A. 2015. Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. *Journal of Taibah University for Science*, 50-55.
- Parlak, B., Güngör, A.A., Demir, Y., Demir, N. 2008. Anadolu Orkidesi (*Orchisanatolica*) Çiçeklerinden Proteaz Enziminin Saflaştırılması ve Peynir

- Üretimindeki Kullanılabilirliğinin Araştırılması, Türkiye 10. Gıda Kong., Erzurum, 697-700.
- Pathak, A.P., Deshmukh, K.B. 2012. Alkaline protease production, extraction and characterization from alkaliphilic *Bacillus licheniformis* KBDL4: A lonar soda lake isolate. Indian J. Exp. Biol, 50(8): 569-76.
- Patke, D., Dey, S. 1997. Proteolytic activity from a thermophilic *Streptomyces megasporae* strain SDP4. Lett. Appl. Microbiol, 26: 171-4.
- Pawar, R., Zambare, V., Barve, S., Paratkar, G. 2009. Application of protease isolated from *Bacillus* sp. 158 in enzymatic cleansing of contact lenses. Biotech, 8(2): 276-280.
- Petrova, D.H., Shishkov, S.A., Vlahov, S.S. 2006. Novel thermostable serine collagenase from *Thermoactinomyces* sp. 21E: purification and some properties. J. Bas. Microbiol, <https://doi.org/10.1002/jobm.200510063>.
- Qiu, D., Ruan, J., Huang, Y. 2008. Selective isolation and rapid identification of members of the genus *Micromonospora*. Appl. Environ. Microbiol, 74(17): 5593-5597.
- Ramesh, S., Mathivanan, N. 2009. Screening of marine actinomycetes isolated from the Bay of Bengal, India for antimicrobial activity and industrial enzymes. World J. Microbiol. Biotech, 25(12): 2103-2111.
- Ramesh, S., Rajesh, M., Mathivanan, N. 2009. Characterization of a thermostable alkaline protease produced by marine *Streptomyces fungicidius* MML1644. Bioprocess. Biosyst. Eng, 32(6): 791-800.
- Raut, G.R., Chakraborty, S., Chopade, B.A., Kokare, C.R. 2013. Isolation and characterization of organic solvent stable protease from alkaliphilic marine *Saccharopolyspora* species. NISCAIR-CSIR, India, 42(1): 131-138.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V. 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. Microbiol. Mol. Biol. Rev, 67(3): 597-635.
- Reed, G. 1993. Enzymes in food processing. Wilwaukee, Winconsin.
- Sellami-Kamoun, A., Haddar, A., El-Hadj, A.N., Ghorbel-Frika, B., Kanoun, S., Nasri, M. 2008. Stability of thermostable alkaline protease from *Bacillus*

- licheniformis* RP1 in commercial solid laundry detergent formulations. *Microbiol. Res*, 163: 299-306.
- Sharma, K.M., Kumar, R., Panwar, S., Kumar, A. 2017. Microbial alkaline proteases: optimization of production parameters and their properties. *J. Genet. Eng. Biotechnol*, 15(1): 115-126.
- Singh, S., Bajaj, B.K. 2017. Potential application spectrum of microbial proteases for clean and green industrial production. *Energy Ecology and Environment*, 370-386.
- Singh, S.B., Pelaez, F. 2008. Biodiversity chemical diversity and drug discovery. *Progress in Drug Research*, 141-174.
- Sivakumar, K., Sahu, M.K., Thangaradjou, T., Kannan, L. 2007. Research on marine actinobacteria in India. *Indian J. Microbiol*, 47(3): 186-196.
- Soria-Mercado, I.E., Villarreal-Gomez, L.J., Rivas, G.G., Sanchez, N.E.A. 2012. Bioactive compounds from bacteria associated to marine algae. In R. Sammour (Ed.). *Biotechnology: molecular studies and novel applications for improved quality of human life*, Intech, Croatia, 25-44.
- Subramani, R., Aalbersberg, W. 2013. Culturable rare actinomycetes: diversity, isolation and marine natural product discovery. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 97(21): 9291-9321.
- Sudha, S., Nandhini, S.U., Mathumathi, V., Nayaki, J.M.A. 2018. Production, optimization and partial purification of protease from terrestrial bacterium *Exiguobacterium profundam* sp. MM1. Elsevier Ltd, 16: 347-352.
- Suthindhiran, K., Jayasri, M.A., Dipali, D., Prasar, A. 2013. Screening and characterization of protease producing actinomycetes from marine saltern. *J. Basic Microbiol*, 54(10): 1098-109.
- Tatineni, R., Doddapaneni, K.K., Potumarthi, R.C., Vellanki, R.N., Kandathil, M.T., Kolli, N., Mangamoori, L.N. 2008. Purification and characterization of an alkaline keratinase from *Streptomyces* sp. Elsevier, *Bioresour. Technol*, 1596-1602.
- Teicher, B.A., Tomaszewski, J.E. 2015. Proteasome inhibitors. *Biochem. Pharmacol*, 96(1): 1-9.

- Temel, M.K. 2015. Sitotoksik Kematerapötiklerin Yirminci Yüzyıldaki Gelişimi. Türk Onk. Derg, 30(2): 96-108.
- Thumar, J., Singh, S.P. 2007. Two-step purification of a highly thermostable alkaline protease from salt-tolerant alkaliphilic *Streptomyces clavuligerus* strain mit-1. J. Chrom B, 854: 198-203.
- Tomita, K., Nishio, M., Saitoh, K., Yamamoto, H., Hoshino, Y., Ohkuma, Y., Konishi, Y., Miyaki, T., Oki, T. 1990. Paradicimins A, B and C: new antifungal antibiotics. J. Antibiotics, 43: 755-762.
- Tsujibo, H., Miyamoto, K., Hasegawa, T., Inamori, Y. 1990. Purification and characterization of two types of alkaline serine proteases produced by an alkalophilic actinomycete. J. Appl. Bacteriol, 69(4): 520-529.
- Udwarý, D.W., Zeigler, L., Asolkar, R.N., Singan, V., Lapidus, A., Fenical, W., Jensen, P.R., Moore, B.S. 2007. Genoma sequencing reveals complex secondary metabolome in the marine actinomycete *Salinispora tropica*. P. Natl. Aca. Sci. USA, 104(25): 10376-81.
- Umezawa, H., Aoyagi, T., Okura, A., Morishima, H., Takeuchi, T., Okami, Y. 1973. Elastatinal, a new elastase inhibitor produced by actinomycetes. The J. Antibiotics, 26(12): 787-789.
- Uttatree, S., Charoenpanich, J. 2016. Isolation and characterization of a broad pH and temperature active, solvent and surfactant stable protease from a new strain of *Bacillus subtilis*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 8:32-38.
- Uzel, A., Hameş-Kocabaş, E.E., Bedir, E. 2011. Prevalence of *Thermoactinomyces thatpophilus* and *T.sacchari* strains with biotechnological potential at hot springs and soil from West Anatolia in Turkey. Turk J. Biol, 195-202.
- Venugopal, M., Saramma, A.V. 2006. Characterization of alkaline protease from *Vibrio fluvialis* strain VM10 isolated from a mangrove sediment sample and its application as a laundry detergent additive. Process. Biochem, 41(6): 1239-1243.

- Vonothini, G., Murugan, M., Sivakumar, K., Sudha, S. 2008. Optimization of protease production by an actinomycete strain, PS-18A from an estuarine shrimo pond. *Afr. J. Biotechnol*, 7(18): 3225-3230.
- Waksman, S.A., Henrici, A.T. 1943. The nomenclature and classification of the actinomycetes. *J. Bacteriol*, 46(4): 337-341.
- Waksman, S.A. 1950. The actinomycetes their nature, occurrence, activities and importance. Published by the Chronica Botanica Company, Waltham, Mass., U.S.A.
- Waksman, S.A. 1989. Actinomycetes (Çeviri Mehmet Öner), Fen Fakültesi Kitaplar Serisi, No:89, Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, İzmir, Ege Üniversitesi 328.
- Wietzorrek, A., Bibb, M. 1997. A novel family of proteins that regulates antibiotic production in *Streptomyces* appears to contain an OmpR-like DNA-binding fold. *Mol. Microbiol*, 25(6): 1181-1184.
- Williams, S., Goodfellow, M., Alderson, G., Wellington, E., Sneath, P., Sackin, M. 1983. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J. Gen. Microbiol*, 129(6): 1743-813.
- Yang, N., Song, F. 2018. Bioprospecting of novel and bioactive compounds from marine actinomycetes isolated from South China sea sediments. *Curr. Microbiol*, 75(2): 142-149.
- Yıldırım, V. 2014. *Aeribacillus pallidus* C10'dan Alkalin Proteaz Enziminin Saflaştırılması. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Erzurum, Yüksek Lisans Tezi.
- Yılmaz, B. 2014. *Bacillus licheniformis* A10'dan Alkalin Proteaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi .
- Yücel, S. 2007. Mağaralardan İzole Edilen Aktinomiset İzolatlarının Antimikrobiyal Aktiviteleri Üzerine Çalışmalar. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Zeigler, D.R. 2001. *The genus Geobacillus*. *BGSC*, 3(7): 1-25.
- Zhang, B., Sun, Z.W., Jiang, D.D., Niu, T.G. 2009. Isolation and purification of alkaline keratinase from *Bacillus* sp. 50-3. *African J. Biotechnol*, 8(11): 2598-2603.

- Zhu, W., Cha, D., Cheng, G., Peng, Q. 2007. Purification and characterization of a thermostable protease from a newly isolated *Geobacillus* sp. YMTC 1049. *Enzyme Microb. Tech*, 40(6): 1592-1597.
- Zobell, C.E. 1946. *Marine microbiology: a monograph on hydrobacteriology*. *Chronica Botanica Co*, Waltham, USA.



ÖZGEÇMİŞ

Serap ERTOP, 1991 yılında Trabzon'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Trabzon Zafer İlköğretim Okulu'nda, 2005 yılında tamamladı. 2009 yılında Trabzon Cumhuriyet Anadolu Lisesi'den mezun oldu. 2010 yılında Giresun Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimine başladı. 2013 yılında Erasmus program kapsamında 5 ay süreyle University of Latvia'da eğitim aldı. 2015 yılında Giresun Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı. 2017 yılında Erasmus Staj Hareketliliği program kapsamında University of Gdansk'da 3 ay staj eğitimine katıldı.