



T.C.

**GİRESUN ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

***BACILLUS MEGATERIUM* T50 İZOLATINDAN İZOLE EDİLEN PROTEAZ  
ENZİMİNİN KARAKTERİZASYONU**

**REYHAN ASAR**

**KASIM 2016**

**GİRESUN**

T.C.

GİRESUN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

*BACILLUS MEGATERIUM* T50 İZOLATINDAN İZOLE EDİLEN PROTEAZ  
ENZİMİNİN KARAKTERİZASYONU

REYHAN ASAR

KASIM 2016

GİRESUN

Fen Bilimleri Enstitü Müdürünün onayı.

.... / .... / 2016

Prof. Dr. M. Serkan SOYLU

Müdür

Bu tezin yüksek lisans tezi olarak Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. İhsan AKYURT

Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumuzu ve yüksek lisans tezi olarak bütün gerekliliklerini yerine getirildiğini onaylarız.

Doç. Dr. Hatice KATI

Danışman

JÜRİ ÜYELERİ

Doç. Dr. Hatice KATI

Doç. Dr. Cengiz MUTLU

Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU

## ÖZET

### *BACILLUS MEGATERIUM* T50 İZOLATINDAN İZOLE EDİLEN PROTEAZ ENZİMİNİN KARAKTERİZASYONU

ASAR, Reyhan

Giresun Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Hatice KATI

Kasım 2016, 48 Sayfa

Son yıllarda, endüstriyel uygulamalarda mikrobiyal kaynaklı enzimlerin kullanımı artmıştır. Mikrobiyal kaynaklar içinde *Bacillus* cinsi bakterilerin birçok enzimin kaynağını oluşturması bu bakterilere olan ilgiyi artırmıştır.

Bu çalışmada *Bacillus megaterium* T50 izolatından izole edilen proteaz enzimi karakterize edilmiştir. Proteaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın, pH'nın, bazı organik çözücülerin ve deterjanların etkisi araştırılmıştır. Molekül ağırlığı ise SDS-PAGE ile belirlenmiştir.

Proteaz aktivitesi en yüksek yağsız süt tozu besiyerinde tespit edilmiştir. Enzimin zamana bağlı en yüksek aktivite üretimi 72. saatte bulunmuştur. Enzimin maksimum aktivitesi pH 8 ve 30 °C'de belirlenmiştir. Organik çözücülerden hekzan varlığında yüksek aktivite gözlenmiş; metanol, asetonitril, izopropanol, etil asetat ve butan-1-ol varlığında aktivitede azalmalar gözlenmiştir. Enzim aktivitesini NH<sub>4</sub>Cl, MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> arttırırken CuCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, CdCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub> ve NiCl<sub>2</sub>'nin azalttığı görülmüştür. SDS-PAGE analizi sonuçları üç proteaz enziminin yaklaşık 20, 80 ve 225 kDa molekül ağırlıklarına sahip olduğunu gösterdi.

**Anahtar Kelimeler:** Enzim, *Bacillus*, Proteaz, Yağsız Süt Tozu

## ABSTRACT

### CHARACTERIZATION OF PROTEASE ENZYME ISOLATED FROM *BACILLUS MEGATERIUM* T50 ISOLATE

ASAR, Reyhan

Giresun University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, Master Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Hatice KATI

November 2016, 48 Pages

In recent years, it is increased to use the microbial enzymes for industrial applications. *Bacillus* bacteria being the source of many enzymes in microbial sources have increased the interest in these bacteria.

In this study, protease enzyme isolated form *Bacillus megaterium* T50 isolate is characterized. The effects of temperature, pH, some organic solvents and detergents on protease enzyme activity were investigated. Its molecular weight was determined by SDS-PAGE.

Protease activity is detected the highest in skimmed milk powder medium. The highest activity production as depend on the time, it is found at 72 nd hours. Maximum activity of enzyme is determined at pH 8 and 30 °C. Enzyme activities are observed high activity in the presence of hexane. Enzyme activity decreasedin the presence of isopropanol, ethyl acetate, methanol, acetonitrile and butan-1-ol. While NH<sub>4</sub>Cl, MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> increased the enzyme activity, CuCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, CdCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, and NiCl<sub>2</sub> decreased. SDS-PAGE analysis results showed that there were three proteases having molecular weights about 20 kDa, 80 kDa, and 225 kDa.

**Key Words:** Enzyme, *Bacillus*, Protease, Skimmed Milk Powder

## TEŞEKKÜR

Tez çalıőmamın her aőamasında bana yardımcı olan, her tŸrlŸ yardımını ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve deneyimleriyle yol gŸsteren danışman hocam Doç. Dr. Hatice KATI'ya sonsuz teőekkŸrlerimi sunarım.

YŸksek lisans eğitimim boyunca desteklerini esirgemeyen Doç. Dr. Cengiz MUTLU'ya ve BŸlŸm Başkanı Sayın Prof. Dr. İhsan AKYURT'a çok teőekkŸr ederim.

Ayrıca Ÿęrenim hayatım boyunca maddi manevi desteğini esirgemeyen aileme ve arkadaşlarıma iten dileklerle teőekkŸr ederim.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
SİMGELER DİZİNİ.....	VIII
KISALTMALAR DİZİNİ.....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
1.1. <i>Bacillus</i> Cinsi.....	1
1.2. Enzimler ve Genel Özellikleri.....	2
1.3. Salgılanma Şekline Göre Enzimler.....	4
1.3.1. İntraselüler Enzimler.....	4
1.3.2. Ekstraselüler Enzimler.....	4
1.4. Enzimlerin Sınıflandırılması.....	4
1.5. Enzimlerin Kullanım Alanları.....	5
1.6. Proteazlar.....	5
1.6.1. Proteazların Sınıflandırılması.....	6
1.6.1.1. Ekzopeptidazlar.....	7
1.6.1.1.1. Aminopeptidazlar.....	7
1.6.1.1.2. Karboksipeptidazlar.....	8
1.6.1.2. Endopeptidazlar.....	8
1.6.1.2.1. Serin Proteazlar.....	9
1.6.1.2.2. Sistein Proteazlar.....	9
1.6.1.2.3. Aspartik Proteazlar.....	10
1.6.1.2.4. Metalloproteazlar.....	10
1.6.2. Proteaz Kaynakları.....	10
1.6.2.1. Bitkisel Kaynaklar.....	11
1.6.2.2. Hayvansal Kaynaklar.....	12
1.6.2.3. Mikrobiyal Kaynaklar.....	12

1.6.2.3.1. Bakteriyal Proteazlar .....	13
1.6.2.3.2. Fungal Proteazlar .....	14
1.6.2.3.3. Viral Proteazlar .....	14
1.6.3. Proteazların Kullanım Alanları .....	14
1.6.3.1. Deri Endüstrisi .....	15
1.6.3.2. Deterjan Endüstrisi .....	15
1.6.3.3. İlaç Endüstrisi .....	15
1.6.3.4. Tekstil Endüstrisi .....	15
1.6.3.5. Gıda Endüstrisi .....	16
1.7. Tezin Amacı.....	16
2. MATERYAL VE METOT .....	17
2.1. Çalışmada Kullanılan Bakteriler .....	17
2.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri.....	17
2.3. Çalışmada Kullanılan Bazı Kimyasallar ve Cihazlar .....	17
2.4. Bakterilerin Proteolitik Aktivitelerinin Belirlenmesi .....	18
2.5. İzolatların En Yüksek Aktivite Gösterdiği Besiyeri ve Saat Aralığının Belirlenmesi.....	19
2.6. Proteazın Karakterizasyonu.....	19
2.6.1. Optimum pH'ın Belirlenmesi.....	19
2.6.2. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi .....	19
2.6.3. pH ve Sıcaklık Stabilitelerinin Belirlenmesi .....	20
2.6.4. Metal İyonlarının Proteaz Üzerine Etkisi .....	20
2.6.5. Organik Çözücülerin Proteaz Üzerine Etkisi.....	20
2.7. Ultrafiltrasyon .....	21
2.8. Aseton, Etanol, Amonyum Sülfat Çöktürmelerinin Yapılması.....	21
2.9. SDS –PAGE ve Zymogram Analizi .....	22
3. ARAŞTIRMA BULGULARI .....	23
3.1. Bakterilerin Proteolitik Aktivitelerinin Belirlenmesi .....	23
3.2. İzolatların Proteaz Aktivitesi.....	24
3.3. Proteaz Enziminin Karakterizasyonu .....	24
3.3.1. Optimum pH'ın Belirlenmesi.....	24
3.3.2. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi .....	25
3.3.3. pH ve Sıcaklık Stabilitelerinin Belirlenmesi .....	26



3.3.4. Metal İyonlarının Proteaz Üzerine Etkisi .....	27
3.3.5. Organik Çözücülerin Proteaz Üzerine Etkisi.....	29
3.4. Aseton, Etanol ve Amonyum Sülfat Çöktürmesinin Yapılması.....	30
3.5. Proteazın Moleküler Ağırlığının Belirlenmesi .....	30
4. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	32
KAYNAKLAR .....	37
ÖZGEÇMİŞ .....	48



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Peptid bağlarının proteazlar tarafından hidrolizi(proteoliz) .....	6
Şekil 1.2. Ekzopeptidazların etki mekanizması .....	7
Şekil 1.3. Endopeptidazların etki mekanizması .....	9
Şekil 1.4. Proteazın biyolojik kaynaklardaki dağılımı .....	10
Şekil 1.5. Bitkilerden elde edilen proteazların dağılımı.....	10
Şekil 1.6. Hayvansal kaynaklı proteazların dağılımı .....	12
Şekil 1.7. Mikrobiyal kaynaklı proteazların dağılımı .....	13
Şekil 1.8. Proteazların endüstrideki kullanım yüzdeleri .....	14
Şekil 3.1. T50 numaralı izolatın kazein ve yağsız süt tozu besiyerlerindeki şeffaf zon oluşumları.....	23
Şekil 3.2. T28 numaralı izolatın kazein ve yağsız süt tozu besiyerlerindeki şeffaf zon oluşumları.....	23
Şekil 3.3. T45 numaralı izolatın kazein ve yağsız süt tozu besiyerlerindeki şeffaf zon oluşumları.....	24
Şekil 3.4. Optimum pH'ın belirlenmesi.....	25
Şekil 3.5. Optimum sıcaklığın belirlenmesi.....	26
Şekil 3.6. pH 8 tamponuyla pH stabilite deney sonuçları .....	27
Şekil 3.7. 30 °C'de sıcaklık stabilite deney sonuçları .....	27
Şekil 3.8. Metal iyonlarının proteaz enzimi üzerine etkisi (20 dk bekleme) .....	28
Şekil 3.9. Metal iyonlarının proteaz enzimi üzerine etkisi (1 saat bekleme) .....	29
Şekil 3.10. Organik çözücülerin proteaz enzimi üzerine etkisi.....	30
Şekil 3.11. <i>Bacillus megaterium</i> T50 izolatına ait proteazın SDS-PAGE profili .....	31
Şekil 3.12. <i>Bacillus megaterium</i> T50 izolatına ait proteazın zymogram görüntüsü...31	

## SİMGELER DİZİNİ

<b>Simge</b>	<b>Açıklama</b>
µm	Mikrometre
ml	Mililitre
nm	Nanometre
dk	Dakika
gr	Gram
M	Molar
mg	Miligram
L	Litre
kDa	Kilodalton
rpm	Dakikada devir sayısı

## KISALTMALAR DİZİNİ

<b>Kısaltma</b>	<b>Açıklama</b>
H <sub>2</sub> O	Su
dH <sub>2</sub> O	Distile Su
NaCl	Sodyum Klorür
HCl	Hidroklorik Asit
Tris	Tris (Hydroxymethyl) aminomethane
TCA	Trikloroasetik asit
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi
UV	Ultraviyole
DFP	Diizopropil florofosfat
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TEMED	n,n,n,n-Tetrametiletildiamin
CaCl <sub>2</sub>	Kalsiyum Klorür
NH <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub>	Amonyum Klorid
CBBR-250	Comassie Brilliant Blue R-250
PMSF	Fenilmetilsülfonil florur

# 1.GİRİŞ

Hücrelerde gerçekleşen metabolik faaliyetlerin tümü enzim adı verilen özel katalizörlerle gerçekleştirilir. Birçok reaksiyonun spesifik enzimlerle kolaylıkla gerçekleşmesi enzimlerin canlı hücrelerden izole edilip kullanılması fikrini doğurmuştur (Gümüsel, 2002).

Günümüzde endüstriyel alanda kullanılan enzimler her ne kadar bitkisel, hayvansal ve mikroorganizma kökenli olsa da bu gruplar içerisinde en fazla pay mikroorganizma kökenli enzimlere aittir. Mikroorganizmaların tercih edilmesinin nedenleri ise yan ürün oluşturma ihtimalinin az olması, yüksek aktiviteye sahip olmaları, ekonomik olmaları, stabiliteye sahip olup yüksek oranda ve saflıkta üretilmeleridir (Wiseman, 1987; Horikoshi, 1999).

Mikroorganizma kökenli enzimler özellikle ticari hayatta birçok kullanım alanı bulurlar. Bugüne değin 2500 farklı enzim tanımlanmıştır ve bunların yaklaşık % 10'u ticari alanda kullanılır. Ticari alanda kullanılan enzimlerin 25 tanesi nişasta sanayisinde ve deterjan katkı maddesi olarak kullanılan enzim olarak ticari alandaki enzimlerin % 80'ini oluşturur (Woodley, 2000). Bu enzimler içerisinde yer alan proteaz enziminin kullanımının yaygın olması bu enzime olan ilgiyi hergün biraz daha artırmaktadır (Talan, 2015). Proteaz enziminin uygulama alanları; gıda ve besin endüstrisi, peptid sentezi, evsel ve endüstriyel atıkların giderilmesi ve deterjan endüstrisidir (Tekin, 2008).

## 1.1. *Bacillus* Cinsi

Bacillaceae familyası *Bacillus* ve *Clostridium* olmak üzere iki alt gruba ayrılır (Garrity, 2004).

*Bacillus* türü bakteriler aerob, sporlu basillerdir ve genellikle gram pozitif boyanırlar. Vejetatif formları 0,5-2,5 µm eninde, 1,2-10 µm boyunda, düz, uçları yuvarlak basillerdir. Endosporları ise silindirik, oval, yuvarlak ya da böbrek şeklinde olabilir. Türlerine göre santral, terminal ve subterminal konumda bulunurlar. Genellikle katalaz pozitif ve değişik antibiyotikler üretebilirler (Gerçeker, 1999; Madigan, 2010). *Bacillus*'ların çoğu saprofit olarak bulunur. Doğada organik materyallerde, hava, su, toprak, yeşil sebzelerde hatta bazıları normal vücut florasında bulunabilir. Bazı türler insanlarda, diğer memelilerde ve böceklerde zorunlu patojen ya da fırsatçı enfeksiyon etkenidir (Logan ve Turnbull, 1999; Berkeley ve Logan, 1997).

*Bacillus* grubu içerisinde yaklaşık 50 tür bulunmaktadır. İçlerinde en çok bilinenler; *B. thuringiensis*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. subtilis* ve *B. pumilis*'tir (Logan ve Turnbull, 1999).

## 1.2. Enzimler ve Genel Özellikleri

Enzimler, canlı organizmada meydana gelen tüm reaksiyonların hızlıca gerçekleşmesini sağlayan protein yapıda spesifik biyokatalizörlerdir. Tüm canlılarda bulunurlar ve reaksiyonları canlıya zarar vermeden hızlı bir şekilde gerçekleştirirler.

Enzimler uzun yıllardan beri insanlığa hizmet etmiş ve bira, şarap, peynir, ekmek gibi yiyecek içeceklerin yapımında bilinmeden kullanılmıştır. Günümüzde de enzim çalışmaları buna bağlı olarak giderek artmaktadır.

Enzimler ilk olarak ferment olarak adlandırılmıştır fakat 1838'de Berzelius katalizör (biyokatalizör) ifadesini kullanmış ve 1878'de Künhe enzim terimini kullanmıştır.

Enzimin etki ettiği madde substrat, açığa çıkan madde ise ürün olarak adlandırılır. Enzimin adlandırılması etki ettiği maddenin sonuna -az (ase) eki

getirilerek yapılır. Enzim substrat arasındaki ilişki anahtar-kilit modeliyle açıklanmaktadır (Aehle, 2004).

Enzimler apoenzim ve koenzim olarak iki kısımdan oluşur. Apoenzim sadece proteinden oluşan kısım, koenzim ise organik ya da inorganik kısımdır. Her iki yapıda inaktif durumdadır. Enzimlerin aktif olabilmeleri için genellikle metal iyonlarından oluşan kofaktör denilen yan grupları vardır. Enzimlerin proteinden oluşan kısmı 20 aminoasidin peptid bağlarıyla bağlanmasıyla oluşur. Protein kısmının aminoasit dizilişi primer yani birincil yapısını oluşturur. Enzimlerde modifikasyonlar sonucu R gruplarında (aminoasit yan zincirleri) kimyasal değişiklikler meydana gelir. Enzimlerin R grupları dikkate alınmaksızın uzaydaki konformasyonu sekonder yani ikincil yapısını oluşturur. Zincirdeki aminoasitleri R gruplarının da dikkate alınmasıyla uzaydaki konformasyonunun belirlenmesi tersiyer (üçüncül) yapıyı oluşturur. Alt birimler arasındaki ilişki ve toplam molekülün uzaydaki konformasyonu da kuaterner yani dördüncül yapıyı oluşturur. Bu tür enzimlerin alt birimlerinin değişmesiyle izoenzimler oluşur. İzoenzimler izozim olarak da bilinirler ve aynı reaksiyonu katalizleyip farklı birincil yapıya sahiptirler (Yıldırım ve ark., 2007).

Her enzimin aktivitesinin en yüksek seviyede olduğu bir sıcaklık ve pH değeri vardır. Bu değerlerin dışına çıkıldığında enzimin aktivitesi düşmeye başlar. Bazı maddeler ise enzimin deformasyonunu sağlayarak aktivitesini düşürebilir ya da tamamen durdurabilir. Bunlara inhibitör madde adı verilir (Aehle, 2004).

Enzimler hayvanlardan, bitkilerden ve mikrobiyal kaynaklardan elde edilirler. Hayvansal kaynaklı enzimler tavuk yumurtalarının beyazı, pankreas, geviş getirenlerin karın bölgesi gibi yenilebilen organlardan izole edilir (John, 1987). Bitkisel kaynaklı enzimler yenilebilir bitkilerden izole edilir. En önemli örneği malt amilazdır. Malt amilaz bira ve ekmek yapımında kullanılır (John, 1987). Mikrobiyal kaynaklı enzimler ise özel mikroorganizmalar tarafından üretilir. Mikroorganizma seçiminde sadece enzim üretme yetenekleri değil toksik ve patojen olmamaları da önemlidir (Demain ve Solomon, 1981).

### **1.3. Salgılanma Şekline Göre Enzimler**

#### **1.3.1. İntraselüler Enzimler**

Sitoplazmada bulunan ribozomlarda sentezlenen enzimlerdir. Substratları şeker, aminoasit gibi hücre zarından geçebilme yeteneğindeki moleküllerdir (John, 1987).

#### **1.3.2. Ekstraselüler Enzimler**

Hücre yapılarının dış kısmı ve besiyeri ile bağlantı halindeki enzimlerdir (John, 1987). İntraselüler enzimlerin aksine stabiliteyi yüksektir ve çevre koşullarına daha dayanıklıdır (Furlan ve ark., 2006).

### **1.4. Enzimlerin Sınıflandırılması**

Enzimlerin sayısının hızla artmasıyla ortaya çıkabilecek karışıklığın önlenmesi amacıyla 1956 yılında Uluslararası Enzim Komisyonu (International Commission on Enzyme) kurulmuştur. Bu komisyonda kabul edilen sistem 3 prensibi içerir:

- 1) –az (ase) eki ile biten enzim isimleri tek enzimler için kullanılmalıdır.
- 2) Enzimler katalizledikleri reaksiyona göre sınıflandırılır ve adlandırılır.
- 3) Katalizlenen reaksiyon tipine göre sınıflandırılır ve adlandırılır.

Bu sistemde enzim komisyonu tarafından belirlenen kod numaraları kullanılır ve enzimler 6 ana sınıfa ayrılır. EC ön ekiyle başlayan kod numaraları dört unsuru ifade eder:

- 1) İlk rakam altı sınıftan hangisine ait olduğunu
- 2) İkinci rakam enzimin alt sınıfını
- 3) Üçüncü rakam ikinci alt grubu
- 4) Dördüncü rakam alt-alt sınıf içindeki seri numarasını ifade eder.



İlk rakamın açıkladığı sınıflar sırasıyla şunlardır:

- 1) Oksidoredüktazlar: Yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonlarını katalizler ve iki gruba ayrılır: – Dehidrojenaz –Oksidaz
- 2) Transferazlar: Molekülden  $H^+$  dışında fonksiyonel grupların transferini katalizleyen enzimlerdir.
- 3) Hidrolazlar: Su ilavesiyle bağların parçalandığı hidroliz reaksiyonunu sentezler.
- 4) Liyazlar: Çift bağ oluşum ve bağa katılma reaksiyonlarını katalizler.
- 5) İzomerazlar: İzomerleşme reaksiyonlarını düzenleyen enzimlerdir.
- 6) Ligazlar: Fosfat kullanarak bağ oluşumunu katalizleyen enzimlerdir (Aehle, 2004).

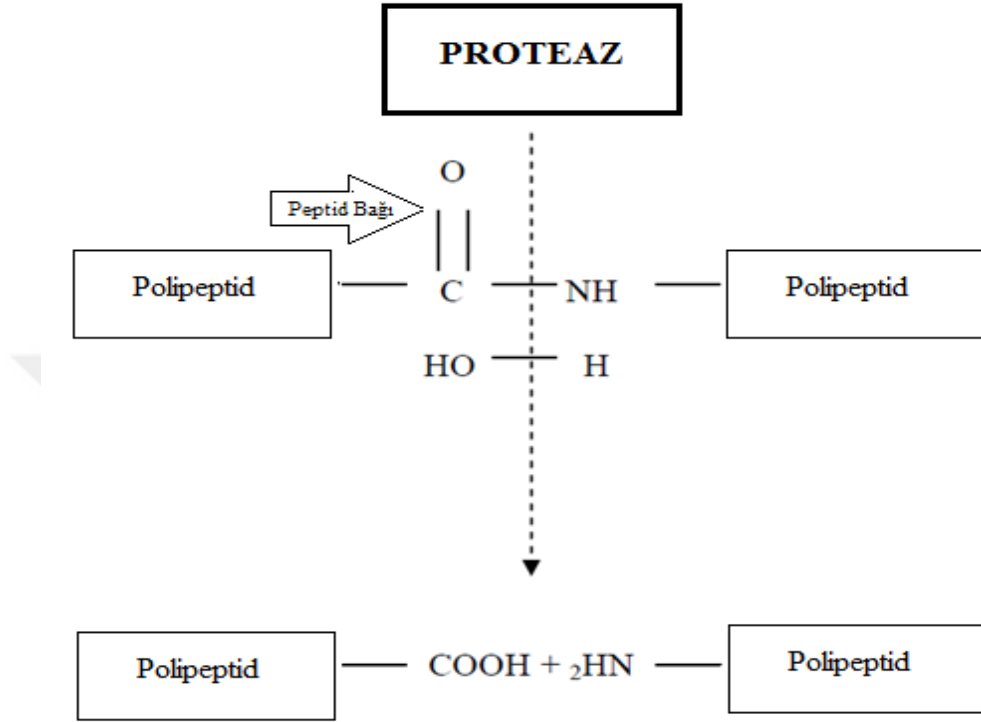
### **1.5. Enzimlerin Kullanım Alanları**

Enzimler gıda endüstrisi, deterjan ve kağıt üretimi, deri işlenmesi, tekstil endüstrisi ile tıpta teşhis ve tedavide kullanım alanlarına sahiptir (Daniels, 1992; Kirk ve ark., 2002). Endüstride kullanılan enzimlerin % 80'nini hidrolitik enzimler oluşturur. Hidrolitik enzimler içinde yer alan proteazlar % 60 ile endüstriyel açıdan en önemli enzimdir (Bhat, 2000; Öztürk, 2005). İkinci sırada yer alan amilazlar ise % 25'lik paya sahiptir (Sidhu ve ark., 1997; Rao ve ark., 2009). Ksilenzazlar kağıt hamurunun beyazlatılması için kullanılmaktadır (Palonen ve ark., 2004; Aygan, 2008). Selülazlar selülozik materyallerin şekerlere dönüştürülerek biyolojik ürün oluşturulmasında kullanılmaktadır. Bu tür enzimlerin enzim piyasasındaki paylarının artması beklenmektedir (Aygan, 2008; Cherry ve ark., 2003).

### **1.6. Proteazlar**

Proteazlar proteinlerdeki peptid bağlarının hidrolizini gerçekleştiren enzim grubudur. Büyük polipeptidleri ve proteinleri hücreler tarafından absorblanabilecek daha küçük moleküllere hidroliz eder (Salleh ve ark., 2006). Peptid bağlarının proteazlar tarafından aminoasitlere parçalanması işlemine proteoliz adı verilir (Şekil

1.1.). Proteoliz sonucu proteinler, peptid parçaları ve aminoasitler oluşur (Sarıkaya, 2006).



**Şekil 1.1.** Peptid bağlarının proteazlar tarafından katalizi (proteoliz) (Gupta, 2002).

Proteazlar enzim komisyonu (EC) numaralarına göre hidrolazlar sınıfının (Sınıf 3), peptidazlar ya da peptid hidrolazlar alt sınıfına (Alt sınıf 3.4) ait enzimlerdir. EC 3.4 başlığıyla bilinirler.

EC 3 Hidrolaz

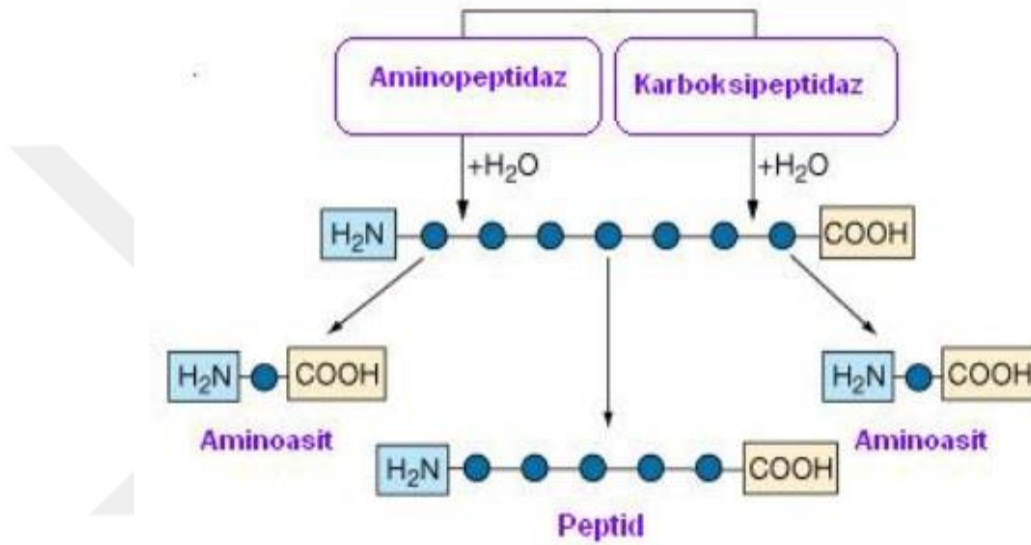
EC 3.4 Proteazlar (Gençkal, 2004)

### 1.6.1. Proteazların Sınıflandırılması

Proteazlar EC sisteminde ekzopeptidazlar (EC 3.4. 21-99) ve endopeptidazlar (EC 3.4. 11-19) olarak iki sınıfa ayrılmıştır (Rao ve ark., 1998).

### 1.6.1.1. Ekzopeptidazlar

Ekzopeptidazlar etkisini peptid zincirinin sonunda bulunan serbest amino (N) ya da karboksil (C) grubunda göstermektedir. Amino grubuna etki ederse aminopeptidaz, karboksil ucuna etki ederse karboksipeptidaz olarak isimlendirilirler (Şekil 1.2.).



Şekil 1.2. Ekzopeptidazların etki mekanizması (Silverthorn, 2004).

#### 1.6.1.1.1. Aminopeptidazlar

Peptid zincirinin serbest N- ucuna etki ederek tek bir aminoasidin, dipeptidin veya tripeptidin ayrılmasını sağlayarak sırasıyla aminopeptidazlar, dipeptidil peptidazlar, tripeptidil peptidazlar isimlerini alırlar.

Aminopeptidazlar bakteri ve fungus türlerinden sentezlenirler. *Aspergillus oryzae* tarafından üretilen aminopeptidaz hariç hücre içi enzimlerdir. Aminopeptidazların N-terminal metiyonini (Met) uzaklaştırdığı bilinmektedir (Rao ve ark., 1998).

### **1.6.1.1.2. Karboksipeptidazlar**

Peptid zincirinin C- ucuna etki ederek tek bir aminoasit ya da dipeptidin uzaklaştırılmasını sağlar. Aktif bölgelerindeki aminoaside göre 3 gruba ayrılırlar:

- 1) Serin Karboksipeptidazlar
- 2) Sistein Karboksipeptidazlar
- 3) Metallo Karboksipeptidazlar (Rao ve ark., 1998).

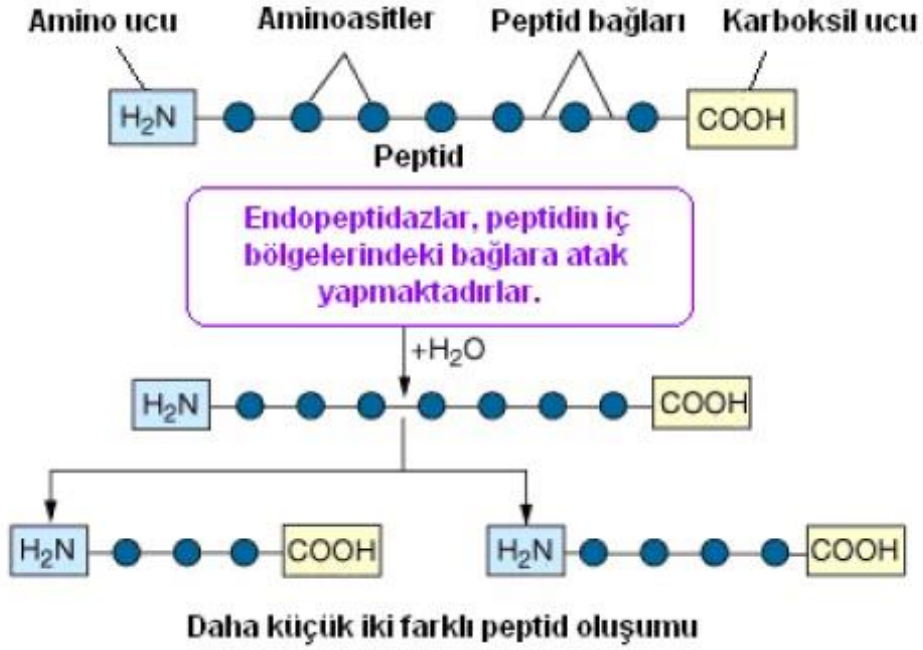
Bunların dışında tanımlanmış ancak etki mekanizmaları tam olarak açıklanmamış iki ekzopeptidaz ailesi daha vardır. Bunlar dipeptidazlar ve omegapeptidazlardır (Alpan, 2008). Dipeptidazlar dipeptidleri hidroliz ederler. Omegapeptidazlar ise N veya C terminal ucuna ihtiyaç duymazlar. Terminal uçlara yakın bölgeleri hidroliz ederler (Rao ve ark., 1998).

### **1.6.1.2. Endopeptidazlar**

Endopeptidazlar polipeptid zincirinin iç bölgesindeki peptid bağlarına etki eder (Şekil 1.3.). Aktiviteleri üzerinde serbest N ve C varlığı negatif etkiye sahiptir. 4 gruba ayrılırlar:

- 1) Serin Proteazlar
- 2) Sistein Proteazlar
- 3) Aspartik Proteazlar
- 4) Metalloproteazlar

Bunların haricinde katalitik aktivitesi bilinmeyen endopeptidaz ailesi de bulunmaktadır.



Şekil 1.3. Endopeptidazların etki mekanizması (Silverthorn, 2004).

#### 1.6.1.2.1. Serin Proteazlar

Bugüne dek çalışılmış geniş çaplı proteolitik enzimlerdir (Castroa, 2010). Tüm proteolitik enzimlerin büyük bir kısmını oluştururlar. Bu enzim ismini aktif bölgesindeki nükleofilik serinden almıştır (Cera, 2009). Substrat tercihlerine göre; tripsin benzeri serin proteazlar, kimotripsin benzeri serin proteazlar, elastaz benzeri serin proteazlar olarak 3 gruba ayrılır. Virüs, bakteri ve ökaryotik organizmalarda bol miktarda bulunurlar. pH 7-11 arasında aktiftir. *Bacillus* sp.'ler en iyi serin proteaz üreticisidir. En önemlileri triptaz, lipaz, elastaz, kimotripsin, trombin ve fosfolipazdır (Rao ve ark., 1998).

#### 1.6.1.2.2. Sistein Proteazlar

Tüm canlılarda bulunur (Kenny, 1999). Nötr pH'da aktivite gösterirler. Aktif merkezinin spesifitesine göre 4 gruba ayrılır:

- 1) Papain benzeri tiyol proteazlar
- 2) Tripsin benzeri tiyol proteazlar
- 3) Glutanik aside özel tiyol proteazlar
- 4) Diğer tiplerdeki tiyol proteazlar

En çok bilinen papain benzeri tiyol proteazlardır (Gençkal, 2004). Sistein proteazlar kaspazlar olarak da bilinirler ve apoptoziste rol oynarlar (Ulukaya, 2003).

#### **1.6.1.2.3. Aspartik Proteazlar**

Asit proteazlar olarak da bilinirler. Aktif bölgelerindeki aktiviteleri için aspartik aside ihtiyaç duyarlar. Bu nedenle asidik pH'larda aktivite gösterirler. Sindirim, lizozomal protein yıkımı ve kan basıncının düzenlenmesinde görevlidirler (Garett ve Grisham, 2010).

#### **1.6.1.2.4. Metalloproteazlar**

Aktivite göstermek için çinko, kobalt ve diğer metal iyonlarını kullanırlar. EDTA ile inhibe edilebilirler. Aktif merkezlerinde fonksiyonel gruplara göre gruplara ayrılırlar. En çok bilinenleri matriks metalloproteazları ve yüzey membran proteinleridir (Edwards ve ark., 1998).

#### **1.6.2. Proteaz Kaynakları**

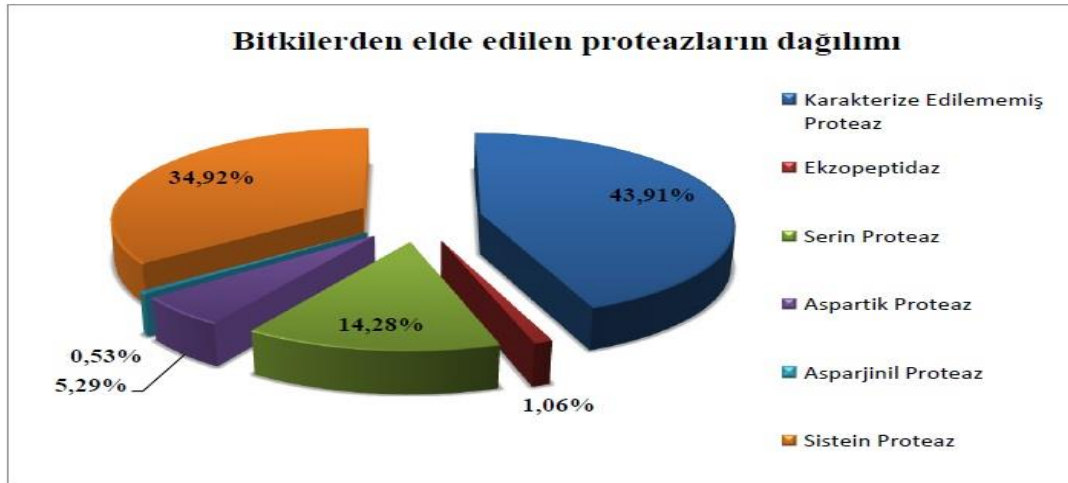
Proteazlar doğada yaygın bir şekilde bulunurlar. Canlılar alemi içinde bitkiler % 48,85 oranıyla en yüksek proteaz bulundurma payına sahiptir. Bitkilerden sonra sırasıyla % 18,9 ile bakteriler, % 15,08 ile mantarlar, % 11,15 ile hayvanlar, % 7,42 ile algler ve % 4,41 ile virüsler sıralamayı oluşturur (Mahojan ve Badgujar, 2010) (Şekil 1.4.).



Şekil 1.4. Proteazın biyolojik kaynaklardaki dağılımı (Mahajan ve Madgular, 2010).

### 1.6.2.1. Bitkisel Kaynaklar

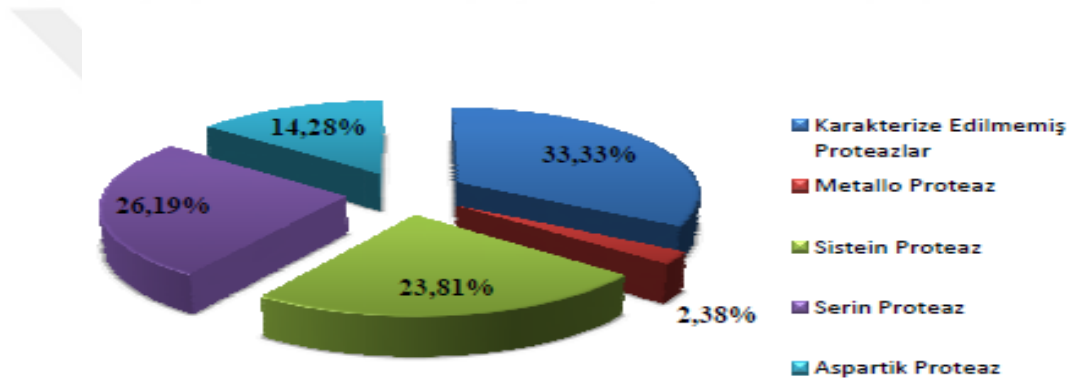
Bitkilerin kök, gövde, yaprak, çiçek, lateks, reçine gibi birçok kısmından proteaz izolasyonu yapılabilir. Bu kısımlar içinde bitki lateksinin zengin bir proteaz kaynağı olduğu bilinmektedir. Bitkisel kaynaklı proteazlar genellikle ananas, papaya gibi tropikal bitkilerden elde edilmektedir (Ward, 1985). Bitkilerde genel olarak sistein ve serin endopeptidazlar bulunurken aspartik proteazlar ve aminopeptidazlar nadiren bulunurlar (Mahojen ve Badgular, 2010) (Şekil 1.5.).



Şekil 1.5. Bitkilerden elde edilen proteazların dağılımı (Mahajan ve Badgular, 2010).

### 1.6.2.2. Hayvansal Kaynaklar

Hayvansal proteazların geçmişi enzimolojinin başlangıcına dayanır. Enzim yapıları bile keşfedilmeden önce pepsin ve pankreas proteazlarının özellikleri bilinmekteydi. Günümüzde ise pankreatik tripsin, kimotripsin, pepsin ve renin en çok bilinen hayvansal kaynaklı proteazlardır (Rao ve ark., 1998). Hayvansal proteazlar birçok alanda kullanım fırsatı bulur ve büyük hacimlerde saflaştırılabilirler (Şekil 1.6.). Ancak bunun için fazla sayıda çiftlik hayvanının kesimi gerekmektedir. Bu dezavantajı nedeniyle mikrobiyal proteazlara yönelim artmıştır (Tekin, 2008; Sevinç, 2010).



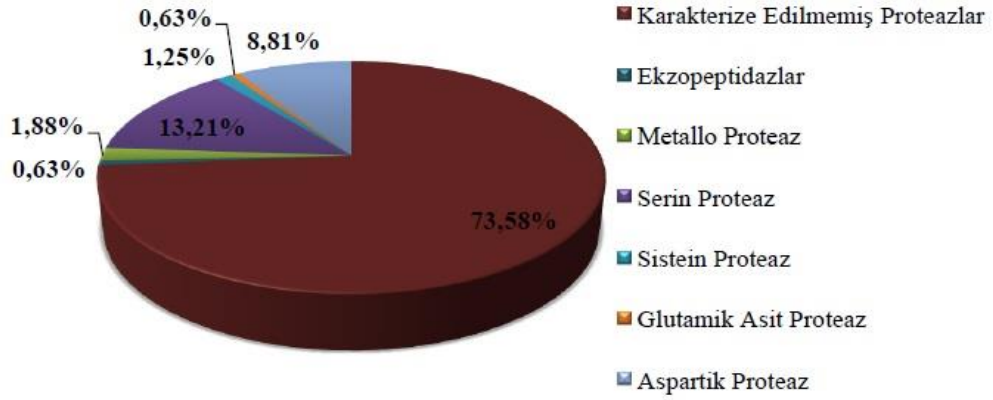
Şekil 1.6. Hayvansal kaynaklı proteazların dağılımı (Sarı, 2011).

### 1.6.2.3. Mikrobiyal Kaynaklar

Günümüzde tercih edilen proteaz kaynağı bakteri, fungus ve virüs orijinli mikrobiyal proteazlardır. Biyoteknolojik uygulamalar için mikroorganizmaların tüm özelliklerinin istenilen yönde değiştirilebilmesi, bitkisel ve hayvansal proteazlara göre daha saf elde edilebilmesi ve mikroorganizmaların daha kolay üretilmelerine yol açmıştır (Kıran ve ark., 2006) (Şekil 1.7.).



## Mikrobiyal kaynaklı proteazların dağılımı



Şekil 1.7. Mikrobiyal kaynaklı proteazların dağılımı (Mahajan ve Badgujar, 2010).

### 1.6.2.3.1. Bakteriyel Proteazlar

Ticari proteazlarının çoğu *Bacillus* cinsi bakteriler tarafından nötral ve alkalın olarak üretilir. Nötral proteazlar pH 5-8 aralığında aktivite gösterir. Aktivite gösterdiği pH aralığı ve uygulama yapılan ürün üzerinde daha az acı bir tat bıraktığı için gıda endüstrisinde daha fazla tercih edilir (Tekin, 2008). *Bacillus* türü bakteriler genellikle serin alkalen proteaz üretirler ve çoğu alkali özellik gösterir (Sevinç, 2010). Alkalen proteazların optimum pH aralığı pH 9-11 arasında olsada optimum pH aralığı pH 12-13 arası olan istisnai durumlarda vardır. Optimum sıcaklıkları 50-70°C'dir. Moleküler ağırlıkları genel olarak 15-30 kDa arasında değişir fakat 33 kDa, 36 kDa ve 45 kDa moleküler ağırlığına sahip enzimler de vardır (Kumar ve Takagi, 1999). Alkalen proteazların maksimum aktivite göstermek için  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$  gibi iki değerlikli katyonlara ihtiyaç duyduğu ve bu katyonların *Bacillus* alkalen proteazlarının termal stabilitesini arttırdığı saptanmıştır (Çelik, 2006). Çeşitli inhibitörlerle yapılan inhibisyon çalışmalarıyla alkalen proteazların genellikle PMSF (Fenilmetilsulfonyl florur) ve DFP (Diizopropilflorofosfat) ile tamamen inhibe olduğu bulunmuştur (Rao ve ark., 1998; Kumar ve Takagi, 1999).

### 1.6.2.3.2. Fungal Proteazlar

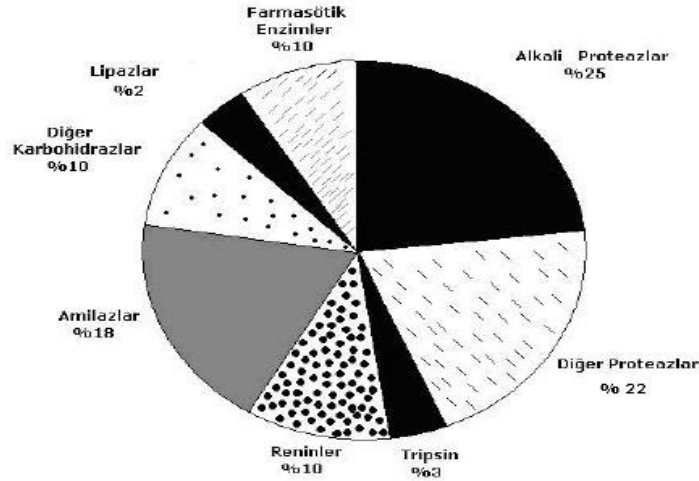
Bakterilere göre daha çeşitlidir. Fungal proteazlar pH 4-11 arasında geniş bir pH aralığına sahiptir. Ancak reaksiyon hızı düşüktür ve termal stabilitesi bakterilere göre daha kötüdür (Rao ve ark., 1998).

### 1.6.2.3.3. Viral Proteazlar

Çeşitli hastalıklara neden olan virüs proteinlerinin fonksiyonları nedeniyle oldukça önemlidir. Serin, aspartik sistein peptidazlar virüste bulunur. Birçok araştırma viral proteazların üç boyutlu yapısı ve bunların sentetik inhibitörlerle etkileşimi üzerinde yoğunlaşmıştır (Tekin, 2008).

### 1.6.3. Proteazların Kullanım Alanları

Proteazlar canlıların büyüme ve çoğalması için gerekli bir enzimdir. Proteinlerin hidrolizinde rol oynadıkları için fizyolojik ve ticari açıdan önemli enzimlerden birisidir. Proteazlar günümüzde deterjan, gıda endüstrisi, tekstil, deri, fotoğraf, yem sanayisi, eczacılık gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Yıldırım, 2010) (Şekil 1.8.).



Şekil 1.8. Proteazların endüstride kullanım yüzdeleri (Rao ve ark., 1998).

### **1.6.3.1. Deri Endüstrisi**

Deri işleme birçok adımdan oluşan bir süreçtir. Bu sürecin her adımında kimyasallar kullanılır. Ancak bu kimyasallar güvenlik ve çevre açısından tehlikeli ve zararlıdır. Bu nedenle deri işlenmesinde enzimatik yöntemler kullanılmaktadır. Proteazlar özellikle derinin ıslatılması, yumuşatılması, inceltmesi ve kılların uzaklaştırılması basamaklarında kullanılır. Ayrıca enzim uygulamasıyla deri yüzeyinin genişlemesi de sağlanır. Ancak enzimlerin derilerin dikiş ve dayanıklılığını etkilemesinden dolayı kullanım miktarına ve süresine dikkat edilmelidir (Tekin, 2008; Sevinç, 2010).

### **1.6.3.2. Deterjan Endüstrisi**

Deterjan sektöründe özellikle çevre kirliliğinin önüne geçmek için bakteriyel enzimlerin kullanımı artmıştır. Enzimler düşük fosfat içeriğine sahip, ılık ve soğuk yıkama ısıları için formüle edilmiştir. Deterjanlarda kullanılan enzimlerin büyük kısmı *Bacillus* sp.'den izole edilen alkalın proteazlardır. Enzimlerin kullanımı yıkama verimini artırarak düşük ısılarda ve kısa sürede temizliği sağlamakta ve çamaşırların yıpranmasını önlemektedir (Yardımcı, 2014).

### **1.6.3.3. İlaç Endüstrisi**

Enzimler ilaç sektöründe de geniş uygulama alanlarına sahiptir. Vücuttaki ihtiyaçları gidermek ve enzim ihtiyaçlarını karşılamak için enzim takviyeleri üretildiği gibi sindirim sistemini desteklemek için üretilen ilaçlarda proteazlar kullanılmaktadır (Yardımcı, 2014).

### **1.6.3.4. Tekstil Endüstrisi**

Tekstil endüstrisinde protein esaslı ürünlerin ön işlenmesinde proteazlar kullanılır. Kumaş üretimi için farklı lif yapılarına sahip maddeler bulunur. Bu maddelerin proteaz ile muamelesi sonucunda liflerin esnekliği sağlanır ve doğal

kirlerden arındırılır. Ayrıca hem zaman tasarrufu sağlanır hem de uygun sonuçlar alınır (Sevinç, 2010).

#### **1.6.3.5. Gıda Endüstrisi**

Balık, bitki ve hayvan proteinlerini hidrolizleme, etin ve bifteğin yumuşatılmasında proteazlardan yararlanır. Son yıllarda peynir üretiminde kullanılmaya başlanmıştır. Bira yapımında serbest aminoasit miktarını artırarak raf ömrünü uzatırlar (Sevinç, 2010).

#### **1.7. Tezin Amacı**

Günümüzde enzim kullanımı hızla artmaktadır. Enzimlerden biri olan proteazların da birçok alanda kullanılması ve kullanılacak potansiyel başka sahalarında olabileceği gerçeği proteaza olan ilgiyi artırmaktadır. Bu çalışmada *Bacillus megaterium* T50 izolatından izole edilen proteaz enziminin karakterizasyonu yapılmıştır.

## 2. MATERYAL VE METOT

### 2.1. Çalışmada Kullanılan Bakteriler

Bu çalışmada Giresun Üniversitesi Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Laboratuvarındaki stoktan temin edilen ve yüksek proteaz aktivitesi gösteren T24, T28, T45 ve T50 nolu toprak izolatları kullanıldı. Bu izolatlardan T24 nolu izolatin *Bacillus* sp., T28 ve T45 nolu izolatların *Bacillus cereus* grubuna ait olduğu ve T50 nolu izolatin *Bacillus megaterium* olduğu fenotipik, biyokimyasal ve moleküler teknikler kullanılarak tanımlanmıştır (Katı ve ark., 2016a). Bu bakterilerin içerisinde en yüksek proteaz aktivitesi *Bacillus megaterium* T50 izolatında gözlemlendiği için çalışmaya bu bakteriyle devam edilmiştir.

### 2.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

Stokları yenilemek için nutrient agar (NA) kullanıldı. Bakterilerin aktifleştirilmesinde luria bertani (LB) kullanıldı. Proteaz aktivitesinin incelenmesi için yağsız süt tozu (% 0,1 pepton, % 0,5 NaCl, % 1 yağsız süt tozu, % 2 agar; yağsız süt tozu ayrı steril edildikten sonra besiyerine eklendi) (Qadar ve ark. 2009) ve kazeinli (5 g/L kazein, 5 g/L pepton, 2 g/L maya ekstraktı, 0,2 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,1 g/L CaCl<sub>2</sub>, 1 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 g/L NaCl, 20 g/L agar) (Tekin, 2008) besiyerleri hazırlandı.

### 2.3. Çalışmada Kullanılan Bazı Kimyasallar ve Cihazlar

Çalışmada TCA, folin ciocalteu, aseton, etanol, amonyum sülfat, sodyum asetat, potasyum fosfat, tris, glisin, asetik asit, NaOH, HCl, metanol, asetonitril, butan-1-ol, hekzan, izopropanol, etilasetat, CuCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub>, CdCl<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, CaCl<sub>2</sub>, NiCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, akrilamid, amonyum persülfat, TEMED, 2-merkaptotanol, SDS, gliserol, Comassie Brilliant Blue R-250 ve Triton X-100 kullanıldı.

Bakteriler Nüve markalı inkübatörde 30 °C'de 150 rpm'de büyütüldü. Hermler marka soğutmalı santrifüj cihazında santrifüj edildi. Shimadzu UV min 1240 markalı spektrofotometre cihazında proteaz aktivitesi ölçüldü. Termoblok WiseTherm HB-96-D cihazında farklı sıcaklık değerlerinin proteaz enzimine etkisi bakıldı. Çalışmaların steril ortamda yürütülebilmesi için ESCO markalı steril kabin kullanıldı.

#### **2.4. Bakterilerin Proteolitik Aktivitelerinin Belirlenmesi**

İzolatların proteolitik aktivitelerinin kalitatif olarak belirlenmesi için yağsız süt tozu ve kazeinli agar besiyerlerine steril kürdan ile ekim yapıldı ve 30 °C'de 2 gün inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda kolonilerin etrafında şeffaf zonların oluşumu pozitif olarak değerlendirildi.

İzolatların proteolitik aktivitelerinin kantitatif olarak belirlenmesi için, izolatlar LB besiyerinde 1 gece inkübe edildi. İnkübasyon sonrası bakteri yoğunluğu spektrofotometrik yöntemle 600 nm dalga boyunda ölçüldü. Taze LB besiyerine optik yoğunluğu 0,1 olacak şekilde aşılama yapıldı ve 30 °C'de, 150 rpm'de yaklaşık 1 saat inkübe edildi. Optik yoğunluk 0,3-0,5 arasındaki değere ulaşıncaya kadar yağsız süt tozu ve kazeinli sıvı besiyerlerine %1 olacak şekilde aşılama yapıldı. 3 gün 30 °C'de 150 rpm'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kültürler 10000 rpm'de 20 dk santrifüj edilerek süpernatantları alındı. Süpernatantlar ham ekstrakt olarak adlandırıldı (Josephine ve ark., 2012).

Tsuchida ve arkadaşlarının 1989 yılında geliştirdikleri metoda göre ham ekstraktların enzim aktivite tayini yapıldı. İlk olarak substrat solüsyonu olarak tris tamponu (pH 8) içinde % 1'lik kazein hazırlandı. Bu substrat solüsyonundan 500 µl alınarak 200 µl ham ekstrakt ile karıştırılarak 20 dk 30 °C'lik su banyosuna bırakıldı. 20 dk sonunda 1 ml % 10'luk Trikloroasetik asit (TCA) eklenerek oda sıcaklığında 15 dk bekletildi. 15 dk sonunda 10000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı alındı üzerine 2,5 ml 0,4 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> eklendi. İyi karışması için hafifçe vortekslendi. 3 kat dilüte edilmiş 1 ml folin ciocalteu eklenerek 30 dk

karanlıkta bekletildi ve spektrofotometrede 660 nm'de ölçüm yapıldı (Tsuchida ve ark., 1989).

## **2.5. İzolatların En Yüksek Aktivite Gösterdiği Besiyerinin ve Saat Aralığının Belirlenmesi**

İzolatlar LB besiyerinde 1 gece 30 °C'de inkübe edildi. Kazeinli ve yağsız süt tozu besiyerlerine ekim yapıldı ve 24, 48, 72 ve 96. saatlerdeki aktiviteleri ölçüldü.

Bu saatlerde örneklerden 2'şer ml alındı. Alınan örneklerin bakteri yoğunluğu spektrofotometrede ölçüldü ve geriye kalan örnekler santrifüj edilerek enzim aktivite tayini yapıldı.

## **2.6. Proteazın Karakterizasyonu**

*Bacillus megaterium* T50 izolatından izole edilen proteaz enzimi karakterize edildi. En iyi aktivite gösterdiği sıcaklık ve pH değerleri belirlendi, stabilitelerine bakıldı. Organik çözücü ve metal iyonlarının etkisi altındaki aktivitesi belirlendi.

### **2.6.1. Optimum pH'ın Belirlenmesi**

*Bacillus megaterium* T50 izolatından elde edilen proteazın en yüksek aktivite gösterdiği pH'sını bulmak için yapılan çalışmada pH'ları 4-10 olan 50 mM'lık tamponlar hazırlandı. pH 4 ve 5 için sodyum asetat, pH 6 ve 7 için potasyum fosfat, pH 8 için tris, pH 9 ve 10 için glisin-NaOH tamponu kullanıldı. Bu tamponlarda % 1 olacak şekilde kazein substrat solüsyonları hazırlandı. En yüksek absorbans değerinin elde edildiği pH, 100 kabul edilerek diğer pH değerlerinden elde edilen sonuçlar buna göre oranlanıp enzim aktivitesi belirlenmiştir.

### **2.6.2. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi**

*Bacillus megaterium* T50 izolatından elde edilen proteaz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklığı belirlemek için 10-90 °C sıcaklıklarda 20 dk bekletilerek

enzim aktivite tayini yapıldı. En yüksek absorbans değerinin elde edildiği sıcaklık, 100 kabul edilerek diğer sıcaklık değerlerinden elde edilen sonuçlar buna göre oranlanıp enzim aktivitesi belirlenmiştir.

### **2.6.3. pH ve Sıcaklık Stabilitelerinin Belirlenmesi**

Stabilitenin belirlenmesi için optimum aktivite gösteren pH ve sıcaklık değerleri kullanıldı. pH stabilitesi için tris (pH 8) tamponu çözeltisi içinde hazırlanmış % 1'lik kazein çözeltisi ile ham ekstrakt karıştırılıp 20, 60, 120 ve 240 dk 30 °C'de inkübe edilerek enzim aktivite tayini yapıldı. Sıcaklık stabilitesi için de yine 20, 60, 120 ve 240 dk en yüksek aktivite gösteren 30 °C sıcaklıkta inkübe edilerek enzim aktivite tayini yapıldı.

Proteaz enziminin en iyi aktivite gösterdiği pH ve sıcaklık bu çalışmanın diğer aşamalarında kullanıldı.

### **2.6.4. Metal İyonlarının Proteaz Üzerine Etkileri**

*Bacillus megaterium* T50 izolatına ait proteazın enzimatik aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisinin belirlenmesi için  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NiCl}_2$  ve  $\text{CoCl}_2$  kullanıldı. Son konsantrasyon 5 mM olarak hazırlanan farklı metal iyonları içeren substrat çözeltisiyle ham ekstrakt karıştırılıp 20 dk ve 1 saat 30 °C'de inkübe edilerek enzim aktivitesi bakıldı. Kontrol olarak metal iyonu içermeyen kazeinli tampon kullanıldı. Kontrol değeri 100 kabul edilerek diğer değerlerinden elde edilen sonuçlar buna göre oranlanıp enzim aktivitesi belirlenmiştir. izolatına ait proteazın enzimatik aktivitesi üzerine

### **2.6.5. Organik Çözücülerin Proteaz Üzerine Etkileri**

*Bacillus megaterium* T50 izolatına ait proteazın enzimatik aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkisinin belirlenmesi için etanol, metanol, asetonitril, butan-1-ol, aseton, hekzan, izopropanol ve etilasetat kullanıldı. 100 µl enzim, 100 µl organik



çözücülerle karıştırılıp 1 saat 30 °C'de bekletildi. Kontrol için organik çözücü içermeyen tampon kullanıldı. 1 saat sonunda enzim aktivite tayini yapıldı. Kontrol değeri 100 kabul edilerek diğer değerlerinden elde edilen sonuçlar buna göre oranlanıp enzim aktivitesi belirlenmiştir.

## 2.7. Ultrafiltrasyon

*Bacillus megaterium* T50 izolatından elde edilen ham ekstrakt ultrafiltrasyon ile konsantre edildi. Bu amaçla 10 kDa büyüklüğündeki molekülleri tutabilme kapasitesine sahip membran içerikli falkon tüpleri kullanıldı. Tüplere ham ekstrakt yüklendi ve 8000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi. Falkon içerisinde membran tarafından tutulan konsantre örnek SDS-PAGE'de kullanıldı.

## 2.8. Aseton, Etanol ve Amonyum Sülfat Çöktürmelerinin Yapılması

Proteaz enziminin kısmi saflaştırması için aseton, etanol ve amonyum sülfat çöktürmeleri yapıldı. Çöktürmeler için yağsız süt tozu besiyerleri hazırlandı. *Bacillus megaterium* T50 izolatı LB besiyerinde 1 gece 30 °C'de 150 rpm'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kültürün yoğunluğu 600 nm'de ölçüm yapılarak LB ortamına optik yoğunluk 0,1 olacak şekilde aşılama yapıldı. Yaklaşık 1 saat inkübasyon sonucu optik yoğunluk 0,3-0,5'e ulaşıncaya yağsız süt tozu besiyerlerine % 1 oranında aşılama yapılarak 30 °C'de, 72 saat, 150 rpm'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kültür 6000 rpm'de 20 dk santrifüj edildi.

Etanol çöktürmesi için; 1 gece -20 °C'de bekletilen 900 ml etanol içerisine kültür süpernatantından 100 ml eklendi ve 1 gece -20 °C'ye bırakıldı.

Aseton çöktürmesi için; 1 gece -20 °C'de bırakılan 400 ml aseton içerisine kültür süpernatantından 100 ml eklendi ve 1 gece -20 °C'ye bırakıldı.

Etanol ve aseton çöktürmeleri için elde edilen örnekler 1 gece inkübasyon sonrası 6000 rpm'de 20 dk santrifüj edildi. Pellet kısmı alındı, 1 gece kurumaya bırakıldı. Kuruyan pelletler 5 ml steril dH<sub>2</sub>O ile çözündürülerek -20 °C 'ye kaldırıldı.

Amonyum sülfat çöktürmesi için % 40, % 60, % 80 yoğunlukta çöktürme kademeli olarak yapıldı. Her bir yoğunlukta çöktürmeler 1 gece +4 °C'de bırakılarak ertesi gün 10000 rpm'de 20 dk santrifüj edildi ve -20 °C'ye kaldırıldı. Daha sonra amonyum sülfat, aseton ve etanol çöktürmelerinin enzim aktivite ölçümleri yapıldı.

## 2.9. SDS –PAGE ve Zymogram Analizi

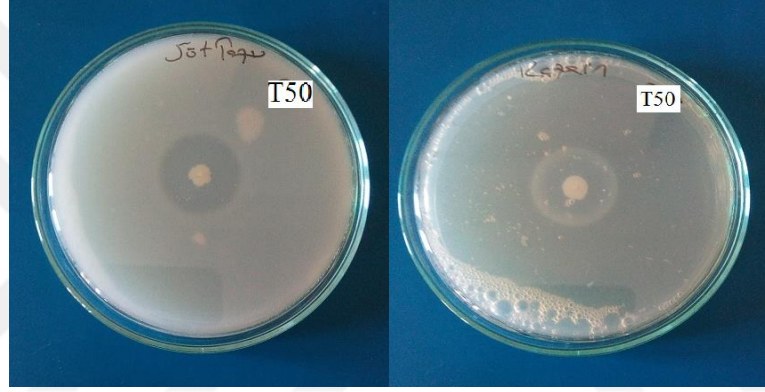
*Bacillus megaterium* T50 izolatından elde edilen enzimin molekül ağırlığının belirlenmesi için Laemmli (1970)'ye göre % 0,1 jelatin içeren % 15'lik SDS-PAGE hazırlandı. Bu çalışmada ham ekstrakt, ultrafiltrasyon ve amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen örnekler kullanıldı.

Hazırlanan jele örnekler iki tekrarlı olarak yüklendi. Jele, örnekler ayırma jelini geçene kadar önce 50 volt, örnekler ayırma jeline geçtikten sonra ise 100 volt sabit akım verildi. Elektroforez işlemi yaklaşık 6 saat sürdü. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra aktivite bakılacak jel boyama yapılmadan uzaklaştırıldı. Jelin diğer kalan kısmı Comassie Brilliant Blue R-250 (CBBR-250) boyası ile boyanmıştır. Aktivite için kesilen jelden SDS'yi uzaklaştırmak için jel 60 dk % 2,5 Triton X-100 solusyonda yıkandı. Ardından 50 mM tris (pH 8) tamponunda 30 dk 30 °C'de inkübe edildi ve aynı taze tampon içinde 12-16 saat inkübasyona tekrar bırakıldı. İnkübasyon sonrası CBB R-250 boyasında yaklaşık 3 saat boyandı ve boya giderme solüsyonu içine alınarak yıkama işlemi gerçekleştirildi.

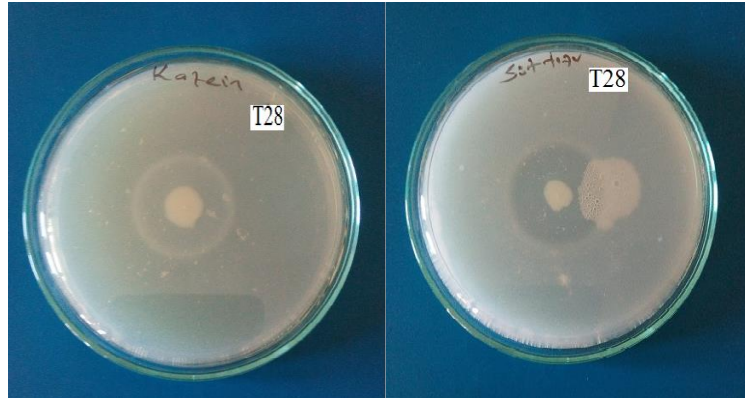
### 3. ARAŞTIRMA BULGULARI

#### 3.1. Bakterilerin Proteolitik Aktivitelerinin Belirlenmesi

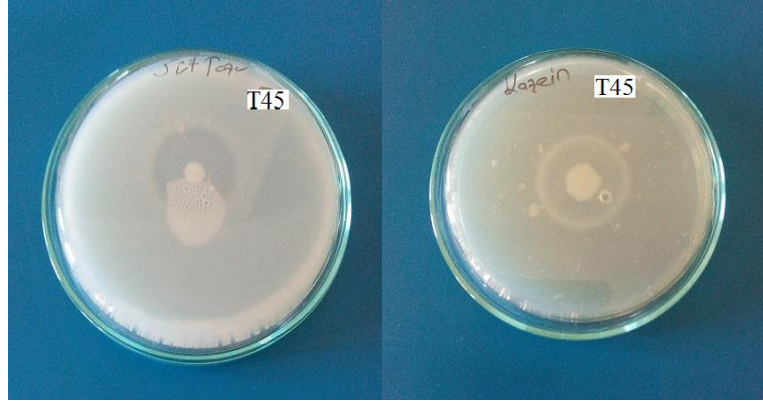
T24, T28, T45 ve T50 nolu izolatların proteolitik aktiviteleri kalitatif olarak yağsız süt tozu ve kazeinli besiyerlerinde 30 °C'de 2 gün inkübe edilerek belirlenmiştir. İnkübasyon sonucunda suşlara ait kolonilerin etrafında şeffaf zon oluşumu gözlenmiş ve proteolitik aktivite pozitif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.1, 3.2 ve 3.3).



**Şekil 3.1.** T50 numaralı izolatın kazeinli ve yağsız süt tozu besiyerlerindeki şeffaf zon oluşumları



**Şekil 3.2.** T28 numaralı izolatın kazeinli ve yağsız süt tozu besiyerlerindeki şeffaf zon oluşumları



**Şekil 3.3.** T45 numaralı izolatın kazeinli ve yağsız süt tozu besiyerlerindeki şeffaf zon oluşumları

### 3.2. İzolatların Proteaz Aktivitesi

T24, T28, T45 ve T50 nolu izolatların yağsız süt tozu besiyerinden 24 saatlik aralıklarda alınan numunelerin proteaz aktivitesi 600 nm dalga boyunda ölçüldü. Ayrıca alınan numuneler 6000 rpm'de 20 dk santrifüj edilerek süpernatantları alındı ve enzim aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre T50 nolu izolatın 72 saatte yağsız süt tozu besiyerinde en yüksek proteaz aktivitesine sahip olduğu gözlemlendi ve çalışmalara *Bacillus megaterium* T50 izolatıyla devam edildi.

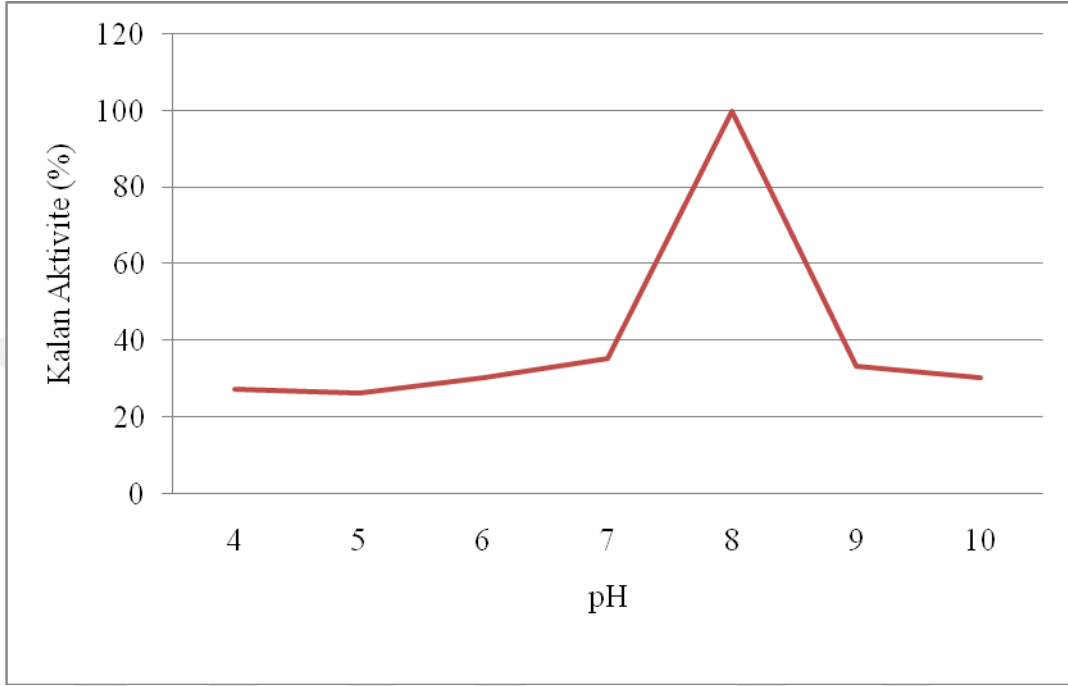
### 3.3. Proteaz Enziminin Karakterizasyonu

*Bacillus megaterium* T50 izolatı 200 ml'lik yağsız süt tozu besiyerinde 72 saat inkübe edildikten sonra 6000 rpm'de +4 °C'de 20 dk santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant ham ekstrakt olarak isimlendirildi ve kullanılmaya kadar -20 °C'ye bırakıldı. Ham ekstrakt kullanılarak optimum pH, optimum sıcaklık, farklı metal iyonlarının ve farklı organik çözücülerin proteaz enzimi üzerine etkisi incelendi.

#### 3.3.1. Optimum pH'ın Belirlenmesi

Proteaz enziminin optimum pH'sını belirlemek için farklı tamponlar kullanılmıştır. pH 4-10 aralığında ölçülen aktivite değerleri Şekil 3.4.'de verilmiştir.

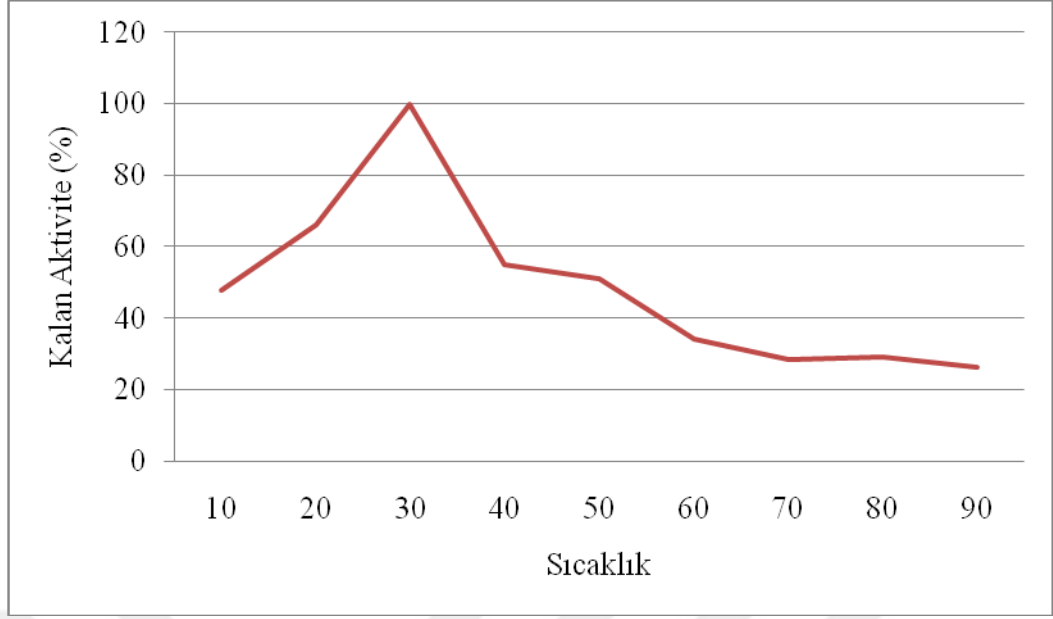
Proteaz enzimin en yüksek aktivitesinin pH 8 olduğu belirlendi. Diğer pH değerlerinde aktivitenin düştüğü görüldü. pH 8'deki proteaz aktivite değerleri %100 kabul edilip diğer değerler buna göre oranlandı. pH 7'de aktivite yaklaşık % 36 civarında olup, pH 9 ve 10'da aktivitenin % 30'lara düştüğü gözlenmiştir.



Şekil 3.4. Optimum pH değerinin belirlenmesi

### 3.3.2. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi

*Bacillus megaterium* T50 izolatına ait proteaz enziminin optimum sıcaklık değerlerinin belirlenmesi amacıyla 10-90 °C aralığında 20 dk bekletilerek enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Sıcaklığın aktiviteye etkisine Şekil 3.5.'de yer verilmiştir. En yüksek aktivite 30 °C'de gözlenmiş ve aktivite değerleri % 100 kabul edilmiştir. 10 °C'de yaklaşık % 47, 20 °C'de % 66 aktivite gözlenirken, 40 °C'de değerleri yaklaşık % 50'ye düştüğü ve bundan sonraki sıcaklık değerlerinde de aktivitenin azaldığı belirlenmiştir.

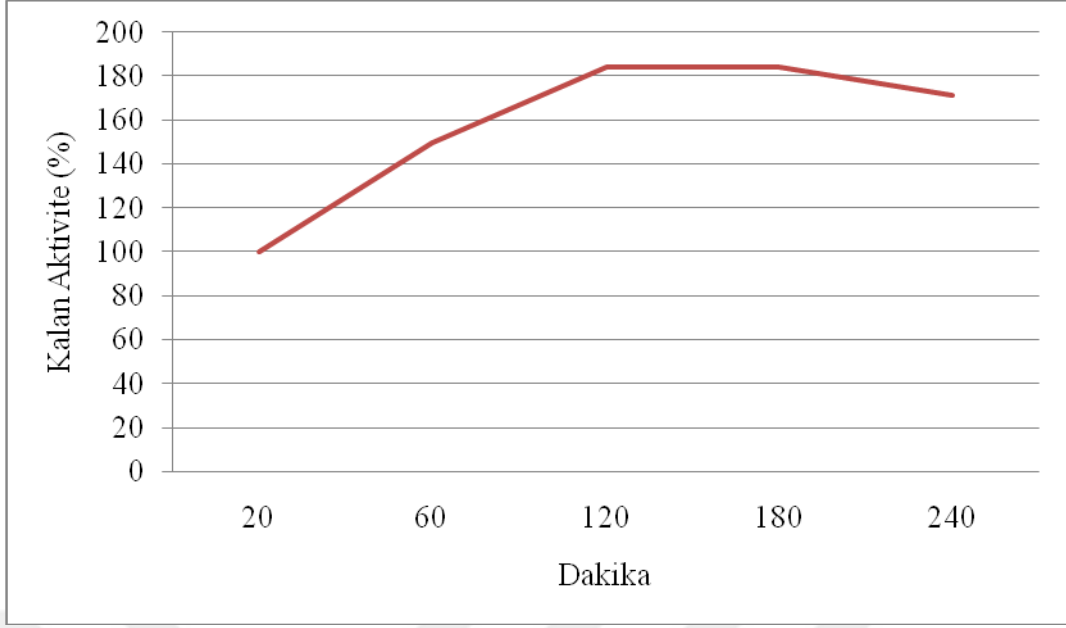


**Şekil 3.5.** Optimum sıcaklığın belirlenmesi

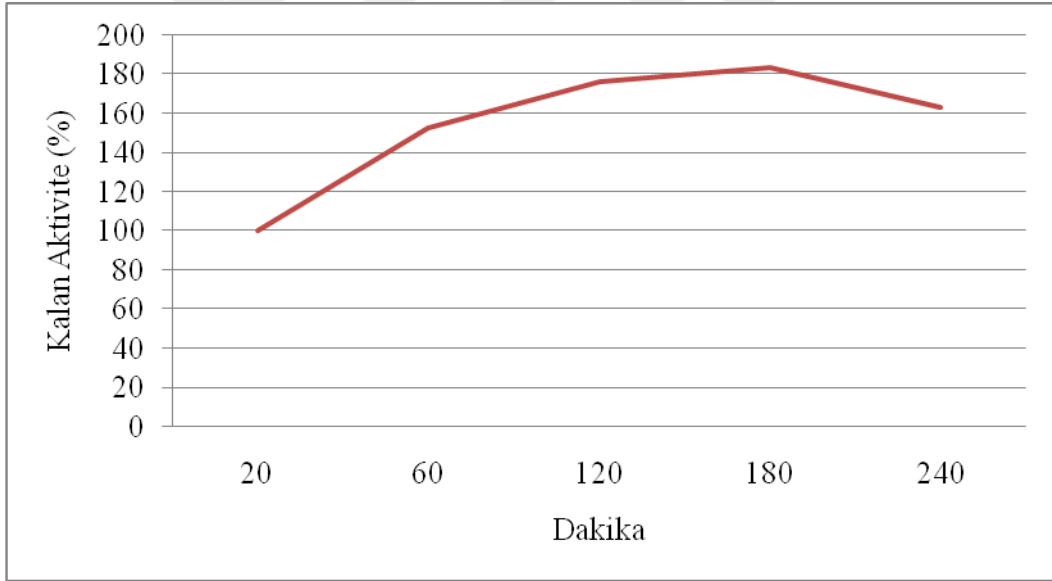
### 3.3.3. pH ve Sıcaklık Stabilitesinin Belirlenmesi

Enzimin pH stabilitesini belirlemek amacıyla enzim pH 8’de 4 saat boyunca 30 °C’deki su banyosunda tutulmuştur. Şekil 3.6.’da pH stabilitesinin değerinin 60. dakikada yaklaşık % 49, 120 ve 180. dakikalarda % 84 oranında artırdığı, 240. dakikada ise % 71 arttığı gözlenmiştir.

Sıcaklık stabilitesi için kazein içeren enzim karışımı 4 saat boyunca 30 °C’de bekletilerek enzim aktivite tayini yapıldı. Sıcaklık stabilitesinin değerinin ise Şekil 3.7.’de 60. dakikada % 52, 120. dakikada % 76, 180. dakikada ise % 83 oranında olduğu, 240. dakikada yaklaşık % 62 arttığı gözlenmiştir.



**Şekil 3.6.** pH 8 tamponuyla pH stabilite deney sonuçları

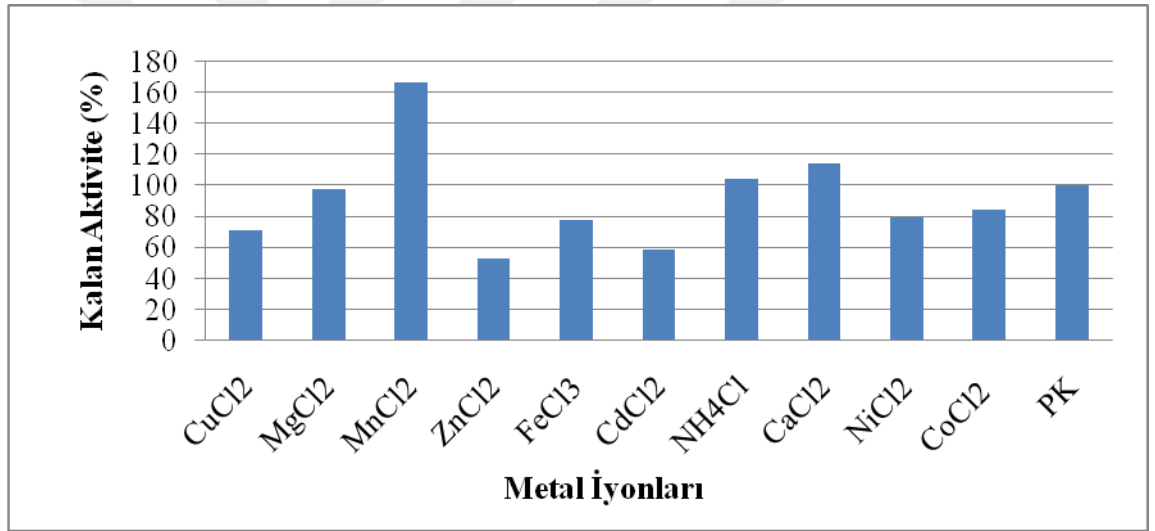


**Şekil 3.7.** 30 °C'de sıcaklık stabilite deney sonuçları

### 3.3.4. Metal İyonlarının Proteaz Üzerine Etkileri

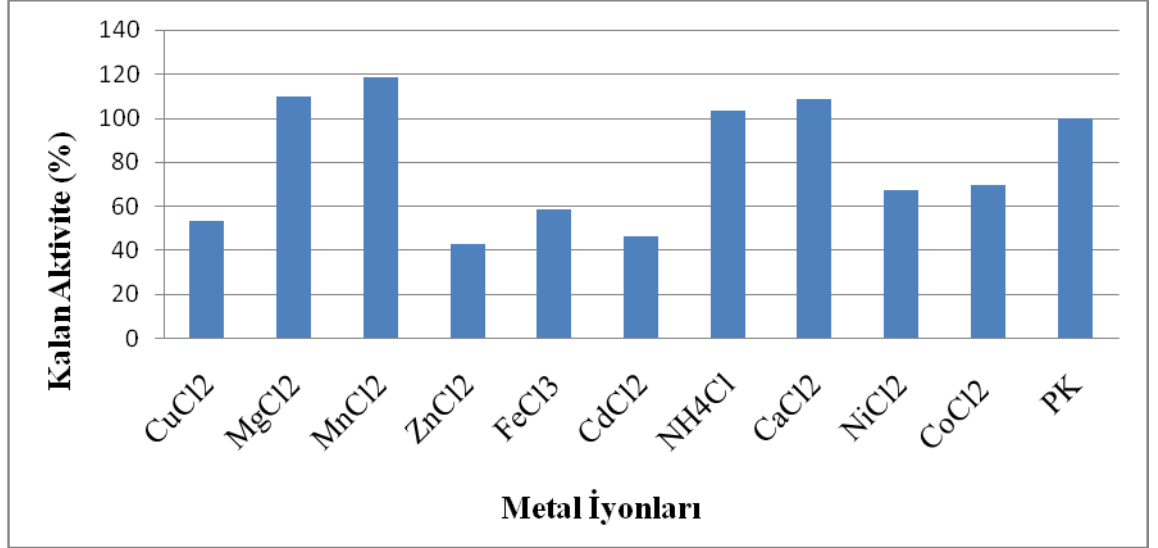
*Bacillus megaterium* T50 izolatına ait proteazın enzimatik aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisinin belirlenmesi için  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NiCl}_2$  ve  $\text{CoCl}_2$  kullanılmıştır. Kazein içeren tamponun metal

iyonları içinde çözünmesi sağlanarak 20 dk ve 1 saat inkübasyona bırakılarak enzim aktivite tayini yapılmıştır. Sonuçlar metal iyonu içermeyen kontrole göre değerlendirilmiştir. Şekil 3.8. ve 3.9.'da metal iyonlarının proteaz enzimi üzerine etkisi gösterilmiştir. 20 dk ve 1 saatlik inkübasyon sonuçlarını karşılaştırdığımızda  $MnCl_2$  varlığında 20 dk inkübasyon sonucu aktivitede yaklaşık % 66'lık artış gözlenirken, 1 saatlik inkübasyon sonucunda bu artışın % 18'e düştüğü;  $MgCl_2$  varlığında 20 dk'lık inkübasyonda aktivitede % 3'lük azalma olmasına rağmen 1 saatlik inkübasyon sonrası aktivitenin % 9 arttığı;  $CaCl_2$  varlığında 20 dk inkübasyon sonucu aktivitede % 14'lük artış olduğu 1 saatlik inkübasyon sonucu bu artışın yaklaşık % 8'e düştüğü gözlenmiştir.



**Şekil 3.8.** Metal iyonlarının proteaz enzimi üzerine etkisi (20 dk bekleme)

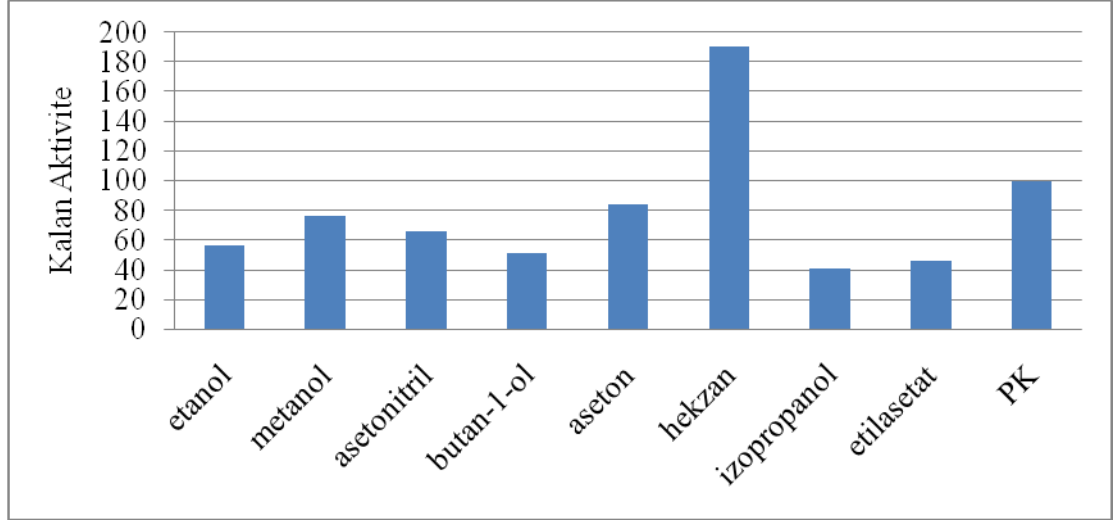




Şekil 3.9. Metal iyonlarının proteaz enzimi üzerine etkisi (1 saat bekleme)

### 3.3.5. Organik Çözücülerin Proteaz Üzerine Etkileri

*Bacillus megaterium* T50 izolatına ait proteaz enziminin üzerine etanol, metanol, asetonitril, butan-1-ol, aseton, hekzan, izopropanol ve etilasetat etkisi araştırılmıştır. Bunun için 100 µl ham ekstrakt, 100 µl organik çözücü ile karıştırılmış ve 1 saat 30 °C'de ön inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol olarak organik çözücü içermeyen enzim tampon karışımı kullanılmış ve enzim aktivite tayini yapılmıştır. Şekil 3.10.'da organik çözücülerin proteaz enzimi üzerine etkisi gösterilmiştir. Sonuçlara bakıldığında özellikle hekzan varlığında proteaz enzim aktivitesinin gözle görülür ölçüde arttığı görülmektedir. Bu çalışmada hekzan varlığında aktivitenin yaklaşık % 80 arttığı gözlenmiştir. Aseton varlığında aktivitede yaklaşık % 17, metanol varlığında ise % 24'lük azalma görülürken, izopropanol ve etilasetat varlığında ise aktivitenin yaklaşık % 55-60 azaldığı gözlenmiştir.



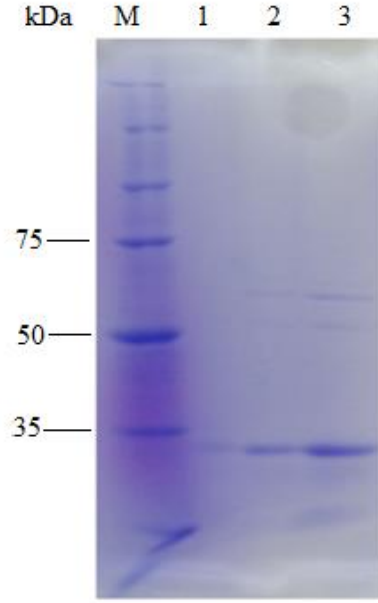
**Şekil 3.10.** Organik çözücülerin proteaz enzimi üzerine etkisi

### 3.4. Aseton, Etanol ve Amonyum Sülfat Çöktürmesinin Yapılması

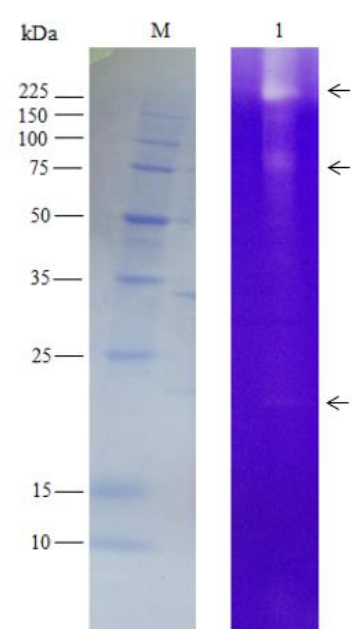
Yapılan kısmi saflaştırma sonucunda 600 nm'de yapılan spektrofotometrik sonuçlara göre aseton çöktürmesinin aktivitesinin etanol çöktürmesine göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Amonyum sülfat çöktürmelerinde pellet ve süpernatant kısmının aktivitelerine bakılmıştır. % 40, % 60 ve % 80 yoğunluktaki pellette süpernatantlara kıyasla aktivitenin daha yüksek olduğu görülmüştür. Genel olarak bakıldığında yoğunluk arttıkça aktivite artmıştır, en yüksek aktivite % 80 yoğunluktaki amonyum sülfat çöktürmesinde gözlenmiştir.

### 3.5. Proteazın Molekül Ağırlığının Belirlenmesi

*Bacillus megaterium* T50 izolatından elde edilen enzimin molekül ağırlığının belirlenmesi için ham ekstrakt, ultrafiltrasyon ve amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen örnekler kullanılarak SDS-PAGE yapıldı (Şekil 3.11). SDS-PAGE sonuçlarına göre aktivite gösteren yaklaşık 20, 80 ve 225 kDa ağırlığında en az üç proteaz bantları tespit edilmiştir (Şekil 3.12).



**Şekil 3.11.** *Bacillus megaterium* T50 izolatına ait proteazın SDS-PAGE görüntüsü  
M: Marker, 1: Ham ekstrakt, 2: Ultrafiltrasyon, 3: Amonyum sülfat



**Şekil 3.12.** *Bacillus megaterium* T50 izolatına ait proteazın zymogram görüntüsü. M: Marker, 1: Ultrafiltrasyon

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde enzim endüstrisi sürekli artan hızla gelişme göstermektedir. Ticari alanda gıda, kozmetik, ilaç, tekstil ve deterjan gibi belli başlı alanların yanı sıra birçok alanda da enzimlere gereksinim duyulmaktadır. Enzimlerin öneminin artmasına paralel olarak enzimlerin izole edilebileceği kaynaklarda önem kazanmaktadır. Enzimlerin izole edilebileceği kaynaklar arasında mikrobiyal kaynakların yeri büyüktür. Çünkü mikrobiyal kaynaklar zaman ve maliyet açısından daha ekonomiktir ve yüksek aktivite ve stabiliteye sahiptir. Mikrobiyal kaynaklar içinde *Bacillus* cinsi bakterilerin enzim üretiminde önemli olduğu bilinmektedir.

Bu tezde *Bacillus megaterium* T50 izolatından izole edilen proteaz enziminin karakterizasyonu yapıldı. İlk olarak stoktaki izolatların aktifleştirilmesi için luria bertani besiyerine ekim yapıldı. Daha sonra izolatların yağsız süt tozu ve kazeinli besiyerlerinde proteolitik aktiviteleri belirlendi. En yüksek aktivite gösteren *Bacillus megaterium* T50 izolatı ile çalışmalara devam edildi. Bu izolatın proteolitik aktivitesi yağsız süt tozu ve kazeinli besiyerleri kullanılarak belirlendi. En iyi proteaz pozitif zon oluşumu yağsız süt tozu besiyerinde görülmüştür. Benzer şekilde Turus (2011) yaptığı çalışmada *Bacillus* sp. suşlarını yağsız süt tozu agar besiyerine çizgi ekim tekniği kullanarak aşılama ve 15 °C'lik etüvde 40 saat inkübasyona bırakmıştır. Inkübasyon sonunda etrafında şeffaf hidroliz zonu oluşan örnekler proteaz pozitif olarak değerlendirilmiştir. Tekin (2008) çalışmasında alkalen proteaz üreticisi izolatları belirlemek için Eraslan ve ark. (2004) uyguladığı yağsız süt tozu agar besiyerini modifiye ederek kullanmıştır. Mezofilik izolatları 37 °C'de, termofilik izolatları ise 55 °C'de 72 saat inkübe etmiş, inkübasyon sonrası koloni çevresindeki şeffaf zonların varlığını proteaz pozitif olarak değerlendirmiştir. Sevinç (2010) çalışmasında bakterilerin proteaz üretme kapasitelerini belirlemek için kazeinli besiyeri (Sangeetha ve Phil, 2008) ve yağsız süt tozu besiyeri (Qadar ve ark., 2009) olmak üzere iki besiyeri kullanmıştır. Örneklerini yayma ekim yöntemiyle ekim yapmış ve 37 °C'de 18 saat inkübasyona bırakmıştır. Inkübasyon sonucu açık renkli zon olan koloniler proteaz pozitif olarak değerlendirilmiştir. Nadeem ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada topraktan izole ettikleri *Bacillus* cinsi bakterileri yağsız süt tozu

içeren agarlı plaklara yayma metodu ile ekerek 37 °C'de 18 saat inkübasyona bırakmış ve zon çaplarına göre proteaz aktivitesinin miktarını belirlemişlerdir.

*Bacillus megaterium* T50 izolatından izole edilen proteazın optimum sıcaklığının 30 °C olduğu belirlenmiştir. Mevcut çalışmalar incelendiğinde Haddar ve ark. (2009), *Bacillus mojavenensis* A21'den alkaliserin proteazlar (BM1 ve BM2) saflaştırmışlardır. Her iki enzimde optimum aktiviteyi 60 °C'de göstermiştir. Yang ve ark. (2000) yaptıkları çalışmada *Bacillus subtilis*'ten saflaştırdıkları metalloproteazın optimum sıcaklığının 50 °C olduğunu saptamışlardır. Gharbel ve ark. (2003) *Bacillus cereus* BG1'den saflaştırdıkları proteaz enziminin maksimum sıcaklığını 60 °C olarak bildirmişlerdir. Jellouli ve ark. (2011) çalışmalarında *Bacillus licheniformis* MP1'den üretilen proteaz enziminin optimum sıcaklığını 70 °C bulmuşlardır. Kaur ve ark. (2001) *Bacillus* sp. P-2'den yüksek derecede termostabil alkalin proteaz üretimi üzerine çalışmış ve bakteriden izole ettikleri proteaz enziminin maksimum aktivitesinin 30 °C'de olduğunu bildirmişlerdir. Joo ve ark. (2002) *Bacillus horikoshii*'den üretilen proteazın 50 °C'de maksimum aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir. Katı ve ark. (2016b) *Bacillus thuringiensis*'ten üretilen proteazın 30 °C'de maksimum aktiviteye sahip olduğunu bulmuşlardır. Bu çalışmadaki sonuca bakıldığında *Bacillus megaterium* T50 izolatından izole edilen proteazın 10 °C ile 40 °C arasında aktivite gösterdiği görülmektedir.

Bu çalışmada *Bacillus megaterium* T50 izolatından izole edilen proteazın optimum pH'sı pH 8 olarak belirlenmiştir. Diğer çalışmalara bakıldığında Beq ve Gupta (2003) *Bacillus majovensis* suşundan izole ettikleri oksidant stabil serin alkali proteaz enziminin optimum pH aralığını 7-11,5 olarak bulmuşlardır. Motta ve Punj (1998) proteaz enziminin optimum pH'sını *Bacillus polymxa*'da 7,5 olarak belirlemişlerdir. Kim (2001), Gharbel (2003) ve Rahman (2006) *Bacillus cereus* ile yaptığı çalışmalarda elde ettikleri metalloproteazın maksimum pH'sını 8 olarak tespit etmişlerdir. Yang ve ark. (2000) yaptıkları benzer bir çalışmada *Bacillus subtilis*'ten izole ettikleri metalloproteazın optimum pH'sını 8 bulmuşlardır. Katı ve ark. (2016b) *Bacillus thuringiensis*'ten izole ettikleri proteaz enziminin pH 7-9 arası yüksek aktivite gösterdiğini ancak en yüksek aktivitenin pH 8'de olduğunu bildirmişlerdir.

*Bacillus megaterium* T50 izolatından izole edilen proteaz enziminin optimum pH'sının literatürdeki bu çalışmalarla uyumlu olduğu görülmektedir.

*Bacillus megaterium* T50 izolatından izole edilen proteaz enziminin aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi 20 dk ve 1 saat ön inkübasyona tabi tutularak araştırılmıştır. 20 dk ön inkübasyon sonucu  $MnCl_2$ ,  $NH_4Cl$  ve  $CaCl_2$  varlığında enzim aktivitesi artarken diğer metal iyonlarının aktiviteyi inhibe ettiği; 1 saatlik ön inkübasyon sonucu  $MgCl_2$ ,  $MnCl_2$ ,  $NH_4Cl$  ve  $CaCl_2$  varlığında aktivite artarken diğer metal iyonları varlığında aktivitenin azaldığı gözlenmiştir. Diğer çalışmalara bakıldığında; Ahmetoğlu (2011) *Bacillus cereus* KG5 bakterisinden izole ettiği proteaz enziminin aktivitesinin  $MnCl_2$ ,  $CaCl_2$  ve  $MgCl_2$  varlığında arttığını;  $ZnCl_2$ ,  $CuCl_2$  ve  $HgCl_2$  varlığında ise azaldığını belirtmiştir. Adinarayana ve ark. (2003) *Bacillus subtilis* PE-11 bakterisinden kısmen saflaştırdıkları enzimin aktivitesinin  $CaCl_2$  ve  $MgCl_2$  varlığında arttığını belirlemişlerdir. Nascimento ve Martins (2004) termofilik *Bacillus* sp.'e ait ekstraselüler proteaz aktivitesinin  $HgCl_2$ ,  $CuCl_2$ ,  $ZnCl_2$ ,  $KCl$  tarafından inhibe edildiğini bildirmişlerdir. Yang ve ark. (2000) *Bacillus subtilis*'ten izole ettikleri proteaz enziminin aktivitesinin  $MnCl_2$  varlığında arttığını,  $HgCl_2$  varlığında ise inhibe olduğunu bulmuşlardır. Okumuş (2004) *Bacillus* sp.'den izole ettiği alkalın serin proteaz enziminin aktivitesinin  $HgCl_2$  ve  $CuCl_2$  varlığında inhibe olduğunu belirtmiştir. Gabdrakhmanova ve ark. (1999) *Bacillus intermedius* ile yaptıkları çalışmada enzim aktivitesinin  $CaCl_2$ ,  $MgCl_2$ ,  $CoCl_2$  varlığında arttığını tespit etmişlerdir. Katı ve ark. (2016b) *Bacillus thuringiensis* ile yaptıkları çalışmada izole ettikleri proteaz enziminin aktivitesinin  $MnCl_2$  varlığında arttığını bildirmişlerdir.

*Bacillus megaterium* T50 izolatından izole edilen proteaz enzimi üzerine organik çözücülerin etkisi incelendiğinde hekzan varlığında aktivitenin % 80 oranında arttığı; aseton, etanol, izopropanol, etilasetat, butan-1-ol varlığında ise yaklaşık % 40-% 60 oranında azaldığı görülmüştür. Diğer araştırmalara bakıldığında Tolan (2015) *Bacillus* sp. MT01 ile yaptığı çalışmasında aseton varlığında enzim aktivitesinin % 47 oranında arttığını; 2-propanol, benzen, etanol, DMSO, toluen varlığında ise % 10 ile % 20 arasında aktivite kaybı olduğunu bulmuştur. İşmarcı (2014) *Bacillus megaterium*'dan izole ettiği proteaz enzimi üzerine organik

çözücülerin etkisini incelediğinde DMSO, 2-propanol, toluen ve metanolun aktiviteyi artırdığını, etanolun herhangi bir değişikliğe neden olmadığını, aseton ve asetonitrilin aktiviteyi düşürdüğünü tespit etmiştir. Yavuz (2013) *Saccharomyces cerevisia*'dan elde ettiği proteaz enziminin aktivitesinin gliserol, asetonitril ve metanol varlığında azaldığını; aseton, toluen, kloroform ve benzen varlığında ise aktivitenin % 65 oranında korunduğunu bildirmiştir. Reddy ve ark. (2008) *Bacillus* sp. RKY3 bakterisinden elde ettikleri proteazın aktivitesinin aseton ve bütanol varlığında azaldığını belirtmişlerdir. Ghorbel ve ark. (2003) balık endüstrisinin atık suyundan izole ettikleri *Bacillus cereus*'tan elde edilen proteazın aktivitesinin metanol, DMSO ve asetonitril varlığında % 95 oranında korunduğunu belirtmişlerdir. Katı ve ark. (2016b) yapraktan izole ettikleri *Bacillus thuringiensis*'ten elde ettikleri proteaz enziminin aktivitesinin hekzan varlığında arttığını görmüşlerdir.

Bu çalışmada *Bacillus megaterium* T50 izolatından elde edilen proteaz enziminin molekül ağırlığı yapılan SDS-PAGE çalışmaları sonucu yaklaşık 20, 80 ve 225 kDa olarak bulunmuştur. Çeşitli araştırmacıların yaptığı çalışmalar farklı molekül ağırlığına sahip *Bacillus* proteazları olduğunu göstermiştir. Kumar ve ark. (2012) süs bitkisi fidanlığından izole ettikleri *Bacillus subtilis* EAG-2'den saflaştırdıkları proteazın molekül ağırlığını 27 kDa, Moradian ve ark. (2009) topraktan izole ettikleri *Bacillus* sp. HR-08 bakterisinden saflaştırdıkları alkalik proteazın molekül ağırlığını 29 kDa, Tanskul ve ark. (2013) *Bacillus subtilis* izolatından üretilen serin alkalik proteazın molekül ağırlığını 30 kDa olarak bulmuşlardır. Yossan ve ark. (2006) *Bacillus megaterium*'dan izole ettikleri alkalik proteazın molekül ağırlığını 30 kDa olarak buldukları bildirmişlerdir. Frikha ve ark. (2005) *Bacillus cereus* BG-1 ile yaptıkları çalışmada 34 kDa'luk proteaz enzimi saflaştırdıklarını bildirmişlerdir. Venugopal ve Saramma (2005) *Bacillus circulans* BM15 izolatından izole ettikleri proteazın, Beq ve ark. (2003) ise *Bacillus mojavensis*'ten izole ettikleri proteazın molekül ağırlığını 30 kDa olarak bulmuşlardır. Seifzadeh ve ark. (2008) *Bacillus* sp.'den izole ettikleri proteazın molekül ağırlığını 47 kDa, Yang ve ark. (2000) *Bacillus subtilis*'ten izole ettiklerini metalloproteazın molekül ağırlığının 44 kDa olduğunu belirtmişlerdir. Asker ve ark. (2013) *Bacillus megaterium* ile yaptıkları çalışmada iki farklı termostabil proteaz enzimi saflaştırmış ve molekül ağırlıklarını sırasıyla 28 ve 25 kDa olarak

bulmuşlardır. Mala ve arkadaşları (2008) yaptıkları çalışmada, topraktan izole edilen *Bacillus* türlerinden alkalın proteaz saflaştırmışlar ve kazein zimografi ve SDS-PAGE ile kısmen saflaştırılmış enzimin moleküler kütlesi sırasıyla yaklaşık 66 kDa ve 18 kDa olarak iki bant gözlenmiştir. Sarnaik ve ark. (2006) *Bacillus cerus* MCM B-326'dan elde edilen proteazın 36 ve 45 kDa olmak üzere 2 farklı bant meydana getirdiğini bildirmiştir.

Bu tezde *Bacillus megaterium* T50 izolatından izole edilen proteaz enziminin karakterizasyonu yapılmıştır. Proteaz enzim aktivitesi için yağsız süt tozu besiyeri kullanılmış ve en yüksek aktivite 72. saatte gözlenmiştir. Çalışma sonucunda izole edilen proteaz enziminin maksimum aktivite gösterdiği pH değeri 8 olarak bulunmuştur. Sıcaklık çalışması sonucunda enzimin 10-40 °C arasında aktivite gösterdiği ancak maksimum aktivitenin 30 °C'de olduğu bulunmuş ve 40 °C'den yüksek sıcaklıklarda aktivitenin azaldığı gözlenmiştir. pH ve sıcaklık stabilite çalışmaları için 30 °C sıcaklık ve pH 8'de yapılan deneyler sonucu enzim aktivitesinin 2-4 saat arası stabil kaldığı gözlenmiştir. Ortamda MnCl<sub>2</sub> varlığında 20 dk ön inkübasyon sonucu enzim aktivitesinin % 60, NH<sub>4</sub>Cl varlığında % 4 ve CaCl<sub>2</sub> varlığında ise yaklaşık % 14 arttığı görülmüştür. 1 saat ön inkübasyon sonucu aktivitenin ortamda MnCl<sub>2</sub> varlığında yaklaşık % 18, CaCl<sub>2</sub> varlığında % 8, NH<sub>4</sub>Cl varlığında % 3, MgCl<sub>2</sub> varlığında % 9 arttığı gözlenmiştir. Organik çözücülerden hekzan ortama eklendiğinde aktivite yaklaşık % 80 artmaktadır. % 80 yoğunlukta yapılan amonyum sülfat çöktürmesinde enzim aktivitesinin yüksek olduğu ve yapılan SDS-PAGE çalışmaları sonucu yaklaşık 20, 80 ve 225 kDa büyüklüklerinde 3 farklı proteaz bandı bulunmuştur.



## KAYNAKLAR

- ADINARAYANA, K., Ellaiah, P. ve Prasad, S.D. 2003. Purification and Partial Characterization of Thermostable Serine Alkaline Protease from a Newly Isolation *Bacillus subtilis* PE-11. *AAPS Pharmscitech* 4 (4): 1-9.
- AEHLE, W. 2004. *Enzymes in Industry Production and Applications*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
- AHMETOĞLU, N. 2011. *Bacillus cereus* KG5'in Proteaz Enzimi Üzerine Çalışmalar. Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Diyarbakır.
- ALPAN, G. L. 2008. Bazı Ekstrem Termofil Anaerobik Bakterilerin Alkali Proteazlarının Özelliklerinin Belirlenmesi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- ASKER, M., M.S., Mahmoud, M.G., Shebwy, K.E. ve Abd el Aziz, M.S. 2013. Purification and Characterization of Two Thermostable Protease Fractions From *Bacillus megaterium*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 11 (2): 103-109.
- AYGAN, A. 2008. Haloalkalofil *Bacillus* sp. İzolasyonu, Amilaz, Selüloz ve Ksilanaz Enzimlerinin Üretimi, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulamalarda Kullanılabilirliği. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Adana.
- BEQ, Q.K., ve Gupta, R. 2003. Purification and characterization of an oxidation stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*. *Enzyme and Microbial Technology* 32 (2): 294-304.

- BEQ, Q.K., Shai, V. ve Gupta, R. 2003. Statistical Media Optimization and Alkaline Protease Production from *Bacillus mojavensis* in a Bioreactor. *Process Biochemistry* 39 (2): 203-209.
- BERKELEY, R. C.CW. ve Logan, N. 1997. *Bacillus*, *Alicyclobacillus* and *Paenibacillus*. In: Emmerson A.M., Hawkey P.M., Gillespie S.H. (Editors). *Principles and practice of Clinical Bacteriology*. Chister: Wiley, 185 p.
- BHAT, M.K. 2000. Cellulase and Related Enzymes in Biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18 (5): 355-383.
- CASTROA, H., Abreu, P., Geraldo, R., Martins, R., Santos, R., Loureiro, N., Cabral, L. ve Rodrigues, C. 2010. Looking at the Proteases From a Simple Perspective. *Journal of Molecular Recognition* 24 (2): 165-181.
- CERA, D. E. 2009. Serine Proteases. *IUBMB Life*, 61(5): 510-515.
- CHERRY, J.R. ve Fidantsef, A.L. 2003. Directed Evolution of Industrial Enzymes, an Update. *Current Opinion in Biotechnology* 14 (4): 438-443.
- ÇELİK, N. 2006. *Bacillus clausii* GMBAE 42'den saflaştırılan Alkalın Proteazın termal inaktivasyon kinetiğinin belirlenmesi ve  $\text{Cu}^{+2}$  iyonları ile termostabilizasyonu. Kocaeli Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli.
- DANIELS, M. J. 1992. Paper Technology 33 (6): 14-17.
- DEMAIN, A.L. ve Solomon, N.A. 1981. In *Industrial Microbiology and the Advent of Genetic Engineering*. Scientific American, Freeman and Company, San Francisco, pp. 3-14.

- EDWARDS, D.R., Handsley, M.M. ve Pennington, C.J. 2008. The ADAM metalloproteinases. *Molecular Aspects Medicine* 29(5): 258-289.
- ERASLAN, A., Kazan, D., Denizci, A.A., Öztürk, D.C., ve Karahan, N. 2005. *Enzim Saflaştırmasında Temel Yöntemler*. 8. Uygulamalı Eğitim Kursu Kitabı. TÜBİTAK Fen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü, Kocaeli.
- FRIKHA, B.G., Sellami-Kamoun, A., Fakhfakh, N., Haddar, A., Manni, L. ve Nasri, M. 2005. Production and Purification of a Calcium-Dependent Protease from *Bacillus cereus* BG1. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 32 (5): 186–194.
- FURLAN, S. A. ve Pant, H. K. 2006. Enzyme Technology: General Properties of Enzymes, Springer Science and Business Media, Inc., New York, pp. 11-37.
- GABDRAKHMANOVA, L., Innokentii, V., Vishniakov, M., Sharipova, N., Balaban, S., Kostrov, I., Leschinskaya, 1999. Biosynthesis and Localization of glutamyl endopeptidase from *Bacillus intermedius*. *Microbios* 100 (396): 97– 108.
- GARRITY, G. M. 2004. Taxonomic Outline of the Prokaryotes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second Edition, Release 5.0, Springer-Verlag, pp. 529-531, New York.
- GENÇKAL, H. 2004. Studies on Alkaline Protease Production from *Bacillus* sp. İzmir Teknoloji Enstitüsü, Biyomühendislik ve Biyoteknoloji Bölümü, Yüksek Lisans Tezi, İzmir.
- GERÇEKER, D. 1999. *Bacillus*. Ustaçelebi, Ş. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Güneş Kitapevi, Ankara.

- GHORBEL, B., Kamoun, A. ve Nasri, M. 2003. Stability Studies of Protease from *Bacillus cereus* BG1. *Enzyme and Microbial Technology* 32 (2003): 513-518.
- GUPTA, R., Beg, Q.K. ve Lorenz. P. 2002. Bacterial Alkaline Proteases: Molecular Approaches and Industrial Applications. *Application Microbiology Biotechnology* 59 (1): 15–32.
- GÜMÜŞEL, F. 2002. Biyoteknoloji, genetik ve sağlık sektörü. *Kocaeli Sanayii için Teknolojik Uzgörü Ortak Projesi*, 73-135.
- HADDAR, A., Agrebi, R., Bougatef, A., Hmidet, N., Kamoun, S.A. ve Nasri M. 2009. Two detergent stable alkaline serine-proteases from *Bacillus mojaviensis* A21: Purification, characterization and potential application as a laundry detergent additive. *Bioresource Technology* 100 (13): 3366-3373.
- HORIKOSHI, K. 1999. Alkaliphiles: some Applications of Their Products for Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63 (4): 735-750.
- JELLOULI, K., Ghorbel-Bellaaj, O., Manni, L., Agrebi, R., Nasri, M. ve Ayed, H. B. 2011. “Alkaline protease from *Bacillus licheniformis* MP1: Purification, Characterization and Potential Application As a Detergent Additive and for Shrimp Waste Deproteinization”, *Process Biochemistry* 46 (6): 1248–1256.
- JOHN, F. K. 1987. Enzyme Technology. H. J. Rehm ve G. Reed (Editors), *Biotechnology*, Vol. 7A. pp. 37-62. New York.

- JOO, H. S., Ganesh, C., Kumar, A. ve Gun-Chun, P. 2002. Optimization of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*. *Applied Biochemistry Biotechnology* 38 (2002): 155-159.
- JOSEPHINE, S.F., Ramya V.S., Neelam, D., Sures, B.G., Siddalingeshwara, K.G., Venugopal, N. ve Vishwanatha, T. J. 2012. Isolation, production and characterization of protease from *Bacillus* sp. isolated from soil sample. *Journal of Microbiology Biotechnology Research* 2 (1):163-168.
- KATI, H., Karaca B. ve Gülşen, Ş. H. 2016a. Topraktan izole edilen *Bacillus* türlerinin tanımlanması ve biyolojik özelliklerinin araştırılması, *SAÜ Fen Bilimleri Dergisi* 20 (2): 281-290.
- KATI, H., Asar R. ve Şen Kaya S. 2016b. Characterization of multiple extracellular proteases isolated from *Bacillus thuringiensis* strain Y25. *Research Journal of Biotechnology* 11 (2).
- KAUR, S., Vohra, R. M., Kapoor, M., Beg, Q. K. ve Hoondal, G. S. 2001. Enhanced Production and Characterization of a Highly Thermostable Alkaline Protease from *Bacillus* sp. P-2. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 17 (2): 125-129.
- KIM, S., Kim, Y. ve Rhee, I. 2001. Purification and Characterization of a Novel Extracellular Protease from *Bacillus cereus* KCTC 3674. *Archives of Microbiology* 175 (6): 458-461.
- KIRAN, Ö. E., Çömlekçioğlu, U. ve Dostbil, N. 2006. Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Endüstrideki Kullanım Alanları. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, *Fen ve Mühendislik Dergisi* 9 (1): 12-19.
- KIRK, O., Borchert, T.V. ve Fuglsang, C.C. 2002. Industrial Enzyme Applications. *Current Opinion in Biotechnology* 13 (4): 345-351.

- KUMAR, C.G. ve Takagi, H. 1999. Microbial Alkaline Proteases: From a Bioindustrial Viewpoint. *Biotechnology Advances* 17 (1999): 561-594.
- KUMAR, D.J. M., Venkatachalam, K., Govindarajan, N., Balakumaran, M.D. ve Kalaichelvan P.T. 2012. "Production and Purification of Alkaline Protease from *Bacillus* sp. MPTK 712 Isolated from Dairy Sludge". *Global Veterinaria* 8 (5): 433-439.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavages of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
- LOGAN, N. A. ve Turnbull, P.C.B. 1999. *Bacillus* and recently derived genera. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (Editors). *Manual of Clinical Microbiology*, Washington.
- MADIGAN, M. T. ve Martinko, J.M. 2010. Prokaryotik Çeşitlilik: Bacteria. (Cumhur ÇÖKMÜŞ Çeviri Editörü). *Mikroorganizmaların Biyolojisi*, Palme Yayıncılık, Ankara.
- MAHAJAN, R. ve Badgular, S. 2010. Biological aspects of proteolytic enzymes: A review. *Journal of Pharmacy Research* 3 (9): 2048-2068.
- MALA, M. ve Srividya, S. 2010. Partial purification and properties of a laundry detergent compatible alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* species Y. *Indian Journal of Microbiology* 50 (3): 309–317.
- MORADIAN, F., Khajeh K., Naderi-Manesh H. ve Sadeghizadeh M. 2009. "Isolation, Purification and Characterization of a Surfactants-, Laundry Detergents- and Organic Solvents-Resistant Alkaline Protease from *Bacillus* sp. HR-08". *Applied Biochemistry and Biotechnology* 159 (1): 33–45.

- MOTTA, H. ve Punj, V. 1998. Isolation And Partial Characterization of A Thermostable Extracellular Protease of *Bacillus polymyxa* B-17. *International Journal of Food Microbiology* 42 (3): 139–145.
- NADEEM, M., Qazi, J.I., Baig, S. ve Syed, Q. 2008. Effect of Medium Composition on Commercially Important Alkaline Protease Production by *Bacillus licheniformis* N-2. *Food Biotechnology Biotechnology* 46 (4) 388–394.
- NASCIMENTO, W.C.A. ve Martins, M.L.L. 2004. Production and Properties of an Extracellular Protease from Thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology* 35 (2003): 91-96.
- OKUMUŞ, V. 2004. *Citrullus lanatus* (KARPUZ) ve *Cucumis melo* L (KAVUN) Kabuğu Kullanılarak Katı-Faz Fermentasyonu tekniği (SSF) ile Toprakta İzole Edilen *Bacillus* sp.'den Alkalın Serin Proteaz Eldesi. Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Diyarbakır.
- ÖZTÜRK, M. H. 2005. Partial Purification and Characterization of Alkaline Proteases from Isolated *Bacillus* Strains. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.
- PALONEN, H. ve Viikari, L. 2004. Role of Oxidative Enzymatic Treatments on Enzymatic Hydrolysis of Softwood. *Biotechnology and Bioengineering* 86 (5): 550-557.
- QADAR, S. A., Shireen, E., Iqbal, S. ve Anwar, A. 2009. Optimization of protease and lipase production by *Bacillus pumilus* SG2 isolated from an industrial effluent. *Indian Journal of Biotechnology* 8 (3): 286-290.
- RAHMAN, R., Geok, L., Basri, M. ve Salleh, A. 2006. An Organic Solvent-Stable Alkaline Protease from *Pseudomonas aeruginosa* strain K: Enzyme

Purification and Characterization. *Enzyme and Microbial Technology* 39 (2006): 1484-1491.

RAO, M. B., Tanksale, A. M., Gathe, M. S. ve Deshpande, V. V. 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62 (3): 597-635.

RAO, S., Sathish, T., Ravichand, R.A. ve Prakasham, R. 2009. Characterization of Therma and Detergent Stable Serine Protease from Isolated *Bacillus circulans* and Evoluation of Eco-friendly Applications. *Process Biochemistry* 44 (3): 262-268.

REDDY, L. Wee, Y. ve Ryu, H. 2008. Purification and Characterization of an Organic Solvent and Detergent-tolerant Novel Protease Produced by *Bacillus* sp.RKY3. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 83 (11): 1526-1533.

SALLEH, A. B. 2006. Protease: Introduction. Editörler: Salleh, A.b., Rahman, R.N.Z.R.A., Basri, M. *New Lipases and Proteases*. Nova Biomedical, pp. 23-39, New York.

SANGEETHAA, R. ve Phil, M. 2008. Optimization of protease and lipase production by *Bacillus pumilus* SG 2 isolated from an industrial effluent. *The Internet Journal of Microbiology* 5 (2).

SARI, E. 2011. *Bacillus circulans* M34'ten Proteaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Ankara Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.

SARIKAYA ÖZTÜRK, S. B. 2006. Yabani Çuha Bitkisininin Çiçeklerinden Proteaz Enziminin Saflaştırılması, Kararkterizasyonu ve Peynir Üretiminde Kullanılabilirliğini Araştırılması. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum.



- SARNAIK, S. S., Nilegaonkar, S.S., Zambare, V.P., Kanekar, P.P. ve Dhakephalkar, P. K. 2006. Production and partial characterization of dehairing protease from *Bacillus cereus* MCM B-326. *Bioresource Technology* 98 (6): 1238-1245.
- SEIFZADEH, S., Sajedi, R. H. ve Sariri, R. 2008. Isolation and Characterization of Thermophilic Alkaline Proteases Resistant to Sodium Dodecyl Sulfate and Ethylene Diamine Tetraacetic Acid from *Bacillus* sp. GUS1. *Iranian Journal of Biotechnology* 6 (4).
- SEVİNÇ, N. 2010. Türkiye Topraklarından İzole Edilen *Bacillus* Suşlarından Proteaz Üretimi, Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Bursa.
- SIDHU, G.S., Sharma, P., Chakrabarti, T. ve Gupta, J. K. 1997. Strain Improvement for the Production of a Thermostable  $\alpha$ -Amylase Enzyme. *Microbiology and Technology* 21: 525-530.
- SILVERTHORN, C.F. 2004. Parsons T.L., *Biomedical Chromotography* pp. 23-27.
- TEKİN, N. 2008. Türkiye Kaynaklı *Bacillus spp.*'lerin Alkalen Proteaz Üretim Kapasiteleri ve Enzimlerin Kısmen Karakterizasyonu. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- TOLAN, M. 2015. Mikrobiyal Kökenli Proteaz Enzimi, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Tokat.
- TSUCHIDA O., Yamagota Y., Ishizuka J., Arai J., Yamada J., Takeuchi M. ve Ichishima E. 1986. An alkaline protease of an alkalophilic *Bacillus* sp., *Current Microbiolog* 14 (1): 7-12 .

- ULUKAYA, E. 2003. *Apoptozis Ders Notları*. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Bursa.
- VENUGOPAL, M. ve Saramma, A.V. 2007. An alkaline protease from *Bacillus circulans* BM15, Newly Isolated From a Mangrove Station: Characterization and Application in Laundry Detergent Formulations. *Indian Journal of Microbiology* 47: 298–303.
- WARD, O. P. 1985. *Proteolytic Enzymes in Comprehensive Biotechnology*. Edited by M. Moo-Young, Pergaman Press, Great Britain. 3: 798-818.
- WISEMAN, A. 1987. *Handbook of Enzymes Biotechnology*. Second Edition. Chapter 3. The Application of Enzymes in Industry, pp. 274-373, New York.
- WOODLEY, J. M. 2000. Advances in Enzyme Technology-UK Contributions. (Thscheperi editör). *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 94-107.
- YANG, J., Shih, I., Tzeng, Y. ve Wang, S. 2000. Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. *Enzyme and Microbial Technology* 26 (5-6): 406-413.
- YARDIMCI, E. 2014. *Geobacillus subterraneus* ile Proteaz Üretimi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir.
- YAVUZ, S. 2013. Bir Maya İzolatından Proteaz Üretimi, Saflaştırılması ve Kısmi Karakterizasyonu. Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Fakültesi, Yüksek Lisans Tezi, Sivas.
- YILDIRIM, A., Bardakçı, F., Karataş, M. ve Tanyolaç, B. 2007. *Moleküler Biyoloji*, Nobel Bilim ve Araştırma Merkezi Yayın No:2.

YILDIRIM, S. 2010. Endüstride Proteazların Kullanım Alanları.

YOSSAN, S., Reungsang, A. ve Yasuda, M. 2006. Purification and characterization of alkaline protease from *Bacillus megaterium* isolated from Thai fish sauce fermentation process. *Science Asia* 32 (4): 379-385.



## ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında Giresun'da doğdu. İlk ve orta öğretimimi Giresun'da tamamlayarak Giresun Hamdi Bozbağ Anadolu Lisesi'nden 2009 yılında mezun oldu. 2009 yılında Mersin Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü kazandı. 2013 Mayıs döneminde aynı bölümden mezun oldu. 2013 Eylül döneminde Giresun Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans programına kaydoldu.

