



**GEOBACILLUS STEAROTHERMOPHILUS AH6
PROTEİN ÜRETİMİ VE OPTİMİZASYON**

Yeşim DALI

Danışman: Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN
Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı
2022
(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİKANA BİLİM DALI

**GEOBACILLUS STEAROTHERMOPHILUS AH6'DAN PROTEAZ ÜRETİMİ VE
OPTİMİZASYONU**

(Production and Optimization of Protease From Geobacillus Stearothermophilus AH6)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yeşim DALI

Danışman: Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

Erzurum
Temmuz, 2022

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Yeşim DALI tarafından hazırlanan “*GEOBACILLUS STEAROTHERMOPHILUS AH6* PROTEİN ÜRETİMİ VE OPTİMİZASYON” başlıklı çalışması 08 / 08 / 2022 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı, Genetik Bilim Dalında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN Atatürk Üniversitesi	Aslı Islak İmzalıdır
Danışman:	Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN Atatürk Üniversitesi	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Özkan BALTACI Atatürk Üniversitesi	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Dr. Öğr. Üyesi Enver Fehim KOÇPINAR Muş Alparslan Üniversitesi	Aslı Islak İmzalıdır

Enstitü Yönetim Kurulunun
.../.../.... tarih ve sayılı
kararı.

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan
CEYHUN
Aslı Islak İmzalıdır

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi olarak *Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN* danışmanlığında sunulan “*Geobacillus Stearothermophilus AH6 ‘dan Protein Üretimi ve Optimizasyonu*” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	28	30
Kuramsal Temeller	0	30
Materyal ve Metot	19	35
Araştırma Bulguları ve Tartışma	0	20
Sonuçlar ve Öneriler	0	20
Tezin Geneli	23	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Sunulan bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ettiğimizi beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Yeşim DALİ	Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN
8.8.2022	8.8.2022
İmza: Aslı Islak İmzalıdır	İmza: Aslı Islak İmzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayımlanmasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../... tarih vesayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../... tarih vesayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu alışma, Atatürk Üniversitesi Fen Fakóltesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Araştırma Laboratuvarında uygulanmış ve tamamlanmıştır.

Tez çalışmam boyunca yakın ilgisini esirgemeyen, manevi olarak güçlendiren, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, büyük emeği olan çok değerli sayın hocam Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN'a ve çalışmaların sürece laboratuvar imkanlarını sağlayan bölüm başkanımız sayın hocam Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e,

Çalışmalarım süresince bana hep destek olan Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Özkan BALTACI'ya, laboratuvar çalışmalarımda her zaman yanımda olan yüksek lisans öğrencisi Saadet Hilal ÖNDER'e çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans çalışmalarım boyunca her daim yanımda olan, bana güç veren biricik eşim Engin DALI'ye, güzel desteklerinden dolayı canım kızım Fatma Sena DALI'ye ve tüm duygularımı benimle beraber yaşayan canım annem Ayşe MEO'ya çok teşekkür ederim.

Yeşim DALI

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***GEOBACILLUS STEAROTHERMOPHILUS* AH6'DAN PROTEAZ ÜRETİMİ VE OPTİMİZASYONU**

Yeşim DALI

Danışman: Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

Amaç: Bu yüksek lisans tez çalışmasında; termofilik bakteri olarak tanımlanmış olan *Geobacillus stearothermophilus* AH6 suşu katı besiyerinde üretilip, proteaz üretimi sağlanıp, optimizasyon çalışmaları yapıldı.

Yöntem: *Geobacillus stearothermophilus* AH6 TSA katı besiyerinde 55°C'de 24 saat inkübe edilerek üretildi. TSB besiyerinde büyütüldü ve çalışmanın devamında nutrient broth-caseinli besiyerinde proteaz üretimi sonrası, optimizasyon çalışmaları yapıldı. Optimizasyon çalışmalarında inkübasyon süresi, optimum pH ve sıcaklık değeri, azot ve karbon kaynağı miktarı kriterleri incelendi. Sonuçlarının grafikleri çizilerek, değerlendirilmiştir.

Bulgular: Optimizasyon çalışmalarında inkübasyon yaşı 5gün, optimum pH 5,0 ve sıcaklık 55° olarak belirlendi. Azot kaynağı olarak casein kullanıldı ve optimum miktarı %2g olarak tespit edildi. Karbon kaynağı için atık ürün değerlendirmek amaçlı kurutulmuş karpuz kabuğu kullanıldı, optimum miktarı 5g olarak belirlendi.

Sonuç: Tez çalışması sonucunda elde edilen bulgular incelendiğinde endüstriyel alanda biyoteknolojik çalışmalarda ve atık ürünlerin kullanımı açısından uyumlu olduğu görülmüştür. Bu sonuçlardan dolayı çalışmamızın gelecekteki biyoteknolojik uygulamalarda katkı sağlayacağını düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Termofilik bakteri, Enzimatik optimizasyon, Enzimatik karakterizasyon, Alkalen proteaz, *Geobacillus stearothermophilus*

Temmuz 2022, 66 sayfa

ABSTRACT

MASTER THESIS

GEOBACILLUS STEAROTHERMOPHILUS AH6'DAN PROTEAZ ÜRETİMİ VE OPTİMİZASYONU

Yeşim DALI

Supervisor: Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

Purpose: In this master's thesis; *Geobacillus stearothermophilus* AH6 strain, which is defined as thermophilic bacteria, was grown in solid medium, protease production was ensured, and optimization studies were carried out.

Method: *Geobacillus stearothermophilus* AH6 was produced by incubating in TSA solid medium at 55°C for 24 hours. TSB was grown in medium and optimization studies were carried out after protease production in nutrient broth- casein medium. In the optimization studies, incubation, optimum pH and temperature value, nitrogen and carbon source amount criteria were examined. The results were evaluated by drawing graphics.

Findings: In the optimization studies, the incubation age was determined as 5 days, the optimum pH was 5,0 and the temperature was 55°C. Casein was used as a nitrogen source and the optimum amount was determined as %2g. Dried watermelon peel was used to evaluate waste product for carbon source, the optimum amount was determined as 5g.

Results: When the findings obtained as a result of the thesis study were examined, it was seen that they were compatible in terms of biotechnological studies in the industrial field and the use of waste products. These results suggest that our study will contribute to future biotechnological applications.

Keywords: Thermophilic bacteria, Enzymatic Optimization, Enzymatic Characterization, alkaline protease, *Geobacillus stearothermophilus*

July2022, 66 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	x
GİRİŞ.....	1
Enzim	1
Enzimlerin sınıflandırılması.....	3
Termostabilenzimler	4
Amilaz.....	5
Selülaz.....	6
Ksilenaz.....	6
Lipaz.....	7
Proteaz.....	7
KURAMSAL TEMELLER.....	24
MATERYAL VE METOD	31
Materyal	31
Çalışmada kullanılan organizma	31
Kullanılan kimyasallar	31
Kullanılan ekipman ve cihazlar.....	31
Yöntemde Yapılan İşlemler	32
Petride bakterinin üretilmesi ve büyütülmesi.....	32
Besiyerinde bakterinin proteaz aktivitesinin belirlenmesi	32
Bakterinin alkalın proteaz aktivitesinin ölçümünün yapılması	32
Proteaz enziminin karakterizasyon çalışmaları	33
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	36
Kullanılan Bakterinin Petride Büyütülmesi ve Üretilmesi.....	36
Besiyerindeki Bakterinin Proteaz Aktivitesinin Ölçümü.....	36

Proteaz Enzimi İçin Optimum İnkübasyon Süresi Bulunmasına Yönelik Sonuçlar.....	38
Proteaz Enzimi İçin Optimum pH Değerinin Bulunmasına Yönelik Sonuçlar.....	39
Proteaz Enzimi İçin Optimum Azot Kaynağı Miktarının Bulunmasına Yönelik Sonuçlar.....	40
Proteaz Enzimi İçin Optimum Sıcaklık Bulunmasına Yönelik Sonuçlar	40
Proteaz Enzimi İçin Optimum Karbon Kaynağı Miktarının Bulunmasına Yönelik Sonuçlar.....	42
SONUÇ VE ÖNERİ	43
KAYNAKLAR.....	45
ÖZGEÇMİŞ.....	53



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Katalizledikleri Reaksiyon Tipine Göre Proteazlar.....	13
Tablo 2. Proteazların Katalizledikleri Bölgenin Yapısına Göre Gruplandırılması.....	17
Tablo 3. Ticari Subtisin Enzimlerinin Deterjanlarda Kullanımı	20
Tablo 4. Deri Endüstrisinde Kullanılan Bazı Bacillus Cinsleri	21



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Enzim yapısının şematik gösterimi	1
Şekil 2. TSA besiyerinde 24 saatin sonunda <i>G.stearothermophilus</i> AH6	36
Şekil 3. Nutrient broth – casein milk powder besiyerinde 5.günde <i>G.stearothermophilus</i> AH6	37
Şekil 4. Proteaz aktivite ölçümü sonunda kör ve enzim çözeltisi arasındaki renk farkı	37
Şekil 5. Proteaz eniziminin optimum inkübasyon yaşı için yapılan aktivite ölçüm grafiği	38
Şekil 6. İnkübasyon yaşı 4. (18), 5. (19) ve 6. (20) günlerindeki aktivite test ölçüm sonundaki renk değişimleri	38
Şekil 7. Proteaz enziminin optimum pH değerinin aktivite ölçüm değeri	39
Şekil 8. Proteaz eniziminin optimum azot kaynağı miktarının aktivite ölçüm grafiği	40
Şekil 9. Proteaz eniziminin optimum sıcaklık değerinin aktivite ölçüm grafiği	41
Şekil 10. Proteaz eniziminin optimum karbon kaynağı miktarının aktivite ölçüm grafiği	42

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

A.	: <i>Aeribacillus</i>
B.	: <i>Bacillus</i>
Ba²⁺	: Baryum
Ca²⁺	: Kalsiyum
Dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
E.C.	: Enzim komisyon numarası
Fe²⁺	: Demir
g	: Gram
Gln	: Glutamin
Glu	: Glutamik asit
Hg²⁺	: Civa
HCl	: Hidroklorik asit
kDa	: Kilodalton
K_M	: Enzimin substrata ilgisini gösteren sabit değeri
Ma²⁺	: Magnezyum
Mn²⁺	: Mangan
mg	: Milligram
ml	: Mikrolitre
nm	: Nanometre
NA₂CO₃	: Sodyum karbonat
NaOH	: Sodyum hidroksit
NB	: Nutrient broth
RNA	: Ribonükleik asit
Rpm	: Dakikada devir sayısı
Sr²⁺	: Stronsiyum
TCA	: Trikloroasetik asit
TSA	: Tryptone soya agar
TSB	: Tryptone soya broth
V_{max}	: Maksimum hız değeri
Zn²⁺	: Çinko

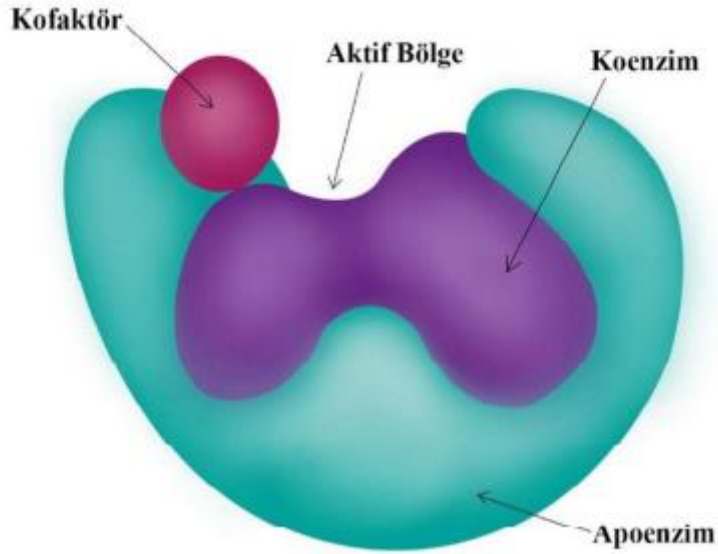
% : Yüzde
°C : Santigrat derece
µg : Mikrogram
µM : Mikrometre



GİRİŞ

Enzim

Enzimler, canlı hücrelerce yapılan ve yaşamın sürekliliği için gerekli bir reaksiyonu katalize eden protein veya protein benzeri yapıya sahip olan biyokatalizör molekülleridir. Enzim molekülleri, bir hücreyi diğer hücrelerden farklı olan özelliklerine ait bilgilerin DNA'dan aktarımını sağlayan en öneme sahip araçlardır. Katalitik RNA moleküllerinin (ribozimler) küçük bir grubu olmayan ve geriye kalan tüm enzimler protein yapısında bulunmaktadır. Enzimlerin protein yapısında olduğunu ve DNA'dan şifrelendiği için hücredeki bütün olaylar DNA seviyesinde kontrolleri yapılmaktadır. Enzimleri incelediğimizde sadece katalizör olarak belirtmek tanımlama için eksik olacaktır. Protein gruplarının en büyük ve en çok özelleşmiş grubunu oluştururlar (Keha & Küfevioğlu, 2000).



Şekil 1. Enzim yapısının şematik gösterimi(PalmerandBonner 2007)

Enzimlerin doğa dostu olmaları ve endüstri-sanayi alanlarındaki çok fazla uygulamalarından dolayı yeşil kimyasallar olarak belirtilmektedir (Rai andMukherjee 2009). Enzimler ilk çalışmalarında ferment olarak isimlendirilmiş olup daha sonraki zamanlarda belirli bir enzimle ilk çalışmayı 1835 yılında S.S. Berzeliusyapmış olup, enzimler için katalizör terimini kullandı. Devamında Künhe (1878) ilk enzim tanımını kullandı (Önal 2010).Enzimoloji alanında en önemli gelişmelerden, 1926yılında J.B.Sumner'inüreazenzimini "jackBean " bitkisinden elde edilip kristallendirmesini yaptıktan sonra protein yapısında

bulunan bileşik ürün olduğunu ortaya koymuştur. İlk zamanlarda şüpheli tepkilere maruz kalan sonuçlar 1930 – 1936 yılları arasında j.Northrop'un pepsin, tripsin ve kimotripsin enzimlerini kristallendirmesi ve protein yapısında olduklarını kesin olarak sonuçları ortaya koymasıyla doğrulanmasını yapmışlardır (Keha & Küfevioğlu, 2000).

Her enzimin maksimum aktivitelerini göstermiş olduğu farklı pH, sıcaklık değerleri vardır. Bu değerlerin üstünde veya altındaki ortam koşullarında aktiviteleri düşer (Bhat 2000). Endüstride enzimlerin kullanımında yüksek sıcaklıklarda işlemleri yapabilmek pek çok avantaj sağlar. Sıcaklığın artmasıyla organik bileşiklerin çözünürlüğü, viskositenin düşmesini ve organik bileşiklerde difüzyon katsayısının artmasını da sağlayarak biyolojik olarak kullanılabilmesi açısından önemlidir (Niehaus *et al.* 1999). Enzimler ile katalize edilen uygulamalarda sıcaklık değeri 0-40°C arasında reaksiyon hızı yükselirken, 40°C'de enzim zarar görmeye başlar sonrasında reaksiyon yavaşlar ve 60°C'de enzim bütünüyle bozularak reaksiyonun durmasına sebep olur. 40°C enzim için optimum ısıdır (Bhat 2000). Bu durumda mikroorganizmalardan elde edilen enzimlere büyük ilgi oluşmasını sağlar.

Enzimler endüstriyel-sanayi alanlarında çok geniş bir pazar alanına sahiptirler. Enzimlerin endüstriyel-sanayi uygulamalarda kimyasal katalizörlere göre bazı avantajları şunlardır:

1. Bazı stereo özgün reaksiyonları, enzimler olmadan gerçekleştirilemez.
2. Substrat özgünlüğünde; istenmeyen yan ürünlerin oluşumunun önüne geçerek maliyeti düşürür ve çevre sorunu oluşturmaz.
3. Proses koşullarında ısıya karşı duyarlı substratların bozulma ihtimalini azaltır, enerji ihtiyaçlarını ve korozyon etkilerini düşürür.
4. Reaksiyon hızı yüksek olup ve maliyeti düşük tutar (Önal 2010).

Enzimlerin maliyet bakımından ucuz olması, *in vitro* koşullarda aktifliği, yüksek katalitik aktivitesi, toksik etkilerinin olmaması ve yüksek derecede substrat 4 spesifikliği göstermeleri gibi avantajları çeşitli alanlarda kullanılmasına olanak sağlıyor. Endüstri – sanayideki kullanımlarına bakıldığında meyve suyu ve süt üretiminde, tıpta medikal olarak teşhis-tedavi süreçlerinde, temizlik malzemeleri üretiminde, biyoyakıt – biyolojik silah alanlarında, fotoğraf-kağıt-ziraat alanlarında geniş bir kullanıma sahiptir (Wiseman 1987).

Endüstriyel enzimleri ve kullanımları incelenmektedir;

- Deterjan endüstrisinde; proteaz enzimi proteinin, amilaz enzimi nişastanın, lipaz enzimi yağların uzaklaştırılması uygulamalarında ve selüloz enziminde renklerin ağartılması ve temizlenmesi işlemlerinde,
- Kağıt endüstrisinde; lipaz enzimi pitch işleminin kontrolünde, amilaz enzimi nişasta kaplama uygulamalarında,
- Gıda endüstrisinde; proteaz enzimi sütün lezzetlendirilmesi ve tatlandırılmasında, lipaz enzimi peynirin lezzetlendirilmesinde, laktaz enzimi laktozun uzaklaştırılmasında ve transglutaminaz enziminde visko-elastik yapı özelliklerinin modifiye edilmesinde,
- Fırıncılık endüstrisinde; amilaz enzimi ekmek hamurunun kabarması ve yumuşaklığının sağlanmasında, ksiniilaz enzimi hamurun işlenmesinde, fosfolipaz enzimi hamurun kararlılığının oluşturulmasında, proteaz enzimi bisküvinin üretiminde ve glukoz oksidaz enziminde hamurun yapısının güçlendirilmesinde,
- Nişasta ve yakıt endüstrisinde; amilaz enzimi nişastanın sakkarifikasyonun sağlanmasında, glukozizomeraz enzimi glukoz-fruktoz dönüşümlerinde, ksiniilaz enzimi viskozitenin düşürülmesinde ve amiloglukozidaz enziminde şekerleştirilme işlemlerinde,
- Meşrubat endüstrisinde, pektinaz enzimi pektinin yıkımında, amilaz enzimi meyve suyu içeceklerinin yapımında, laktaz enzimi meyve sularının görünümünün berraklaştırılmasında,
- Hayvan besleme endüstrisinde, fitaz enzimi fitik asidin yıkımının yapılmasında, ksiniilaz ve glukozidaz enzimi sindirimin kolaylaştırılmasında,
- Tekstil endüstrisinde, selüloz enzimi pamuğun yapısının yumuşatılmasında, amilaz enzimi kumaşların ağartılması ve taşlama işlemlerinde, peroksidaz enzimi kumaşlardaki fazla boyaların uzaklaştırılmasında ve pektatliiaz enzimi kumaş üzerindeki kirlerin giderilmesi amaçlı kullanılmaktadır (Önal 2010).

Enzimlerin sınıflandırılması

Enzimler, öncelikle katalitik etkilerini gösterdikleri substrat denilen bileşiklerin isminin sonuna 'az' eki eklenip adlandırıldı. Enzimolojik alanındaki çalışmaların yapılması ve çoğu enzimin ortaya çıkmasıyla sistematik olarak bir adlandırılmaya ihtiyaç olduğu ortaya çıktı. Zamanla enzimlerin, uluslararası bir enzim komisyonu (E.C.) tarafından, katalizledikleri reaksiyon tipleri ve mekanizmalarına göre gruplandırılması yapıldı.

Enzimlerin sistematik olarak adlandırmanın başlıca özellikleri ve kuralları şunlardır:

- a. Enzimin ismi iki kısımda verilir. Adının ilk bölümü substrat, ikinci bölümü katalizlenen reaksiyonun tipinin sonuna '-az' eki getirilmiştir. Substratların aralarına da iki nokta konularak yazılırlar.
- b. Enzim reaksiyonlar ve bu reaksiyonların üzerine etki eden enzimler 6 farklı gruba ayrılır ve her bir grup kendi içerisinde alt gruplara ayrılmıştır.
- c. Her bir enzime sistematik kod numarası uygulanmıştır. Her enzim için E.C. (EnzymeCommission) harflerinden sonra devamında dört rakamdan oluşan bir kod numarasına aittir. Birinci rakam enzimin bağlı olduğu grubu simgelerken, ikincisi kimyasal yapı ve fonksiyonel grubunu, üçüncüsü alıcı grubunu, dördüncüsü ise enzimin aynı üç rakam olan enzimler arasında sırasının gösterilmesini sağlar.
- d. Reaksiyonun oluşumunu açıklayan bir ifade yazılması gerekirse parantez içinde ismin sonuna eklenir.

Enzimlerin kod numaralarına göre sınıflandırılması:

1. Oksidoredüktaz enzimi: İki substrat arasında yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonlarının katalizlenmesini sağlarlar.
2. Transferaz enzimi: Hidrojen dışındaki diğer grupların iki substrat arasındaki transferini katalizlenmesini sağlayan enzimlerdir.
3. Hidrolaz enzimi: Ester, peptid, eter ve glikozid, C-C, C-N, C-O gibi bağlarını bir su molekülünün katılması ile hidrolize edebilmesini sağlayan enzimlerdir.
4. Liyaz enzimi: Hidrolitik olmayan diğer bir işlem ile oluşmuş çift bağ oluşumunu katalizleyen enzim grubudur.
5. İzomeraz enzimi: Molekül içindeki geometrik veya yapısal izomerlerin birbirine dönüştürülmesini katalizleyen enzimlerdir.
6. Ligaz enzimi: GTP ve ATP gibi yüksek enerjili olan birleşiklerden fosfat bağının kopması sonucu açığa çıkan enerji ile iki molekülün birbirine bağlanmasını yapabilen enzim grubudur (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Termostabil enzimler

Endüstride fazlaca kullanılan enzimlerin çoğu mikroorganizmalardan elde edilmektedir (A. Wiseman 1987). Ekstremofilik enzimlerin endüstri alanında kullanımıyla yüksek sıcaklıkta bakteriyel ve viral kontaminasyon riskinin azalması sağlanmış olur. Termostabil protein enzimleri farklı denatüre edici koşullara karşı yüksek koruma gösterirler. Ayrıca bu enzimler çok yavaş katlanmalar yaparlar (B. Van Den Burg 2003; S.Fujiwara 2002;

Haki *et al.*2003). Termotabil enzimler biyolojik olarak zor parçalanabilen ve çözünmesi mümkün olmayan çevresel kirleticilerin var olmasını da engeller (R. Gül-Güven 2007).

Yüksek termotabil bir çok endüstriyel alanda fazla tercih edilen bir özelliktir, çünkü yapılan çalışmalar genelde yüksek sıcaklıklarda (>50 °C) gerçekleştirilir (M.M. Kristjansson and B.Asgersson, 2002).

Termofil kaynaklı elde edilen enzimler dayanıklılıklarından dolayı günümüzde çok fazla tercih edilen ticari olarak kullanılmaktadır. Yüksek sıcaklıklarda yapılan biyoteknolojik ve endüstriyel işlemlerde, organik bileşiklerin çözünürlüğüyle kullanım kolaylığı sağlaması ve difüzyon katsayısının artışı, viskozitenin düşmesini, küçük alanlarda yüksek reaksiyon hızını sağlarlar (R. Gül-Güven 2007; Dc. Demirjian *et al.*2001).

Termotabil proteinlerin sıcaklıklara karşı dayanıklılık stratejileri vardır. Ayrıca mezofilik olanları da benzeyen sekonder ve tersiyer yapılarına sahiptirler. Termotabil proteinler fazlaca yüklü ve hidrofobik aminoasitlerini içerirler (S.Fujiwara 2002). Proteinlerin konformasyonel dayanıklılığı iki zıt etkili faktör arasındaki dengenin sonucuyla oluşmaktadır. Bunlar fleksibilite ve sertlik özellikleridir. Sertlik proteinlerin stabilitelerini ve katalitik aktif yapılarını koruyarak, denatüre edici ortamlarda optimal düzeyde aktif kalmalarını sağlar (M.E. Bruinset *et al.*2001).

Endüstriyel çalışmalarda sanayi-ticari olarak kullanılan enzimlerin %59'unu proteaz enzimleri, %28'ini karbohidraz enzimleri, %3'ünü lipaz enzimleri ve %10'unu ise diğer enzimler oluşturmaktadır. Karbohidraz enzim grubuna giren α -amilaz üretimi %13 ile önemli bir yer oluşturmaktadır (A. Wiseman 1987).

Amilaz

Karbohidraz grubu enzimlerinin en önemli elde edilme kaynağını *Bacillus* cinsi bakteriler oluşturmaktadır. Bir karbohidraz olarak α -amilaz enzimi ticari açıdan kullanılan ilk enzim olmuştur (Radley, 1976; Aira *et al.*1983). Amilaz enzimlerinden α -amilaz enzimi, glikoizomeraz, β -amilaz ve glikoamilaz çeşitleri nişastanın parçalanmasında görevlidirler. Bu enzimlerin üretimi bazı cins bakteri ve mantarlardan sağlanmaktadır (Lee 1996). Amilaz enzimi çeşitlerinden α -amilaz, nişastanın α -1,4 bağlarını parçalayarak α -limit dekstrinlerin, maltoz-maltotrioz ve glikoz yapılarının oluşumunu sağlar. α -amilazların bakteriyel kaynaklı enzimleri fungal kaynaklı olan enzimlere göre sıcaklığa karşı daha çok stabil kalabilmektedirler. Bu stabilite özelliklerinden dolayı çalışılan ve tercih edilen bakteriyel kaynaklı amilaz enzimleri olmuştur (Wiseman 1987). *Bacillus* cinsinin α -amilaz sentezlediği 8 tanesi bilim adamları tarafından karakterize edilmiştir. *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus*

coagulans, *Bacillus caldolyticus*, *Bacillus macerans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus subtilisamylosacchariticus*, *Bacillus licheniformis* ve *Bacillus stearothermophilus* olmaktadır (Coleman and Elliott 1962; Pazur 1965; Matsuzaki *et al.*1974; Borgia and Campell 1978; Grootegoed *et al.*1973; Bliesmer and Hartman 1973; Meer 1972; Saito 1973; Lane and Pirt 1973; Ogasahara *et al.* 1970; Matsuzaki *et al.*1974).

Termostabil α -amilazın endüstriyel sanayide uygulamaları çok fazla tercih edilmektedir. Amilaz ekmek yapımında, tekstil – kağıt sanayisinde, glikoz ve fruktoz şuruplarında, tutkalın üretiminde, nişastanın sıvılaştırılması işleminde ve alkol fermantasyonunda kullanılmaktadır (Bailey and Ollis 1987; Bajpai and Bajpai 1989; Igarashi *et al.* 1998). Ayrıca fırıncılıkta, bira üretiminde, damıtma işleminde de tercih edilmektedir.

Selülaz

Selülaz, bitki biyokütlesinin ortalama %40'ını oluşturmaktadır. Selülazun suya karşı yüksek çekiciliğinin var olmasına rağmen suda çözünmemektedir. Selülazun glikoza, hidrolize edilebilmesi için endoglukanaz, ekzoglukanaz ve β -glukosidaz enzimlerinin sinerjistik çalışması gerekmektedir. (Niehaus *et al.*1999).

Endüstride en çok tercih edilen selülaz *Trichoderma sp.*dir (Teeriet *et al.*1998). Ayrıca *Aspergillus*, *Penicillin*, *Basidiomycetes* ve *Bacillus* suşlarında tercih edilmektedir (Tomme *et al.*1995; Ito 1997). Deterjan alanında renklerin ağartma ve temizlenmesinde, tekstilde kotların taşlanması ve pamukların yumuşatılmasında kullanılmaktadır (Niehaus *et al.*1999).

Ksilenaz

Bitkilerin hücre duvarlarında dışarıdan gelen mikroorganizmaların canlı bitki dokularına girişini engellemek amacıyla bariyer oluşturmaktadırlar (Gamerith *et al.*1992). Bitkinin kendiliğinden bulunduran lignoselülozik bitki biyokütlesinde %20 ve %30 arasını heterojen polisakkaritler grupları ve selülozla ilgili bulunan hemiselülozik yapı materyaller oluşturmaktadır. Biyokütle, dünyadaki yakıt ihtiyacının karşılanmasını sağlayan ve kısa bir döngüye sahip olan doğal kaynaklardır. Ksilen, yüksek bitkilerin hücre duvarında bulunan hemiselülozik kısmının temel bileşeni olup yüksek potansiyalde istenilen ürünlere parçalanabilen ikinci bol kaynak olmaktadır (Yanget *et al.*1995; Salles *et al.*2000). Birçok mantar ve bakteri ksilani parçalamak için ksilenaza ihtiyaç duyarlar (Gamerith *et al.*1992; Salles *et al.*2000).

Ksilenaz, günümüzde çevresel kirliliği azaltmak amacıyla kağıt ağartma endüstrisinde çok fazla tercih edilmektedir. Gıda endüstrisi alanında da geniş bir kullanıma sahiptirler. Hamur ve ekmek yapımında kullanılan buğday unundaki ksilenaz için substrat olan suda çözünmeyen

arabinoxylan (AX)'ın çözünmesi ile hamur pişirmede su emilimini değiştirerek kabarmanın artmasını sağlar (Jeffries *et al.* 1998). Ayrıca şıra ve meyve - sebze sularının arıtılmasında, yem endüstrisinde kullanılır (Wong *et al.* 2000).

Lipaz

Lipaz enzimi, yağ asidi esterlerini ve yağ hücrelerinin hidroliz edilmesini sağlarlar. Lipazlar hidrolizi gerçekleştirirken yağ asitlerinin zincir uzunluğu ve pozisyonu, doyma dereceleri, substratların fiziksel durumuna uygunluğu farklılık gösterirler (Abbas *vd.* 2002).

Lipolitik enzimler süt endüstrisinde, peynir yapımında kullanılan renninin kütesinde, tereyağına aroma kazandırmada, kremalarda, çikolata yapımında, karamel üretiminde, biyomedikal uygulamalarda, deterjan ve deri sanayisinde, biyosensörler ve pestisit yapımında, çevre yönetiminde, kozmetik sanayisinde kullanılmaktadır.

Endüstri alanında en fazla kullanılan lipaz üreticisi mikroorganizmalar; *Candida sp.*, *Rhizopus sp.* *Pseudomonas sp.*, 'dır. Bakteri, küf ve mayaları içeren mikrobiyal flora tarafında fazlaca üretimi olmaktadır. Lipazların biyoteknoloji alanında kullanımının son yıllarda artmasıyla, üretimini arttırmak için mutasyon yardımıyla suş geliştirme çalışmaları çoğalmıştır (Hiolet *al.* 2000).

Proteaz

Proteazlar, proteinlerin içeriğinde bulunan peptid bağlarını hidrolize eden ve organik çözücülerde peptid sentezini katalizlenmesini sağlayan enzimdir (Sookkheo 2000). Proteaz enzimleri doğada bitkisel, hayvansal kalıntıların ve mikrobiyal kalıntıların dekompozisyonunda önemli görevleri vardır. Böylece besin döngüsünü düzenleyip ve bitkilerin besinleri alabilmelerini sağlarlar (Aokiet *al.* 1995). Aynı zamanda ticari olarak da önemli olan hidrolitik enzim olmaktadır (JoshiandSatyanarayana 2012).

Proteolitik enzimler, peptidaz veya proteinaz olarak, farklı protein türlerini kırmak için kullanılan bir enzim türüdür. Bu enzim, protein hidroliz etmek üzere, peptit adı verilen daha küçük zincirlere veya amino asitler adı verilen başka bir küçük üniteye dönüştürülür.

Proteazların reaksiyonları hızlandırma yeteneğe sahip olmak üzere, enzimatik özelliklerini değiştiren pH ile, sıcaklık ve aktivatör veya inhibitör olarak hizmet veren metaller gibi çeşitli faktörlerden etkilenir (A. Oniludeet *al.* 2014). Mikrobiyal proteazlar asit, nötr veya alkaline aittir. Ayrıca, aktivite için pH optimumlarına, aktif bölgelerine ve ortamın bileşimine bağlıdır. Kültür koşulları büyüme ve üretim üzerinde proteazlar bakteri tarafından önemli rol oynar (B. Christudhas Williams 2012).

Proteaz kaynaklarımız bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalardan faydalanarak tüm yaşam biçimlerini içermektedir. Proteazlar doğada yaygın bulunmakta ve mikroplar bir hızlı büyümeleri nedeniyle bu enzimlerin tercih edilen kaynağı, ekimi için gerekli olan sınırlı alan ve yeni üretmek için genetik olarak manipüle edilen alanıdır. Mantar proteazları ile karşılaştırıldığında, bakteriyel proteazlar daha yüksek reaksiyon oranlarına ve daha iyi ısı toleransına sahiptirler (Sharma 2017).

Çeşitli bakterilerden üretilen ve kullanılan toplam mikrobiyal enzimlerin yaklaşık % 35'i deterjan endüstrisinden oluşmaktadır (M. A. Ferrero1996). Enzim kaynağı olarak kullanılan mikroplar bitki ve hayvan kaynaklarından daha avantajlıdır, çünkü mikroplar ucuz substratlarda hızla büyüebilir ve büyüme koşullarını manipüle ederek ve genetik mühendisliği uygulayarak kolayca geliştirilebilir (A. Pandey2005). Böylece endüstriyel alanda kullanılan enzimler biyoteknoloji uygulamalarıyla ticari olarak üretilir, hem daha ekonomik hem de çevreye daha az zarar veren ürünlerin üretilmesi sağlanmış olur.

Endüstriyel çalışmalarında ticari olarak en büyük alanı proteolitik enzimler içermektedir. Çamaşır deterjanları ilk sırada olmak üzere deri, gıda ve ilaç endüstrisinde çok geniş ticari kullanım alanına sahiptir (M. A. Ferrero 1996).

Proteazların sınıflandırılması

Proteaz enzimleri sınıflandırılması katalize edilen reaksiyon tiplerine ve katalitik mekanizmalarına göre olmaktadır;

- a. Kaynaklarına göre bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal proteazlar,
- b. Aktif oldukları pH değerlerine göre asidik, alkalın ve nötral proteazlar,
- c. Katalizledikleri reaksiyona göre endopeptidazlar ve ekzopeptidazlardır (Raoet al. 1998).

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği tarafından kurulan komisyon, yeni bir sınıflandırma sistemi geliştirmiştir.

Proteazların kaynaklarına göre sınıflandırılması

Proteazlar fizyolojik işlevlerde ve tüm yaşam metabolizmasında görev alırlar. Bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar olarak sınıflandırılmaktadır (Raghunathet al, 2010).

1.Bitkisel Proteazlar

Bitkisel proteazlar kök, tohum, gövde, çiçek, yaprak, meyve, lateks ve reçine bölümlerinden oluşmaktadır. Bitkilerde sistein ve serin endoproteazları daha fazla bulunurken, aspartik ve aminoproteazları nadir bulunmaktadır (Raghunathet al, 2010).

Bitkisel proteazlara örnek olarak papain, bromelain ve keratinazdır. Papain geleneksel bir bitki proteazıdır ve uzun ömürlüdür. Papain proteazı pH 5.0-9.0 arasında aktif olup ve 80-90 °C'ye kadar dengede olmaktadır. Endüstri alanında süt pıhtılaştırıcı ve et yumuşatıcı olarak sık şekilde kullanılmaktadır. İlaç, deterjan, veterinerlik ve gıda endüstrisinde başka kullanım alanları da vardır (Raghunath *et al*,2010; Malaet *al*,1998).Bromelain ananas (*Ananas comosus*) kökünden ve suyundan elde edilmektedir. Bromelain enzimi, sisteinproteazı olarak karakterize edilip ve pH 5.0-9.0arasında aktiftirler. İnaktivasyon sıcaklığı 70 °C'dir. Keratinaz enzimleri bitkilerin bazı grupları tarafından üretilmektedir. Saç ve yünün sindiriminde, lisin gibi esansiyel amino asitlerin üretiminde, atık su sistemlerinin tıkanmasının önlenmesinde tercih edilirler.

Bitkisel proteaz enzimi üretiminde incirden elde edilen fisin enzimleri çok fazla proteaz aktivitesine sahiptir. 10-15 g bitkiden 100-150 mg fisin elde edilebilmektedir (Uhlig 1998). Ancak kurutma işlemi sırasında aktivitenin çoğunu yok olmaktadır. Fisın, yüksüz ve aromatik aminoasitler içeren bağlarda etkili enzimdir. Fisın enziminin optimum pH'sı 6.5'tur ve pH 4.0-9.5 arasında etkili olmaktadır. Enzim, antik çağda peynir mayası olarak sütün pıhtılaştırılmasında kullanılmış olup biracılık, yem, et ve deniz ürünlerinde tercih edilmiştir (<http://www.piercenet.com> 2006).

Bitkilerden elde edilen enzimlerin aktivitesini bitkinin kaynağı, iklim koşulları, ekstraksiyon ve saflaştırma işlemlerinde kullanılan yöntemler etkilemektedir. Bu sebeple endüstriyel alanda kullanımlarına baktığımızda bitkisel enzimlere göre mikrobiyal enzimlerin kullanımı daha fazla tercih edilmektedir (Raghunath *et al*, 2010).

2.Hayvansal Proteazlar

Hayvansal proteazlara kimotripsin, pepsin, rennin ve pankreatik tripsin örnek verilebilir. Hayvansal proteaz enzimleri, gıda sanayisinde, protein hidrolizatları üretiminde, et ve balık atıklarının imhasında, deri endüstrisinde ve tıp alanında tercih edilmektedir (Rao *et al*. 1998).

Kimotripsin proteaz enzimi, hayvanın pankreatik özündedir. Pankreasta depolanması kimotripinojen şeklinde olurken, aktif olması için birden fazla adımlı işlem süreci gerektirir. Peptit bağlarının karboksil grubunun üç aromatik amino asidi olan tirozin, fenilalanin ya da triptofanın hidrolizlenmesinde özgündür. Gıda endüstrisinde süt proteinin alerjen özelliğinin katalizmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Peptit bağlarının karboksil grubundaki üç aromatik amino asidi; fenilalanin, tirozin veya triptofan hidrolizi için spesifiktir. Süt proteini hidrolizatlarının deallerjenleştirilmesinde yaygın olarak kullanılır. Pepsin çok omurgalının midelerinde asidik olarak bulunan aspartik proteazdır. Aktif olduğu pH 1.0-2.0 iken pH 6.0'da

inaktive durumdadır. Pepsin iki hidrofobik aminoasit arasındaki peptit bağlarının hidrolizinin katalizlenmesini sağlarlar. Rennin proteazı pepsinin etkisiyle ya da otokataliziyle aktifleşen ve emziren tüm memelilerin midelerinde inaktif protein olarak üretimi olan pepsine benzer enzimdir. Özgül niteliği, k-kazeinde bulunan tek bir peptid bağının hidrolizlenmesi ile oluşmaktadır. Gıda endüstrisinde süt ürününe iyi bir aroma verilmesinde ve peynir üretiminde kullanılmaktadır. Rennin üretiminde hayatı sona ermiş memelilerin kullanılmasına bağlı olduğu için hayvansal proteazlar yerine mikrobiyalproteazlar olarak tercih edilmektedir. Tripsinproteazı olup peptit bağlarının karboksil gruplarında bulunan lizin ve arginin kalıntılarının hidrolizini sağlayan ince bağırsak sindirim enzimidir. Tripsin enziminden elde edilen hidrolizatının tadı acı olduğundan gıda endüstrisinde çok fazla tercih edilmemektedir (Mala *et al*, 1998).

Ökaryotik hücrelerde proteazlar, organizmanın türüne göre kompleks görevleri yerine getirmektedirler. Proteazlar ökaryotik hücrelerde kanın pıhtılaşması, kontrollü hücre ölümü ve doku farklılaşması gibi biyolojik süreçlerde rol alırlar. Triptaz, kimaz, karboksipeptidaz, katepsin C ve G gibi nötralproteaz enzimleri özellikle insan ve ratmast hücrelerindeki salgı granüllerinin dominant protein unsurları olup ve seçici olarak bu hücrelerde lokalize olmaktadır.

Nötral proteaz enzimleri, diğer hücre tiplerine bakarak memeli mast hücrelerinde daha yüksek düzeylerde var olup, biyolojik doku ve sıvılarda, mast hücrelerinin rol aldığı biyolojik olayların belirlenmesinde ölçüt olarak kullanılmaktadırlar.

Farklı hastalık durumlarında farklı tipte proteazlar rol oynadığından bu enzimlerin inhibitörlerinin bilinmesi yeni terapötik ajanların geliştirilmesi açısından oldukça önemlidir (Henningsson *et al*.2005). Hayvansal kaynaklı endüstriyel enzimler incelendiğinde;

- Katalaz enzimi, karaciğer kaynaklı gıda endüstrisinde,
- Kimotripsin enzimi, pankreas kaynaklı deri endüstrisinde,
- Lipaz enzimi, pankreas kaynaklı gıda endüstrisinde,
- Peynir mayası (Rennet) enzimi, kırmayır kaynaklı peynir endüstrisinde,
- Tripsin kaynaklı enzimi, pankreas kaynaklı deri endüstrisinde kullanılmaktadır (<http://www1.lsbu.ac.uk/water/enztech/sources.html>,2017).

3. Mikrobiyal Proteazlar

Proteaz enzimleri, tüm prokaryotik ve ökaryotik organizmalar için vazgeçilmezdir ve hücrede birden fazla önemli fizyolojik görevleri yerine getirmektedirler. Proteazlar, proteinazlar ya da peptidazlar organizmada sentezlenmiş proteinlerin büyüklüğünün,

biçiminin, kompozisyonunun ve döngüsünün kontrolünde esansiyel olan enzimlerdir (Kıran *et al.*2006).

Mikrobiyal proteazlar aktif merkezlerine göre gruplandırılmaktadırlar ve en önemli grupları; serin-, metallo- ve karboksil proteazlardır. Ayrıca literatürde incelendiğinde ‘jelatinaz’, ‘keratinaz’, ‘kazeinaz’ şeklinde yapılan sınıflandırmalar da bulunmaktadır (Novel *et al.*1963).

Endüstrinin hemen hemen çoğu alanında genellikle mikroorganizmalardan elde edilen mikrobiyal enzimler tercih edilmektedir. Mikrobiyal proteazların tercih edilmesinin nedeni bitkisel veya hayvansal enzimlere göre genetik manipülasyonlara daha duyarlı olmaları, katalitik aktivitelerinin fazla olması, reaksiyonda istenmeyen yan ürünlerin oluşmaması, daha kararlı stabil ve ucuz olmaları, istenilen miktarda daha saf ve fazla üretilibilmeleridir (Wiseman 1987). Biyoteknolojik uygulamalara uygundur. Mikrobiyal enzimler sadece enzim üretme özelliklerine göre değil, mikroorganizmaların toksik ve patojen olmamalarına göre de tercih edilmişlerdir (Demain and Solomon, 1981)

Fungus orijinli proteaz enzimlerini üreten mantarlar, bakterilerden daha geniş kapsamlı üreticilerdir. Bakteriyel kaynaklı proteazlar ile karşılaştırıldıklarında bakteriyel proteazlardan daha düşük reaksiyon hızına ve daha düşük bir sıcaklık toleransına sahiptirler. Fungal proteaz enzimleri katı hal fermentasyon prosesi ile üretilmektedirler. En fazla peynir endüstrisinde dar pH ve sıcaklık spesifikliğinden dolayı tercih edilirler (Rao *et al.* 1998; Uhlig 1998). Fungal proteazlar endo ve ekzopeptidazlar olup, çok geniş çeşitlilikte salgılanabilmektedirler (Gripon 2003).

Ekstremofilik mikroorganizmalar, yaşamlarını yüksek sıcaklıklara sahip olan volkanik ortamlarda, çok yüksek ve çok düşük pH şartlarında (pH değerleri 0-3 veya 10-12), kutupların düşük sıcaklıklarında ya da çok yüksek tuz konsantrasyonlarında (%5-%30) idame etmeye adapte ederler (Niehaus *et al.*1999). Bu farklı çevre şartlarında yaşamını devam ettiren mikroorganizmalar alkalifilik, asidofilik, halofilik ve termofilik bakteriler olarak gruplandırılmıştır (Zeikus 1979). Bu koşullarda bulunan termoasidofilik ve alkalifilik bakterilerden sağlanan proteaz enzimleri yüksek sıcaklık ve pH ortamlarına dayanıklı olduklarından dolayı endüstriyel alanda çok fazla tercih edilmektedir (Kindle 1983).

Proteaz enzimleri, katalizlemiş oldukları reaksiyon türüne göre 6 ayrı gruba bölünmüşlerdir. Enzimlerin çoğu mikrobiyal ve ekstrasellüler kökenli olup, yüksek moleküler ağırlığa sahip substratlar ile birlikte çalışırlar. Günümüze kadar 2000’den fazla proteaz enzimi belirlenmiş olup, bunların da 100’e yakını ticari olarak kullanıma uygunluğu

bulunmuştur. Ancak şu dönemde sadece 18 adedi endüstriyel alanda üretilip kullanılmaktadır (Zeman and McCrea 1985).

Endüstriyel alanda tercih edilen enzimlerin %59'unu proteaz enzimleri, %28'ini karbohidraz enzimleri, %3'ünü lipaz enzimleri ve geriye kalan %10'unu diğer enzimlerden oluşmaktadır (Wiseman 1987). Son yıllarda yapılan biyoteknolojik çalışmalarda rekombinant DNA teknolojisinde son gelişmelerden faydalanılarak enzim üretimi önemi boyutlara ulaşmış ve kullanımı yaygınlaşmıştır (Gessese 1998).

Proteaz enzimlerinin katalizledikleri reaksiyon tipine göre sınıflandırılması

Proteaz enzimlerinin katalize ettikleri reaksiyon tipine göre endopeptidazlar ve ekzopeptidazlar olmak üzere iki grupta sınıflandırılmıştır. Proteaz enzimleri peptit bağlarının substrattaki yerleşimine, kesilecek peptit bağının etrafındaki aminoasit kalıntılara ve substratların bilinmeyen diğer özgü özelliklerine göre seçicilik yapmaktadır (Maccebe2007; Dos Santos 2011; N. Jisha *et al.* 2013). Proteaz enzimlerinin katalizledikleri reaksiyon tipine göre sınıflandırılması aşağıdaki Tablo 1'de gösterilmiştir.

1. Ekzopeptidaz

International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB)'ın yaptığı numaralandırılmasına göre ekzopeptidazlar (E.C 3.4.11-19) olarak belirlenmiştir. Polipeptit zincirinin amino (- NH₂) veya karboksil (- COOH) ucundaki peptit bağlarının hidroliz edilmesinden görevlidirler. Proteinin amino ucundaki peptit bağlarına etki ederlerse ekzopeptidazlar, aminopeptidazlar; karboksil ucundaki peptit bağlarını etki edenler ise karboksipeptidazlar olarak isimlendirilirler. Karboksi proteazlar, katalitik bölgesinde bulunan aminoasit kalıntısına göre, metallo, serin vesistein karboksi proteazlar olarak gruplandırılırlar. (Felix *et al.* 1966).

Tablo 1. Katalizledikleri Reaksiyon Tipine Göre Proteazlar

Proteazlar	EC Code	Mekanizması	Şekil
Ekzopeptidaz	3.4.11 – 3.4.19	Zincirin amino (-NH ₂) veya karboksil (-COOH)ucundaki peptit bağlarını hidroliz ederler.	↓↓↓ NH ₂ -O-O-O-O-O-O-O-O- O-O-O-O-O-COOH
Aminopeptidaz	3.4.11	Zincirin amino ucundaki peptit bağlarını hidroliz ederler.	↓ NH ₂ -O-O-O-O-O-O-O-O- O-O-O-O-O-COOH
Dipeptidaz	3.4.13	Zincirdeki spesifik dipeptitleri hidroliz ederler.	↓ ↓ NH ₂ -O-O-O-O-O-O-O-O- O-O-O-O-O-COOH
Dipeptidilpeptidaz	3.4.14	Zincirin amino ucundaki ikinci peptid bağının hidroliz ederler.	↓ NH ₂ -O-O-O-O-O-O-O-O- O-O-O-O-O-COOH
Tripeptidilpeptidaz	3.4.14	Zincirin amino ucundaki üçüncü peptit bağını hidroliz ederler.	↓ NH ₂ -O-O-O-O-O-O-O-O- O-O-O-O-O-COOH
Peptidildipeptidaz	3.4.15	Zincirin karboksil ucunda bulunan son peptit bağından bir önceki peptit bağını hidroliz ederler.	NH ₂ -O-O-O-O-O-O-O-O- O-O-O- ↓ -O-O-O-COOH
Karboksipeptidaz	3.4.16 – 3.4.18	Zincirin karboksil ucundaki peptit bağlarını hidroliz ederler.	NH ₂ -O-O-O-O-O-O-O-O- ↓↓↓ O-O-O-O-O-O-O-COOH
Omega tip proteaz	3.4.19	Terminal uçların yakınındaki izopeptit bağlarını hidroliz ederler.	↓ NH ₂ -O-O-O-O-O-O-O-O- O-O-O-O-O-COOH
Endopeptidaz	3.4.21 – 3.4.24	Zincirdeki iç alfa-peptid bağlarını hidroliz ederler.	

a.Aminopeptidaz

Aminopeptidazlar, polipeptid zincirinin ucundaki serbest N terminaline hareket ederek tek bir amino asidi, bir dipeptit ya da bir tripeptidi serbest bırakarak hidroliz yaparlar. Hidrolizleme şekline göre isimlendirilirler. Aminopeptidazlar N-terminalden metionini uzaklaştırdıkları belirlenmiştir. Başta mantarlar ve bakteriler olmak üzere birçok mikroorganizmada bulunsalarda, bunların substrat spesifikliği ve hidroliz ürünlerin farklı olabilmektedir. Genellikle aminopeptidazlar hücre içi enzimlerdir, fakat *Aspergillusoryzae* tarafından üretilen hücre dışı aminopeptidaz rapor edilmiştir. Bu nedenle ticari ürün olarak az bulunmaktadır (Rao *et al.* 1998).

b.Karboksipeptidaz

Karboksipeptidazlar, polipeptit zincirinin C terminallerinde hareket ederek ya tek bir aminoasidi ya da bir dipeptidi serbest bırakarak ayırırlar. Enzimlerin aktif bölgelerinde bulunan aminoasit çeşitlerine üç gruba ayrılırlar. Bunlar; metallokarboksipeptidaz, serin karboksipeptidaz ve sistein karboksi peptidaz olmaktadır. *Penicillium* sp., *Saccharomyces* sp. ve *Aspergillus* sp.'dan izole edilen serin karboksi peptidazların substrat spesifikliğı aynı olmaktadır ancak moleküler kütleleri, optimum pH, stabilite ve inhibitörlerin etkileri gibi diğer özellikleri farklılıklar göstermektedir. *Pseudomonas* sp. ve *Saccharomyces* sp.'den elde edilen metallo karboksi peptidazların aktivite olabilmeleri için Co^{+2} ve Zn^{+2} metallerinin varlığına ihtiyaç duyarlar (Rao et al. 1998).

c. Omegapeptidaz

Omegapeptidazların, Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliğı'nin Adlandırma Komitesi tarafından EC. 3.4.19 alt sınıfına yerleştirilmesi yapılmıştır. Omegapeptidaz, substratta serbest bir N-terminal ucuna ya da C-terminal ucuna bağlanmaya ihtiyacı olmayan peptidaz üyesidir. Endopeptidazlardan farkı; yüklü bir terminal gruba ihtiyaçları olmamalarına karşın genellikle terminallerin etrafında aktivite olmalarıdır (http://merops.sanger.ac.uk/about/about_9.htm, 2005). Gama-glutamil hidrolazlar ve proglutamil peptidazlar omega peptidazlara örnek sayılabilir (Polina and Maccabe 2007).

2. Endopeptidaz

Endopeptidazlar, polipeptid zincirindeki iç alfa-peptid bağlarını hidrolize etmeleri ile karakterize edilirler. Polipeptid zincirinin N- ve C- gruplarının varlığı enzimatik aktivite üzerine negatif etkiye sebep olmaktadır. Endopeptidazların bazıları sadece proteinlerden daha küçük yapıda olan substratlara etki edebilmektedir. Bu endopeptidazlar oligoproteaz olarak isimlendirilmektedir. Endopeptidazlar, gıda ile alınan proteinlerin sindirimini başlamasını sağlar ve ekzopeptidazların substratları olan yeni amino (-N) ve karboksil (-C) terminusunun oluşumunu yaparlar (Rao et al. 1998).

Endopeptidaz enzimleri, Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliğı İsimlendirme Komitesi (NC-IUBMB) tarafından ikili adlandırılmaya göre; EC 3.4.21-26 alt gruplarına eklenmiştir. Alt gruplarının içerisinde serin, sistein, aspartik, metallo ve treonin ve glutamik endopeptidaz enzimleri vardır. Glutamik peptidaz enzimleri 2005 yılında tanımlanmış yapılmış olup ve katalitik mekanizmaları ile ilgili araştırmalar devam ettirilmekle birlikte yapı ve aktivitelerinde bir Glu / Gln katalitik kalıntısı olduğu görülmüştür (Kataoka et al. 2005).

a. Serin proteazlar

Serin proteaz enzimleri, aktif bölgelerinde serin kalıntılarıyla karakterize edilmektedirler. 40 aile ve 13 klandan meydana gelen serin proteazlar, tüm proteolitik enzimlerin üçte birinden daha fazlasını oluşturan enzim grubudur (Cera 2009). Serin proteazlar arasında PA klanı ve S1 ailesinin tripsin benzeri peptidazları en bol bulunduranlardır.

Serin proteazlar, bakteriler, virüsler ve ökaryot organizmalarında hayati öneme sahip olup çok sık ve bol sayıda bulunmaktadır. Molekül ağırlığı 18-35 kDa aralığında değişmektedir. Serin proteazların pH'ları 7-11 aralığında iken aktif olurlar, bu sebeple bunlara serin alkalın proteazlar da denilmektedir. Serin proteazın birçok üreticileri bulunmaktadır. Bunlar maya mantarları, küfler, birçok bakteri türleri ve bazı makro mantar çeşitleridir. En iyi serin proteaz üreticisi subtilisin üreten *Bacillus sp.*'lardır (Rao *et al.* 1998). En önemli serin proteazlar ise elastaz, fosfolipaz, kimotripsin, lipaz, tripsin, triptaz ve trombinlerdir. Substrat tercihlerine göre dört grupta toplanırlar; kimotripsin benzeri olan serin proteazlar, tripsin benzeri olan serin proteazlar, elastaz benzeri olan serin proteazlar ve subtilisinlerdir. İşlevlerine bakıldığında kimotripsin benzeri proteazlar aromatik aminoasitlerin bulunduğu peptid bağımlı hidrolizler, tripsin benzeri serin proteazlar lys (lisin) veya arg (arjinin) aminoasitlerinden sonraki peptid bağımlı hidrolizler, elastaz benzeri serin proteazlar da küçük yan zincirlerdeki hidrofobik aminoasitten sonraki peptid bağımlı hidrolizler, subtilisinler ise prokaryotlardaki peptid bağımlı hidrolizlemektedirler (Gisha 2014). Serin proteazların inhibitörleri, PMSF (fenilmetilsülfonil-florür), TLCK (tosil-L-lizin klorokumarin) ve DFP (diizopropilflorofosfat)'dır (Rao *et al.* 1998). Serin proteazlar sindirim (tripsin, kimotripsin) sisteminde, kan pıhtılaşması (faktör VIIa, IXa, Xa, XIIa) ve fibroliz (plazmin, ürokinaz) ve immun sistemde (kompleman B, C, D) gibi çok önemli fizyolojik süreçlerde bulunmaktadır (Polgar 2005).

b. Aspartik proteaz

Asidik proteazlar olarak bilinmektedirler ve katalitik olan bölgelerinde aspartik asit kalıntılarına bağımlı olması ile karakterize edilirler. Aspartik proteaz enzimleri üç gruba ayrılmışlardır, pepsin (A1), retropepsin (A2), pararetrovirüslerden (A3) elde edilen enzimler olarak gruplandırılmıştır (Dashet *et al.* 2003). Düşük pH'larda aktif olurlar. Enzimin molekül kütlesi 30-45 kDa aralığındadır. Aspartik proteaz enziminin inhibitörü pepstatindir (Rao *et al.* 1998). En iyi bilinen aspartik proteazlar pepsin, katepsin, D ve E renin aspartatlarıdır (Bugg 1996). Mikrobiyal aspartik proteazlar *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* ve *Neurospora*'nın ürettikleri pepsin benzeri enzimler ve *Endothia* ve *Mucor sp.*'nin ürettikleri rennin benzeri

enzimler olmak üzere iki gruba ayrılabilir (Kunitz 1938; Morihara *et al.* 1973). Birçok sistemde aktivite göstermektedirler, memelilerin sindirim sisteminde görev yapan pepsin A, patojen ve maya virülansına karşı savunmayı sağlarlar, candidapepsin, meme kanseri metastazında, kardosin A, kan kontrollerinde, kathepsin D, polen-pistil etkileşimlerinde, renim, hemogloblin bozunması ve retropepsinler de HIV proteinlerinin olgunlaşmasında görevleri bulunmaktadır (Ostermann *et al.* 1973; Maccebe 2007).

c. Sistein proteazlar

Sistein proteazlara tiyol proteazlarda denilmektedir. Hem ökaryotlarda hem de prokaryotlarda bulunurlar. Sistein proteazlar peptid, amid, ester ve tiyol esterlerin hidrolizini katalizlerler. Tiyol proteazların aktif olabilmesi için ortamda HCN (hidrosiyamik asit) ve sistein varlığında etki gösterirler. Sistein proteazların nötr pH optimumları vardır, moleküler ağırlıkları da 21-30 kDa'dur. Sistein proteazların gruplandırılması aktif merkezlerinin spesifitesine göre yapılmaktadır. Bunlar dört grup olup, papain benzeri olan tiyol proteazlar, tripsin benzeri olan tiyol proteazlar, glukamik aside özel olan tiyol ve diğer tiplerde olantiyol proteazlardır. Sistein proteaz enzimlerinin en iyi bilineni papaindir. Sistein proteaz enzimleri, aktif bölgelerinde -SH grubu sahip olmaları, ağır metaller ve okside edici ajanlar varlığında inhibe olmalarından dolayı önemli enzim grubudurlar (GenckalandTari 2006; Dubey *et al.* 2007). Sistein proteazların fonksiyonları, bitkilerin büyüme-gelişmesinde, çekirdekte proteinin birikiminde, apoptozisde, biyotik ve abiyotik strese karşı yanıt oluşturulması ve bunun gibi diğer fizyolojik olaylarda görevleri vardır (GrudkowskaandZagdanska 2004). Tüm sistein proteazların aktivitesleri, sistein ve histidine sahip bir katalitik dyad'a bağlı olmaktadır (Raghunanth *et al.* 2010; Barrett 1994). PCMB (p-kloromerküribenzoat) gibi sülfidril ajanlarına karşı hassastırlar, fakat metal şelatlarından etkilenmezler (Rao *et al.* 1998). Sistein proteazlar hem endopeptidaz (papain, bromelain, fisin, cathepsin) hem ekzopeptidaz (cathepsin X, karboksipeptidaz B) olarak görev yapabilirler (Raghunanth *et al.* 2010).

d. Metalloproteazlar

Metalloproteazlar, katalitik proteazların en çeşitlisi ve etkisi olarak diğerlerin farklı olanıdır. Katalitik etki mekanizmasında iki değerlikli olan çinko, kobalt veya farklı metal iyonlarını tercih etmektedirler. Çoğu metalloproteazların karakteristik özelliği katalitik bir çinko iyonu olmalarıdır (Barrett 1995). EDTA ile inhibe edilebilmektedir. Fakat sülfhidril ajanlar ya da DFP tarafından baskılanma olmamaktadır. Sınıflandırılmaları aktif merkezlerdeki fonksiyonel gruplarına göre yapılmaktadır (Griponet *et al.* 1980). Serralysin, adamalysin gibi matriks metalloproteaz enzimleri ve hücre zarının yapısında bulunan yuzey membran proteinleri olan ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase) proteinleri en çok

bilinen metalloproteazlardır (Edwardset *al.*2008). Metalloproteazların doku morfogenezi olaylarında ve farklılaşmasında görevleri vardır. Onkoloji hastalıkların tedavilerinde uygulanabilirler. Bakteriler de bulunan termolizin ve yüksek organizmalarda yılan zehrinde bulunan hemorhagicensimi toksin bilinen en yaygın metalloproteazlardır (Raoet *al.* 1998). Disülfid köprülerinin olmadığı 34 kDa ağırlığında tek bir proteaz peptididir. Proteinin iki katlı lobunda bulunan çinko (Zn) atomu esansiyel olup ve dört adet kalsiyum (Ca) atomu proteinin termostabilitesini korumaktadır (Raghunathet *al.*, 2010).

Proteazların katalizlediği bölgenin kimyasal yapısına göre gruplandırılmaları Tablo 2’de özet olarak gösterilmiştir (Duman 2017).

Tablo 2. Proteazların Katalizledikleri Bölgenin Yapısına Göre Gruplandırılması (Duman 2017)

Proteaz Sınıfı	Serin	Sistein	Aspartik	Metallo
Eski isim	Serin	Tiol	Karboksil	Metallo
Enzim Numaralandırılması	EC 3.4.21	EC 3.4.22	EC 3.4.23	EC 3.4.24
Aktif site bileşeni	serin	sistein	aspartik	Zn+2
pH aralığı	7-9	3-7	2-6	5-9
Sıcaklık (°C)	20-80	25-70	40-70	40-60
Moleküler Ağırlık (kDa)	20-135	20-65	30-60	20-60
İnhibitör	PMSF, DCI	E-64, Iodoacetate	Pepstatin	EDTA
Lokasyon	Hücre içi - dışı	Lizozom	Lizozom	Hücre içi-dışı
Örnekler	Elastin, Plasmin	Cathepsins B & L	CathepsinD	Gelatinase

***Bacillus* hakkında genel bilgiler**

Bacillaceae’ ailesinden *Bacillus* ve *Clostridium* olmakuzere iki ana alt grubu vardır (Garrity 2004). Hücreleri çubuk şeklinde ve düzdür, uçları yuvarlak veya kare şeklindedir. Ortamda ya çiftler halinde ya da zincirler halinde bulunurlar. Peritrikoz kamçıya sahip ve hareketlidirler. Zorlu ortam koşullarına dirençlidirler. pH, sıcaklık ve tuzluluğa karşı yüksek fizyolojik toleransları vardır. Üreyip gelişebilmeleri için ortam sıcaklık dereceleri minimum 25°C - 75°C aralığında, pH ortamı asidofilik türleri için 7.5 -8.0’e kadar yükselmektedir (Holtet *al.* 1994). Nutrient agar besiyerinde kolayca üretilmektedir (Ayhan 2000). *Bacillus*’ ların çoğu endospor oluşturabilirler, bunlar da bazen oval, yuvarlak veya silindirik şekillerde olabilirler. Çoğu Gram (+) olup, yaşlı kültürlerde Gram (-)’de olabilirler (Holtet *al.* 1994).

Bacillus familyası mikroorganizmaları endüstriyel alanda kullanılan çoğu enzim tiplerini uretebilmelerinden dolayı oldukça önemlidirler. Termofilik bakterilerin yüksek sıcaklık ve pH'larda üreyebilmeleri biyoteknolojide kullanım açısından kolaylık sağlamasıyla ilgi görmüşlerdir. Özellikle düşük sıcaklıklarda yüksek aktiviteli proteaz ve amilaz üretimi ve bu arada yüksek enerji kullanımının gerekmemesi deterjan endüstrisinde tercih edilmesine sebep olmuştur.

Bacillus mikroorganizmaların ürettikleri proteaz enzimleri genelde alkalin serin proteazlarıdır. Alkalin proteazların yüksek aktivite ve termal stabiliteyi arttırabilmeleri için Ca^{+2} , Mn^{+2} , Mg^{+2} gibi iki değerlikli olan katyon ve bunların kombinasyonuna gereksinim duyarlar (Çelik 2006). Alkalin proteaz enzimleri çoğunlukla PMSF (Fenilmetilsulfonyl florür) ve DFP (Diizopropilflorofosfat) ile tamamen inhibe olurken bazı metalloalkalin proteazları EDTA (Etilendiamintetraasetik asit) ile inhibe olduğu bulunmuştur. Bazı aromatik ve hidrofobik aminoasit, tirozin veya fenilalanin yer aldığı peptid bağlarının hidrolizlerine spesifiktirler (Rao *et al.* 1998; Kumar and Takagi 1999).

a. Bakteriyel Alkali Proteazların Özellikleri

Dünyadaki endüstriyel alanda kullanımı en fazla olan enzimlerin üçte ikisini mikroorganizmalardan elde edilen enzimler oluşturmaktadır. Mikrobiyal enzimlerin katalitik aktivitelerin yüksek olması, istenmeyen yan ürünlerin oluşmaması, üreme ve büyüme şartlarının kolay sağlanabilmesi, ucuz maliyetle yapılabilmesi, yüksek kalite ve saflıkta üretimi sağlanmaktadır. Enzim üretiminde tercih edilen *Bacillus* sp.'lerin fermentasyon yöntemleri ve kısa sürede fazlaca üretilebilmeleri, ortam koşullarının kolaylığı, yüksek pH ve sıcaklık gibi ekstrem koşullarda yüksek aktiviteli olmaları, izolasyon ve tanımlanmalarının basitliği, suşlarının çoğunun zararsız oluşu, ürettikleri proteinleri dışarı sentezlemeleri gibi özellikleri ile mikrobiyal enzim üretimi fazlaca ilgi görüp tercih edilmektedir (Wiseman 1987; Horikoshi 1999; Boyce and Walsh 2007). Mikroorganizmaların biyomühendislik ve biyokimyasal alanlardaki çeşitliliklerinden dolayı proteaz üretiminde kullanılan oldukça iyi kaynaklardır (Lazimet *et al.* 2009).

Endüstriyel alanlarda kullanılmak üzere üretilen proteaz enziminin yüksek sıcaklık ve pH, oksitleyici ajanlar ve organik çözücüler ile muamele edildiğinde aktif ve stabil olmaları gerekmektedir (Arostoo and Zahrami 2012). Alkalin proteazların optimal şartlarını incelediğinde pH 9.0-11.0, sıcaklık 50-70°C, molekül kütlesi 15-30 kDa olup maksimum aktiviteleri için Ca^{+2} , Mn^{+2} ve Mg^{+2} gibi divalent metallere gereksinim duyarlar (Kumar and Takagi 1999). Alkali proteaz enzimi ilk olarak 1914 yılında deterjan katkı maddesi olarak

satışa çıkarıldı ve büyük ilgi gördü. Bakteriyel alkalın proteaz Savinase, SubtilisinCarlsberg ve Subtilisin BPN gibi şirketlerde deterjan enzimi olarak tercih etmektedir (Gupta *et al.* 2002).

Proteazların fizyolojik görevleri

Proteaz enzimlerinin, hücrenin büyümesi ve göçü olayında, proteinin katabolizmasında, doku düzenlenmesi ve inflamasyonunda, kanın pıhtılaşmasında, tümör büyümesi ve metastazlarında, hormonların salınması, membranlar arası salgı proteinlerinin taşınması gibi fizyolojik ve patolojik süreçlerde görevleri bulunmaktadır.

Proteaz enzimleri, makro polipeptidlerin daha küçük peptid ve aminoasitlere parçalanmasını sağlayarak, hücre içerisine emilimlerini kolaylaştırırlar (Mala *et al.* 1998). Proteinlerin sindirimi ilk olarak midede başlayıp, burada HCl ve pepsinin otokatalizi ile pepsinojen pepsine çevrilerek aktifleşir. Proteinler pepsinin katalizi ile az miktar aminoasit ve polipeptitlere ayrılır, buradan ince bağırsakta tripsin ve kimotripsin ile daha öncekinden daha küçük polipeptidlere ve bir miktar aminoasitlere parçalanır. Son olarak dipeptidaz ve tripeptidaz ile aminoasitlere parçalanmış olur. Hücre içi proteaz enzimlerinin hücredeki uygun protein döngülerine destekleri bulunmaktadır. Ökaryotlarda hücre içi protein döngülerinin gerçekleşmesinde ATP'ye bağımlı proteazlar aktiftirler (Chun *et al.* 1981).

Belli bakteri sporlarının ve maya askosporlarının sporülasyon-çimlenme evrelerinde görevleri oldukları ve yapılan başka çalışmalar incelendiğinde gen ifadesinin modülasyonunda da proteaz enzimleriyle ilgili oldukları kanıtlanmıştır (Dancer *et al.* 1975;).

Proteaz enzimlerinin diğer birçok fizyolojik olaylarda etkili ve görevlidirler. Bunlar; bakteriyofajın yaşam döngülerini ve apoptozlarını, ısı şoku tepkilerini, DNA hasarlarına karşı SOS yanıtlarını kontrol eden çeşitli düzenleyici proteinlerin proteaz aracılığıyla parçalanmasını sağlarlar (Van Melder *et al.* 1996; Gottesman *et al.* 1992). Ayrıca gen ifade modülasyonunun da proteazlar ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Roberts *et al.* 1977).

Proteazların endüstriyel uygulama alanları

a. Deterjan endüstrisinde proteazlar

Enzimlerin kullanım alanları incelendiğinde en büyük endüstriyel uygulamaları deterjanlar olmaktadır. Dünya enzim üretiminin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır (Horikoshi 1996). Etkili bir proteaz enziminin, deterjan içerisindeki diğer katkı maddelerine karşı dayanıklı olabilmeli, izoelektrik noktası uyumluluğu, geniş substrat özgüllüğü, farklı sıcaklıklara, süre ve pH değerlerine uygun olmaları gerekmektedir.

Deterjan içerisindeki bir proteaz enziminin en iyi performansı gösterebilmeleri için ana parametre düzeyi onun izoelektrik noktasıdır (pI). Deterjan ürünün çözeltisinin pH'ı ile pI'sı birbirleriyle uyumlu olmaları enzimin bu uygulama için kullanıma uygun olduğunu gösterir. Proteaz enziminin pI değeri ne kadar fazlaysa, o proteazda yüksek pH'larda etkilidir (Çelik 2006). Proteaz enzimin ayrıca EDTA'ya karşı kararlı ve stabil olması da deterjan formülasyonu için istenilmektedir (Gupta *et al.* 2002).

Tablo 3. Ticari Subtilisin Enzimlerinin Deterjanlarda Kullanımı (Maccabe 2007).

Ürün adı	Orjin	Saf/Protein mühendisliği ile modifiye edilmiş	Mikroorganizma
Alcalase (Novozymes)	<i>B. licheniformis</i>	Saf	<i>B. licheniformis</i>
Savinase (Novozymes)	<i>B. clausii</i>	Saf	<i>B. clausii</i>
Purafect (Genencor)	<i>B. lentus</i>	Saf	<i>B. lentus</i>
Everlase (Novozymes)	<i>B. clausii</i>	Protein mühendisliği ile modifiye edilmiş	<i>B. clausii</i>
PurafectOxP (Genencor)	<i>B. lentus</i>	Protein mühendisliği ile modifiye edilmiş	<i>B. lentus</i>
Esperase (Novozymes)	<i>B. halodurans</i>	Saf	<i>B. halodurans</i>
Kannase (Novozymes)	<i>B. lentus</i>	Protein mühendisliği ile modifiye edilmiş	<i>B. lentus</i>
Properase (Genencor)	<i>B. alkalophilus</i>	Protein mühendisliği ile modifiye edilmiş	<i>B. alkalophilus</i>

Deterjanın leke çıkarma etkisini arttıran proteazlar, daha düşük sıcaklık ve daha düşük zaman içerisinde temizlik yapabilmektedir. Amilaz, lipaz ve proteaz kombinasyonlarının leke çıkarmakta daha etkili olduğu görülmüştür. Proteaz enzimlerinin özellikle kan ve çim lekelerinin çıkarılmasında çok daha etkilidirler (Orhan 2003; Öztürk 2004).

Deterjan içerisinde bulunan oksitleme ajanları ve ağartıcılara dayanıklı olan günümüzde ticari enzimlerin bulunamaması mikrobiyal enzimlere olan ilgiyi ve araştırmanın artmasına sebep olmuştur. Zaman avantajı, performansın yüksekliği, kalite ve üretim maliyetinin düşüklüğü, dış etkenlere bağımlı olmaması, farklı pH/sıcaklıklarda yüksek aktivite gösteren enzimlerin bulunması biyoteknolojik açıdan önemlidir (Oberoi *et al.* 2001).

Proteazlardan sadece serin proteazlar deterjanlara dahil edilmeye uygundur. Günümüzde, deterjanlarda kullanılan subtilisinlerin çoğu *Bacilluslicheniformis*, *B. lentus*, *B.*

alcalophilus ya da *B. amyloliquefaciens* (Subtilisin BPN ')den izole edilenlerden oluşmaktadır (Gupta *et al.* 2002).

b. Bira endüstrisinde proteazlar

Biranın üretiminde çözünmeyen proteinlerden dolayı oluşan bulanık görünümü engelleyerek berrak ve parlaklık için proteaz enzimleri kullanılmaktadır. Bu görünüm için genellikle kaba papain ya da bromelain (sistein) kullanımı ile sağlanmaktadır. Ayrıcamaltın matlaştırılmasında da kullanılmaktadır (Maccabe 2007).

c. Deri endüstrisinde proteazlar

Deri işlenmesi yapılırken, ıslatma, sepileme, kireçlik ve kireç giderme, sama ve kıldan arındırma gibi basamaklardan geçmektedir. Fakat bu işlemler yapılırken ortaya yüksek miktarda kimyasal madde ve atık su ürünleri çıkmaktadır. Günümüzde artık kimyasal maddenin kullanımını azaltarak enzimlerden faydalanılmaktadır (Öztürk 2004). Yapılan çalışmalara bakıldığında zararlı kimyasal madde yerine alternatif bakteriyel enzimlerin kullanımıyla, çevre kirliliğinin azalması, deri kalitesinin artırılmasında başarılı olunmuş ve uygulamaların daha ekonomik olması sağlanmıştır (Afşar 2008).

Tablo 4. Deri Endüstrisinde Kullanılan Bazı *Bacillus* Cinsleri (MukhtarandHaq 2008)

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

d. Fırın endüstrisinde proteazlar

Ekmek yapımında hamurun daha hızlı hazırlanabilmesi için bromealin gibi sistein proteazları kullanılmaktadır. Bromealin, hamurun gerilemesini engelleyebildiği için bisküvi ve pasta hamurlarının hacminin artmasını da sağlamaktadır (Maccabe 2007).

e. Gıda endüstrisinde proteazlar

Proteaz enzimlerinin temel işlevleri, proteinlerin hidrolize edilmesi özelliğiyle protein hidrolizatlarının hazırlanmasında kullanılır. Protein hidrolizatları bebek mamalarının formülasyonlarında, kan basıncı fizyolojisinin düzenlenmesinde, meşrubat ve meyve sularının raf ömürlerini uzatmada önemlidir (Gupta *et al.* 2002).

Gıda sanayisinde en fazla kullanılan proteaz enzimi papainin, en önemli iki uygulama alanıbiranın soğukta saklanması ve yapay olarak etin gevrekleştirilmesidir (Fadıloğlu ve Erkmen 2004).

Proteaz enzimleri gıda endüstrisinde fırıncılık, peynir yapımı, et yumuşatma ve alkolsüz içkileri kuvvetlendirmede, proteince zengin diyet amaçlı yiyeceklerin üretimi gibi çeşitli alanlarda tercih edilmektedir (MahajanmandBadgujar 2010; Çelik 2006).

Soya ve buğday hidrolizatları, çorba ve sosların lezzet artırımında, et hidrolizatlarının da et ürünlerinin ve çorbaların tadının lezzetlendirilmesi amaçlı kullanılmaktadır. Enzimatik süreçlerin önemli bir avantajı, işlem esnasında meydana gelen yan ürünlerin sağlık üzerindeki olumsuz etkilerinin az oluşudur (Maccabe 2007).

f. Peptid sentezinde proteazlar

Sentetik biyoteknolojide susuz ortam koşullarında biyokatalizör olarak kullanılmaktadır. Enzimatik peptid sentezi organik çözücülerde; apolar substratların çözünürlüğünün artırılması, suya bağlı oluşan yan reaksiyonların engellenmesi, hidroliz reaksiyonlarında termodinamik dengenin tersine döndürülmesi, mikrobiyal kontaminasyonun engellenmesini sağlarlar (ArostoandZahrami 2012). Ayrıca dipeptid ve tripeptid sentezinde de kullanılmaktadır (Gupta *et al.* 2002).

Aspartam, düşük esterolitik aktivitesi özelliğiyle, peptidin 28 tatlı tadında esas olan metil ester grubunun korunmasına sebep olurlar. Bu yapılarından dolayı yapay tatlandırıcı olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar (Adekoya *et al.* 2006).

g. Kozmetik ve ilaç endüstrisinde proteazlar

Bromelain ve papain enzimleri yüz bakım ürünlerinde hafif peeling etkilerinden dolayı kullanılmaktadır. Ayrıca papaininlekeleri ve sivilcelerin giderilmesinde, yüze pürüzsüzlük sağlanmasında, yara debridmanında, nekrotik dokunun alınması ve kan dolaşımını hızlandırarak cildin iyileşmesine yardımcı olurlar (Maccabe 2007; Mekkeset *et al.* 1997). Bromelain'in uygulama alanları; geri dönüşümlü trombosit agregasyonunda, anti-inflamatuar etki, sitokin ve bağışıklığın modülasyonunda, yanık cildin debridmanında, anti tümör aktivite sağlanmasında, mukolitiketki, sindirime yardımcı olması ve yaraların iyileşmesidir (Morita *et al.* 1979; Inoue *et al.* 1994; Munzige *et al.* 1994; Rosenberg *et al.* 2004; Batkinet *et al.* 1988; Hunter *et al.* 1957; Knill-Jones *et al.* 1970; Tassmanet *et al.* 1965).

Kozmetik sanayisinin kontak lens solüsyonlarında, saç bakımı ürünlerinde, diş macunlarında ve vücuttaki istenmeyen tüylerin giderilmesinde kullanılan ürünlerin yapımında tercih edilmektedirler (Langmaier *et al.* 2002).

Subtilisin ve kollejenaz enzimleri, ciltte meydana gelen yanık ve yara tedavisinde antibiyotikler ile birlikte uygulanırlar. Proteaz inhibitörü ilaçlar; HIV gibi virüs kaynaklı

hastalıkların tedavisinde, yatak yaraları, derin apse ve çıban tedavileri kullanılmaktadırlar (Sevinç 2010; Rao *et al.* 1988).

h. Fotoğraf endüstrisinde proteazlar

Alkalin proteaz enzimleri, kullanılmış X-ışını filmleri veya fotoğraf filmlerinden gümüş geri elde edilmesinde geniş kullanım alanına sahiptirler. Gümüşün geri kazanılması işleminde, jelatin tabakasının filmde ayrılması için filmin yakılarak yapılır. Bu işlem çevre kirliliğine sebep olduğundan yakma işlemi yerine enzimatik hidrolizi tercih edilmektedir (Horikoshi 1999).

i. Atık arıtma işleminde proteazlar

Kıl, saç, tırnak, boynuz, tüy ve yüzgeç, kemik gibi atık ürünlerin imha edilmesinde ve bu ürünlerden değerli biyomateryaller elde edilmesi amaçlı alkalin proteazlardan faydalanılmaktadır. Kümes hayvanlarının atık tüylerinin sert keratin yapısının parçalanmasıyla gıda, yem için gerekli olan yüksek protein kaynağınınvebalık atıklarından da protein, lipid, kitin moleküllerinin eldesini sağlarlar (Gupta *et al.* 2002; Kandasamy *et al.* 2011).

j. Tekstil endüstrisinde proteazlar

Yün, ipek, angora, kaşmir doğal protein liflerindedir, bu ürünlerle papain, pronaz ve pepsin enzimleri bir araya getirildiğinde liflere esneklik sağlanır, daha beyaz bir renk elde edilir ve doğal kirlerinden arındırılmış olunur. Proteolitik enzimlerle yapılan işlemler, kimyasal maddelere göre hem daha kaliteli ürün elde edilmesini hem de zamandan tasarruf yapması bakımından daha avantajlıdır (Duran vd. 2007; Karmakar 1999).

KURAMSAL TEMELLER

Jooand Chang (2004), çalışmalarında *B.clausii*I-52 mikroorganizmasından biyoteknolojik açıdan önemli olan alkalın proteazı saflaştırmışlardır. Öncelikle enzimidiyanon HPA75, devamında Fenil Sefaroz ve DEAE-Sefaroz kolon kromatografisi işlemlerini yaparak %79 verimle 10kat saflaştırıp, molekül kütlesini 28 kDa bulmuşlardır. Enzimin karakterizasyon çalışması sonuçlarını pH 11, optimum sıcaklık 45°C, KM değerini 83,9 μmol^{-1} , Vmax değerini 238.6 s⁻¹ bulup SDS ve H₂O₂ varlığında enzimin kararlı olduğunu raporlarında bildirmişlerdir.

Miyaji et al. (2005), çalışmalarında *B.pumilus*MS-1'den, subtilisin benzeri alkalın proteaz olan BPP-A'yı saflaştırıp, karakterizasyon çalışmalarını yapmışlardır. Alkalın proteazı %13 verimle 5.5 kat saflaştırma sonrasında molekül kütlesini SDS-PAGE tekniğiyle 33 kDa olduğunu raporlarında belirtmişlerdir.

Kim et al. (2006), çalışmalarında *B.subtilis*TP-6 bakterisinden fibronilitiksubtilisin benzeri alkalın proteaz enzimini saflaştırma yapmışlardır. Amonyum sülfat, Octyl Sepharose ve SP Sepharoz işlemlerini uygulayarak %26 verimle 200 kat saflaştırma gerçekleştirmişlerdir. Karakterizasyon çalışma sonuçları maksimum aktiviteyi, sıcaklık 50°C'de, pH 7, molekül kütlesini SDS-PAGE tekniğiyle 29 kDa olarak belirlemişlerdir. Alkalın proteaz enzimi, %1 ve %10'luk metanol, izopropanol ve etanol varlığında, kararlı ve stabil olduğunu göstermişlerdir. Enzimin inhibasyonunun 1 mM EDTA (%36), 1 mM PMSF (%53) ve %10 β -merkaptoetanolda (%46) ile yapıldığını bildirmişlerdir.

Gupta and Khare (2005), çalışmalarında topraktan izole ettikleri bakteri *Pseudomonas aeruginosa*'danelde edilen proteazı kullanmışlardır. Bu suştan salgılanan enzimi hidrofobik çözücüler ile muamele ettiklerinde stabil kaldığını, %25 çözücü konsantrasyonunda 10gün boyunca aktif olabildiğini ve proteazın %75'lik yüksek çözücü konsantrasyonunda 48 saate kadar dayanabildiklerini belirtmişlerdir. Bu özellikleri incelendiğinde bu proteazı atık su arıtımı - çözücü biyoremediasyonu ve susuz ortamda biyotransformasyon uygulamalarında kullanılmaya elverişlidir.

Arulmaniet al. (2006), çalışmalarında *B.laterosporus*-AK1 bakterisinden termostabil alkalın proteazı saflaştırmışlardır. Saflaştırma işlemi Sephadex G-200 jel filtrasyon tekniği ve DEAE selüloz iyon değişim kromatografisi tekniklerini uygulayarak %34.3 verimle 11.1 kat saflık sağlamışlardır. Enzimin en fazla ilgiyi kazein substratına gösterdiğini ve molekül

kütlesinin SDS-PAGE tekniğiyle 89.29 kDa olarak belirtmişlerdir. Çalışmada bulunan optimum sonuçları, sıcaklık 75°C, pH 9.0, enzim aktivitesine Ca²⁺ ve Mg²⁺ iki değerlikli metal iyonlarının da arttırıcı etkisi olduklarını bildirmişlerdir. Ariel deterjanı ile 1 saat inkübe edildikten sonra %75 enzimin kararlılığını koruduğunu ve Wheel deterjanının kan lekesi üzerine uygulandığında lekeleri çıkarttığını belirlemişlerdir.

Basu et al. (2006), *Aspergillusniger* AB100'ün proteaz enzimini çalışmışlardır. Karakterizasyon çalışmalarında maksimum aktiviteyi, pH 7.0, sıcaklık 50°C ve molekül kütlesini SDS-PAGE tekniğiyle 30,09 kDa değerlerinde bildirmişlerdir. Enzimin metalloproteaz olduğunu ve Mg²⁺, Mn²⁺, Ca²⁺, Fe²⁺ ve Zn²⁺varlığında aktif, Hg²⁺ varlığında ise inhibe olduğu raporlarında göstermişlerdir.

Jaouadi et al. (2008), çalışmalarında *B.pumilis* CBS bakterisinden katalitik etkisi yüksek olan alkalenproteaz enzimini saflaştırmışlardır. Alkalen proteaz enziminituz çöktürmesi, jel filtrasyon ve HPLC tekniğiyle saflaştırıp, molekül kütlesini MALDI-TOF kütle spektrometresiyle 34598,19 kDa bulmuşlardır. Karakterize çalışmasında enzimin optimum koşulları, pH 10,6 ise sıcaklığın 65°C iken pH 7,0-10,6 arası ise sıcaklığın 30°C-55°C arasında karalı olduğunu bildirmişlerdir. Enzimin aktivitesini Ca²⁺ ve Mg²⁺ arttırırken Hg²⁺'nin inhibe ettiğini, Mn²⁺, Ba²⁺ ve Cu²⁺'nin ise etkisiz olduğunu rapor etmişlerdir.

Charles et al. (2008), çalışmalarında *Aspergillusnidulans* HA-10'undan alkalın proteaz enzimini saflaştırmışlardır. Saflaştırma işlemini amonyum sülfat ve Sephadex G-200 kolon kromotografisi teknikleri ile %39 verimle 42.4 kat gerçekleştirip molekül kütlesini SDS-PAGE tekniğiyle 42 kDa olarak bildirmişlerdir. Alkalen proteaz enziminin optimum ortam koşulları 50°C'de ve pH 6,0-10,0 arasında stabilitesini koruduğunu ve serin proteaz olduğunu bildirmişlerdir.

Haddar et al. (2008), *B.mojavensis* A21'i deniz suyu örneklerinden izole edip çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. Bakterinin ürettiği enzimin ağartıcılara karşı kararlı ve hücre dışı olduklarını bildirmişlerdir. Saflaştırma için öncelikle aseton çöktürmesi işlemi uygulandı devamında Sephadex G-75 jel filtrasyon yöntemi ve CM-Sepheroz iyon değişim kromotografisi tekniği uygulanmış olup %16.4 verimle 6,43 kat saflaştırmışlardır. Alkalen proteaz enziminin optimum koşulları, sıcaklık 60°C, pH 8,5 ve molekül kütlesi 20 kDa'dur. Enzimin %1 ve %5 Tween-80, %0.1 SDS, %1 Triton-X100 varlığında kararlılığını koruduğu ve sıcaklık 60°C iken CaCl₂ varlığında termostabilitesini arttırdığını rapor etmişlerdir. Ağartıcı ve okside edici ajanlar ile bir saat inkübasyon edildikten sonra aktivite ölçümü yapıldığında ilk olarak %79 ve devamında %70 olarak bildirmişlerdir. Bu sonuçlara baktıklarında saflaştırılan enzimin sıvı-katı deterjanlar ile kullanıma uygun olabileceği

yorumunu yapmışlardır. Ariel, Axion, Dixan, Nadhif ve New Det markalı deterjanlar ile farklı sıcaklık değerlerinde bir saat inkübasyonda muameleye bırakmışlardır. Ölçüm sonuçlarına baktıklarında 30°C ve 40°C de var olan aktivitelerini koruduklarını, ancak 50°C’de Axion ve Ariel markalı deterjanlarda enzimin ilk baştaki aktivitesinin %80’ini koruduğu, New Det ve Nadhif çamaşır deterjanlarında ise %75’ini kaybaldığını belirtmişlerdir.

Rao et al. (2008), çalışmalarını *B.circulans* bakterisinden saflaştırdıkları proteaz enzimini çalışmışlardır. Alkalın proteaz enzimini amonyum sülfat çöktürmesi işlemi ve Sephadex G-100 tekniğiyle %20 verimle 11.9 kat saflaştırmışlardır. SDS-PAGE ile molekül kütesinin 39.5 kDa bulmuşlardır. Proteaz enziminin optimum sıcaklık 70°C, pH 11, KM değerini 0,597 mg ml⁻¹ ve Vmax değerini 13825 µmol.min⁻¹ olarak bildirmişlerdir. Proteaz enziminin %1 Triton-X-100 ve Tween-20 varlığında ilk başta %15 ve sonrasında %20 aktivitesini arttırdığını, %1 SDS varlığında ise %75’ini koruduğunu ve %1 H₂O₂ varlığında da inhibasyon oluşmadığını belirtmişlerdir. Deri endüstrisinde ve kan lekesi üzerinde çalışmalar yapmışlardır.

Rai and Mukherjee (2008), çalışmalarında *B.subtilis* DM-04’den izole ettikleri alkalın proteaz enzimini çalışmışlardır. Saflaştırılmasında zwitter iyon formunda anyon ve katyon değiştirici kromatografisi işlemi, etanol çöktürmesi ve HPLC tekniklerini kullanmışlardır. İşlem sonunda 23,5 kat saflaştırma sağlayıp, molekül kütesini değerini 16,9 kDa olarak raporlamışlardır. Karakterizasyon çalışmasında optimal sıcaklık 45°C, pH’ı 10,0 ve substrat eşliğinde KM değerini 59 µM iken Vmax değerini de 336 µg min⁻¹ olarak belirtmişlerdir. Çalışmalar sonunda proteaz enziminin iyi bir leke çıkarıcı olduğunu ve deri işleme alanlarında etkili bulunduğunu raporlarında bildirmişlerdir.

Divakar et al. (2010), çalışmalarında *Aeromonas veronii* PG01’i endüstriyel atıklardan izole edip saflaştırmışlardır. Enzimi öncelikle amonyum sülfat çöktürmesi işlemi daha sonrasında iyon değişim kromatografisi yöntemi ve jel permeasyon tekniklerini kullanarak %32 verimle 53 kat saflaştırma gerçekleştirmişlerdir. Molekül kütesini GPC-HPLC ile 67 kDa bulurken SDS-PAGE’le 33 kDa tespit etmişlerdir. Karakterizasyon çalışmalarında optimum sıcaklık 60°C ve pH’ı 7,5 olduğunu belirlemişlerdir. Mg⁺², Ca⁺² ve Mn⁺² iki değerlikli metallerinin enzimin aktivitesini artırır iken Zn⁺² ve Hg⁺²’nin ise inhibe edici olduğunu belirlemişlerdir. Alkalın proteaz enziminin DMSO, benzen ve metanolde kararlı olduğunu ayrıca n-hekzan ve n-dodekanın enzimin aktivitesini 1,3-1,5 kat arttırdığını raporlamışlardır. Enzimin çalışmalarda yüzey aktif maddelerine ve okside edici ajanlara kararlı ve aktif olduğunu göstermişlerdir.

Cihan et al. (2011), çalışmaları için Türkiye'nin farklı bölgelerdeki jeotermallerinden saflaştırdıkları *Aeribacillus* ve *Geobacillus* cinslerine ait izolatların filogenetik çeşitliliklerinin araştırmalarını yapmışlardır. Toplamda Türkiye'nin farklı jeotermallerinden izole ettikleri 31 cins termofilik *Bacillus sp.* tanımlanmış olup bunların 4 tanesi *Aeribacillus* ve 27 tanesi *Geobacillus* cinsine aittir.

Deepti et. Al (2011), çalışmalarında *Bacillus sp.* SM2014 suşunun tanımlanmasını yapmışlardır. *Bacillus sp.* SM2014 suşu, termoaktif, haloalkalin ve organik çözücülere karşı kararlı proteaz enzimi üretebildiğini bildirmişlerdir. Saflaştırılmasını öncelikle amonyum sülfat ve devamında diyslizSephadex jel filtrasyon işlemleriyle %54 verimle 64 kat saflıkta gerçekleştirmişlerdir. Alkalen proteaz enzimin optimum aktiviteyi sıcaklık 60°C'de, pH 10 ve 3M tuz varlığında iken olduğunu rapor etmişlerdir. Molekül kütlelerini 71 kDa, KM değerini 0,57 mg/ml ve Vmax değerini ise 445,23 U/ml olarak bulmuşlardır. Enzimi 15 gün boyunca aseton, benzen, DMSO, toluen, bütanol, hekzan, ksilan, n-decan, n-heptan ve izooktanın %14 ve %25'lik konsantrasyonlarda inkübasyona bırakılmış ve kararlılıklarını muhafaza ettiklerini rapor etmişlerdir. Ancak %50'lik konsantrasyon değerlerinde ise 192 saat sonra n-heptan, n-dekan ve hekzan varlığında enzimin aktivitesinde bir farklılık görülmezken diğer kullanılan organik çözücülerdeki enzimin aktivitesinde azalma olduğunu göstermişlerdir. Enzimin %50'lik konsantrasyonlardaki kararlılığından dolayı peptid sentezinde kullanıma uygun olabileceğini belirtmişlerdir. Proteaz enziminin yıkama performans test sonucu değerlendirildiğinde deterjan ve sürfaktanlar ile uyumlu olması çamaşır deterjanları sanayisinde kullanılabileceğini doğrulamışlardır.

Kandasamy et al. (2011), çalışmalarında *Pseudomonasfluorescens* izole etmişlerdir. Enzim için en iyi pH 10,5 ve sıcaklık 40°C olarak belirlemişlerdir. Bu enzimin uygulanabileceği endüstriyel alanların deri işleme ve kıl ayırma için uygun olduğunu göstermişlerdir.

JoshiandSatyanarayana (2012), çalışmalarında *B.lehensis* bakterisinden alkalik proteaz enzimi izole edip *Escherichiacoli*'ye klonlayıp gerçekleştirmişlerdir. Rekombinant 27 enzimin molekül kütlelerini 39 kDa, optimum sıcaklık 30-60°C ve optimum pH'ını 8-12 aralığında bildirmişlerdir. Enzimin Co⁺² ve Ca⁺² metalleri ile aktive olduğunu Hg⁺² metaliyle ise inhibe olduğunu belirtmişlerdir. Enzim okside edici ajanlar ve yüzey aktif maddeleri ile muamele edildiğinde dayanıklılığını tespit etmişlerdir. Saflaştırıp klonladıkları genin sonrasında incelediğinde 4 kat proteaz enzim üretiminin arttığını rapor etmişlerdir. Çalışmalarında yaptıkları ile X ray/fotoğrafik filmlerden gümüş ürününün geri

kazanılmasını sağlayarak bu aşamalarda proteaz enziminin bu alanlarda kullanıma uygunluğunu bildirmişlerdir.

Annamalai et al. (2012), *B.halodurans* CAS6'ı deniz tortularından izole edip proteaz enzimini saflaştırmışlardır. Saflaştırma işlem basamakları önce amonyum sülfat çöktürmesi işlemi devamında ise DEAE iyon değişim kromatografisi yöntemini ve Sephadax G-50 kromatografisi uygulanarak %12,6 ile 7,96 kat saflık sağlamışlardır. Molekül kütlesini n sonucunu 28 kDa olarak belirlemişlerdir. Enzimin optimum sıcaklık 70°C, optimum pH 10,0'da ve %30 tuz yoğunluğu varlığında bir saat inkübasyon sonrasında aktivitesini koruduğunu raporlamışlardır. Enzimin haloalkalin, termostabil ve organik çözücülere karşı dayanıklı olduğunu göstermişlerdir. Enzimi %0.5'lik konsantrasyondaki organik çözücüler ile 50°C'de dört saat inkübasyon sonucuna bakıldığında enzimi ksilen ve hekzanın aktive ederken, izopropanol ve benzen varlığında kararlılığını koruduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışmaların sonunda endüstriyel olarak %1'lik konsantrasyondaki ticari deterjan ve yüzey aktif maddeleri ile enzimin aktivitesinin kararlılık gösterdiğini raporlarında belirtmişlerdir.

Raut et al. (2012), çalışmalarında *Saccharopolyspora sp.* A9 bakterisinden proteaz enzimini saflaştırmışlardır. Enzimi deniz suyundan izole edip sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi işlemi, DEAE iyon değişim kromatografisi yöntemini, Sephadex G-200 jel filtrasyon teknikleri uygulayarak %20 verimle 23,28 kat saflaştırmışlardır. Alkalin proteaz enziminin molekül kütlesinin değerini 32 kDa belirleyip, optimum sıcaklık 70-80°C ve optimum pH ise 10,0 ve 8,0-12,0 arasında kararlı olduğunu belirtmişlerdir. Yapılan metal testinde Ca²⁺ ve Mg²⁺'nin enzimi aktive edip PMSF'de ise tamamen inhibe olduğunu raporlamışlardır. Bu sebeple enzimin serin proteaz ailesine ait olduğunu bildirmişlerdir. Çalıştıkları enzimin yara iyileştirici özellikte olduğunu ve uygulanabilirliğini göstermişlerdir.

Jayakumar et al. (2012), yaptıkları çalışmalarında alkalin proteaz enzimini *B.pumilis*MCAS8'den izole edip saflaştırmışlardır. İşlemi sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi işlemi ve diyaliz teknikleri uygulayarak %44,3 verimle %1,9 kat saflaştırma sağlamışlardır. Çalıştıkları enzimin molekül kütlesini 36 kDa belirleyip, optimum sıcaklık 60°C ve pH'ı 9,0 olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca bu enzimin 20-70°C sıcaklıklar arasında kararlı olduğunu da göstermişlerdir. Yapılan metal test uygulamalarında Ca²⁺,Ba²⁺ ve Mg²⁺ iki değerlikli metallerin varlığında aktive olduğunu, Zn²⁺, Sr²⁺, Hg²⁺ ve Fe²⁺ varlığında ise inhibe olduğunu belirtmişlerdir. Yıkama performans çalışma sonuçlarında, pamuklu kumaşlardaki kan lekelerini başarılı bir şekilde çıkardığı için deterjanlara katkı maddesi olarak kullanıma uygulanabilirliğini söylemişlerdir. Ayrıca keçi derseniden kıl ayırma uygulamalarında da başarılı olduğunu bildirmişlerdir.

Pandey et al. (2012), *Oceanobacillus sp.* (GQ162111)'dan alkalın proteaz enzimini izole edip, saflaştırmışlardır. Hindistan kıyı Gujarat'dan izole edip, amonyum sülfat çöktürmesi işlemleri ve Fenil Sepharoz 6FF tekniğiyle %28 verimle %27,83 kat saflaştırma sağlamışlardır. Optimum sıcaklık 50°C ve pH'ında 8,0-11,0 olup, moleköl kütlelerinin 30 kDa olduğunu tespit etmişlerdir. Enzimin 2-3M tuz inkubasyon edilmesinin 18 saat sonunda stabilitesini koruduğunu raporlamışlardır. Bakterinin organik çözücüler varlığında enzim ürettiklerini ve %30 konsantrasyonlardaki dekan, dodoken, hekzan, hptan gibi organik çözücülerde önemli derecede büyüdüklerini de kanıtlamışlardır.

Anbu (2013), çalışmasında *B.koreensis* BKP21A'dan alkalın proteaz enzimi izole edip saflaştırmıştır. Enzimi öncelikle amonyum sülfat çöktürmesi işlemleri devamında Superdex 200 10/300 ve Superdex 75 10/300 GL kromatografi yöntemleriyle %23 verimle 5 kat saflaştırmıştır. Güney Kore'de deterjan atıklarından izole ettiği suşun toplam 18 proteaz ürettiğini tanımlamıştır. Enzimin moleköl kütleleri 48 kDa olup, optimum sıcaklık 60°C ve pH'ın 9,0 olarak belirtmiştir. Enzim %1 H₂O₂ ile muamele edildiğinde %81 aktivitesini koruduğunu belirtip hidrofilik organik çözücülerle karşı aktif ve kararlı olduğunu raporlamıştır.

Wang et al. (2013), çalışmalarında *B.Amyloliuefaciens* SYB-001 suşundan nötral metallo proteaz enzimini izole edip saflaştırmışlardır. İlk olarak amonyum sülfat çöktürmesi işlemleri, iyon değişim, hidrofobik etkileşim ve jel filtrasyon kromatografisi yöntemlerini uygulayarak 5,6 kat saflaştırma sağlamışlardır. Enzimin optimum aktiviteyi sıcaklık 50°C ve pH 7,0'de sağladığı, moleköl kütlelerini 36,8 kDa olarak rapor etmişlerdir. Çalışmaların EDTA'nın enzimi tamamen inhibe ettiğini ve bu yüzden bulunan enzimin metallo proteaz grubu olduğunu bildirmişlerdir.

Nam et al. (2013), yaptıkları çalışmalarında *Serratiamarcescens* S3-R1'den proteaz enzimini izole edip saflaştırmışlardır. Kore ginseng rizosferden izole edip, amonyum sülfat çöktürmesi işlemleri, DEAE anyon değişim yöntemini ve Mono Q kromatografisi tekniklerini uygulayarak 5,8 kat saflaştırmışlardır. Enzimin optimum aktiviteyi sıcaklık 40°C ve pH 7,0-9,0 arasında olduğunu ayrıca moleköl kütlelerini de 50,3 kDa olarak tespit etmişlerdir. Enzimin 30 N-terminal ucundaki aminoasitleri belirleyerek metallo proteaz enzimi olduğunu göstermişlerdir.

Karadize et al. (2014), çalışmalarında *Pseudomonasaeruginosa* san-ai suşunu izole edip proteaz enzimini saflaştırmışlardır. Bu mikroorganizmayı sanayide metal işlemleri prosesleri sırasında yağlama ve soğutmada kullanılan suda çözümleri kesme yağından izole edip, 18kDa proteazı saflaştırdıklarını belirtmişlerdir. Enzimin maksimum aktiviteyi

olabilmesi için sıcaklığın 60°C ve pH'ında 9,0 olması gerektiğini raporlamışlardır. Organik çözücüler ile enzim muamele edildiğinde kararlılığını koruduğunu ve peptid sentezi için uygunluğunu bildirmişlerdir. Metal endüstrisindeki uygulamalarda kesme yağının çürümesini engellemek için enzim kullanılabileceğini göstermişlerdir.

Papgianni and Sergedilis (2014), çalışmalarında *Penicillium nalgiovense* PNA9 suşundan enzimi izole edip saflaştırmışlardır. Enzimin saflaştırılmasını sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve ultrafiltrasyon tekniklerini uygulayarak 12,1 kat saflık sağlamışlardır. Çalışılan enzimin molekül kütlesi değerini 45,2 kDa olarak belirleyip, optimum aktiviteyi sıcak 35°C'de pH 8,0 ve 0.25M tuz yoğunluğu varlığında olduğunu raporlamışlardır. Enzim PMSF ile muamele edildiğinde inhibe olmasından dolayı enzimin serin proteaz olduğunu bildirmişlerdir.

Mohammed et al. (2017), yaptıkları çalışmalarda Ürdün kaplıcalarından *Thermomona shydrothermalis* izole edip enzimini saflaştırmışlardır. Bu izolatan amilaz, selüloz, jelatin, proteaz ve lesitin gibi termofilik enzim üretebildiklerini göstermişlerdir. Bu izolatların enzimatik özelliklerinin filogenetik ağaçlarını belirleyip, endüstriyel çevresel uygulamalar için başarılı bir fenotipik çeşitlilik gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Manyara (2018), çalışmasında Soda gölleri gibi aşırı eksterm şartlarda yaşayan mikroorganizmaların ürettiği enzim ve bunların karakterizasyonlarını yapmıştır. Çalışmasındaki dizileme analizlerinde *Bacillus*, *Clostridium* ve *Halomonastürlerine* saptamıştır. Yapmış olduğu analizler sonunda göl sistemi için ekolojik önlem ve biyoteknolojik uygulamalar için büyük ölçüde önemli olduğu belirtmiştir.

Pham et al. (2021), çalışmalarında amilaz ve proteaz gibi mikrobiyal enzimlerin biyoyakıt sanayisinde, organik atıkların parçalanması, ilaç, kimya ve tarım alanlarının biyoteknolojik uygulamalarında değerli enzimler olduklarını bildirmişlerdir. *Baxillys* cinsine ait FW2 suşunu izole edip saflaştırmışlardır. Enzimin maksimum aktivitesi için sıcaklık 40-45°C ve pH'ın 4,5-12 arasında olduğunu rapor etmişlerdir. Molekül kütesinin değerini SDS-PAGE analiziyle 28 kDa olarak bildirmişlerdir.

MATERYAL VE METOD

Materyal

Çalışmada kullanılan organizma

Yüksek lisans tez çalışmasında Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL (Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü) tarafından izolasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirilen *Geobacillus stearothermophilus* AH6 şusu kullanılmıştır (Adıgüzel).

Kullanılan kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasal ürünler şunlardır:

- Tris
- caseinfrommilkpowder
- Tryptone soya agar
- Tryptone soya broth
- Nutrientbroth
- TCA
- Na_2CO_3
- Folin
- NaOH ve HCL .

Kullanılan ekipman ve cihazlar

- Steril Kabin cihazı (Telstar AV -100)
- Spektrofotometre cihazı (BeckmanCoulter DU'730 Life science UV/V is spectrophotometer)
- Santrifüj cihazı (Hettich)
- Magnetik Karıştırıcı (Stirrer HS31)
- Etüv cihazı (Termo Scientific Heraus Incubator)
- Vorteks (WiseMix)
- Çalkalayıcı (Midii Dual 14)
- İnkübatör cihazı (Sanyo)
- Deep-Freeze dondurucu (Harris, -20 °C)
- Hassas Terazı aleti (Geg, Avery)

- Otoklav cihazı (Hiclave Hv-50L)
- Su Banyosu (Grant 6G)
- pH metre ölçeri (Metler Toledo)
- Saf su cihazı (BamsteadPureEasy)
- Buzdolabı (Siemens)

Yöntemde Yapılan İşlemler

Petride bakterinin üretilmesi ve büyütülmesi

Steril kabinde *Geobacillus stearothermophilus* AH6 suşunu öze ile alınarak TSA katı besiyerine çizgi ekim yapıldı ve 55°C'de 24saat inoküle uygulandı. Daha sonra TSB sıvı besiyerine ekim yapıp, kapakları hafif aralıklı kapatılıp 55°C'de inkübatörde 24saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda 600nm spektrofotometre ölçümleri yapıldı ve kaydedildi.

Besiyerinde bakterinin proteaz aktivitesinin belirlenmesi

TSB sıvı besiyerindeki bakterilerin 600nm spektrofotometre ölçümleri yapıldı. Nutrient broth (100ml saf su ve 1,3g NB)-1g casein milk powder besiyeri hazırlandı. TSB'de büyüyen bakteriler alınıp, nutrientbroth-casein besiyerine ekimi yapıp, 130rpm'de, 55°C'de 6gün inkübasyona bırakıldı. 4 ve 5. günlerdeki besiyerlerinden alınıp falkona eklendi. Ürünler 5000rpm-15dk.-25°C santrifüj edildi. Falkondaki süpernatant kısım alınıp başka bir falkona aktarıldı ve +4°C buzdolabında saklandı.

Bakterinin alkalın proteaz aktivitesinin ölçümünün yapılması

Geobacillusstearothermophilus AH6 suşunun proteaz aktivitesi ölçümü için Takami et al. (1989), tarafından uygulanan kazeinin substrat olarak kullanıldığı yöntem modifiye edilerek hesaplama işlemi yapıldı. İşlem basamakları, 0,5 ml enzim çözeltisinin üzerine 100 mM pH'sı 8 olan Tris ve HCl tampon çözeltisinde hazırlanan %0,65'lik kazein çözeltisi 2,5 ml miktarında eklenerek reaksiyon çözeltisi 55°C'de ve 10 dakika süre ile inkübatörde bekletildi. Kör olarak enzim çözeltisi yerine 0,5ml 100 mM pH 8,5 Tris-HCl tampon çözeltisi ilave edilen reaksiyon karışımı kullanılarak yapıldı. İnkübasyon işlemi sonunda enzim karışımına ve köre 110 mM trikloroasetik asit (TCA) çözeltisinden 2,5 ml eklenerek reaksiyonun sonlandırılması yapıp, karışımlar 55°C'de ve 20 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. Süreleri tamamlandıktan sonra 5000rpm'de 5 dakika santrifüj işlemi uygulandı. Süpernatantın 1 ml'sine 0,5 M hazırlanan Na₂CO₃ çözeltisinden 2,5 ml ve Folin-Ciocalteu reaktifinden 0,5 ml karışıma eklenerek, karışım 55°C'de 15 dakika daha bekletildikten sonra 660 nm'de spektrofotometrik olarak proteaz enziminin absorbans ölçümleri yapıldı ve kaydedildi.

Enzim aktivitesi ölçümü için aşağıdaki formül kullanılmıştır:

$$\text{Proteaz Aktivitesi (EU/ml)} = \frac{\text{A660/Eğim} \times \text{Toplam Hacim}}{\text{Enzim Hacmi} \times \text{İnkübasyon Süresi}} \times \text{Seyreltme Faktörü}$$

Proteaz enziminin karakterizasyon çalışmaları

Alkale proteaz enzimi için optimum inkübasyon süresinin belirlenmesi çalışması

Geobacillus stearothermophilus AH6 suşunun proteaz enziminin optimum inkübasyon yaşı belirlemek amacıyla TSA ve devamında TSB’de büyütülen bakteriler nutrient broth-casein milk powder karışımı besiyerine ekimi yapıp, 55°C’de, 130rpm’de 6gün inkübasyona bırakıldı. 4., 5. ve 6. günlerdeki besiyer karışımındaki bakterilerin 600nm spektrofotometre ölçümleri yapıp kaydedildi. Besiyerdeki bakteri ekstratlarından 15ml. falkon tüplerine alınarak 5000rpm, 15dk. ve 25°C santrifüj yapıldı. Santrifüj sonunda üst süpernatant kısımları alınıp steril falkon tüplerinde +4°C’de üremeleri durdurulmuş şekilde muhafaza edildiler. 6.günün sonunda üç numunenin proteaz aktivite ölçümleri için 0,5ml enzim çözeltisi üzerine, Tris-HCl (pH:8), 2,5ml %0,65’lik casein, 2,5ml 110mM TCA, 2,5ml 0,5M Na₂CO₃ ve 0,5ml folin kullanılarak tamamlandı. Daha sonrasında numuneler 660nm spektrofotometre ölçümleri yapıldı.

Alkale proteaz enzimi için optimum pH belirlenmesi çalışması

Geobacillus stearothermophilus AH6 suşunun proteaz enziminin optimum pH’ını belirlemek için %1’lik casein milk powder ile nutrient broth (500ml saf su ve 6,5g NB) besiyerini beş farklı pH değerlerinde (5, 6, 7, 8 ve 9) 1M HCl ve 1M NaOH ile asidik ve bazik ortamlar ayarlanıp bakterilerin ekimi yapıldı. 55°C’de, 130rpm’de 5 gün inkübasyona bırakıldı. 5. günün sonunda 5 tüpünde 600nm spektrofotometre ölçümleri yapıldı. Besiyerdeki bakteri ekstratlarından 15ml. falkon tüplerine alınarak 5000rpm, 15dk. ve 25°C santrifüj yapıldı. Santrifüj sonunda süpernatant kısımları alınıp, proteaz aktivite tayinlerinin ölçümü yapıldı (Haddar *et al.* 2008; Ravindranet *al.* 2011). Proteaz aktivite tayini için 0,5ml enzim çözeltisi üzerine, Tris-HCl (pH:8), 2,5ml %0,65’lik casein, 2,5ml 110mM TCA, 2,5ml 0,5M Na₂CO₃ ve 0,5ml folin kullanılarak tamamlandı. Daha sonrasında numuneler 660nm spektrofotometre ölçümleri yapıldı. Alkaline proteaz enziminin pH aralığının grafik çiziminde en yüksek aktivitesinin gözlemlendiği pH değerini 100 olarak kabul edip ve diğer sonuçlarıdabu değere göre bağıl aktivite (%) cinsinden aralarında kıyaslamaları yapıldı.

Alkalın proteaz aktivitesi için optimum azot kaynağı miktarının belirlenmesi çalışması

G.stearothermophilus AH6'dan elde edilen proteaz enziminin optimum azot kaynağı miktarını belirlemek için her besiyerinin pH değeri 5, %0,5 (100ml saf su + 0,5g casein), %1 (100ml saf su + 1g casein), %1,5 (100ml saf su + 1,5g casein) ve %2 (100ml saf su + 2g casein)'lik olacak şekilde dört farklı casein milk powder ile nutrient broth (100ml saf su ve 1,3g NB) besiyerlerine bakterilerin ekimi yapıldı. 55°C'de, 130rpm'de 5 gün inkübasyona bırakıldı. 3., 4. ve 5. günlerin sonunda üç tüpünde 600nm spektrofotometre ölçümleri yapıldı. Besiyerdeki bakteri ekstratlarından 15ml. falkon tüplerine alınarak 5000rpm, 15dk. ve 25°C santrifüj yapıldı. Santrifüj sonunda süpernatant kısımları alınıp, proteaz aktivite tayinleri yapıldı. Proteaz aktivite tayini için 0,5ml enzim çözeltisi, Tris-HCl (pH:8), 2,5ml %0,65'lik casein, 2,5ml 110mM TCA, 2,5ml 0,5M Na₂CO₃ ve 0,5ml folin kullanılarak tamamlandı. Daha sonrasında numuneler 660nm spektrofotometre ölçümleri yapıldı.

Alkalın proteaz aktivitesi için optimum sıcaklık belirlenmesi çalışması

G.stearothermophilus AH6'dan elde edilen proteaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için her besiyeri için pH değeri 5,%2 casein milk powder ile nutrient broth (100ml saf su ve 1,3g NB) besiyerlerine bakterilerin ekimi yapıldı. İnkübasyon sıcaklığı üç farklı inkübatörde 50°C, 55°C ve 60°C ayarlanıp, 130rpm'de 5 gün inkübasyona bırakıldı. 5. ve 7. günlerin sonunda iki tüpünde 600nm spektrofotometre ölçümleri yapıldı. Besiyerdeki bakteri ekstratlarından 15ml. falkon tüplerine alınarak 5000rpm, 15dk. ve 25°C santrifüj yapıldı. Santrifüj sonunda süpernatant kısımları alınıp, proteaz aktivite tayinleri yapıldı (Rahman *et al.*2006). Proteaz aktivite tayini için 0,5ml enzim çözeltisi üzerine, Tris-HCl (pH:8), 2,5ml %0,65'lik casein, 2,5ml 110mM TCA, 2,5ml 0,5M Na₂CO₃ ve 0,5ml folin kullanılarak tamamlandı. Daha sonrasında numuneler 660nm spektrofotometre ölçümleri yapıldı. Alkalın proteaz enziminin sıcaklık profilinin grafik yapımında en yüksek aktivitesinin gözlemlendiği sıcaklık değerini 100 olarak kabul edip ve diğer sonuçları da ona göre bağlı aktivite (%) cinsinden birbiriyle kıyaslamaları uygulandı.

Alkalın proteaz aktivitesi için optimum karbon kaynağı miktarının belirlenmesi çalışması

G.stearothermophilus AH6'dan elde edilen proteaz enziminin optimum karbon kaynağı miktarını belirlemek için kurutulmuş karpuz kabuğu tozu kullanıldı. Bu çalışmada karbon kaynağını altı farklı değer belirleyerek 1g, 2g, 3g, 4g, 5g, ve 6g kurutulmuş karpuz kabuğu tozu eklendi ve her besiyeri için pH değeri 5,%2 caseinmilkpowder ile nutrientbroth (100ml saf su ve 1,3g NB) besiyerlerine bakterilerin ekimi yapıldı. Altı ekim yapılmış

erlenlerimizi 55°C, 130rpm'de 5 gün inkübasyona bırakıldı. 5. günün sonunda altı tüpünde 600nm spektrofotometre ölçümleri yapıldı. Besiyerdeki bakteri ekstratlarından 15ml. falkon tüplerine alınarak 5000rpm, 15dk. ve 25°C santrifüj yapıldı. Santrifüj sonunda süpernatant kısımları alınıp, proteaz aktivite tayinleri yapıldı. Proteaz aktivite tayini için 0,5ml enzim çözeltisi üzerine, Tris-HCl (pH:8), 2,5ml %0,65'lik casein, 2,5ml 110mM TCA, 2,5ml 0,5M Na₂CO₃ ve 0,5ml folin kullanılarak tamamlandı. Daha sonrasında numuneler 660nm spektrofotometre ölçümleri yapıldı.

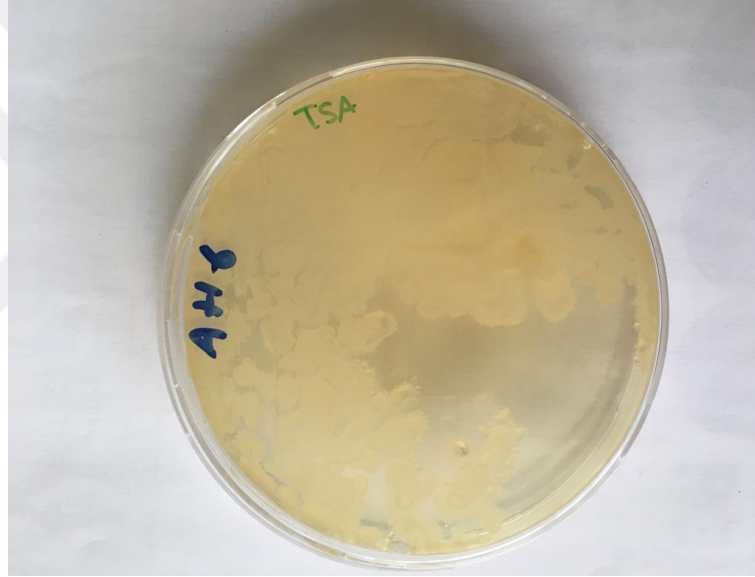
Verilen istatikselsel analizinin yapılması

Bu tez çalışmasında verilerin istatikselsel analizlerinin değerlendirilmesi aşamasında Graph Pad Prism 5 (Graphpad, La, Jolla, CA) Software 7,0 istatik programıyla yapıldı. Bütün sonuçlarda mean±standart hata (SEM) değerleri analiz yapıldı.

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Kullanılan Bakterinin Petride Büyütülmesi ve Üretilmesi

Bu yüksek lisans tez çalışmasında kullanılan *G.stearothermophilus* AH6 şusu, çubuk şeklinde, gram pozitif ve termofiliktir. Toprakta, kaplıcalarda ve okyonus tortularında bolca bulunmaktadırlar. Prof.Dr. Ahmet Adıgüzel tarafından izole edilmiş ve -80°C’de dondurularak muhafaza edilen bakteri önce TSA besiyerinde devamında TSB besiyerinde büyütülüp çoğaltıldı, daha sonrasında nutrient broth - casein milk powder karışımı besiyerlerinde proteaz aktivitesi açısından pozitif olduğu gösterildi.



Şekil 2. TSA besiyerinde 24 saatin sonunda *G.stearothermophilus* AH6

Besiyerindeki Bakterinin Proteaz Aktivitesinin Ölçümü

İnkübasyon sonunda nutrient broth - casein milk powder besiyerindeki Şekil 3’de gösterildiği gibibulanık görünüm bakterilerin proteaz aktivitesi açısından pozitif olduklarını gösterdi. Proteaz aktivitesi ölçümü için 3.2.3.’de belirttiğim gibi substrat olarak kazeini kullanarak yapıldı.



Şekil 3. Nutrient broth – casein milk powder besiyerinde 5.günde *G.stearothermophilus* AH6

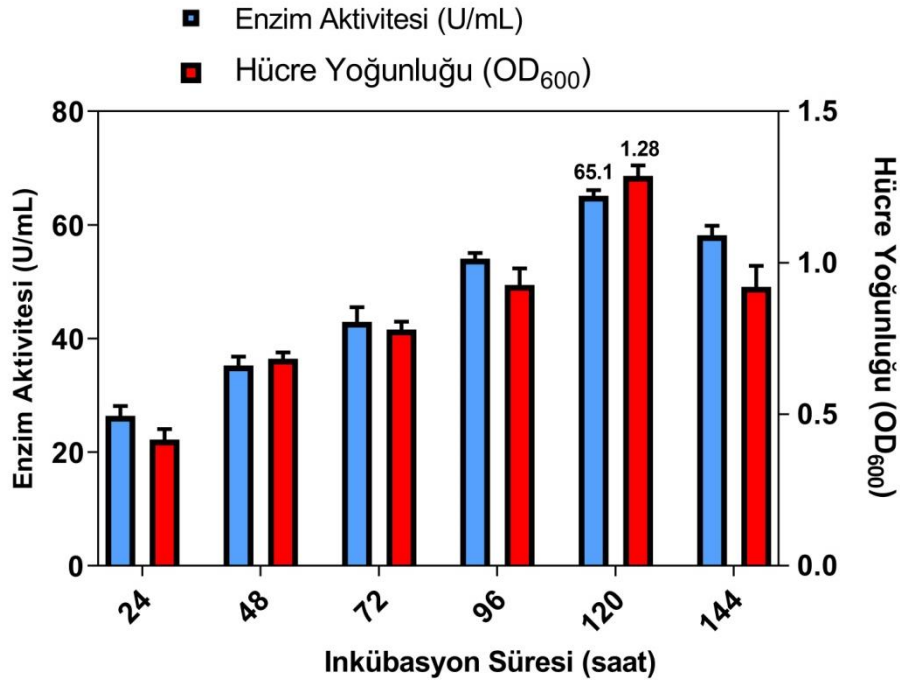


Şekil 4. Proteaz aktivite ölçümü sonunda kör ve enzim çözeltisi arasındaki renk farkı

Besiyerindeki bakterinin santrifüj yapıp, elde edilen süpernatant kısmından 0,5ml enzim çözeltisi alınıp üzerine, Tris-HCl (pH:8), 2,5ml %0,65'lik casein, 2,5ml 110mM TCA, 2,5ml 0,5M Na₂CO₃ ve 0,5ml folin kullanılarak tamamlandı. Daha sonrasında numuneler 660nm spektrofotometre ölçümleri yapıldı. Şekil 4.'dekör ve enzim çözeltisi arasında renk değişim farkı gösterilmiştir.

Proteaz Enzimi İçin Optimum İnkübasyon Süresi Bulunmasına Yönelik Sonuçlar

G.stearothermophilus AH6'dan elde edilen proteaz enziminin 3.2.4.a.'da belirtildiği yönteme göre optimum inkübasyon süresi belirlendi. Proteaz enziminin optimum inkübasyon yaşının tespiti için, inkübatörde 55°C ve 130rpm'de 4, 5 ve 6. günlerdeki nutrientbroth (100ml saf su ve 1.3g NB)-1g caseinmilkpowder besiyerindeki bakterilerin santrifüj yapıp elde edilen süpernatantları ile Tris-HCl (pH 8,0), casein (%065), 110mM TCA, 0,5M Na₂CO₃ ve folin çözeltileri kullanıldı. Bakterinin proteaz enziminin en yüksek aktivitesinin olduğu inkübasyon süresi 5.gün olarak belirlendi.



Şekil 5. Proteaz enziminin optimum inkübasyon yaşı için yapılan aktivite ölçüm grafiği

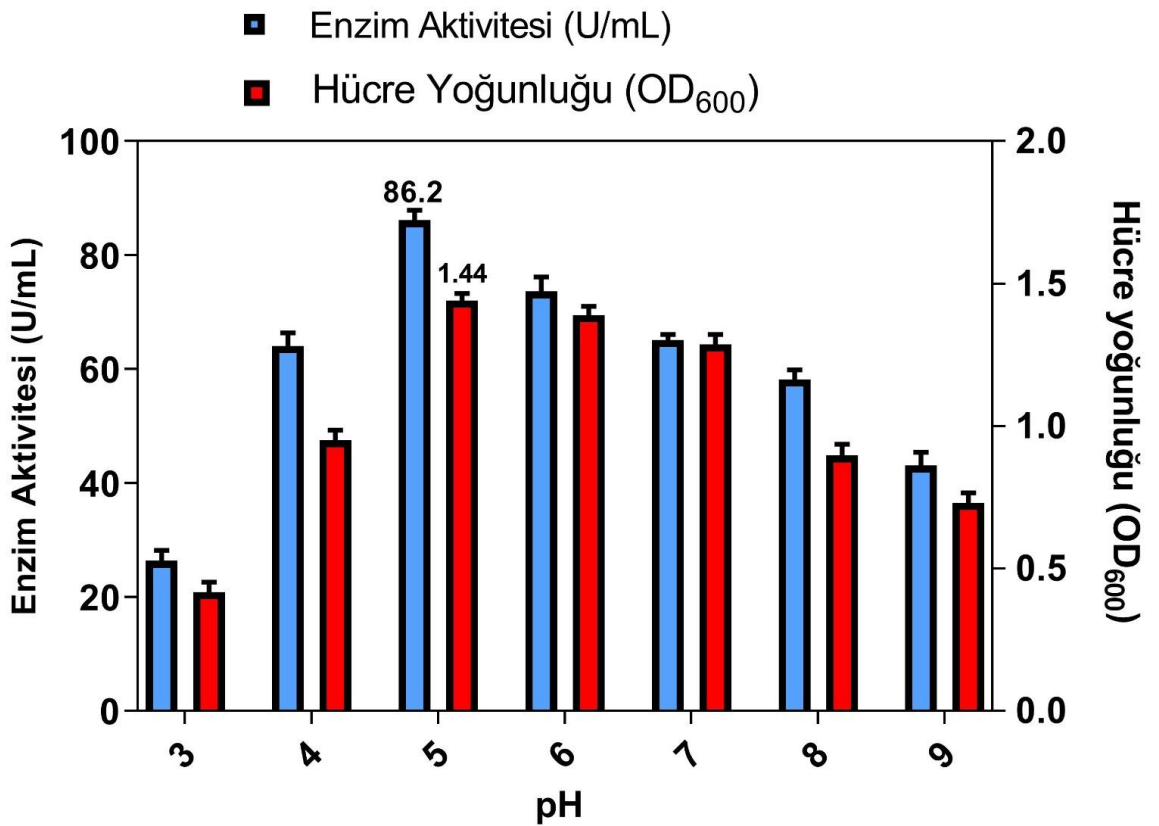


Şekil 6. İnkübasyon yaşı 4. (18), 5. (19) ve 6. (20) günlerindeki aktivite test ölçüm sonundaki renk değişimleri

Proteaz Enzimi İçin Optimum pH Değerinin Bulunmasına Yönelik Sonuçlar

G.stearothermophilus AH6'dan elde edilen proteaz enziminin 3.2.4.b.'de belirtildiği yöntemle göre optimum olarak pH değeri belirlendi. Proteaz enziminin optimum pH'ın tespiti için, farklı pH değerlerdeki (5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0), inkübatörde 55°C ve 130rpm'de, nutrient broth (100ml saf su ve 1,3g NB)-1g casein milk powder besiyerindeki bakterilerin 5.gün sonunda santrifüj yapıp elde edilen süpernatantları ile Tris-HCl (pH 8,0), casein (%065),110mM TCA, 0,5M Na₂CO₃ ve folin çözeltileri kullanıldı. Bakterinin proteaz enziminin en yüksek aktivitesinin olduğu pH5,0 olarak belirlendi.

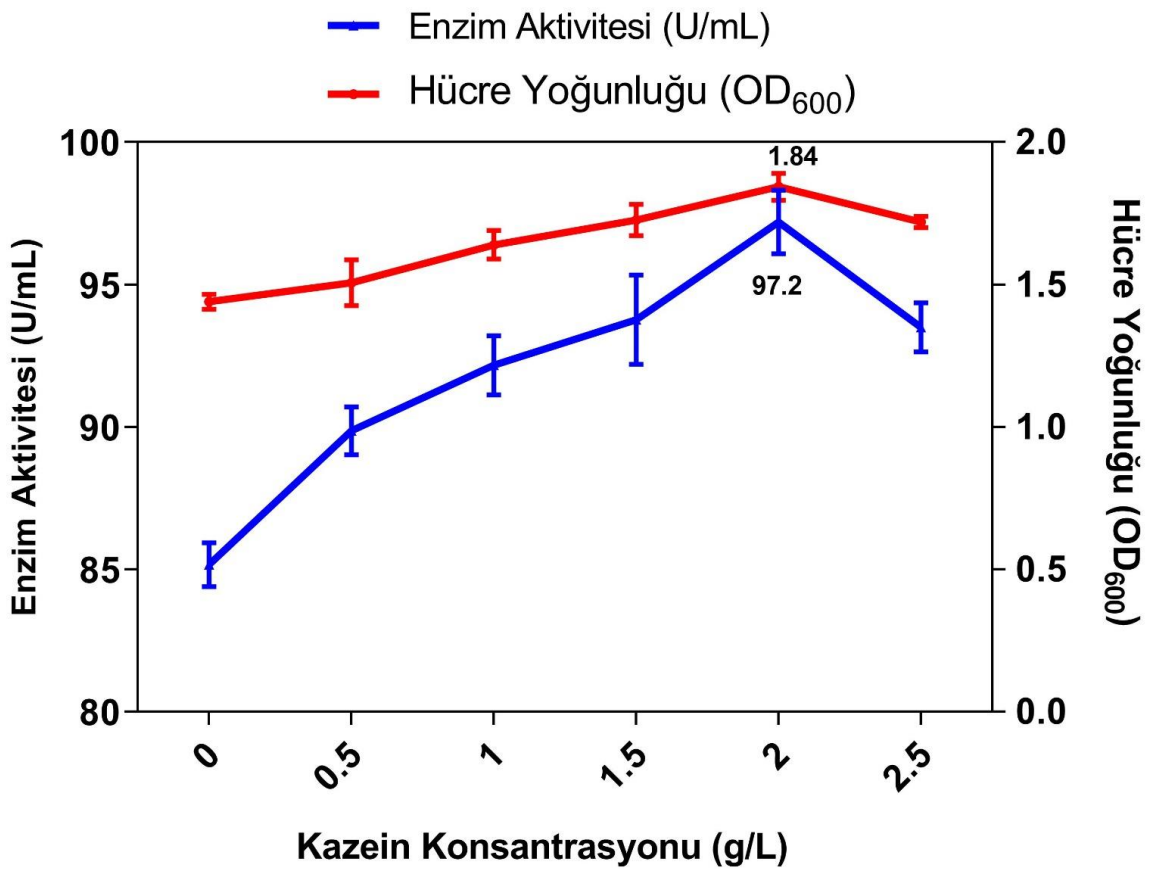
Bialkowska *et al.* (2016), yaptıkları çalışmalarında termofilik funguslar ve aktinomisetler tarafından üretilen proteazların çok fazla olmadığını, arke ve bakterilerden elde edilen proteazlara göre optimum kataliz sıcaklıklarının daha düşük olduklarını göstermişlerdir. *G.stearothermophilus*'tan elde edilen alkalın serin proteaz enziminin optimum pH 8,0 olduğunu bildirmiştir, sunulan tez çalışmasında *G.stearothermophilus* AH6'dan izole edilen alkalın proteazın optimum pH'ı 5,0 belirlenmiştir. Bu sonuçları değerlendirirsek *G.stearothermophilus*'tan elde edilen alkalın proteazın optimum aktivite gösterebileceği pH aralığı oldukça geniştir.



Şekil 7. Proteaz enziminin optimum pH değerinin aktivite ölçüm değeri

Proteaz Enzimi İçin Optimum Azot Kaynağı Miktarının Bulunmasına Yönelik Sonuçlar

G.stearothermophilus AH6'dan elde edilen proteaz enziminin 3.2.4.c.'de belirtildiği yöntemle göre optimum azot kaynağı miktarı belirlendi. Proteaz enziminin optimum azot kaynağı miktarının tespiti için, farklı casein (%0,5g, %1g, %1,5g, %2g) gramlarında hazırlanan, inkübatörde 55°C ve 130rpm'de, pH'ı 5,0, nutrient broth (100ml saf su ve 1,3g NB)-casein milk powder besiyerindeki bakterilerin 5.gün sonunda santrifüj yapıp elde edilen süpernatantları ile Tris-HCl (pH 8,0), casein (%0,65), 110mM TCA, 0,5M Na₂CO₃ ve folin çözeltileri kullanıldı. Bakterinin proteaz enziminin en yüksek aktivitesinin olduğu azot kaynağı miktarı %2g casein olarak belirlendi.



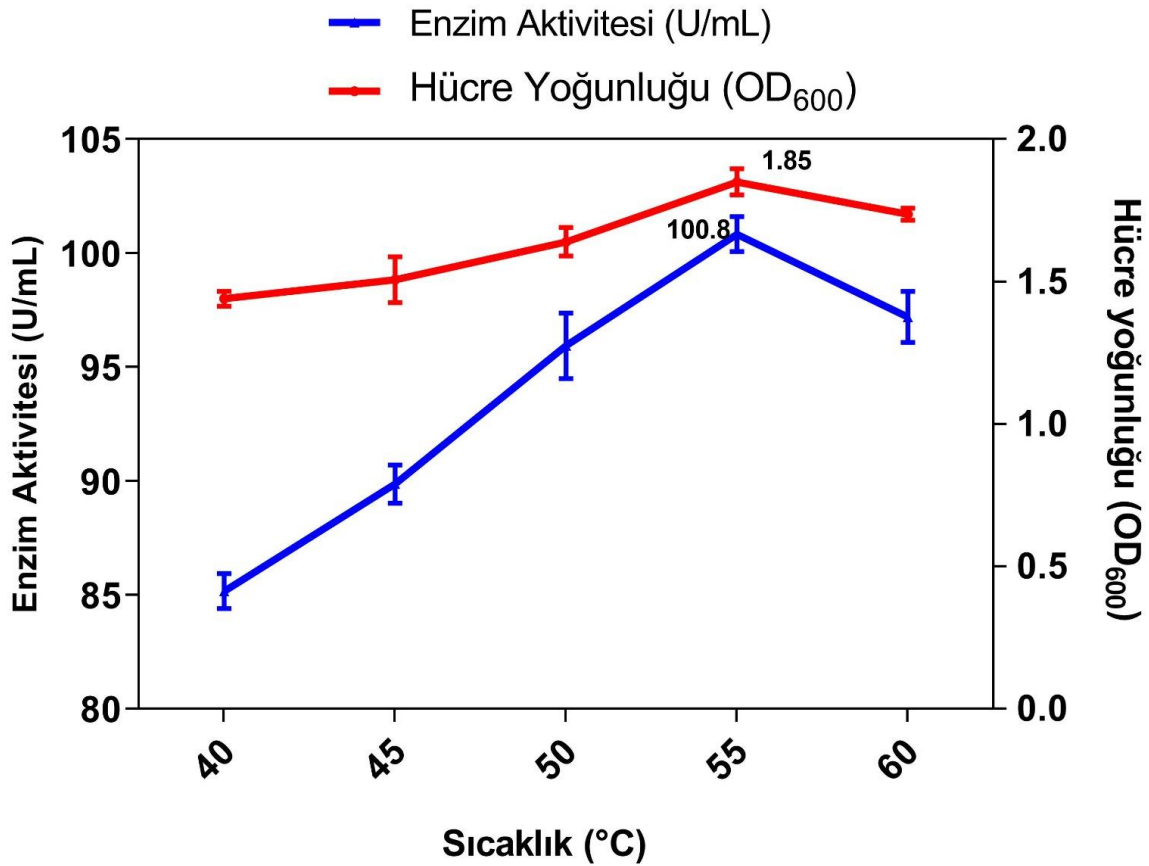
Şekil 8. Proteaz enziminin optimum azot kaynağı miktarının aktivite ölçüm grafiği

Proteaz Enzimi İçin Optimum Sıcaklık Bulunmasına Yönelik Sonuçlar

G.stearothermophilus AH6'dan elde edilen proteaz enziminin 3.2.4.d.'de belirtildiği yöntemle göre optimum sıcaklık belirlendi. Proteaz enziminin optimum sıcaklık değerinin tespiti için, farklı ısılardaki inkübatörlerde (50°C, 55°C, 60°C) 130rpm'de, pH'ı 5,0, nutrient broth (100ml saf su ve 1,3g NB) - %2g casein milk powder besiyerindeki bakterilerin 5.gün sonunda santrifüj yapıp elde edilen süpernatantları ile Tris-HCl (pH 8,0), casein (%0,65),

110mM TCA, 0,5M Na₂CO₃ ve folin çözeltileri kullanıldı. Bakterinin proteaz enziminin en yüksek aktivitesinin olduğu sıcaklık değeri 55°C olarak belirlendi.

Bialkowska et al. (2016), yaptıkları çalışmalarında termofilik funguslar ve aktinomisetler tarafından üretilen proteazların çok fazla olmadığını, arke ve bakterilerden elde edilen proteazlara göre optimum kataliz sıcaklıklarının daha düşük olduklarını göstermişlerdir. *G.stearothermophilus*'tan elde edilen alkalın serin proteaz enziminin optimum sıcaklık 60°C iken, termostabilitesinde 90°C'de 1 saat stabil ve 100°C yarı ömrünün 1 saat olduğunu belirtmişlerdir. Sunulan tez çalışmasında *G.stearothermophilus* AH6'dan izole edilen alkalın proteazın optimum sıcaklık değeri 55°C belirlenmiştir. Yapılan tez çalışmasında bakterinin üretilmesi aşamasında, bakteri TSA katı ekim besiyerinde inkübatörde sıcaklığı 55°C'de 24 saatte üretilmiştir. Ancak çalışmalar sırasında 37°C'de denenmiş ve bu sıcaklıktada üreyebildiği görülmüştür. Bu özellikleriyle endüstriyel alanda daha fazla, daha çok verimle çalışabileceğini göstermiştir.

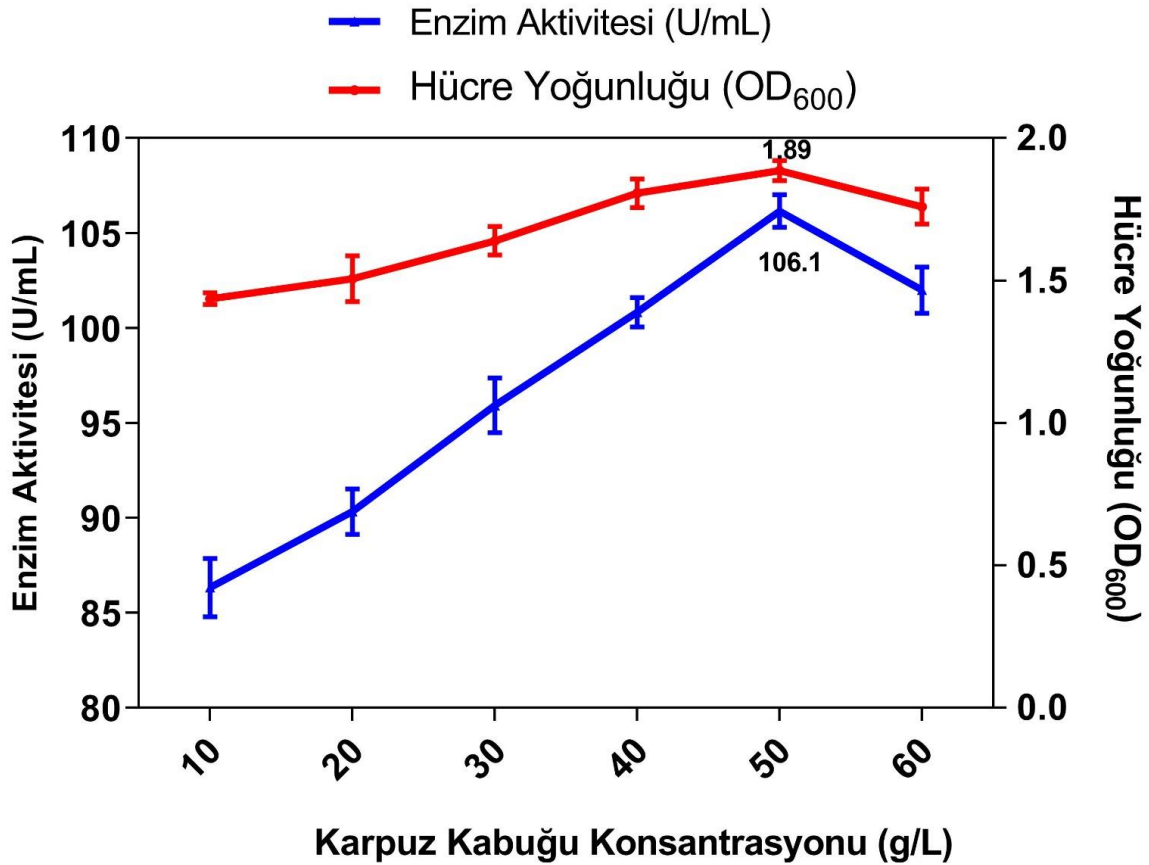


Şekil 9. Proteaz enziminin optimum sıcaklık değerinin aktivite ölçüm grafiği

Proteaz Enzimi İçin Optimum Karbon Kaynağı Miktarının Bulunmasına Yönelik Sonuçlar

G.stearothermophilus AH6'dan elde edilen proteaz enziminin 3.2.4.e.'de belirtildiği yönteme göre optimum karbon kaynağı miktarı belirlendi. Proteaz enziminin optimum karbon kaynağı miktarının tespiti için, farklı kurutulmuş karpuz kabuğu tozu (1g, 2g, 3g, 4g, 5g, 6g) gramlarında hazırlanan, inkübatörde 55°C ve 130rpm'de, pH'ı 5,0, nutrient broth (100ml saf su ve 1,3g NB) - %2g casein milk powder besiyerindeki bakterilerin 5.gün sonunda santrifüj yapıp elde edilen süpernatantları ile Tris-HCl (pH 8,0), casein (%065),110mM TCA, 0,5M Na₂CO₃ ve folin çözeltileri kullanıldı. Bakterinin proteaz enziminin en yüksek aktivitesinin olduğu karbon kaynağı miktarı 5g kurutulmuş karpuz kabuğu tozu olarak belirlendi.

Mikrobiyal kaynaklı enzimlerin üretilmesinde karbon kaynağı olarak atık ürünlerin kullanılması simbiyoz çalışmaları ve maliyetin azaltılması açısından çok fayda sağlayacaktır. Bu tez çalışmasında da atık ürünün kullanılması öncelikli olup, etkili olduğu görülmüştür.



Şekil 10. Proteaz eniziminin optimum karbon kaynağı miktarının aktivite ölçüm grafiği

SONUÇ VE ÖNERİ

Endüstriyel biyoteknoloji diğer ismiyle beyaz biyoteknolojinin amacı, canlı hücreleri ve enzimleri, yenilenebilir kaynakları endüstride kullanarak minimum atık üretimi ve düşük enerji kullanımıyla daha temiz prosesler oluşturmaktır (Maury *et al.* 2005).

Dünya enzim pazarının en geniş grubunu proteazlar oluşturmaktadır. Endüstrinin çoğu alanında en fazla kullanılan proteazın, biyoteknoloji çalışmalarında enzimlere yapılan modifikasyonlar ile geniş pH aralığında stabilite sağlama, termostabilitesini artırma, uzun raf ömrü gibi uygulamalarla ticari olarak endüstriyel alanda kullanılabilirliğini amaçlamaktadır. Bu çalışmalar ile hem ekonomik ve çevreye çok daha az zarar veren hem de istenilen enzimlerin elde edilmesini sağlamış olunur (Bachmann 2003).

G. stearothermophilus cinsi hücre zarı ve kalın bir hücre duvarına sahip, gram pozitif hareketli bir bakteridir. *G. stearothermophilus* bakterileri çok dayanıklı endosporları olan elips şeklinde terminal veya subterminal formda bulunurlar. Kalın bir hücre duvarı olması sebebiyle gram pozitif bir bakteri olsada gram boyama işleminde negatif-pozitif arasında değişen reaksiyonlar gösterebilirler. *G. Stearothermophilus*, fakültatif anaerobik veya aerobik solunum yapabilme yeteneğine sahiptirler. Alfa-amilaz üretebilen ilk termofilik bakteri olarak bilinmektedirler. 30°C-75°C sıcaklık aralığına dayanıklı olup pH'sı 6,0- 8,5 arası üreme sağlarlar. Termofil *Geobacillus* cinslerinde, ısıya karşı dayanıklılık için protein sentez mekanizmaları, organizmaya yapısal esneklik sağlamak ve moleküler stabilitesi koruyabilmesi için enzimatik adaptasyon ve membran fosfolipitlerinde de adaptasyon sistemleri vardır (Logan *et al.* 2009; Nazina *et al.* 2001; Kalaylı and Beyatlı 2003).

Sunulan tez çalışmasında termofilik bir bakteri tercih edilmesinin nedeni, maya kaynaklı proteazlarda görülen alkali pH değerlerinde ve bazı kimyasallarla etkileşiminde kaybedilen aktivite sorununun olmaması, ayrıca bakteri kaynaklı enzimlerde yüksek sıcaklıklarda yüksek verimle çalışan proteaz enzimi elde edilmektedir (A. Wiseman 1987). Ekstremofilik enzimlerin endüstri alanında kullanılmasının önemli bir sebebi yüksek sıcaklıkta bakteriyel ve viral kontaminasyon riskini azaltıp ve çevrel kirlenmelerin oluşmasını engellerler. Termostabil protein enzimleri farklı denatüre edici koşullara karşı yüksek koruma gösterirler ve çok yavaş katlanmalar yaparlar (B. Van Den Burg 2003, S. Fujiwara 2002, Haki *et al.* 2003; R. Gül-Güven 2007). Ayrıca *G. stearothermophilus* sporları, yüksek sıcaklığa karşı dayanıklı olması özelliğiyle sterilizasyon yöntemlerinde biyolojik kontrolünün yapımında

tercih edilirler. Böylece sterilizasyon hatalarını erken dönemde yakalanmasını ve sterilizasyon işleminin biyolojik ölümü gerçekleştirip gerçekleştirmediğini göstermiş olurlar (ISO 17665, 2006; Rutala and Weber 2008).

Bialkowska et al. (2016), yaptıkları çalışmalarında termofilik funguslar ve aktinomisetler tarafından üretilen proteazların çok fazla olmadığını, arke ve bakterilerden elde edilen proteazlara göre optimum kataliz sıcaklıklarının daha düşük olduklarını göstermişlerdir. *G.stearothermophilus*'tan elde edilen alkalın serin proteaz enziminin optimum sıcaklık 60°C ve optimum pH 8,0 olduğunu bildirmişken, termostabilitesinde 90°C'de 1 saat stabil ve 100°C yarı ömrünün 1 saat olduğunu belirtmişlerdir. Sunulan tez çalışmasında *G.stearothermophilus*AH6'dan izole edilen alkalın proteazın optimum pH'ı 5,0 belirlenmiştir. Bu sonuçları değerlendirirsek *G.stearothermophilus*'tan elde edilen alkalın proteazın optimum aktivite gösterebileceği pH aralığı oldukça geniştir. Yapılan tez çalışmasında bakterinin üretilmesi aşamasında, bakteri TSA katı ekim besiyerinde inkübatörde sıcaklığı 55°C'de 24 saatte üretilmiştir. Ancak çalışmalar sırasında 37°C'de denemiş ve bu sıcaklıktada üreyebildiği görülmüştür. Bu özellikleriyle endüstriyel alanda daha fazla, daha çok verimle çalışabileceğini göstermiştir.

Sunulan tez çalışmasında karbon kaynağı olarak kurutulmuş karpuz kabuğu atıkları kullanılmıştır. Mikrobiyal kaynaklı enzimlerin üretilmesinde karbon kaynağı olarak atık ürünlerin kullanılması simbiyoz çalışmaları ve maliyetin azaltılması açısından çok fayda sağlayacaktır. Çalışmada kurutulmuş karpuz kabuğu tozu 1g, 2g, 3g, 4g, 5g ve 6g olacak şekilde hazırlandı. Yapılan uygulamalar sonucunda optimum aktiviteyi 5g olarak belirlenmiştir.

G.stearothermophilus AH6'dan Prof.Dr. Ahmet ADIGÜZEL tarafından saflaştırılmış olan proteaz enziminin karakteristik özelliklerini belirlemek amacıyla pH ve sıcaklık profili, azot kaynağı ve karbon kaynağı ihtiyaç miktarları, inkübasyon yaşı açısından incelendi. Endüstriyel bir enzimin en önemli özelliklerinden biri maksimum aktivite gösterdiği ve stabilitesini koruduğu pH ve sıcaklık noktalarıdır. *G.stearothermophilus* AH6'dan elde edilen proteaz enziminin için optimum pH 5,0 ve sıcaklık 55°C, kazein olarak azot kaynağını %2g, inkübasyon yaşını 5gün ve kurutulmuş karpuz kabuğu olarak karbon kaynağını 5g bulunmuştur. Böylece alkalın ve termostabil bir proteaz üretildiği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Abbas, H., Hiol, A., Deyris, V., Comeau, L., 2002. Isolation and Characterization of an Extracellular Lipase From Mucorsp Strain Isolated From Palm Fruit. *Enzyme and Microbial Techonology*, 31, 968-975.
- Adekoya, O.A., Et Al., Comparative Sequence And Structure Analysis Reveal Features Of Cold Adaptation Of An Enzyme İn The Thermolysin Family. *Proteins*, 2006. 62 (2): P. 435-49.
- Afşar, A., 2008, A Research on Increasing The Effectiveness Of Degreasing Process By Using Enzymes. *Microbiol. Res.* P: 45-53.
- Aoki, K., Miyamoto, K., Murakami, S., and Shinke, R., 1995. Anaerobic Synthesis of Extracellular Proteases by The Soil Bacterium *Bacillus sp.* AM-23: Putrification And Characterization of The Enzymes. *Soil Biol. Biochem.* Vol. 27. No. 11. pp. 1377-1382.
- Arostoo, B.D., and Zahrami, K., 2012. Screening and isolation of an organic solvent tolerant-protease from *Bacillus sp.* JER02: Activity optimization by responsesur facemethodology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 89,15– 23.
- Arulmani, M., Aparanjini, K., Vasanthi, K., Arumugam, P., Arivuchelvi, M., Kalaichelvan, P.T., 2006. Purification and partial characterization of serine proteasefrom thermostable alkalophilic *Bacillus laterosporus*-AK1. *World J Microbiol Biotechnol*, 23, 475–481.
- Ayhan, K. 2000. Gıdalarla Bulunan Mikroorganizmalar, Gıda Mikroorganizmalar, Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölüm Yayını, sim Matbaacılık Ltd. Ankara. P:43*44.
- Bajpai, P., ve Bajpai, K.P., 1987. Yüksek Sıcaklık Alkalik α -Amilaz *Bacillus licheniformis* TCRDC-B13. *Biyoteknoloji Logy ve Biyomühendislik*. Vol. 33, 72-78.
- Barrett, A., *Methods İn Enzymology. Proteolytic Enzymes: Aspartic And Metallo Peptidases*, Vol. 248. 1995, AcademicPress
- Barrett, A.J., *Proteolytic Enzymes: Serine And Cysteine Peptidases*. 1994: Academic Press.
- Basu, B.R., Banik, A.K., Das, M., 2007. Production and characterization of extracellular proteaseof mutant *Aspergillusniger* AB100 grown on fishscale. *World J Microbiol Biotechnol*, 24, 449–455.
- Batkin, S., S.J. Taussig, And J. Szekerezes, Antimetastatic Effect Of BromelainWith Or Without İts Proteolytic And Anticoagulant Activity. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1988. 114 (5): P. 507-8
- Bhat, M.K., 2000. Cellulases and Related Enzymes in Biotechnology. *Biotechnology Advances* 18, 355-383
- Bialkowska, A, Gromek, E., Florczak, T., Krysiak, J., Szulczewska, K., Turkiewicz, M. (2016). Extremophilic proteases: developments of theirspecial functions, potential resources and biotechnological applications. P. H. Rampelotto (Editör), *Biotechnology of extrem ophiles advances and challenges* (s. 399-444). Springer.

- Bliesmer, B.O. and Hartman, P.A., 1973. Differential Heat Stabilities of *Bacillus subtilis* Amylases. *J. Bacteriol.*, 113, 526-528.
- Borgia, P.T. and Campbell, L.L., 1978. α -Amylases from Five Strains of *Bacillus amylolique faciens*: Evidence for Identical Primary Structures. *J. Bacteriol.* 134 (2) 389-393.
- Boyce, A., and Walsh, G., 2007. Production, purification and application-relevant characterization of an endo-1,2 (4)- β -glucanase from *Rhizomucormiegei*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 76, 835-841.
- Bruins, M.E., Jansen, A.E.M., Boom, R. M. (2001). *Thermostables and Their Applications. Applied Biochemistry and Biotechnology.* 90, 155-186.
- Bugg, T., 1996. *An Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry.* Blackwell Science, 657-689.
- Cera, D.E., 2009. Serine proteases. *IUBMB Life*, 61 (5), 510-515.
- Charles, P., Devanathan, V., Periasamy, A., Ponnuswamy, M.N., Kalaichelvan, P.T., Hur, B., 2008. Purification, characterization and crystallization of an extracellular alkaline protease from *Aspergillus nidulans* HA-10. *Journal of Basic Microbiology*, 48, 347–352
- Chung, C.H. And A.L. Goldberg, *The Product Of The Lon (Capr) Gene In Escherichia Coli Is The ATP-Dependent Protease, ProteaseLa.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981. **78** (8): P. 4931-5.
- Coleman, G., and Elliott, W.H., 1962. Studies on α Amylase formation by *Bacillus subtilis*. *Biochem. J.* 83, 256-263.
- Çelik, N. 2006. *Bacillus clausii* 42'den saflaştırılan Alkalın Proteazın termal inaktivasyon kinetiğinin belirlenmesi ve Cu⁺² iyonları ile termostabilizasyonu. *Yüksek Lisans Tezi, KOCAELİ.* P:11-56.
- Dancer, B.N. And J. Mandelstam, *Production And Possible Function Of Serine Protease During Sporulation Of Bacillus subtilis.* *J Bacteriol*, 1975. **121** (2): P. 406-10.
- Dash, C., Kulkarni, A., Dunn B., Rao, M., 2003. Aspartic Peptidase Inhibitors: Implications in Drug Development. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 38 (2), 89–119.
- Demain, A.L., and Solomon, N.A., 1981. In *Industrial Microbiology and the Advent of Genetic Engineering*, pp. 3-14. Scientific American, Freeman&Comp., San Francisco.
- Demirjian, dc., Moris-Vara, F., Sassidy, Cs. (2001). Enzymes from Extremophiles. *Curr Opin Chem Biol.* 5,144–51.
- Divakar, K., Priya, J.D.A., Gautam, P., 2010. Purification and characterization of thermostable organic solvent-stable protease from *Aeromonas veronii* PG01. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 66, 311–318
- Duman, F.Ş. 2017. Proteaz üreticisi mikroorganizmaların izolasyonu, tanımlanması ve proteaz enzimlerinin biyoteknolojik uygulanabilirliği. *Yüksek Lisans Tezi, Kırıkkale.* P:2-28.
- Duran, K., E., Bozacı, H.A., Karahan, 2007. Protein Esaslı Mamüllerin Enzimatik Ön Terbiyesi, Ege Üniversitesi Tekstil Mühendisliği Bölümü. *Tekstil ve Konfeksiyon Araştırma Uygulama Merkezi Yayını*, P: 17-3.
- Edwards, D.R, M.M., Handsley, C.J., Pennington, 2008. The ADAM metallo proteinases. *Mol. Aspect Med.* 29 (5): 258-89. *Enzyme biotechnology.* (Ed.): A. Wiseman. Ellis Harwood, U.K., P:88.

- Fadıloğlu, S., O., Erkmen 2004. Gıda sanayinde enzimlerin önemi. Gaziantep Üniversitesi, Bilimsel yayınlar kataloğu. s: 1-16
- Felix, F. And N. Brouillet, [*Purification And Properties Of 2 Peptidases From Baker's Yeast*]. Biochim Biophys Acta, 1966. **122** (1): P. 127-44.
- Fujiwara, S. (2002). Extremophiles: Developments of Their Special Functions and Potential Resources. Journal of Bioscience and Bioengineering. 94, 518-525.
- Gamerith, G., Groicher, R., Zeilinger, S., Herzog, P., Kubicek, C.P., 1992. Cellulase-Poor Xylanases Produced by *Trichoderma reesei* RUTC-30 on Hemicellulose Substrates. Appl Microbiol Biotechnol. 38: 315-322
- Garrity, G.M., 2004. Taxonomic Outline of the Prokaryotes. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second Edition, Release 5.0, Springer-Verlag, New York. P:529-531.
- Gessesse, A., 1998. Purification and Properties of Two Thermostable Alkaline Xylanases From an Alkaliphilic *Bacillus* sp. Applied and Environmental Microbiology . p. 3533-3535.
- Gisha, G.P., 2014. Serine protease. S3 MSc Biotechnology, www.slideshare.net/puliyoor/serine-protease (12.10.2014).
- Gottesman, S. And M.R. Maurizi, Regulation By Proteolysis: Energy Dependent Proteases And Their Targets. Microbiol Rev, 1992. 56 (4): P. 592- 621.
- Gripon, J., B. Auberger, And J. Lenoir, *Metallo proteases From Penicillium Caseicolum And P. Roqueforti: Comparison Of Specificity And Chemical Characterization*. International Journal Of Biochemistry, 1980. **12** (3): P. 451-455.
- Gripon, J.C., 2003. Encyclopedia of Dairy Sciences, Academic Press, P: 410- 406.
- Grootegeod, J.E., Lauvers, A.M. and Heinen, W., 1973. Separation and Partial Purification of Extracellular Amylase and Protease from *Bacillus caldolyticus*. Arch. Microbiol. 90, 223-232.
- Gupta, A., and Khare, S.K., 2005. A protease stable in organic solvents from solvent tolerant strain of *Pseudomonas aeruginosa*. Bioresource Technology, 97, 1788– 1793
- Gupta, R., Beg, Q.K., Lorenz, P., 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. Appl Microbiol Biotechnol, 59, 15–32.
- Gupta, R., Et Al., An Overview On Fermentation, Downstream Processing And Properties Of Microbial Alkaline Proteases. Appl Microbiol Biotechnol, 2002. 60 (4): P. 381-95
- Gül-Güven, R. (2007). Sıcak Su Kaynaklarından Bakteri zolasyonu, Tanımlanması ve *Alicyclo bacillus acidocaldarius* subsp. *rittmanii*'nin β -galaktozidaz Enziminin Saflaştırılması. Doktora Tezi, Dicle Üniversitesi, DİYARBAKIR. (196).
- Haddar, A., Bougatef, A., Agrebi, R., Sellami-Kamoun, A., Nasri, M., 2008. A novel surfactant-stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus mojavensis* A21. Purification and characterization. Process Biochemistry, 44, 29–35.
- Haki, G.D., Rakshit, S.K. (2003). Developments in Industrially Important Thermostable Enzymes: a Review. Bioresour Tecnol. 89, 17–34.
- Hiol, A., Jonzo, M. D., Rugani, N., Druet, D., Sadra, L., Comeau, L.C., 2000. Purification and Characterization of an Extracellular Lipase from Thermophilic Rhizopus oryzae strain isolated from Palm Fruit. Enzyme and Microbial Technology. 26, 421-430.
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A: Sneath, J.T. Staley, S.T. Williams. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Ninth Edition. 559 p.

- Horikoshi, K., 1999. Alkaliphiles: Some applications of their products for biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, p. 735-750.
- Horiskoshi, K., 1996. Alkaliphiles from an industrial point of view. *FEMS Microbiology Reviews*, P:18-259.
- http://merops.sanger.ac.uk/about/about_9.htm, Erişim Tarihi: 2005. Konu: Omega peptidazların etki mekanizmaları hakkında bilgiler.
- <http://www.piercenet.com>, Erişim Tarihi: 2006. Konu: Fisın'ın kullanım alanları.
- <http://www1.lsbu.ac.uk/water/enztech/sources.html>, Erişim Tarihi: 2017
- Hunter, R.G., G.W. Henry, And W.H. Civin, The Action Of Papain And Bromelain On The Uterus. *Am J Obstet Gynecol*, 1957. 73 (4): P. 875-80.
- Inoue, K., Et Al., Effect Of Etodolac On Prostaglandin E2 Biosynthesis, Active Oxygen Generation And Bradykinin Formation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 1994. 51 (6): P. 457-62.
- ISO 17665. Sterilization of health care products -Moistheat- Part 1: Requirements for the development, validation and routine control of a sterilization process form edical devices, 2006.
- Jaouadi, B., Ellouz-Chaabouni, S., Rhimi, M., Bejar, S., 2008. Biochemical and molecular characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus pumilus* CBS with high catalytic efficiency. *Science Direct Biochimie*, 90, 1291-1305.
- Joo, H.S., and Chang C.S., 2004. Oxidant and SDS-stable alkaline protease from a halotolerant *Bacillus clausii* I-52: enhanced production and simple purification. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 491-497
- Joshi, S. And Satyanarayana, T., 2012. Characteristics and applications of a recombinant alkaline serine protease from a novel bacterium *Bacillus lehensis*. *Bioresource Technology*, 131 (2013), 76-85.
- Kalaylı E, Beyatlı Y. *Bacillus* Cinsi Bakterilerin antimikrobiyal Aktiviteleri, PHB Üretimleri ve Plazmid DNA' ları. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*. 2003;01: 24-35.
- Kandasamy, N., Punitha, V., Amsamani, S., Rao, J.R., Chandrasekaran, B., Thanikaivelan, P., 2011. Eco-benign enzymatic dehairing of goat skin utilizing a protease from a *Pseudomonas fluorescens* species isolated from fish visceral waste. *Journal of Cleaner Production*, 25, 27-33
- Karmakar S.R., 1999. *Chemical Technology in The Pretreatment Process of Textiles*, Elsevier Science B.V. P:18-24.
- Kataoka, Y., Et Al., *Catalytic Residues And Substrate Specificity Of Scytalidoglutamic Peptidase, The First Member Of The Eqolisin In Family (G1) Of Peptidases*. *FEBS Lett*, 2005. 579 (14): P. 2991-4.
- Keha, E. E., & Küfevioğlu, Ö. İ. (2000). *Biyokimya*. Erzurum: Aktif Yayınevi
- Kıran, E.Ö., U., Çömlekçiöğlü, N., Dostbil, 2006. Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları, *KSU. Journal of Science and Engineering* 9 (1):12-19.
- Kim, S., Lee, D., Cheigh, C., Choe, E., Lee, S., Hong, Y., Choi, H., Pyun, Y., 2006. Purification and characterization of a fibrinolytic subtilisin-like protease of *Bacillus subtilis* TP-6 from an Indonesian fermented soybean, Tempeh. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 33, 436-444.

- Kindle, K.L., 1983. Characterization and Production of thermostable α -Amylase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 8,153
- Knill-Jones, R.P., Et Al., Comparative Trial Of Nutrizym In Chronic Pancreatic Insufficiency. *Br Med J*, 1970. 4 (5726): P. 21-4.
- Kristjansson, M.M., Asgeirsson, B. (2002). Properties of Extremophilic Enzymes and Their Importance in Food Science and Technology. *Handbook of Food Enzymology* (ed. J.R. Whitaker), NY, USA, p.77-99.
- Kumar, C.G., H., Takagi 1999. Microbial Alkaline Proteases: From a Bioindustrial View point, *Biotechnology Advances*, vol. 17, P:561-594.
- Kunitz, M., *Formation Of Trypsin From Trypsinogen By An Enzyme Produced By A Mold Of The Genus Penicillium*. *The Journal Of General Physiology*, 1938. 21 (5): P. 601-620.
- Lane, A.G. and PIRT, S.J., 1973. Production of Cyclodextrin Glycoyl transferase by Batch and Chemostat Cultures of *Bacillus macerans* in Chemically Defined Medium. *J. Appl. Chem. Biotech.* 23, 309-321
- Langmaier, F., M., Mladek, K., Kolomaznik, S., Sukop, 2002. Isolation of elastin and collagen polypeptides from long cattle tendons as raw material for the cosmetic industry. CZECH REPUBLIC. P:1-9.
- Lazim, H., Houda, M., Nedra, S., Insaf, B., Ferid, L., 2009. Production and optimization of thermophilic alkaline protease in solid-state fermentation by *Streptomyces* sp. CN902. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 36, 531–537.
- Lee, B.H., 1996. *Fundamentals of Biotechnology*, VCH Publishers, USA, 431p
- Logan NA, De Vos P, Dinsdale A. Genus *Geobacillus*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Second Edition Volume Three The Firmicutes*. De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH (eds), Whitman WB Springer, New York, 2009; 144-160.
- Maccabe, A.P., *Industrial Enzymes Structure, Function And Applications*, J. Polaina, Editor. 2007. P. 161-243.
- Mahajan, R.T., Badgajar, S.M., 2010. Biological aspects of proteolytic enzymes: A Review, *Journal of Pharmacy Research*, 3 (9), 2048-2068.
- Mala B. RAO, A.M.T., Mohini S. Ghatge, and Vasanti V. Deshpande, *Molecular And Biotechnological Aspect Of Microbial Proteases*. American Society For Microbiology, 1998: P. 597–635.
- Matsuzaki, H., Yamane, K., Yamaguchi, K., Nagata, K., and Marou, B., 1974. Hybrid α -Amylases Produced by Transformants of *Bacillus subtilis*. I Purification and Characterization of Extracellular α -Amylases Produced by the Parental Strains and Transformants. *Biochim. Biophys. Acta.*, 365, 235-247.
- Meer, J.L., 1972. The Regulation Of α -Amylase Production in *Bacillus licheniformis*. *Antonievon Leuvenhoek : J. Microb. Serol.*, 38, 570-585.
- Mekkes, J.R., Et Al., In Vitro Tissue-Digesting Properties Of Krill Enzymes Compared With Fibrinolysin/Dnase, Papain And Placebo. *Int J Biochem Cell Biol*, 1997. 29 (4): P. 703-6.
- Miyaji, T., Ota, Y., Nakagawa, T., Watanabe, T., Niimura, Y., Tomizuka, N., 2005. Purification and molecular characterization of subtilisin-like alkaline protease BPP-A from *Bacillus pumilus* strain MS-1. *Letters in Applied Microbiology* ISSN, 0266-8254.

- Morihara, K. And T. Oka, *Comparative Specificity Of Microbial Acid Proteinases For Syntheti Peptides. III. Relationship With Their Trypsinogen Activating Ability.* Archives Of Biochemistry And Biophysics, 1973. 157 (2): P. 561-572.
- Morita, A.H., Et Al., Chromatographic Fractionation And Characterization Of The Active Platelet Aggregation İnhibitory Factor From Bromelain. ArchInt Pharmacodyn Ther, 1979. 239 (2): P. 340-50
- Muhktar, H., HAQ, I., 2008. Production of alkaline protease by *Bacillus subtilis* and its application as a depilatingagent in leather processing. Institute of Industrial Biotechnology, G.C. University, Lahore 54000, Pakistan
- Munzig, E., Et Al., Bromelain Protease F9 Reduces The CD44 Mediated Adhesion Of Human Peripheral Blood Lymphocytes To Human Umbilical Vein Endothelial Cells. FEBSLett, 1994. 351 (2): P. 215-8.
- N. Jisha, V., Et Al., Versatility Of Microbial Proteases. Advances İn Enzyme Research, 2013. 01 (03): P. 39-51
- Nazina TN, Tourova TP, Poltarauş AB, et al. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. And *Geobacillusuzenensis* sp. nov. From petroleum reservoirsand transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermo-catenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosid asius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations G. 12
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kahler, M., Antranikian, G., 1999. Extremophiles As a Source of Novel Enzymes For Indusrtial Application. Appl Microbiol Biotechnol. 51: 711-729
- Novel, J.J., W.J., Nickerson, R.S., Robinson, 1963. Screeningfor a new *Streptomyces* strain capable of efficient keratin degradation Biochim. Acta, P:77,73.
- Oberoi, R., Beg, Q.K., Puri, S., Saxena, R.K., Gupta, R. 2001. Characterization and washper form an ceanalysis of an SDS-resistant alkaline protease from a *Bacillus* sp. World J Microbiol Biotechnol, 17, 493-497.
- Ogasahara, K.Imanishi, A., andIsemura, T., 1970. Studies on Thermophilic α - Amylase from *Bacillus stearothermophilus*. I some General and Physiochemical
- Oke, MA ve Onilude, AA (2014). *Pedicoccusacidilactici*'den hücre dışı proteazın kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu. Nijerya Temel ve Uygulamalı Bilimler Dergisi, 22 (1-2), 19-25.
- Orhan, E., 2003. *Bacillus subtilis* ve *Bacillus cereus* Bakterilerinden Proteaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması ve Özelliklerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Đ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, P: 24-38
- Ostermann, N., Et Al., *Crystal Structure Of An Activation İntermediate Of Cathepsin E.* J Mol Biol, 2004. 342 (3): P. 889-99.
- Önal, S., 2010. Enzimler, Bölüm 8. Moleküler Biyoloji, Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M., Tanyolaç, B. Ankara, 249-296
- Öztürk, M.H., 2004. Partial Purification and Characterization of Alkaline Proteases from Isolated *Bacillus* Strains, Yüksek Lisans Tezi, Đ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Padmapriya, M. ve Williams, BC (2012). *Bacillus subtilis*'ten nötral proteaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu. *Mikrobiyoloji ve Biyoteknoloji Araştırmaları Dergisi*, 2 (4), 612-618.

- Palmer, T. ve Bonner, P. L. (2007). An introduction to enzymes. Enzymes: biochemistry, biotechnology, clinical chemistry. (s. 2-13). Woodhead Publishing.
- Polaina, J., and MacCabe, A.P., 2007. Industrial Enzymes Structure, Function and Applications. Spinger, 161-243, Spain.
- Polgar, L., 2005. The catalytic triad of serine peptidases. Cell. Mol. Life Sci., 62, 2161–2172 .
- Radley, J.A., 1976. Production of Microbial Amylolytic Enzymes: Starch Production Technology (L.A. Underkofler Editor). Chapter 16. Applied Science Publisher Ltd., England, p : 295-309
- Raghunath T. Mahajan, S.B.B., Biological Aspects Of Proteolytic Enzymes: A Review. Journal Of Pharmacy Research, 2010.
- Rai, S.K., and Mukherjee, A.K., 2008. Ecological significance and some biotechnological application of an organic solvent stable alkaline serine protease from *Bacillus subtilis* strain DM-04. Bioresource Technology, 100 (2009), 2642–2645
- Rao, C.S., Sathish, T., Ravichandra, P., Prakasham, R.S., 2008. Characterization of thermo- and detergent stable serine protease from isolated *Bacillus circulans* and evaluation of eco-friendly applications. Process Biochemistry, 44, 262–268
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V., 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases, Microbiology and Molecular Biology Reviews, vol 62, P: 597-635.
- Ravindran, B., Ganesh, K.A., Aruna, B.P.S., Sekaran, G., 2011. Solid-state fermentation for the production of alkaline protease by *Bacillus cereus* 1173900 using proteinaceous solid waste. Current Science, 5, 100.
- Roberts, J.W., C.W. Roberts, And D.W. Mount, Inactivation And Proteolytic Cleavage Of Phage Lambda Repressor In Vitro In An ATP-Dependent Reaction. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. 74 (6): P. 2283-7
- Rosenberg, L., Et Al., Safety And Efficacy Of A Proteolytic Enzyme For Enzymatic Burn Debridement: A Preliminary Report. Burns, 2004. 30 (8): P. 843-50
- Rutala WA, Weber DC, and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities, 2008.
- Salles, B.C., Cunha, R.B., Fontes, W., Sousa, M.V., Filho, E.X.F., 2000. Purification and Characterization of a New Xylanase From *Acrophialo phoranainiana*. Journal of Biotechnology . 81 : 199-204
- Sevinç, N., 2010. Türkiye topraklarından izole edilen *Bacillus* sp. suşlarından proteaz üretimi, kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa
- Sookkheo, B., Sinchaikul, S., Phutrakul, S., Chen, S.T., 2000. Purification and characterization of the highly thermostable proteases from *Bacillus stearothermophilus* TLS33. Protein Expression and Purification, 20, 142–151.
- Takami, H., Akiba, T., Horikoshi, K., 1989. Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. AH-101. Applied Microbiology and Biotechnology, 30, 120-124
- Tassman, G.C., J.N. Zafran, And G.M. Zayon, A Double-Blind Crossover Study Of A Plant Proteolytic Enzyme In Oral Surgery. J Dent Med, 1965. 20: P. 51-4

- Teeri, T.T., Lehtovaara, P., Kauppinen, S., Salovuori, I., Knowles, J., 1990. Homolog Etki Alanları *Trichoderma reesei* Selülitik Enzimler: Gen *Cellobiohydrolase II*'nin Sırası ve İfadesi. *Gen*. 51: 43-52
- Tomme, P., Warren, R.A., Gilkes, N.R., 1995. Selüloz Bakteri ve Mantarlar tarafından hidroliz. *Adv Mikrob Fizyoterapist*. 1 37: 1-81.
- Uhlig, H., 1998. *Industrial Enzymes and Their Applications*, John Wiley&Sons, USA, P: 116-144.
- Van Den Burg, B. (2003). Extremophiles as a Source for Novel Enzymes. *Microbiology*. 6, 213-218.
- Van Melderer, L., Et Al., ATP-Dependent Degradation Of *Ccda* By Lon Protease. Effects Of Secondary Structure And Heterologous Subunit Interactions. *J Biol Chem*, 1996. 271 (44): P. 27730-8.
- Wiseman, A., 1987. *Hanbook of Enzyme Biotechnology*. Second Edition. Chapter The application of Enzymes in Industry, 274 – 373.
- Wong, K.K.Y., Richardson, J.D., and Mansfield, S.D.,2000. Enzymatic Treatment of Mechanical Pulp Fibers For Improving Papermaking Properties. *Biotechnol. Prg*. 16, 1025-1029.
- Yang, VW., Zhuang, Z., Elegir, G., and Jeffries, TW., 1995. Alkaline-Active Xylanase Produced by an Alkaliphilic *Bacillus* sp. İsolated From Kraft Pulp. *Journal of Industrial Microbiology*. 15, 434-441.
- Zeikus, J.G., 1979. *Enzyme Microb. Technol*. 1,243
- Zeman, N.W. and Mccrea, J.M., 1985. Alpha-amylase Production Using a Recombinant DNA Organism. *Cereal Foods World*. 30 (1) : 777-780.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı: Yeşim DALİ	
Doğum tarihi:	
Doğum Yeri:	
Uyruğu:	
Adres:	
Tel:	
E-mail:	
Eğitim	
Lise	: Bakırköy 70.Yıl S.M.L.
Önlisans	:İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ S.M.Y.
Lisans	:ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
Yüksek lisans:	ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Doktora:	
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	İyi
Almanca:	-
Rusça:	-
Diğer	
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
Tezden Üretilmiş Yayınlar	