



GİRESUN
ÜNİVERSİTESİ



FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AKTİNOMİSET BSU-9 SUŞUNDAN PROTEAZ
ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU**

**BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

Yüksek Lisans Tezi

**Ebru COŞAR
20152102001**

2020

GİRESUN

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

**AKTİNOMİSET BSU-9 SUŞUNDAN PROTEAZ
ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Öğrencinin Adı SOYADI : Ebru COŞAR
ORCID : 0000-0003-0754-9365
Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 18/01/2021

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Hatice KATI
ORCID : 0000-0002-2053-3168

**Aralık 2020
GİRESUN**

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

**AKTİNOMİSET BSU-9 SUŞUNDAN PROTEAZ
ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ebru COŞAR

Enstitü Anabilim Dalı : Biyoloji Anabilim Dalı

Bu tez 23/12/2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

**Prof. Dr. Remziye
NALÇACIOĞLU**

Prof. Dr. Hatice KATI

Doç. Dr. Tamer AKKAN

Jüri Başkanı

Üye

Üye

Doç. Dr. Bahadır KOZ

Enstitü Müdürü

BEYAN

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

Ebru COŞAR
23/12/2020

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimin danışmalığını üstlenerek tez çalışmalarımın gerçekleştirilmesinde değerli bilgi, yardım, tecrübe ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Hatice KATI'ya sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Eğitim hayatım boyunca her zaman yanımda olan aileme ve çalışmalarım süresince desteklerini her zaman hissettiğim arkadaşlarıma teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER	II
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	IV
ŞEKİLLER LİSTESİ	VI
TABLolar LİSTESİ	VII
ÖZET.....	VIII
SUMMARY	IX

1. GİRİŞ	1
1.1. Aktinomisetlerin Genel Özellikleri	2
1.1.1. Aktinomisetlerin Sınıflandırılması	4
1.1.2. Aktinomisetlerin Ekolojileri.....	5
1.1.3. Aktinomisetler Tarafından Üretilen Biyoaktif Ürünler	6
1.2. Enzimlerin Genel Özellikleri	7
1.3. Proteazların Genel Özellikleri.....	9
1.3.1. Proteazların Sınıflandırılması.....	10
1.3.1.1. Endopeptidazlar.....	11
1.3.1.2. Ekzopeptidazlar.....	13
1.3.2. Proteaz Kaynakları	13
1.3.2.1. Bitkisel Proteazlar	14
1.3.2.2. Hayvansal Proteazlar.....	15
1.3.2.3. Mikrobiyal Proteazlar.....	15
1.3.3. Alkali Proteazların Genel Özellikleri	16
1.3.4. Proteazların Kullanım Alanları	17

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	19
----------------------------	----

3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	23
3.1. Materyal	23
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Bakteri	23
3.1.2. Cihazlar	23
3.1.3. Kimyasallar	23
3.1.4. Kullanılan Besiyerler, Substratlar ve Solüsyonlar	24
3.2. Yöntem	27

3.2.1. Proteaz Aktivitesinin Kantitatif Olarak Belirlenmesi	27
3.2.2. Tirozin Standart Eğrisinin Hazırlanması	28
3.2.3. Enzim Üretimi	28
3.3. Enzimin Karakterizasyonu	29
3.3.1. Optimum pH ve Sıcaklık Belirlenmesi	29
3.3.2. pH ve Sıcaklık Stabilitesinin Belirlenmesi	29
3.3.3. İnhibitörlerin Proteaz Üzerine Etkisi	30
3.3.4. Metal İyonlarının Proteaz Üzerine Etkisi	30
3.3.5. Organik Çözücülerin Proteaz Üzerine Etkisi	30
3.3.6. Hidrojen Peroksit, Deterjan ve Denatüranların Proteaz Üzerine Etkisi	31
3.4. Proteazın Saflaştırılması	31
3.4.1. Amonyum Sülfat ile Çöktürme	31
3.4.2. Diyaliz	32
3.4.3. Jel Filtrasyonu	32
3.5. SDS-PAGE ve Zimogram Analizi	32
 4. ARAŞTIRMA BULGULARI	 34
4.1. Proteaz Üretimi ve Aktivitesi	34
4.2. Enzimin Karakterizasyonu	35
4.2.1. Optimum pH ve Stabilite	35
4.2.2. Optimum Sıcaklık ve Stabilite	36
4.2.3. İnhibitörlerin Proteaz Üzerine Etkisi	38
4.2.4. Metal İyonlarının Proteaz Üzerine Etkisi	38
4.2.5. Organik Çözücülerin Proteaz Üzerine Etkisi	39
4.2.6. Hidrojen Peroksit, Çeşitli Deterjan ve Denatüranların Proteaz Üzerine Etkisi	40
4.3. Proteazın Saflaştırılması	40
4.3.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Jel Filtrasyonu	41
4.3.2. SDS-PAGE ve Zimogram Analizi	41
 5. TARTIŞMA VE SONUÇ	 43
 KAYNAKLAR	 49
ÖZGEÇMİŞ	60

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

µl	:	Mikrolitre
%	:	Yüzde
BSU	:	Black Sea <i>Ulva lactuca</i>
°C	:	Santigrat derece
cm	:	Santimetre
DEAE	:	Dietilaminoetil
dH ₂ O	:	Distile su
Dk	:	Dakika
DMSO	:	Dimetil sülfoksit
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
DTT	:	Dithiothreitol
EDTA	:	Etilendiamin tetraasetik asit
G	:	Gram
kDa	:	Kilodalton
L	:	Litre
m	:	Metre
M	:	Molar
mM	:	Milimolar
ml	:	Mililitre
mm	:	Milimetre
nm	:	Nanometre
PAGE	:	Poliakrilamid jel elektroforezi
PMSF	:	Fenilmetilsülfonilflorid
rDNA	:	Ribozomal deoksiribonükleik asit
rpm	:	Dakikadaki devir sayısı
SDS	:	Sodyum dodesil sülfat

TCA : Trikloroasetik asit
U : Ünite
V : Volt



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Aktinomisetler tarafından üretilen farklı spor zincirlerinin şematik çizimleri	3
Şekil 4.1. Tirozin standart grafiği	34
Şekil 4.2. Aktinomiset BSU-9 suşundan elde edilen ham enzime farklı pH'ların etkileri	35
Şekil 4.3. Aktinomiset BSU-9 suşundan elde edilen ham enzimin farklı sıcaklık ve farklı inkübasyon sürelerinde pH stabilite değerleri	36
Şekil 4.4. Aktinomiset BSU-9 suşundan elde edilen ham enzim üzerine farklı sıcaklıkların etkileri	36
Şekil 4.5. Aktinomiset BSU-9 suşundan elde edilen ham enzim üzerine farklı sıcaklıkların etkileri	37
Şekil 4.6. Aktinomiset BSU-9 suşundan elde edilen ham enzim üzerine farklı sıcaklıkların stabilite değerleri.....	37
Şekil 4.7. Aktinomiset BSU-9 suşundan elde edilen ham enzim üzerine inhibitörlerin etkileri	38
Şekil 4.8. Aktinomiset BSU-9 suşundan elde edilen ham enzim üzerine metal iyonlarının etkileri	39
Şekil 4.9. Aktinomiset BSU-9 suşundan elde edilen ham enzim üzerine organik çözücülerin etkileri	39
Şekil 4.10. Aktinomiset BSU-9 suşundan elde edilen ham enzim üzerine hidrojen peroksit, çeşitli deterjan ve denatüranların etkileri	40
Şekil 4.11. Aktinomiset BSU-9'dan izole edilen proteazın, jel filtrasyon kromatografi kolonundan elde edilen enzim absorbands değerleri	41
Şekil 4.12. SDS-PAGE ve zimogram sonuçları.....	42

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.1. Enzimlerin sınıflandırılması	8
Tablo 1.2. Proteazların özellikleri	10
Tablo 1.3. Proteazların sınıflandırılması	11
Tablo 1.4. Farklı kaynaklardan üretilen proteazlar	14

AKTİNOMİSET BSU-9 SUŞUNDAN PROTEAZ ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

ÖZET

Proteazlar, bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar gibi çok çeşitli kaynaklardan elde edilmektedirler. Bu tez çalışmasında alg kompost örneğinden izole edilen ve proteaz üreten aktinomiset BSU-9 suşu kullanıldı. Aktinomiset BSU-9 suşu sıvı besiyerinde büyütüldü ve elde edilen süpernatanttan proteaz karakterize edildi. Proteazın karakterizasyonu amacıyla optimum pH, optimum sıcaklık, pH stabilitesi, sıcaklık stabilitesi ile bazı inhibitörlerin, metal iyonlarının, organik çözücülerin, deterjanların, denatüranların ve hidrojen peroksitin proteaz aktivitesi üzerine etkileri araştırıldı. Ayrıca proteazın zimogram ile aktivite çalışmaları yapıldı.

BSU-9 suşundan ekstrasellüler proteaz üretimi gerçekleştirildi. Bu proteaz pH 8-13 aralığında geniş bir stabilite gösterirken, optimum pH'ı 11 olarak belirlendi. Enzimin 65 °C'de maksimum aktivite gösterdiği bulundu. EDTA varlığında enzim aktivitesi yaklaşık % 44 oranında azalırken PMSF varlığında enzim aktivitesi büyük oranda inhibe edildi. Enzimin aktivitesi $MnCl_2$ varlığında artarken $CuCl_2$ varlığında azaldı. Proteazın zimogram analizinde tek bant görülmekte ve bu bantın molekül ağırlığı yaklaşık 45 kDa olarak tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Aktinomiset, Proteaz, Enzim Karakterizasyonu

PROTEASE PRODUCTION AND CHARACTERIZATION FROM ACTINOMYCETES BSU-9 STRAIN

SUMMARY

Proteases are obtained from a wide variety of sources such as plants, animals and microorganisms. In this thesis, the actinomycetes BSU-9 strain, producing protease, isolated from algae compost sample and was used. The actinomycetes BSU-9 strain was grown in broth medium and protease was characterized from supernatant. For the characterization of protease; optimum pH, optimum temperature, pH stability, temperature stability, and the effects of some inhibitors, metal ions, organic solvents, detergents, denaturants and hydrogen peroxide on protease activity were investigated. In addition, activity studies of the protease were performed by using zymogram.

Extracellular protease was produced from BSU-9 strain. While this protease showed a wide stability in the range of pH 8-13, its optimum pH was determined as 11. It was found that the enzyme showed maximum activity at 65 ° C. While in the presence of EDTA, enzyme activity decreased by approximately 44 %, in the presence of PMSF, enzyme activity was largely inhibited. While the activity of the enzyme increased in the presence of MnCl₂, it decreased in the presence of CuCl₂. In the zymogram analysis of the protease, a single band is seen and the molecular weight of this band was determined to be approximately 45 kDa.

Keywords: Actinomycetes, Protease, Enzyme Characterisation

1. GİRİŞ

İnsanlar enzimi binlerce yıldan beri enzimin varlığından habersiz olarak peynir, şarap, ekmek yapımı gibi alanlarda kullanmışlardır. Louis Pasteur'un çalışmalarıyla beraber fermantasyon olayının sebebinin enzimler olduğu anlaşıncı biyoteknoloji bilinci de oluşmuştur (Çırakoğlu, 2009). Günümüzde ekonomik değerinin yüksek olmasından ve enzim kullanımının çeşitliliğinden dolayı enzim üretiminin önemi artmıştır. Özellikle rekombinant DNA teknolojisiyle enzim üretimi yaygınlaşmıştır (Gessesse, 1998). Çeşitli mikroorganizmalardan enzim üretimi mümkündür (Walsh ve Wright, 2005). Üretilmesi istenilen enzim yeni tekniklerle mikroorganizmalar kullanılarak üretilebilmektedir (Aehle, 2004). Daha kullanışlı enzimler üretebilmek için farklı pH ve sıcaklıklarda aktif olan ve dış etkenlerden bağımsız enzimler üretilebilen çeşitli mikroorganizmaların tanımlanması önem kazanmış ve mikroorganizmaların kullanımı yaygınlaşmıştır. Bunda üretim maliyetleri, zaman, kalite ve performans gibi kriterler de baz alınır (Gupta ve ark., 2001).

Aktinobakteriler, topraktaki humatları ve hümik asitleri yavaşça parçalamaya yardımcı olmaktadır (Reid ve Wong, 2005). Bu bakteriler, özellikle toprakta hemiselüloz, kitin, nişasta gibi organik maddeleri parçalama işlevi görmektedirler (Crawford ve ark., 1993). Topraklarda yaşayan aktinomisetlerin antifungal aktiviteleri dikkatleri çekmektedir (Crawford ve ark., 1993; Lee ve Hwang, 2002). Sadece antifungal aktiviteleri değil antibakteriyal aktiviteleri de bulunmaktadır (Velayudham ve Murugan, 2012).

Aktinomisetler, sekonder metabolitler salgılamalarıyla endüstride kullanılmaktadır. Bunlar antibiyotik üretimi, kozmetik, enzimler, antitümör ajanları, enzim inhibitörleri, vitaminler, immün modülatörleri ve organik maddelerin geri dönüşümü gibi çeşitli endüstri alanlarında kullanılmaktadır (Arifuzzaman ve ark., 2010).

Proteazlar fizyolojik olduğu kadar ticari açıdan da çok önemli bir enzim grubudur. Bu enzimler deterjan, deri, gıda ve ilaç sanayi gibi birçok endüstri alanlarında kullanılmaktadır (Rao ve ark., 1998).

1.1. Aktinomisetlerin Genel Özellikleri

Aktinomiset ismi Yunanca “aktis” (ışın) ve “mykes” (fungus) kelimelerinin bir araya gelmesiyle oluşmuştur (Das ve ark., 2008). Fungus gibi hifli yapıları mevcuttur (Lechevalier ve Lechevalier, 1967). Aktinomisetlerin fungus ile bakteri arasında olan bir organizma grubu olduğu düşünülmekteydi. Yapılan araştırmalar neticesinde aktinomisetlerin gram pozitif bakterilere benzer hücre duvarı ihtiva ettikleri ortaya çıkmıştır (Khasabuli ve Kibera, 2014).

1875 yılında Ferninand Cohn tarafından *Streptothrix foersteri* bakteri türünün teşhisi ve 1877 yılında Carl Otto Harz tarafından *Actinomyces bovis* bakteri türünün tanımlanması ile Actinobacteria sınıfı ilk kez tanımlanmıştır (Hassan ve Wellington, 2009).

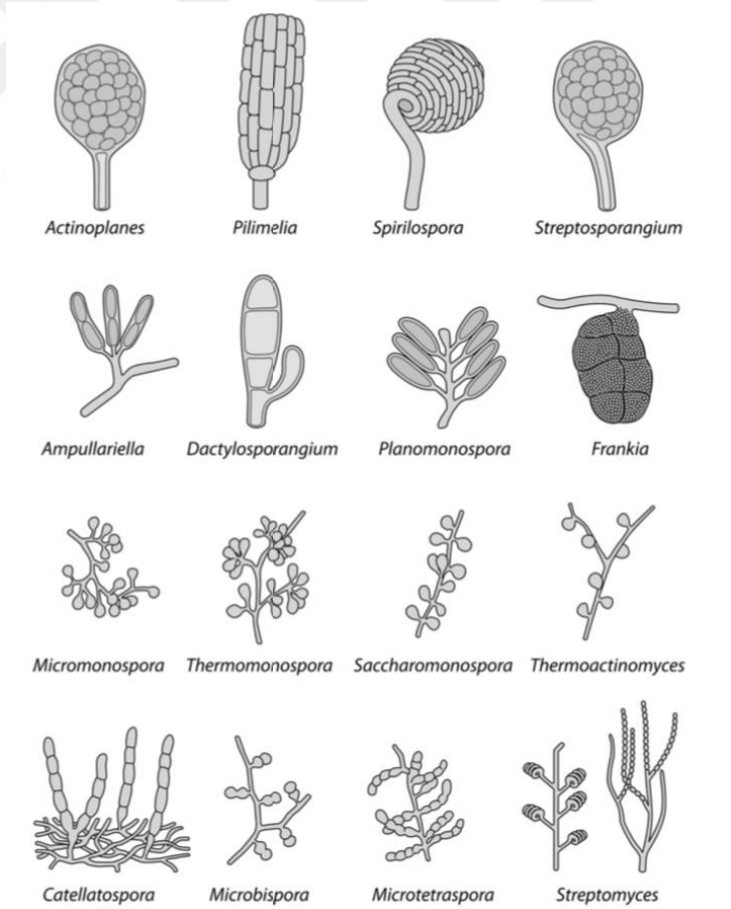
Aktinomisetler, bacteria domaininde en geniş yer tutan, gram pozitif bakteri grubunda yer alan ve dallanmış hücre zincirlerinden oluşan aerobik bakterilerdir. DNA'larında yüksek guanin ve sitozin baz içeriği mevcuttur (Ventura ve ark., 2007; Campbell ve Reece, 2008; Chaudhary ve ark., 2013). Peptidoglikan hücre duvarları LL-diaminopimelik asit içermektedir (Lee ve Hwang, 2005).

Aktinomisetler pH'ı 5-9 ve sıcaklığı 25-30 °C aralığında optimum büyüme göstermektedirler. Bunun yanı sıra daha yüksek sıcaklıklarda büyüme gösteren termofilik türleri de mevcuttur (Goodfellow ve Williams, 1983).

Aktinomisetler havasal hiflerini oluşturarak üreme sporlarını üretmektedirler (Flärdh ve Buttner, 2009; Claessen ve ark., 2014). Bu bakteriler genellikle iyi gelişmiş radyal miselyumlara sahiptir. Morfolojik ve işlevsel olarak ayrılan miseller havasal misellere veya substrat misellere ayrılmaktadırlar. Substrat miselyumları, sporların büyümesinden gelişmektedirler. Bunlar aktinobakterilerin büyümeleri için besin

absorblamaktadırlar. Beyaz, sarı, turuncu, kırmızı, yeşil, mavi, mor, kahverengi, siyah veya farklı bir renkte olabilmektedirler. Havasal miseller substrat miselyumlarından gelişmektedirler. Substrat miselyumunda dallanma ikili olabileceği gibi nadir durumlar olsa da genellikle tek kutuplu olmaktadır (Kalakoutsii ve Agre, 1976; Li ve ark., 2016).

Aktinomisetlerin sporları taksonomik açıdan oldukça önem arz etmektedir. Bu bakteriler tanımlanırken sporulasyon süreçleri de baz alınmaktadır (Locci ve Sharples, 1984). Sporlar çok farklı şekillerde olabilmektedir (Şekil 1.1). Bunlar farklı uzunluklarda, tek hücre veya zincir şeklinde, flagellaya sahip veya veziküllere sahip olmak üzere farklı formlarda bulunmaktadır (Cross ve Goodfellow, 1973). Aktinomisetler çoğu ortamda büyüyebilmelerine rağmen spor oluşumları için karbon ve azot içeriği yüksek özel ortamlara gereksinim duymaktadır (Kutzner, 1981).



Şekil 1.1. Aktinomisetler tarafından üretilen farklı spor zincirlerinin şematik çizimleri (Barka ve ark., 2016).

Aktinobakteriler kırmızı, sarı, turuncu, pembe, kahverengimsi, belirgin kahverengi, yeşilimsi kahverengi, mavi veya siyah renklerde pigmentler üretmektedirler (Lechevalier ve Lechevalier, 1970).

Streptomyces cinsi Waksman ve Henrici tarafından ilk kez 1943 yılında tanımlanmıştır (Williams ve ark., 1983). *Streptomyces* cinsi, Actinobacteria sınıfı içindeki Actinomycetales takımının Streptomycetacea ailesine ait bakterilerdir (Waksman, 1943; Anderson ve Wellington, 2001; Hasani ve ark., 2014). Sporları yuvarlak, oval veya silindirik formlarda olabilmektedir. Spor zincirleri genellikle spiral olarak sarılıdır (Waksman ve Henrici, 1943). Genellikle havasal misellerinin üzerinde sporlarını ihtiva etmektedirler (Williams ve ark., 1984). *Streptomyces* türleri yavaş büyüyen kolonilere sahiptir. Genellikle geosmin denilen uçucu metabolitleri ile kokuya sahiptir (Jüttner ve Watson, 2007; Hasani ve ark., 2014). *Streptomyces* cinsleri 5,1-6,5 pH aralığında, % 9,1-13,0 nem aralığında ve % 9,1-11,0 organik maddece zengin topraklarda yaşamayı tercih etmektedirler (Lee ve Hwang, 2002).

1.1.1. Aktinomisetlerin Sınıflandırılması

Aktinomisetler 1943'de Waksman ve Henrici tarafından taksonomik olarak sınıflandırılmışlardır (Waksman ve Henrici, 1943). Aktinomisetlerin sınıflandırılması kimyasal içerikleri, ürettikleri renk pigmentleri, sporların formları, miselyumların yapısı ve rRNA dizilimleri gibi birçok kriter baz alınarak yapılmaktadır (Barka ve ark., 2016). Actinobacteria beş alt sınıf, dokuz takım, elli beş familya, iki yüz kırk cins ve üç binden fazla türden oluşmaktadır (Goodfellow ve ark., 2010).

Aktinomiset, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'ye göre Nitriliruptoria, Acidimicrobiia, Thermoleophilia, Cariobacteria, Rubrobacteria ve Actinobacteria olmak üzere sınıflara ayrılmıştır. Actinobacteria sınıfı da Frankiales, Micromonosporales, Bifidobacteriales, Glycomycetales, Pseudonocardiales, Actinopolysporales, Jiangellales, Micrococcales, Propionibacteriales, Streptosporangiales, Actinomycetales, Corynebacteriales, Catenulisporales,

Kineosporiales, Streptomycetales ve Incertae olmak üzere 16 takıma ayrılmıştır (Goodfellow ve ark., 2012; Chaudhary ve ark., 2013).

Actinomycetales takımı Actinomycineae, Actinopolysporineae, Catenulisporineae, Corynebacterineae, Frankineae, Glycomycineae, Jiangellineae, Kineosporineae, Micrococineae, Micromonosporineae ve Propionib olmak üzere 14 alt takıma sahiptir (Adegboye ve Babalola, 2012).

Aktinomiset şubesi, Streptomycetaceae, Actinomycetaceae, Micromonosporaceae, Acidimicrobiaceae, Dermatophilaceae, Actinocoralliaceae, Streptosporangiaceae ve Nocardiaceae olmak üzere 8 aileye ayrılmıştır (Dworkin ve ark., 2006).

Streptomyces cinsi, Actinomycetales takımının Streptomycetacea ailesine ait bakterilerdir (Walksman ve Henrici, 1943; Hasani ve ark., 2014).

1.1.2. Aktinomisetlerin Ekolojileri

Sıcaklık, pH ve toprak nemi gibi faktörler aktinomisetlerin büyümesini etkilemektedir. Bu bakteriler çoğunlukla mezofiliktir ve 25 ile 30 °C arasındaki sıcaklıklarda optimal büyüme göstermektedirler. Ancak termofilik olan türleri 50-60 °C arasındaki sıcaklıklarda da büyüebilmektedir (Edwards, 1993). Bu bakteriler toprakta vejetatif büyümesinde düşük nem oranı tercih etmektedirler. Optimum 6 ile 9 arasında değişen pH'larda büyüyen çoğu aktinobakteri, genellikle nötr pH'a sahip topraklarda büyümektedirler. Ancak bazı *Streptomyces* suşları pH'ı 3,5 olan asidik topraklardan izole edilmiştir (Kim ve ark., 2003). Genellikle *Streptomyces* türleri asidik topraktan ziyade alkali ve nötral topraklarda yaşamaktadırlar. Ayrıca kumlu veya kireçli toprakları tercih etmektedirler (Madigan ve Martinko, 2010). Bununla birlikte toprakta, tatlı suda, tuzlu suda ve havada olmak üzere geniş ekolojik ortamlarda bulunmaktadırlar. Özellikle organik maddece zengin alkali topraklarda yayılım göstermektedirler. Hem toprak üstünde hem de toprağın 2 cm altında bulunabilmektedirler (Goodfellow ve Williams, 1983).

Aktinomisetler en yaygın topraklarda yayılım göstermektedirler (Das ve ark., 2008). Bu bakterilerin çoğu saprofitik, toprakta yaşayan organizmalar ve yarı olgun sporlar olmak üzere farklı yaşam döngülerine sahip olarak bulunmaktadır (Mayfield ve ark., 1972). Aktinomisetlerin karmaşık ve farklı yaşamları vardır. *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Tropheryma* ve *Propionibacterium* gibi patojen olarak yaşayanları, *Streptomyces* gibi toprakta yaşayanları, *Leifsonia* gibi bitki parazitleri olarak yaşayanları veya *Bifidobakterium* gibi gastrointestinal parazitleri olarak yaşayanları mevcuttur (Ventura ve ark., 2007).

Aktinobakterilerin popülasyon yoğunluğu, habitata ve iklim koşullarına bağlı olarak değişmektedir. Genelde gram toprak başına 10^6 ila 10^9 hücre yoğunluğunda bulunmaktadır (Goodfellow ve Williams, 1983). 1903'de Hiltner ve Störmer tarafından jelatin plak yöntemiyle sayılan aktinomisetlerini ilk defa sayısının mevsime bağlı olarak değiştiğini keşfetmişlerdir. İlkbaharda % 20, yazın % 13, sonbaharda % 30 ve kışın % 13 olduğu sonucuna varmışlardır (Hiltner ve Störmer, 1903).

1.1.3. Aktinomisetler Tarafından Üretilen Biyoaktif Ürünler

Aktinomisetler, sekonder metabolit üreticilerinin en etkili gruplarından biri olmaları nedeniyle endüstriyel açıdan oldukça önemlidir. Aktinomiset cinsleri arasında *Streptomyces*, *Saccharopolyspora*, *Amycolatopsis*, *Micromonospora* ve *Actinoplanes* ticari açıdan değerli biyomoleküllerin başlıca üreticileri olarak yer almaktadır. Bu bakteriler sekonder metabolit olarak antibakteriyel, antifungal, antiviral, antitumor ve antiprotozoal gibi aktivite gösteren bileşikler üretmektedirler. Genellikle tarım, ilaç, endüstri sanayisinde kullanılmaktadırlar. Yaklaşık 14000 mikrobiyal bileşik; antifungal, antibakteriyel ve antiprotozoal gibi antimikrobiyal aktivite göstermektedir. Antibakteriyel olarak eritromisin, kanamisin, streptomisin; antifungal olarak rapamisin, ascomisin, leptomisin; antitümoral olarak zorbamisin, himastatin, saptomisin, retamisin; antiprotozoal olarak kalafungin örnek olarak verilebilir (Solanki ve ark., 2008).

Aktinomisetler proteaz, selüloz, amilaz, kitinaz, jelatinaz ve lipaz gibi endüstriyel enzimler gibi sekonder metabolit üretme yeteneğine sahiptir (Bredholt ve ark., 2008). Aktinomisetler tarafından terapötik enzimler de üretilmektedir. Bunlara *Streptomyces* sp. tarafından üretilen L-Asparaginaz (DeJong, 1972) ve *Streptomyces olivochromogenes* tarafından üretilen L-Glutaminaz (Balagurunatha ve ark., 2010) enzimleri örnek olarak verilebilir. *Streptomyces* türleri hücre dışı hidrolitik enzimler üretmektedirler. Ürettikleri bu enzimlerle nişasta ve selüloz gibi çok sayıda polisakkariti parçalayabilmektedirler (Madigan ve Martinko, 2010).

1.2. Enzimlerin Genel Özellikleri

“Enzim” terimi 1876 tarihinde Kuhne tarafından kullanılmıştır (Aehle, 2004). Enzimler, aktivasyon enerjisini düşürerek metabolik reaksiyonları hızlandıran biyolojik katalizörlerdir. Katalizörler, kendilerini harcamadan reaksiyon hızını değiştiren kimyasal ajanlardır (Campbell ve Reece, 2008).

Enzim proteinlerinin primer, sekonder, tersiyer ve kuarterner yapıları katalitik aktiviteleri için esastır (Aehle, 2004). Enzimler substratlarına özgüdür. Enzimin etkilediği reaktanta enzimin substratı denilmektedir. Enzimin özgüllüğü aktif bölgenin biçimi ve substratın biçimi arasındaki uyumdan kaynaklanmaktadır. Substrat aktif bölgeye girdiğinde substratın biçiminde bir miktar değişiklik oluşmaktadır ve böylece substratı daha iyi kavramaktadır. İndüklenmiş uyum olarak isimlendirilen bu şekil değişikliği aktif bölgedeki kimyasal gruplara kimyasal tepkimeyi katalizleme yeteneklerini artırmış olmaktadır. Enzim molekülünün sadece belirli bir bölgesi substrata bağlanmaktadır. Aktif bölge bağ yapan katalitik grubu kapsayan bir cep veya oluk görünümündeki bölge olarak ifade edilmektedir (Campbell ve Reece, 2008).

Enzimlerin çoğu, aktivitesini tarif eden kelimeye veya substratın adına “-az” son eki getirilerek adlandırılmaktadır. Enzimlerin sistematik adlandırılması Enzim Komisyonu (EC) tarafından belirlenen kurala göre yapılmaktadır. Enzim Komisyonu (EC) tarafından, her enzime dört rakamlı kod numarası verilerek katalizledikleri

reaksiyonlara göre sınıflandırılmaktadır. İlk rakam, enzimin altı sınıfından birini (Tablo 1.1); ikincisi, enzimin alt sınıfını; üçüncü rakam, ikinci alt grubunu; dördüncü rakam ise enzimin alt-alt sınıf içindeki seri numarasını ifade etmektedir. Tablo 1.1’de enzimlerin sınıflandırılması gösterilmektedir (Nelson ve Cox, 2008).

Tablo 1.1. Enzimlerin sınıflandırılması (Nelson ve Cox, 2008).

No	Sınıf	Katalizlenen tepkime tipi
1	Oksidoredüktazlar	Elektronların transferi (Hidril atomları ve H iyonları)
2	Transferazlar	Grup transfer tepkimeleri
3	Hidrolazlar	Hidroliz tepkimeleri (işlevsel grupların suya transferi)
4	Liyazlar	Çift bağlara grupların ilavesi ve grupların yer değiştirilmesiyle çift bağların oluşması
5	İzomerazlar	İzomerik formları oluşturmak üzere moleküller içine grupların transferi
6	Ligazlar	ATP'nin ayrılmasıyla eşleşmiş kondensasyon tepkimeleriyle C-C, C-S, C-O ve C-N bağlarının oluşması

Hücrenin fiziksel ve kimyasal çevresi enzim aktivitesini etkilemektedir. Enzimlerin çalışmasını etkileyen faktörler sıcaklık, enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu, substrat yüzeyi, pH değeri, su, inhibitörler ve aktivatörlerdir (Aehle, 2004; Campbell ve Reece, 2008).

Bazı enzimler sadece enzimin protein kısmıyla, bazıları metal iyonuna, bazıları protein olmayan organik bir bileşiğe ve bazıları ise hem metal iyonuna hem protein olmayan organik bileşiğe gereksinim duyarak katalizlenmektedirler. Enzimlerin protein kısmına apoenzim, sahip oldukları iyon veya bileşiklerine kofaktör, organik bileşikleri içeren enzimlere koenzim, koenzim apoenzimin birlikte olduğu yapıya holoenzim denilmektedir. Enzim saflaştırma işlemlerinde genellikle enzimlerin

molekül büyüklüğü, çözünürlük farklılıkları, elektriksel yükleri ve adsorbsiyon davranışlarındaki farklılıklarına göre gerçekleşmektedir (Keha ve Küfrevioğlu, 2007). Saflaştırılmış bir enzimin etki mekanizmasının anlaşılması substratlar, kofaktörler, ürünler ve düzenleyicilerin hepsinin tanımlanması gerekmektedir. Enzim-bağımlı reaksiyon ara ürünlerindeki geçici oluş sırası; her bir ara ürün ve her bir geçiş durumunun yapısı; ara ürünler arasındaki dönüşüm hızları; her bir ara ürünle enzimin yapısal ilişkisi; ara ürün kompleksleri ve geçiş durumlarına katkıda bulunan reaksiyona giren ve etkileşen bütün grupların enerjisinin bilgisi gerekli olmaktadır (Nelson ve Cox, 2005).

Binlerce yıldır enzimler, peynir yapımında, mayalanmada ve ekmek yapımında şans eseri kullanılmışlardır. Enzimlerin varlığının anlaşılmasıyla birlikte pişirme ve mayalanma endüstrisinde hızlıca kullanımı yaygınlaşmıştır. Alman kimyager Otto Rohm köpek dışkısında proteaz enziminin varlığını belirlemiştir. Dışkının yerine hayvan organlarında da benzer enzimlere rastlamıştır. Domuz ve inek pankreasının bu enzimler için daha güvenilir kaynak olduğunu saptamıştır. Sadece hayvanlarda değil bitkilerde de enzimlerin varlığı ortaya çıkmıştır. Papaya bitkisinden papain, incirden fisin ve ananastan promelain gibi proteaz enzimleri izole edilmiştir. 1950'lerin ortalarında enzim teknolojisinin gelişmesiyle mikrobiyal kaynaklardan enzimler elde edilerek karakterizasyonları yapılmıştır. Enzimler %90 mikroorganizmalardan, %6 hayvanlardan ve %4 bitkilerden üretilmektedirler (Smith, 2004).

1.3. Proteazların Genel Özellikleri

Proteazlar, proteinlerin peptit bağlarını hidrolize eden katalitik bir enzim grubudur. Bu enzimler peptidazlar veya proteinazlar olarak da ifade edilmektedirler. Proteazlar hidrolaz sınıfına ait büyük bir enzim grubu oluşturmaktadırlar. Doğada her yerde bulunurlar, hem fizyolojik hem de ticari açıdan oldukça önem arz etmektedirler (Rani ve ark., 2012). Proteazlar yüksek pH, sıcaklık ve tuzluluk gibi çeşitli stres ortamlarına karşı tolerans gösterebilen enzimlerdir (Rathan ve Ambili, 2011). Hayvan, bitki, fungi, virüs ve bakteriler proteaz kaynakları olmak üzere geniş bir

yayılım göstermektedir (Barrett ve McDonald, 1986). Tablo 1.2’de gösterildiği gibi proteazlar çeşitlerine göre özellikleri de değişiklik göstermektedir (Tablo 1.2).

Tablo 1.2. Proteazların özellikleri (Rao ve ark., 1998; Sumantha ve ark., 2006).

Proteazlar	Özellikler		
	Molar kütle	Optimum pH aralığı	Optimum sıcaklık aralığı (°C)
Aspartik proteaz	30-45	3-5	40-55
Sistein proteaz	34-35	2-3	40-55
Metallo proteaz	19-37	5-7	65-85
Serin proteaz	18-35	6-11	50-70

Proteazlar, birçok fizyolojik ve patolojik durumda kritik bir rol oynamaktadır: protein katabolizması, kan pıhtılaşması gibi süreçler, hücre gelişimi ve göçü, doku düzenlemesi, gelişimde morfogenez, iltihaplanma, tümör büyüme ve metastaz, zimojenlerin aktivasyonu, mebranlardan proteinlerin geçişi, öncül proteinlerden hormonların ve aktif peptidlerin ayrılması gibi tüm metabolik ve fizyolojik olaylarda önemli görevlere sahiptirler (Rao ve ark., 1998; Rani ve ark., 2012).

1.3.1. Proteazların Sınıflandırılması

Proteazların sınıflandırılmasında; katalize edilen reaksiyon, katalitik bölgenin kimyasal yapısı ve yapısal olarak evrimsel ilişkisi olmak üzere üç ana kriter kullanılmaktadır. Proteazlar katalitik etkilerine göre endopeptidazlar ve ekzopeptidazlar olmak üzere iki gruba ayrılır (Barrett, 1994). Endopeptidazlar serin, sistein, aspartat ve metallo olarak 4 gruba ayrılmaktadır (Reed, 1993). Ekzopeptidazlar ise aminopeptidazlar ve karboksipeptidazlar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Tablo 1.3).

Tablo 1.3. Proteazların sınıflandırılması (Rao ve ark., 1998).

PROTEAZLAR (PEPTİDAZLAR)	EC No
Ekzopeptidazlar	
Aminopeptidazlar	3.4.11
Dipeptidil peptidazlar	3.4.14
Tripeptidil peptidazlar	3.4.14
Karboksipeptidazlar	3.4.16-18
Serin tip proteaz	3.4.16
Metaloproteaz	3.4.17
Sistein tip proteaz	3.4.18
Endopeptidazlar	
Serin proteaz	3.4.21
Sistein Proteaz	3.4.22
Aspartik proteaz	3.4.23
Metaloproteaz	3.4.24
Katalitik mekanizması bilinmeyen endopeptidazlar	3.4.99

1.3.1.1. Endopeptidazlar

Endopeptidazlar katalitik etkilerine göre dört gruba ayrılmaktadır: serin proteaz, sistein proteaz, aspartat proteaz ve metallo proteazlar.

a. Serin proteaz

Genellikle nötral ve alkali pH'larda aktivite gösteren serin proteazların optimum pH'ları 7-11 arasında değişiklik göstermektedir (Çalık, 1998). Kimotripsin, tripsin ve elastaz enzimleri serin proteaz özelliği taşımaktadır (Hedstrom, 2002). Kimotripsin, peptit bağlarının hidrolitik parçalanmasını katalizleyen bir proteaz enzimidir. Bu proteaz aromatik amino asit kalıntılarına bitişik peptit bağlarının parçalanmasına özgüdür (Nelson ve Cox, 2008). Serin proteazlar sindirim (tripsin, kimotripsin) dahil olmak üzere immün sistemde (kompleman B, C, D), kan pıhtılaşması (faktör VIIa,

IXa, Xa, XIIa) ve fibroliz (ürokinaz, plazmin) gibi hayati öneme sahip fizyolojik süreçlere katılmaktadırlar (Polgar, 2005).

b. Sistein proteaz

Aspartik asit, sistein ve histidini ihtiva eden enzim grubudur. Sistein proteazlar okside edici ajanlarla ve ağır metal iyonlarıyla rahatça inhibe edilebilmektedir. Sistein proteaz kaynakları bitkiler ve mikroorganizmalardır (Gerze, 2003). Bu proteazlar nötral pH'larda aktiftirler ancak lizozomal proteazlar gibi bazı proteazlar asidik pH değerinde maksimum aktivite göstermektedir. Papain en iyi bilinen sistein proteazdır (Rani ve ark., 2012).

c. Aspartat proteaz

Düşük pH aralığında aktiftirler. Bu özelliklerinden dolayı asit proteazlar da denilmektedir (Fersht, 1998). Pepsin, rennin, kimosin gibi proteazları içermektedir (Benes ve ark., 2008). Maksimum aktiviteyi düşük pH aralığında (pH 3-4) göstermektedir. Mikrobiyal aspartat proteaz iki gruba ayrılır: pepsin benzeri enzim ve rennin benzeri enzimler. Pepsin benzeri enzimler *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* ve *Neurospora* tarafından; rennin benzeri enzimler *Endothia* ve *Mucor* tarafından üretilmektedir (Rani ve ark., 2012).

d. Metallo proteaz

Metallo proteazların aktiviteleri için çinko gereklidir. Bitki patojeni virüslerde bulunmaktadır (Dougherty ve Semler, 1993). Genellikle nötr pH değerlerinde aktiftirler (Fersht, 1998). Metallo proteazlar doku morfogenez ve farklılaşmasında rol oynamaktadır. Ayrıca kanser hastalıklarının tedavisinde kullanılabilir. Bakterilerden elde edilen termolizin metallo proteazlardanır (Rao ve ark., 1998).

1.3.1.2. Ekzopeptidazlar

Ekzopeptidazlar sadece polipeptid zincirinin uç kısımlarını hidroliz etmektedir. (Rao ve ark., 1998). Ekzopeptidazlar aminopeptidazlar ve karboksipeptidazlar olarak gruplandırılmaktadır.

a. Aminopeptidazlar

Bitki ve hayvanlardan elde edilen aminopeptidazlar, amino uçtaki bölgeden bir aminoasit kesimi yapmaktadır (Rao ve ark., 1998). Aminopeptidazlar mantarlarda ve bakterilerde geniş yayılım göstermektedirler. Genellikle hücre içi enzimler olduğu bilinse de *Aspergillus oryzae* tarafından üretilen hücre dışı aminopeptidaz olduğu rapor edilmiştir. pH 7,5 ile 10,5 arasında optimum aktivite göstermektedirler (Rani ve ark., 2012).

b. Karboksipeptidazlar

Karboksil uçtaki bölgeden tek ve son peptid bağını hidroliz etmektedir. Karboksipeptidazlar, aktif bölgelerine göre sistein karboksipeptidaz, serin karboksipeptidaz ve metallo karboksipeptidaz olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır (Rao ve ark., 1998).

1.3.2. Proteaz Kaynakları

Proteazlar, canlılar için metabolik olarak ihtiyaç olduğundan Tablo 1.4'te gösterildiği gibi bitkiler, hayvanlar, mikroorganizmalar gibi çok çeşitli kaynaklarda bulunabilmektedirler (Tablo 1.4). Genetik mühendisliği proteazlardan daha fazla yararlanmayı hedeflemektedir. Bitkiler ve hayvanlardan ziyade avantajlarından dolayı mikrobiyal proteazlar üzerine yoğunlaşmaktadır (Rao ve ark., 1998).

Tablo 1.4. Farklı kaynaklardan üretilen proteazlar (Naveed ve ark., 2020).

Proteaz Kaynakları		
Hayvansal	Bitkisel	Mikrobiyal
Tripsin	Promelian	Endoproteinaz
Kimotripsin	Papain	Subtilizm
Enterokinaz	Fisin	Karboksipeptidaz
Elastaz		Dipaz
Trombin		Kollajenaz
Factor Xa		Termolisiz
Katepsin C		Endoproteinaz
Katepsin D		TVMV proteaz
Pepsin		TEV proteaz
DAPaz		WNV proteaz
Karboksipeptidaz		Rhino virus 3C
		Proteinaz K

1.3.2.1. Bitkisel Proteazlar

Bitkisel proteazlar, iklim koşullarının büyümeye etkisi ve tarım yapılacak arazinin koşulları gibi birçok faktörden etkilenmektedirler. Papain, bromelain, keratinazlar ve fisin bitki kaynaklı iyi bilinen bazı proteazlardır (Rao ve ark., 1998). *Carica papaya* meyvelerinin lateksinden elde edilen papain, Batı ve Orta Afrika ile Hindistan'ın subtropikal bölgelerinde yetişen bir sistein proteazdır. Papain pH 5-9 arası değerlerde aktiftir ve substratların varlığında 80 veya 90 °C'ye kadar stabil kalmaktadır (Rani ve ark., 2012). Ananasın suyundan ve sapından elde edilen bromelain, bir sistein proteaz olarak karakterize edilmektedir. pH 5-9 arası değerlerde aktiftir ve inaktivasyon sıcaklığı 70 °C'dir. Keratinazlar saç bozan proteazlardır. Bunlar, saç ve yünün sindirilmesi, lizin gibi temel amino asitlerin üretimi ve atık su sistemlerinin tıkanmasının engellenmesi gibi alanlarda kullanılmaktadırlar (Rao ve ark., 1998). Fisin, *Ficus carica* ağacının lateksinden elde edilmektedir. Maksimum aktiviteyi 6,5-8,5 aralığında göstermektedir. Jelatin eldesi için kolajen hidrolizi ve et yumuşatma gibi özellikleriyle endüstride kullanılmaktadır (Silva-López ve Gonçalves, 2019).

1.3.2.2. Hayvansal Proteazlar

Tripsin, kimotripsin, pepsin ve rennin hayvansal kaynaklı iyi bilinen bazı proteazlardır. Bir serin proteaz olan tripsin, karboksil gruplarına lizin ve arginin kalıntılarını ihtiva eden peptid bağlarını hidrolize etmektedir. Böcek zararlılarının biyolojik kontrolünde, bakteri besiyerinin hazırlanmasında ve bazı özel tıbbi uygulamalarda tripsin kullanılmaktadır. Pepsin, iki hidrofobik amino asit arasındaki peptit bağlarının hidrolizini katalizleyen bir aspartil proteazıdır. pH 1-2 gibi oldukça düşük asidik değerlerde aktiftirler ve pH 6'nın üzerinde inaktif olmaktadır (Rani ve ark., 2012).

1.3.2.3. Mikrobiyal Proteazlar

Mikroorganizmalar geniş bir hücre içi ve hücre dışı proteazlar içermektedir. Hücre içi proteazlar çeşitli hücrel ve metabolik süreçlerde oldukça önemlidir. Hücre dışı proteazlar protein hidrolizi için önem arz etmektedir. Aynı zamanda çeşitli endüstriyel alanlarda protein parçalanmasına yardımcı olduğundan dolayı daha değerlidir (Rani ve ark., 2012).

Bitki ve hayvan kaynaklı proteazların istenilen talepleri karşılayamaması üzerine ilgi mikrobiyal kaynaklı proteazlarda toplanmıştır. Biyoteknolojik uygulamalar için mikrobiyal kaynaklı proteazlar istenilen tüm özellikleri karşılaması sebebiyle de tercih edilmektedir. Mikroorganizmalar, geniş biyokimyasal çeşitlilikleri ve genetik manipülasyona yatkınlıkları nedeniyle enzim kaynağı olarak kullanılmaktadır (Rao ve ark., 1998; Gupta ve ark., 2002a). Aynı zamanda bu enzimler katalitik aktivitelerinin yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha kararlı ve daha ucuz olmaları, büyük boyutlarda ve yüksek saflıkta elde edilmesi gibi avantajlara sahiptir (Wiseman, 1987).

Çeşitli virüslerde serin peptidazları, aspartik peptidazları ve sistein peptidazları bulunmaktadır (Rawlings ve Barrett, 1993). Virüs kodlu peptidazların tümü endopeptidazlardır. Araştırmalarda, AIDS ile mücadele edebilecek güçlü inhibitörler

tasarlamak için viral proteazların üç boyutlu yapısı ve bunların sentetik inhibitörlerle etkileşimleri ilgi çekmektedir (Rao ve ark., 1998).

Mantarlar, oldukça fazla çeşitlilikte enzimler üretmektedirler. Mantar proteazları, pH 4-11 gibi geniş bir pH aralığında aktiftirler ve geniş substrat spesifikliğine sahiptirler. Fungal asit proteazları, pH 4,0-4,5 arasında aktiftir ve pH 2,5-6,0 arasında stabildir. Dar pH değerleri arasında aktif olmalarından ve sıcaklık özelliklerinden dolayı peynir yapımı endüstrisinde kullanılmaktadır. Fungal nötr proteazlar, pH 7'de aktif olan metaloproteazlardır. Bu proteazlar, gıda proteini hidrolizatlarının acılığını azaltmada ve bitki, hayvan ve bakteriyel proteazların etkisini tamamlamaktadır. Ayrıca fungal alkali proteazlar gıda proteini modifikasyonunda da kullanılmaktadır (Rao ve ark., 1998).

1.3.3. Alkali Proteazların Genel Özellikleri

Alkali proteazlar, nötralden alkali pH aralığına kadar aktif olan ve çeşitli mikroorganizmalardan izole edilebilen proteazlardır. Genellikle pH 9-11 değerleri arasında optimal aktivite göstermektedirler. Genellikle 50-70 °C sıcaklık değerlerinde aktiftirler. Genellikle molekül kütlesi 15-30 kDa arasında değişmektedirler. Ca^{2+} , Mg^{2+} ve Mn^{2+} gibi divalent metallere gereksinim duymaktadırlar ve bu metallerin varlığında maksimum aktivite göstermektedirler (Kumar ve Takagi, 1999; Sharma ve ark., 2019).

Alkali proteazlar, deterjanlarda, gıdalarda ve diğer çeşitli uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Gıda endüstrisinde alkali proteazlar oldukça önemli bir rol oynamaktadır (Sharma ve ark., 2019). Deterjan endüstrisinde en çok alkali pH aralığındaki serin proteazlar kullanılmaktadır (Gupta ve ark., 2002b).

Genellikle asit proteazlar mantarlardan, nötral proteazlar bitkilerden elde edilirken alkali proteazlar bakterilerden elde edilmektedir. Hem asidik hem de nötr proteazların mantarlardan ve bitkilerden izolasyonu kolay ve ekonomik değildir. Bakteri türlerinden elde edilen proteazlar ise maliyetinin ekonomik olması,

üretiminin kolay olması, genetik manipölasyona uygun olması, izolasyonunun kolay olması ve sınırlı alanın yeterli olması gibi avantajlarıyla endüstrilerde kullanım açısından ilgi odağı haline gelmektedir (Razzaq ve ark., 2019).

1.3.4. Proteazların Kullanım Alanları

Proteazlar hem fizyolojik hem ticari açıdan çok önemlidir. Proteazlar deterjan, deri, gıda, ilaç sanayi gibi birçok alanda kullanılan değerli bir enzim grubudur (Rao ve ark., 1998).

Genetik mühendisleri genleri istenilen ürünün üretilmesi üzerine çalışmalarını sürdürmektedir. Bunun için endüstriyel alanında bakteriyel enzimlerin üretimi de mevcuttur (Hogdson, 1994).

Gıda endüstrisinde oldukça yaygın olarak proteaz kullanılmaktadır. Sütten peynir üretimi sırasında, proteaz kappa kazeinine ilave edilerek topaklanmayı önlemektedir. Besin değeri yüksek protein hidrolizat preparasyonu, mikrobiyal alkali proteazların ilavesiyle gerçekleştirilmektedir. Bu hidrolizatın hazırlanmasıyla bebek maması formölasyonu, alkolsüz içeceklerin ve meyve sularının güçlendirilmesinde kullanılmaktadır. Biyoaktif peptitler, çeşitli farmasötik ilaç oluşumlarında ve stresli çevre koşulları altında potansiyel moleküller olarak önemli bir rol oynamaktadır. (Ray, 2012; Singhal ve ark., 2012; Mótyán ve ark., 2013; Singh ve ark., 2016). Gıda endüstrisinde kullanılan proteaz enzimleri undaki proteinler üzerinde etki göstermektedir. Böylece unun yoğurulmasında yaşanan güçlüğe çözüm olmaktadır. Bisküvi, gofret gibi unlu gıdalarda kırılabilirliği arttırmaktadır (Suhartati ve ark., 2008).

Deterjan endüstrisinde proteaz, 1913'de Rohm tarafından pankreatik ekstraktların kullanımıyla başlamıştır (Wiseman, 1987). Proteazlar, deterjan endüstrisinde ticari boyutta oldukça öneme sahiptir. Deterjan endüstrisinde proteaz kullanımı ev tipi çamaşır yıkama, kontak lenslerin temizlenmesi veya protezlerin temizlenmesi için kullanılmaktadır. Toplam enzim satışında deterjanlarda proteaz kullanımı % 20'dir

(Razzaq ve ark., 2019). Yıkama performansını arttırmak için en ideal proteaz seçiminde olması gereken kriterler: yıkama sırasında farklı sıcaklık ve pH değerlerinde yüksek aktivite göstermesi ve stabil kalması, deterjan bileşenleri ve iyonik kuvvet ile uyumluluğu, lekeyi çıkarabilmesi, deterjan solüsyonun pH değeri ile izoelektrik noktalarının uyumlu olması ve enzimin EDTA'ya karşı stabil olmasıdır (Gupta ve ark., 2002b; Rai ve Mukherjee, 2009).

Bacillus subtilis, *Streptomyces avermectnus* ve *Conidiobolus coronatus* tarafından üretilen proteazlar, X-ray filmlerinden gümüşü başarılı bir şekilde geri kazandırmaktadır ve çevre dostu olmasıyla dikkatleri çekmektedir (Godfrey ve West, 1996; Wolff ve ark., 1996; Yang ve ark., 2000a).

Kimya endüstrisinde su sistemindeki bazı alkali proteaz üreten *Bacillus* ve *Streptomyces* türleri peptit ve organik sentez için aktif adaylardır (Masui ve ark., 2004; Jadhav ve Hocheng, 2012; Yadav ve ark., 2015).

Deri endüstrisinde elastolitik ve keratinolitik aktivitelerinden dolayı alkali proteaz tercih edilmektedir. Alkali proteaz derinin hazırlanmasında rol oynamaktadır. İstenmeyen pigmentler enzimlerle imha edilerek temiz derilerin üretilmesine yardımcı olmaktadır (Takami ve ark., 1992; Brandelli ve ark., 2010).

Bilim insanları tarafından tıp alanında proteazlar geniş ölçüde kullanılmaktadır. Proteazlar, tıpta, gazlı bez, dokunmamış dokular ve alkali proteazları içeren merhem bileşimi gibi farklı formüller kullanılarak umut verici bir terapötik özellik göstermektedir (Sen ve ark., 2011; Anbu, 2013; Awad ve ark., 2013).

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Al-Dhabi ve arkadaşları tarafından Suudi Arabistan topraklarından izole ettikleri *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-49 ile proteaz ve lipaz üzerine çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada proteazın pH 9'da ve 40 °C'de, lipaz enziminin ise pH 8'de ve 35 °C'de maksimum aktivite gösterdiği saptanmıştır. Proteaz üretiminde Ca^{2+} , lipaz üretiminde Mg^{2+} ilave edilerek fermentasyon ortamında üretimin artırıldığı tespit edilmiştir (Al-Dhabi ve ark., 2019).

De Azaredo ve arkadaşları tarafından Brezilya Cerrado'dan izole edilen *Streptomyces* sp. 594'ün proteaz üretimi üzerine araştırma yapılmıştır. İstatiksel deney tasarımı kullanılarak düşük maliyetli besiyeriyle optimize edilmesiyle maksimuma çıkarıldığı sonucuna varılmıştır. Sonuçta proteaz enzim aktivitesi artırılmıştır (De Azaredo, 2013).

Xu ve arkadaşları tarafından Antartik denizden izole edilen *Streptomyces* sp. XE-1'in proteaz üretimi üzerine araştırma yapılmıştır. XE-1'e morfolojik, biyokimyasal ve moleküler olarak yapılan çalışmalar sonucu *Streptomyces* türü olduğu belirlenmiştir. Bir çözücü, deterjan ve oksitleyici ajan olarak serin proteazının XE-1 tarafından üretildiği tespit edilmiştir ve karakterize edilmiştir. Bu enzimin pH 5-10 arasında stabil kaldığı, optimum pH'ı 8,2, optimal sıcaklığı da 55 °C olduğu saptanmıştır. Hidrofilik organik bir çözücü, ağartma maddelerinde (hidrojen peroksit gibi) aktif ve kararlı, denatüran ajanlarda (üre ve guanidin hidroklorür gibi) stabil olduğu kanaatine varılmıştır (Xu ve ark., 2015).

Thumar ve Singh tarafından alkali proteazın organik çözücü toleransı üzerine çalışma yapılmıştır. Tuza toleranslı bir alkalifilik aktinomiset olan Mit-1, Hindistan'ın sahil

bölgesi Mithapur'un Gucerat eyaletinden izole edilmiştir. *Streptomyces* sp. % 15'e kadar tuzda ve pH 11'de büyüebildiği tespit edilmiştir. % 5 tuz oranında ve pH 9'da optimum olarak büyüdüğü sonucuna varılmıştır. Ksilen, etanol, aseton, butanol, benzen gibi bir dizi organik çözücü varlığında alkali proteazı tolere edebildiği ve üretebildiği; etanol ve benzenin enzimin katalizini olumsuz etkilediği saptanmıştır (Thumar ve Singh, 2009).

Boominadhan ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada farklı kaynaklardan *Bacillus* izolatları izole edilmiştir. İzole edilen izolatların proteaz üretimini geliştirmek için optimum büyüme koşulları incelenmiştir. Bu çalışmada *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus megaterium* ve *Bacillus licheniformis* izolatları kullanılmıştır. Farklı kaynaklardan elde edilen dört *Bacillus* izolatının da glukozu iyi bir karbon kaynağı olarak kullandığı saptanmıştır. Ayrıca *Bacillus licheniformis* izolatının proteaz üretimi için en iyi karbon kaynağının nişasta olduğu saptanmıştır. Tüm testlerde sığır eti ekstratının da iyi bir azot kaynağı olduğu belirlenmiştir. Tüm izolatlar için optimum sıcaklığı 50 °C ve optimum pH'ı 8 olarak bulunmuştur. Soya keki ise iyi bir enzim substratı olduğu tespit edilmiştir (Boominadhan ve ark., 2009).

Yum ve arkadaşları tarafından, bir *Streptomyces* türünden izole edilen alkali serin proteazı saflaştırılarak karakterizasyonu araştırılmıştır. Bu çalışmada *Streptomyces* sp. YSA-130 izolatı kullanılmıştır. SDS-PAGE ve jel filtrasyonları kullanılarak molekül ağırlığı ölçülerek 19 kDa olduğu saptanmıştır. Amino asit konsantrasyonlarına bakılarak glisin, serin, treonin ve valin amino asitlerinin yüksek konsantrasyonlarda olduğu belirlenmiştir. Amino ucundaki 15 amino asitlik diziliminde diğer bazı bakterilerin proteaz homologileri karşılaştırılmıştır. Sıcaklık ve pH değerlerine bakıldığı zaman optimum sıcaklığın 60 °C ve optimum pH'ının 11,5 olduğu, 50 °C'de ve pH 11-14 arasında stabil kaldığı saptanmıştır. Metal iyonlarının proteaza etkisini incelediklerinde Ag^+ , Hg^{2+} , Co^{2+} gibi metal iyonlarının güçlü bir şekilde proteazı inhibe ettiği anlaşılmıştır. Kimyasalların proteaz üzerine etkisini araştırdıklarında DFP, NEM, PMSF ve fenilglioksal kimyasallarının bu enzimi güçlü bir şekilde inhibe ettiği anlaşılmıştır (Yum ve ark., 1994).

Suthindhiran ve arkadaşları, alkali proteaz üreten halofilik tür *Actinopolyspora* sp. VITSDK2, Güney Hindistan'daki deniz tuzundan izole edip çalışma yapmışlardır. Proteaz, amonyum sülfat çöktürmesi ve ardından DEAE (dietilethanolamin) selüloz kolon kromatografisi kullanılarak HLPC (yüksek performans sıvı kromatografi) ile daha fazla saflaştırılmıştır. Proteazın SDS-PAGE analizi sonucu 22 kDa moleküler ağırlığında olduğu saptanmıştır. Saflaştırılan proteazın optimum pH 10'da aktif olduğu ve pH 4-12 arasında stabil kaldığı belirlenmiştir. Sıcaklık değerlerine bakıldığı zaman optimum sıcaklığı 60 °C olduğu 25-80 °C arasında stabil kaldığı saptanmıştır. Enzim aktivitesi, Mn^{2+} , Mg^{2+} ve Ca^{2+} varlığında artarken Cu^{2+} varlığında azaldığı sonucuna varılmıştır. Serin proteaz olduğunu tahmin ederek PMSF ve DFP varlığında aktivitenin inhibe olduğu ve kimotripsin benzeri serin proteaz olduğunu düşünerek N-tosil-L-lizin klorometil keton varlığında ortadan kalktığı tespit edilmiştir (Suthindhiran ve ark., 2014).

Rao ve arkadaşları, *Bacillus circulans*'dan izole etikleri ve saflaştırdıkları alkali proteazın deterjan ve deri endüstrisinde, çevre dostu ve dayanıklılığını göstermek amacıyla çalışmışlardır. Saflaştırılan enzimin moleküler ağırlığının SDS-PAGE kullanılarak 39,5 kDa olduğu tespit edilmiştir. Enzimin optimum pH'ı 11 ve optimum sıcaklığı ise 70 °C olarak saptanmıştır. K_M değerini 0,597 mg ml⁻¹, V_{max} değerini 13825 μ mol.min⁻¹ olarak hesaplanmıştır. Metal testinde Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} ve Na^+ metallerinin enzim aktivitesini arttırdığı tespit edilmiştir. % 1 Triton-X-100 varlığında % 15 ve Tween-20 varlığında % 20 aktivitesini arttırdığı, % 1 SDS varlığında aktivitesinin % 75'ini muhafaza ettiği ve % 1 H₂O₂ varlığında inhibe ettiği saptanmıştır. Kimyasal kullanmadan ve lifli proteinleri hidrolize etmeden hayvan postu için leke çıkarma ve tüy giderme özelliği olduğu belirlenmiştir. Böylece deri işleme endüstrisinde çevre dostu ve kaliteli ürün üretimi için iyi bir uygulama potansiyeli gösterdiği sonucuna varılmıştır. Kan lekesi verilerinin stabilitesi (pH, sıcaklık ve yüzey aktif maddeler) ve hidrolizi, deterjan endüstrilerindeki önemini de ortaya koyduğu bildirilmiştir.

Yapılan bir çalışmada *Bacillus subtilis* bakterisinden izole edilen proteaz enziminin saflaştırılması için amonyum sülfat çöktürmesi ile Sefadeks G-200 jel filtrasyon

kromatografisi kullanılmış ve enzim karakterize edilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda proteazın optimum substrat yoğunluğunun % 0,5; optimum pH değerinin 7; optimum inkübasyon süresinin 30 saat; optimum inkübasyon sıcaklığının 30 °C; en iyi tamponunun fosfat tamponu; en iyi karbon kaynağının laktoz; en iyi nitrojen kaynağının (NH₄)₂SO₄ olduğu sonucuna varılmıştır. Proteaz üretiminde ise en iyi amino asitin valin olduğu tespit edilmiştir (El-Safey ve Abdul-Raouf, 2004).

Diğer bir çalışmada; Bangalore'den dört farklı toprak örnekleri toplanmış ve bu örneklerden bakteri izolasyonu yapılarak proteaz üreten bakteri suşları belirlenmiştir. Yağsız süt agarda proteaz üreten izolatları seçilmiştir. Yapılan testler sonucunda bu bakterilerin proteaz üreten *Bacillus subtilis* bakterisi olduğu sonucuna varılmıştır. Enzim üretiminde bakterinin optimum büyüme sıcaklığı 37 °C ve optimum büyüme pH değerinin 8 olduğu belirlenmiştir. Proteaza amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve kolon kromatografisi yöntemleri uygulanarak saflaştırma gerçekleştirilmiştir (Das ve Prasad, 2010).

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Bakteri

Bu tez çalışmasında FEN-BAP-A-140316-52 nolu proje tarafından desteklenen “*Ulva lactuca* Kompostundan İzole Edilen Aktinomisetlerin Biyolojik Aktivitelerinin Araştırılması” başlıklı tez çalışmasında elde edilen aktinomiset BSU-9 suşu kullanıldı (Yıldırım, 2018).

3.1.2. Cihazlar

Bu çalışmada; buzdolabı (BEKO), çalkalamalı inkübatör (Julabo SW22), etüv (Nüve, EN120), güç kaynağı (JUNY1), dikey jel elektroforez, termoplate (WiseTherm HB-960), Isıtıcı-Manyetik karıştırıcı (Heidolp), otoklav (Zealway GR85DR), pH metre (Hanna HI2211), santrifüj (Sigma 1-14), soğutmalı santrifüj (Sartorius), spektrofotometre (MAPADA UV-6100), Vortex (Heidolp) ve -80 °C Dondurucu (DAIHAN) cihazları kullanıldı.

3.1.3. Kimyasallar

Çalışmada akrilamid (merck), APS (merck), aseton (carloerba), asetik asit (carloerba), asetonitril (panreac), amonyum persülfat (merck), etanol (smyras), izopropanol (panreac), metanol (sigma), amonyum sülfat (merck), bacteriological agar (multicell), Pepton (merck), CaCl₂ (merck), comassie brillant blue G-250 (merk), coomassie brillant blue R-250 (merck), CuSO₄.5H₂O (sigma-aldrich), D-

glukoz (sigma), DTT (acros), EDTA (sigma), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (merck), gliserol (carloerba), glisin (carloerba), H_2O_2 (sigma-aldrich), HCl (merck), kazein (sigma), KH_2PO_4 (carloerba), L-tirozin (sigma), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (merck), MnCl_2 (acros), NaOH (merck), PMSF (across), protein marker (promega), SDS (merck), TCA (sigma), TEMED (merk), Tris Base (merk), Triton X-100 (merck), Tween 20(merk), Tween-80 (sigma), maya ekstraktı (merck) ve $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (merck) kimyasalları kullanıldı.

3.1.4. Kullanılan Besiyerler, Substratlar ve Solüsyonlar

Çalışmada aktinomiset BSU-9 izolatını canlandırmak için Nişasta-Kazein agar besiyeri kullanıldı (Jeffrey, 2008). Besiyeri içerikleri distile suda çözülerek, otoklavda 1,1 atmosfer basınç altında, 121°C 'de, 15 dakika süre ile steril edildi.

Nişasta-Kazein besiyeri (Litre)

– Çözünür nişasta	10,0 g
– Kazein hidrolaz	0,3 g
– KNO_3	2,0 g
– NaCl	2,0 g
– K_2HPO_4	2,0 g
– $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,05 g
– $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01 g
– Agar	18,0 g
– Saf su	1000 ml

Petinate ve arkadaşları (1999) tarafından belirlenen gliserol-peptone-tuz besiyeri modifiye edilerek hazırlandı ve bu besiyeri deneylerde aktinomiset BSU-9 izolatından proteaz üretmek için kullanıldı.

Besiyeri içerikleri distile suda çözülerek, otoklavda 1,1 atmosfer basınç altında, 121°C 'de, 15 dakika süre ile steril edildi.

Gliserol-peptone-tuz besiyeri (Litre)

- Peptone 4,5 g
- KCl 0,3 g
- MgSO₄ 0,5 g
- K₂HPO₄ 2 g
- 1 ml eser element solusyonu:
 - CuSO₄.5H₂O 1 mg/ml
 - MnSO₄.7H₂O 1 mg/ml
 - ZnSO₄.7H₂O 1 mg/ml
 - CaCl₂.2H₂O 1 mg/ml

Substrat solüsyonu: Proteaz aktivitesinin kantitatif ölçümü için 0,65 g kazein 100 ml uygun tamponda sıcaklık yardımıyla çözülerek substrat solüsyonu hazırlandı.

Akrilamid solüsyonu: 29,2 g akrilamid ve 0,8 g bisakrilamid çözülerek distile su ile 100 ml'ye tamamlandı (Bollag ve ark., 1996).

Amonyum persülfat: SDS-PAGE sisteminde ayırıcı ve yükleme jelin hazırlanmasında kullanılmak üzere 0,1 g amonyum persülfat 1 ml distile su içinde çözüldü (Bollag ve ark., 1996).

Tris-HCl 1 M, pH 6,8: SDS-PAGE sisteminde yükleme jelin hazırlanmasında kullanılmak üzere Tris-HCl 1 M, pH 6,8 hazırlamak için 60 g Tris Base 500 ml distile su ile çözdürülür ve pH HCl ile 6,8'e ayarlandı.

Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8: SDS-PAGE sisteminde ayırıcı jelin hazırlanmasında kullanılmak üzere 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 91 g Tris Base 500 ml distile su ile çözdürülür ve pH HCl ile 8,8'e ayarlandı.

Elektroforez Tamponu: Tris 4,5 g, Glisin 21,16 g, SDS 15 ml (%10) ve dH₂O 1000 ml ile hazırlandı (Bollag ve ark, 1996).

Örnek yükleme tamponu: SDS-PAGE sistemine yüklenecek olan protein örneklerinin hazırlanmasında kullanılmak üzere örnek yükleme tamponu (62,5 mM Tris (pH 6,8), % 2 SDS, %5 β -merkaptoetanol, % 10 Gliserol ve % 0,002 Bromfenol mavisi) hazırlandı (Zhang ve ark., 2009).

Coomassie Brilliant Blue R-250: Jeli boyamak için Coomassie Brilliant Blue R-250 % 0,25, metanol % 40 ve asetik asit % 10 olacak şekilde hazırlandı.

Boya giderme solüsyonu: Boya giderme solüsyonu % 50 metanol ve % 10 glisial asetik asit olacak şekilde hazırlandı.

Fiksatif solüsyon: Fiksasyon için % 5 metanol ve % 7 glisial asetik hazırlandı.

Triton-X100: SDS'i uzaklaştırmak için % 2.5 Triton-X100 hazırlandı (Böckle ve ark., 1995).

Tris-HCl 50 mM, pH 8: Tris-HCl 50 mM, pH 8 tamponu hazırlamak için 0,6 g Tris distile su ile 100 ml'ye tamamlandı ve pH HCl ile 8 ayarlandı.

Glisin-NaOH 50 mM, pH 9-13: Glisin-NaOH 50 mM, pH 9-13 tamponları hazırlamak için 0,375 gram glisin distile su ile 100 ml'ye tamamlandı ve NaOH ile istenilen pH'a ayarlandı.

DTT: 100 mM DTT distile su ile hazırlandı.

PMSF: 100 mM PMSF izopropanol ile hazırlandı.

EDTA: 100 mM EDTA distile su ile hazırlandı.

TCA: Proteaz aktivite çalışmalarında kullanılmak üzere 110 mM TCA hazırlandı.

Na₂CO₃: Proteaz aktivite çalışmalarında kullanılmak üzere 0,5 M Na₂CO₃

hazırlandı.

Folin-Ciocalteu fenol solüsyonu: Proteaz aktivite çalışmaları için kullanılmak üzere 1:1 oranında Folin-Ciocalteu fenol solüsyonu hazırlandı.

Metaller: Deneylerde kullanılmak üzere 100 mM stok metal çözeltileri hazırlandı.

3.2. Yöntem

Aktinomiset BSU-9 izolatından proteaz enzimi üretilerek karakterizasyon çalışmaları yapıldı. Gliserol içinde -80 °C’de stokta bulunan aktinomiset BSU-9 suşu nişasta kazein besiyerine ekildi ve 30 °C’de, 150 rpm’de, 3 gün çalkalamalı inkübatörde inkübe edilerek canlandırıldı.

3.2.1. Proteaz Aktivitesinin Kantitatif Olarak Belirlenmesi

Cupp-Enyard (2008)’ın geliştirdiği metot modifiye edilerek aktivite çalışmaları kullanıldı. Bu yöntemde 0,1 ml ham enzim ile 0,5 ml Tris HCl (pH 8, 50 mM) tamponunda % 0,65 kazein içeren substrat solüsyonu ile karıştırıldı. Karışım 60 °C’de 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 110 mM TCA’dan 0,5 ml ilave edilerek reaksiyon durduruldu ve oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra karışım 8000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası 0,5 ml süpernatant cam deney tüplerine alındı ve üzerine 0,5 M Na₂CO₃’dan 1,25 ml eklendi ve karıştırıldı. Daha sonra üzerine 0,25 ml Folin-Ciocalteu’nun fenol (1:1 oranında seyreltilmiş) ilave edilerek 30 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi. Oluşan mavi renk 660 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçüldü.

Enzim aktivitesinin hesaplanmasında (3.1)’de verilen formülden ve hazırlanan tirozin standart grafiğinden yararlanıldı.

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

Bir ünite proteaz aktivitesi (U), 65 °C’de, pH 11’de gerçekleşen hidroliz reaksiyonu sonucu enzimin substrattan bir dakikada açığa çıkarttığı tirozinin μmol cinsinden miktarı olarak ifade edilmektedir.

3.2.2. Tirozin Standart Eğrisinin Hazırlanması

Proteaz aktivitesinin hesaplanmasında; tirozin standart eğrisinin oluşturulması amacıyla Glisin NaOH (pH 11, 50 mM) tamponu ile 1,1 mM L- tirozin konsantrasyonuna sahip stok çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan bu stok çözeltiden 0,05, 0,1, 0,2, 0,4 ve 0,5 μM olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda örnekler alınarak üzerine 0,5 M Na_2CO_3 ’dan 1,25 ml eklendi ve karıştırıldı. Daha sonra 0,25 ml Folin-Ciocalteu’nun fenol (1:1 oranında seyreltilmiş) ilave edilerek 30 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi. Oluşan mavi renk 660 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçüldü. Elde edilen absorbans değerlerine karşı tirozin konsantrasyon eğrisi çizilerek elde edilen grafiğin eğimi hesaplandı.

3.2.3. Enzim Üretimi

Aktinomiset BSU-9 suşundan elde edilen proteazın özelliklerinin belirlenmesi amacıyla ilk olarak enzim üretimi yapıldı. Bu amaçla, proteaz üretimi için ilk olarak 50 ml falkon tüpü içerisinde 10 ml olarak hazırlanmış proteaz besiyerine BSU-9 suşundan ekim yapıldı ve falkon tüpleri 30 °C’de 150 rpm’de 3 gün inkübe edildi. İnkübasyon sonrası bu kültürden % 3 olacak şekilde 200 ml taze proteaz besiyerisi bulunan bir litrelik erlen içerisine inokülasyon yapıldı ve 30 °C’de 150 rpm’de 3 gün inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kültür 6000 rpm’de 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant ham enzim olarak adlandırıldı ve deneylerde kullanıldı. Ayrıca elde edilen bu enzimin kısmi olarak saflaştırılması yapılarak molekül ağırlığının belirlenmesi için SDS-PAGE ve zimogram analizleri de gerçekleştirildi.

3.3. Enzimin Karakterizasyonu

3.3.1. Optimum pH ve Sıcaklık Belirlenmesi

Proteazın optimum pH değerin belirlenmesi amacıyla, pH 8 için 50 mM Tris-HCl tamponu, pH 9 ve 13 için 50 mM Glisin-NaOH tamponlarında % 0,65'lik (w/v) konsantrasyonda kazein substratı hazırlandı. Enzim aktivite çalışmaları 60 °C'de yapıldı. Negatif kontrolde enzim yerine saf su kullanıldı.

Proteazın sıcaklık aktivitesinin belirlenmesi amacıyla; enzim uygun tampon ile hazırlanan % 0,65'lik (w/v) kazein substratı ile 30-100 °C'de değişen sıcaklıklarda 15 dakika inkübe edildi ve enzim aktivitesi ölçüldü. Negatif kontrolde enzim yerine saf su kullanıldı. Aktivite çalışması bölüm 3.2.1'de belirtildiği gibi yapıldı.

En yüksek proteaz aktivitesinin görüldüğü pH ve sıcaklık değerleri 100 olarak kabul edildi ve enzim aktiviteleri oransal olarak kalan aktivite olarak belirlendi. Daha sonraki çalışmalarda, yüksek proteaz aktivitesinin görüldüğü pH ve sıcaklık değerleri kullanıldı.

3.3.2. pH ve Sıcaklık Stabilitesinin Belirlenmesi

pH stabilitesinin belirlenmesi için enzim 1:1 oranında uygun tampon ile karıştırıldı. Bu karışım oda sıcaklığında 60 dakika, 55 ve 65 °C'de 60 dakika ile +4 °C'de 24 saat ön inkübasyona bırakıldı. Enzimin aktivite çalışmaları bölüm 3.2.1'de anlatılan yöntem kullanılarak optimum sıcaklık değerinde hesaplandı. Pozitif kontrolde ön inkübasyona bırakılmamış enzim, negatif kontrolde saf su ve tampon kullanıldı.

Sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi amacıyla ham enzimin yüksek aktivite gösteren sıcaklıklardaki ham enzim 15, 30, 45, 60, 75 ve 90 dakika ön inkübasyona bırakıldı. Ön inkübasyon sonrası optimum aktivite sıcaklığında aktivite ölçümü yapıldı. Negatif kontrolde enzim yerine saf su, pozitif kontrolde ön inkübasyona bırakılmamış ham enzim kullanıldı. Aktivite çalışmaları bölüm 3.2.1'deki yöntemle

göre yapıldı. Ön inkübasyona tabi tutulmayan proteazın aktivitesi 100 olarak kabul edildi ve muamele görmüş enzimlerin aktiviteleri oransal olarak kalan aktivite olarak belirlendi.

3.3.3. İnhibitörlerin Proteaz Üzerine Etkisi

Proteazın katalitik etkisini gösterdiği aktif bölgesinin belirlenmesi için enzim örneklerinin son konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde DTT, EDTA ve PMSF'nin proteaz inhibitörleri ilave edilerek bir saat oda sıcaklığında ön inkübasyona maruz bırakıldı. Aktivite çalışmaları bölüm 3.2.1'deki gibi yapıldı.

Kontrol olarak muamele görmeyen proteaza ait aktivite 100 olarak kabul edildi ve muamele görmüş enzimlerin aktiviteleri oransal olarak kalan aktivite olarak hesaplandı.

3.3.4. Metal İyonlarının Proteaz Üzerine Etkisi

Metal iyonlarının proteaza etkisinin belirlenmesi için enzim örneklerinin son konsantrasyonu 5 mM olacak şekilde CaCl_2 , CuCl_2 , MnCl_2 , MgCl_2 , NaCl , HgCl_2 ve ZnCl_2 metal iyonları ilave edilerek oda sıcaklığında, 65 °C'de bir saat ön inkübasyona bırakıldı. Aktivite çalışması bölüm 3.2.1'de belirtildiği yapıldı.

Kör, metal iyonu ve saf su ile hazırlandı. Metal ile muamele edilmemiş enziminin aktivitesi 100 olarak kabul edildi, muamele edilen enzimlerin aktivitesi oransal olarak kalan aktivite olarak hesaplandı.

3.3.5. Organik Çözücülerin Proteaz Üzerine Etkisi

Proteaz üzerine organik çözücülerin etkisinin belirlenmesi amacıyla 2-propanol, aseton, etanol, DMSO ve metanol çözücülerinin proteaz ile % 10 oranında olacak şekilde muamele edildi ve bir saat oda sıcaklığında ön inkübasyona maruz bırakıldı. Kör her bir çözücü için ayrı ayrı hazırlandı ve kontrolde enzim ile saf su kullanıldı.

Aktivite çalışması bölüm 3.2.1’de belirtilen şekilde yapıldı. Organik çözücüler ile muamele edilmemiş enzim örneğinin aktivitesi 100 olarak kabul edildi, muamele edilen örneklerin aktivitesi oransal olarak kalan aktivite olarak hesaplandı.

3.3.6. Hidrojen Peroksit, Deterjan ve Denatüranların Proteaz Üzerine Etkisi

Proteaz üzerine hidrojen peroksit, deterjan ve denatüranların etkilerinin belirlenmesi amacıyla enzim solüsyonuna son konsantrasyon % 1 (v/v) olacak şekilde Tween 20, Tween-80, Triton X-100 ve SDS ile % 5 olacak şekilde H₂O₂ ile karıştırılarak oda sıcaklığında, 65 °C’de 1 saat ön inkübasyona maruz bırakıldı. Kör hidrojen peroksit, deterjan ve denatüranlar için ayrı ayrı hazırlandı. Aktivite çalışması bölüm 3.2.1’de belirtildiği gibi yapıldı.

Deterjan, denatüran ve hidrojen peroksit ile muamele edilmemiş enzimin aktivitesi 100 olarak kabul edildi, muamele edilen enzimlerin aktivitesi oransal olarak kalan aktivite olarak hesaplandı.

3.4. Proteazın Saflaştırılması

BSU-9 suşu 30 °C’de 150 rpm’de 3 gün inkübe edildi. İnkübasyon sonrası aktive edilen bu kültürden 1 litre erlen içerisinde 250 ml bulunan proteaz besiyerine %3 olacak şekilde inokülasyon yapıldı ve 30 °C’de 150 rpm’de 3 gün inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 6000 rpm’de 30 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant saflaştırma için kullanıldı.

3.4.1. Amonyum Sülfat ile Çöktürme

Süpernatanttaki proteazın konsantre edilmesi için % 40, 50, 60, 70 ve 80 doyumlukta amonyum sülfat ile çöktürme gerçekleştirildi. Elde edilen süpernatantı içeren beher, manyetik karıştırıcı üzerinde buzdolabına yerleştirildi. Süpernatanta eklenecek olan amonyum sülfat sürekli karıştırılarak yavaş yavaş ortama bırakıldı. Amonyum sülfat ilavesi bittikten sonra, yaklaşık 60 dakika daha karıştırmaya devam

edildi. Her doygunluk sonrası 6000 rpm'de 20 dakika +4 °C'de santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası elde edilen pellet steril dH₂O'da çözüldü ve aktivite çalışmaları bölüm 3.2.1'de belirtildiği gibi yapıldı.

3.4.2. Diyaliz

Bu işlem için diyaliz membranı (10000 Da cut off) % 2 NaHCO₃ ve % 0,05 EDTA'lı solüsyon içine bırakıldı ve 10 dakika kaynatıldı, steril saf su ile tekrar 10 dakika daha kaynatıldı. Bu işlem 2 kez tekrarlandı. Amonyum sülfat ile % 60 çöktürme sonucu elde edilen örnek diyaliz membranı kullanılarak saf suya karşı +4 °C'de gece boyu diyaliz edildi. Diyaliz işlemi sonrası örneğin aktivite çalışması bölüm 3.2.1'de belirtildiği gibi yapıldı.

3.4.3. Jel Filtrasyonu

Jel filtrasyon kromatografisi için 27 cm uzunluğunda 2,5 cm çapında cam kolon içine Sephadex G-50 maddesi dolduruldu. Kolon dH₂O ile yıkanarak örnek yüklemeye hazır hale getirildi. Doldurulan kolonun üst yüzeyine 2 ml diyaliz örneği yüklendi. Akış hızı peristaltik pompa yardımı ile 1 ml/dk olacak şekilde ayarlandı ve dH₂O elüsyon olarak kullanıldı. Elde edilen fraksiyonlar yaklaşık 1 ml olacak şekilde ependorf tüplerine alındı. Daha sonra fraksiyonların proteaz aktivitesi bölüm 3.2.1'de belirtildiği gibi ölçüm yapıldı. Ölçüm sonuçlarında pik veren fraksiyonlar birleştirilip, SDS-PAGE analizi için hazırlandı.

3.5. SDS-PAGE ve Zimogram Analizi

SDS-PAGE yöntemi saflaştırma basamakları sırasında alınan örneklerin molekül ağırlıklarının belirlenmesi için kullanıldı.

Kısmi saflaştırma işleminden elde edilen proteinler % 0,1 jelatin içeren % 10'luk SDS-PAGE (Laemmli, 1970) ile analizi yapıldı. Enzim örnek yükleme boyası ile karıştırılarak, 5 dakika kaynatıldı. Zimogram analizde kullanılan örnek yükleme

boyası içine β -merkaptoetanol ilave edilmedi. Ayrıca zimogram için hazırlanan örnekler kaynatma işlemi uygulanmadı.

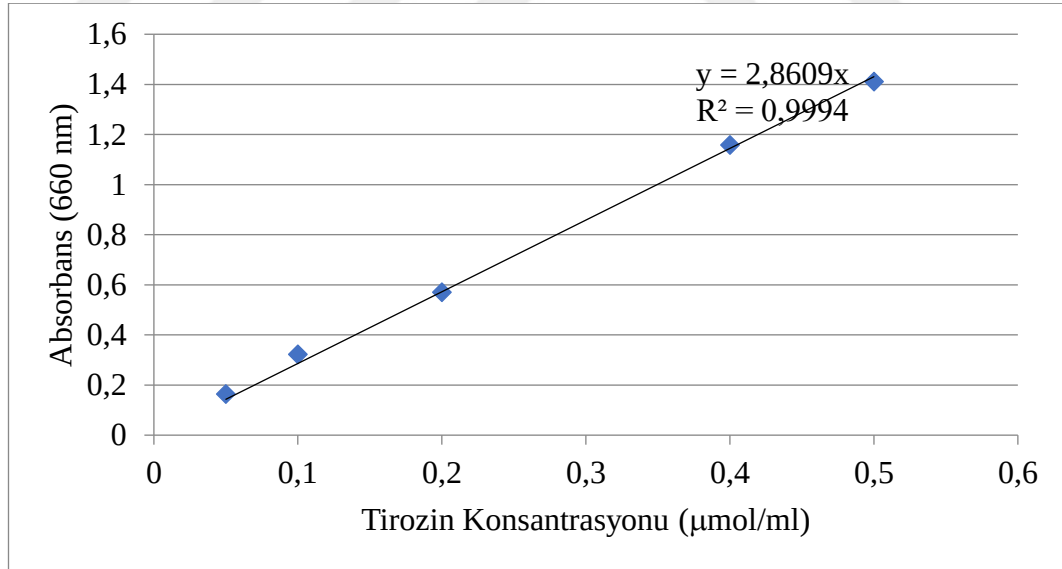
Hazırlanan örnekler jele yüklendi. Yükleme işlemi ardından proteinler önce 50 V'da daha sonra 100 V'de yürütüldü.

Yürütme işleminden sonra jel iki kısma ayrıldı. Marker içeren kısım coomassie brilliant blue R-250 boyası ile yaklaşık 2,5 saat boyandı. Boyama işlemi sonrası yıkama 1 solüsyonunda yaklaşık 6-8 saat bekletildi. Jel yıkama 2 solüsyonuna alınarak değerlendirildi. Jelin diğer kısmı % 2,5'lik Triton X-100'de 1 saat bekletildikten sonra pH 8 tamponu içinde oda sıcaklığında yaklaşık 12 saat bekletildi. İnkübasyon sonrası coomassie brilliant blue R-250 ile yaklaşık 2,5 saat boyama işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra yıkama 1 solüsyonuna alınarak yaklaşık 2 saat bekletildi. Beyaz bantların görünmesi proteaz için pozitif olarak değerlendirildi ve fotoğraflandı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Proteaz Üretimi ve Aktivitesi

Ekstraselüler proteaz üretmek için aktinomiset BSU-9 izolatı 200 ml proteaz besiyerine ekildi ve 30 °C’de 3 gün 150 rpm’de çoğaltıldı. İnkübasyon sonrası elde edilen süpernatanttaki proteaz aktivitesi bölüm 3.2.1’de anlatılan yöntemle ölçüldü. Tirozin standart grafiği elde edilen sonuçlara göre çizildi ve doğrunun eğimi proteaz aktivite hesaplama çalışmalarında kullanıldı (Şekil 4.3). Aktinomiset BSU-9 izolatından elde edilen ham enzimin 60 °C’deki aktivitesi 2,35 U/ml/dak olarak hesaplandı.

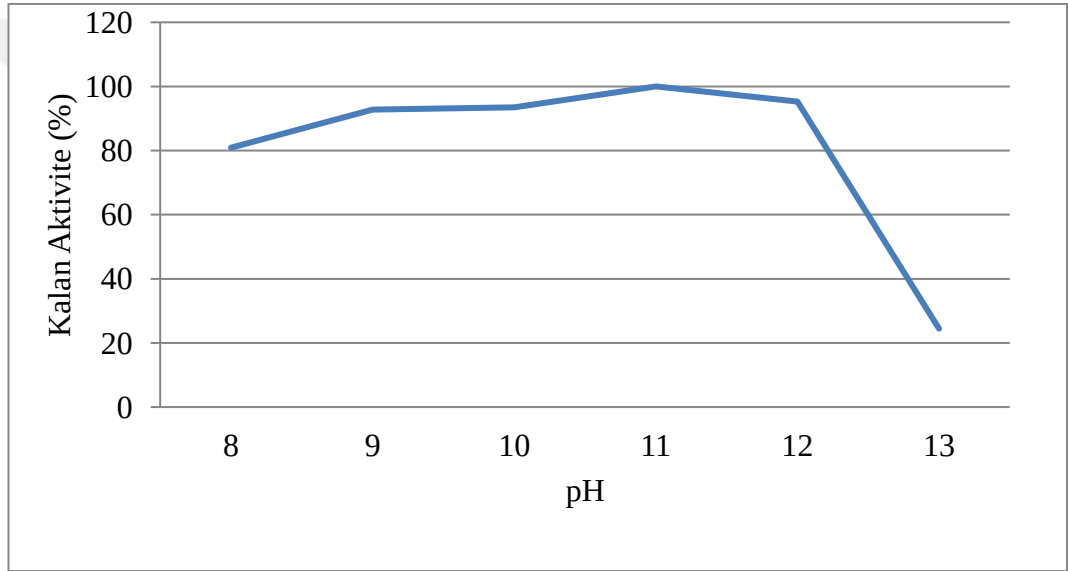


Şekil 4.1. Tirozin standart grafiği

4.2. Enzimin Karakterizasyonu

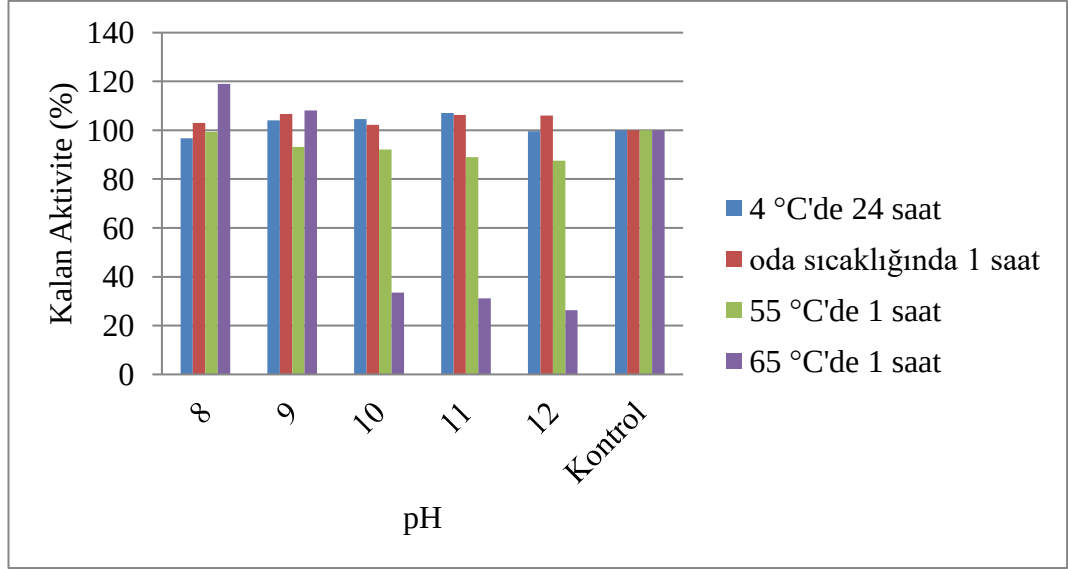
4.2.1. Optimum pH ve Stabilite

Aktinomiset BSU-9 suşundan elde edilen proteazın optimum pH'sını tespit etmek için farklı pH değerlerindeki Tris-HCl (pH 8, 50 mM) ve Glisin-NaOH (pH 9-13, 50 mM) tampon çözeltileri kullanıldı. Enzimin aktivite gösterdiği pH değerleri şekil 4.2'de verilmiştir. Proteazın optimum aktivite gösterdiği pH değeri 11 olarak bulundu.



Şekil 4.2. Aktinomiset BSU-9 suşundan elde edilen ham enzime farklı pH'ların etkileri.

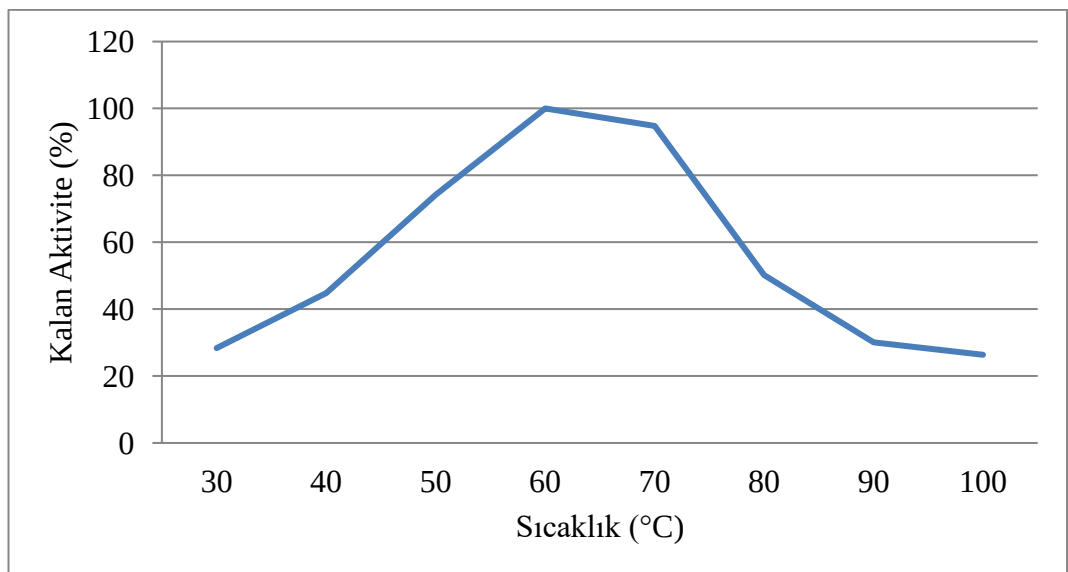
Proteazın pH stabilitesini belirlemek için farklı sıcaklıklarda ve farklı inkübasyon sürelerinde aktivite çalışmaları yapıldı. Deney sonuçları şekil 4.3'de verilmektedir. Farklı pH'larda stabilite çalışmalarında 55 °C'de enzimin kalan aktivitesi % 80 üzerinde bulundu.



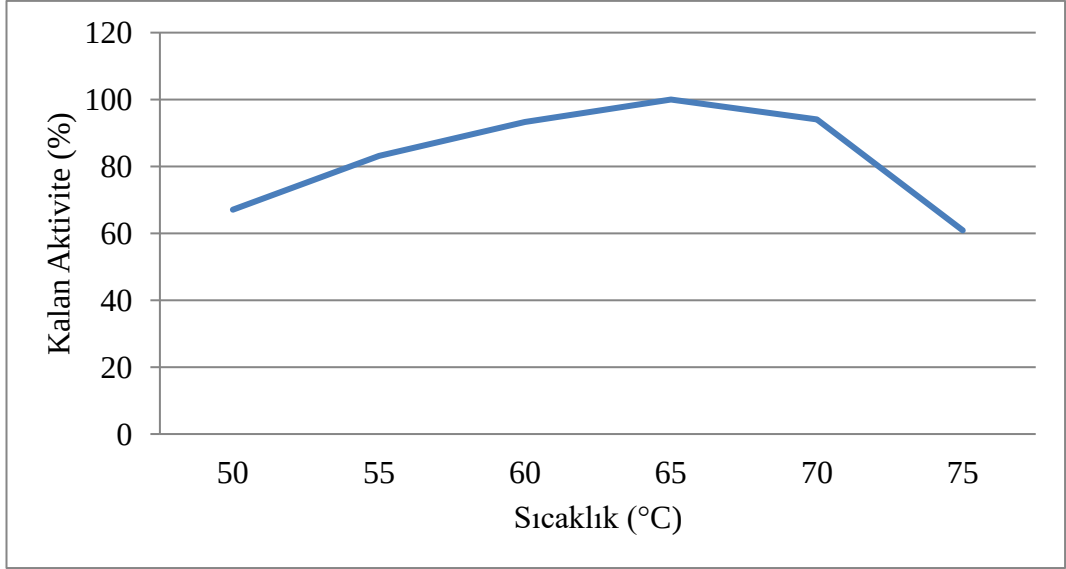
Şekil 4.3. Aktinomiset BSU-9 suşundan elde edilen ham enzimin farklı sıcaklık ve farklı inkübasyon sürelerinde pH stabilite değerleri.

4.2.2. Optimum Sıcaklık ve Stabilite

Proteazın optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla enzim, 30-100 °C arasındaki sıcaklıklarda aktivitesine bakıldı. Aktinomiset BSU-9 suşundan elde edilen proteazın optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla 30°C ile 100°C arasındaki sıcaklıklar kullanıldı. Elde edilen sonuçlar şekil 4.4 ve 4.5'te gösterildi. Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık 65 °C olarak tespit edildi.

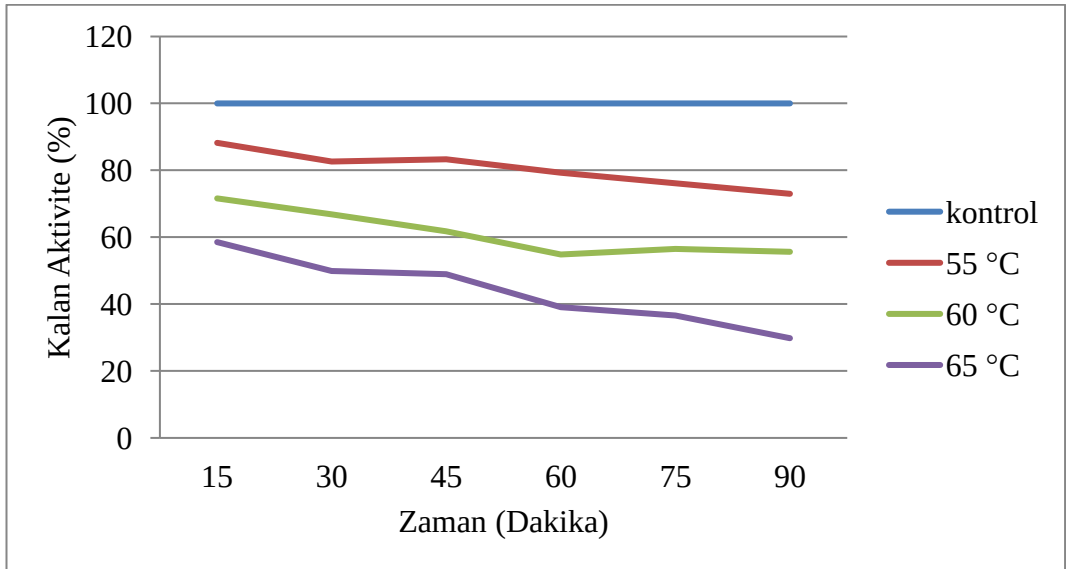


Şekil 4.4. Aktinomiset BSU-9 suşundan elde edilen ham enzim üzerine farklı sıcaklıkların etkileri.



Şekil 4.5. Aktinomiset BSU-9 suşundan elde edilen ham enzim üzerine farklı sıcaklıkların etkileri.

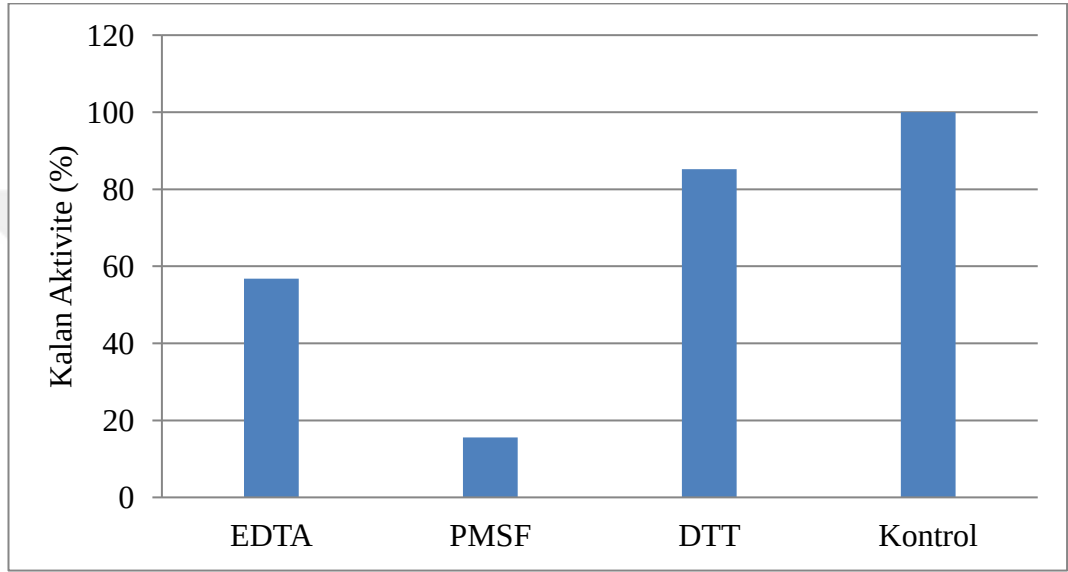
Proteazın yüksek aktivite gösterdiği 55, 60 ve 65 °C'deki sıcaklıklarda stabilite çalışmaları yapıldı (Şekil 4.6). Proteazın 55 °C'deki 45 dakika ön inkübasyon sonrası kalan aktivitesi yaklaşık % 83 oranında korunduğu bulunurken, 65 °C'de yaklaşık % 48 oranında korunduğu saptandı.



Şekil 4.6. Aktinomiset BSU-9 suşundan elde edilen ham enzim üzerine farklı sıcaklıkların stabilite değerleri.

4.2.3. İnhibitörlerin Proteaz Üzerine Etkisi

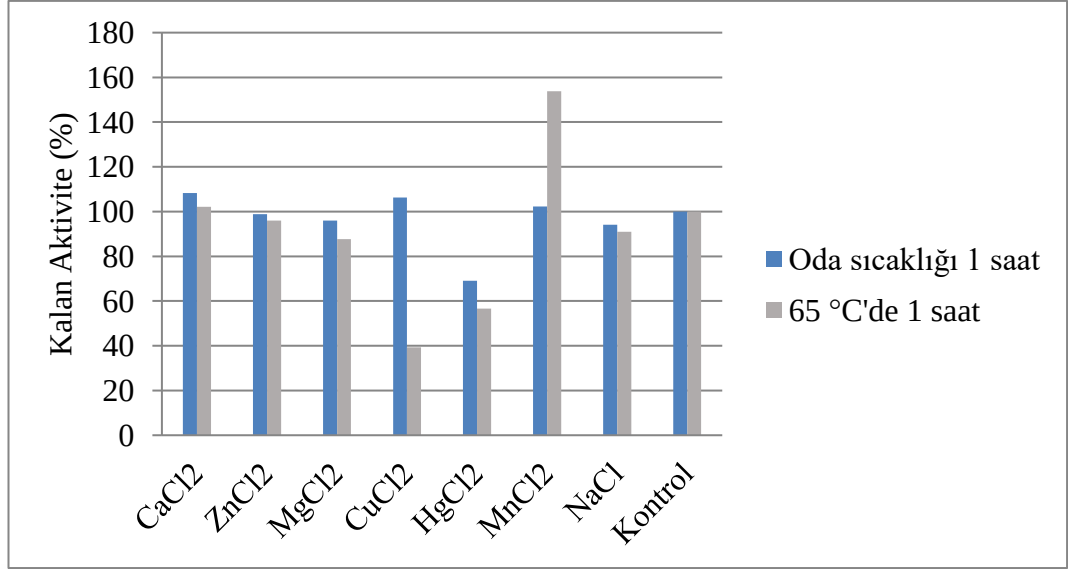
Proteaz aktivitesi üzerine bazı inhibitörlerinin etkisini belirlemek amacı ile PMSF, EDTA ve DTT kullanılmıştır. PMSF varlığında enzim aktivitesi büyük oranda kaybolmuştur. EDTA varlığında enzim aktivitesi yaklaşık % 44 oranında azalmıştır (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Aktinomiset BSU-9 suşundan elde edilen ham enzim üzerine inhibitörlerin etkileri.

4.2.4. Metal İyonlarının Proteaz Üzerine Etkisi

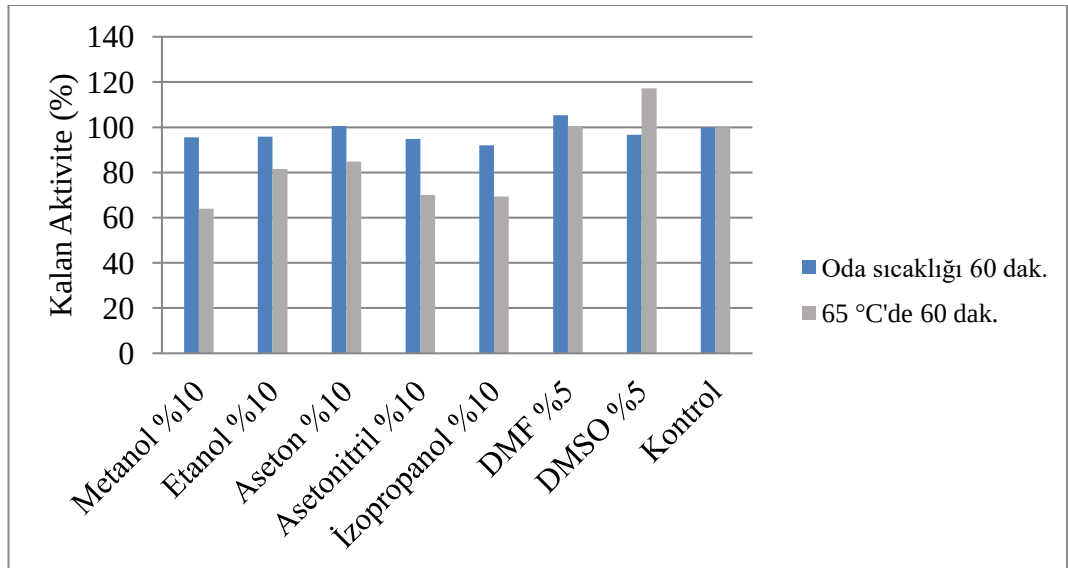
Proteaz aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisini belirlemek için CuCl_2 , MgCl_2 , MnCl_2 , CaCl_2 , NaCl , ZnCl_2 ve HgCl_2 iyonları kullanıldı. Proteazın son konsantrasyonu 5 mM olacak şekilde ilave edilen metal iyonlarının etkisi incelendi. Elde edilen veriler Şekil 4.8’te verilmiştir. 65 °C’de bir saat ön inkübasyon sonrası CuCl_2 varlığında enzim aktivitesi yaklaşık % 61 oranında azalırken, MnCl_2 varlığında ise enzim aktivitesi yaklaşık % 53 oranında artmıştır.



Şekil 4.8. Aktinomiset BSU-9 suşundan elde edilen ham enzim üzerine metal iyonlarının etkileri.

4.2.5. Organik Çözücülerin Proteaz Üzerine Etkisi

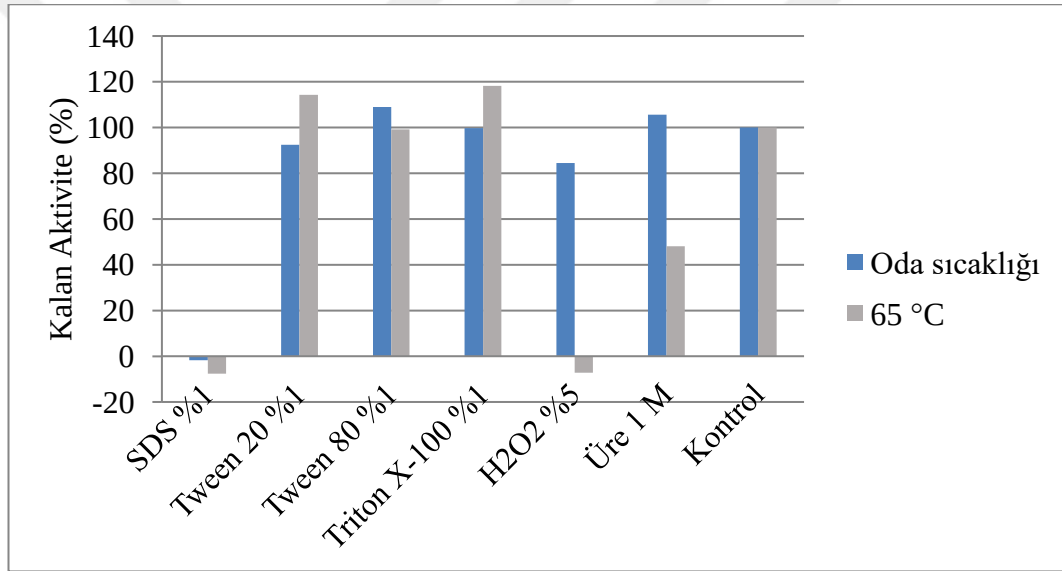
Proteaz üzerine organik çözücülerin etkisi Şekil 4.9'ta verilmektedir. Metanol, asetonitril ve izopropanol varlığında 65 °C'de 1 saat ön inkübasyon sonrası enzim aktivitesi yaklaşık % 30-37 oranında azalmıştır. DMSO varlığında 65 °C'de 1 saat ön inkübasyon sonrası enzim aktivitesinde bir miktar artış gözlemlendi.



Şekil 4.9. Aktinomiset BSU-9 suşundan elde edilen ham enzim üzerine organik çözücülerin etkileri.

4.2.6. Hidrojen Peroksit, Çeşitli Deterjan ve Denatüranların Proteaz Üzerine Etkisi

Bu çalışmada proteaz üzerinde etkilerini belirlemek için % 1-5'lik konsantrasyonlarda SDS, Tween 20, Tween-80, Triton X-100 ve H₂O₂ (v/v) kullanıldı. Ayrıca 1 M ürenin proteaz üzerindeki etkisi araştırıldı. Proteaz üzerine hidrojen peroksit, deterjan ve denatüranların etkisi Şekil 4.10'da verilmektedir. Oda sıcaklığında bir saat ön inkübasyon sonrası % 5'lik H₂O₂ varlığında az miktarda kayıp gözlenirken, Tween 80 ve üre varlığında bir miktar artış gözlemlendi (Şekil 4.10).



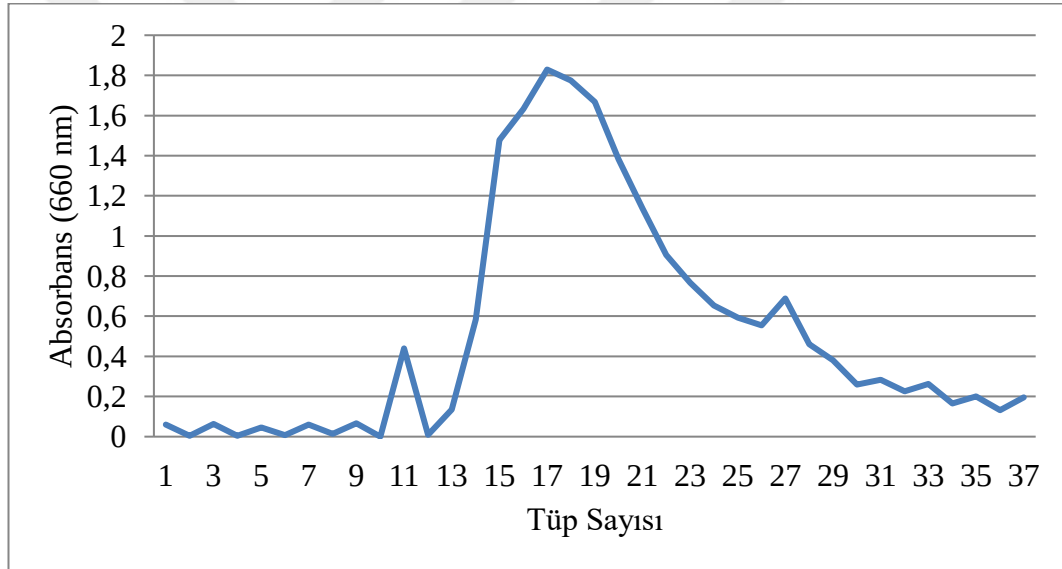
Şekil 4.10. Aktinomiset BSU-9 suşundan elde edilen ham enzim üzerine hidrojen peroksit, çeşitli deterjan ve denatüranların etkileri.

4.3. Proteazın Saflaştırılması

Aktinomiset BSU-9'dan proteaz saflaştırılmasında amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Amonyum sülfat çöktürmesi sonrası diyaliz edilen örnek jel filtrasyonuna tabi tutuldu.

4.3.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Jel Filtrasyonu

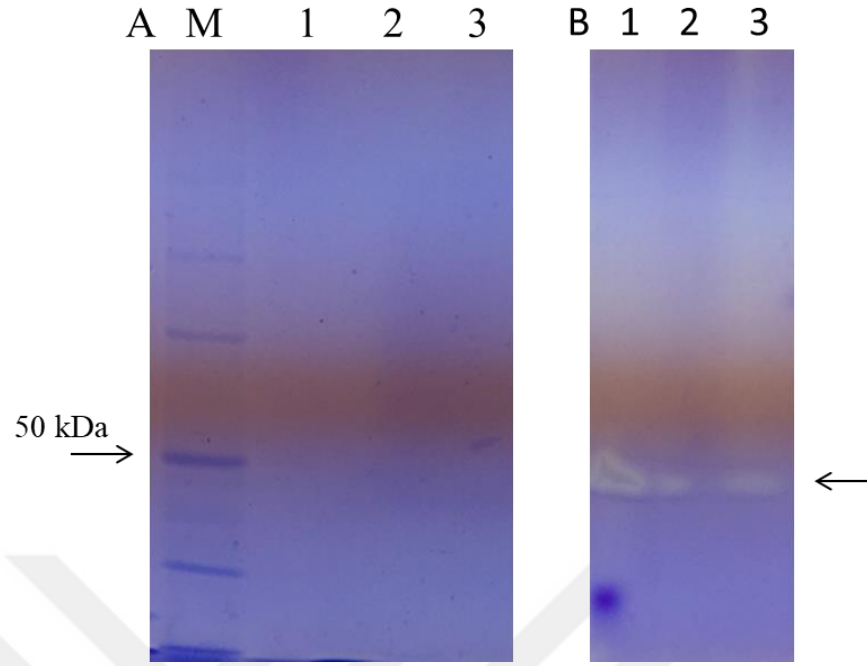
Ekstraselüler proteazın kısmi olarak saflaştırma işleminde amonyum sülfat çöktürmesinde en yüksek enzim aktivitesi % 60 doygunlukta elde edildi ve enzim aktivite değeri 9,85 U/ml olarak bulundu. Amonyum sülfat ile çöktürme ile elde edilen % 60 doygunlukta örnek, saf suya karşı +4 °C’de gece boyu diyaliz edildi. Diyaliz sonrası elde edilen örneğin enzim aktivite değeri 8,47 U/ml olarak belirlendi. Diyaliz örneğine jel filtrasyonu kromatografisi yapıldı. Kromatografi süresince toplamda 37 fraksiyon elde edildi ve 660 nm’de absorbans değerleri şekil 4.11’de verildi. Absorbans ölçümü sonucu 15 ve 21. fraksiyonlar arasında en yüksek enzim değerleri elde edildi. Bu fraksiyonlar bir araya getirildi ve ultrafiltrasyon yapıldı.



Şekil 4.11. Aktinomiset BSU-9’den izole edilen proteazın, jel filtrasyon kromatografi kolonundan elde edilen enzim absorbans değerleri.

4.3.2. SDS-PAGE ve Zimogram Analizi

Aktinomiset BSU-9’den elde edilen proteazın, % 60 doygunlukta amonyum sülfat, diyaliz ve jel filtrasyon örnekleri SDS-PAGE ve zimogram analizlerinde kullanıldı ve şekil 4.12 görüntüsü elde edildi. SDS-PAGE çalışmalarında enzime ait bant tespit edilemedi ancak zimogram analizde yaklaşık 45 kDa civarında tek bir aktivite bantı tespit edildi.



Şekil 4.12. SDS-PAGE ve zimogram sonuçları. M: marker, 1:Diyaliz örneği, 2: Jel Filtrasyon örneği, 3: Amonyum sülfat örneği.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmada FEN-BAP-A-140316-52 nolu proje kapsamında izole edilen ve proteaz üretme yeteneğine sahip aktinomiset BSU-9 suşu kullanıldı. Aktinomiset BSU-9 izolatından elde edilen proteazın karakterizasyonu amacıyla optimum pH ve sıcaklık değerlerinin tespit edilmesi, pH ve sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi, inhibitörlerin, metal iyonlarının, organik çözücülerin, hidrojen peroksit, deterjan ve denatüranların proteaz enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Ayrıca proteaz kısmi saflaştırılması yapılarak zimogram analizi yapılmıştır.

Bu tez çalışmasında elde edilen proteazın alkali pH 8-13 aralığında aktivite gösterdiği ve optimum aktivitesinin pH 11 olduğu saptandı. Alkali proteazlar genel olarak pH 9-11 değerleri arasında optimal aktivite göstermektedirler (Kumar ve Takagi, 1999; Sharma ve ark., 2019). Deterjan endüstrisinde en çok alkali pH aralığında proteaz kullanılmaktadır (Gupta ve ark., 2002b). Xu ve arkadaşları (2015) tarafından Antartik denizden izole ettikleri *Streptomyces* sp. XE-1'in proteaz aktivitesi üzerine yaptıkları araştırmada pH 5-10 arasında stabil olduğu, optimum pH'ın ise 8,2 değerinde olduğu saptandı. Suthindhiran ve arkadaşları (2014) tarafından, *Actinopolyspora* sp. VITSDK2'den saflaştırılan alkali proteazın optimum pH 10'da aktif olduğu ve pH 4-12 değerleri arasında stabil kaldığı belirlenmiştir. Rao ve arkadaşları (2008) tarafından, *Bacillus circulans*'dan izole ettikleri alkali proteazın pH 11'de optimum aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Naidu ve Devi (2005) tarafından yapılan çalışmada topraktan *Bacillus* suşları izole edilmiştir. İzole ettikleri K-30 suşundan alkali proteaz üretilmiş ve optimum pH değeri 9 olarak saptanmıştır. Shimogaki ve arkadaşlarının (1991) alkalofilik *Bacillus* türlerinden alkali proteaz eldesi çalışmasında, optimum pH değeri 10-12,5 arasında, pH kararlılığı ise 6,5-13 değerleri arasında olduğu belirlenmiştir. Adinarayana ve arkadaşları (2003) tarafından, *Bacillus subtilis* PE-11'den alkali serin proteaz saflaştırılmış ve optimum pH'ın 10 olduğu, pH kararlılığının ise 8-10 değerleri

arasında korunduğu saptanmıştır. Al-Dhabi ve arkadaşları (2019) tarafından, Suudi Arabistan topraklarından izole edilen *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-49 ile proteaz ve lipaz üzerine yapılan çalışmada prolitik enzim pH 9 değerinde maksimum olarak üretildiği bulunmuştur. El-Safey ve Abdul-Raouf (2004) tarafından, *Bacillus subtilis* bakterisinden izole edilen proteaz enziminin optimum pH değerinin 7 olduğu tespit edilmiştir. Das ve Prasad (2010) tarafından yapılan çalışmada, *Bacillus subtilis* bakterisinden izole edilen proteaz enziminin optimum pH değerinin 8 olduğu sonucuna varılmıştır.

Enzim karakterizasyonu için gerçekleştirilen çalışmalardan bir diğeri de sıcaklık değerinin belirlenmesidir. Bu çalışmada 30-100 °C’de değişen sıcaklıklarda enzim aktivitesi ölçüldü. Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığın 65 °C olduğu tespit edildi. Proteazın 65 °C ön inkübasyon koşullarında aktivitesini 45 dakika boyunca yaklaşık % 48 koruduğu saptandı. Literatürde de proteazların sıcaklıkla ilgili birçok çalışması bulunmaktadır. Suthindhiran ve arkadaşları (2014) tarafından, *Actinopolyspora* sp. VITSDK2’den izole edilen alkali proteazın optimum sıcaklığının 60 °C olduğu ve 25-80 °C değerleri arasında stabil kaldığı tespit edilmiştir. Rao ve arkadaşları (2008) tarafından yapılan çalışmada ise, *Bacillus circulans*’dan izole ettikleri alkali proteazın optimum sıcaklığı 70 °C olarak belirlenmiştir. Xu ve arkadaşları (2015) tarafından Antartik denizden izole edilen *Streptomyces* sp. XE-1’in proteaz üzerine yaptıkları araştırmada proteazın optimum sıcaklığı 55 °C olduğu tespit edilmiştir. Yum ve arkadaşları (1994) tarafından yapılan çalışmada kullandıkları *Streptomyces* sp. YSA-130 izolatından saflaştırdıkları alkali serin proteazının optimum sıcaklığı 60 °C olduğu belirlenmiştir ve 50 °C’de ise stabil kaldığı saptanmıştır.

Enzim karakterizasyonu için gerçekleştirilen çalışmalardan biri de inhibitörlerin proteaz üzerine etkisinin araştırılmasıdır. Proteaz üzerinde DTT, EDTA ve PMSF’nin proteaz inhibitörlerinin etkileri incelenmiştir. PMSF varlığında enzim aktivitesi büyük oranda kaybolurken EDTA varlığında enzim aktivitesi yaklaşık % 44 azalmıştır. PMSF varlığında enzimin inhibe olması enzimin serin proteaz ailesinden olduğunu düşündürmektedir. Suthindhiran ve arkadaşları (2014) tarafından yapılan

çalışmada, *Actinopolyspora* sp. VITSDK2 izolatından izole edilen proteazın PMSF ve DFP varlığında aktivitenin inhibe olduğu ve N-tosil-L-lizin klorometil keton varlığında ortadan kalktığı tespit edilmiştir. Kim ve arkadaşları (2006) tarafından, *Bacillus subtilis* TP-6'dan saflaştırılan fibronilitik subtilisin benzeri alkali proteaz enziminin 1 mM PMSF (% 53), 1 mM EDTA (% 36) ve % 10 β -merkaptetanolda (% 46) inhibe olduğu; %1 ve %10'luk etanol, metanol ve izopropanol varlığında ise enzimin kararlı olduğu bildirilmiştir. Yum ve arkadaşları (1994) tarafından *Streptomyces* sp. YSA-130 izolatından saflaştırılan alkali serin proteazının DFP, DTNB, iodoasetat, NEM, PMSF ve fenilglioksal varlığında enzim aktivitesini inhibe ettikleri saptanmıştır.

Metal iyonlarının proteaz üzerine etkisinin belirlenmesi için CaCl_2 , CuCl_2 , MnCl_2 , MgCl_2 , NaCl , HgCl_2 ve ZnCl_2 metal iyonları kullanıldı. 65°C 'de 1 saat ön inkübasyon sonrası CuCl_2 varlığında enzim aktivitesi yaklaşık % 61 azalırken, MnCl_2 varlığında ise enzim aktivitesi yaklaşık % 53 oranında artış göstermiştir. Alkali proteazlar, Ca^{2+} , Mg^{2+} ve Mn^{2+} gibi divalent metallere gereksinim duyarak bu metaller varlığında maksimum aktivite gösterirler (Sharma ve ark., 2019; Kumar ve Takagi, 1999). Das ve arkadaşları (2007) tarafından yapılan çalışmada balık pulu ve balık atıkları üzerinde büyüyen mutant *Aspergillus niger* AB100'den izole edilen proteaz enziminin metal testinde Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} ve Mn^{2+} ile aktivite olduğu Hg^{2+} varlığında ise inhibe olduğu saptanmıştır. Suthindhiran ve arkadaşları (2014) tarafından, *Actinopolyspora* sp. VITSDK2'den izole ettikleri proteazın enzim aktivitesi, Mn^{2+} , Mg^{2+} ve Ca^{2+} varlığında artarken Cu^{2+} varlığında azaldığı bildirilmiştir. Bejar ve arkadaşları (2008) tarafından yapılan çalışmada *Bacillus pumilis* CBS'den izole edilen alkali proteazın Ca^{+2} ve Mg^{+2} metalleri varlığında enzimin aktivitesini artırdığı, Mn^{2+} , Ba^{2+} , Cu^{2+} metallerinin varlığında nötr olarak etkilediği ve Hg^{2+} 'nin ise inhibe ettiği bildirilmiştir. Yang ve arkadaşları (2000b) tarafından *Bacillus subtilis* türünden proteaz üretimi ve saflaştırma çalışmalarında Mn^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} ve Co^{2+} iyonları varlığında enzim aktivitesi artış gösterirken, Hg^{2+} iyonu ile tamamen inhibe olduğu sonucuna varılmıştır. Adinarayana ve arkadaşları (2003) tarafından yapılan çalışmada, *Bacillus subtilis* PE-11'den saflaştırılan termostabil alkali serin proteazının Ca^{2+} , Mg^{2+} ve Mn^{2+} iyonları

varlığında yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Yum ve arkadaşları (1994) tarafından yapılan çalışmada *Streptomyces* sp. YSA-130 izolatından saflaştırılan alkali serin proteazının Ag^+ , Hg^{2+} ve Co^{2+} gibi metal iyonlarının güçlü bir şekilde proteazı inhibe ettiği anlaşılmıştır. Rao ve arkadaşları (2008) tarafından yapılan çalışmada, *Bacillus circulans*'dan izole edilen ve saflaştırılan alkali proteazın Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} ve Na^+ metallerinin enzim aktivitesini arttırdığı tespit edilmiştir.

Proteaz üzerine organik çözücülerin etkisinin belirlenmesi amacıyla 2-propanol, aseton, etanol, DMSO ve metanol çözücülerinin proteaz ile muamelesi sonucu enzim aktivitesine bakıldı. Metanol, asetonitril ve izopropanol varlığında 65 °C'de 1 saat ön inkübasyon sonrası enzim aktivitesi yaklaşık % 30-37 kaybolduğu tespit edilirken DMSO varlığında 65 °C'de 1 saat ön inkübasyon sonrası enzim aktivitesinde artış olduğu gözlemlendi. Thumar ve Singh (2009) tarafından alkali proteazın organik çözücü toleransı üzerine çalışma yapılmıştır. Tuza toleranslı bir alkalifilik aktinomiset olan *Streptomyces* sp. Mit-1, ksilen, etanol, aseton, butanol, benzen gibi bir dizi organik çözücü varlığında alkali proteazı tolere edebildiği ve üretebildiği; etanol ve benzenin enzimin katalizini olumsuz etkilediği tespit edilmiştir.

Proteaz üzerine etkilerini belirlemek için hidrojen peroksit, Tween 20, Tween-80, Triton X-100 ve SDS ajanları kullanıldı. Oda sıcaklığında 1 saat ön inkübasyon sonrası % 5'lik H_2O_2 varlığında azalma gözlenirken Tween 80 ve üre varlığında artış gözlemlendi. Bejar ve arkadaşları (2008) tarafından yapılan çalışmada *Bacillus pumilis* CBS'den izole edilen alkali proteaz enziminin % 5 Tween-80, % 1 SDS, % 15 üre ve % 10 H_2O_2 varlığında 40 °C'de 24 saat sonra aktivitesini koruduğu sonucuna varılmıştır. Rao ve arkadaşlarının (2008) tarafından yapılan çalışmada, *Bacillus circulans*'dan izole ettikleri alkali proteazın % 1 Triton-X-100 varlığında % 15 ve Tween-20 varlığında % 20 aktivitesini arttırdığı, % 1 SDS varlığında aktivitesinin % 75'ini koruduğu ve % 1 H_2O_2 varlığında inhibe olduğu sonucuna varılmıştır.

Proteaz enziminin saflaştırması sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve jel filtrasyon işlemleriyle yapılmıştır. Zimogram analizi sonucuna göre beyaz bantların

görünmesi proteaz enzimi için pozitif olarak değerlendirildi. SDS-PAGE çalışmalarında enzime ait bant tespit edilememiştir ancak zimogram analizinde yaklaşık 45 kDa civarında tek bir aktivite bantı görülmektedir. Ilmiah ve arkadaşları (2018) tarafından *Bacillus licheniformis* F11.1'den üretilen proteaz üzerine çalışmalar yapılmıştır. Çalışmalarında örneklerdeki protein miktarı 595 nm'de Bradford yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Bradford, 1976). SDS-PAGE ve zimogram kullanılarak moleküler ağırlığı 32,90-35,16 kDa olduğu tespit edilmiştir. Thu ve arkadaşları (2019) tarafından serin proteazının fibrinolitik aktiveleri üzerine çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmada karides kabuğundan izole edilen *Bacillus subtilis* C10 suşundan serin proteaz amonyum sülfat çöktürmesi ile kısmen saflaştırılmış zimogram analizi ile moleküler ağırlıkları yaklaşık 69, 67, 39 ve 36 kDa olan dört fibrinolitik enzim varlığı gösterilmiştir. Kim ve arkadaşları (2006) tarafından yapılan çalışmada, *Bacillus subtilis* TP-6'dan izole edilen fibrinolitik subtilisin benzeri alkali proteaz enziminin amonyum sülfat, Octyl Sepharose, SP Sepharoz tekniklerini ile % 26 verimle 200 kat saflaştırılmış ve molekül kütlesi SDS-PAGE ile 29 kDa olduğu saptanmıştır. Suthindhiran ve arkadaşları (2014) tarafından yapılan çalışmada, halofilik tür olan *Actinopolyspora* sp. VITSDK2'dan izole edilen alkali proteazın, saflaştırma işlemi sonrası yapılan SDS-PAGE analizi sonucu 22 kDa moleküler ağırlığında olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak yapılan çalışmada BSU-9 suşundan ekstrasellüler proteaz üretimi gerçekleştirildi. Aktinomiset BSU-9'dan elde edilen proteazın pH 8-13 aralığında geniş bir stabilite gösterirken optimum pH'ı 11 olarak belirlendi. Enzimin 65 °C'de maksimum aktivite gösterdiği tespit edildi. Çalışılan proteazın 65 °C'de 45 dakikada yaklaşık % 48 aktivitesini koruduğu saptandı. PMSF varlığında enzim aktivitesi azalmıştır. EDTA varlığında enzim aktivitesinde yaklaşık % 44 azalma tespit edilmiştir. 65 °C 'de 1 saat sonunda CuCl₂ varlığında enzim aktivitesi yaklaşık % 61 azalırken MnCl₂ varlığında ise enzim aktivitesi yaklaşık % 53 artış göstermiştir. 65 °C'de 1 saat sonra metanol, asetonitril ve izopropanol varlığında enzim aktivitesi yaklaşık % 30-37 azaldığı gözlenirken DMSO varlığında artış olduğu gözlemlendi. Enzimin aktivitesinde 65 °C'de Triton X-100 ve Tween 20'de artış olduğu saptandı. Aktinomiset BSU-9'dan proteaz saflaştırılmasında amonyum sülfat çöktürmesi

yapıldı. Amonyum sülfat çöktürmesi sonrası diyaliz edilen örnek jel filtrasyonuna tabi tutuldu. Zimogram analizinde yaklaşık 45 kDa civarında tek bir aktivite bantı saptandı.



KAYNAKLAR

- Adegboye, M.F., Babalola, O.O. 2012. Taxonomy and ecology of antibiotic producing actinomycetes. *African Journal of Agricultural Research*, 7(15): 2255-2261. Doi: 10.5897/AJARX11.071
- Adinarayana, K., Ellaiah, P., Prasad, D. S. 2003. Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* pe-11. *An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, 4(4):1-9. Doi: 10.1208/pt040456
- Aehle, W. 2004. *Enzymes In Industry Production and Application*. Wiley Vch Verlag, Weinheim, 484s. Doi: 10.1002/anie.200385162
- Al-Dhabi, N.A., Esmail, G.A., Ghilan A.M., Arasu, M.V. 2020. Isolation and screening of *Streptomyces* sp. al-dhabi-49 from the environment of saudi arabia with concomitant production of lipase and protease in submerged fermentation. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(1):474-479. Doi: 10.1016/j.sjbs.2019.11.011
- Anbu, P. 2013. Characterization of solvent stable extracellular protease from *Bacillus koreensis* (BK-P21A). 2013. *International Journal of Biological Macromolecules*, 56:162-168. Doi:10.1016/j.ijbiomac
- Anderson, A.S., Wellington, M.H.E. 2001. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(3):797-814. Doi: 10.1099/00207713-51-3-797
- Arifuzzaman, M., Khatun, M.R., Rahman, H. 2010. Isolation and screening of actinomycetes from sundarabars soil for antibacterial activity. *African Journal of Biotechnology*, 9(29):4615-4619.
- Awad, H.M., El-Sayed, E.M., Saad, M.M., Selim, M.H., Hassan, H.M. 2013. Partial purification and characterization of extracellular protease from a halophilic and thermotolerant strain *Streptomyces pseudogrisiolus* nrc-15. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 50(4):305-11.
- Balagurunatha, R., Radhakrishnon, M., Somasundaram, S.T. 2010. L-Glutaminase producing actinomycetes from marine sediments-selective isolation, semiquantitative assay and characterization of potential strain. *Australian*

- Balasubramanian, T., Annamalai, N., Rajeswari, M.V., Thavasi, R., Vijayalakshmi, S. 2013. Optimization, purification and characterization of novel thermostable, haloalkaline, solvent stable protease from *B. halodurans* CAS6 using marine shellfish wastes: a potential additive for detergent and antioxidant synthesis. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36(7):873-83. Doi: 10.1007/s00449-012-0820-3.
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., Wezel, V., G. P. 2016. Taxonomy, physiology and natural products of actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1):1-43. Doi:10.1128/MMBR.00019-15
- Barrett, A.J. 1994. Classification of peptidases. *methods in enzymology*, 244:1-15. Doi: 10.1016/0076-6879(94)44003-4
- Barrett, A. J., McDonald, J. K. 1986. Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. *Biochemical Journal*, 237(3):935. Doi: 10.1042/bj2370935
- Bejar, S., Jaouadi, B., Ellouz-Chaabouni, S., Rhimi, M. 2008. Biochemical and molecular characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus pumilus* CBS with high catalytic efficiency. *Science Direct Biochimie*, 90(9):1291-1305. Doi: 10.1016/j.biochi.2008.03.004
- Benes, P., Vetvicka, V., Fusek, M. 2008. Cathepsin D- many functions of one aspartic protease. *Critical Reviews in Oncology and Hematology*, 68(1):12-28. Doi: 10.1016/j.critrevonc.2008.02.008
- Bollag, D.M., Rozycki, M.D., Edelstein, S.J. 1997. *Protein Methods*. 2. Baski, VileyLiss Press, USA, 414. Doi: 10.1002/(SICI)1097-0134(199705)28:13.0.CO;2-J
- Boominadhan, U., Rajakumar, R., Sivakumaar, P.K.V., Joe, M.M. 2009. Optimization of protease enzyme production using *Bacillus* sp. isolated from different wastes. *Botany Research International*, 2(2): 83-87.
- Böckle, B., Galunsky, B., Müller, R. 1995. Characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DSM 40530. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(10): 3705-10. Doi:10.1128/AEM.61.10.3705-3710.1995
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2):248-254. Doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Brandelli A, Daroit D.J., Riffel A. 2010. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(6):1735-50. Doi: 10.1007/s00253-009-2398-5

- Bredholt, H., Fjaervik, E., Johnsen, G., Zotchev, S. B. 2008. Actinomycetes from sediments in the trondneim fjord, norway: diversity and biological activity. *Marine Drugs*, 6(1):12-24. Doi: 10.3390/md6010012
- Campbell, N.A., Reece, J.B. 2008. *Biyoloji, Altıncı Baskıdan Çeviri*, Gündüz, E., Türkan, İ., Palme Yayıncılık, Ankara.
- Chaudhary, H.S., Soni, B., Shrivastava, A.R., Shrivastava, S. 2013. Diversity and versatility of actinomycetes and its role in antibiotic production. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3:83-94. Doi: 10.7324/JAPS.2013.38.S14
- Claessen, D., Van Dissel, D., Van Wezel, G.P. 2014. Morphogenesis of *Streptomyces* in submerged cultures. *Advances in Applied Microbiology*, 89:1–45. Doi:10.1016/B978-0-12-800259-9.00001-9
- Crawford, D. L., Lynch, J. M., Whipps, J. M., Ousley, M. A. 1993. Isolation and characterisation of actinomycetes antagonists of a fungal root pathogen. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(11):3899-3905. Doi: 10.1128/AEM.59.11.3899-3905.1993
- Cross, T., Goodfellow, M. 1973. Taxonomy and classification of the actinomycetes. *Society for Applied Bacteriology Symposium Series*, 2:11-112.
- Cupp-Enyard, C. 2008. Sigma's non-specific protease activity assay-casein as a substrate. *Journal of Visualized Experiments*, 19:899. Doi:10.3791/899
- Çalık, P. 1998. Serin alkali proteaz üretimi için biyoproses geliştirilmesi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- Çırakoğlu, B. 2009. *Biyoteknolojideki Gelişmelerin Temel Prensipleri Ve Sanayiye Uygulamaları*. İzmir, 176-324.
- Das, G., Prasad, M.P. 2010. Isolation, purification & mass production of protease enzyme from *Bacillus subtilis*. *International Research Journals of Microbiology*, 1(2):026-031.
- Das, M., Basu, B.R., Banik, A.K. 2007. Production and characterization of extracellular protease of mutant *Aspergillus niger* AB100 grown on fish scale. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(4):449-455. Doi:10.1007/s11274-007-9492-6
- Das, S., Lyla, P.S., Khan, S.A. 2008. Distribution and generic composition of culturable marine actinomycetes from the sediments of Indian continental slope of bay of Bengal. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 26(2):166-177. Doi:10.1007/s00343-008-0166-5
- De Azeredo, L.A., Castilho, L.R., Leite, S.G., Coelho, R.R.R., Freire, D.M.G. 2003. Protease production by *Streptomyces* sp. isolated from Brazilian cerrado soil: optimization of culture medium employing statistical experimental design. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 108:749-55.

Doi:10.1385/abab:108:1-3:749

- De Azeredo, L.A.I., Leite, S.G., Freire, D.M.G., Benchetrit, L.C., Coelho, R.R.R. 2001. Proteases from actinomycetes interfere in solid media plate assays of hyaluronidase activity. *Journal of Microbiological Methods*, 45(3):207-212. Doi:10.1016/S0167-7012(01)00251-2
- DeJong, P. 1972. L-Asparaginase production by *Streptomyces griseus*. *Applied Microbiology*, 23(6):1163-4. Doi:10.1128/AEM.23.6.1163-1164.1972
- Dougherty, W., Semler, B.L. 1993. Expression of virus encoded proteinases: functional and structural similarities with cellular enzymes. *Microbiological Reviews*, 57(4):781-822. Doi:10.1128/MMBR.57.4.781-822.1993
- Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E. 2006. The Prokaryotes, 3. Edition, Vol. 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes, USA, 297-299.
- Edwards, C. 1993. Isolation properties and potential applications of thermophilic actinomycetes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 42(2):161-179. Doi:10.1007/BF02788050
- El-Safey, E.M., Abdul-Raouf, U.M. 2004. Production, purification and characterization of protease enzyme from *Bacillus subtilis*. *International Conferences for Development and the Environment in the Arab World*, Assiut University, March 23-25, 2004. p 14.
- Fersht, A., 1998. Structure and mechanism in protein science. Freeman and Company, USA.
- Flärdh, K., Buttner, M.J. 2009. *Streptomyces morphogenetics*: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature Reviews Microbiology*, 7(1):36 –49. Doi:10.1038/nrmicro1968
- Godfrey, T., West, S. 1996. Introduction To Industrial Enzymology, In *Industrial Enzymology*. Eds Godfrey T., West S., London: Mac. Millan Press.
- Gerhartz, W. 1990. *Enzymes In Industry*, Weinheim, Germany.
- Gessesse, A. 1998. Purification and properties of two thermostable alkaline xylanases from an alkaliphilic *Bacillus* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(9):3533-3535. Doi: 10.1128/AEM.64.9.3533-3535.1998
- Gerze, A. 2003. Proteaz enziminin *Bacillus subtilismegatherium* ve *Bacillus polymxa* bakteri türlerinden kısmi saflaştırılması ve özelliklerinin incelenmesi. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği, Yüksek Lisans Tezi.
- Goodfellow, M., Williams, S.T. 1983. Ecology of actinomycetes. *Annual Review of Microbiology*, 37(1):189-216. Doi: 10.1146/annurev.mi.37.100183.001201

- Goodfellow, M., Fiedler, H. 2010. A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematic. *Antonie van Leeuwenhoek*, 98(2):119-42. Doi: 10.1007/s10482-010-9460-2
- Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.J., Trujillo, M.E., Suzuki, K., Ludwig, W., Whitman, W.B. 2012. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Ed., The Actinobacteria, 2083.
- Gupta, R., Beg, Q.K., Oberoi, R., Puri, S., Saxena, R.K. 2001. Characterization and wash performance analysis of an sds-resistant alkaline protease from a *Bacillus* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(5):493-497. Doi: 10.1023/A:1011911109179
- Gupta, R., Beg, Q.K., Khan, S., Chauhan, B. 2002a. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(4):381-95. Doi:10.1007/s00253-002-1142-1
- Gupta, R., Beg, Q.K., Lorenz, P. 2002b. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(1):15-32. Doi:10.1007/s00253-002-0975-y
- Hassan, A.U.I., Wellington, E.M., 2009. Actinobacteria. *Encyclopedia of Microbiology*, 3th Edition by Moselio Schaechter, 26-44.
- Hasani, A., Kariminik, A., Issazadeh, K. 2014. Streptomyces: characteristics and their antimicrobial activities. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2(1):63-75.
- Hedstrom, L. 2002. Serine protease mechanism and specificity. *Chemical Reviews*, 102(12):4501-4524. Doi:10.1021/cr000033x
- Hiltner, L., Störmer, K. 1903. Studien über die bakterienflora des ackerbodens, mit besonderer berücksichtigung ihres verhaltens nach einer behandlung mit schwefelkohlenstoff und nach brache. *Arbeiten Biologischen Reichsanst Land-Forstwirtschaft*, 3:443-545.
- Hogdson, J. 1994. The changing bulk biocatalyst market: recombinant dna techniques have changed bulk enzyme production dramatically. *Biotechnology*, 12(8):789-90. Doi:10.1038/nbt0894-789.
- Ilmiah, S.T., Mubarik, N.R., Budiasih Wahyuntari, B. 2018. Characterization of protease from *Bacillus licheniformis* f11.1 as a bio-detergent agent. *Makara Journal of Science*, 22/3:105-112. Doi:10.7454/mss.v22i3.8809
- Jadhav, U., Hocheng, H. 2012. A review of recovery of metals from industrial waste. *Journal of Achievements of Materials and Manufacturing Engineering*, 54(2):159-167.
- Jeffrey, L.S.H. 2008. Isolation, characterization and identification of actinomycetes

- from agriculture soils at Semongok, Sarawak. *African Journal of Biotechnology*, 7(20):3700- 3705. Doi: 10.4314/ajb.v7i20.59415
- Jüttner, F., Watson, S. 2007. Biochemical and ecological control of geosmin and 2-methylisoborneol in source waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14):4395-4406. Doi:10.1128/AEM.02250-06
- Kalakoutskii, L.V., Agre, N.S. 1976. Comparative aspects of development and differentiation in actinomycetes. *Bacteriological Reviews*, 40(2):469-524. Doi: 10.1128/MMBR.40.2.469-524.1976
- Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö.D. 2007. *Biyokimya. Aktif Yayınevi*, 118.
- Khasabuli, O.Y., Kibera, A. N. 2014. Isolation, characterization and primary screening of soil actinomycetes from Kenyatta University arboretum grounds for antibacterial activities. *Journal of Applied Biosciences*, 74(1):6072-6079. Doi: 10.4314/jab.v74i1.12
- Kim S.B., Lonsdale J, Seong C-N, Goodfellow M. 2003. *Streptacidiphilus* gen. nov., acidophilic actinomycetes with wall chemotype 1 and emendation of the family Streptomycetaceae (Waksman and Henrici (1943)AL) emend. Rainey et al. 1997. *Antonie van Leeuwenhoek*, 83(2):107-16. Doi:10.1023/A:1023397724023
- 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. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(6):436-444. Doi:10.1007/s10295-006-0085-4
- Kumar, C.G., Takagi, H. 1999. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances*, 17(7):561-594. Doi:10.1016/S0734-9750(99)00027-0
- Kutzner, H.J. 1981. *The Family Streptomycetaceae, The Prokaryotes: A Handbook On Habitats, Isolation and Identification of Bacteria*. Springer Verlag, Berlin, 20282090.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680-685. Doi: 10.1038/227680a0
- Lechevalier, H. A., Lechevalier, M. P. 1967. Biology of actinomycetes. *Annual Review of Microbiology* 21(1):71-100. Doi:10.1146/annurev.mi.21.100167.000443
- Lechevalier, H. A., Lechevalier, M. P. 1970. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 20(4):435-443. Doi:10.1099/00207713-20-4-435

- Lee, J.Y., Hwang, B.K. 2002. Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Canadian Journal of Microbiology*, 48(5):407-17. Doi:10.1139/w02-025
- Li, Q., Chen, X., Jiang, Y., Jiang, C., 2016. Cultural, physiological, and biochemical identification of actinobacteria. *İçinde: Actinobacteria-basics and biotechnological applications*. Intech, 87-111. Doi:10.5772/61462
- Locci, R., Sharples, G. 1984. Morphology. In Goodfellow M, Mordarski M, Williams ST (ed), *The Biology of Actinomycetes*. Academic Press, London, United Kingdom, 165–199.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. 2010. Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi. Çeviri Editörü: Çökmüş, C., Onbirinci Baskıdan Çeviri, Palme Yayınevi, Ankara.
- Masui, A, Yasuda, M, Fujiwara, N, Ishikawa, H. 2004. Enzymatic hydrolysis of gelatin layers on used lith film using thermostable alkaline protease for recovery of silver and pet film. *Biotechnology Progress*, 20(4):1267-9. Doi:10.1021/bp030058s
- Mayfield, C.I., Williams, S.T., Ruddick, S.M., Hatfield, H.L. 1972. Studies on the ecology of actinomycetes in soil. IV. observations on the form and growth of streptomycetes in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 4(1):79-91. Doi:10.1016/0038-0717(72)90045-4
- Mótyán, J.A., Tóth F., Tózsér J. 2013. Research applications of proteolytic enzymes in molecular biology. *Biomolecules*, 3(4):923-942. Doi:10.3390/biom3040923
- Naidu, K.S.B., Devi, K.L. 2005. Optimization of thermostable alkaline protease production from species of *Bacillus* using rice bran. *African Journal of Biotechnology*, 4 (7):724-726. Doi:10.5897/AJB2005.000-3132
- Naveed, M., Nadeem, F., Mehmood, T., Bilal, M., Anwar, Z., Amjad, F. 2020. Protease - a versatile and ecofriendly biocatalyst with multi-industrial applications: an updated review. *Catalysis Letters*. Doi:10.1007/s10562-020-03316-7
- Nelson, D.L., Cox, M.M. 2008. Lehninger Biyokimyanın İlkeleri, Üçüncü Baskıdan Çeviri, Nedret Kılıç (Çeviri Editörü), Palme Yayıncılık, Ankara.
- Polgar, L. 2005. The catalytic triad of serine peptidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(19-20):2161-72. Doi:10.1007/s00018-005-5160-x
- Rai, S.K., 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(9):2642-5. Doi:10.1016/j.biortech.2008.11.042

- Rani, R., Rana, R., Datt, S. 2012. Review on latest overview of proteases. *International Journal of Current Life Sciences*, 2(1):12–18.
- 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*, 62(3):597-635. Doi:10.1128/MMBR.62.3.597-635.1998
- 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(3):262-268. Doi:10.1016/j.procbio.2008.10.022
- Rathan, R.K, Ambili, M. 2011. Cellulase enzyme production by *Streptomyces* sp. using fruitwaste as substrate. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(12):1114-1118.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J. 1993. Evolutionary families of peptidases. *Biochemical Journal*, 290(1):205-18. Doi:10.1042/bj2900205
- Ray, A. 2012. Protease enzyme-potential industrial scope. *International Journal of Technology*, 2:1–4.
- Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Ashraf, M. 2019. Microbial proteases applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7:110. Doi:10.3389/fbioe.2019.00110
- Reed, G. 1993. *Enzymes In Food Processing*, 3. Edition, Academic Press, 480.
- Reid, G., Wong, P. 2005. *Soil bacteria*. Wales: Soil Biology Basics.
- Sen, S., Dasu, V., Dutta, K., Mandal, B. 2011. Characterization of a novel surfactant and organic solvent stable high-alkaline protease from new *Bacillus pseudofirmus* svb1. *Research Journal of Microbiology*, 6(11):769. Doi:10.3923/jm.2011.769.783
- Sharma, M., Gat, Y., Arya, S., Kumar, V., Panghal, A., Kumar, A. 2019. A review on microbial alkaline protease: an essential tool for various industrial approaches. *Industrial Biotechnology*, 15(2):69-78. Doi:10.1089/ind.2018.0032
- Shimogaki, H., Takeuchi, K., Nishino, T., Ohdera, M., Kudo, T., Ohba, K., Iwama, M., Irie, M. 1991. Purification and properties of a novel surface-active agent- and alkaline-resistant protease from *Bacillus* sp.Y. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55(9):2251-8. Doi:10.1271/bbb1961.55.2251
- Silva-López, R.E., Gonçalves, R.N. 2019. Therapeutic proteases from plants:biopharmaceuticals with multiple applications. *Journal of Applied Biotechnology and Bioengineering*, 6(2):101–109. Doi:10.15406/jabb.2019.06.00180
- Singh, R., Mittal, A., Kumar, M., Mehta, P.K. 2016. Microbial protease in

- commercial applications. *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, 4(3):365–374.
- Singhal, P., Nigam, V., Vidyarthi, A. 2012. Studies on production, characterization and applications of microbial alkaline proteases. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, 3(3):653–669.
- Smith, J.E. 2004. *Biotechnology*, Fourth Edition, Cambridge University Press, New York, 284.
- Solanki, R., Khanna, M., Lal, R. 2008. Bioactive compounds from marine actinomycetes. *Indian Journal of Microbiology* 48(4):410-31. Doi:10.1007/s12088-008-0052-z
- Suhartati, Y.T., Herasari, D., Hadi, S. 2008. The chemical modification of protease enzyme isolated from locale bacteria isolate, *Bacillus subtilis* Itbccb148 with cyanuric chloride-polyethylenglycol. *European Journal of Scientific Research*., 23:177-186.
- Sumantha, A., Larroche, C., Pandey, A. 2006. Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2): 211–220.
- Suthindhiran, K., Mangalam Achuthananda Jayasri, M.A., Dipali, D., Prasar, A. 2014. Screening and characterization of protease producing actinomycetes from marine saltern. *Journal of Basic Microbiology*, 54(10):1098-109. Doi: 10.1002/jobm.201300563.
- Takami, H., Nakamura, S., Aono, R., Horikoshi, K. 1992. Degradation of human hair by a thermostable alkaline protease from alkaliphilic *Bacillus* sp. No. Ah-101. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 56(10):1667-1669. Doi:10.1271/bbb.56.1667
- Thu, N.T.A., Khue, N.T.M., Huy, N.D., Tien, N.Q.D. 2019. Characterizations and fibrinolytic activity of serine protease from *Bacillus subtilis* c10. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 21(2):110-116 Doi:10.2174/1389201020666191002145415
- Thumar, J.T., Singh, S.P. 2009. Organic solvent tolerance of an alkaline protease from salt-tolerant alkaliphilic *Streptomyces clavuligerus* strain mit-1. *Journal of Industrial Microbiology*, 36(2):211-8. doi: 10.1007/s10295-008-0487-6.
- Velayudham, S., Murugan, K. 2012. Diversity and antibacterial screening of actinomycetes from javadi hill forest soil, tamilnadu, india. *Research Journal of Microbiology*, 2(2):41-46 Doi: 10.5923/j.microbiology.20120202.07
- Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G. F., Chater, K. F., Van Sinderen, D. 2007. Genomics of actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(3):495-548. Doi:10.1128/MMBR.00005-07

- Waksman, S.A., Henrici, A.T. 1943. The nomenclature and classification of the actinomycetes. *Journal of Bacteriology*, 46(4):337-41. doi:10.1128/JB.46.4.337-341.1943.
- Walsh, C.T., Wright, G. 2005. Introduction: antibiotic resistance. *Chemical Reviews*, 105(2):391-4. Doi:10.1021/cr030100y
- Williams, S.T., Lanning, S., Wellington, E.M.H. 1984. Ecology of Actinomycetes. *İçinde: The Biology of the Actinomycetes*, Goodfellow, M., Modarski, M., Williams, S.T. (eds), London: Academic Press, 481-528.
- Williams, S., Goodfellow, M., Alderson, G., Wellington, E., Sneath, P., Sackin, M. 1983. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *Journal of General Microbiology*, 129(6):1743-813. Doi:10.1099/00221287-129-6-1743
- Wiseman, A. 1987. *Handbook of Enzyme Biotechnology*, Second Edition, Chapter 3, The Application Of Enzymes in Industry, 274-373.
- Wolff, A.M., Showell, M.S., Venegas, M.G., Barnett, B.L., Wertz, W.C. 1996. Laundry performance of subtilisin proteases. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 379:113-20. Doi:10.1007/978-1-4613-0319-0_12
- Xu, Y., Lu, Y., Xing, Y., Xi, T. 2015. Characterization of solvent, detergent and oxidizing agent stable protease from isolated antarctic marine *Streptomyces* sp. xe-1. *Acta Microbiologica Sinica*, 55(3):311-20.
- Yadav, S.K., Bisht, D., Tiwari, S., Darmwal, N. S. 2015. purification, biochemical characterization and performance evaluation of an alkaline serine protease from *Aspergillus flavus* mtcc 9952 mutant. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4:667–677. Doi:10.1016/j.bcab.2015.08.007
- Yapasan, E. 2008. Partial purification and characterization of lipase enzyme from a *Pseudomonas* strain. İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Yang, Y., Jiang, L., Zhu, L., Wu, Y., Yang, S. 2000a. Thermal stable and oxidation-resistant variant of subtilisin e. *Journal of Biotechnology*, 81(2-3):113-118. Doi:10.1016/S0168-1656(00)00272-8
- Yang, J., Shih, I., Tzeng, Y., Wang, S. 2000b. Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. *Enzyme and Microbial Technology*, 26:406-413. Doi:10.1016/S0141-0229(99)00164-7
- Yıldırım, S. 2018. *Ulva lactuca* kompostundan izole edilen aktinomisetlerin biyolojik aktivitelerinin araştırılması, Giresun Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Yum, D.Y., Chung, R.C., Bai, D.R., OH, D.H., Yu, J.H. 1994. Purification and characterization of alkaline serine protease from an alkalophilic *Streptomyces*

sp. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 58(3):470-4.
Doi:10.1271/bbb.58.470

Zhang, B., Sun, Z.W., Jiang, D.D., Niu, T.G. 2009. Isolation and purification of alkaline keratinase from *Bacillus* sp. 50-3. African Journal of Biotechnology, 8(11):2598- 2603. Doi:10.5897/AJB09.504



ÖZGEÇMİŞ

Ebru Coşar 1989 yılında Kocaeli’de doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Kocaeli’de tamamladı. 2008 yılında Neşet Yalçın Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi’nden mezun oldu. 2009 yılında başladığı Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü’nü 2014 yılında bitirdi. 2015 yılında Giresun Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı.