

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bacillus sp. Suşlarından Proteaz Üretimi

Gizem AYVAZOĞLU

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Ağustos, 2023

İÇİNDEKİLER

ÖZ	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR	III
ÇİZELGELER DİZİNİ	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	V
SİMGELER VE KISALTMALAR	VI
1. GİRİŞ	1
1.1. Enzimler	1
1.2. Proteazlar	1
1.3. Proteazların Sınıflandırılması	1
1.4. Proteaz Kaynakları	2
1.5. <i>Bacillus</i> ve Proteazlar	3
1.6. Proteazların Kullanım Alanları	3
1.6.1. Deri Endüstrisi	3
1.6.2. Deterjan Endüstrisi	3
1.6.3. Kozmetik ve İlaç Endüstrisi	4
1.6.4. Tekstil Endüstrisi	4
1.6.5. Gıda Endüstrisi	4
1.7. Tezin Amacı	5
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	7
3. MATERYAL VE METOT	9
3.1. Materyal	9
3.1.1. Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar	9
3.1.2. Bakteri İzolasyonu ve Tanımlanmasında Kullanılan Besiyerleri	10
3.2. Metot	11
3.2.1. Topraktan <i>Bacillus</i> sp. Suşlarının İzolasyonu	11
3.2.2. Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi	11
3.2.3. Proteaz Üretiminde Optimum Koşulların Belirlenmesi	12
3.2.4. Optimum Koşullarda Proteaz Üretimi ve Etanol (Et-OH) ile Presipitasyonu	13
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	17
4.1. <i>Bacillus</i> sp. Suşlarının İzolasyonu ve Tanımlanması	17
4.2. İzolatların Proteaz Aktivitelerinin Belirlenmesi	18
4.2.1. Katı Besiyerinde Proteaz Aktivitesinin Saptanması	18
4.3. Proteaz Üretimini Etkileyen Koşulların Optimizasyonu	18
4.3.1. Sıcaklık ve pH'nın Sıvı Besiyerinde Enzim Üretimi Üzerine Etkisi	18

4.3.2. Proteaz Üretiminde İnkübasyon Süresinin Etkisi.....	20
4.3.3. Proteaz Üretiminde İnokülüm Miktarının Etkisi.....	21
4.3.4. Enzimin Karakterizasyonu	22
4.4. Sıcaklığın Enzim Kararlılığına (Stabilitesi) Etkisi.....	23
4.5. pH'nın Enzim Kararlılığına (Stabilitesi) Etkisi.....	24
4.6. Kimyasalların Enzim Kararlılığına Etkisi.....	25
4.7. Metal İyonlarının Proteaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	26
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	27
KAYNAKLAR	29
ÖZGEÇMİŞ	35



***Bacillus* sp. Suşlarından Proteaz Üretimi**

Gizem AYVAZOĞLU

Danışman: Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

ÖZ

Bu çalışmada küçükbaş hayvan üretimi yapılan çiftlik kesimhane toprağından izole edilen *Bacillus* sp. G17 suşundan proteaz üretilmiş ve enzimin karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Bu amaçla izole edilen 203 suş proteolitik aktivite bakımından test edilmek üzere Skimmed Milk Agar(SMA) besiyerinde 37°C’de 48 saat inkübe edilmiştir. Koloni morfolojisi bakımından değerlendirilen örneklerden etrafında şeffaf zon oluşturan 71 suş, proteaz pozitif olarak değerlendirilmiştir. Kısmi olarak saflaştırılan proteazın 50°C ve pH 8,0’de optimum aktivite gösterdiği saptanmıştır. Enzimin karakterizasyon sonuçlarına göre pH 4,0-6,0 aralığında ortalama %95 aktiviteye sahip olması asidik ortamda çalışmaya elverişli olduğunu göstermiştir. 20°C-40°C aralığında yüksek oranda kararlılık da sağladığı belirlenmiştir. Farklı kimyasalların proteolitik aktiviteye olan etkisi test edildiğinde 5 mM TEMED ile proteaz aktivitesinin arttığı, Triton X-100, Tween 80 ve EDTA nın 1 mM ve 5 mM konsantrasyonlarının tümünün enzimi inhibe ettiği görülmüştür. 1 mM CaCl₂ ve MnCl₂ nin enzim aktivitesini sırasıyla %9 ve %5 artırdığı gözlenmiştir.

Elde edilen bulgular, *Bacillus* sp. G17 suşundan üretilen proteaz enziminin endüstriyel kullanım potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus* sp., Enzim, Proteaz, Üretim

CUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

MSc THESIS

Protease Production from *Bacillus* sp.

Gizem AYVAZOĞLU

Advisor: Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ

Department of Biotechnology

ABSTRACT

In this study, protease was produced from the *Bacillus* sp. G17 strain isolated from the slaughterhouse soil of a farm where small ruminants are produced and the enzyme was characterized.

For this purpose, 203 isolated strains were incubated in Skimmed Milk Agar (SMA) medium at 37°C for 48 hours to be tested for proteolytic activity. Among the samples evaluated in terms of colony morphology, 71 strains that formed a transparent zone around were evaluated as protease positive. It was determined that the partially purified protease showed optimum activity at 50°C and pH 8.0. According to the characterization results of the enzyme, it has an average activity of 95% in the pH range of 4.0-6.0, showing that it is suitable for working in an acidic environment. It has also been determined that it provides high stability in the range of 20°C-40°C. When the effect of different chemicals on proteolytic activity was tested, it was observed that protease activity increased with 5 mM TEMED, and 1 mM and 5 mM concentrations of Triton X-100, Tween 80 and EDTA all inhibited the enzyme. It was observed that 1 mM CaCl₂ and MnCl₂ increased enzyme activity by 9% and 5%, respectively.

The results obtained, *Bacillus* sp. It shows that the protease enzyme produced from the G17 strain has the potential for industrial use.

Keywords: *Bacillus* sp., Enzyme, Protease, Production

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasında bilgisi ve deneyimiyle yolumu aydınlatan sabırlı ve mütevazî değerli danışmanım Prof. Dr. Hatice Korkmaz GÜVENMEZ'e, deneyimlerini benimle paylaşan değerli arkadaşlarım Mete KARABOYUN'a ve Damla SİHAY'a şükranlarımı sunarım.

Yüksek lisans eğitimine başlamama vesile olan ve beni cesaretlendiren Halil İbrahim BEYÇİOĞLU'na, çalışma arkadaşlarım Gülgen ÖZENİR ve Alev ARICIOĞLU'na teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek lisans serüvenim boyunca sonsuz destek ve anlayış gösteren değerli eşim Levent Cengiz Ayvazoğlu'na, oğullarım Atlas ve Atıl'a manevi destekleri için anneme, kayınvalideme ve ailemin her bir bireyine teşekkürlerimi sunarım.



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1 Proteaz üretimi için optimizasyon sonuçları	21
Çizelge 4.2 pH ve sıcaklığın proteaz aktivitesine etkisi ile ilgili sonuç özeti	25



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. <i>Bacillus</i> sp.'nin Gram boyanma karakteristiği (ışık mikroskobu 10x100)	17
Şekil 4.2. G17 suşunun Skimmed Milk Agar'da 37°C'de proteolitik aktivitenin saptanması	18
Şekil 4.3. Sıvı besiyerinde pH'nın enzim üretimi üzerine etkisi	19
Şekil 4.4. Sıcaklığın enzim üretimi üzerine etkisi	20
Şekil 4.5. Enzim üretiminde inkübasyon süresinin etkinliği	20
Şekil 4.6. Proteaz üretiminde inokulum miktarının etkisi	21
Şekil 4.7. pH'nın enzim aktivitesi üzerine etkisi	22
Şekil 4.8 Sıcaklığın enzim aktivitesi etkisi	23
Şekil 4.9. Sıcaklığın enzim kararlılığına etkisi	24
Şekil 4.10. pH'nın enzim kararlılığına etkisi	24
Şekil 4.11. Kimyasalların enzim aktivitesine etkileri	25
Şekil 4.12. Metal İyonlarının enzim kararlılığına etkisi	26

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	: Santigrat derece
EDTA	: Etilendiamin, tetra, asetik asit
mM	: Milimolar
OD	: Optik Dansite
rpm	: Dakikada devir sayısı
SMA	: Skimmed Milk Agar
sp.	: Species (tür, tekil)
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametil etilendiamin
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre

1. GİRİŞ

1.1. Enzimler

Enzimler, değerli bir son ürün üretmek için kimyasal reaksiyonları hızlandıran biyokatalizörlerdir. Günümüzde mikroorganizmalardan elde edilen enzim preparatları sanayinin birçok alanında, tarımda ve tıpta kullanılmaktadır. Enzimlerin kullanımı, teknolojik süreçlerin hızını artırmayı, bitmiş ürünlerin verimini önemli ölçüde artırmayı, kalitelerini iyileştirmeyi, değerli hammaddelerden tasarruf etmeyi ve atık miktarını azaltmayı mümkün kılar (Jankorazov ve ark.,2023).

Enzimler, metabolik görevlerinin yanı sıra artık hayatımızın her alanında karşımıza çıkmaktadır. Tıpta teşhis ve tedavi sürecinde, süt ve süt ürünleri üretiminde, fotoğrafçılık, gıda üretim ve işlemede, temizlik malzemeleri üretiminde büyük miktarlarda kullanımı mevcuttur. Bu alanlar dışında da çok çeşitli kullanım amaçları bulunmaktadır.

Günümüzde biyoteknolojik işlemlerin gelişmesi ile metabolik süreçlerde rol oynayan enzimler endüstriyel çevrelerin dikkatini çekmiştir. Enzimlerin kullanıldığı endüstriyel proseslerde nispeten kaliteli, ucuz ve çevreye dost ürün elde edilmesi bu enzimlerin üretiminin ve kullanımının artmasını sağlamıştır. Enzim teknolojisinin sürekli gelişmesi, endüstriyel enzimlere olan ilgiyi de artırmıştır.

1.2. Proteazlar

Proteazlar, tüm hayvanlarda, bitkilerde ve virüslerde olduğu kadar bazı mikroorganizmalarda da yaygın olarak bulunur. Proteazlar, hayvanlar, insanlar, bitkiler ve bazı mikroorganizmaların içinde yer alan biyokimyasal süreçlerin ayrılmaz bir bileşenini temsil eder (Shamsi ve ark., 2016).

Proteazlar, yüksek substrat özgüllüğü ve verimli katalitik aktivite sunarak canlı organizmalardan izole edilebilir ve saflaştırılabilir. Aynı zamanda proteazlar, protein katabolizması, sindirilen proteinlerin sindirimi ve hücre sinyali gibi çeşitli temel biyolojik işlevlerde yer alırlar. Çeşitli proteaz türleri, tamamen farklı mekanizmalar yoluyla benzer reaksiyonları katalize edebilir. Ayrıca, proteazlar, hücresel proteinin dönüşümünde yer alma gibi önemli bir işleve sahiptir. Proteazlar, kanın pıhtılaşması, zimojenik enzimlerin aktivasyonu ve salgı proteinlerinin işlenmesi gibi sınırlı bölünmeler yoluyla proteinlerin seçici modifikasyonlarını gerçekleştirebilir (Johnvesly ve Naik., 2001).

1.3. Proteazların Sınıflandırılması

Proteazlar temelde kimyasal yapılarına göre ekzopeptidazlar ve endopeptidazlar olarak ikiye ayrılmaktadır. Ekzopeptidazlar polipeptit zincirinin sonunda hareket ederken endopeptidazlar tercihen hücrenin iç bölgesinde hareket eder.

Ekzopeptidazlar ayrıca; polipeptit zincirlerinin amino (N-) ve karboksil (C-) terminalindeki peptit bağlarına yaptıkları katalitik etkiye göre karboksipeptidaz ve aminopeptidaz olarak ikiye ayrılmaktadır.

Aynı şekilde, endopeptidazlar da aktif bölgelerinde bulunan farklı katalitik mekanizmaları temel alınarak; serin, sistein, aspartik ve metalloproteaz olarak dört gruba ayrılmaktadır.

1. Serin proteazlar: Serin proteazlar, aktif bölgelerinde serin grubu (-OH) bulunduran proteazlardır.
2. Sistein proteazları: Aktif bölgelerinde bozulmamış bir SH grubu bulunduran proteazlardır.
3. Metalloproteazlar: Aktif bölgelerinde bir veya iki değerlikli metal iyonu bulunduran proteazlardır.
4. Aspartik proteazlar: Asit proteazlar olarak da bilinirler. Katalitik aktiviteleri için aspartik asit aminoasitlerine ihtiyaç duyarlar (Rao ve ark., 1998, Nduka O., 2007).

Endoproteazlar ayrıca maksimum aktiviteye sahip oldukları pH aralığına göre; asidik, nötr ve alkalın proteazlar olarak üç alt gruba ayrılmaktadır.

- Asidik proteazlar: Asit proteazlar olarak adlandırılırlar. pH 2,0-6,0 aralığında aktivite gösterirler.
- Nötr proteazlar: nötr, zayıf alkali veya zayıf asidik pH'ta aktiftirler.
- Alkalın proteazlar: Alkalın pH aralığında aktif olan proteazlardır (Rao ve Narasu., 2007).

1.4. Proteaz Kaynakları

Proteazlar hemen hemen tüm canlılar için fizyolojik olarak gereklidir. Proteaz enzimlerinin doğal kaynakları arasında bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar bulunur. Bu kaynaklar arasında, mikrobiyal proteazlar, hızlı hücresel üretim hızı ve mikrobiyal kültürlerin bakımının kolaylığı nedeniyle büyük ilgi görmektedir (Naveed ve ark., 2021).

Küresel pazarda proteazlara olan yüksek talep nedeniyle, doğada her yerde, yani bitkilerde, hayvanlarda ve mikroorganizmalarda bulunan proteazlara yönelik arayışlar muazzam bir şekilde artmıştır (Rani ve ark., 2012).

Mikrobiyal proteazlar, proteinaz aktivitesi, amidaz aktivitesi ve peptidaz aktivitesi gibi geniş bir protein hidrolitik aktivite aralığına sahip en büyük enzim grubunu oluşturur ve toplam enzim pazarının %60'ına katkıda bulunur (Naveed ve ark., 2021; Dhayalan ve ark., 2022).

1.5. *Bacillus* ve Proteazlar

Proteaz enzimlerinin büyük bir kısmının *Bacillus* cinsi bakterilerden elde edildiği bilinmektedir.

Bacillus cinsi, zorunlu aeroblar veya fakültatif anaeroblar olan Gram pozitif, spor oluşturan, çubuk şeklindeki bakterilerle temsil edilir (Dijl ve Hecker 2013).

Doğada bulunan sayısız mikroorganizma arasında *Bacillus* sp. proteaz enzimlerinin en büyük üreticileri olarak önemli bir role sahiptir. *Bacillus* sp.'den izole edilen proteazlar yüksek substrat özgüllüğüne ve substrat biyobozunurluğuna kadar geniş bir sıcaklık ve pH aralığına karşı dirençlidir (Danilova ve Sharipova, 2020; Hasan ve ark., 2022).

Mikrobiyal proteazlar, daha geniş esneklikleri ve endüstriyel önemleri nedeniyle araştırmaların büyük ilgisini çekmiştir (Matkawala ve ark., 2021; Banerjee ve ark., 2022).

1.6. Proteazların Kullanım Alanları

Proteazlar, tüm canlı formlarında ve virüslerde bulunan esansiyel bir enzim grubudur. Mikroorganizmalar, çeşitli bitki grupları ve hayvanlar tarafından üretilirler. Bakteriler tarafından üretilen bakteriyel proteazlar endüstriyel uygulamaları nedeniyle en önemli yeri tutmaktadır. Endüstriyel enzim grupları deterjan, deri, gıda, ilaç ve tekstil endüstrisinin yanı sıra gümüşün geri kazanımı ve biyoremediasyon süreçlerinde uygulama alanı bulmaktadır.

1.6.1. Deri Endüstrisi

Enzimlerin deri işleme ve üretiminde uygulanması ile ilgili çalışmalar 1910 yılında başlamıştır. O zamandan beri önemli araştırmalar yapılmış ve günümüzde birçok enzim deri işlemede ticari düzeyde kullanılmaktadır. Deri işleme; kürlenme, ıslatma, kireçleme, tüy alma, yaralama, dekapaj, yağdan arındırma ve tabaklama gibi birkaç adım içerir. Bu adımlar sırasında oluşan atıklar veya atık sular, yalnızca çok büyük çevre kirliliğine neden olmakla kalmaz ve ekosistem için bir tehdit oluşturarak yüksek konsantrasyonlarda sülfid ve krom bulunması nedeniyle ciddi sağlık tehlikesi oluşturabilir (Nilegaonkar ve ark., 2007).

Deri işleme endüstrisinde yapılan çalışmalara bakıldığında zararlı kimyasal madde yerine alternatif bakteriyel enzimlerin kullanımıyla, çevre kirliliğinin azalması, deri kalitesinin artırılmasında başarılı olunmuş ve uygulamaların daha ekonomik olması sağlanmıştır (Afşar, 2008).

1.6.2. Deterjan Endüstrisi

Enzimlerin kullanım alanları incelendiğinde deterjanlar, en büyük endüstriyel uygulamaları olmaktadır (Horikoshi, 1999).

Proteazlar, deterjan endüstrisinde ticari ölçekte yaygın olarak kullanılmaktadır. Temel bileşen veya bileşen olarak proteazlar içeren deterjan endüstrisindeki çeşitli ürünler, evdeki

Çamaşırların, takma dişlerin veya kontakt lenslerin temizlenmesi için kullanılmıştır. Toplam enzim satışının, deterjan endüstrisindeki proteazların kullanımı ~%20'dir. (Jacobson ve ark., 1985).

Proteazlar sadece çamaşır deterjanı olarak değil hem kurumsal hem de endüstriyel sektörlerde bulaşık ve temizlik deterjanı olarak da kullanılmaktadır (Estell ve ark., 1985; Shanlin ve ark., 1997; Bornscheuer ve ark., 2012).

Deterjan sektöründe kullanılan alkalın proteaz enzimlerin büyük çoğunluğu *Bacillus* sp.'den izole edilmektedir. Deterjan formülasyonlarında enzimlerin kullanımı, düşük ısılarda ve kısa sürede temizliği sağlamakta aynı zamanda yıkama verimini artırmaktadır (Yardımcı, 2014).

1.6.3. Kozmetik ve İlaç Endüstrisi

Enzimler ilaç endüstrisinde pıhtı önleyici, anti-inflamatuar ve antikanserojen ajanlar olarak karşımaza çıkmaktadır.

Bakterilerden elde edilen saflaştırılmış proteaz, antibakteriyel aktivite gibi çeşitli amaçlar için kullanılır. Klinik patojenlerin yanı sıra biyofilmleri degrade eder (Harish ve Chauhan, 2017). Ayrıca onkoloji alanında ilaç olarak kullanılır (Prabhavathy ve ark., 2013).

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

1.6.4. Tekstil Endüstrisi

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

1.6.5. Gıda Endüstrisi

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

Proteaz enzimleri gıda endüstrisinde fırıncılık, peynir yapımı, et yumuşatma ve protein açısından zengin diyet yiyeceklerinin üretimi gibi çeşitli alanlarda tercih edilmektedir (Mahajan ve Badgajar, 2010; Çelik, 2006).

Biranın üretiminde çözünmeyen proteinlerden dolayı oluşan bulanık görünümü engelleyerek berrak ve parlaklık için proteaz enzimleri kullanılmaktadır. Bu görünüm için genellikle kaba papain

ya da bromelain (sistein) kullanımı ile sağlanmaktadır. Ayrıca maltın matlaştırılmasında da kullanılmaktadır (Maccabe, 2007).

1.7. Tezin Amacı

Proteazları incelemeye olan ilgi, yalnızca farklı metabolik süreçlerin düzenlenmesi nedeniyle değil, aynı zamanda endüstriyel topluluktaki önemli kullanımı nedeniyle de artmıştır. Önemli sayıda hücre dışı proteaz üreten mikroorganizmalar, endüstri için büyük önem taşır ve birkaç alkalın proteaz ürünü başarılı bir şekilde pazarlanır (Gupta ve ark., 2002; Gupta ve Ramnani, 2006; Vijayaraghavan ve ark., 2014).

Günümüzde endüstriyel açıdan önemli enzimlerin başında gelen proteazların sahip olduğu özellikler göz önüne alındığında kullanılabilecek başka potansiyel alanların da olabileceği bu enzimin endüstriyel ve biyoteknolojik olarak tercih edilmesine yol açmıştır.

Modern dünyada daha yeni, sürdürülebilir ve çok yönlü enzimler geliştirmek için yapılan çalışmalar hızla devam etmektedir.

Bu çalışmada *Bacillus* sp. G17 suşundan izole edilen proteaz enziminin üretim optimizasyonu ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Usharani ve ark. (2010), *Bacillus laterosporus* suşunun EDTA varlığında proteaz üretiminin büyük ölçüde inhibe olduğunu belirtmiştir.

Shah ve ark. (2010), *Bacillus cereus* suşundan üretilen proteazın geniş pH (6,0 – 9,0) ve (40-70°C) sıcaklık aralığında aktif olduğunu ve enzimin optimum 60°C ve pH 8,0'de aktivite gösterdiğini belirtmiştir. Ayrıca Tween 80 ve Triton X-100 gibi noniyonik deterjanların varlığında enzimin kararlı olduğunu saptamıştır.

Akcan ve ark. (2010), *Bacillus subtilis* RSKK96 suşunun maksimum proteaz üretiminin 72. saatte gerçekleştiğini saptamıştır.

Bajaj ve ark. (2014), *Bacillus subtilis* I-2 suşundan ürettikleri proteaz enziminin optimum aktivitesini 50°C sıcaklıkta ve pH 8,0'de gösterdiğini saptamıştır. Ayrıca enzimin pH 7,0–10,0 aralığında ve 30-50°C sıcaklıkta stabil olduğunu ve EDTA varlığında enzim aktivitesinin büyük ölçüde azaldığını bildirmiştir.

Vijayaraghavan ve arkadaşları (2014), *B. cereus* AT suşundan izole ettikleri proteaz enziminin pH 8,0 ve 50°C sıcaklıkta en yüksek aktiviteyi gösterdiğini rapor etmiştir.

Sahin ve ark. (2015), *Bacillus subtilis* M-11 suşundan izole edilen proteazın optimum enzim aktivitesini pH 8,0 ve 50°C sıcaklıkta gösterdiğini bildirmiştir.

Mothe ve ark. (2016), *Bacillus caseinilyticus* suşundan izole ettikleri alkali proteazın aktivite gösterdiği optimum pH değerinin 8,0, optimum sıcaklık değerinin ise 60°C olduğunu ve Ca^{2+} ve Mg^{2+} iyonları varlığında aktivitesinin arttığını rapor etmiştir.

Maruthiah ve ark. (2017), *Bacillus sp.* APCMST-RS7 suşundan izole edilen proteazın aktivite gösterdiği optimum pH değerinin 8,0 ve optimum sıcaklık değerinin ise 50°C olduğunu tespit etmiştir.

Yang ve ark. (2019), *Bacillus altitudinis* W3 suşundan izole ettikleri alkali proteazın Ca^{2+} ve Mg^{2+} iyonları varlığında aktivitesinin arttığını, EDTA varlığında enzimin inhibe olduğunu rapor etmiştir.

Abdollahi ve ark. (2020), *Bacillus altitudinis* suşundan izole ettikleri proteazın optimum sıcaklık değerinin 50-55°C, optimum pH değerinin ise 8-8,5 olduğunu bildirmiştir.

Avcı ve ark. (2020), *Bacillus sp.* EBTA6 suşundan izole ettikleri proteaz enziminin optimum sıcaklık değerinin 50-60°C, optimum pH değerinin ise 8,0 olduğunu ve Ca^{2+} iyonu etkisi ile aktivitesinin arttığını tespit etmiştir.

Sharma ve ark. (2020), *Bacillus cereus* RSA1 suşundan izole ettikleri proteazın pH 8,0 ve 50°C sıcaklıkta en yüksek aktiviteyi gösterdiğini bildirmiştir.

Shafique ve ark. (2021), *Bacillus subtilis* apr-IPL04 suşunun maksimum proteaz üretiminin 72. saatte ve %3 inokulum kullanıldığında gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Gurunathan ve ark. (2021), *Bacillus cereus* suşu ile yaptıkları çalışmada elde ettikleri proteazın proteazın optimum sıcaklık değerinin 50°C, optimum pH değerinin ise 10 olduğunu rapor etmiştir.

Ullah ve ark. (2022), *Bacillus cereus* AUST-7 suşundan izole ettikleri alkali proteazın pH 10,0'da ve 55°C'de kararlı olduğunu tespit etmiştir. Ayrıca pH 8-11 ve 50°C'de stabilitesini koruduğunu belirtmiştir.

Tennalli ve ark. (2022) *Bacillus cereus* PW3A suşundan izole ettikleri proteaz enziminin optimum pH 8,0 ve optimum 50°C sıcaklıkta aktivite gösterdiğini, ayrıca enzimin MgCl₂ ve CuSO₄ varlığında aktivitesinin arttığını rapor etmiştir.

Ramalingam ve ark. (2022) süt ürünleri atıklarının döküldüğü topraktan izole ettikleri *Bacillus subtilis* VBC7 suşunun Mg²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺ iyonları varlığında aktivitesinin arttığını bildirmiştir.

Fahmy ve El-Daab (2023), Kızıldeniz'in kıyısında bulunan abu-Shaar vadisinin tuzlu topraklarından izole ettikleri *Halobacillus* sp. HAL1 suşundan izole ettikleri proteazın 50°C ve pH 8,0'de optimum aktivite gösterdiğini, ayrıca Ca²⁺, Mn²⁺ ve Mg²⁺ iyonları varlığında enzim aktivitesinin arttığını bildirmişlerdir.

Adetunji ve Olaniran (2023) *Bacillus aryabhattai* Ab-15S suşundan izole ettikleri proteazın en yüksek aktivitesini 50°C ve pH 8,0'de gösterdiğini bildirmişlerdir.

Bu çalışma ve diğer çalışma sonuçlarının da gösterdiği gibi farklı *Bacillus* suşlarıyla yapılan deneylerde proteolitik aktivitedeki farklılıklar, kültür ortamı bileşenlerine bağlı olduğu kadar bakteri suşunun genetik özelliklerine ve deney koşullarına da bağlanabilir. Ayrıca proteaz üretimini etkileyen fiziksel faktörlerin test edildiği araştırmalarda farklı sonuçların elde edilmesi mikroorganizmaların farklı metabolik yolları kullandığını kanıtlar niteliktedir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Bu çalışmada küçükbaş hayvan kesimi yapılan çiftlik toprağının farklı lokasyonlarından izole edilen *Bacillus* sp. suşları kullanılmıştır. Bakteri suşlarının izolasyonu, enzimin üretimi, enzim karakterizasyonu ve etkinliğinin test edilmesi için yapılan deneylerde çeşitli besiyerleri, substratlar, tamponlar ve diğer kimyasallar kullanılmıştır. Su banyosu, çalkalamalı inkübatör, soğutmalı santrifüj otoklav, spektrofotometre, steril hava kabini, pH metre, otomatik pipetler kullanılan ekipmanlardır.

3.1.1. Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar

NaOH Çözeltisi

Besiyerleri ve tamponlarının çözeltilerin pH'larının ayarlanması için 0,2 N ve 2 N NaOH çözeltileri kullanılmıştır.

Etanol

Sıvı besiyerinde üretilen enzimlerin çöktürülmesi amacıyla %96'lık soğuk etanol kullanılmıştır.

Sodyum Fosfat Tamponu (100 mM, pH 7,0)

Etanol ile kısmi saflaştırma amacıyla çöktürülen enzimin çözündürülmesi için kullanılmıştır.

Sodyum-Fosfat Tamponu

pH 6,0-8,0 arasında enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılmıştır. İstenilen pH'da tampon elde edebilmek amacıyla 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve 0,2 M NaH_2PO_4 uygun hacimlerde karıştırılır ve son hacim 100 mL'ye tamamlanır (Temizkan ve Arda, 2004).

Glisin-NaOH Tamponu

pH 8,5-10,5 aralığında enzim aktivitesini belirlemek amacıyla kullanılmıştır. İstenilen pH'ta tampon elde edebilmek amacıyla 0,2 M Glisin ve 0,2 M NaOH uygun hacimlerde karıştırılarak distile su ile son hacim 200 mL'ye tamamlanır (Temizkan ve Arda, 2004).

Borax-NaOH Tamponu

pH 11,0-12,5 arasında enzim aktivitesini belirlemek amacı ile kullanılmıştır. Stok olarak hazırlanan 0,05 M Boraks (19,05 g/L) çözeltisinden 50 mL alınarak üzerine istenilen pH değeri elde edilene kadar uygun hacimde NaOH çözeltisi ilave edilerek son hacim distile su ile 200 mL'ye tamamlanır (Temizkan ve Arda, 2004).

TCA (Trikloro Asetik Asit)

Enzim aktivitesini durdurmak amacıyla kullanılmıştır. 60 mL distile su içerisinde 10 g TCA çözdürüldükten sonra son hacim distile su ile 100 mL olacak şekilde hazırlanmıştır (Chi ve ark, 2007).

3.1.2. Bakteri İzolasyonu ve Tanılanmasında Kullanılan Besiyerleri

N1 Agar

Çalışmada kullanılan bakteri suşlarının izolasyonu, saf kültür eldesi, çoğaltılması, geliştirilmesi ve saklanması (stok kültür) amacıyla hazırlanmıştır (Anonymous, 1978).

Bileşimi	g/L
Pepton	10
Et özütü	10
Maya	5
Glikoz	1
Agar	15

Proteaz Üretim Besiyeri (Skimmed Milk Besiyeri)

Katı ve sıvı besiyerlerinde proteaz aktivitesini belirlemek amacıyla Singh ve ark. (2001)'nın tanımladığı besiyeri içeriği modifiye edilerek hazırlanmıştır.

Bileşimi	g/L
Pepton	10
Et özütü	3
NaCl	5
Skimmilk	11
Agar	15
Distile su	1000 mL

Skimmed Milk ayrıca sterilize edildikten sonra steril edilmiş besiyerine sonradan eklenerek pH'sı 8,0'e ayarlanmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Topraktan *Bacillus* sp. Suşlarının İzolasyonu

Küçükbaş hayvan kesimi yapılan çiftlik toprağının farklı bölgelerinden alınan örneklerden 1 g toprak örneği 9 mL steril distile su içerisinde karıştırılmış ve homojenize edilmiştir (Moraga ve ark., 2004). Spor oluşturan bakterileri izole edip vejetatif formdaki bakterileri elimine etmek amacıyla 80°C'de 15 dakika ısı şoku uygulanmıştır (Lennette ve ark., 1985; Venkateswaran ve ark., 2003). Ön işlem uygulanan toprak örneklerine seri sulandırma (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) yapılmış daha sonra N1 agar besiyerine (pH: 7,0) yayma metoduyla (0,1 mL) inoküle edilmiş ve 37°C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra tek koloni formunda üremiş, koloni morfolojileri Bacillaceae familyasına benzeyen suşlar seçilip SMA besiyerine (pH: 7,0) çizgi ekim metoduyla ekilmiş ve 37°C'de 24 saat inkübasyondan sonra proteolitik aktivite bakımından test edilmek üzere (stok kültür şeklinde) +4°C'de saklanmıştır.

3.2.2. Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Katı Besiyerinde Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Proteolitik aktivite gösteren suşların belirlenebilmesi için stok kültür olarak saklanan izolatlar SMA besiyerlerine çizgi yöntemiyle ekilmiş ve 37 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Toplam 203 izolatın proteaz aktivitesini saptamak amacıyla izole edilen 203 suşun katı besiyerine ekimleri yapılmıştır. İnkübasyon sonrasında bakterilerin etraflarında oluşan zon çapları ölçülerek enzim aktivitesi hesaplanmıştır (Regmi ve ark, 2017). En geniş proteolitik aktiviteleri gösteren suşlar belirlenmiş ve bu çalışmada üretici suş olarak kullanılmıştır.

Sıvı Besiyerinde Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Sıvı besiyerinde enzim aktivitesi Leighton yöntemine göre tayin edilmiştir (Leighton ve ark., 1973). Bu yöntemle göre 0,1 M Tris-HCl (pH 7,0) içerisinde %0,5 lik Azokazein vorteksenerek çözündürülmüş ve substrat olarak kullanılmıştır.

Reaksiyon karışımı:

- Azokazein çözeltisi (%0,5'lik, 300 µl)
- Enzim preparatı (300 µl)

Reaksiyon karışımı, 40°C sıcaklıkta 30 dk inkübe edildikten sonra %10'luk TCA (Trikloroasetik asit) çözeltisinden 600 µl eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. -20°C'de 5 dk 4°C'de 12000 rpm'de 15 dk santrifüjlenmiştir. 440 nm'de spektrofotometrede absorbans ölçümü yapılarak proteaz aktivitesi hesaplanmıştır.

3.2.3. Proteaz Üretiminde Optimum Koşulların Belirlenmesi

Sıcaklık ve pH'nın Etkisi

Endüstriyel uygulamalarda mikroorganizma temelli enzim üretimlerinde üretici suştan en yüksek verimle üretim sağlanması temel adımdır. Bu nedenle bu araştırmada enzim üretici suşlardan üretim yapmak amacıyla sıcaklığın ve pH'nın etkisi saptanmıştır.

Bu amaçla farklı pH'larda hazırlanan (4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0; 11,0 ve 12,0) 100 mL SM sıvı besiyerine %1 oranında inoküle edilen taze bakteri kültürü 150 d/dk çalkalama hızında çalkalamalı inkübatörde 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında kültür +4°C'de 8000 d/dk'da, 15 dk santrifüj edilerek üst faz solüsyonu ile standart yöntemle proteaz aktivitesi belirlenmiştir.

En yüksek absorbansın elde edildiği değer %100 kabul edilerek bağlı aktivite cinsinden grafiklendirilmiştir.

Her suş için üç seri örnek hazırlanarak ortalamaları alınmıştır. Besiyeri pH optimizasyonu yapıldıktan sonra optimum pH'ta 100mL SM sıvı besiyeri hazırlanmış ve suşlar %1 oranında SM besiyerlerine (enzim üretim besiyeri, 250 mL'lik erlenlerde) inoküle edilmiştir. 150 d/dk çalkalama hızında 20°C, 30°C, 40°C, 50°C ve 60°C 'de 48 saat inkübe edilen örnekler +4°C'de 8000 d/dk'da, 15 dk santrifüj edilmiştir. Üst sıvı faz ile standart yöntemle enzim aktivitesi belirlenmiştir.

En yüksek absorbansın elde edildiği değer %100 kabul edilerek bağlı aktivite cinsinden grafiklendirilmiştir.

Proteaz Üretimine İnokulum Miktarının Etkisi

Enzim üretim süreçlerinde üretim besiyerine ilave edilecek inokulum miktarının saptanması en temel parametrelerden biridir. Bu nedenle bu çalışmada proteaz üretimi amacıyla 25 mL üretim besiyerine eklenecek en uygun inokulum miktarı saptanmıştır. 100 mL'lik erlenler hazırlanmış ve 25 mL SM (enzim üretim besiyeri) besiyerlerine %0,5; %1; %1,5; %2, %3; %4 oranlarında *Bacillus* sp. inoküle edilmiş, 40°C'de 150 d/dk'da çalkalayıcı inkübatörde 48 saat inkübe edilerek +4°C'de 8000 d/dk'da 15 dk santrifüj edilmiş ve üst sıvı faz alınarak 440 nm dalga boyunda proteaz aktiviteleri ölçülmüştür.

En yüksek absorbansın elde edildiği inokülasyon miktarı değeri %100 kabul edilerek bağlı aktivite cinsinden grafiklendirilmiştir.

Proteaz Üretimine İnkübasyon Süresinin Etkisi

Üretim koşulları için optimum pH, sıcaklık ve inokülüm miktarı saptandıktan sonra maksimum üretim için inkübasyon süre tayini yapılmıştır. Bu amaçla optimum koşullarda hazırlanan SM besiyerine (enzim üretim besiyeri) 18 saatlik taze bakteri kültüründen %3 oranında inoküle edilmiştir. Daha sonra 24, 36, 48, 72, 96 ve 120. saatlerde örnekler alınarak +4°C’de 8000 d/dk’da 15 dk santrifüj edilmiş ve üst sıvı faz alınarak 440 nm dalga boyunda proteaz aktiviteleri ölçülmüştür.

En yüksek absorbansın elde edildiği inkübasyon süresi değeri %100 kabul edilerek bağlı aktivite cinsinden grafiklendirilmiştir.

3.2.4. Optimum Koşullarda Proteaz Üretimi ve Etanol (Et-OH) ile Presipitasyonu

Proteaz üretimi için optimum koşulların belirlenmesini takiben üretici suş G17, 20 mL N1 sıvı besiyerine ekilmiş ve 37°C’de 150 d/dk çalkalama hızında 18 saat üremeye bırakılmıştır. Kültür pH’sı 8,0’e ayarlanan 100 mL SM sıvı besiyerine %3 oranında inoküle edilmiş ve 40°C sıcaklıkta 150 d/dk çalkalama hızında 72 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra kültür, +4°C’de 8000 d/dk’da 15 dk santrifüj edilmiştir.

Üst sıvı faz alınarak üzerine kendi hacminin %70’i oranında %96’lık soğuk etanol eklenerek -20°C’de bir gece bekletilmiştir. Daha sonra örnek, +4°C’de 10000 d/dk’da 15 dakika santrifüj edilerek enzimin geri kazanımı sağlanmıştır. Çökelti, 0,1 M sodyum fosfat tamponunda (pH 7,0) çözülerek +4°C’de saklanmıştır.

Proteaz Aktivitesi Üzerine pH’nın Etkisi

Bu çalışmada üretici suş olarak G17 den optimum koşullarda enzim üretimi yapıldıktan sonra üretilen enzimin aktivitesi üzerine pH ve sıcaklığın etkisi saptanmaya çalışılmıştır.

Etanol presipitasyonu ile kısmi saflaştırma yapılan proteazın optimum pH aktivitesinin belirlenmesi için aşağıdaki tamponlar hazırlanmıştır;

- Sodyum Asetat (pH 4,0-5,0),
- Sodyum-Fosfat (pH 6,0-8,0),
- Glisin-NaOH (pH 9,0-10,0),
- Boraks-NaOH (pH 11,0-12,0).

Substrat olarak kullanılan azokazein, pH 4,0-12,0 aralığında farklı pH’larda yukarıdaki tamponlar içerisinde %0,5 oranında hazırlanmıştır. Hazırlanan substrat çözeltileri ile standart proteaz aktivite tayini yapılmıştır.

En yüksek absorbansın elde edildiği pH değeri %100 kabul edilerek bağıl aktivite cinsinden grafiklendirilmiştir.

Proteaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Proteazın optimum aktivite gösterdiği sıcaklığı belirlemek amacıyla, optimum proteaz aktivitesinin görüldüğü pH'ta (pH 8,0) enzim-substrat karışımı 20, 30, 40, 50 ve 60°C sıcaklıklarda inkübasyona bırakılarak standart proteaz aktivite tayini yapılmıştır.

En yüksek absorbansın elde edildiği sıcaklık değeri %100 kabul edilerek bağıl aktivite cinsinden grafiklendirilmiştir.

pH'nın Enzim Kararlılığına Etkisi

Özellikle endüstriyel üretim süreçlerinde fiziksel ve kimyasal değişkenlerden etkilenen enzim aktivitesinin yüksek düzeyde korunması ve kabul edilebilir düzeyde aktivite kaybı arzu edilir. pH değişiklikleri de enzim aktivitesini olumsuz etkileyecek bir kimyasal etkidir. Bu nedenle pH'nın enzim kararlılığına etkisi saptanmıştır.

pH'nın enzim kararlılığına etkisini saptamak amacı ile enzim preparasyonu pH 4,0-12,0 aralığındaki farklı tamponlarla optimum sıcaklıkta (50°C) 2 saat ön inkübasyona bırakılmıştır. Optimum pH'da hazırlanan substrat (pH 8,0) ile ön inkübasyona bırakılan enzim karıştırılarak, enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklıkta (50°C) standart proteaz aktivite tayini yapılmıştır.

Kontrol olarak, ön inkübasyona bırakılmamış enzim örneğiyle standart aktivite tayini yapılmış ve bu değer %100 kabul edilerek kalan aktivite cinsinden grafiklendirilmiştir.

Sıcaklığın Enzim Kararlılığına Etkisi

Endüstriyel üretim proseslerinde kullanılan enzimler ekstrem sıcaklıklarda kararlılık göstermeleri nedeniyle endüstriyel uygulamalarda tercih edilmektedirler. Bu nedenle enzim, 20, 30, 40, 50, 60 ve 70°C sıcaklıklarda 2 saat ön inkübasyona bırakılmıştır. Optimum pH'da hazırlanan substrat (pH 8,0) ile ön inkübasyona bırakılan enzim karıştırılarak, enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklıkta (50°C) standart proteaz aktivite tayini yapılmıştır.

Kontrol olarak, ön inkübasyona bırakılmamış enzim örneğiyle standart aktivite tayini yapılmış ve bu değer %100 kabul edilerek kalan aktivite cinsinden grafiklendirilmiştir.

Metal İyonlarının Proteaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Enzimlerin kullanıldığı süreçlerde bazı metal iyonları enzim aktivitesini etkileyebilmektedir. Bu çalışmada bazı metal iyonlarının proteolitik aktivite üzerine etkisini belirlemek amacıyla NaCl, CaCl₂, CoCl₂, MgSO₄, CuSO₄, MnCl₂, ZnCl₂ ve FeSO₄ metalleri kullanılmıştır.

Metal iyonlarının distile su ile 100 mM stok çözeltileri hazırlandıktan sonra son konsantrasyonları 1 mM ve 5 mM olacak şekilde enzime eklenmiş ve 60 dakika ön inkübasyona bırakılmıştır (Asha ve ark., 2018). Optimum pH'da hazırlanan substrat (pH 8,0) ile ön inkübasyona bırakılan enzim karıştırılarak, enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklıkta (50°C) standart proteaz aktivite tayini yapılmıştır.

Kontrol olarak, metal iyonu içermeyen enzim ile standart aktivite tayini yapılmış ve bu değer %100 kabul edilerek kalan aktivite cinsinden grafiklendirilmiştir.

Diğer Kimyasalların Proteaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

G17 suşundan üretilen proteaz aktivitesi üzerine EDTA, TEMED, Tween 80 ve Triton X-100'ün, etkisi araştırılmıştır. Enzime son konsantrasyonları %1 ve %5 olarak hazırlanan kimyasallar eklenmiş, 60 dakikalık ön inkübasyon sonrası optimum pH'da hazırlanan substrat (pH 8,0) ile ön inkübasyona bırakılan enzim karıştırılarak, enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklıkta (50°C) standart proteaz aktivite tayini yapılmıştır.

Kontrol olarak, kimyasal içermeyen ortamda standart aktivite tayini yapılmış ve bu değer %100 kabul edilerek kalan aktivite cinsinden grafiklendirilmiştir.



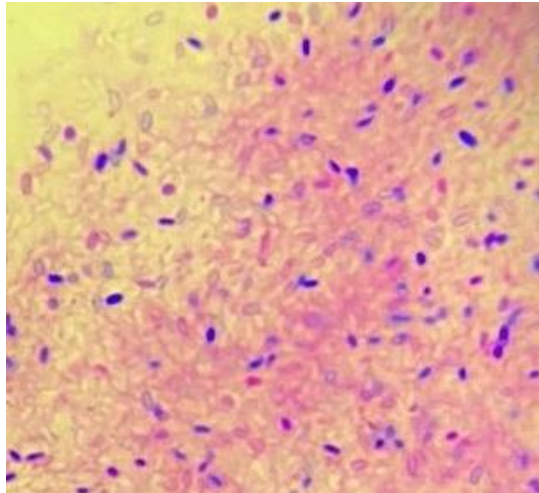
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmaya ait bulgular aşağıdaki adımlarda tartışılacaktır;

- Doğal ortamlardan *Bacillus* cinsi bakterilerin izolasyonu ve saf kültürlerinin hazırlanması,
- İzolatların proteolitik aktivitelerinin Skimmed milk agarda belirlenmesi ve en yüksek aktivite gösteren suşların seçimi,
- Üretici suş ile enzim üretim besiyerinde (sıvı) enzim üretimi ve proteaz aktivite kontrolü,
- Üretici suş ile proteaz üretim koşullarının optimizasyonu,
- Optimum koşullarda enzim üretimi ve enzimin karakterizasyonu.

4.1. *Bacillus* sp. Suşlarının İzolasyonu ve Tanılanması

Bu çalışmada, küçükbaş hayvan kesimi yapılan çiftlik toprağının farklı lokasyonlarından alınan toprak örneklerinden *Bacillus* cinsi bakteriler izole edilmiştir. Distile su içerisinde homojenize edilen toprak örneği 80°C’de 15 dk ön ısıtma işlemine maruz bırakıldıktan sonra, vejetatif formdaki bakteri hücrelerinin eliminasyonu sağlanmıştır. Daha sonra seri sulandırmayla N1 besiyerine yayma metoduyla ekim yapılmış ve 37°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben N1 besiyerinde üreyen tek kolonilerden 203 suş seçilmiştir. Koloni seçiminde; koloni morfolojileri dikkate alınarak Bacillaceae familyasına benzeyen suşlar SMA besiyerine (pH 7,0) çizgi ekim metoduyla ekilmiş ve 37°C’de 24 saat üremeye bırakılmıştır. Böylece her bir suşun saf kültürü elde edilmiş ve ışık mikroskobu incelemesi ile boyanma karakteristikleri dikkate alınarak (gram pozitif, çubuk şeklinde, endospor oluşumu; Şekil 4.1) *Bacillus* cinsine ait olan 71 suş proteolitik aktivite bakımından test edilmek üzere (stok kültür şeklinde) +4°C’de saklanmıştır.

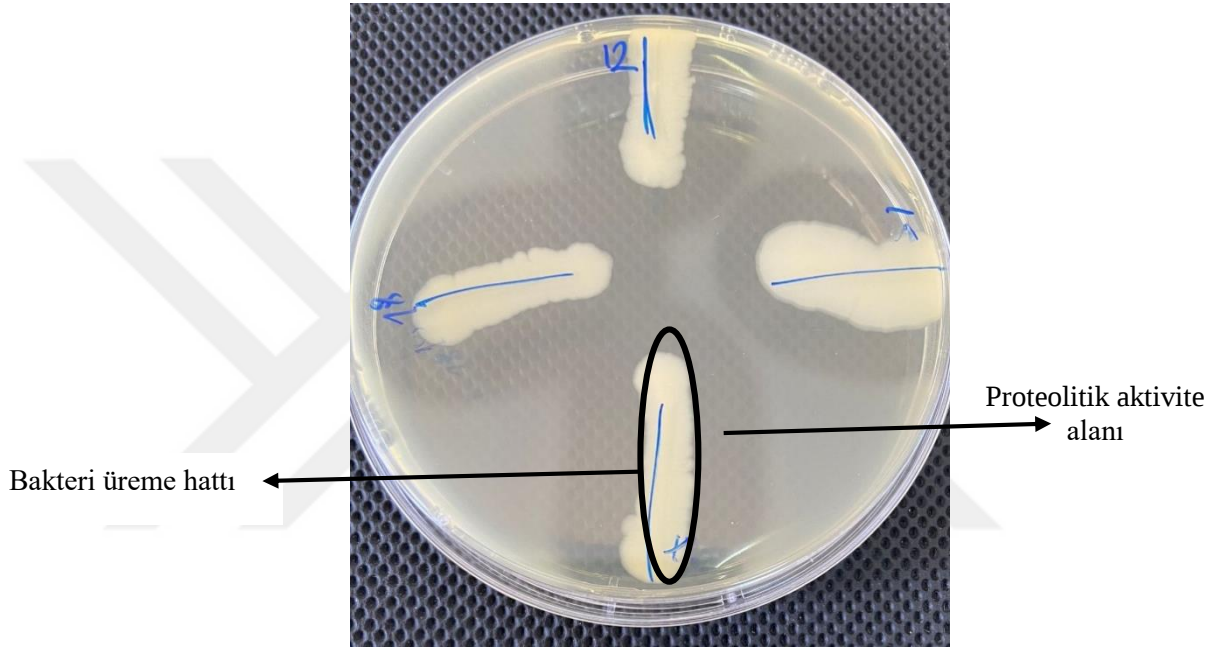


Şekil 4.1. *Bacillus* sp.’nin Gram boyanma karakteristiği (ışık mikroskobu 10x100)

4.2. İzolatların Proteaz Aktivitelerinin Belirlenmesi

4.2.1. Katı Besiyerinde Proteaz Aktivitesinin Saptanması

Bacillus cinsine ait olduğu koloni morfolojisi ve mikroskopik inceleme ile belirlenen 71 suş proteolitik aktivite belirlenmesi amacıyla Skimmed Milk Agar'a (SMA) çizgi şeklinde ekilerek 37°C'de 48 saat bekletilmiştir. Suşların üreme hattı etrafında görülen hidroliz zonları proteolitik aktiviteyi işaret etmektedir (Şekil 4.2). Bu araştırma için katı besiyerinde gözlenen proteolitik aktiviteye istinaden 17 numaralı suşun üretim suşu olarak kullanılmasına karar verilmiş ve G17 olarak kodlanmıştır.



Şekil 4.2. G17 suşunun Skimmed Milk Agar'da 37°C'de proteolitik aktivitenin saptanması

4.3. Proteaz Üretimini Etkileyen Koşulların Optimizasyonu

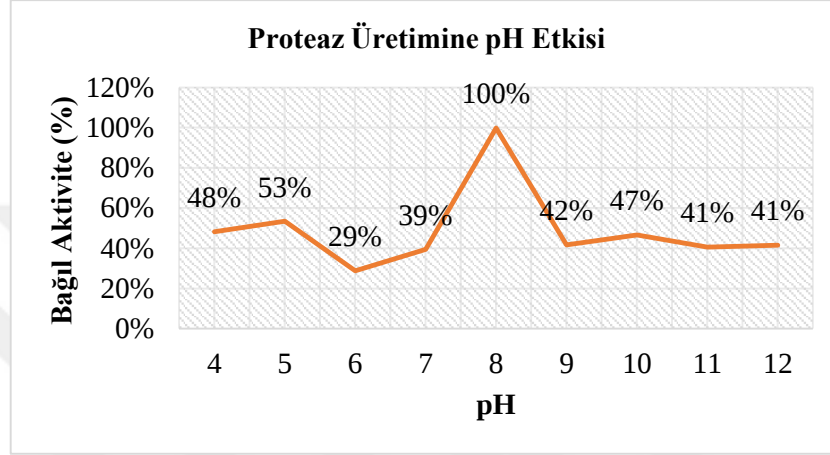
4.3.1. Sıcaklık ve pH'nın Sıvı Besiyerinde Enzim Üretimi Üzerine Etkisi

G17 suşu kullanılarak sıvı besiyerinde proteaz üretimi SM (Skimmed Milk) besiyerinde gerçekleştirilmiştir. Enzim üretimi süreçlerinde pH ve sıcaklık en önemli parametreler olduğu için, enzim üretimine pH ve sıcaklığın etkisi araştırılmış ve optimum koşullar belirlenmeye çalışılmıştır.

pH'nin etkisi

Sıvı besiyerinde enzim üretimi üzerine pH'nın etkisini belirlemek amacıyla, G17 suşunun N1 sıvı besiyerinde 18 saatlik taze kültürü hazırlanmış ve kültürün optik yoğunluğu McFarland ile 0,5'e ayarlanmıştır. pH 4,0-12,0 aralığında hazırlanan skimmed milk sıvı besiyerlerine %1 oranında taze kültür inoküle edilmiş ve 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Kültür +4°C'de 8000 d/dk'da santrifüj edilerek kültür canlı hücre/ölü hücrelerden oluşan katı fazdan ayrılmıştır. Santrifüjleme ile ayrıştırılan sıvı üst faz ile (enzim preparasyonu) standart aktivite tayini (kaynak) ile proteolitik

aktivite belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.3'te grafik olarak verilmiştir. Kontrole göre maksimum enzim aktivitesi pH 8,0'de saptanmıştır. pH 7,0'da bağıl aktivite %39 saptanırken, pH 9,0'da bağıl aktivite %42 saptanmıştır. Grafikte görüldüğü üzere pH 4,0-7,0 ve 9,0-12,0 aralıklarında ölçülen aktivitelere göre pH 8,0'da dikkate değer yüksek aktivite saptanmıştır. Bu çalışmada üretim suşu olarak belirlenen G17 suşu için üretim besiyerinin pH'sı 8,0 olduğunda en yüksek verimlilikte enzim üretilebileceği saptanmıştır. **Bir sonraki adım olan sıcaklığın etkisini belirlemek ve enzim karakterizasyonu amacıyla proteaz üretmek için besiyeri pH'sı 8,0 olarak kullanılacaktır.**

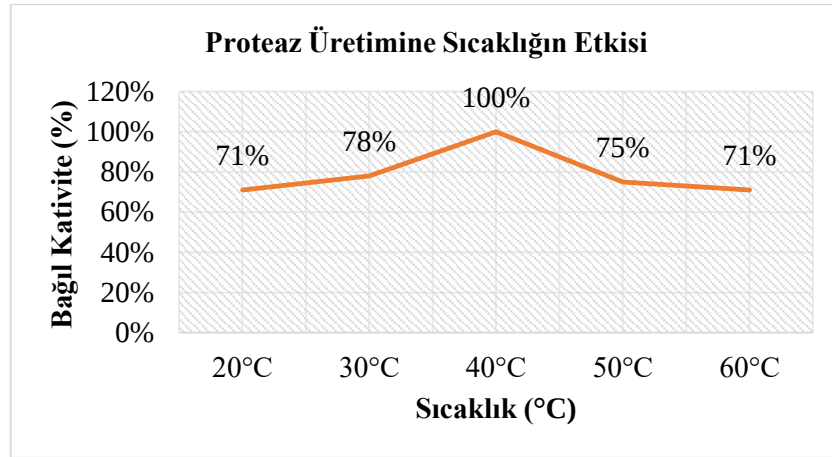


Şekil 4.3. Sıvı besiyerinde pH'nın enzim üretimi üzerine etkisi

Anandharaj ve arkadaşları (2016), *Bacillus alkalitelluris* TWI3 suşunun skimmed milk (azot kaynağı) içeren besiyerinde maksimum proteaz üretiminin 40°C sıcaklıkta ve pH 8,0'de gerçekleştiğini saptamıştır.

Sıcaklığın etkisi

Sıvı besiyerinde enzim üretimine sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla G17 suşunun N1 sıvı besiyerinde (pH= 8.0) 18 saatlik taze kültürü hazırlanmıştır. Beş farklı erleninde hazırlanan enzim üretim besiyerine (SM) optik yoğunluğu McFarland ile 0,5'e ayarlanmış kültürden %1 oranında taze kültür inoküle edilmiş ve enzim üretimi 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C'lerde 150 d/dk çalkalama hızında inkübatörde gerçekleştirilmiştir. İnkübasyondan sonra bakteri kültürü +4°C'de 8000 d/dk'da santrifüj edilmiş ve üst sıvı faz (enzim solüsyonu) alınarak farklı sıcaklıklarda üretilen enzimlerin aktivitesi standart aktivite tayini ile saptanmıştır. Sonuçlar bağıl aktivite cinsinden grafik olarak Şekil 4.4'te verilmiştir. Bu verilere göre en yüksek aktivite 40°C'de gözlenmiş ve G17 kullanılarak proteaz üretimi için optimum sıcaklığın 40°C olduğu belirlenmiştir. Test edilen diğer sıcaklıklarda %71-78 aralığında aktivite saptanması söz konusu suşun koşullara bağlı olarak psikrofilik ve termofilik koşullarda dahi üretim için kullanılabileceğinin göstergesidir. Sonuç olarak G17 suşundan en yüksek verimde enzim üretmek için mezofil koşullara gereksinim duyulmaktadır.

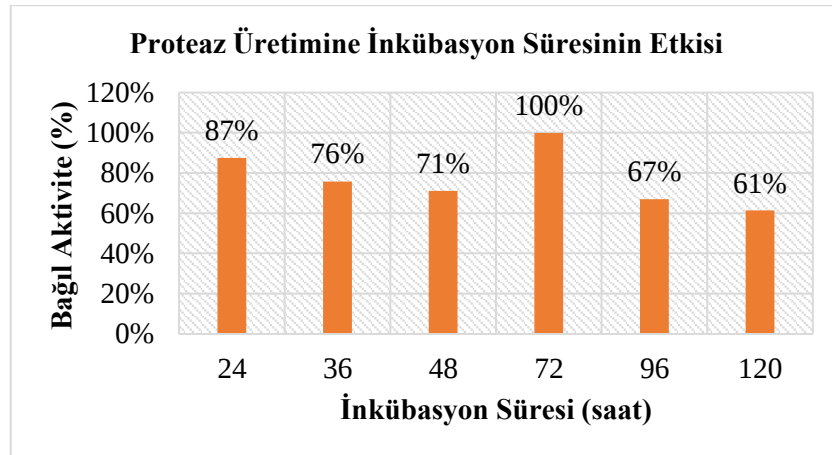


Şekil 4.4. Sıcaklığın enzim üretimi üzerine etkisi

4.3.2. Proteaz Üretiminde İnkübasyon Süresinin Etkisi

Endüstriyel süreçlerde mikroorganizmalardan enzim üretiminde inkübasyon süresinin önceden belirlenmesi enzimden maksimum verimin alınabilmesi için önemli bir adımdır. Böylece gereksiz enerji kullanılmasının önüne geçilmiş ve enzim verimi maksimum düzeyde sağlanmış olur.

Bu amaçla önceki adımlarda belirlenmiş optimum koşullarda (pH 8,0; 40°C inkübasyon sıcaklığı) hazırlanan SM besiyerlerine üretim suşu inoküle edilmiş ve inkübasyonun 24, 36, 48, 72, 96 ve 120. saatlerinde alınan örneklerin standart yöntemle proteolitik aktivitelerine bakılmıştır. Şekil 4.5'te verilen grafikte en yüksek enzim üretiminin 72. saatte gerçekleştiği belirlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan üretici suş olan G17 ile proteaz üretmek için inkübasyon süresinin 72. saatte sonlandırılması gerektiği sonucuna varılmıştır. 96. saatten sonra enzim veriminde %35-40 düzeyinde bir düşüş gözlenmiştir.



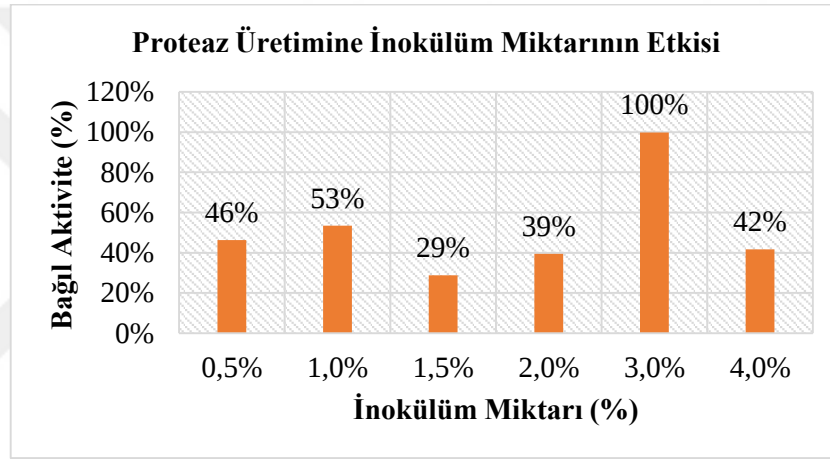
Şekil 4.5. Enzim üretiminde inkübasyon süresinin etkinliği

Shafique ve ark. (2021), *Bacillus subtilis* apr-IPL04 suşu ile maksimum proteaz üretiminin 72. saatte gerçekleştiği bildirilmiştir.

4.3.3. Proteaz Üretiminde İnokülüm Miktarının Etkisi

Enzim üretiminde maksimum verim için belirlenmesi önem arzeden parametrelerden biri de inokülüm miktarıdır. Bu amaçla, optimum pH ve sıcaklıkta skimmed milk içeren (enzim üretim besiyeri) besiyeri hazırlanmış ve sıvı besiyerlerine %0,5; %1; %1,5; %2; %3 ve %4 oranında 18 saatlik taze bakteri kültürü inoküle edilmiştir. Örnekler 40°C’de inkübe edilmiş ve santrifüjleme ile katı kısımdan ayrılan üst sıvı faz alınarak standart aktivite yöntemiyle proteolitik aktiviteleri belirlenmiştir. Şekil 4.6’da verilen grafikte görüldüğü gibi %3 oranında taze kültür eklenmiş denemede maksimum enzim aktivitesi sağlanmıştır. Enzim üretimi için en uygun aşılama oranının sırasıyla %3>%1>%0,5>%4>%2>%1,5 olduğu belirlenmiştir.

Shafique ve ark. (2021), *Bacillus subtilis* apr-IPL04 suşu ile proteaz üretimi için %3 inokülüm miktarı ile en yüksek verim alındığını bildirmişlerdir.



Şekil 4.6. Proteaz üretiminde inokülüm miktarının etkisi

Bu araştırmada; enzim üretimi için en uygun **pH** (Şekil 4.3), **sıcaklık** (Şekil 4.4), **inkübasyon süresi** (Şekil 4.5) ve **inokülüm miktarı** (Şekil 4.6) belirlendikten sonra bu parametreler bakımından elde edilen optimum koşullarda enzimin karakterizasyonu için üretim gerçekleştirilmiştir. Üretim koşullarının optimizasyon çalışmalarına göre; SM besiyerinde G17 suşu ile enzim üretmek için Çizelge 4.1’de özetlenen sonuçlar elde edilmiştir.

Çizelge 4.1. Proteaz üretimi için optimizasyon sonuçları

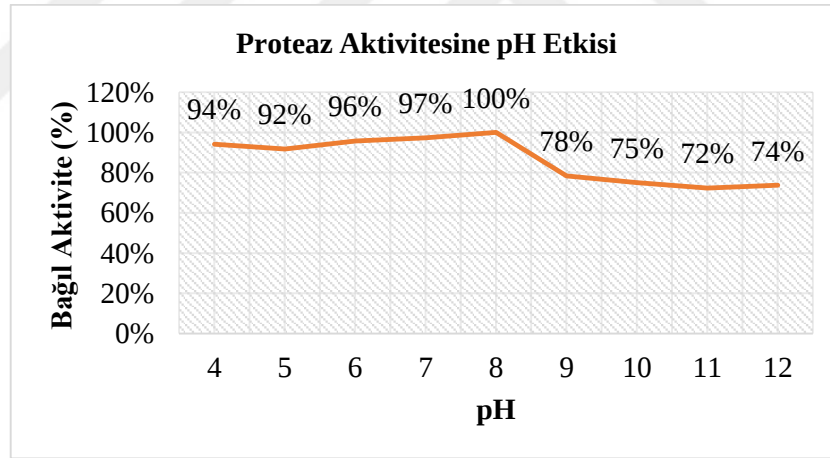
Üretim suşu	<i>Bacillus</i> sp. G17
Üretilen enzim	Proteaz
Besiyeri pH’sı	8,0
İnkübasyon sıcaklığı (C)	40
İnkübasyon süresi (saat)	72
İnokülüm miktarı (%)	3

4.3.4. Enzimin Karakterizasyonu

Sıcaklık ve pH'nın Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Üretim koşullarının optimizasyonundan sonra optimum koşullarda üretilen enzimin kullanıldığı/cağı endüstriyel süreçlerde maksimum verim ile çalışması beklenir. Mikrobiyal enzimlerin maksimum üreyebildiği pH ve sıcaklık koşulları, enzimin maksimum aktivite göstereceği pH ve sıcaklıktan farklı olabilmektedir. Bu nedenle endüstriye yönelik üretilmiş enzimlerin aktiviteleri üzerine pH ve sıcaklığın etkisi belirlenmeli ve etiket üzerine yazılmalıdır.

Bu gerçekten hareketle; optimum koşullarda üretilen enzimin aktivitesi pH 4,0-12,0 aralığında farklı tamponlar kullanılarak standart yöntemle belirlenmiş ve sonuçlar Şekil 4.7'de grafik ile gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre G17 proteazı en yüksek aktiviteyi pH 8,0'da göstermiştir. Maksimum aktivite pH 8,0'da belirlenmiş olmakla birlikte üretilen enzimin pH 4,0-8,5 aralığında çalışan proseslerde kullanılabileceği açıktır. Çünkü asidofil koşullarda bile aktivite yaklaşık %95 düzeyinde devam etmektedir. pH 9,0-12,0 aralığında ortalama %75 aktivite saptanmıştır. Söz konusu enzim asidik üretim koşulları gerektiren endüstriyel süreçlerde kullanılabilir nitelikte olup maksimum verim için pH 8,0'ın en uygun pH olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.7. pH'nın enzim aktivitesi üzerine etkisi

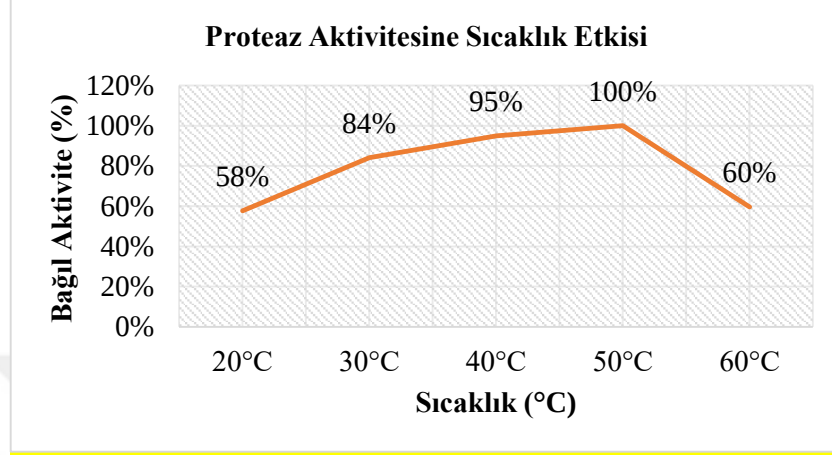
Avcı ve ark. (2020), *Bacillus* sp. EBTA6 suşundan izole edilen proteaz enziminin en yüksek aktiviteyi pH 8,0'de gösterdiğini bildirmişlerdir.

Manavalan ve ark. (2020), *Bacillus megaterium* TK1 suşundan üretilen proteazın pH 8,0'de maksimum aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Optimum üretim koşullarında üretilen proteaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla standart aktivite tayini reaksiyon sıcaklığı için beş farklı sıcaklık test edilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.8.'de grafiklendirilmiştir. G17 suşu kullanılarak proteaz üretimi için en uygun sıcaklığın 40°C olmasına karşın, enzimin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık 50°C olarak belirlenmiştir. Endüstriyel üretim prosesi koşullarına göre bu araştırmada üretilen proteaz enzimi

30°C-50°C aralıklarında kullanılabilir niteliktedir. 30°C'nin altı ve 55°C'nin üzerinde enzim aktivitesinde dramatik bir azalma gözlenmiştir.

Singh ve Batth (2020) *Bacillus lehensis* JO-26 ile yaptıkları çalışmada saflaştırdıkları alkali proteazın optimum sıcaklığının 50°C olduğunu belirtmiştir.



Şekil 4.8. Sıcaklığın enzim aktivitesi etkisi

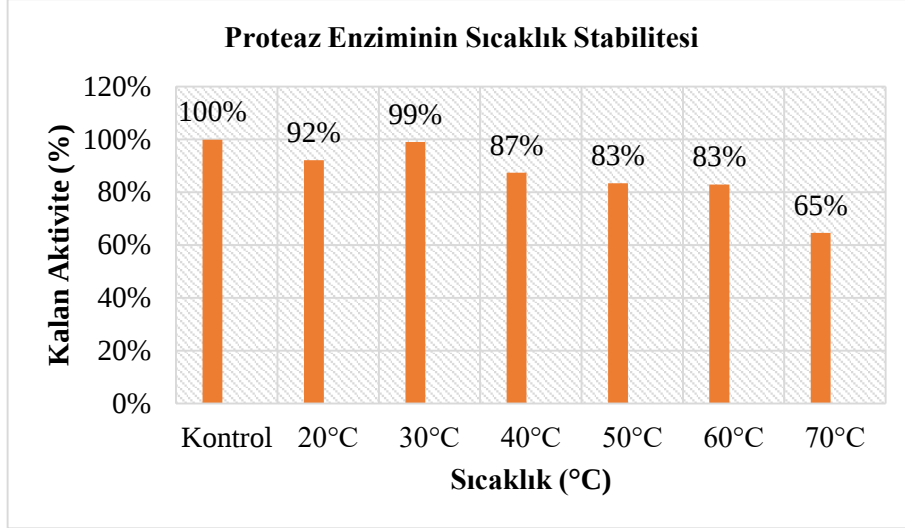
4.4. Sıcaklığın Enzim Kararlılığına (Stabilitesi) Etkisi

Mikrobiyal enzimler günümüzde endüstriyel üretim süreçlerinin pek çoğunda kullanılmaktadır ve dünya pazarında etkin bir rol oynamaktadır. Üretim süreçlerinde kullanılan enzimlerin pH, sıcaklık, çeşitli kimyasalların etkisi ile aktivite kayıplarının ne düzeyde olduğu bilinmeli ve üretim modülleri bu değerlere göre belirlenmelidir. Bu nedenle kararlılık deneyleri yapılarak, sonuçların etiket üzerine yazılması ticari bir zorunluluktur.

Enzim kararlılığına sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla; enzim preparasyonu 20, 30, 40, 50, 60 ve 70°C sıcaklıklarda 60 dk bekletilmiştir. İnkübasyon sonrasında standart aktivite tayini (50°C'de) yapılmış ve bulgular Şekil 4.9'da verilmiştir. Grafiğe göre; 20°C'de %92, 30°C'de %99, 40°C'de %87, 50°C'de %83, 60°C'de %83, 70°C'de %65 oranında enzim aktivitesi korunmuştur. Enzim, ön inkübasyona bırakılan tüm sıcaklıklarda ortalama %84,8 oranında aktivitesini korumuştur. 20-40°C aralığında ortalama %92,66 oranında, 50-70°C'lerde ortalama %77 oranında aktivite korunmuştur.

Adetunji ve Olaniran (2023) *Bacillus aryabhatai* Ab-15S suşundan izole ettikleri proteazın 40- 50°C sıcaklıkta stabilitesini koruyabildiğini bildirmişlerdir.

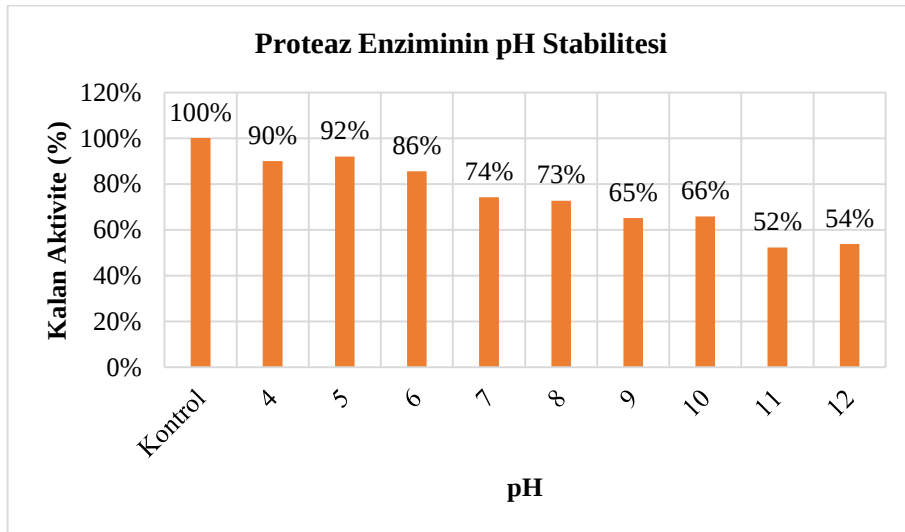
Avcı ve ark. (2020), *Bacillus* sp. EBTA6 suşu ile üretilen proteazın 50°C'de kararlı olduğunu bildirmişlerdir.



Şekil 4.9. Sıcaklığın enzim kararlılığına etkisi

4.5. pH'nın Enzim Kararlılığına (Stabilitesi) Etkisi

Bacillus sp. G17 suşundan üretilen proteazın farklı pH'larda kararlılık durumu incelenmiştir. Bu amaçla enzim preparasyonu pH 4,0-12,0 arasında 60 dk bekletildikten sonra optimum koşullarda (pH 8,0, t=50°C) standart yöntemle aktiviteleri ölçülmüş ve sonuçlar Şekil 4.10'da verilmiştir. Enzimin aktivitesi, pH 4,0'de %90, pH 5,0'de, pH %92, 6,0'da %86, pH 7,0'de %74, pH 8,0'de %73, pH 9,0'da %65, pH 10,0'da %66, pH 11,0'de %52 ve pH 12,0'de %54 oranında korunmuştur. Proteaz, pH 4,0-12,0 arasında tüm pH'larda ortalama %72,4 oranında aktivite göstermiştir. pH 4,0-8,0 aralığında ortalama %83,4 oranında, pH 9,0-12,0 aralığında ortalama %59,25 oranında aktivite korunmuştur. Sonuçlara göre söz konusu enzimin asidik koşullarda daha yüksek verimle sürece dahil olacağı, alkali pH'larda yaklaşık %35-46 oranında aktivite kaybına uğrayacağı saptanmıştır. Bu sonuçlardan enzimin asidofil/asit tolerant olarak ifade edilebileceği sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.10. pH'nın enzim kararlılığına etkisi

Kotb ve arkadaşları (2023) *Bacillus* sp. Mar64 suşundan izole ettikleri proteazın pH 7,0-12,0 aralığında ve Anandharaj ve arkadaşlarının (2016), *Bacillus alkalitelluris* TWI3 suşundan izole ettikleri proteaz enziminin pH 6,0-12,0 aralığında stabil olduğunu bildirmişlerdir.

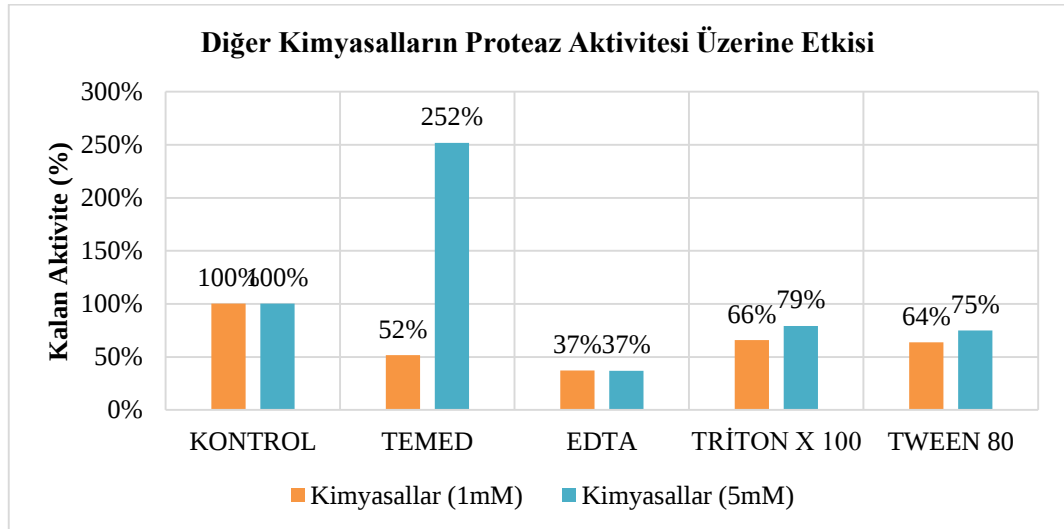
Çizelge 4.2. pH ve sıcaklığın proteaz aktivitesine etkisi ile ilgili sonuç özeti

Test edilen pH'lar	4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0, 12.0
Optimum pH	8.0
Test edilen sıcaklıklar (°C)	20, 30, 40, 50, 60, 70, 80
Optimum sıcaklık (°C)	50

4.6. Kimyasalların Enzim Kararlılığına Etkisi

Endüstriyel süreçlerde kullanılacak enzimlerin aktivitesi pH ve sıcaklık değişimlerinden ve sürece dahil olma olasılığı olan bazı kimyasallardan etkilenebilmektedir. Bazı kimyasallar, ağır metaller ve deterjan gibi ajanlar enzim aktivitesini olumlu/olumsuz yönde etkileyebilmektedirler.

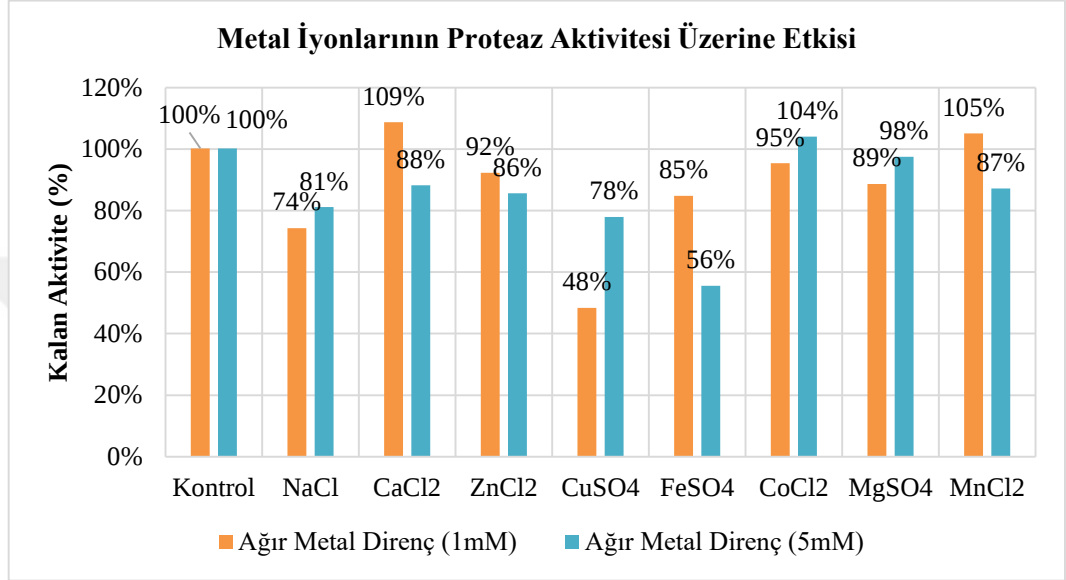
Bu sebeple kimyasalların enzim aktivitesi üzerindeki etkinliklerinin test edilmesi önemlidir. G17 suşundan üretilen proteaz son konsantrasyonları 1 mM ve 5 mM olmak üzere çeşitli kimyasallarla muamele edilerek 60 dk bekletilmiştir. İnkübasyonu takiben önceki adımlarda belirlenmiş optimum koşullarda standart proteaz aktivite tayini yapılmış ve bulgular Şekil 4.11'de verilmiştir. Grafiğe göre 5 mM TEMED ile proteaz aktivitesinin dikkate değer düzeyde arttığı, Triton X-100, Tween 80 ve EDTA'nın 1 mM ve 5 mM konsantrasyonlarının tümünün enzim aktivitesini düşürdüğü gözlenmiştir. EDTA varlığında aktivitede %73 oranında azalma saptanması enzimin bir **metalloproteaz** olabileceğine işaret etmektedir.



Şekil 4.11. Kimyasalların enzim aktivitesine etkileri

4.7. Metal İyonlarının Proteaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Metal iyonlarının enzim aktivitesine etkisini test etmek amacıyla enzim preparasyonuna son konsantrasyonları 1 ve 5 mM olarak ayarlanan NaCl, CaCl₂, ZnCl₂, CuSO₄, FeSO₄, CoCl₂, MgSO₄, MnCl₂ metal bileşikleri eklenmiş ve aktivite tayini yapılmıştır. Enzim aktivitesinin 1 mM CaCl₂ ve MnCl₂ varlığında sırası ile %9 ve %5 oranında indüklendiği saptanırken 5 mM CuSO₄ varlığında %52 ve 5 mM FeSO₄ varlığında %44 aktivite kaybı görülmüştür.



Şekil 4.12. Metal İyonlarının enzim kararlılığına etkisi

Fahmy ve El-Daab (2023), *Bacillus* sp. HAL1 suşunun Mn²⁺, Mg²⁺ ve Ca²⁺ iyonu ile proteaz aktivitesinin büyük ölçüde arttığını belirtmişlerdir.

Ramalingam ve ark. (2022) süt ürünleri atıklarının döküldüğü topraktan izole ettikleri *Bacillus subtilis* VBC7 suşunun Mg²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺ iyonları varlığında aktivitesinin arttığını bildirmiştir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Proteazlar, proteinlerde bulunan peptit bağlarının parçalanmasını katalizleyen ve endüstrinin pek çok alanında kullanılan en önemli enzim sınıfıdır. Endüstriyel uygulamalar için üretilen biyomoleküllerin %25'ten fazlasını ve tüm enzim pazarının %60'ını oluştururlar (Savitha ve ark., 2011; Novelli ve ark., 2016).

Mikrobiyal proteazlar; ilaç, deterjan, deri, atık ve gıda endüstrileri gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Gıda endüstrisinde et yumuşatma, bira, şarap, sirke ve peynir yapımının yanı sıra ekmek, pizza, bisküvi gibi unlu mamullerin hazırlanması gibi birçok alanda kullanılırlar. Sağlık sektörlerinde proteazlar; X-ışını filmlerinden gümüşün geri kazanılmasında, kanser, HIV, enflamatuar hastalıklar ve diyabet gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde terapötik ajanlar olarak da kullanılmaktadırlar (Novelli ve ark., 2016; Naeem ve ark., 2022).

Mikrobiyal proteazlar doğal izolatlardan kolaylıkla üretilebileceği gibi, genetik manipülasyonlarla konak organizmada iyileştirmeler yapılarak, rekombinant endüstriyel suşların elde edilmesi günümüzde biyoteknolojik yöntemlerle hızlı ve kolaydır.

Bu Yüksek Lisans tez çalışmasında; proteaz enzim üreticisi *Bacillus* cinsine ait G17 suşu küçükbaş hayvan kesimhanesi atık toprağından elde edilen doğal izolatdır. Örneklem alanı seçilirken protein içeren habitat tercih edilmiştir çünkü; protein kirliliği söz konusu olan atıklarda proteolitik bakteriler mutlaka bulunurlar.

Bu çalışma için söz konusu habitatın 8 farklı alanından alınan toprak örneğinden *Bacillus* cinsine ait 203 suş izole edilmiştir. Yağı alınmış süt tozunun substrat olarak eklendiği (Skimmed-Milk) agarda ve enzim üretim besiyerinden alınan örneklerde proteolitik aktivite gösteren 71 izolat içerisinde en yüksek aktivite gösteren *Bacillus* sp. G17 suşu bu çalışmada üretici suş olarak kullanılmıştır.

Bacillus sp. G17 suşu kullanılarak Proteaz üretimi için üretim koşullarının optimizasyonu sonucunda; besiyeri pH'sı 8,0, inkübasyon sıcaklığı 40 °C, inkübasyon süresi 72 saat ve inokulum miktarı %3 olarak belirlenmiştir.

Optimize koşullarda üretilen proteazın karakterizasyonu amacıyla sıcaklık ve pH'nın etkisi ayrıca sıcaklık, pH ve bazı kimyasalların enzim kararlılığına etkinliği araştırılmıştır. En yüksek aktivite pH 8,0 ve 50°C'de saptanmıştır. Enzim; 20-50 °C sıcaklıklarda aktivitesini yüksek oranda korumuş, en fazla aktivite kaybı 60 °C'de %17 oranında saptanmıştır. Test edilen pH'lar için pH 4,0-6,0 aralığında aktivite yüksek oranda korunmuş ve pH 7,0'nin üzerinde dikkate değer düzeyde (%26) aktivite kaybı saptanmıştır.

Kimyasalların etkinliği test edilmiş ve 5 mM TEMED ile proteaz aktivitesinin dikkate değer düzeyde arttığı, Triton X-100, Tween 80 ve EDTA'nın 1 mM ve 5 mM konsantrasyonlarının tümünün enzim aktivitesini düşürdüğü gözlenmiştir. EDTA varlığında aktivitede %73 oranında azalma saptanması enzimin bir metalloproteaz olabileceğini göstermiştir. Metal iyonlarının etkinliği

test edildiğine; enzim aktivitesinin 1 mM CaCl₂ ve MnCl₂ varlığında sırası ile %9 ve %5 oranında indüklendiği saptanırken 5 mM CuSO₄ varlığında %52 ve 5 mM FeSO₄ varlığında %44 aktivite kaybı görölmüşür.

Bu çalışma özelinde; *Bacillus* G17 izolatı kullanılarak üretilen proteazın karakterizasyonu dikkate alındığında 50-60°C'lerde ve pH 4,0-6,0 aralığında uygulanacak üretim süreçlerinde kullanılabilecek bir metallaproteaz olduğu söylenebilir.

Dünya enzim pazarı için proteazın payı %60 düzeyindedir. Bu gerçeklikten hareketle; doğal habitatlardan izole edilen/lecek mikroorganizmaların proteaz kaynağı olarak kullanılması ve genetik manipölasyonlar için önemli gen kaynakları olabilme potansiyeli nedeniyle ölke ekonomisi için önem arz etmektedir. Bu alandaki çalışmaların devam etmesi, detaylandırılması ve endüstriyel üretimler için temel oluşturulması hatta endüstriyel boyutta üretimler yapılabilmesi için gayret edilmesi öneri olarak söylenebilir.



KAYNAKLAR

- Adetunji, A.I.; Olaniran, A.O. (2023). Biocatalytic Profiling of Free and Immobilized Partially Purified Alkaline Protease from an Autochthonous *Bacillus aryabhattai* Ab15-ES. *Reactions*, 4, 231–245.
- Afşar, A., (2008). A Research on Increasing The Effectiveness Of Degreasing Process By Using Enzymes. *Microbiol. Res.* P: 45-53.
- Akcan, N., & Uyar, F. (2010). Protease production by *Bacillus subtilis* RSKK96 with submerged fermentation. *Kafkas Üniv. Fen Bil. Enst. Derg.* 3(1), 33-38.
- Anandharaj, M., Sivasankari, B., Siddharthan, N., Rani, R. P., & Sivakumar, S. (2016). Production, purification, and biochemical characterization of thermostable metallo-protease from novel *Bacillus alkalitelluris* TWI3 isolated from tannery waste. *Applied biochemistry and biotechnology*, 178(8), 1666-1686.
- Asha, B., Palaniswamy, M. (2018). Optimization of alkaline protease production by *Bacillus cereus* FT 1 isolated from soil. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 8(2): 119-127.
- Avcı, A., Değirmen, M., & Akcay, F. A. (2022). Investigation of lentil flour utilization for the production of protease by *Bacillus subtilis* ZBP4. *Biocatalysis and Biotransformation*, 40(1), 75-81.
- Bajaj, B. K., Singh, S., Khullar, M., Singh, K., & Bhardwaj, S. (2014). Optimization of fibrinolytic protease production from *Bacillus subtilis* I-2 using agro-residues. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57, 653-662.
- Banerjee, S., Maiti, T. K., & Roy, R. N. (2022). Enzyme producing insect gut microbes: an unexplored biotechnological aspect. *Critical Reviews in Biotechnology*, 42(3), 384-402.
- Bornscheuer, U., Huisman, G., Kazlauskas, R., Lutz, S., Moore, J., and Robins, K. (2012). Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature* 485:185.
- Çelik, N. (2006). *Bacillus clausii* GMBAE 42'den saflaştırılan Alkalın Proteazın termal inaktivasyon kinetiğinin belirlenmesi ve Cu⁺² iyonları ile termostabilizasyonu. Kocaeli Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli.
- Danilova, I., & Sharipova, M. (2020). The practical potential of bacilli and their enzymes for industrial production. *Frontiers in microbiology*, 11, 1782.
- Dhayalan, A., Velramar, B., Govindasamy, B., Ramalingam, K. R., Dilipkumar, A., & Pachiappan, P. (2022). Isolation of a bacterial strain from the gut of the fish, *Systomus sarana*, identification of the isolated strain, optimized production of its protease, the enzyme purification, and partial structural characterization. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 20(1), 24.

- Duran, K., E., Bozacı, H.A., Karahan, (2007). Protein Esaslı Mamüllerin Enzimatik Ön Terbiyesi, Ege Üniversitesi Tekstil Mühendisliği Bölümü. Tekstil ve Konfeksiyon Araştırma Uygulama Merkezi Yayını, P: 17-3.
- Estell, D. A., Graycar, T. P., and Wells, J. A. (1985). Engineering an enzyme by site-directed mutagenesis to be resistant to chemical oxidation. *J. Biol. Chem.* 260, 6518–6521.
- Fahmy, N. M., & El-Deeb, B. (2023). Optimization, partial purification, and characterization of a novel high molecular weight alkaline protease produced by *Halobacillus* sp. HAL1 using fish wastes as a substrate. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 21(1), 48.
- Gupta, R., & Ramnani, P. (2006). Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Applied microbiology and biotechnology*, 70, 21-33.
- Gupta, R., Beg, Q., & Lorenz, P. (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 59, 15-32.
- Harish R. and Chauhan, B. J. (2017). Isolation, characterization of protease producing microbes from soil of agriculture land and purification of protease. *International Journal of Pharma Research and Health Sciences*, 5 (1):1581- 1585.
- Horikoshi, K., (1999). Alkaliphiles: Some applications of their products for biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, p. 735-750.
- J. B., Jang, E. J., Charalampopoulos, D., Wee, Y. J. (2018). Purification and Characterization of Microbial Protease Produced Extracellularly from *Bacillus subtilis* FBL-1. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 23: 176-182.
- Jacobson, J. W., Glick, J. L., and Madello, K. L. (1985). Composition for Cleaning Drains Clogged With Deposits Containing Hair. Google Patents.
- Jankorazov, A., Xolmamatova, D., & Murodboyeva, M. (2023). ENZYMES AND THEIR INDUSTRIAL APPLICATION METHODS. *International Bulletin of Engineering and Technology*, 3(3), 102-107.
- Johnvesly, B.; Naik, G. R. (2001). Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. *Process. Bioch.*, 37, 139– 144
- Karmakar S.R., (1999). Chemical Technology in The Pretreatment Process of Textiles, Elsevier Science B.V. P:18-24.
- Kotb E, Alabdalall AH, Alsayed MA, Alghamdi AI, Alkhaldi E, AbdulAzeez S, Borgio JF. (2023). Isolation, Screening, and Identification of Alkaline Protease-Producing Bacteria and Application of the Most Potent Enzyme from *Bacillus* sp. Mar64. *Fermentation.*; 9(7):637.
- Langmaier, F., M., Mladek, K., Kolomaznik, S., Sukop. (2002). Isolation of elastin and collagen polypeptides from long cattle tendons as raw material for the cosmetic industry. CZECH REPUBLIC. P:1-9.

- Leighton, T.J., Doi, R. H., Warren, R.A.J., Kelln, R.A. (1973). The Relationship of SerineProtease Activity to RNA Polymerase Modification and Sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Biology*, 76: 103-22.
- Maccabe, A.P. (2007). *Industrial Enzymes Structure, Function And Applications*, J. Polaina, Editor.. P. 161-243.
- Mahajan, R. ve Badgujar, S. (2010). Biological aspects of proteolytic enzymes: A review. *Journal of Pharmacy Research* 3 (9): 2048-2068.
- Manavalan, T., Manavalan, A., Ramachandran, S., & Heese, K. (2020). Identification of a novel thermostable alkaline protease from *Bacillus megaterium*-TK1 for the detergent and leather industry. *Biology*, 9(12), 472.
- Maruthiah, T., & Palavesam, A. (2017). Characterization of haloalkalophilic organic solvent tolerant protease for chitin extraction from shrimp shell waste. *International journal of biological macromolecules*, 97, 552-560.
- Moraga AR, Nohales PF, Perez JA, Gómez-Gómez L (2004). "Glucosylation of the saffron apocarotenoid crocetin by a glucosyltransferase isolated from *Crocus sativus* stigmas." *Planta*, 219(6): 955-966.
- Mothe, T., & Sultanpuram, V. R. (2016). Production, purification and characterization of a thermotolerant alkaline serine protease from a novel species *Bacillus caseinilyticus*. *3 Biotech*, 6, 1-10.
- Naeem, M., Manzoor, S., Abid, M.U., Tareen, M.B.K., Asad, M., Mushtaq, S., Ehsan, N., Amna, D., Xu, B., Hazafa, A. (2022). Fungal Proteases as Emerging Biocatalysts to Meet the Current Challenges and Recent Developments in Biomedical Therapies: An Updated Review. *J Fungi (Basel)*. 24;8(2):109.
- Naveed, M., Nadeem, F., Mehmood, T., Bilal, M., Anwar, Z., & Amjad, F. (2021). Proteasea versatile and ecofriendly biocatalyst with multi-industrial applications: an updated review. *Catalysis Letters*, 151, 307-323.
- Nduka, O. (2007). *Modern industrial microbiology and biotechnology: biocatalysts: immobilized enzymes and immobilized cells*. Published by Science Publishers, South Carolina, USA, 398-416.
- Nilegaonkar, S. S., Zambare, V. P., Kanekar, P. P., Dhakephalkar, P. K., & Sarnaik, S. S. (2007). Production and partial characterization of dehairing protease from *Bacillus cereus* MCM B-326. *Bioresource technology*, 98(6), 1238-1245.
- Novelli, P.K., Barros M.M., Fleuri L.F. (2016). Novel inexpensive fungi proteases: Production by solid state fermentation and characterization. *Food Chem.* 1;198: 119-24.
- Prabhavathy, G., Rajasekara, M., Pandian and Senthilkumar, B. (2013). Identification of industrially important alkaline protease producing *Bacillus subtilis* by 16s rRNA sequence analysis and

- its applications. International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences, 4:332-338.
- Ramalingam, K., Nandhi, P., Murugan, R., & Venkatesan, R. (2022). Physical and chemical characterization of alkaline protease from *Bacillus subtilis* vbc7 using agro waste as substrate: Characterization of alkaline protease. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 12(3), e5301.
- Rani, R., Rana, R., Datt, S. (2012). Review on latest overview of proteases. International Journal of Current Life Sciences, 2(1):12–18.
- Rao, k., and Narasu, L. M. (2007). Alkaline protease from *Bacillus firmus* 7728. African Journal of Biotechnology, 6:2493-2496.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiology and Molecular Biology Research, 62(3):597-635.
- Regmi, S., Choi, Y.H., Choi, Y.S. *et al.* (2017). Antimicrobial peptide isolated from *Bacillus amyloliquefaciens* K14 revitalizes its use in combinatorial drug therapy. *Folia Microbiol* **62**, 127–138.
- Sahin, S., Ozmen, I., Kir, E. (2015). Purification, immobilization, and characterization of protease from local *Bacillus subtilis* M-11. Asia-Pac. J. Chem. Eng., 10: 241-247.
- Savitha, S., Sadhasivam, S., Swaminathan, K. (2011). Fungal protease: production, purification and compatibility with laundry detergents and their washperformance. J Taiwan Inst. Chem.Eng. 42:298–304
- Shafique, T., Shafique, J., Zahid, S., Kazi, M., Alnemer, O., & Ahmad, A. (2021). Screening, selection and development of *Bacillus subtilis* apr-IBL04 for hyper production of macromolecule alkaline protease. *Saudi journal of biological sciences*, 28(2), 1494–1501.
- Shah, K., Mody, K., Keshri, J., Jha, B. (2010). Purification and characterization of a solvent, detergent and oxidizing agent tolerant protease from *Bacillus cereus* isolated from the Gulf of Khambhat. J. Mol. Catal. B-Enz., 67: 85-91
- Shamsi, T. N.; Parveen, R.; Fatima, S. (2016). Characterization, biomedical and agricultural applications of protease inhibitors: A review. Int. J. Biol. Macromol., 91, 1120– 1133
- Shanlin, F., Stocker, R., and Davies, M. J. (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. Biochem. J. 324, 1–18
- Sharma, C., Salem, G. E. M., Sharma, N., Gautam, P., & Singh, R. (2019). Thrombolytic Potential of Novel Thiol-Dependent Fibrinolytic Protease from *Bacillus cereus* RSA1. *Biomolecules*, 10(1), 3.
- Singh SP. and Bhatt HB. (2020). Cloning, Expression and Structural Elucidation of A Biotechnologically.

- Singh, J., Batra, N., and SOBRI, C., 2001. Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1. *Process Biochemistry*, 36: 781-785.
- Temizkan, G. ve Arda, N., 2004. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul. 345
- Tennalli GB, Garawadmath S, Sequeira L, Murudi S, Patil V, Divite MN, Hungund BS. (2022). Media optimization for the production of alkaline protease by *Bacillus cereus* PW3A using response surface methodology. *J App Biol Biotech. J App Biol Biotech.*;10(4):17-26.
- Ullah, N.; Rehman, M.U.; Sarwar, A.; Nadeem, M.; Nelofer, R.; Shakir, H.A.; Irfan, M.; Idrees, M.; Naz, S.; Nabi, G.; et al. (2022). Purification, Characterization, and Application of Alkaline Protease Enzyme from a Locally Isolated *Bacillus cereus* Strain. *Fermentation*, 8, 628.
- Usharani, B., Muthuraj, M., Kaur, M., Dhillon, S., & Chaudhary, K. (2009). Production and characterization of protease enzyme from *Bacillus laterosporus*. *Global. J. Molecul. Sci*, 4, 180-186.
- Van Dijk, J., & Hecker, M. (2013). *Bacillus subtilis*: from soil bacterium to super-secreting cell factory. *Microbial cell factories*, 12(1), 1-6.
- Vijayaraghavan, P., Lazarus, S., & Vincent, S. G. P. (2014). De-hairing protease production by an isolated *Bacillus cereus* strain AT under solid-state fermentation using cow dung: Biosynthesis and properties. *Saudi journal of biological sciences*, 21(1), 27-34.
- Yang, J., Shih, I., Tzeng, Y. ve Wang, S. 2000. Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. *Enzyme and Microbial Technology* 26 (5-6): 406-413.
- Yardımcı, E. 2014. *Geobacillus subterraneus* ile Proteaz Üretimi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir.



ÖZGEÇMİŞ

Gizem AYVAZOĞLU. İlk ve orta öğrenimini Adana’da tamamladı. 2007 yılında Kayseri Erciyes Üniversitesi Biyoloji Bölümü’nü kazandı ve 2011 yılında bu bölümden mezun oldu. 2018 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda başladığı yüksek lisans eğitimini sürdürmektedir.

