



T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***BACILLUS SUBTILIS MEGATHERIUM* BAKTERİ TÜRÜNDEN
PROTEAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI ve
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

Bekir ERDOĞAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SAĞLIK VE BİYOMEDİKAL BİLİMLER (DİSİPLİNLER ARASI)
ANABİLİM DALI

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Şevkinaz KONAK

BURDUR-2020

T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***BACILLUS SUBTILIS MEGATHERIUM* BAKTERİ TÜRÜNDEN
PROTEAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI ve
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

Bekir ERDOĞAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SAĞLIK VE BİYOMEDİKAL BİLİMLER (DİSİPLİNLER ARASI)
ANABİLİM DALI

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Şevkinaz KONAK

Bu Araştırma Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından 0587-YL-19 proje numarası ile desteklenmiştir.

BURDUR-2020

KABUL ve ONAY

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Bekir ERDOĞAN tarafından **Dr.Öğr.Üyesi Şevkinaz KONAK** yönetiminde hazırlanan **“Bacillus Subtilis Megatherium Bakteri Türünden Proteaz Enziminin Saflaştırılması ve Özelliklerinin İncelenmesi”** başlıklı tez çalışması jüri üyeleri olarak tarafımızdan okunmuş; kapsamı ve niteliği açısından Sağlık Ve Biyomedikal Bilimler (Disiplinler Arası) Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak oy birliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Sınavı Tarihi 21/08/2020

Dr.Öğr.Üyesi Sıddıka
ERSOY
Süleyman Demirel
Üniversitesi
Başkan

Dr.Öğr.Üyesi Şevkinaz
KONAK
Burdur Mehmet Akif
Ersoy Üniversitesi
Jüri

Dr.Öğr.Üyesi E.Hilal
ŞENER
Burdur Mehmet Akif
Ersoy Üniversitesi
Jüri

ONAY

Bu tez, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Lisans Üstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu ... / ... / Tarih vesayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof.Dr. M.Doğa
TEMİZSOYLU
Müdür
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezim sırasında tez konumun belirlenmesinden itibaren her aşamada desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Şevkinaz KONAK'a sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım. Tez çalışmam esnasında bana desteklerini esirgemeyen ve her zaman yanımda olduklarını hissettiren aileme teşekkür ederim. 0587-YL-19 No'lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Bekir ERDOĞAN

Burdur, 2020

ETİK BEYAN

“Bacillus Subtilis Megatherium Bakteri Türünden Proteaz Enziminin Saflaştırılması ve Özelliklerinin İncelenmesi” başlıklı tez çalışmamdaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Dr.Öğr.Üyesi Şevkinaz KONAK danışmanlığında Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığını beyan ederim.

Bekir ERDOĞAN
21.08.2020



İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK	i
KABUL ve ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
ETİK BEYAN	iiiv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER	vii
TABLolar	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
ÖZET	x
İNGİLİZCE ÖZET(ABSTRACT)	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Enzimler	2
2.1.1. Enzimlerin Sınıflandırılması	3
2.1.2. Proteazlar	4
2.1.2.1. Ekzopeptidazlar	7
2.1.2.2. Endopeptidazlar	8
2.1.3. Proteaz kaynakları	9
2.1.3.1. Bitkisel kaynaklar	9
2.1.3.2. Hayvansal kaynaklar	9
2.1.3.3. Mikrobiyal kaynaklar	10
2.1.4. Endüstriyel açıdan alkali proteazlar	11
2.1.4.1. Süt teknolojisinde alkali proteazlar	11
2.1.4.2. Deri endüstrisinde proteazlar	12
2.1.4.3. Deterjan endüstrisinde alkali proteazlar	12
2.1.4.4. Gıda sanayisinde proteazlar	13
2.1.4.5. Kozmetik ve ilaç sanayisinde proteazlar	13
2.1.5. Tez çalışmasında kullanılan <i>Bacillus subtilis</i> 'in özellikleri	13
3. MATERYAL VE YÖNTEM	15
3.1 Kullanılan Malzemeler	15
3.2. Kullanılan Cihazlar	16
3.3. Kullanılan Çözelti ve Tamponlar	17
3.4. Metot	19

3.4.1. Santrifüjleme	19
3.4.2. Çöktürme	19
3.4.3. Diyaliz	20
3.4.4. İyon Değiştime Kromatografisi	20
3.4.5. SDS-PAGE	21
3.5. <i>Bacillus</i> Türlerinden Proteaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması	21
3.5.1. <i>Bacillus</i> Türü Bakterilerin Genel Özellikleri	21
3.5.2. Besiyerinin Hazırlanması ve Ekim İşlemi	22
3.5.3. Amonyum Sülfat ile Çöktürme	23
3.5.4. Diyaliz	24
3.5.5. İyon Değiştirme Kromatografisi	24
3.5.6. Aktivite Tayini	24
3.5.7. Protein Tayini	26
3.5.8. Aktivite ve Spesifik Aktivite Hesabı	28
4. BULGULAR	29
4.1. Çalışma 1	29
4.2. Çalışma 2	31
4.3. <i>Bacillus subtilis megatherium</i> ’dan Elde Edilen Proteaz Enziminin Özelliklerinin İncelenmesi	34
5. TARTIŞMA	37
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	40
KAYNAKLAR	41
ÖZGEÇMİŞ	48

ŞEKİLLER

Şekil 3.1. Trosin standart eğrisi	25
Şekil 3.2. BSA standart eğrisi(280 nm)	27
Şekil 3.3. BSA standart eğrisi (BCA Yöntemi)	27
Şekil 4.1. Bacillus subtilis megatherium spesifik aktivite-zaman eğrisi (Ç1)	30
Şekil 4.2. Bacillus subtilis megatherium spesifik aktivite-zaman eğrisi (Ç2)	33
Şekil 4.3. SDS-PAGE ile molekül ağırlığı tayini	36



TABLÖLAR

Tablo 2.1. Proteazların yıllık kullanım oranları	6
Tablo 2.2. Proteaz sınıflandırılması	7
Tablo 4.1. <i>Bacillus subtilis megatherium</i> spesifik aktivite-zaman değerleri (Ç1)	30
Tablo 4.2. <i>Bacillus subtilis megatherium</i> spesifik aktivite-zaman değerleri (Ç2)	32
Tablo 4.3. <i>Bacillus subtilis megatherium</i> 'dan elde edilen proteaz enziminin kısmi saflaştırılması (Ç2)	33

SİMGELER ve KISALTMALAR

APS	Amonyum persülfat
ATP	Adenintrifosfat
BCA	2,2-biçinolil 4,4-dikarbonik asit
BP	<i>Bacillus polymxa</i>
BSA	Bovin serum albümin
BSM	<i>Bacillus Subtilis megatherium</i>
CM	Karboksimetil
DEAE	Dietilaminoetil
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
KDa	Kilodalton
NTA	Nitrilotriasetik asit
SDS-PAGE	Sodyumdodasilsülfat-poliakrilamid jelelektroforez
TCA	Trikloroasetikasit
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilelendiamin
U	Ünite

ÖZET

Bacillus Subtilis Megatherium Bakteri Türünden Proteaz Enziminin Saflaştırılması ve Özelliklerinin İncelenmesi

Enzimler canlı organizmalar tarafından üretilen, önemli biyolojik reaksiyonların çalışma hızını etkileyen biyokatalizörlerdir. Enzim teknolojisi günümüzde hızla gelişmekte olup, çıkan ürünlerin çeşitliliği ve ekonomik değerlerinin yüksek olması sebebiyle hızla önem kazanmaktadır. Bu alanda kullanılan en önemli enzim proteazdır. Proteazlar deterjan, gıda, ilaç ve deri sanayisinde çok sık kullanılmaktadır. Enzimlerin %60'ından büyük bir payı mikroorganizma kaynaklıdır. Çalışmamızın amacı *Bacillus subtilis megatherium* bakterisinden proteaz enziminin saflaştırılması ve özelliklerinin belirlenmesidir. Çalışmanın ilk basamağında enzimin uygun şartlarda üretimi sağlanmıştır. Saflaştırma için diyaliz, amonyum sülfatla çöktürme ve DEAE-Sefaroz iyon değişim kromatografi yöntemleri yapılmıştır. İşlemler sonrasında ham homojenat spesifik aktivite 10.2 U/mg bulunmuştur. %80'lik çöktürme işleminden sonra çözelti spesifik aktivitesi 12.9 U/mg' dır. Doyurma sonrası 1.2 kat saflaştırma sağlanmıştır. Proteaz enziminin optimum sıcaklık, sıcaklık kararlılığı, optimum pH ve pH kararlılığı; reaksiyon üzerine inhibitör ve aktivatör etkisi, reaksiyonun süresine ve substratın etkisine bakılmış olup molekül ağırlığı tayini yapılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Alkaline proteaz, *Bacillus subtilis*, Saflaştırma.

ABSTRACT

Purification and Analysis of the Properties of the Prostheses Enzymes from *Bacillus Subtilis Megatherium* Bacteria

Enzymes are biocatalysts produced by living organisms that affect the working speed of important biological reactions. Enzyme technology is developing rapidly today and is gaining importance due to the diversity of products and economic values. The most important enzyme used in this field is protease. Proteases are used very frequently in the detergent, food, pharmaceutical and leather industries. More than 60% of the enzymes are sourced from microorganisms. The aim of our study is to purify the protease enzyme from *Bacillus subtilis megatherium* bacteria and to determine its properties. In the first step of the study, the production of the enzyme was provided under suitable conditions. For purification, dialysis, precipitation with ammonium sulfate and *DEAE-Sepharose* ion exchange chromatography methods were performed. The crude homogenate specific activity was found 10.2 U / mg after the procedures. After 80% precipitation, the solution specific activity was 12.9 U / mg. 1.2 times purification was achieved after saturation. Protease enzyme's optimum temperature, temperature stability, optimum pH and pH stability; the inhibitory and activator effects on the reaction, the duration of the reaction and the effect of the substrate were examined and molecular weight was determined.

Keywords: Alkaline protease, *Bacillus subtilis*, Purification.

1. GİRİŞ

Enzimler, yaşayan canlılarda oluşan tepkimelerin uygun şartlarda gerçekleşmesini sağlayan ve bu tepkimeleri düzenleyen, çoğunlukla protein yapısındaki özelleşmiş biyokatalizörlerdir. Hücrelerin yapısında önemli metabolik görevleri olan enzimler uzun yıllardan beri insanlar tarafından kullanılmaktadır. Örneğin; ekmek, sirke, boza, şarap, yoğurt imalatında organizmaların ürettiği enzimlerden yararlanılmaktadır. Enzimler; gıda üretiminde, temizlik malzemelerinde ve tıbbi tanı ve tedavi aşamasında kullanılmaktadırlar (Godfrey ve West, 1996; Öztürk, 2007). Enzimler, çevre kirliliğine daha az yol açmaları ve ekonomik olarak gerçekleştirebilmelerinden dolayı birçok sanayi alanında kimyasal süreçlerin yerini almaktadır. Alkalen proteaz enzimleri %60'lık oranla endüstriyel enzimler arasında payı büyüktür (Gençkal ve Tari, 2006). Enzimlerin sanayi ve teknolojiye kullanılmaları için öncelikle saflaştırılması gerekmektedir. Mikroorganizmalar, kolay üreyebilmeleri ve ürettikleri enzimlerin daha kolay saflaştırılmalarından dolayı enzim kaynağı olarak kullanılmaktadır. Enzimlerin çoğunluğunun düşük ısıda ve dar bir pH aralığında çalışması, sanayi alanında kullanılan geniş pH aralığı ve yüksek ısı koşullarında kullanılamamalarına neden olmaktadır. Bu sebepten dolayı endüstrinin ihtiyacını karşılayabilecek özellikte yeni enzimlerin ve bu enzimleri üretebilecek mikroorganizmaların bulunmasını teşvik etmektedir. Mikroorganizmalar enzimlerin elde edilmesinde önemli bir kaynaktır (Anvar ve Saleemuddin, 1998; Niehaus ve ark., 1999; Öztürk, 2007). *Bacillus* cinsinin de içinde bulunduğu ekstremofil özellikte birçok mikroorganizma mevcuttur ve *Bacillus* genusu türleri proteaz üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır (Kumar ve Takagi, 1999). Deterjan sanayii başta olmak üzere sağlık, gıda ve deri endüstrilerinde kullanılmaktadır. Ayrıca tüy ve saç gibi proteinlerin hidrolizinde ve bu proteinlerin kullanışlı biyokütleler haline getirilmesi gibi birçok endüstri alanında kullanılmaktadır. (Anvar ve Saleemuddin, 1998; Kumar ve Takagi, 1999). Çalışmamızın amacı *Bacillus subtilis megatherium* bakteri türünden proteaz enziminin saflaştırılması ve özelliklerinin belirlenmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Enzimler

Enzimler, canlı organizma bileşiminde az miktarda bulunan, bu organizmada oluşan tepkimelerin gerçekleşmesini sağlayan, düzenleyen, genellikle protein ana yapıdaki özelleşmiş biyokatalizörlerdir. Protein yapısında olduklarından, enzimlere metabolik proteinler denilmektedir. Canlı organizmanın tüm işlemleri enzimlerle yapıldığından; enzimler için enzimatik tepkimeler bütünü denilebilmektedir (Eren Kıran, 2006). Diğer katalizörler gibi enzimler de reaksiyon hızını arttırarak çalışırlar. Katalizörün olmadığı reaksiyon oranına göre enzim katıldığında reaksiyon hızı bir veya birkaç milyon kat daha yüksek olmaktadır (Uludağ, 2000).

Yapılarında bulunan aminoasitlerin dizilimi ve buna bağlı olarak edindikleri üç boyutlu yapı enzimlerin kataliz görevini yapabilmelerini sağlayan en önemli etkidir (Onat ve Emerk, 1997). Enzimler biyokimyasal süreçlerde ana merkez durumundadır. Düzenli tepkime olaylarındaki aktiviteleriyle besinsel moleküllerin parçalandığı tepkime basamaklarının yüzlercesini katalizler, kataliz sırasında kimyasal enerji korunur, dönüştürülür ve basit öncüllerden biyolojik makromoleküller üretilir. (Nelson ve Cox, 2005).

Enzim kavramı ilk olarak kelime anlamı eski Yunanca'da, ilk kez mayalardan elde edildiği için, “mayada bulunan” (in yeast) anlamını taşıyor olsa da, günümüzde enzimler yaşayan tüm hücrelerden; hayvanlardan, bitkilerden ve özellikle de mikroorganizmalardan elde edilebilmektedir (Polaina ve MacCabe, 2007). Enzimler, metabolik görevlerinin yanı sıra artık hayatımızın her alanında karşımıza çıkmaktadır. Tıpta teşhis ile tedavi sürecinde, süt ve mamülleri üretiminde, gıda üretiminde ve temizlik malzemeleri üretiminde büyük miktarlarda kullanımı mevcuttur. Bu alanlar dışında da çok çeşitli kullanım amaçları bulunmaktadır.

Enzimlerin geniş çapta kullanılabilir olmasının sebepleri; maliyetinin düşük olması, in-vitro şartlarında aktif özellikte olması, çeşitli alanlarda kullanılma

özelliğine sahip olması ve en önemlisi de enzimin zararlı etkiye sahip olmamasıdır (Wiseman, 1987). Endüstriyel ürünlerin çeşitli alanlarda kullanımı ve ekonomik değerlerinin yüksek olmasına bağlı olarak enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, endüstriyel enzimler ile ilgili alanlardaki araştırmaların önem kazanmasına neden olmaktadır. Günümüzde değerini artıran rekombinant DNA teknolojisiinden faydalanarak, enzim üretiminde artış olmuş ve kullanımı giderek yaygınlaşmıştır (Gessesse, 1999).

Bazı gıda ürünlerine ve temizlik maddelerine katılan enzimlerin, yüksek sıcaklığa dayanıklı olması, deterjanların yapısındaki kimyasallara karşı yapısını koruması ve uzun süre stabil kalabilmesi gerekmektedir. Doğal yaşamda bu özelliklere sahip olamayan enzimler, rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak istenilen hale getirilmeye çalışılmaktadır. Endüstri alanında enzimlerin dünyadaki pazar payı 1,6 milyar doları geçmektedir (Ottrup ve Jorgensen 2002; Schallmey ve ark., 2004; Zakaria, 2006). Deterjan, gıda ve nişasta endüstrileri, endüstriyel enzim üretiminin %75'ini kullanmaktadır ve proteaz, amilaz, lipaz, selüloz, pektinaz gibi hidrolazlar, en yaygın kullanılan enzim gruplarıdır (Topal ve ark., 2000). Endüstriyel alanda kullanılanların %80'i hidrolazlardır (Kasavi, 2006). Endüstriyel enzimler arasında ise %60'lık pazar payı ile en büyük grubu proteazlar oluşturmaktadır (Gençkal ve Tari, 2006). Bunu %28 ile karbohidrazlar, %2 ile lipazlar ve %10 ile diğer enzim grupları izlemektedir (Dinçbaş, 2009). Günümüzde proteaz gibi birçok mikrobiyal enzim, önemli bir yere sahip olup, dünyanın her yerinde üretilmeye, sanayi ve endüstri alanında kullanılmaya başlanmıştır.

2.1.1. Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzim terminolojisi ve sınıflandırılması için önceleri sadece substrat isimlerine göre “az” eki ilave edilerek tek grupta toplanırdı. Şimdi ise 1000'den fazla çeşidinin olduğunun bilinmesi bu sınıflandırmanın yetersizliğini ortaya koymaktadır. Yetersiz sınıflandırma yüzünden uluslararası bilimsel sınıflandırma yapılmıştır. Sınıflandırmaya göre; bir enzim ECS x.x.x.x şeklinde bir numara almaktadır. Örneğin, glikoz transferaz enziminin tanımlanması “ECS 2.7.1.1” şeklinde yapılmaktadır. İsmi sonundaki “az” eki enzim olduğunu; “2” transferaz olduğunu; “7” fosfotranferaz

olduğunu; “1” hidroksil grup taşıdığını; “1” bir fosfat grubunu D-glikoza verdiğini ifade eder. Bu sistemde enzimler katalizledikleri reaksiyona göre 6 sınıfa ayrılır ve proteazlar hidrolazlar sınıfındadır.

Oksido-redüktazlar: Bu sınıf, elektron transferi yapan enzimlerdir. Redoks tepkimeleri kataliz eden tüm enzimleri içine alır yani oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarını katalizler.

Transferazlar: Bu sınıf, gruplar arası transfer yapan reaksiyonları katalizler. Hidrojen hariç atom veya atom grubunun bir molekülden diğerine aktarılmasını sağlarlar.

Hidrolazlar: Asitanhidrit, eter, glikoz, peptid, ester, C-O, C-N, C-C bağ kısımlarını hidrolize ederler. Kompleks yapıdaki moleküllerin bağlarını sindirim reaksiyonlarında olduğu gibi su ile parçalarlar.

Liyazlar: Susuz ortamdaki bir grubu koparırlar. Örneğin C-C bağı aldolaz enzimiyle yıkılabilir. Ayrıca, C-O ve C-N bağı yıkan tüm enzimler de bu gruba dâhildir.

İzomerazlar: Molekül içi gruplar arası transfer yapan enzimlerdir. Moleküllerde yapısal veya geometrik olarak ayarlamaları yeniden katalize eder.

Ligazlar: Bu sınıf enzimler, dehidrasyon reaksiyonlarını katalizlerken ATP yıkımı meydana getiren enzimlerdir. Substrat moleküllerinin birbirine bağlanmasını enerji kullanarak yapar; örnek verecek olursak aminoasitlerin ve yağ asitlerinin aktifleşmesini söyleyebiliriz.

2.1.2. Proteazlar

Hücre metabolizmasında birçok reaksiyon meydana gelmektedir. En önemlisi hidroliz reaksiyonlarıdır. Bu reaksiyonlar için en önemli enzim proteazdır. Proteazlar, proteinlerdeki peptid bağlarının hidrolizini katalizleyen enzimler olup proteinaz veya peptidaz olarak da bilinirler. Doğada hayvansal, mikrobiyal ve bitkisel artıkların parçalanmasında rol oynarlar ve bu sebeple besin döngüsü sağlamaktadırlar. Sindirim

sisteminde bol bulunan bir enzim olup genellikle pankreas ve midede üretilmektedirler (Aoki ve ark., 1995; Fersht, 1998).

Diğer enzimler gibi proteazlar da protein yapısındadırlar ve belli pH ve sıcaklık aralığında verimli olarak çalışmaktadırlar. Proteazlar enzimlerin kompleks bir grubunu oluşturular ve farklı fizikokimyasal ve katalitik özelliklere sahiptirler. Proteaz enziminin sentezinden sorumlu olan hücresel kontrol mekanizma tam olarak bilinmemekle beraber alkali proteazların üretimi amino asit veya amonyum gibi hızlı bir şekilde metabolize edilebilen azot kaynakları ile baskılanmaktadır. Küçük şekerler ve mineraller de enzim sentezini etkilemektedir. Endüstriyel işlemlerin maliyetini düşürmek için potansiyel proteaz kullanımı ve maksimum enzim üretimi amaçlanmaktadır (Fersht, 1998; Kaur ve ark., 2001).

Proteazların kullanım alanları geniş olup çamaşır deterjanlarının üretimi, fotoğrafçılık, deri, bira, et, süt, ilaç, organik sentezler ve atık muamelesinde kullanılmaktadır (Kıran ve ark., 2006). Proteazlar, çoğunlukla mikroorganizmalardan elde edilirler. Bitkisel, hayvansal ya da kimyasal olarak üretilen enzimlere göre mikrobiyal enzimler önemli avantajlara sahiptirler. Mikrobiyal enzimlerin katalitik aktiviteleri çok yüksektir, istenmeyen yan ürünler oluşturmazlar, daha istikrarlı ve ucuzdurlar, ayrıca tek bir üretim sürecinde çok fazla miktarda üretmek mümkün olmaktadır (Zeman ve Mcree, 1985).

Proteazların karşılaştırılmasında bakteriyel proteazların, hayvansal ve fungal proteazlardan daha etkin olduğu görülmüştür (Banerjee ve ark., 1999). Maya, küf ve bakteri gibi kaynaklardan elde edilen proteazlar, ayrıca da *Bacillus* cinsi bakteriler tarafından üretilenler biyoteknolojide daha çok tercih edilmektedir (Kalisz, 1988; Singh ve ark., 2000). Çünkü farklı farklı alanlardan izolasyonları çok daha kolaydır. Bununla birlikte *Bacillus*, hem kompleks hem de sentetik besi ortamında gelişebilmektedir. Ayrıca *Bacillus* türleri post-eksponansiyal ve durgunluk fazlarında da ekstrasellüler proteazlar üretebilmektedir (Mabrouk ve ark., 1998; Singh ve ark., 2000).

Enzim verimini en iyi şekilde elde etmek için, ya mutasyonla yeni mutantlar elde edilmekte ya mikroorganizma doğrudan izole edilmekte ya da üretim ortamının değiştirilmesi yoluna gidilmektedir. Özellikle besin ortamında bulunan inorganik tuzlar, karbon ve nitrojen kaynakları ve diğer büyüme faktörleri, bakterilerin enzim üretme kapasiteleri üzerinde önemli etkiye sahiptir (Khalil ve ark., 2003).

Proteolitik enzimler dünyada deterjan endüstrilerinde en çok kullanılan enzimlerdir. İyi bir deterjan enzimi oksitleme ajanı ve ağartıcılarla birlikte mevcut durumunu koruyabilmelidir. Ticari olarak kullanılan enzimlerin büyük bir kısmı bu özelliğe sahip değildir. Bu nedenle deterjanların bu özelliği için rekombinant DNA teknolojisi kullanılmaktadır. (Yang ve ark.,2000; Oberoi ve ark., 2001). Birçok endüstriyel alanda kullanılmakta olan alkali proteazlar geniş pH ve sıcaklık aralıklarında kararlıdır. Proteazın yıllık kullanım oranları şu şekildedir:

Tablo 2.1. Proteazların yıllık kullanım oranları

Enzim	Pazar payı (%)
Alkali Proteazlar	25
Diğer Proteazlar	21
Amilaz	18
Reninler	10
Analitik enzimler	10
Karbohidrolazlar	10
Lipaz	3
Tripsin	3

Proteazlar, reaksiyonlara göre ekzopeptidazlar ve endopeptidazlar olmak üzere iki türdür. Bu iki grubun özellikleri enzimlerin substratta etkili oldukları bölgedir (Mahler ve Cordes, 1966). Proteazlar katalitik mekanizmalarına göre; serin proteazlar, sistein proteazlar, aspartik proteazlar ve metallo proteazlar şeklinde ve aktivite gösterdikleri pH aralığına göre de asidik proteazlar, nötral proteazlar ve alkali proteazlar olarak sınıflandırılmışlardır (Singh ve ark.,2000). Proteazların sınıflandırmadaki yeri Tablo 2.2.'de verilmiştir.

Tablo 2.2. Proteaz sınıflandırılması

Proteaz	E.C. sayısı
Ekzopeptidaz	3.4.11
Aminopeptidaz Dipeptidil peptidaz	3.4.14
Tripeptidil peptidaz	3.4.14
Karboksipeptidaz Serin proteaz	3.4.16-3.4.18
Metaloproteaz Sistein proteaz	3.4.16
Peptidil dipeptidaz	3.4.17
Dipeptidaz	3.4.18
Omega peptidaz	3.4.15
Endopeptidaz Serin proteaz Sistein	3.4.13
Protez	
Aspartik proteaz	3.4.19
Metalo proteaz	3.4.21-3.4.34
Endopeptidaz (bilinmeyen katalitik mekanizmanın)	3.4.21 3.4.22 3.4.23 3.4.24 3.4.99

2.1.2.1. Ekzopeptidazlar

Ekzopeptidazlar, aminopeptidazlar (amino uç bağlarını hidroliz eden) ve karboksipeptidazlar (karboksil uç bağlarını hidroliz eden) olmak üzere ikiye ayrılır (Gheorghiu Alpan, 2008). Aminopeptidazlar ve karboksipeptidazlardan başka iki ekzopeptidaz grubu daha tanımlanmaktadır. Bunlar dipeptidazlar ve omegapeptidazlardır (Silverthorn, 2004; Rao ve ark., 1998).

Aminopeptidazlar: Aminopeptidazlar, polipeptid zincirinde bulunan serbest N ucuna atak yapmaktadırlar. Mikroorganizmaların genelinde bulunmaktadır. Hücre içi enzim olarak bilinirler fakat *A. oryzae* tarafından üretilen aminopeptidaz hücre dışıdır. Bakteri ve funguslardan üretilen aminopeptidazların substrat spesifisimleri, hidroliz ürünlerinin profilleri temel alındığında farklı olabilmektedir. Örneğin, *E. coli*'den üretilen aminopeptidaz I 400 kDa'luk büyük bir proteazdır. Optimum pH'sı 7.5-10.5 arasındadır ve optimum aktivite için Mg^{2+} ya da Mn^{2+} 'a ihtiyaç duyarlar. *Bacillus*

licheniformis aminopeptidazın ise, molekül ağırlığı 34 kDa'dur ve aktivitesi Co^{2+} iyonları varlığında artar. Diğer taraftan, *B. stearrowthermophilus* aminopeptidaz II bir dimerdir ve molekül ağırlığı 80-100 kDa arasında olup, Zn^{2+} , Mn^{2+} ve Co^{2+} iyonları tarafından aktive olmaktadır (Rao ve ark., 1998; Gheorghiu Alpan, 2008).

Karboksipeptidazlar: Karboksipeptidazlar enzimlerin aktif bölgesindeki aminoasit çeşitlerinin yapısına göre üç ana gruba ayrılırlar. Bunlar; serin karboksipeptidazlar, metallo karboksipeptidazlar ve sistein karboksipeptidazlardır. *Penicillium sp.*, *Saccharomyces sp.* ve *Aspergillus sp.*'den izole edilen serin karboksipeptidazların substrat spesifisiteleri aynıdır fakat optimum pH, stabilite, molekül ağırlık ve inhibitörlerin etkisi gibi diğer özellikleri farklıdır. *Saccharomyces sp.*, ve *Pseudomonas sp.*'den izole edilen metallo karboksipeptidazlar aktiviteleri için Zn^{2+} ya da Co^{2+} iyonuna ihtiyaç duyarlar. Sistein karboksipeptidazlar, aktif bölgelerinde sistein aminoasidi içerirler (Rao ve ark., 1998; Szecsi ve ark., 1992). Bazı ekzopeptidazların tepkime mekanizmaları tam olarak açıklanamadığından alt grup olarak da sınıflandırılmışlardır. Farklı özelliklerde omegapeptidazlar grupları da vardır. Bunlar; ubiquitinil hidrolazlar, piroglutamil peptidazlar ve gama-glutamil hidrolazlardır.

2.1.2.2. Endopeptidazlar

Endopeptidazlar mekanizmalarına göre dört gruba ayrılırlar; sistein proteazlar (E.C. 3.4.22), aspartat proteazlar (E.C. 3.4.23), serin proteazlar (E.C. 3.4.21) ve metallo proteazlar (E.C. 3.4.24). Endopeptidazlar iç kısımlarda bulunan peptit bağlarını hidroliz ederler (Tanksale, 2001).

Serin proteazlar: Serin proteazlar, alkalın pH civarında maksimum aktivite gösteren proteazlardır. Bu özelliklerinden dolayı çok farklı endüstriyel alanlarda uygulamaya tabii tutulan enzimlerdir. Serin proteazlar DFP (diizopropilflorofosfat) ve PMSF (fenilmetilsulfonilflorid) ile baskılanan enzimlerdir. Molekül ağırlıkları 18-35 kDa aralığında ve alkali pH civarında maksimum düzeyde aktiftirler ve substrat çeşitliliği fazladır (Rao ve ark., 1998).

Sistein proteazlar: Tiyol proteazlar olarak da bilinen bu grup serin proteazlar gibi özellik gösterirler. Bu grup hücresel proteinlerin dönüşümünde görev alan hücre içi proteazlardır. Sistein proteazlar ağır metal iyonları ve okside edici ajanlarla etkisi baskılandığından önemli enzimlerdir (Kenny, 1999).

Aspartat proteazlar: Asit proteazlar olarak bilinen bu grup düşük pH değerlerinde aktiftirler. Reaksiyon mekanizmaları karmaşıktır. Molekül ağırlıkları 30-45 kDa arasındadır. En bilinen örneği pepsin olup katepsin D ve E ile renin aspartat endopeptidazlar diğer bilinen örnekleridir (Szecsi ve ark., 1992).

Metallo proteazlar: Etki mekanizmaları farklılık gösteren enzimlerdir. Çinko proteaz olarak bilinirler. Aktivite gösterebilmeleri için divalent katyonlara gerek duyarlar. EDTA gibi, şelat yapıcı ajanlar tarafından inhibe edilirler (Tanksale, 2001).

2.1.3. Proteaz kaynakları

Proteazlar, bitkilerden, hayvanlardan ve mikroorganizmalardan elde edilebilmektedirler. Bu nedenle kaynaklarına göre; bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal olmak üzere üç farklı yoldan elde edilebilirler.

2.1.3.1. Bitkisel kaynaklar

Bitki kaynaklı tüm proteazlar aynı gruba aittirler ve aktif merkezlerindeki sulfidril grupları ile karakterize edilirler. Bu sulfidril grupları enzimlerin aktivitesinden sorumludur (Uhlir, 1998). Genellikle bu proteazlar tropikal bitkilerden elde edilmektedir. Papaya (*Carica papaya*), ananas (*Anana sativa*), bazı Ficus türleri (*F. carica*, *F. glabrata*), enginar (*Cynara cardunculus*) ve soya fasulyesi (*Soya hispida*) bilinen en güçlü bitkisel proteaz kaynaklarıdır (Ward, 1985).

2.1.3.2. Hayvansal kaynaklar

Hayvansal kaynaklı proteazlar; pankreatik tripsin, kimotripsin, pepsin ve renindir. Bu tür proteazlar protein hidrolizatları üretiminde, gıda sanayisinde, deri

endüstrisinde, et ve balık atıklarının gideriminde ve tıpta kullanılmaktadır. Pankreastan salgılanan tripsin, ince bağırsaktaki proteinleri parçalayıcı özelliğe sahiptir. Genellikle bakteriyel ortamın hazırlanmasında ve bazı özel tıbbi uygulamalarda kullanılır. Hayvansal pankreatik ekstraktlarda bulunan kimotripsin bir sindirim enzimidir. Serin proteaz olan bu enzim peptid bağlarını fenilalanin, tirozin ve triptofan aminoasitlerinden sonraki karboksil gruplarından hidrolizler. Pahalı bir enzim olup yalnızca tanılama ve analitik uygulamalarda kullanılmaktadır (Rao ve ark., 1998). Diğer bir enzim olan pepsin, gıda proteinlerini peptidlere parçalamaktan sorumludur ve hemen hemen tüm omurgalıların midelerinde ana hücreler tarafından salgılanan asidik bir proteazdır. Pepsin bir aspartik proteazdır ve pH 1-2 arasında optimum aktivite göstermektedir. pH 6'nın üzerinde aktivitesini kaybeder ve iki hidrofobik aminoasit arasındaki peptid bağlarının hidrolizini sağlar. Sütü pıhtılaştıran enzim olan renin, anne sütünü sindirmek için her memelinin midesinde üretilen doğal bir enzimdir (Fankhauser, 2007). Bütün süt veren memelilerin midelerinde inaktif pro-renin olarak bulunan renin, pepsine benzer bir proteazdır. Pepsin işleviyle ya da kendi kendine katalizle aktif renine dönüşür. Süt endüstrisinde süt kazeininin çöktürülmesinde ve lor üretiminde kullanılmaktadır (Rao ve ark., 1998).

2.1.3.3. Mikrobiyal kaynaklar

Günümüzde daha çok tercih edilen proteaz kaynağı mikrobiyal proteazlar olup bitki ve hayvan kaynaklı proteazlara göre daha çok tercih edilmektedirler (Kıran ve ark., 2006). Mikrobiyal proteazların en önemli grupları; serin-, metallo- ve karboksil proteazlardır. Ayrıca literatürde 'jelatinaz', 'keratinaz', 'kazeinaz' şeklinde yapılan sınıflandırmalara da rastlamak mümkündür (Novel ve ark., 1963). Fungus orijinli proteazları üreten mantarlar, bakterilerden daha geniş kapsamlı enzim üreticileridirler. Ayrıca fungal proteazlar pH 4-11 gibi geniş bir pH aralığında aktivite gösterirler. Fungal proteazlar, bakteriyel enzimlerden düşük reaksiyon hızına ve düşük bir sıcaklık toleransına sahiptirler. Özellikle peynir endüstrisinde dar pH ve sıcaklık spesifisitesinden dolayı kullanılırlar (Rao ve ark., 1998; Uhlig, 1998). Fungal proteazlar hem endo hem de ekzopeptidazlar olup, çok geniş çeşitlilikte salgılanabilmektedirler (Gripon, 2003). Virus kaynaklı proteazlar, özellikle virus proteinlerine olan hassasiyetleri dolayısıyla önemlidirler. Viral proteazların üç boyutlu

yapısı ve sentetik inhibitörler ile etkileşimi önemlidir. Serin, aspartik ve sistein peptidazlar değişik virüslerde bulunmaktadır. Virus kaynaklı peptidazların hepsi endopeptidazlardır (Babe ve Craik, 1997). Bakteri orijinli proteazlar, büyük polipeptidlerin daha küçük peptidlere ve amino asitlere hidrolizine yardımcı olurlar, böylelikle onların hücre tarafından absorpsiyonunu kolaylaştırırlar. Hücre dışı enzimler, onların depolimerleşme aktivitesinden dolayı beslenmede büyük bir rol oynar. Hücre içi proteazlar hücrede uygun protein dönüşümünü yapmaya katkısıyla bilinirler. E.coli’de, lon geni tarafından üretilen ATP-bağılı proteaz La, anormal proteinlerin hidrolizinden sorumludur (Çelik, 2006).

2.1.4. Endüstriyel açıdan alkali proteazlar

Proteazlar endüstriyel açıdan bu grupta olup; deri, ilaç, bira, deterjan, et, fotoğrafçılık ve süt gibi daha birçok alanda kullanılmaktadır. Bu alanlarda kullanılan proteazlar, bakteri, fungi ve böcekler gibi çeşitli kaynaklardan temin edilmektedir (Anwar ve Saleemuddin, 1998). Proteazların üretimleri aşamasında metal iyonlarının (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Ag^{3+} , Pb^{3+} , Hg^{2+}) ve surfaktanların uyarıcı bir etkiye sahip olduğu görülmektedir. Proteazların yüksek pH ve sıcaklıkta aktivitelerini en üst düzeyde göstermesi endüstriyel uygulamalar için elverişli enzimlerdir (Anwar ve Saleemuddin, 1998; Gheorghiu Alpan, 2008; Kumar ve Takagi, 1999).

2.1.4.1. Süt teknolojisinde alkali proteazlar

Peynir ve süt ürünlerinin yapımında en çok kullanılan mikroorganizma grubu laktik asit bakterileridir (Thomas ve Mills, 1981). Peynir üretimi sırasında sütün asitlenmesi ve peynirin olgun haline gelmesinde görevlidir ve peynirin lezzetinde katkısı vardır. Son zamanlarda fermentasyon bakterileri ile yapılan çalışmalar artmıştır. Bu asitler besinlerin fermentasyonu için kullanılmaktadır. Proteazlar süt ve ürünlerinin dışında, meyve suyu, bebek maması vb. ürünlerin üretiminde yer almaktadır (Anwar ve Saleemuddin, 1998).

2.1.4.2. Deri endüstrisinde proteazlar

Deri üzerine yapılan tüm işlemlerde (yıkama, kıl temizliği vb.) değişik proteazlar kullanılmaktadır. Bu sayede derilerin yüzeyi daha düzgün hale gelmektedir. Geçmişte deri işlemi için kullanılan kireçleme gibi yöntemlerinin yerini daha ucuz ve zararsız olduğu için enzimler almaktadır (Afşar, 2008). Alkali proteazlar nitelikli deri üretilmesine imkân sağlamaktadır (Anwar ve Saleemuddin, 1998).

2.1.4.3. Deterjan endüstrisinde alkali proteazlar

Deterjan üretiminde ilk kullanılan enzim proteazdır. Deterjanlar farklı enzimler içerir böylelikle tüm lekelerin çıkarılmasına imkân sağlar. Enzimlerin pH 12 gibi alkali koşullarda etkilerini göstermesinden dolayı deterjanlarda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Demain ve Solomon, 1981). Enzimlerin temizleme özelliğinin fazla olması, fiyatlarının düşük olması bu endüstri alanında kullanılmasını sağlamıştır. Bu alanda kullanılanlar özellikle *Bacillus* proteazlarıdır. Her çeşit deterjanlarda (çamaşır, bulaşık vb.) kullanılmakta olup protein içerikli lekelerin giderilmesini sağlamaktadır (Maurer, 2004).

Yıkama verimini arttıran proteazlar, enzimin karakterine bağlı olarak daha düşük sıcaklıklarda ve daha düşük sürelerde temizlik sağlayabilmektedir. Proteazlar özellikle zor lekelerin giderilmesinde etkilidir. Amilaz ve lipazlarla birlikte kullanıldığı zaman yemek lekelerinin çıkarılmasında daha etkilidir. Ayrıca, kontak lenslerin temizlenmesini sağlayan deniz solucanlarından üretilen proteazlar mevcuttur (Aehle, 2004; Orhan, 2003; Öztürk, 2004). Deterjanlar için en uygun enzim, yüksek pH da ve 65°C sıcaklıkta çalışılabilme özelliğine sahip olmalı ve oksitlenmeye karşı dayanıklı olmalıdır. Az miktarda bile etkisini gösterebilmelidir. Deterjan üretimindeki proteazlar, pH 8-10 değerlerinde ve protein lekelerini çıkarabilme özelliğinde olması gerekmektedir (Demain ve Solomon, 1981).

2.1.4.4. Gıda sanayisinde proteazlar

Gıda alanında enzimlerin kullanımı çok eskidir. Günümüzde proteazlar peynir, ekmek yapımı gibi çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır (Aehle, 2004). *Bacillus subtilis*'ten üretilen proteazlar bisküvi, kek ve kraker yapımında kullanılmaktadır. Bu proteazlar hamurların yumuşamasını geciktirir (Çelik, 2006; Fadıloğlu ve Erkmen 2004). Ayrıca ürünlerin tat ve aromasında da etkilidirler (Krajewska, 2003; Uhlig, 1998).

2.1.4.5. Kozmetik ve ilaç sanayisinde proteazlar

Proteazların, kozmetikte kullanımı artış göstermektedir. Cilt ve saç bakımı alanında uygulanmaktadır. Ayrıca tüylerin yok edilmesinde ve diş macunlarında kullanılmaktadır. sağlayan ürünlerde ve kontak lens solüsyonlarında kullanılmaktadır (Langmaier ve ark., 2002). Proteazların geniş spesifisitesi ve çeşitliliği tedavi edici ajanların gelişiminde büyük bir avantaj olarak kullanılır. Subtilisin ya da kollejenaz yanık ve yara tedavisinde, antibiyotiklerin geniş bir aralıkta kullanımıyla kombine edilerek kullanılmaktadır. *E.coli*'den izole edilen asparajinaz lenfositik lösemilerin çeşitli formlarında kan akışından asparajini elimine etmek için kullanılmaktadır (Gupta ve ark., 2002; Kurdy ve Simonenko 1994; Rao ve ark., 1998). Şeker hastalarında yaraların geç iyileşmesine karşı proteaz absorban ortu tedavisinde metalloproteaz inhibitörleri kullanılarak, yaraların kronik halden akut hale geçmesi sağlanmıştır (Lobmann ve ark., 2005).

2.1.5. Tez çalışmasında kullanılan *Bacillus subtilis*'in özellikleri

Kirpikli bir basil olduğu için hareketli, sporları oval ve subterminaldir. Kapsülsüz, gram pozitif, aerob, oda sıcaklığı ve zenginleşmemiş besiyerinde rahatlıkla üreyebilen, R tipi koloniler yapan saprofit yani doğada yaygın olarak bulunan bir basildir. Vejetatif şekilleri dayanıksız olup, sporları bazen kaynama derecelerinde birkaç saat dayanabilirler. Toz, toprak, su gibi temel alanlarda yerleştiklerinden besin maddelerine kolaylıkla bulaşırlar. Saprofit bir bakteri olmakla beraber doku içine veya göz içine bulaşarak enfeksiyonlara ve bazı besin zehirlenmelerine neden olabilir

(Coleman ve Elliott, 1962; Demain ve Solomon, 1981). Özellikle sütte çoğaldıkları zaman kazeini parçalayarak zehirli maddeler açığa çıkarırlar. Diğer besin maddelerinde üredikleri zaman toksin oluştururlar. 2-18 saat arasında ekmekte ipliklenmeye neden olan bir bakteridir. Özellikle ekşi mayayla yapılan ekmeklerde görülür (Demain ve Solomon, 1981; Gessesse, 1998).



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Malzemeler

Çalışmamızda kullanılan malzemeler firma markaları ile birlikte;

- Pepton (Marka:Sigma),
- Et Ekstraktı (Marka:Sigma),
- Bakto Tripton (Marka:Sigma),
- BaktoSoyton (Marka:Sigma),
- Bakto Agar (Marka:Sigma),
- NaCl (Sodyum Klorür) (Marka:Merck),
- CH₃COOH (Asetik Asit) (Marka:Merck),
- CCl₃COOH (Trikloroasetik Asit) (Marka:Carlo Erba),
- CH₃COONa (Sodyum Asetat) (Marka:Carlo Erba),
- H₃BO₃ (Borik Asit) (Marka:Merck),
- NaOH (Sodyum Hidroksit) (Marka:Carlo Erba),
- C₈H₁₂O₃N₂(Süt Kazeini) (Marka:Merck),
- ((NH₄)₂SO₄) (Amonyum Sülfat) (Marka:Teknik),
- Tris-HCl (Marka:Merck),
- HCl (Hidroklorik Asit) (Marka:Merck),
- BSA (Marka:Sigma),
- Trosin (Marka:Sigma),
- BCA (Marka:Sigma),
- NaCO₃. H₂O (Sodyum Karbonat) (Marka:Merck),
- C₄H₈Na₂O₈ (Sodyum Tartarat) (Marka:Merck),
- NaHCO₃ (Sodyum Bikarbonat) (Marka:Merck),
- CuSO₄.5H₂O (Bakır Sülfat) (Marka:Merck),
- C₃H₅NO (Akrilamit) (Marka:Biorad),
- Bis-akrilamit (Marka:Biorad),
- Tris (Marka:Merck),
- [C₁₂H₂₅O₄SN_a] (SDS) (Marka:Sigma),
- [(NH₄)₂S₂O₈] (APS) (Marka:Sigma),

- TEMED (Marka:Biorad),
 - $C_3H_8O_3$ (Gliserol) (Marka:Merck),
 - C_2H_6OS (β –Merkaptoetanol) (Marka:Merck),
 - Bromfenol mavisi (Marka:Merck),
 - $C_2H_5NO_2$ (Glisin) (Marka:Merck),
 - Coomassie parlak mavisi (Marka:Sigma),
 - CH_3OH (Metanol) (Marka:Merck),
 - Distile Su,
 - Nessler Reaktifi (Marka:Fluka),
 - Diyaliz Bandı (Özellik:çap:16 mm, Kapasite: 60ml/ft) (Marka:Sigma),
 - Mavi Bant Süzgeç Kâğıdı (Marka:Filtrak),
 - DEAE Sefaroz Anyon Değiştirici (Marka:Sigma)
- şeklinde sıralanmaktadır.

3.2. Kullanılan Cihazlar

Çalışmamızda kullanmış olduğumuz cihazlar ise markaları ile birlikte şu şekilde sıralanmaktadır:

- Julabo SW marka Su Banyosu,
- Clifton marka Su Banyosu,
- Hereus Christ UJ III (25000dev/dak) marka Santrifüj cihazı,
- Oerling Na 264 marka Hassas Terazı,
- IKA-Schüttler –Mas 2 marka Manyetik Karıştırıcı,
- Hewlett Packard -8452 A marka UV Spektrometre,
- NEL marka pH metre (NEL),
- EC-120 marka SDS-PAGE Elektroforez Cihazı,
- Edmund Bühler marka Çalkalayıcı,
- Elektro-mag marka Etüv,
- Hirayama marka Otoklav.

3.3. Kullanılan Çözelti ve Tamponlar

Çalışmada kullanılan çözelti ve tamponların elde edilme şekli aşağıda yer almaktadır.

Sodyum–Borat Tamponu 1 (0,135 mol/l): 1 lt distile suda 10,8 g sodyum hidroksit ve 30,9 g borikasit çözündürülerek elde edilmiştir.

Sodyum–Borat Tamponu 2 (0,01mol/l; pH:10,5): Sodyum–Borat Tamponu A'dan 74 ml alınmış 1 litreye tamamlanmış ve pH'ı 0,1N sodyum hidroksit ile 10,5'e ayarlanmıştır.

Sodyum–Borat Tamponu 3 (0,01 mol/l; pH: 9,3): Sodyum–Borat Tamponu A'dan 74 ml alınmış 1 litreye tamamlanmış ve pH'ı 0,1N sodyum hidroksit ile 9,3'e ayarlanmıştır.

Tris-HCl Tamponu (0,5 mol/l; pH: 7,2): 1 litre distile suda 79,8 g Tris-HCl çözündürülmüştür ve 0,1N sodyum hidroksit ile pH'ı 7,2'ye ayarlanmıştır.

Sodyum Klorür Çözeltisi (1 mol/l): 1 litre distile suda 58,44 g sodyum klorür çözünmesi ile elde edilmiştir.

Sodyum Hidroksit Çözeltisi (0,1N): 1 lt distile suda 4 g sodyum hidroksit çözünmesi ile elde edilmiştir.

Hidroklorik Asit Çözeltisi (1N): 8,28 ml hidroklorik asit'in 100 ml'ye tamamlanmasıyla elde edilmiştir.

Süt Kazeini Substrat Çözeltisi 1 (% 0,6 Ağ/hacim): Sodyum-Borat Tamponu B ile 6 g süt kazeinin 1 litreye tamamlanmasıyla elde edilmiştir.

Süt Kazeini Substrat Çözeltisi 2 (% 0,6 Ağ/hacim): 100 ml 0,1N sodyum hidroksit çözeltisinde 6 g süt kazeini çözündürülmüş üzerine 400 ml distile su ve 40 ml Tris-HCl tamponu eklenmiştir. Elde edilen çözeltinin pH'ı 1N hidroklorik asit çözeltisi ile 7,2'ye ayarlanmış ve distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır.

TCA Karışım Çözeltisi 1 (0,11 mol/l TCA; 0,22mol/l Sodyum asetat; 0,33mol/l Asetik asit): 31,4 ml asetik asit, 17,97 g TCA ve 29,94 g sodyum asetat'ın karıştırılıp distile su ile 1 litreye tamamlanmasıyla elde edilmiştir.

TCA Karışım Çözeltisi 2: 220 ml hazırlanan sodyum asetat ve 330 ml asetik asit çözeltilerinin tamamı ile %50 (Ağ/hacim)'lik TCA çözeltisinin 36 ml'si karıştırılmış, karışım distile su ile 1 litreye tamamlanarak elde edilmiştir.

Asetik Asit Çözeltisi (1 mol/l): 31,43 ml asetik asit'in distile su ile 330 ml'ye tamamlanmasıyla elde edilmiştir.

Sodyum Asetat Çözeltisi (1 mol/l): 29,94 g sodyum asetat'ın distile su ile 220 ml'ye tamamlanmasıyla elde edilmiştir.

TCA Çözeltisi (%50 Ağ/hacim): 50,5 g TCA'nın distile su ile 100 ml'ye tamamlanmasıyla elde edilmiştir.

Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler:

Çözelti A: 1 g BCA, 2 g sodyum karbonat, 0,16 g sodyum tartarak, 0,4 g sodyum hidroksit ve 0,95 g sodyum bikarbonat 100 ml distile suda çözölmüş sodyum hidroksit veya sodyum bikarbonat ile pH'ı 11,25'e ile ayarlanarak elde edilmiştir.

Çözelti B: 4 g bakır sülfat'ın 100 ml distile suda çözölmesiyle elde edilmiştir.

Çözelti C: Çözelti A'nın 100ml'si ile Çözelti B'nin 2 ml'si karıştırılarak elde edilmiştir.

SDS-PAGE Çözeltileri:

Monomer çözeltisi: 58,4 g Akrilamit ve 1,6 g Bisakrilamit'in 200 ml distile suda çözölmesiyle elde edilmiştir.

4A Ayırıcı Jel Tamponu (1,5 M Tris-Cl, pH: 8,8): 36,3 g Tris distile su ile 200 ml'ye tamamlanarak hidroklorik asit çözeltisi ile pH'ı 8,8'e ayarlanarak elde edilmiştir.

4A Yığın Jel Tamponu (0,5 M Tris-Cl, pH: 6,8): 3 g Tris bir miktar distile su ile çözölüp pH 6,8'e ayarlanmış ve distile su ile 50 ml'ye tamamlanarak elde edilmiştir.

%10'luk SDS Çözeltisi: 100 ml distile suda 10 g SDS çözölerek elde edilmiştir.

%10'luk APS Çözeltisi: 1 ml distile suda 0,1 g APS çözölerek elde edilmiştir.

2A Örnek Tamponu: 2,5 ml 4A Yığın Jel Tamponu, 4 ml %10'luk SDS çözeltisi, 2 ml gliserol ve 1 ml β -Merkaptoetanol karıştırılıp 10ml'ye distile su ile tamamlanarak elde edilmiştir.

Tank Tamponu: 3 g Tris, 14,4 g glisin 10 ml SDS ile karıştırılıp distile su ile 1 litreye tamamlanarak elde edilmiştir.

Coomassie Blue Stain: 1 g Coomassie parlak mavisi, 50 ml metanol, 10 ml asetik asit ile karıştırılıp distile su ile 1 litreye tamamlanarak elde edilmiştir.

Jel Destain: Metanoldan 25 ml veasetik asitten 50 ml alıp distile su ile 500 ml'ye tamamlanarak elde edilmiştir.

3.4. Metot

Çalışmamızda ayırma ve enzim saflaştırma yöntemleri olarak; Diyaliz-Santrifüjleme-Çöktürme-İyon Değiştirme Kromatografisi kullanılmıştır. Saflaştırılmış enzimden molekül ağırlığının tayininde ise SDS-PAGE yöntemi kullanılmıştır.

3.4.1. Santrifüjleme

Büyük moleküller olan enzimler de ultrasantrifüj aracılığıyla oluşturulan yüksek santrifüj durumlarında çöktürülürler. Enzimin tanecikleri değişik faktörlere bağlı olarak (molekül şekline, büyüklüğüne ve çözeltinin viskozitesine vb.) çökme hızına sahiptir. Ancak genellikle molekül ağırlığı fazlalaştıkça çökmede hız oranı artmaktadır. Kullanılan yöntem enzimi saflaştırmada sıklıkla kullanılan enzimi ayırma yöntemidir. Bu yöntem küçük hacimlerin ultrasantrifüjü için en uygun olanıdır. Genellikle santrifüjleme yöntemi, çöktürme veya izole etme esnasında çözünemeyen maddeleri çöktürme uzaklaştırma için kullanılan yaygın bir yöntemdir (Jonsson ve Martin, 1965). 0.5 mm yarıçapında olan bakteride çökme 1mm/saat'ten daha az bir orana sahiptir. Bundan dolayı bakterilerin sıvı besiyerlerinden ayırmakadına en uygun ve ekonomik yol santrifüjdür (Bugg, 1996). Çalışmamızda 12000-20000 devir/dakika hızında santrifüj işlemi yapılmıştır.

3.4.2. Çöktürme

Tuzla çöktürme proteinlerin konsantre edilmesinde ve saflaştırmasında kullanılan yöntemdir. Ortama eklenen yüksek tuz konsantrasyonları proteinlerin bir araya gelmelerine ve çözeltiden ayırarak çözünürlüğü sağlamaya neden olur (Bugg, 1996). Saf suda çözünürlüğü az olan büyük moleküller iyon ilavesi ile yükleri dağıtılarak çözünürlükleri artırılır. Böylece iyonik şiddet belirli değeri aşar ve yüklü olan molekül çöker. Bu işlem için genellikle çözünürlüğü yüksek, etkin, pH'ı az

etkileyen, fazla ısınmaya neden olmayan ve ekonomik olarak ucuz olan amonyum sülfat kullanılır. Çöktürme için kullanılan amonyum sülfat bazen istenmeyen bazen de istenilen proteinleri çöktürmeye yarar (Bugg, 1996). Bu metot çözeltilerin hacmini düşürmek için saflaştırma aşamalarının başlangıcında kullanılır. Çöktürme işlemi yapılmış olan enzim, tamponu küçük hacimli olanda yeniden çözülür (Jonsson ve Martin, 1965). Çalışmamızda, amonyum sülfat çöktürme yapılarak proteinler çöktürülmüş ve çözeltiden ayrılmıştır.

3.4.3. Diyaliz

İşlem sırasındaki tüpler elek görevi görerek ağırlığı 20000 olan moleküle sahip proteinlerin geçişini sağlamaktadır. Bu ağırlıktan büyük olan molekül ağırlığındaki proteinleri ise tutmaktadır. Ayrıca saflaştırma işlemleri sırasında çöktürme sonrası ortamda kalan tuzları, ufak moleküllü inhibitörleri ve organik çözücülerini uzaklaştırmak için de iyi bir yöntemdir (Jonsson ve Martin, 1965). Çalışmada, tuzları uzaklaştırmak için 60 ml/ft kapasiteli 16 mm çapında diyaliz zarı kullanılmıştır.

3.4.4. İyon Değiştime Kromatografisi

Protein moleküllerinin yüküne dayanan bu yöntemde zıt yüklerin elektrostatik çekimi olmaktadır. Bu yöntemde öncelikle proteinler yük çeşidi (pozitif veya negatif) sonra yük kuvvetine (zayıf veya kuvvetli) göre ayrılır. pH, net yüküetkiler. Bu etki özelliği değiştirici seçiminde (anyon veya katyon) kullanılır. Kullanılan örneğe, sulu bir çözelti (düşük iyonik güç) uygulanır. Ayırmada konsantrasyon artmasıyla oluşan tuz değişim ölçüleriyle meydana getirilir. İyon değiştirici olarak genelde, Sefaroz, Sefadeks ve Selüloz, gibi malzemelerden oluşur (Gerhartz,1990; Jonsson ve Martin, 1965). Bunların arasında en fazla tercih edilen bir katyon değiştirici Karboksimetil (CM) Selüloz ve anyon değiştirici olan DEAE-Selülozdur $[OC_2H_5NH(C_2H_5)_2]$. pH 6-8'de DEAE grubu yüksek pozitif yüke sahiptir. Bu özelliğinde dolayı negatif yüke sahip proteinlerin kromatografisinde DEAE-Selüloz daha faydalıdır (Price ve Stevens,1982). Saflaştırma aşamalarında enzim, gerekli etkinin olacağı pH'daki ve küçük iyonik şiddetteki çözeltideki iyon değiştiriciye tatbik edilir. pH değişimi ile iyon değiştiriciye bağlanan maddeler serbest bırakılır (Gerhartz,1990; Jonsson ve

Martin,1965). Proteinlerin kolondan geçirilmesi tuz konsantrasyonunun değişimi ile meydana gelir. NaCl konsantrasyonu arttıkça DEAE-Selüloza bağlanan protein, anyon (Cl-) ile yer değiştirir (Price ve Stevens,1982). Çalışmada saflaştırma için DEAE-Selüloz anyon değiştiricisi olarak kullanılmıştır.

3.4.5. SDS-PAGE

Molekül ağırlıkları proteinler için hesaplanmasında en fazla tercih edilen SDS-PAGE yöntemidir. SDS bir anyonik deterjandır. SDS moleküllerin birçoğu tek bir protein molekülüne bağlanır, doğal yapısını farklılaştırır ve proteine büyük bir negatif yük verir. SDS ile birleşen tüm protein molekülleri aynı biçime ve aynı yük/kütle oranına sahiptirler. SDS ile birleşen farklı proteinler poliakramid jel içerisinde elektroforez ortamında boyutlarına göre ayrılmaktadır. Bu işlemde proteinlerin sürtünme değerlerine göre ayrılma meydana gelmektedir. Molekül ağırlıkları büyük olanlar jelde fazla ilerleyemez. SDS-Protein kompleks boyutu protein molekül orjinal boyutuna bağlıdır. Bu yüzden molekül ağırlığı bilinen proteinler marker olarak kullanılır. Bundan dolayı ölçeklendirme yapılarak proteinin molekül ağırlığı hesaplanır(Price ve Stevens,1982).

3.5. *Bacillus* Türlerinden Proteaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması

3.5.1. *Bacillus* Türü Bakterilerin Genel Özellikleri

Bacillus türü bakteriler su, toprak, bitki, gübre ve hayvan vb. ortamlarda olan hastalık yapmayan bakterilerdir. Kirpikli bir basil oldukları için hareketlidirler. Gram pozitif ve kapsülsüz olup besiyerinde rahatlıkla üreyebilirler. Bakteriler şeffaf ve renksizdirler. Bu özellikleri sayesinde bazı boyama teknikleriyle yapıları ve şekilleri incelenebilir. Böylelikle bakterilerin teşhisi ve sınıflandırılmaları yapılabilir. Bakteriler, gram pozitif ve negatiftir (Coleman ve Elliott, 1962; Demain ve Solomon, 1981). *Bacillus subtilis megatherium* türü boyama sonrasında kalın çubuk (çomak) ve uzun şekildedir. Bakterinin çoğalması ve gelişmesi için gerekli maddeleri içeren besiyerleri oluşturulur. Sıvı, katı veya özel gibi besiyerleri çeşitleri mevcuttur. Sıvı ortam besiyerlerinde bakteri üretmenin çeşitli aşamaları mevcuttur. Sıvı besiyerine

alınan bakteri kısa sürede ikiye bölünerek artmaya başlar.Çoğalma aşamasından sonra bakteri hızla üremeye başlar. Üremenin artmasından sonra bunu logaritmik aşama takip eder. Bakterinin beslendiği besinler bittiği zaman bölünme hızı azalmaya başlar. Bazı bakteriler bu aşamada ölür. Ölen ve yaşayan bakteri hücreleri arasında bir denge meydana gelir. Bu durum yaşayan bakteri sayısının sabit aşamasına neden olur. Sabit aşamada üreme meydana gelmez. Ölü bakteriler artmaya başladığında canlı bakterilerin azalma aşaması meydana gelir. Sonraki aşamada bakteri sayısı azalmıştır ama bir kısmı uzun süre ölmeden kalır. Bakteri türünün sporlu veya sporsuz olması ölmeden kalmasını sağlar. Bunlardan sporlu bakteriler, aşamanın sonunda spor şekillerini alırlar böylece ölmemeleri sağlanır. Proteaz enzimi *Bacillus* türlerinin sporlanmada ortaya çıkardığı üründür. Sıvı besiyerlerinde bakteriler yüzeyde zar, dipte çöküntü ve homojen bir bulanıklık oluşturacak şekilde ürerler. *Bacillus subtilis megatherium* türü yüzeyde zar şeklinde ürerler (Çetin., 1965).

3.5.2. Besiyerinin Hazırlanması ve Ekim İşlemi

Et ekstraktından 3 g ve peptondan 5 g alınarak distile suyla 1 litreye tamamlayarak sıvı besiyeri hazırlanır. pH, 1M Na₂CO₃ ile 7 olarak belirlenmiştir. Sporlanmanın hızının artması için 10 mg MnSO₄.2H₂O sıvı besiyerine eklenmiştir. Bakto soytondan 5 g, sodyum klorürden 5 g, bakto triptondan 15 g, bakto agardan 15 g alınarak distile su ile 1 litreye tamamlanarak ve pH 7,3'e ayarlanarak katı besiyeri ve eğri katı besiyeri petri kabında hazırlanmıştır. Besi yerleri sterilizasyon işlemi için 15 dakika otoklavda 121°C'de tutulur. Kurutulmuş *Bacillus* türleri ampullerde temin edilmiştir. Kırılma işlemi ampullere uygulanmıştır. Kırılma işlemi olarak ampulün uç kısmı çizilerek ısıtıldı ve ani su eklemesi yaparak çatlatılmıştır. Bu işlemden sonra sıvı besiyerinden pipetle toplanan az miktardaki sıvı, ampule zerk edilerek süspansiyon haline getirilmiştir. Süspansiyon sıvının hepsi alınarak sıvı besiyerine katılmıştır. Sonraki aşamada azaltma metodu ile katı besiyeri petri kutusuna ekim yapılmıştır. Petri kutsunun arka tarafı cam kalem ile dörde bölünerek saat yönünde numaralanmıştır. Sıvı besiyerinden iğne yardımı ile alınan bakteriler, sırasıyla dörde bölünen alanlara zigzaglar şeklinde çizerek ekim yapılmıştır. Ekim sonrası üremeleri için petri kutuları 37°C'deki etüvde ve 24 saat süresince bekletilmiştir. Üreyen kolonilerden saf kültür elde edilmiştir. Kültür eldesi için iğne ile tek koloniden alınan

bakteri, eğri katı besiyerine ekilerek 24 saat süresince etüvde 37°C’de tutulmuştur. Örneklerden numune alınarak farklı bir eğri katı besiyerine ekilmiştir. 48 saat bekletilen numuneden önceden hazırlığı yapılan sıvı besiyerine özeyle ekim uygulanmıştır. Uygun üreme koşullarında sporlanmaları ve üremeleri izlenmiştir.

3.5.3. Amonyum Sülfat ile Çöktürme

Besiyerine, 20000 devir/dakikada 30 dakika santrifüj işlemi yapılarak çözelti ve bakteri ayrılır. Çöken kısım ayrılır. Ham homojenat olan sıvı kısım amonyum sülfat çöktürmesiyle çözeltideki proteinler ayrılmıştır. Çöktürme üç bölümde gerçekleşir. İlk bölümde %40’lık çöktürme gerçekleşmiştir. Çöktürme işlemi için 25 g amonyum sülfat içeren 100 ml çözeltide, ham homojenatın düzeyi (ml) için eklenen amonyum sülfat miktarı hesaplanmıştır. Çöktürme işlemi 4°C’de yapılmıştır. Çözelti amonyum sülfat eklendikten sonra yarım saat karıştırıldıktan sonra, yarım saat 20000 devir/dakika hızla santrifüj edilmiştir. Santrifüj yapıldıktan sonra çökelti ve çözelti (süpernatant) kısımları ayrılmıştır. Çözelti A1 ve çökelti de B1 olarak tanımlanmıştır. Protein ve aktivite tayinleri için A1’den 5 ml ayırarak B1 ile buzdolabına kaldırılmıştır. Çöktürme işlemi A1 ile yürütülmüştür. İkinci bölüm % 70’lik amonyum sülfat doyurmasıdır. Bu bölümde 44,2 g amonyum sülfat içeren 100 ml çözelti yapılmıştır. A1 çözeltisi için hesaplanan amonyum sülfat ölçüsü ve bu değerden %40’lık çöktürme işlemi için kullanılan amonyum sülfat ölçüsü çıkarılarak, %70’lik çöktürmede eklenen amonyum sülfat ölçüsü bulunmuştur. Çöktürme bölümlerinin hepsi 4°C’de yapılmıştır. Amonyum sülfat ilave edilen çözelti yarım saat karıştırılır. Çözelti daha sonra 20000 devir/dakika hızla yarım saat santrifüj edilir. Bu işlemten sonra çökelti ve çözelti (süpernatant) kısımları ayrılır. Çözelti kısmına A2, çökelti kısmı da B2 diye adlandırma yapılmıştır. Protein ve aktivite tayinlerinde A2’den 5 ml ayırıp B2’yle buzdolabına kaldırılmıştır. Çözeltinin işlemlerine A2’yle sürdürülmüştür. Çöktürmenin 3.bölümünde % 80’lik amonyum sülfat çöktürmesi uygulanmıştır. 52,3 g amonyum sülfat 100 ml çözelti hazırlanmıştır. Amonyum sülfat miktarı hesaplanarak A2 çözeltisi yapılmıştır. Bundan %70 ve %40’lık çöktürmede kullanılan bütün amonyum sülfat miktarını çıkararak, %80’lik çöktürmede gerekli olan amonyum sülfat miktarı bulunmuştur. Çöktürmenin bütün bölümleri 4°C’de yapılmıştır. Amonyum sülfat ilave edilen çözelti yarım saat karıştırılır. Çözelti daha

sonra 20000 devir/dakika hızla yarım saat santrifüj edilir. Bu işlemden sonra çökelti ve çözelti (süpernatant) kısımları ayrılır. Çözelti kısmı A3, çökelti kısmı da B3 diye adlandırılır. Protein ve aktivite tayinlerinde kullanılmak için A3 ve B3 buzdolabına kaldırılmıştır. Aktivite tayini sonrasında ortaya çıkması beklenen değerlerin çöktirilerde olduğu bulunmuş ve yapılacak işlemler çöktirilerde sürdürölmüştür.

3.5.4. Diyaliz

Çökelti aşaması bitince tüm çöktiriler toplanarak toplam çöktirilerde çalışmalara devam edilmiştir. Toplam çökelti üzerinde diyaliz işlemi yapılmıştır. Diyaliz tüpleri işlem öncesi koşullandırılmıştır. Gliserin, 3-5 saat süresince su ile yıkanarak tüplerin içerisinden uzaklaştırılmıştır. Ayrıca 80°C’de sodyum sülfid (%0,3 Ağ/hacim) çözeltisinde 60 saniye kaynatılarak kükürt bileşenleri uzaklaştırılır. Sülfürik asit çözeltisi (%0.2 hacim/hacim) ile 60°C’de 2 dakika sıcak suyla yıkanarak bir süre temas ettirilir. En son aşamada asit sıcak suyla yıkanarak uzaklaştırılır. Koşullandırmadan sonra, diyalize tabi tutulacak örneklerden belirli miktarlarda tüplere koyulup örnek miktar 100 kat ölçüsündeki uygun tamponla diyalize yapılmıştır. Diyalize zamanı Nessler Reaktifi ile desteklenmiştir. Diyalizden sonra örnekler santrifüj edilmiştir. Santrifüjden önce ve sonra protein ve aktivite tayinleri yapılmıştır.

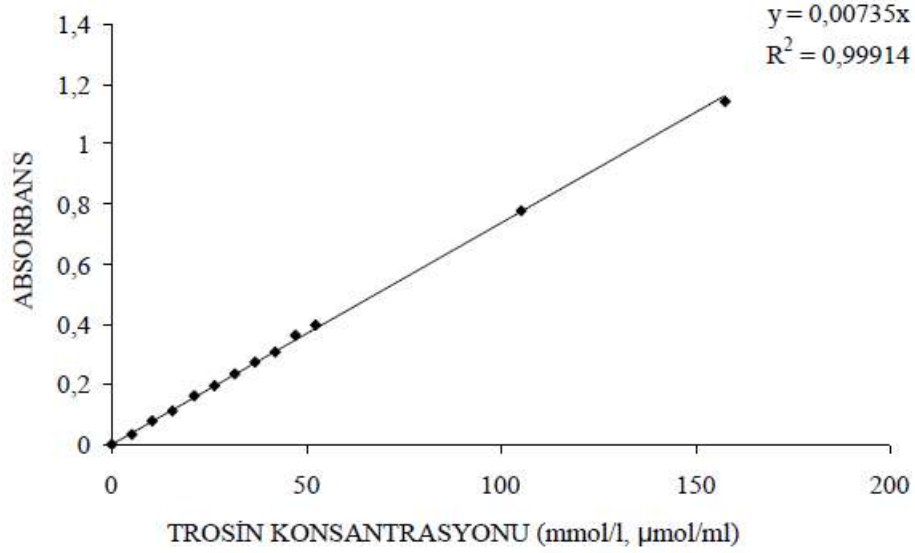
3.5.5. İyon Değıştirme Kromatografisi

İlk olarak DEAE-Sefaroz iyon değıştiricisinden enzim çözeltisi geçirilmektedir. Kullanılan kolonun çapı 2 cm ve yüksekliğı 30 cm’dir. Kullanılan kolon uygun tamponla yarım saat boyunca 3ml/dk hızla yıkanmıştır. Kolona besleme yapılmış ve akış hızı 1ml/dk olacak şekilde ayarlanmış örnekden 10 ml konulmuştur. Örnek beslendikten sonra NaCl’lü tamponla 2,5 saat boyunca kolondan geçirilmiştir. Tüm örnekler aktivite ve protein tayini yapılması için buzdolabında saklanmıştır.

3.5.6. Aktivite Tayini

Tüm çalışmalarmız 2 çeşit aktivite tayin yöntemiyle yapılmıştır. Yöntemler sonucunda trosin standart eğri grafiğı oluşturulmuştur. Bunun için çözeltinin

konsantrasyon oranı 0.2 M olan 21 mg trosin 100ml TCA çözeltisinde çözündürölüp gerekli oranda dilüe edilerek standart çözeltiler yapılmıştır. Hazırlanan çözeltiler ile standart eğri grafiğı yapılmıştır. Standart eğri Şekil 1’degösterilmiştir.



Şekil 3.1. Trosin standart eğrisi

Aktivite Tayin Yöntemi 1

Aktivite ölçümlerinin hepsi 35°C’de gerçekleştirilmiştir. Su banyosu da 35°C’ye ayarlanmıştır. İlk olarak Süt Kazeini Substrat Çözeltisi 1’in 3 ml’si su banyosunda 5 dakika boyunca bekletilmiştir. Sonra 0.5 ml enzim çözeltisinden üzerine eklenerek 10 dakika reaksiyonun oluşması beklenmiştir. Süre tamamlandıktan sonra reaksiyonu bitirmek için TCA Karışım Çözeltisi 1’den 3,2 ml eklenerek 10 dakika bekletilmiştir. Şahit numunede enzim çözeltisi eklenmesi dışında tüm basamaklar yapılmıştır. Numuneler mavi bant süzgeç kâğıdından geçirilerek 275nm’de spektrofotometrede absorbans değerleri bulunmuştur (Shimogaki., 1991).

Aktivite Tayin Yöntemi 2

Aktivite ölçümlerinin hepsi 30°C’de gerçekleştirilmiştir. Su banyosu da 30°C’ye ayarlanmıştır. İlk olarak Süt Kazeini Substrat Çözeltisi 2’nin su banyosunda 2,5 ml’si 5 dakika boyunca bekletilmiştir. Sonra 0.5 ml enzim çözeltisinden üzerine

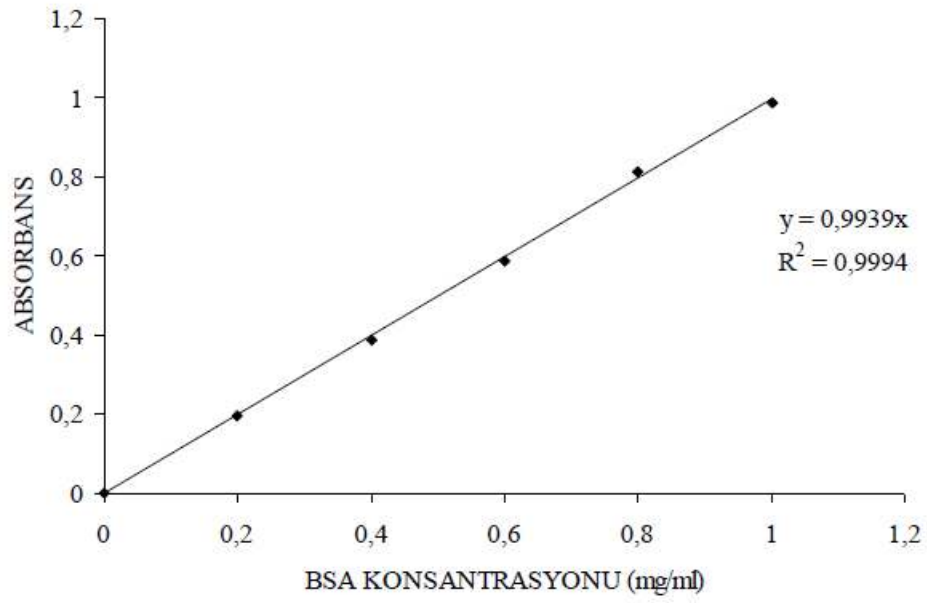
eklenerek 10 dakika reaksiyonun oluşması beklenmiştir. Süre tamamlandıktan sonra reaksiyonu bitirmek için TCA Karışım Çözeltisi 2' den 2,5 ml eklenerek yaklaşık yarım saat bekletilmiştir. Şahit numunede enzim çözeltisi eklenmesi dışında tüm basamaklar yapılmıştır. Numuneler mavi bant süzgeç kâğıdından geçirilerek 275nm'de spektrofotometrede absorbans değerleri bulunmuştur (Jıca,1995).

3.5.7. Protein Tayini

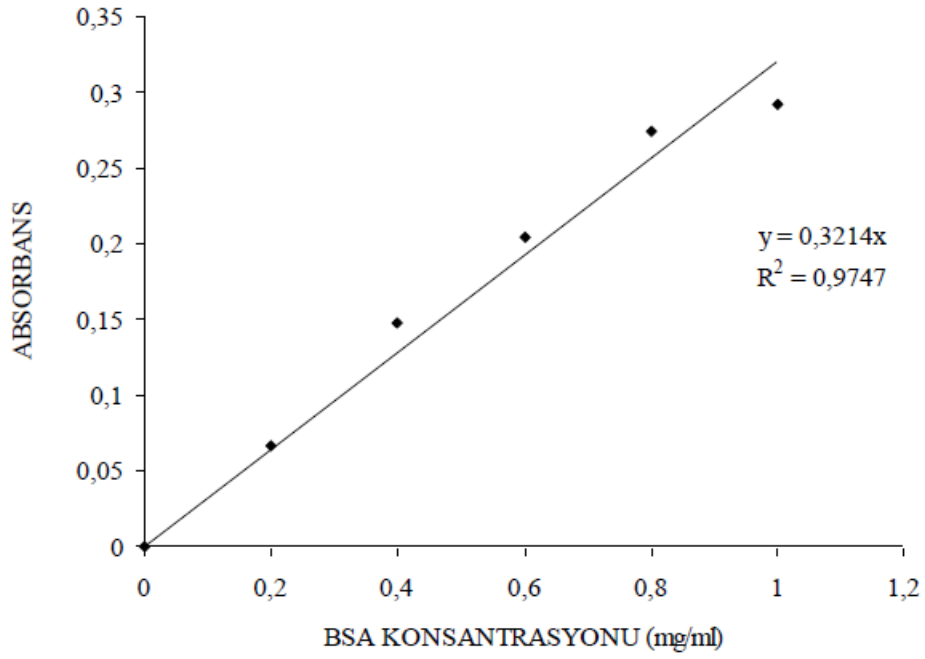
Protein tayin hesaplamaları için UV Absorbsiyon ve BCA Yöntemi uygulanmıştır. Çalışmaların sonucu yakın olduğu için tek bir çalışmayla devam edilmiş olup UV Absorbsiyon Yöntemi ile çalışmalara devam edilmiştir. Bu yöntemde, 280 nm'de protein miktarları (mg/ml) enzim numunelerinin hesaplanmıştır. Çalışma tamponu Şahit numune olarak kullanılmıştır. BSA standart eğrisi kullanarak protein miktarları gösterilmiştir.

Kullanılan tampon ml'sinde 0,2-1 mg BSA içeren çözelti hazırlanarak tampona karşı absorbans değerleri 280 nm'de belirlenmiştir. Standart eğri Şekil 2' de gösterilmiştir (Stoscheck, 1990). BCA Yöntemiyle yapılan protein tayini 2 ml çözelti ve 100 µl örnek 3 ile karıştırılarak 37°C'de yarım saat bekletilmiştir ve absorbansları 562 nm'de okunmuştur.

BSA standart çözeltileri kullanılarak protein miktarının hesabı için standart eğri çizilmiştir. Bunun için 1 ml distile suda 0,2-1 mg BSA hazırlanarak BSA standart çözeltilerinin 100 µl'si ile çözelti 3'ün 2 ml'si karıştırılarak 37°C'de yarım saat bekletilmiştir ve absorbansları 562 nm'de okunmuştur. Sonuçların standart eğrisi Şekil 3.2.'de gösterilmiştir (Stoscheck, 1990).



Şekil 3.2. BSA standart eğrisi(280 nm)



Şekil 3.3. BSA standart eğrisi (BCA Yöntemi)

3.5.8. Aktivite ve Spesifik Aktivite Hesabı

UV spektrofotometrede aşağıda belirtilen formüllerle ölçülen absorbans değerleri U/ml olarak aktivite değerine ve U/mg olarak spesifik aktivite değerine çevrilmiştir.

$$\text{Aktivite (U/ml)} (\mu\text{mol/dak*ml}) = [\text{Abs}_{275,\text{numune}} / \text{Abs}_{\text{şahit},275(1\mu\text{mol Trosin})}]^*$$

$$(1/t) * (V_1/V_2) * \text{Seyreltme oranı}$$

$$\text{Spesifik Aktivite (U/mg)} = [\text{Aktivite (U/ml)} / \text{Protein (mg/ml)}]$$

t => Reaksiyon süresi (dak)

V₁ => Reaksiyon Hacmi (ml)

V₂ => Enzim hacmi (ml)

Abs_{275,numune} => Aktivite tayininde elde edilen absorbans değerleri

Abs_{şahit,275(1μmol Trosin)} => Trosin standart eğrisinden elde edilen eğim
(Abs/μmol.ml⁻¹)

4. BULGULAR

4.1. Çalışma 1

Bacillus subtilis megatherium türünden meydana getirilen proteaz enziminin spesifik aktivite değişimine bakılmıştır. Çalışmadaki besiyeri hazırlığı ve ekim bölüm 3.5.2’de anlatılan şekildedir. Sadece 400 ml’si sıvı besiyerinden hazırlanmıştır. 250 ml’lik 4 adet erlene 100’er ml olarak sterilizasyon yapmak için otoklavlanmıştır. *Bacillus subtilis megatherium* sıvı besiyerine ekim yapılarak erlenler 37°C’deki etüve kaldırılmıştır sporlanma ve üremelerine bakılmıştır.

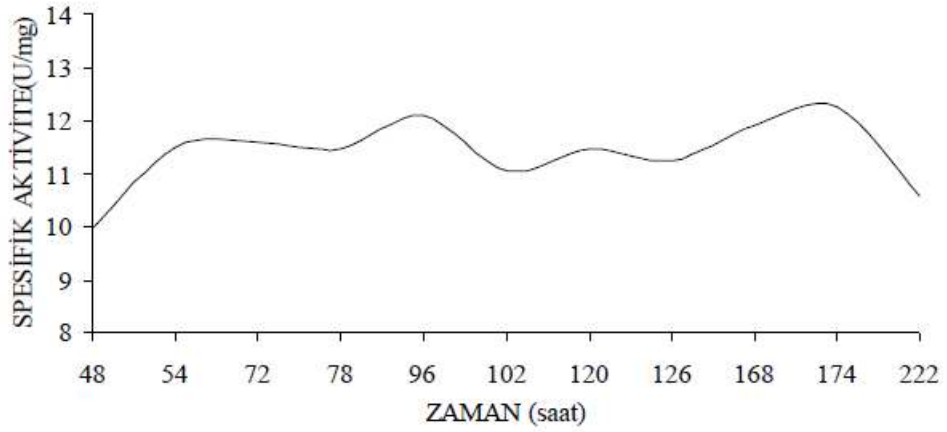
2 gün sonunda sabah ve akşam 12 saat arayla 5’er ml numune alınmıştır. 156 saat sonunda numune alımına son verilmiştir. Tüm örnekler santrifüj yapılarak protein ve aktivite tayini için çözelti kısımları buzdolabına konulmuştur. Erlenlerde bulunan çözeltiler santrifüj yapıp çökelti ve çözelti ayrılmıştır.

Protein ve aktivite ölçümleri yapmak için 48 saat buzdolabında bekletilmiştir. Yapılacak çalışmada Aktivite Tayin Yöntemi 1 kullanılmıştır. Yüksek çıkan protein değerler için örnekler Sodyum–Borat Tamponu 2 (0,01mol/l; pH:10,5) ile 1/20 oranında seyreltilerek ölçülmüştür.

Ölçüm sonuçları Tablo 4.1’de ve Şekil 4.1’de gösterilmiştir. Çalışma 1’de ayrılan 4 erlendeki örneklerde tek tek ölçümler yapılmıştır. Gösterilen değerler bu ayrılan 4 erlendeki örneklerin ortalama değerleridir. Bu sonuçlara göre yüksek aktivite 96. ve 156. saatlerdedir. 96 ile 156 saat dilimleri sporlanma ve üremeye en uygun zamanlardır.

Tablo 4.1. *Bacillus subtilis megatherium* spesifik aktivite-zaman değerleri (Ç1)

Zaman (saat)	Aktivite (U/ml)	Protein (mg/ml) (1/20)	Spesifik Aktivite (U/mg)
48	159,2	0,718	8,9
60	145,9	0,59	10,5
72	132,3	0,535	10,6
84	120,3	0,528	10,5
96	112,7	0,468	12,3
108	107,8	0,485	10
120	108,9	0,463	10,5
132	106,7	0,475	10,3
144	111,4	0,477	10,9
156	119,1	0,489	12,6
168	115,6	0,521	10,6



Şekil 4.1. *Bacillus subtilis megatherium* spesifik aktivite-zaman eğrisi (Ç1)

4.2. Çalışma 2

Çalışma 2’de *Bacillus subtilis megatherium* türünden meydana getirilen proteaz enziminin spesifik aktivitesindeki değişimler incelenmiştir. İncelemeler için örnekler erken saatte başlanıp sık aralıklarla alınmıştır. Enzim çözeltisi amonyum sülfat ile çöktürme ve diyaliz işlemine tabii tutulmuştur. Çalışmadaki besiyeri hazırlığı ve ekim prosedürü bölüm 3.5.2’de anlatılan şekildedir. Sadece 200 ml’si sıvı besiyerinden hazırlanmıştır 100’er ml olacak şekilde 500 ml’lik 42 adet erlene sterilizasyon için otoklava alınmıştır.

Bacillus subtilis megatherium sıvı besiyerine ekim yapılarak erlenler 37°C’deki odada çalkalayıcıda çalkalanarak sporlanma ve üreme zamanları gözlenmiştir. 2 gün sonunda sabah ve akşam 12 saat arayla 5’er ml numune alınmıştır. 156 saat sonunda numune alınma son verilmiştir. Örnekler santrifüj edilerek protein ve aktivite tayini için çözelti kısımları buzdolabına konulmuştur. Erlenide bulunan çözeltiler santrifüj yapıp çökelti ve çözelti ayrılmıştır.

Protein ve aktivite ölçümleri yapmak için 48 saat buzdolabında bekletilmiştir. Yapılacak çalışmada Aktivite Tayin Yöntemi 1 kullanılmıştır. Yüksek çıkan protein değerler için örnekler Sodyum–Borat Tamponu 2 (0,01mol/l; pH:10,5) ile 1/20 değerinde dilüe edilerek ölçülmüştür. Elde edilen veriler Tablo 4.2’de ve Şekil 4.2’de gösterilmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda erlenlerdeki örnekler santrifüj yapılarak toplanan diğer örneklerle beraber (ham homojenat) protein ve aktivite ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Ham homojenatın hacmi ölçülmüş ve amonyum sülfat ile çöktürme yapılmıştır.

Çöktürme %40, %70 ve %80 olarak gerçekleştirilmiştir. Çöktürme için amonyum sülfat ilave edilerek santrifüj yapılarak oluşan çökelti (P1, P2, P3), Sodyum–Borat Tamponu 1 (0,01mol/l; pH:9,3)’in en küçük hacmi ile çözülmüştür. Çöktürmeden sonra diyaliz tüpleri şartlandırılmış ve toplam çökelti (P4) ve %80’lik çöktürme çözeltiye (ÇC) diyaliz yapılmıştır. P4’ün 5 ml’si 500 ml Sodyum–Borat Tamponu 3 (0,01mol/l; pH:9,3)’e karşı 1 gece boyunca diyaliz edilmiştir. Nessler reaktifi diyalizle kontrol edilmiştir. Ç4X olarak isimlendirilen diyaliz örneğinin hacmi

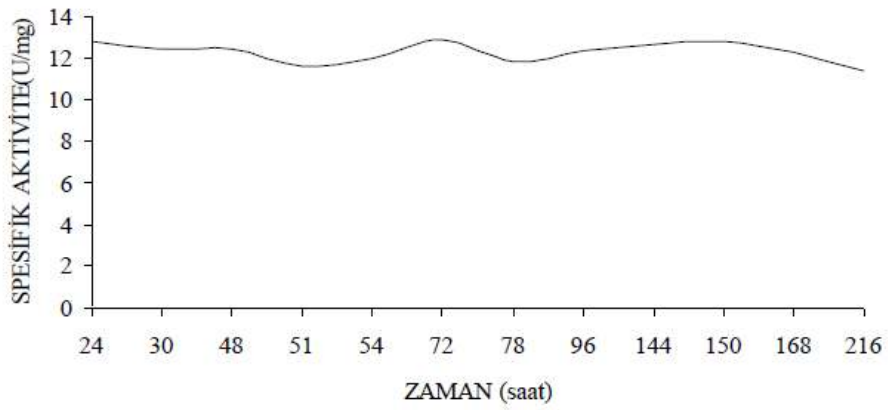
ölçülerek 20000 devir/dakika hızla yaklaşık yarım saat santrifüj edilerek çökelti (P5A) ve çözelti (Ç5X) ayrılmıştır.

Örneklerden santrifüjden önce ve sonra protein ve aktiviteleri belirlenmiştir. Ç3'ün 30 ml'si 3 litre Sodyum–Borat Tamponu 3 (0,01mol/l; pH:9,3)'e karşı 1 gece diyalize alınmıştır. Diyaliz kontrolü Nessler reaktifi ile yapılmıştır. Ç4Y olarak isimlendirilen diyaliz örneğinin hacmi ölçülerek 20000 devir/dakika hızla yaklaşık yarım saatsantrifüj edilerek çökelti (P5B) ve çözelti (Ç5Y) oluşmuştur. P5A ve P5B kısımları saf dışı bırakılmıştır. Örneklerden santrifüjden önce ve sonra protein ve aktiviteleri belirlenmiştir (Tablo 4.3.) (Şekil 4.2.).

Tablo 4.2. *Bacillus subtilis megatherium* spesifik aktivite-zaman değerleri (Ç2)

Zaman(saat)	Aktivite(U/ml)	Protein(mg/ml)(1/20)	Spesifik Aktivite(U/mg)
48	103	0,412	12,5
60	92,5	0,378	12,1
72	92	0,376	12,1
84	90,1	0,388	11,2
96	91,6	0,386	11,1
108	99,8	0,390	12,7
120	96,8	0,401	11,2
132	102,1	0,417	12
144	97,6	0,385	12,2
156	99,8	0,389	12,1
168	97,4	0,398	11,2

Tablo 4.2.'de erlenin ortalama değerleri gösterilmektedir. Spesifik aktivite değerleri 156 saat sonunda 12 U/mg civarındadır. Bu saatten sonra düşmeye başladığı görülmüştür. Çalışma 2 sonucunda Çalışma 1'e nazaran süreye göre daha yüksek olan spesifik aktivite elde edilmiştir.



Şekil 4.2. *Bacillus subtilis megatherium* spesifik aktivite-zaman eğrisi (Ç2)

Tablo 4.3. *Bacillus subtilis megatherium* 'dan elde edilen proteaz enziminin kısmi saflaştırılması (Ç2)

BSM Substrat: Kazein	Hacim (ml)	Protein (1/20) (mg/ml)	Aktivite (U/ml)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg)
HamHomojenat	124	0,397	96,5	1189	12398	9,8
% 40 çöktürme(Ç1)	126,7	0,354	100	969	13199	12,9
% 40 çöktürme(P1)	5,9	0,598	75,2	81	498	5,1
% 70 çöktürme(Ç2)	129	0,301	81,9	942	11287	11,8
% 70 çöktürme(P2)	5,8	0,300	50	48	348	6,9
% 80 çöktürme(Ç3)	127	0,299	79,8	800	10547	12,8
% 80 çöktürme(P3)	5,8	0,297	42	41,5	279	5,9
Toplam çökelti(P4)	17,5	0,398	39	160	784	4
Diyaliz sonr, ve santr,önc(Ç4X)	6	0,201	2	29,8	15,8	0,35
Diyalizsonr, ve santr,öncsi(Ç4Y)	70	0,032	1,1	50	91,8	1,2
Diyalizsonr, ve santr,sonra(Ç5X)	4	0,089	1,3	8,1	8	0,6
Diyalizsonr, ve santr,sonra(Ç5Y)	65	0,014	3	19	228	9,7

Ham homojenatın spesifik aktivitesi 9,8 U/mg, %80'lik çöktürmede çözelti spesifik aktivitesi 12,8 U/mg' dir. Çökeltinin %80'lik çöktürmespesifik aktivite 5,9 U/mg olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara doğrultusunda enzimin çoğunlukla çözelti kısmında kaldığı ve çöktürmede çökeltiye enziminin geçmediği ortaya konulmuştur. Çözeltiye göre çöktürmede 1,5 kat saflaştırma meydana gelmiştir. Çökelti ve çözeltinin diyalizi sonucunda ise spesifik aktivite kaybolmuş ve saflaştırma olmamıştır.

İki farklı yöntem kullanılarak yapılan bu ölçümler karşılaştırıldığında (Aktivite Tayin Yöntemi 1: Spesifik Aktivite 12,9 U/mg ve Aktivite Tayin Yöntemi 2: 12,2 U/mg) spesifik aktiviteler yaklaşık aynı olarak görülmüştür. Çalışma sonucu iki yöntemde kullanım açısından uygundur.

4.3. *Bacillus subtilis megatherium*'dan Elde Edilen Proteaz Enziminin Özelliklerinin İncelenmesi

Enzim Aktivitesi Üzerine pH Etkisi: Belli pH aralıklarında etkisini gösteren enzimlerin reaksiyonunda pH önemli bir ölçüttür. Bu çalışmada optimum pH ve pH kararlılığı açısından incelemeler yapılmıştır. pH aralığı 4-10 arasında değiştirilerek Aktivite Tayin Yöntemi 2 kullanarak ölçümler yapılmıştır. Ölçümler sonucunda enzim örneğinin optimum pH değeri 8,97 olarak belirlenmiştir. pH kararlılığı için yapılan çalışmada kullanılan Tris-HCl tampon pH aralığı 4-10 arasında değiştirilerek Aktivite Tayin Yöntemi 2 kullanarak ölçümler yapılmıştır. Ölçümler sonucunda proteaz enzimi pH 10'dan sonra bozunma özelliği göstermiştir.

Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklık Etkisi: Enzim farklı sıcaklıklara tabii tutularak aktivite tayini kullanarak optimum sıcaklık belirlenmiştir. Bunun için Aktivite Tayin Yöntemi 2 kullanılmıştır. Kullanılan su banyosu 30°C yerine 20°C ile 80°C arasında değiştirilmiştir. Enzim örneklerinin bu ısılarda etkisinin kaybolup aminoasitlere etkisine, etkisini kaybetmesi halinde aktivite değerleri üzerine etkisinin nasıl değiştiğine bakılmıştır. Ortaya çıkan sonuçlarda 70°C sıcaklıkta enzimin etkisinin kaybedildiği görülmüştür. Optimum sıcaklık *Bacillus subtilis megatherium* türü için 60°C dolayındadır. Sıcaklık kararlılığı çalışmalarında enzim örneklerinin hepsi 0,5'er

ml tüplere konularak 10°C ile 80°C arası sıcaklıkta 15 dakika etüvlenmiştir. Sonra oda sıcaklığında 5 dakika soğutulmuş ve Aktivite Tayin Yöntemi 2 ile aktivite tayinleri belirlenmiştir. Ortaya çıkan sonuçlarda 70°C sıcaklıkta enzimin etkisinin kaybedildiği görülmüştür. Sonuçlar doğrultusunda *Bacillus subtilis megatherium*'un, 30-60°C sıcaklık aralığında kararlı olduğu görülmüştür.

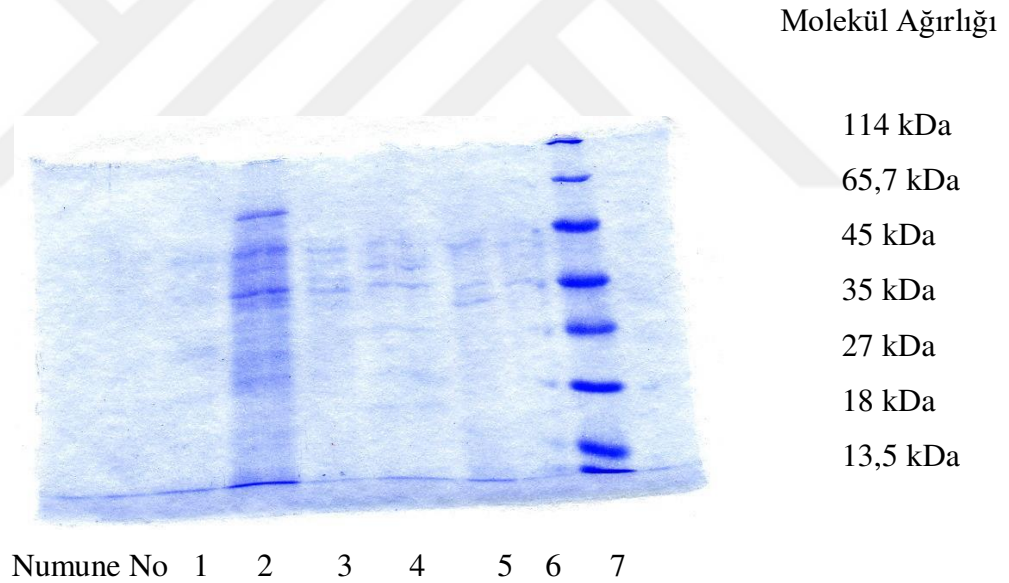
Enzim Aktivitesi Üzerine Metal İyonlarının Etkisi: Yapılan çalışmada metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkileri incelenmiştir. İncelemede metal iyonlarının 1mM'lık çözeltileri hazırlanarak Aktivite Tayin Yöntemi 2 kullanarak ölçümleri yapılmıştır. MnCl₂, FeCl₂ ve CaCl₂ tuzlarının *Bacillus subtilis megatherium*'dan elde edilen örneklerin aktiviteleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. MnCl₂ tuzunun iyi bir aktivatör olduğu belirlenmiştir. FeCl₂ ve CaCl₂ tuzlarının iyi bir aktivatör olmadığı ve inhibitör etkisinin olduğu görülmüştür. İnhibitör olarak CuCl₂ ve EDTA tuzları kullanılmıştır. Sonuçlara göre EDTA iyi bir inhibitör olarak belirlenmiştir.

Reaksiyon Süresinin ve Substrat Konsantrasyonunun Etkisi: Bu çalışma için süre 15-85 dakika arasında ve substrat konsantrasyonu %1-0,07 arasında ayarlanarak yapılmıştır. Aktivite Tayinleri Yöntem 2 ile yapılmıştır. Farklı reaksiyon süresi ve substrat konsantrasyonlarda aktivite değerleri değişmiştir ve 70 dakikada bütün konsantrasyonlar çok yakın çıkmıştır. Ölçümler sonucunda 70 dakikadan sonra substrat konsantrasyonları aktivitede değişiklik yapmamıştır.

Molekül Ağırlığı Tayini: SDS-PAGE kullanarak molekül ağırlığı tayini yapılmıştır. İlk olarak molekül ağırlığı belirlenecek olan numunenin 10µl'sive 10µl 2A Örnek Tamponu karıştırılmıştır. Karışım tüplere konularak 5 dakika 100°C'de kaynamaya bırakılmıştır. 10µl'lik marker da farklı bir tüpte kaynatılmıştır. Örneklerin soğuması beklenerek buzdolabına yerleştirilmiş ve jel çözeltileri hazırlanmıştır. Öncelikle %10'luk Ayırıcı Jel Çözeltisi hazırlanmıştır. Jel çözeltisi için 1,67 ml Monomer çözeltisi; 1,25 ml 4X Ayırıcı Tamponu; 1,97 ml distile su; 50µl %10'luk SDS Çözeltisi; 30µl %10'luk APS Çözeltisi karıştırılmıştır. Son olarak polimerleşme için 10µl TEMED eklenmiştir. Hazırlanan karışım hemen sıkıştırılmış iki cam plaka

arasına $\frac{3}{4}$ 'ü dolacak şekilde dökülmüştür. Jel donduktan sonra %3'lük Yığın Jel Çözeltisi hazırlanmıştır.

Çözelti için 0,2 ml Monomer çözeltisi; 0,5 ml 4X Yığın Tamponu; 1,26 ml distile su; 20µl %10'luk SDS Çözeltisi; 10µl %10'luk APS Çözeltisi karıştırılmıştır. Polimerleşme için 5 µl TEMED eklenmiştir. Hazırlanan karışım hemen sıkıştırılmış iki cam plaka arasına dökülmüştür ve plakalar arasına tarak saplanmıştır ve donması beklenmiştir. Çıkarılan tarağın açtığı kuyucuklara örnek enjektörle beslenerek elektroforez işlemi başlamıştır. Tamamlanan işlemde 2 saat sonunda jel boyama için Coomassie Blue Stain çözeltisinde 1 gece boyunca durmuştur. Bu işlemde sonra jel Destain çözeltisinde 1 gece bekletilmiştir. Çözeltiden çıkarılan jel 20 dakika kurutulmaya bırakılmıştır. Örneklerin fazla bulunduğu bant aralığı marker ile karşılaştırılmış ve böylece molekül ağırlığı hesaplanmıştır (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. SDS-PAGE ile molekül ağırlığı tayini (2:*Bacillus subtilismegatherium*, 7:Marker)

Bacillus subtilis megatherium türünden elde edilen proteaz enziminin molekül ağırlığı 45 kDa civarındadır.

5. TARTIŞMA

Bacillus subtilis megatherium'dan yapılan enzim örneğinin optimum sıcaklık 37°C pH değeri 8,97'dir. Alkalın sınırlar içinde olan bu değerde serin proteazlar yüksek aktivite göstermektedir. Çalışmamızda bulunan proteaz enziminin serin proteazlar grubunda olduğu söylenebilir. Bhaskar ve ark., (2007) ve Denizci ve ark., (2004)'ın yaptığı çalışmalarda da alkalen proteaz üretimi benzerlik görülmektedir. Kaur ve ark., (2001) yaptığı çalışmada, proteaz enzim aktivitesi 30 °C ve pH değeri ise 9.0 olarak belirtilmiştir. Enzimler farklı pH'larda etkilerini gösterirler. Farklı pH'larda enzim aktivitesi büyük değişiklikler göstermektedir (Sarkar ve ark., 1998). Mao ve ark. (1992), çalışmalarında enzim üretim sıcaklık ve pH değerleri belirlenerek, kontrol edileceği belirtmişlerdir.

Çalışma 1'de sporlanma ve üreme koşulları için yapılan hesaplama sonucunda yüksek aktivite 96. ve 156. saatlerde hesap edilmiştir. 168. saat ve sonrası aktivite düşmüştür. 96 ile 156 saat aralığında sporlanma ve üreme için en uygun dilimlerdir. Çalışma 2'de spesifik aktivite değerleri 156 saat sonunda 12 U/mg civarındadır ve 156 saatten itibaren düşmüştür. Çalkalayarak yapıldığı için Çalışma 1'e göre yüksek ve kararlı bir sonuç çıkmıştır. Çalışma sonucunda 156 saatin yeterli bir süre olduğu görülmüştür. Çalışma 2'deki saflaştırmada ham homojenat spesifik aktivite 9,8 U/mg olup %80'lik çöktürmede çözelti spesifik aktivitesi 12,8 U/mg'dır. Çökeltide %80'lik çöktürmede spesifik aktivite 5,9 U/mg olarak belirlenmiştir. Enzimin çoğunluğu çözeltide kalmış ve çöktürmeyle çökeltiye aktarılamamıştır. Çözeltiye nazaran çöktürme sonrası 1,5 kat saflaştırma olmuştur. Çökelti ve çözelti diyalize edildikten sonra spesifik aktivite kaybolmuş ve saflaştırma olmamıştır. Bununla ilgili yapılan çalışmalarda farklı türlerden saflaştırılan alkalen proteazlarda iyon değiştirme kromatografisi kolon çıkışı itibariyle sırasıyla % 58, % 65 ve % 24 verime ve 3,9; 4,9; 21,4 kat saflaştırma görülmüştür (Kumar, 2002; Gessesse ve ark., 2003). Diğer bir çalışmada *B. Pumilus* ve *Bacillus sp.* PS719 türlerinde saflaştırılan alkalen proteazların saflaştırma derecelerini arttırmak için farklı kromatografik işlemler yapılmıştır. Alkalen proteazın *Bacillus clausii* I-52 türünden % 79 verimle 9,9 kat saflaştırıldığı belirtilmiştir (Joo ve ark., 2005).

Bacillus soylarından izole edilen alkalen proteazların optimum sıcaklık değerleri genellikle 50-70°C aralığında (Bayoudh ve ark., 2000; Hadj ve ark., 2007; Kazan ve ark., 2005; Saeki ve ark., 2002) olmakla birlikte bazı mezofilik *Bacillus* türlerinde 40-55°C, termofilik *Bacillus* türlerinde ise 70-75°C aralığında değişmektedir (Joo ve ark., 2005; Patel ve ark., 2006; Singh ve ark., 2001). Çalışmamızda optimum sıcaklık *Bacillus subtilis megatherium* türü için 60°C civarındadır. Sonuçlar doğrultusunda *Bacillus subtilis megatherium*'un, 30-60°C sıcaklık aralığında kararlı olduğu görülmüştür. Kumar (2002)'ın, yaptığı çalışmada *Bacillus pumilus* alkalen proteaz optimal sıcaklığı 55-60 °C, Kazan ve ark. (2005)'ın, yaptığı çalışmada *B. clausii* GMBAE 42 alkalen proteaz optimal sıcaklığı 60°C olarak belirtmişlerdir. Literatür çalışmalarında *Bacillus* türlerinden saflaştırılan alkalen proteazlar 30-60°C ısı aralıklarına sahip oldukları gösterilmiştir (Hood, 2002; Kazan ve ark., 2005; Mohamed, 2005; Patel, 2006; Sareen ve Mishra, 2008).

Metal iyonlarının etkisi incelendiğinde $MnCl_2$ tuzunun iyi bir aktivatör olduğu belirlenmiştir. $FeCl_2$ ve $CaCl_2$ tuzlarının iyi bir aktivatör olmadığı ve inhibitör etkisinin olduğu görülmüştür. İnhibitör olarak $CuCl_2$ ve EDTA tuzları kullanılmıştır. Sonuçlara göre EDTA iyi bir inhibitör olarak belirlenmiştir. Farklı reaksiyon süresi ve substrat konsantrasyonlarda aktivite değerleri değişmiştir ve 70 dakikada bütün konsantrasyonlar çok yakın çıkmıştır. Ölçümler sonucunda 70 dakikadan sonra substrat konsantrasyonları aktivitede değişiklik yapmamıştır. Yapılan çalışmalarda *Bacillus* türlerinden izole edilen alkalen proteazlar Ca^{2+} , Mg^{2+} ve Mn^{2+} gibi metal iyonlarının aktivatör etkiye Fe^{3+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Cu^{3+} , Ag^{+} ve Zn^{2+} gibi metal iyonlarının inhibitör etkiye, Na^{+} , K^{+} , Co^{2+} , Cd^{2+} ve Fe^{2+} gibi diğer metal iyonlarının proteazları çok az baskıladığı belirtilmiştir (Ghorbel ve ark., 2003; Jaoudai ve ark., 2008; Konak, 2012; Sellami-Kamoun, 2008; Yossan ve ark., 2006). Beg ve Gupta (2003)'nın, çalışmasında *Bacillus marmariensis*' in alkalen proteazın 30°C'de Cu^{2+} iyonları ile yüksek aktiveye sahip olduğu gösterilmiştir. Mikroorganizma kaynaklı proteazların aktivitelerinde Ca^{2+} iyonlarının aktivatör etkisi bilinmekle birlikte Ca^{2+} ve Mg^{2+} iyonlarının *Bacillus marmariensis* türünün alkalen proteazı inhibisyona uğratmaktadır. Fe^{2+} ve Zn^{2+} metal iyonları alkalen proteazlarda az ya da hiç inhibisyon etkisi yapmamakla birlikte GMBE 72 alkalen proteazı üzerinde kuvvetli

inhibisyona neden olmaktadır (Ghorbel ve ark., 2003; Jaoudai ve ark., 2008; Kazan ve ark., 2005; Konak, 2012; Sellami-Kamoun, 2008; Yossan ve ark., 2006). Çalışmamızda molekül ağırlığı tayininde *Bacillus subtilis megatherium* türünden elde edilen proteaz enziminin molekül ağırlığı 45 kDa civarındadır. Farklı *Bacillus* türlerinden saflaştırılan alkalen proteazların molekül ağırlıkları 15-36 kDa aralığındadır (Bugg, 1996; Jonsson ve Martin, 1965; Trevor., 1994; Zouari ve Jaoua, 1999). Yossan ve ark. (2006), yaptıkları çalışmada *Bacillus megaterium* 'dan izole edilen alkalen proteazın moleküler ağırlığını 27 kDa iken, Seifzadeh ve ark., (2008)'ın yaptığı çalışmada *Bacillus* sp.'den izole edilen proteazın molekül ağırlığı 47 kDa, Falahatpishe ve ark., (2007)'in çalışmasında ise *Bacillus* sp. proteazının molekül ağırlığını 24,7 kDa olarak belirtilmiştir. Çıkan sonuçlar doğrultusunda proteazlar moleküler ağırlıklarıyla genellenememektedir. Türü aynı olanlarda farklı molekül ağırlığına sahip proteazlar olduğu gibi, türü aynı olan molekül ağırlığına sahip proteazlar da saptanmıştır.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Endüstride yer alan giderek daha fazla önem kazanan enzim teknolojisinde mikroorganizma kaynaklar tercih edilmektedir. Çünkü bu tür kaynakların diğer kaynaklara göre katalitik aktiviteleri yüksek olması, farklı yan ürün oluşturmaması, ucuz ve her koşulda üretilebilir olması tercih sebebidir. Bu tür kaynaktan üretilen enzimler aşırı ısı ve pH değerlerinde bile yüksek seviyede aktivitelidir. Bu açıdan endüstride kullanılacak enzimler seçilmeli, alerjik ya da toksik etkili olmamalıdır (Aygan, 2008). Enzim teknolojisi alanında gelişmelerin artması, kullanılan alanların çeşitliliğinin fazla olması ve ekonomik olarak yüksek değere sahip olması açısından, bu alandaki farklı araştırmalar, daha da önem kazanmaktadır (Konak, 2012). Endüstri alanında en sık kullanılan enzim türü *Bacillus* cinsidir. Endüstriyel enzimler arasında pazar payının %60'ını oluşturan proteazlar en fazla deterjan endüstrisinde kullanılmaktadır. Bu enzimlerin % 89'unu *Bacillus* soyundan izole edilen proteazlar oluşturmaktadır. Sonuç olarak; Enzimden yeterli derecede saflaştırma olmamasına rağmen endüstri için önemli olan ısı ve pH stabilitesinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Bakteriler çeşitli ortamlarda geliştirilerek verim ve saflık dereceleri belirlenebilir. Bu da enzimin endüstriyel açıdan kullanım olanaklarının sağlanmasına ve dış piyasadan temin edilen proteazın, ülkemizde üretilebilmesine ve ülke ekonomisine katkıda bulunulmasına olanak sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Aehle W (2004).** Enzymes in Industry Production and Applications. Wiley- VCH, Weinheim, **28**, 335- 340.
- Afşar A (2008).** A Research on Increasing The Effectiveness Of Degreasing Process By Using Enzymes. *Res. Microbiol.*,45-53.
- Anwar A, Saleemuddin M (1998).** Alkalene Proteases: A Review. *Bioresour. Technol.*, **64**, 175-183.
- Aoki K, Miyamoto S, Murakami R, Shinke R (1995).** Anaerobic Synthesis of Extracellular Proteases by The Soil Bacterium *Bacillus sp.* AM-23: Purification and Characterization of The Enzymes. *Soil. Biol. Biochem.*, **27(11)**, 1377-1382.
- Aygan A (2008).** *Haloalkolofil Bacillus sp. izolasyonu, amilaz, selüloz ve ksilanaz enzimlerinin üretimi, karakterizasyonu ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilirliği.* Çukurova Üniversitesi. Doktora Tezi, Adana, 186s.
- Babe LM, Craik CS (1997).** Viral Proteases: Evolution Of Diverse Structural Motifs To Optimize Function, *Cell*, **91**, 427-430.
- Banerjee UC, Sanı RK, Azmi W (1999).** Thermostable Alkaline Protease from *Bacillus brevis* and its Characterization as a Laundry Detergent Additive. *Process Biochem.*, **35**, 213-219.
- Bayoudh A, Gharsallah N, Chamkha M, Dhouib A, Ammar S, Nasri M (2000).** Purification and characterization of an alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa* MN1. *J. Ind. Microb. Biotechnol.*, **24**, 291- 295.
- Beg KQ, Gupta R (2003).** Purification and Characterization of an Oxidation- Stable, Thiol-Dependent Serine Alkaline Protease from *Bacillus mojavensis*. *Enzyme Microb. Technol.*, **32**, 294-304.
- Bhaskar N, Modi VK, Govindaraju K, Radha C, Lalitha RG (2007).** Et endüstrisinin ürünlerine göre kullanımı: koyun visseral kütesinden protein hidrolizatı. *Bioresour. Technol.* **98**, 388-394. doi: 10.1016 / j.biortech.2005.12.017.
- Bugg T (1996).** An Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry, Blackwell Science, Oxford, U.K.
- Coleman G, Elliott WH (1962).** Studies On A-Amylase Formation By *Bacillus subtilis*. *Biochem. J.*, **83**, 256-263.
- Çelik N (2006).** *Bacillus clausii* GMBAE 42'den Saflaştırılan Alkalın Proteazın Termal İnaktivasyon Kinetiğinin Belirlenmesi ve Cu²⁺ İyonları İle Termostabilizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli. 11-56.
- Çetin ET (1965).** *Pratik Mikrobiyoloji.* 206, İsmail Akgün Matbaası. İstanbul.

Demain AL, Solomon NA (1981). In Industrial Microbiology and the Advent of Genetic Engineering, Scientific American, Freeman&Comp., San Francisco, 3-14.

Denizci AA, Kazan D, Abeln ECA, Erarslan A. (2004). Yeni izole *Bacillus clausii* GMBAE42: bir alkalın proteaz pro- Yüksek alkali koşullar altında büyüeyebilen kanal. *J. Baş. Microbiol.*, **96**, 320-327.

Dinçbaş S (2009). *Alginat Kapsüllerinde Tutuklanan Bacillus Amyloliquefaciens A-Amylase Enziminin Farklı Nişasta Kaynaklarını Hidrolizleme Yeteneğinin Araştırılması.* Yüksek Lisans Tezi, Bursa, 6-8.

Doonan S (1996). *Protein Purification Protocols.* New Jersey: Humana Press.

Eren KÖ, Çömlekçioğlu U, Dostbil N (2006). Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Endüstrideki Kullanım Alanları, *KSU J. Eng. Sci.*, **9(1)**.

Fadıloğlu SO, Erkmen N (2004). Gıda Sanayinde Enzimlerin Önemi. Gaziantep Üniversitesi, Bilimsel yayımlar kataloğu. s: 1-16.

Falahatpishe HM, Jalali N, Badami N, Mardani D (2007). Production and purification of a protease from an alkalophilic *Bacillus* sp. 2-5 strain isolated from soil. *Iran. J. Biotechnol.*, 110–113.

Fankhauser DB (2007). Fankhauser's Cheese Page. *Enzyme Microb. Tech.*, 1-25.

Fersht A (1998). *Structure and Mechanism in Protein Science.* USA: Freeman and Company.

Gençkal H, Tari C (2006). Alkaline Protease Production from Alkalophilic *Bacillus* sp. Isolated from Natural Habitats. *Enzyme Microb. Tech.*, **39**, 703-710.

Gerhartz W (1990). *Enzymes in Industry.* Weinheim, Germany.

Gessesse A (1999). Purification And Characterization Of Two Raw-Starch-DigestingThermostable A-Amylase From A Thermophilic *Bacillus*. *Enzyme Microb. Tech.*, **25**, 433-438.

Gessesse A (1998). Purification and Properties of Two Thermostable Alkaline Xylanases From an Alkaliphilic *Bacillus* sp. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64(9)**, 3533-3535.

Gessesse A, Hatti-Kaul R, Gashe BA, Mattiasson B (2003). “ Novel Alkaline Proteases from Alkaliphilic Bacteria Grown on Chicken Feather”, *Enzyme Microb. Tech.*, **32**, 519-524.

Gheorghiu AL (2008). *Bazı ekstrem termofil anaerobik bakterilerin alkali proteazlarının özelliklerinin belirlenmesi.* Ankara Üniv. Fen Bil. Enst. Yüksek Lisans Tezi, Ankara.

Ghorbel B, Sellami-Kamoun A, Nasri M (2003). Denge saplaması *Bacillus cereus* BG1'den proteazlar. *Enzyme Microb. Tech.*, **32**, 513-518.

Godfrey T, West S (1996). Industrial Enzymology. 2nd edn. p. 3. Macmillan Publishers, Inc., NY. ISBN 0-33359464-9.

Gripon JC (2003). Encyclopedia of Dairy Sciences. Academic Press, 410- 406.

Gupta R, Beg QK, Khan S, Chauhan B (2002). An Overview On Fermentation, Downstream Processing And Properties Of Microbial Alkaline Proteases. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 381 –395.

Hadj T, Dosta J, Ma´rquez-Serrano R, Mata-A´ IJ (2007). Effect of ultrasound pretreatment in mesophilic and thermophilic anaerobic digestion with emphasis on naphthalene and pyrene removal. *Water Res.*, **41(1)**, 87–94.

Hood EE (2002). “From Green Plants to Industrial Enzymes”, *Enzyme Microb. Tech.*, **30**, 279-283.

Jaoudai B, Ellouz-Chaabouni S, Rhimi M, Bejar S (2008). “ Biochemical and Molecular Characterization of a Detergent-Stable Serine Alkaline Protease from *Bacillus pumilus* CBS With High Catalytic Efficiency”, *Biochimie*, **90**, 1291-1305.

Jica (1995). *Enzyme Technology Coursebook*, Japan International Cooperation Agency, Osaka, Japan.

Jonsson A, Martin SM (1965). “Protease production by *Aspergillus fumigatus*”, *Agr. Biol. Chem*, **28**, 734-738.

Joo H, Chang C (2005). Production Of Protease From A New Alkalophilic *Bacillus* Sp. I-312 Grown On Soybean Meal: Optimization And Some Properties. *Process Biochem.*, **40**, 1263-1270.

Kalisz HM (1988). Microbial enzymes. Advances in Biochemical engineering, Biotechnology, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, **36**,3-61.

Kasavi C (2006). *Kovalent bağlanma ve fiziksel adsorbsiyon metodları ile proteaz enziminin immobilizasyonu*. İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

Kaur S, Vohra RM, Kapoor M, Beg QK, Hoondal GS (2001). Enhanced Production and Characterization of a Highly Thermostable Alkaline Protease from *Bacillus* sp P-2. *World J. Microb. Biot.*, **17(2)**, 125-129.

Kazan D, Denizci AA, Öner MNK, Erarslan A (2005). Purification and Characterisation of a Serine Alkaline Protease from *Bacillus clausii* GMBAE 42. *J. Ind. Microbio.l Biot.*, **32**: 335-344.

Kenny AJ (1999). Nomenclature and Classes of Peptidases, In *Proteolytic Enzymes Tools and Targets*, edited by E.E. Sterchi and W. Stocker, (Springer- Verlag, Germany, 1-8.

Khalil AB, Ghandi H, Anfoka H, Bdour S (2003). Isolation Of Plasmids Present In Thermophilic Strains From Hot Springs In Jordan. *J. Ind. Microbiol. Biot.*, **19**, 239-241.

Kıran EÖ, Çömlekçioğlu U, Dostbil N (2006). Bazı Mikrobiyal Enzimler Ve Endüstrideki Kullanım Alanları. *KSU J. Eng. Sci.*, **9(1)**, 12-19.

Konak Ş (2012). Bazı polinükleer metal komplekslerinin alkalin proteaz, plazmid DNA üzerine etkilerinin ve antioksidan kapasitelerinin araştırılması. Süleyman Demirel Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, s:35-42, Isparta.

Krajewska B (2003). Application of Chitin and Chitosan Based Materials for Enzyme Immobilizations: A Review. *Enzyme Microb. Tech.*, **35**, 126-139.

Kumar CG (2002). “Purification and Characterization of a Thermostable Alkaline Protease from *Bacillus pumilus*”, *Lett. Appl. Microbiol.*, **34**, 13-17.

Kumar CG, Takagi H (1999). Microbial Alkaline Proteases: a Bioindustrial Viewpoint. *Biotechnol. Adv.*, **17**, 561-594.

Kurdy VA, Simonenko IA (1994). Alkaline Serine Proteinase And Lectin Isolation From The Culture Fluid Of *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41-505.

Lobmann R, Zemlin C, Motzkau M, Reschke K, Lehnert H (2006). Proteaz absorban örtü ile tedavi edilmiş diyabetik ayak yaralarında matriks metalloproteinazlar ve büyüme faktörlerinin ekspresyonu. *J. Diabetes Complicat.*, **2(4)**, 230-238.

Mabrouk SS, Hashem AM, EL-Shayeb A, Ismail MS, Abdel- Fattah AF (1998). Optimization of alkaline protease productivity by *Bacillus licheniformis* ATCC 21415. *Bioresour. Technol.*, **69**, 155-159.

Mahler RH, Cordes H (1966). *Biological Chemistry*. New York, 346- 411.

Mao W, Pan R, Fredman D (1992). High Production of Alkaline Protease by *Bacillus licheniformis* in a Fed-Batch Fermentation Using Synthetic Medium. *J. Indust. Microbiol.*, **11(1)**, 1-6.

Mohamed SA, Fahmy AS, Mohamed TM, Hamdy SM (2005). Proteases in Egg, Miracidium and Adult of *Fasciola gigantica*. Characterization of Serine and Cysteine Proteases from Adult. *Comp. Biochem. Phys. A*, Part B **142**, 192-200.

Nelson D, Cox MM (2005). Lehninger Biyokimyanın İlkeleri, N. Kılıç (Editor), 3. Baskıdan Çeviri, Palme Yayıncılık, Sayfa: 243-290.

Niehaus F, Bertoldo C, Kahler M, Antranikian G (1999). Extremophiles As A Source Of Novel Enzymes For Industrial Application. *Appl. Environ. Microbiol.*, **5**, 711-729.

Novel JJ, Nickerson WJ, Robinson RS (1963). Screening For A New Streptomyces Strain Capable Of Efficient Keratin Degradation. *Bba-Gen Subjects.*, **77**, 73.

Oberoi R, Beg QK, Puri S, Saxena RK, Gupta R (2001). Characterization And Wash Performance Analysis Of An SDS-Resistant Alkaline Protease From A *Bacillus Sp.* *World J. Microb. Biot.*, **17**, 493-497.

Onat T, Emerk K (1997). Temel Biyokimya. 2.Baskı, İzmir: Saray Medikal Yayıncılık.

Orhan E (2003). *Bacillus subtilis* ve *bacillus cereus* bakterilerinden proteaz enziminin kısmi saflaştırılması ve özelliklerinin incelenmesi. İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, s: 24-38, İstanbul.

Ottrup H, Jorgensen ST (2002). *The Importance Of Bacillus Species In The Production Of Industrial Enzymes.* In: Berkley, R. (Ed.) Applications.

Öztürk MH (2004). *Partial purification and characterization of alkaline proteases from isolated bacillus strains.* İ.T.U. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

Öztürk S (2007). *Ülkemizden izole edilen bacillus licheniformis ba17'den elde edilen alkale proteaz enzimin saflaştırılması ve karakterizasyonu.* Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Patel RK, Dodia MS, Joshi RH, Singh SP (2006). Purification and Characterization of Alkaline Protease from a Newly Isolated Haloalkaliphilic *Bacillus sp.* *Process Biochem.*, **41**, 2002-2009.

Polaina J (ed), MacCabe AP (ed). 2007. *Industrial Enzymes, Structure, Function and Applications.* Springer, Dordrecht, The Netherlands, 633 p.

Price NC, Stevens L (1982). *Fundamentals of Enzymology*, Oxford.

Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV (1998). Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiol Mol. Biol. Rev.*, **62**, 597-635.

Saeki K, Hitomi J, Okuda M, Hatada Y, Kageyama Y, Takaiwa M, Kubota H, Hagihara H, Kobayashi T, Kawai S, Ito S (2002). “ A Novel Species of Alkaliphilic *Bacillus* That Produces an Oxidatively Stable Alkaline Serin Protease”, *Extremophiles*, **6**, 65-72.

Sareen R, Mishra P (2008). Organik çözücü kararlı proteazın saflaştırılması ve karakterizasyonu *Bacillus licheniformis* RSP-09-37. *Uygulamalı Mikrobiyoloji ve Biyoteknoloji*, **79**, 399 - 405.

Sarkar SB, Sreekanth S, Kant R, Banarjee BC, Bhattacharyya D (1998). Production and Optimization of Microbial lipase. *Biotechnol Bioproc. E.*, **19**, 29- 32.

Schallmeyer M, Singh A, Ward OP (2004). Development In The Use Of *Bacillus* Species For İndustrial Production. *Can. J. Microbiol.*, **50**, 1-17.

Sellami-Kamoun A, Haddar A, Ali NE, Ghorbel-Frikha B, Kanoun S, Nasri M, (2008). “ Stability of Thermostable Alkaline Protease from *Bacillus licheniformis* RP1 in Commercial Solid Laundry Detergent Formulations”, *Microbiol. Res.*, **163**, 299-306.

Shimogaki H, Takeuchi K, Nishino T, Ohdera M, Kudo T, Ohba K, Irie M (1991). Purification and properties of a novel surface-active agent- and alkaline-resistant protease from *Bacillus sp.Y. Agric.Biol.Chem.*, **55(9)**, 2251-2258.

Silverthorn CF (2004). Parsons T.L., Biomedical Chromotography, P:23-27.

Singh J, Vohra RM, Sahoo DK (2001). Purification And Characterization Of Two Extracellular Alkaline Protease From A Newly İolated Obligate Alkalophilic *Bacillus Sphaericus*. *J Ind Microbiol Biot.*, **26**, 387-393.

Singh J, Batra N, Sobti RC (2000). Serine Alkaline Protease from Newly Isolated *Bacillus sp.* SSR1. *Process Biochem.*, **36**, 781-785.

Stoscheck CM (1990). Quantitation of Protein Methods in Enzymology, *AP.*, **182**, 50-69.

Szecsı P, Koch C, Foltmann B (1992). Seminal Pepsinogen C is Not Identical With, But is Very Similar to Gastric Pepsinogen. *FEBS Lett*, 238-101.

Tanksale A, Chandra PM, Rao M, Deshpande V (2001). Immobilization of alkaline protease from *Conidiobolus macrosporus* for reuse and improved thermal stability. *Biotechnol. Lett.*, **23(1)**, 51-54.

Thomas TD, Mills OE (1981). Proteolytic Enzymes of Starter Bacteria. *Int. Dairy J.*, **35**, 255-273.

Topal S, Pembeci C, Borcaklı M (2000). Türkiye'nin Tarımsal Mikoflorasının Endustriyel Oneme Sahip Bazı Enzimatik Aktivitelerinin İncelenmesi-I:Amilaz, Proteaz, Lipaz. *IUFS J. Biol.*, **24**, 79-93.

Uhlig H (1998). *Industrial Enzymes and Their Applications*. USA: John Wiley & Sons, 116-144.

Uludağ YB (2000). *İmmobilize Glukomilaz ile Maltodekstrinden Glukoz Üretimi*. Gebze İleri Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, s: 25-39, Kocaeli.

Ward OP (1985). *Proteolytic Enzymes*. In: Moo-Young M. (Eds.), *Comprehensive Biotechnology*. Great Britain: Pergamon Press, p: 789-818.

Wiseman A (1987). *Handbook of Enzyme Biotechnology*. 2. ed. New York: EUA John Wiley sons.

Yang J, Shih I, Tzeng Y, Wang S (2000). Production And Purification of Protease From a *Bacillus subtilis* That Can Deproteinize Crustacean Wastes. *Enzyme Microb. Technol.*, **6**, 406-413.

Yossan S, Reungsang A, Yasuda M (2006). Purification and Characterization of Alkaline Protease From *Bacillus megaterium* Isolated From Thai Fish Sauce Fermentation Process. *Sci. Asia.*, **32**, 377-383.

Zakaria AQ (2006). Production And Characterization Of Thermostable A-Amylase By Thermophilic *Geobacillus stearothermophilus*. *J. Biotechnol.*, **1**, 850-857.

Zeman NW, Mcrea JM (1985). α -Amylase production using a recombinant DNA organism. *Cereal Food World*, **30 (1)**, 777-780.

Zouari N, Jaoua S (1999). Production and Characterization of Metalloproteases synthesized concomitantly with δ -endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain grown on gruel-based media. *Enzyme Microb. Technol.*, **25**, 364-371.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Bekir ERDOĞAN
Doğum Yeri ve Yılı : ANTALYA-1993
Medeni Hali : EVLİ
Yabancı Dili : İNGİLİZCE
Uyruğu : T.C.
Telefon No : 05078420285
Elektronik Posta : bekirerdogan07@hotmail.com
İletişim Adresi : Buğday pazarı mah. Hardal sok.
no:14 Çankırı



Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):

Lisans: Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Hemşirelik Bölümü (2011-2015)

Yüksek Lisans: Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sağlık ve Biyomedikal Bilimler (Disiplinler Arası) Anabilim Dalı (2017-2020)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl (Mesleki Deneyim):

1. Eldivan Şehit Mustafa Yahya Mertcan Mesleki ve Teknik Anadolu Lisesi (2016-Devam ediyor)

