

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Bacillus subtilis* ZBP4 SUŞUNUN PROTEAZ
ÜRETİM KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU VE
ENZİMİN BAZI ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Merve DEĞİRMEN

Enstitü Anabilim Dalı : GIDA MÜHENDİSLİĞİ

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Ayşe AVCI

Temmuz 2019

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Bacillus sp.* ZBP4 SUŞUNUN PROTEAZ ÜRETİM
KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU VE ENZİMİN
BAZI ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Merve DEĞİRMEN

Enstitü Anabilim Dalı : GIDA MÜHENDİSLİĞİ

Bu tez 08.07.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği /oyçokluğu ile kabul edilmiştir.



**Prof. Dr.
İbrahim Çakır
Jüri Başkanı**



**Doç. Dr.
Omca Demirkol
Üye**



**Doç. Dr.
Ayşe Avcı
Üye**

BEYAN

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

Merve DEĞİRMEN

08.07.2019

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca araştırma ve laboratuvar çalışmalarında beni teşvik eden ve bilgisi ile yönlendiren değerli danışmanım Doç. Dr. Ayşe AVCI'ya verdiği emek, güven ve sunduğu fırsatlar için teşekkür ederim.

Bilgi birikiminden faydalandığım ve laboratuvar çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Arş. Gör. F. Alev AKÇAY'a; protein analizi için Arş. Gör. Hatice SIÇRAMAZ'a; çalışmalarım boyunca verdiği maddi manevi destek için fedakâr arkadaşım Ayşegül AY'a teşekkür ederim.

Vatanımı ve milletimi ilelebet muhafaza etmem için her an maddi manevi desteklerini hissettiğim kıymetli ailem; annem Melehat DEĞİRMEN'e, babam Mustafa DEĞİRMEN'e, ablam Müşra PEKER'e ve abim A. Şahin DEĞİRMEN'e çok teşekkür ederim.

Ayrıca bu çalışmanın maddi olarak desteklenmesine imkan veren Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyon Başkanlığına (Proje No: 2019-7-24-52) teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vi
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ÖZET.....	viii
SUMMARY	ix
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2.	
KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Enzimler	3
2.2. Proteazlar.....	5
2.2.1. Proteazların sınıflandırılması	6
2.3. Proteazların Kaynakları.....	9
2.3.1. <i>Bacillus</i> cinsi bakterilerle proteaz üretimi.....	11
2.4. Proteazların Kullanım Alanları	14
2.4.1. Gıda endüstrisinde proteazlar	15
BÖLÜM 3.	
MATERYAL VE YÖNTEM	17
3.1. Materyal	17
3.2. Yöntem.....	17
3.2.1. Kullanılan araç-gereçler ve kimyasallar.....	17

3.2.2. Kullanılan çözelti ve tamponlar	19
3.2.3. Kullanılan substrat ve besiyerleri	21
3.2.4. <i>Bacillus subtilis</i> ZBP4'ün çoğaltılması ve proteaz üretimi ...	22
3.2.4.1. Glukoz konsantrasyonunun proteaz üretimine etkisinin belirlenmesi	23
3.2.4.2. Çeşitli azot kaynaklarının proteaz üretimine ve mikrobiyal gelişime etkisi	23
3.2.4.3. Maya özütü konsantrasyonunun proteaz üretimine etkisinin belirlenmesi	24
3.2.4.4. Soya unu konsantrasyonunun proteaz üretimine ve mikrobiyal gelişime etkisinin belirlenmesi	24
3.2.4.5. Sarımercimek unu konsantrasyonunun proteaz üretimine ve mikrobiyal gelişime etkisi	24
3.2.4.6. Soya ve sarımercimek ununda glukoz katkısının proteaz üretimine etkisinin belirlenmesi	25
3.2.4.7. Başlangıç pH'sının proteaz üretimine ve mikrobiyal gelişime etkisinin belirlenmesi	25
3.2.4.8. Sıcaklığın proteaz üretimine ve mikrobiyal gelişime etkisinin belirlenmesi	26
3.2.5. <i>Bacillus subtilis</i> ZBP4'ten üretilen proteaz enziminin bazı özelliklerinin belirlenmesi	26
3.2.5.1. Proteaz enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi	26
3.2.5.2. Proteaz enziminin optimum pH'sının belirlenmesi	26
3.3. Analizler	27
3.3.1. Mikroorganizma gelişiminin belirlenmesi	27
3.3.2. Enzim aktivitesi	27
3.3.3. Tirozin standart eğrisinin hazırlanması	27
3.3.4. Sarımercimek ununda protein miktarı tayini	28
3.3.5. İstatistiksel analizler	30

BÖLÜM 4.

ARAŞTIRMA BULGULARI	31
4.1. <i>Bacillus subtilis</i> ZBP4	31
4.2. Skim Milk Agarda Proteolitik Aktivitenin Belirlenmesi	31
4.3. <i>Bacillus subtilis</i> ZBP4'ün Çoğaltılması ve Bazal Besiyerinde Proteaz Üretimi	32
4.3.1. Glukoz konsantrasyonunun proteaz üretimine etkisi	32
4.3.2. Çeşitli azot kaynaklarının proteaz üretimine ve mikrobiyal gelişime etkisi	34
4.3.3. Maya özütü konsantrasyonunun proteaz üretimine etkisi	35
4.3.4. Soya unu konsantrasyonunun proteaz üretimine ve mikrobiyal gelişime etkisi	36
4.3.5. Sarımercimek unu konsantrasyonunun proteaz üretimine ve mikrobiyal gelişime etkisi	38
4.3.6. Soya ve sarımercimek ununda glukoz katkısının proteaz üretimine etkisi	40
4.4. Başlangıç pH'sı ve Sıcaklığın Proteaz Üretimine ve Mikrobiyal Gelişime Etkisi	41
4.4.1. Başlangıç pH'sının proteaz üretimine ve mikrobiyal gelişime etkisi	41
4.4.2. Sıcaklığın proteaz üretimine ve mikrobiyal gelişime etkisi ..	45
4.5. Enzimin Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi	48
4.5.1. Proteaz enziminin optimum pH'sının belirlenmesi	48
4.5.2. Proteaz enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi	49

BÖLÜM 5.

TARTIŞMA VE SONUÇ	51
KAYNAKLAR	56
ÖZGEÇMİŞ	65

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

°C	: derece veya derece santigrad
A	: Ağırlık
Dk	: Dakika
EC	: Enzim Komisyonu
g	: Gram
h	: Hacim
HCl	: Hidroklorik asit
L	: Litre
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
N	: Normalite
NA	: Nutrient agar
NB	: Nutrient broth
OD	: Optik yoğunluk
pH	: Pondus hidrojeni
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
sp.	: Alt tür
UV-VIS	: Morötesi- görünür bölge
SMU	: Sarımercimek unu
SST	: Solid State Fermantasyon (Katı Hal Fermantasyonu)
SmF	: Submerged Fermantasyon (Derin Kültür Fermantasyonu)
U	: Ünite
TRIS	: Trihidroksimetil aminometan

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Proteaz enzimi kataliz mekanizması	5
Şekil 3.1. Tirozin standart eğrisi	28
Şekil 4.1. <i>Bacillus subtilis</i> ZBP4 suşunun SMA üzerindeki hidroliz bölgesi.....	31
Şekil 4.2. Bazal besiyerinde proteaz aktivitesi.....	32
Şekil 4.3. Glukoz konsantrasyonlarında proteaz aktivitesi	33
Şekil 4.4. Maya özütü konsantrasyonlarında proteaz aktivitesi	36
Şekil 4.5. Soya unu konsantrasyonlarında proteaz aktivitesi	37
Şekil 4.6. Sarımercimek unu konsantrasyonlarında proteaz aktivitesi	39
Şekil 4.7. Soya veya sarımercimek ununun glukoz varlığında proteaz aktivitesine etkisi	41
Şekil 4.8. Maya özütü ile hazırlanan besiyerinde pH değerine bağlı proteaz aktivitesi	42
Şekil 4.9. Sarımercimek unu ile hazırlanan besiyerinde pH değerine bağlı proteaz aktivitesi	44
Şekil 4.10. Maya özütü ile hazırlanan besiyerinde sıcaklığa bağlı proteaz aktivitesi	45
Şekil 4.11. Sarımercimek unu ile hazırlanan besiyerinde sıcaklığa bağlı proteaz aktivitesi	47
Şekil 4.12. Farklı pH değerlerinde maya özütü içeren besiyerinin proteaz aktivitesi	48
Şekil 4.13. Farklı pH değerlerinde sarımercimek unu içeren besiyerinin proteaz aktivitesi	49
Şekil 4.14. Farklı sıcaklık değerlerinde maya özütü içeren besiyerinin proteaz aktivitesi	50

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Enzimlerin sınıflandırılması	5
Tablo 2.2. Proteazların sınıflandırılması ve etki şekli	9
Tablo 3.1. Kullanılan araç-gereçlerin listesi	17
Tablo 3.2. Kullanılan kimyasalların listesi	18
Tablo 3.3. Protein miktarı tayininde gerçekleşen kimyasal reaksiyonlar	30
Tablo 4.1. Azot kaynaklarının proteaz üretimine etkisi ve mikrobiyal gelişim.....	34
Tablo 4.2. Farklı konsantrasyonlarda soya unu içeren besiyerinde bakteri gelişimi	38
Tablo 4.3. Farklı konsantrasyonlarda sarımercimek unu içeren besiyerinde bakteri gelişimi	40
Tablo 4.4. Maya özütü kullanılan ortamda pH değerine bağlı bakteri gelişimi.....	43
Tablo 4.5. Sarımercimek unu kullanılan ortamda pH'ya bağlı bakteri gelişimi	44
Tablo 4.6. Farklı sıcaklık değerlerinde maya özütü içeren besiyerinde bakteri gelişimi	46
Tablo 4.7. Farklı sıcaklık değerlerinde sarımercimek unu içeren besiyerindeki bakteri gelişimi	48

ÖZET

Anahtar kelimeler: *Bacillus*, proteaz, enzim üretimi

Bu çalışmada, *Bacillus subtilis* ZBP4 suşunun hücre dışı proteaz enzimi üretimi araştırılarak ortam koşullarının enzim üretimi ve mikrobiyal gelişime etkisi belirlenmiştir. Enzim aktivitesinin belirlendiği tüm çalışmalarda bakteri gelişimi sonucunda elde edilen hücresiz sıvı (süpernatant) kullanılmıştır.

Yapılan ön çalışmalarda izolatın proteaz üretme yeteneğinde olduğu anlaşılmıştır. Bazal besiyerinde geliştirilen izolatın verdiği proteaz aktivitesi dikkate alınarak optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Enzim üretimine glukoz konsantrasyonunun (2-20 g/L), azot kaynaklarının (maya özütü, kazein, peynir altı suyu tozu, yağsız süt tozu, soya unu, mercimek unu, amonyum sülfat, pepton), başlangıç pH'sının (5-9) ve sıcaklığın (30-40°C) etkisi belirlenmiştir. Enzim aktivitesi süpernatantın, Tris HCl pH 8 tamponunda çözünmüş kazeinle birlikte 60°C sıcaklıkta 15 dakika boyunca inkübe edilmesiyle belirlenmiştir. Ayrıca enziminin bazı özellikleri (pH, sıcaklık) belirlenmiştir. Enzim aktivitesi ve mikrobiyal gelişimi belirlemek için numunelerin absorbansı sırasıyla UV-VIS spektrofotometrede 280 nm ve 600 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

Çalışılan bazal besiyerinde optimizasyon öncesi enzim aktivitesi 1206 U/mL olmuştur. En iyi proteaz üretimine azot kaynağı olarak maya özütünün kullanıldığı, pH'sı 9 olan ortamda, 35°C'de 48 saat inkübasyon sonunda ulaşılmıştır. Ayrıca üretim koşullarında maya özütü, soya unu ve mercimek unu en iyi azot kaynakları olarak bulunmuştur. Her üç kaynak için konsantrasyon çalışması yapılmış ve maya özütü ve soya ununun optimum 15 g/L konsantrasyonda, mercimek ununun ise 20 g/L konsantrasyonda en iyi proteaz aktivitesine ulaştığı tespit edilmiştir. Proteaz enziminin optimum sıcaklık ve pH'sı sırası ile 60°C ve 8.0 olarak belirlenmiştir.

OPTIMIZATION OF PROTEASE PRODUCTION CONDITIONS OF *Bacillus subtilis* ZBP4 STRAIN AND DETERMINATION OF SOME PROPERTIES OF ENZYME

SUMMARY

Keywords: *Bacillus*, protease, enzyme production

In this study, the production of the extracellular protease enzyme by *Bacillus subtilis* ZBP4 strain was investigated and the effects of environmental conditions on enzyme production and microbial growth were determined. The enzymatic activity was determined in the cell-free supernatant that was obtained after the growth of the isolate.

Preliminary studies showed that the isolate was able to produce protease enzyme. By taking into consideration the protease activity obtained in the basal medium, optimization studies were performed. The effects of glucose concentration (2-20 g/L), nitrogen sources (yeast extract, casein, whey powder, skimmed milk powder, soy flour, yellow lentil flour, ammonium sulfate, pepton), initial pH (5-9) of the medium and incubation temperature (30-40°C) have been determined. Enzymatic activity was determined by incubating the supernatant and casein which was dissolved in Tris HCl pH 8 buffer at 60°C for 15 minutes. In addition, some properties of the enzyme (pH, temperature) were determined. To determine the enzyme activity and microbial growth, the absorbances of the samples were measured at 280 nm and 600 nm by using a UV-VIS spectrophotometer, respectively.

The enzyme activity prior to optimization was 1206 U/mL in the basal medium. The best production was achieved in the medium contained yeast extract as a nitrogen source at pH 9 and 35°C in 48 hours. Furthermore, yeast extract, soybean flour and lentil flour were the best nitrogen sources for the enzyme production. Concentration studies were performed for all three sources and it was determined that yeast extract and soy flour had the optimum 15 g/L concentration and lentil flour had the best protease activity at a concentration of 20 g/L. The optimum temperature and the pH of the protease enzyme were determined as 60°C and pH 8.0.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Biyoteknoloji kavramında enzimler “Özel kullanım için ürün veya süreçleri yapan veya değiştiren; biyolojik sistemleri, canlı organizmaları veya bunların türevlerini kullanan herhangi bir teknolojik uygulama.” olarak tanımlanır (URL-1, 2017). Enzimler biyoteknoloji süreçlerinin merkezini temsil ederek sürekli yenilikçi bir ürün akışı oluşturmaktadır. Enzim teknolojisi endüstriyel enzimlerin aktivitelerini ve kullanımlarını kapsamaktadır. Endüstriyel, farmasötik ve biyoteknolojik uygulamalar için gerekli olan en verimli biyokatalizörlerdir. Katalizör yokluğunda, metabolizmaya yeterli hızda ürün üretmesi gereken biyolojik sistemlerdeki reaksiyonlar çok yavaş gerçekleşir (Campbell ve Farrell, 2011). Enzimatik olmayan katalizörler reaksiyon hızını 10^2 ile 10^4 kat artırırken enzimler tepkimelerin hızını 10^{20} katına kadar yükseltirler. Kimyasal katalizörlere kıyasla ekonomik ve çevresel avantajları nedeniyle biyolojik katalizörler olan enzimlere talep hızla artmaktadır. Ayrıca geleneksel kimyasal katalizörler biyolojik olarak parçalanamazlar ve toksik olabilirler (Adrio ve Demain, 2014).

Proteazlar hücre gelişimi, protein yıkımı, kan pıhtılaşması, iltihaplanma, zimojenlerin aktivasyonu, hormon salınımı, farmakolojik yünden aktif peptitlerin ve salgı proteinlerinin membranlar boyunca taşınması gibi birçok fizyolojik ve patolojik süreçte kritik bir rol almaktadır (Rao ve ark., 1998). Sadece hücre metabolik süreçler için değil, aynı zamanda endüstriyel uygulamalar için de istenilen özellikleri barındırdığından özel ilgi kazanmıştır (Gupta ve ark., 2002; Bach ve ark., 2012; Tavano ve ark., 2018). İlaç, gıda, deterjan, deri, ipek ve ziraat endüstrisi uygulamalarına kimyasal ürünler üretmek için kullanılırlar.

Meydana gelen kimyasal reaksiyonların neredeyse tümünü katalize eden enzimler ekzo- ve endoenzimler olarak aktivite göstermektedir. Ekzoenzimler, hücre içinde

sentezlendikten sonra dış ortama salgılanarak protein, polisakkarid, lipid, vs. büyük moleküllerin hidrolizasyonunda görev yaparlar. Hücre duvarından geçebilecek düzeye inmelerini katalize ederler (Rao ve ark., 1998). Bu tarz aktivite gösteren hidrolitik enzimlerin başlıcası proteazlardır. Proteazlar amino asitler arasındaki peptit bağına hidrolize eden enzimlerdir yani proteinlerin hidrolizinde katalitik bir rol oynarlar. Proteazların özgünlüğü; fonksiyonel grupların özelliklerine, substratın büyüklüğüne, amino asitlerin dizilişlerine ve molekül ucundaki atomların karakterine bağlıdır. Protein moleküllerindeki tüm peptit bağlarını parçalayabilmek için tek bir proteaz yeterli değildir.

Proteazlar bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar gibi çok çeşitli kaynaklarda bulunurlar. Bitkisel ve hayvansal proteazların beklentileri karşılayamaması, mikrobiyal proteazlara olan ilginin artmasına neden olmuştur. *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor* cinsine ait fungal proteazlar; *Bacillus* cinsine ait bakteriyel proteazlar üretilmiştir. *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquifaciens*, *Bacillus firmus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* en önemli proteaz üreticileridir (Singh ve ark., 2016).

Proteazlar genellikle üretim avantajları nedeniyle derin kültür fermantasyonu kullanılarak üretilir. Ortam bileşimi mikroorganizmalardan enzim üretiminde önemli bir rol oynar. Örneğin C/N oranındaki değişiklik, glukoz gibi kolayca metabolize olabilen şekerlerin varlığı, ortamdaki azot kaynakları ve metal iyonları mikroorganizmalardan hücre dışı proteaz üretimini etkiler. Bunların yanı sıra havalandırma, inokulum yoğunluğu, pH, sıcaklık ve inkübasyon süresi gibi diğer bazı fiziksel faktörler de üretilen proteaz miktarını etkiler (Lakshmi ve Hemalatha, 2016).

Bu çalışmada, önceden izole edilen *Bacillus subtilis* ZBP4 izolatından hücre dışı proteaz enzimi üretimi araştırılmıştır. Proteaz enzimini üretme yeteneğinde olduğu belirlenen *Bacillus* izolatı ile bazı üretim koşulları (karbon ve azot kaynağı, pH, sıcaklık) optimize edilerek üretime olan etkisi belirlenmiştir.

BÖLÜM 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Enzimler

Bir enzim spesifik bir reaksiyonu veya bir dizi reaksiyonu gerçekleştirebilen büyük bir protein molekülüdür (tipik olarak 20.000 g/mol veya daha fazla). Çoğunlukla protein moleküllerinden oluşur ancak RNA molekülünden oluşan enzimler de kimyasal reaksiyonlara katılabilmektedir. Reaktant moleküller olarak adlandırılan substratlar, enzim üzerindeki aktif bir bölgeye bağlanarak spesifik bir tepkimeyi katalize etmek için enzim-substrat kompleksini (ES) oluşturur. Daha sonra tepkime ilerledikçe ürün (Ü) oluşur ve enzim orijinal durumuna döner. Reaksiyon denge sabitlerini ve sistemin termodinamik özelliklerini değiştirmezler (Illanes, 2008).

1. Basamak Enzim (E) + Substrat (S) $\leftrightarrow$ Enzim-substrat kompleksi (ES)

2. Basamak Enzim-substrat kompleksi (ES) $\rightarrow$ Enzim (E) + Ürün (Ü)

Enzimlerin birçoğu protein yapıda olmayan bileşiklere sahiptir. Bunlardan biri olan prostetik gruplar genelde kovalent bağlarla enzime çok sıkı bir şekilde bağlanırlar. Diğer bileşik olan koenzimler ise enzimlere gevşek bir şekilde bağlanırlar. Bir enzim etkinliği için bir kofaktör gerektirdiğinde aktif olmayan protein bileşeni apoenzim olarak adlandırılır, bu kısım enzimin spesifitesini sağlayan kısımdır. Apoenzime kofaktör eklenirse haloenzim (aktif enzim) olarak adlandırılır.

Enzimler katalize edecekleri tepkimelere oldukça spesifik olan proteinlerdir. Bu spesifiklik mutlak spesifite, grup spesifitesi, bağ spesifitesi ve stereokimyasal spesifite olarak sınıflandırılmaktadır. Kristalografik yapılar göstermektedir ki bir proteazın aktif bölgesi genel olarak molekül yüzeyindeki bir oyuğa yerleştirilir ve substrat

spesifikliği peptit bağının hidrolizinden sorumlu olan katalitik bölge boyunca düzenlenen bağların özellikleri ile belirlenir. Buna göre, bir proteazın özgüllüğü spesifik her bir alt birimin tek bir amino asit kalıntısının yan zincirini barındırmasıyla tanımlanmaktadır (Benyon ve Bond, 2001). Yani enzimin protein kısmı etki edeceği maddenin ve katalize edeceği reaksiyonun tipini belirlemektedir. Bu zgllk proteinin  boyutlu yapısının bir işlevidir.  boyutlu yapının bozulması veya ayrıştırılması katalitik aktiviteyi genelde yok etmektedir (Smith, 2004, Bender ve ark., 2017).

Kimyasal reaksiyonların aktivasyon enerjisini azaltan dolayısıyla tepkimelerin ilerleme hızını arttıran maddelere katalizör denir. Enzimler ise biyolojik katalizörlerdir (Bender ve ark., 2017). Biyolojik katalizör olmadan biyokimyasal reaksiyonların çoğu, enerji bariyerinden dolayı yeterince hızlı gerçekleşemez. Ancak enzimler aktivasyon enerjisini düşürüp substratın ürüne dönüşümünü hızlandırarak reaksiyonları katalize etmektedir (Cuesta ve ark., 2015; Sutiono, 2016). Çok düşük konsantrasyonlarda yeterli olup reaksiyonlarda tkutilmeden görev almaktadır (Robinson, 2015).

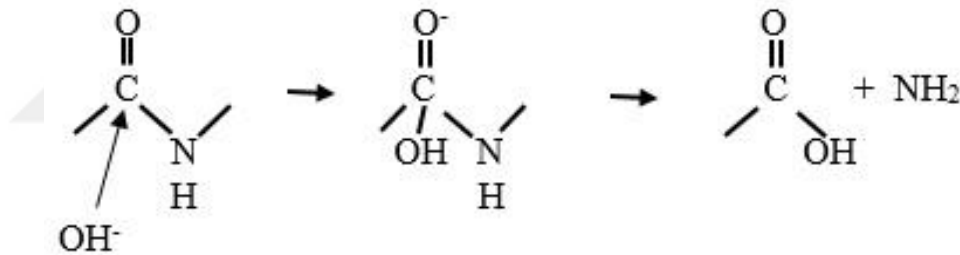
Enzimler katalizledikleri tepkimelere göre Enzim Komisyonu tarafından altı sınıfa ayrılırlar (Boyce and Tipton, 2001). Bu enzim grupları katalizledikleri tepkimelerle birlikte Tablo 2.1’de verilmiştir.

Tablo 2.1. Enzimlerin sınıflandırılması

Grup	Sınıf	Fonksiyon
1	Oksidoredüktazlar	İndirgenme-yükseltgenme reaksiyonları
2	Transferazlar	Fonksiyonel grup transferi
3	Hidrolazlar	Hidrolitik parçalama
4	Liyazlar	Çift bağlara ekleme
5	İzomerazlar	İzomerizasyon reaksiyonları
6	Ligazlar	ATP parçalanması ile bağların oluşumu

2.2. Proteazlar

Proteolitik enzimler olarak da bilinen proteazlar enzimlerin hidrolazlar kategorisinde sınıflandırılır (EC 3.4.) ve hidrolitik reaksiyon mekanizmasını takip ederek amino asitler arasındaki bağları ayırırlar. Bir kimyasal bağa su eklenmesiyle veya başka bir grubun suya çevirilmesiyle yıkımı sağlayan enzimlerdir.



Şekil 2.1. Proteaz enzimi kataliz mekanizması. Proteazlar, bir peptit bağına bir su molekülü ilavesi ile gerçekleşen hidroliz reaksiyonu sonucu proteinleri parçalamaktadır.

Peptitlerin proteaz katalizli hidrolizi ayrıca proteazların spesifikliğı nedeniyle kimyasal hidrolizle karşılaştırıldığında tercih edilen bir uygulamadır (Mótyán ve ark., 2013). Proteazların özgünlüğü fonksiyonel gruplarının özelliklerine, substrat molekülünün büyüklüğüne, amino asitlerinin konfigürasyonuna ve molekülün uçlarda yer alan atomlarının karakterine bağlıdır (Aran, 2014). Diğer bir deyişle, tek bir proteaz protein moleküllerindeki tüm peptit bağlarını parçalama yeteneğine sahip değildir.

2.2.1. Proteazların sınıflandırılması

Kökenlerine, katalitik mekanizmalarına, özgünlüklerine veya katalitik bölgedeki reaktif grubun yapısına bağlı olarak geniş bir şekilde gruplandırılabilir. Bütün enzimler gibi proteaz enziminin aktivitesi de reaksiyon ortamındaki pH değerinden etkilenir. Bu yüzden alkali ($pH > 7.0$) veya yüksek alkali proteazlar ($pH > 10.0$), nötral (pH 7 civarında) ve asidik proteazlar ($pH < 7.0$) olarak sınıflandırma yapılabilir (Sumantha ve ark., 2006).

MEROPS (URL-2, 2019) veri tabanında proteolitik enzimlerin sınıflandırılması ve isimlendirilmesinin yanı sıra amino asit dizisi benzerliği ile gruplanmış 259 farklı proteolitik enzim ailesi mevcuttur (Rawlings ve ark., 2012). Polipeptit zincirleri üzerindeki etki bölgesine dayanarak ekzoproteazlar ve endoproteazlar olmak üzere iki gruba ayrılır (Singh ve ark., 2016). Rao ve ark. (1998) tarafından yayınlanan çalışma Tablo 2.2.'de verilmiş, proteazların sınıflandırılması ve etki şekli bu tabloya göre açıklanmıştır.

Ekzopeptidazlar, substratın amino ($-NH_2$) veya karboksi ($-COOH$) ucuna yakın bir yerden peptit bağını parçalar. Polipeptit uçlarındaki spesifik amino asitler, ayrılacak olan peptit bağının yakınındaki polipeptit zincirinin konformasyonu ve peptit uzunluğu ekzopeptidazların aktivitesini belirlemektedir. Polipeptit zincirinin uç kısımlarına etkisine göre aminopeptidaz, karboksipeptidaz ve omega peptidaz olarak incelenmektedir. (Saravanamuthu ve ark., 2010)

- Aminopeptidaz, polipeptit zincirinin serbest bir N-terminaline etki etmekte ve amino asit kalıntısını serbest bırakmaktadır. Amino ucundaki ilk iki kalıntıyı katalizleyen enzimler dipeptidil peptidaz, üç kalıntıyı katalizleyen enzimler tripeptidil peptidaz olarak sınıflandırılır.

- Karboksipeptidaz, polipeptit zincirinin C-terminaline etki eder ve dipeptidi veya amino asidi serbest bırakır. Enzimin aktif bölgesindeki amino asit kalıntısına bağlı olarak serin karboksipeptidazlar, metallo karboksipeptidazlar ve sistein karboksipeptidazlar olmak üzere üç gruba ayrılırlar.
- Omega peptidaz, peptit bağlarına etkiyen ekzopeptidazlardır.

Ekzopeptidazlar genellikle tek bir protein veya protein ailesi için gösterdiği yüksek substrat özgüllüğü ile monomeriktir. Bunlar genellikle salgılanmadan önce hücreyi düzensiz aktiviteden koruyan, aktif olmayan zimojenler olarak sentezlenir (Raju ve ark., 2012).

Polipeptit zincirinin N- ve C- terminalinden uzakta olan veya iç kısımlarında yer alan peptit bağlarına etkilerine göre karakterize edilen endoproteazlar altı sınıfa ayrılmaktadır. Bunlar; serin proteaz, sistein proteaz, aspartik proteaz, metalloproteaz, glutamik asit proteaz ve treonin proteazlardan oluşmaktadır (Rawlings ve ark., 2016).

- Serin proteazlar, aktif bölgelerinde serin grubunun varlığı ile karakterize edilirler. Yapısal benzerliklerine ve işlevsel belirtilerine dayanarak hem ekzoproteaz hem de endoproteaz gruplarında bulunurlar. Aktif bir bölge olan Ser yan zincirinin birincil hidroksilini (genel olarak Ser-His-Asp üçlüsü veya Ser-Lys ikilisi) aktive ederek, nükleofilikliğini artırır ve bir peptit amid bağını etkileyecek şekilde konumlandırır. Elde edilen kovalent enzim kompleksi daha sonra hidrolizle ayrılır (Saravanamuthu ve ark., 2010). Serin proteazlar genellikle nötral ve alkali pH değerinde aktif olup optimum pH değerleri 7 ve 11 arasındadır. Serin proteazların izoelektrik noktası genel olarak pH 4 ve 6 arasındadır. Serin proteaz 3, 4 dikloro izookumarin (3,4-DCI), di-izopropil florofosfat (DFD) ve fenil metil sülfonil florür (PMSF) ile geri dönüşümsüz inhibisyonlarıyla tanımlanır (Kalwasińska ve ark., 2018). Aktif ve yüksek alkali olan serin alkali proteazlar, serin proteazların en büyük alt grubunu temsil eder. Endüstride en büyük öneme sahip serin proteazlar bakteriyel substilindirler.

- Tiyol proteaz olarak da bilinen sistein proteazların etki mekanizması serin proteazlara çok benzemektedir. Karboksilik asit türevlerinin ve bir açıl-tiyol ara ürününün hidrolizini katalize eder. Tüm sistein proteazlarının aktivitesi sistein ve histidinden oluşan katalitik ikiliye bağlıdır. Bu enzimlerin aktif bölgeleri sistein kalıntılarıdır. Yan zincir özgüllüklerine bağlı olarak dört gruba ayrılırlar; (i) papain benzeri, (ii) glutamik asit benzeri (iii) arginin kalıntılarının ayrılması ile tripsin benzeri ve (iv) diğerleri. Papain en iyi bilinen sistein proteazıdır. Sistein proteazlar nötr pH'ya sahiptir ve bu proteaz *p*-chloromercuric benzoate (*p*CMB) inhibitörleri ile tanımlanır (Nadeem ve ark., 2013).
- Asidik proteazlar olarak da bilinen aspartik proteazların katalitik aktiviteleri iki aspartik asit kalıntısının katalitik iki molekülüne bağlıdır (Topkaya ve Ertunç, 2018). Önemli bir şekilde serin ve sistein proteazlardan farklılık gösterir çünkü çapraz peptit bağına etki eden nükleofil, bir amino asidin nükleofilik yan zincirinden ziyade aktif bir su molekülüdür (Barret ve ark., 1998). Çoğu aspartik proteaz pH 3,0 ve 4,0 arasındaki değerlerde maksimum aktivite gösterir ve pH 3,0 ile 4,5 arasında izoelektrik noktaya sahiptir. Aspartik proteazlar pepstatin ile inhibe edilebilir (Singh ve ark., 2016).
- Metalloproteazlar biyolojik aktiviteyi sürdürmek için gerek duydukları metal iyonu (iki değerli) ile karakterize edilirler. Zn^{+2} enzim aktivitesi, Ca^{+2} ise stabilite sağlamak için esas iyonlardır. Bunlar yüksek organizmalardan gelen kolajenazlar ve bakterilerden gelen termolizin gibi çeşitli kökenlerden gelen enzimleri içerir. Metalloproteazların çoğu nötral ve alkalın pH'da maksimum aktivite gösterir. EDTA, fosforamid gibi şelatlama ajanları tarafından inhibe edilirler (Saravanamuthu ve ark., 2010).

Tablo 2.2. Proteazların sınıflandırılması ve etki şekli (Rao ve ark., 1998)

Proteaz	Etki Şekli	EC Kodu
Ekzopeptidazlar		
Aminopeptidaz	•↓-0-0-0-0---	3.4.11
Dipeptidil peptidaz	•-↓-0-0-0---	3.4.14
Tripeptidil peptidaz	•-•-↓-0-0---	3.4.14
Karboksi peptidaz	---0-0-0-0-↓ •	3.4.16-3.4.18
Serin tipi proteaz		3.4.16
Metallo proteaz		3.4.17
Sistein tipi proteaz		3.4.18
Peptidil dipeptidaz	---0-0-0-↓-•-•	3.4.15
Dipeptidaz	•↓-•	3.4.13
Omegapeptidaz	*-•↓-0-0---	3.4.19
	---0-0-0-↓-•*	
Endopeptidazlar	---0-0-↓-0-0-0---	3.4.21-3.4.34
Serin proteaz		3.4.21
Sistein proteaz		3.4.22
Aspartik proteaz		3.4.23
Metalloproteaz		3.4.24
Endopeptidaz (bilinmeyen)		3.4.99

Açık daireler, polipeptit zincirindeki amino asit kalıntılarını temsil eder. Koyu daireler terminal amino asitleri gösterir. Yıldızlar, bloklanmış terminali belirtir. Oklar enzimin etki alanlarını göstermektedir.

2.3. Proteazların Kaynakları

Endüstriyel enzimlerin kullanım alanlarının artması ve ekonomik değerinin yükselmesi biyoteknoloji alanında üretim çalışmalarının artmasına sebep olmuştur. Gıda sanayisinde kullanılan enzimlerin %80'i hidroliz amaçlıdır. Proteazlar, toplam enzim pazarının yaklaşık %60'ını kapsar ve en değerli ticari enzimler arasında yer alır. Dünyadaki proteaz piyasasının 2022 yılına kadar 3,29 milyar ABD doları olacağı tahmin edilmektedir (URL- 2019). Gıda bileşenlerinin üretilmesinde, ürün kalitesinin geliştirilmesinde ve gıda işleme aşamalarının veriminin artırılmasında bu enzimlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Proteazlar hayvansal, bitkisel veya mikrobiyal kaynaklardan elde edilirler ve kullanılan kaynağa göre hücrenin tamamından, bölümlerinden veya hücre içermeyen özütlerden elde edilebilirler. Gıda proteinlerinin parçalanmasında etkili olan proteazların kaynağı gıda maddesinin kendisi olabildiği gibi gıdada gelişen mikroorganizmalar tarafından salgılananlar da kaynak olabilmektedir (Aran, 2014).

Endüstriyel işlemlerde uzun süredir kullanılmasına rağmen bitkisel proteazların yapısı ve özellikleri hakkında yeterince bilgi yoktur. Meyve ve sebzelerden seçilen 90 çeşit bitkiden (Sun ve ark., 2015), *Crocus biflorus* çiğdem yumruları (Çelik, 2018) gibi sap, meyve, yapraklar ve kabuğu da dahil olmak üzere çok çeşitli biyoçeşitliliğe sahip olan bitkilerden potansiyel proteaz enzimi üretilebileceği ve sanayide mevcut proteaz üretimine kaynak olabileceği belirlenmiştir.

Hayvansal kaynaklı proteazların çoğunu tripsin, kimotripsin, pepsin ve renin enzimleri oluşturmaktadır. Özellikle deniz hayvanlarından elde edilen proteaz enziminin diğerlerine kıyasla yeni kimyasal ve stereokimyasal özellikler taşıyabildiği belirtilmiştir (Homaei ve ark., 2016). Ancak endüstriyel kullanımda bu enzimlerin izolasyonu ve saflaştırılması büyük ölçüde zor olmaktadır. Ayrıca hayvansal kaynaklardan yapılan izolasyonda birçok etik sorunla karşılaşmaktadır.

Mikrobiyal proteazlar önemli endüstriyel enzimlerdir. Fermantasyon teknolojisi geliştikçe mikrobiyal proteazlar daha yaygın olarak kullanılmıştır. Kısa sürede ve küçük bir üretim tesisinde mikroorganizmalardan üretilebilecek çok miktarda enzim, endüstri talebini arttırmıştır. Büyük çoğunluğu alkalın proteazlardan oluşan proteazlar endüstriyel enzim pazarının % 40-65'inden fazlasına sahiptir (Vijay ve ark., 2011; Annamalai ve ark., 2014). Son yıllarda özellikle ekstremofillere ve simbiyotik mikroorganizmalar çok daha fazla ilgi gösterilmektedir (Homaei ve ark., 2016). Diğer kaynaklardan ziyade mikrobiyal kaynaklı proteazlar ekonomik, teknik ve etik avantajlara sahiptir. Örneğin, mikrobiyal enzimlerin stabilitesi genellikle daha yüksek, üretimleri kolaylıkla kontrol altına alınabilmekte ve nispeten daha basit ekstraksiyon yöntemleri uygulanmaktadır (Robinson, 2015). Her ne kadar birçok enzim hücre içinde tutulsa da mikroorganizmalar tarafından hücre dışına salınan enzimlerin

ekstraksiyon ve saflaştırma işlemleri daha kolaydır. Endüstriyel kullanımdaki enzimlerin çoğu fungus (Srilakshmi, 2015) veya bakteri kaynaklı (Sarker ve ark., 2013; Si ve ark., 2018) hücre dışı salgılanan proteazlardır. Endüstriyel olmayan kullanımdaki enzimler hücre içidir ve hücre tarafından çok az miktarlarda üretilir (Robinson, 2015).

2.3.1. *Bacillus* cinsi bakterilerle proteaz üretimi

Bacillus cinsi, Gram pozitif, düşük G+C miktarına sahip, çubuk şekilli, endospor oluşturabilen, aerob veya fakültatif anaerob olan bakterileri içerir. Habitatı toprak veya toprakla ilişkili ekosistemler olduğundan çoğu ortamdan izole edilebilirler. Antibiyotik, enzim, toksin üretimi gibi birçok metabolik ürünlerine endüstriyel alanda büyük önem gösterilmektedir. Endüstriyel mikroorganizmalar genetik stabilite, hedef üretimin etkinliği, vitaminler veya ek gelişme faktörlerine çok az veya hiç gereksinim duymamak, düşük maliyetli ve kolaylıkla erişilebilen geniş çeşitlilikteki karbon kaynaklarını kullanmak, patojen olmamak, toksik ajanlar üretmemek, fermantasyon sürecinde ürünü kolaylıkla almak gibi ideal özellikleri barındırmalıdır (Waites ve ark., 2014).

Bacillus türleri, mikrobiyal fermantasyon uygulamalarında en sık kullanılan mikroorganizmalar olmuştur. Kültür ortamına büyük miktarlarda (20-25 g/L) hücre dışı enzim üretme ve salgılayabilme, çevresel değişikliklere yüksek adaptasyon, kısa fermantasyon döngüsünü sağlayan yüksek çoğalma hızları, GRAS (genellikle güvenli olarak kabul edilir) statüsü ve bu türler hakkında geniş miktarda bilgi olması onları en önemli enzim üreticileri arasına yerleştirmiştir (Schallmey ve ark., 2004). *Bacillus* türleri tarafından üretilen enzimlerden amilazlar ve proteazlar dünya çapında ilgi çekmektedir (Blanco ve ark., 2016). Bu nedenle, bu enzimlerin üretimi ekonomik olarak uygun ve optimize edilmiş fermantasyon koşulları kullanılarak düşük üretim maliyetinde gerçekleştirilmektedir. Fermantasyon enzim üretiminin yanı sıra mikroorganizmanın gelişimini de çeşitli yönlerde etkiler. Derin kültür fermantasyonu sterilizasyon kolaylığı nedeniyle avantajlıdır ve bu sistemlerde proses kontrolü daha kolaydır. Proteazlar genellikle üretim avantajları nedeniyle derin kültür fermantasyonu

kullanılarak üretilir. Ortam bileşimi mikroorganizmaların enzim üretiminde önemli bir rol oynar. Sıcaklık, pH, inkübasyon süresi gibi bu çevresel faktörler mikrobiyal metabolizmayı da büyük ölçüde etkiler (Lakshmi ve Hemalatha, 2016).

Her organizma veya suşun maksimum enzim üretimi için kendine has koşulları vardır (Sharma ve ark., 2017). Bu faktörler proteaz üretimini teşvik etmek, geliştirmek ve optimize etmek için önemlidir. Yüksek ve ticari olarak uygulanabilir proteaz verimleri elde etmek için fermantasyon ortamının optimize edilmesi şarttır (Sumantha ve ark., 2006). Katı hal fermantasyonu (Solide state fermentation; SSF), serbest suyun yokluğunda veya çok az olduğunda meydana gelen fermantasyon işlemi olarak tanımlanır. SSF süreçleri, ucuz hammadde olarak kullanılan ve bol miktarda biyokütle, tarımsal sanayi artıkları bulunan ülkeler için ekonomik açıdan önemlidir. Derin kültür fermantasyonu (Submerged fermentation; SmF) ya çözülmüş ya da sulu bir ortamda süspanse edilmiş bir substrat ile gerçekleştirilir. Farklı substratlarla gerçekleştirilen SmF'ler, farklı proteaz aktiviteleri ile sonuçlanır. Kazein ve jelatin gibi basit substratlar düşük enzim aktiviteleri verirken, soya fasulyesi unu ve buğday kepeği gibi daha karmaşık substratlar daha yüksek proteaz aktiviteleri ile sonuçlanır. Azot bakımından zengin bir ortamın glikoz ile takviyesi de proteaz üretimini artırır (Boer ve Peralta, 1999). Fermantasyon parametrelerinin istatistiksel optimizasyonu, optimum enzim üretimi ile sonuçlanır.

Bacillus türleri spesifik hücre dışı proteaz üreticileridir. *Bacillus* türlerindeki mikrobiyal çeşitlilik biyoteknolojik kullanımlar için uygun özelliklere sahip proteazlar sağlamaktadır. Salgılanan proteazların çoğu spesifik alanlara özgüdür. Aynı *Bacillus* cinsine ait farklı türler, farklı proteazlar üretebilirler. Diğer yandan *Bacillus* cinsinin aynı türleri de farklı proteazlar üretebilirler. Devanadera ve ark. (2016), nötral ve alkalın proteaz üretmek için altı farklı *Bacillus subtilis* türü ile bir çalışma yapmıştır. pH, sıcaklık ve inkübasyon süresi gibi fermantasyon parametreleri, ticari uygulama için en iyi bakteri izolatlarını seçmek amacıyla optimize edilmiştir. Çalışılan altı izolat arasında USTCMS 1011, pH 7'de ve 37°C'de 72 saat boyunca en yüksek 0,647 U/mg protein nötral proteaz aktivitesini vermiştir. Aynı suş, 72 saat boyunca pH 9'da ve 30°C'de 0,495 U/mg proteininin en yüksek alkalın proteaz aktivitesini vermiştir. Hem

nötral hem de alkalın proteaz yüksek proteolitik aktivite gösterdiğinden, iki proteaz üretimi için de kullanılmıştır. Diğer bir çalışmada Aruna ve ark. (2014) bir peynir çeşidinden izole ederek *Bacillus tequilensis* SCSGAB0139 olarak tanımladıkları suştan alkalın proteaz üretmiştir. Enzimin pH 9’da optimum aktiviteye sahip ve 45°C ye kadar stabil olduğunu belirlemişlerdir. *Bacillus tequilensis*, optimize edilen besiyerinin bileşiminde maksimum 67,03 U/mL proteaz üretimi gerçekleştirmiştir. Bakteri tarafından 48 saatlik inkübasyon sonunda maksimum proteaz üretimi gerçekleşmiştir.

Bacillus cinsine ait türler, farklı azot ve karbon kaynakları kullanarak, yüksek pH ve sıcaklıklarda kararlılığı yüksek ürünler üretebilirler. Bindu ve ark. (2013) tarafından yapılan çalışmada hücre dışı alkalın proteaz üreten yeni bakteri suşu *Bacillus stratosphericus* DF, toprak örneklerinden izole edilmiştir. Kültür koşullarını optimize ederek proteaz üretimi 2,3 kat arttırılmıştır. Farklı karbon ve azot kaynaklarının etkisi üzerine yapılan çalışmalar laktoz, maya özü ve soya unu kombinasyonunun enzim üretimini arttırdığını ortaya koymuştur. Bakteri 35°C’de pH 10’da 48 saat inkübasyona bırakıldığında maksimum enzim miktarını üretmiştir. Suberu ve ark. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada, yöreye özgü *Bacillus* türleri toprak örneklerinden izole edilmiş ve proteaz üretimi için optimize edilmiştir. Proteaz optimizasyonu Box-Behincken Design (BBD) Design-Expert yazılımı ile yanıt yüzey metodolojisi (RSM) kullanılarak in sliko yapılmış ve sonra deneysel olarak doğrulanmıştır. Optimize edilmiş faktörler sıcaklık, pH, karbon ve azot kaynağı ve inokulum yoğunluğu olarak belirlenmiştir. Proteaz üretimi için yüksek potansiyel gösteren üç suş *Bacillus cereus* ABBA1, *Bacillus subtilis* RD7 ve *Bacillus subtilis* NRD9 olarak tanımlanmıştır. İn sliko deney modelinde optimize edilmiş ortamda sırasıyla ABBA1, RD7 ve NRD9 suşları 159,43 U/ml, 141,28 U/mL ve 138,17 U/mL proteaz aktivitesi gösterirken deneysel doğrulama 200,56 U/mL, 176,00 U/mL ve 163,76 U/mL proteaz aktivitesi göstermiştir. RSM modelinden elde edilen hücre dışı proteaz üretimi için optimum koşullar 40°C, pH 8,5, inokulum konsantrasyonu %2,5 (h/h), maltoz 1,5 g/L ve sığır özü tozu 2,0 g/L olarak belirlenmiştir.

Si ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmada *B. subtilis* FBL-1'den elde edilen proteaz enzimini saflaştırmıştır ve endüstriyel uygulama için karakterizasyonunu yapmıştır. Enzimin pH stabilitesinin 7,0-9,0 arasında ve ısıl stabilitenin ise 30-50°C arasında olduğu belirlenmiştir. Tekin ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada zorunlu alkalifilik bir *Bacillus* suşu toprak numunesinden izole edilmiş ve filogenetik ve fenotipik analizlere dayanarak *Bacillus cohnii* APT5 olarak tanımlanmıştır. *B. cohnii* APT5'in optimum gelişme pH'sı 10 ve 50°C'de optimum enzim aktivitesi 693,318 U/dk olarak belirlenmiştir. *B. cohnii* APT5'in ayrıca kazein içeren bir ortamda geliştirildiğinde 50°C'de ve pH 11'de optimum aktivite gösteren hücre dışı bir alkalın proteaz üretme kabiliyetine sahip olduğu bulunmuştur.

2.4. Proteazların Kullanım Alanları

Enzimler canlı hücrelerde oluşsa da birçoğu hücrelerden ayrılabilir ve *in vitro* olarak çalışmaya devam edebilir. Enzimlere özgü bu eşsiz yetenek endüstriyel proseslerde, enzim teknolojisinin giderek daha fazla kullanılmasına neden olmuştur (Smith, 2004). En yüksek oranda ticari enzim tüketimi %34 ile deterjan endüstrisinde ve bunu %14 ile süt endüstrisi, %12 ile nişasta sanayi ve %11 ile tekstil uygulamalarında kullanılan enzimler izlemektedir. Kalan %29'luk kısım ise çok çeşitli uygulamalarda değerlendirmektedir (Waites ve ark., 2014).

Bir proteaz olan tripsin ilk kez 1913 yılında Almanya'da Röhm & Haas tarafından deterjanlarda kullanılmıştır. Ardından 1963 yılında Novo'nun Alcalase adı verilen bakteriyel bir proteaz geliştirmesiyle pazarlanmıştır. (Rao, 1998; Aehle, 2008; Adrio, 2014). Daha sonra deterjan formülünde yüksek pH ve sıcaklık ortamında kararlı olabilen, oksidasyona, şelatlama ajanlarına dayanıklı olabilen, düşük derişimlerde aktif kalabilen ve geniş substrat spesifikliğine sahip enzimler üretilmiştir.

Deri endüstrisinde kullanılan toksik kimyasalların yerine geçmek üzere biyoteknolojik önem kazanmıştır. Deri atma ve tüy giderme uygulamaları nispeten yeni bir gelişmedir. Deri işleme, ıslatma, sepileme, kireç giderme, kıl giderme gibi birkaç adımı içerir. Deri ve kılın yapı taşları proteinlidir. Bu proseslerde enzimlerin artan

kullanımı yalnızca kirlilik sorunlarını önlemekle kalmaz aynı zamanda enerjiden tasarruf sağlar. Mikrobiyal alkalın proteazlar suyun daha hızlı emilmesini sağlamak ve ısılatma için gereken süreyi azaltmak için kullanılır (Zhou ve ark., 2018).

ABD ilaç endüstrisinde Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) 12 proteaz tedavisini onaylamıştır ve bir dizi yeni nesil proteazlar klinik tedavilerinde fayda göstermektedir. Proteazlar geleneksel tedavilerle birlikte uygulanabilir veya diğer proteinlerle formüle edilebilir (Craik ve ark., 2011). Günümüzde protein hidrolizatlarına dayalı diyet tamamlayıcılarının kullanımı ile birçok enzim takviyesi, sağlıklı gıdalar veya diğer farmasötik olmayan ürünler yoluyla tedarik edilmektedir. Crohn hastalığı veya pankreatit gibi hastalıklar nedeniyle doğal proteinleri özümseyemeyen hastalar proteazlar sayesinde protein alımının sınırlarının çok ötesine geçmiştir (Posovszky, 2016).

Proteazlar kozmetik endüstrisinde saç bakımını, diş sağlığını, istenmeyen tüylerin yok edilmesini sağlayan ürünlerde de kullanılmaktadır. Özellikle keratinazların potansiyel rolünün geliştirilmesi ile keratinaz kullanımına özel bir yaklaşım sergilenmektedir. Yapılan bir araştırmada ticari olarak mevcut olan tüy dökücü kremlere kıyasla proteazların biyolojik etkinliği arttırdığı belirtilmektedir. Aynı zamanda proteazlar, derinin boyanmasını kolaylaştıran toksik olmayan ve çevre dostu biyokatalizörler olarak kullanılmaktadırlar (Sanghvi, 2016).

2.4.1. Gıda endüstrisinde proteazlar

Gıda endüstrisinde proteazlar biyolojik, teknolojik ve besin değerinin artırılmasında önemli rol oynar (Wouters ve ark., 2016). Duyusal kalitede modifikasyonlar oluşturarak gelişmiş sindirilebilirlik, azalmış alerjenite veya biyoaktif peptitlerin serbest bırakılması gibi olumlu etkiler yaratmaktadır. Alcalase ve Flavourzyme (Shu ve ark., 2015) işlenmiş gıdalarda lezzet, tat ve dokusal değişiklikler sağlamak için işlem yardımcıları olarak kullanılan proteazlardır. Çeşitli gıdaların üretiminde ve iyileştirilmesinde hem mikroorganizmanın oluşturduğu enzimler hem de proteaz etkisi ile serbest amino gruplarının ortaya çıkması etkili olmaktadır (Aran, 2014).

Modern peynir yapımı aşamaları sütün hazırlanması, proteolitik enzimlerle süt pıhtılaşması sonucu lor oluşumu, lor kesimi, peynir tanelerinin peynir altı suyundan ayrılması, peynir kütlesinin yoğrulması, preslenmesi ve olgunlaştırılmasını içerir (Law ve ark., 2010). Rennin kazeindeki (k-kazein) peptit bağlarını hidrolize ederek sütün pıhtılaşmasını sağlayan enzimlerdir. Süt pıhtılaştırıcıları olarak kullanılan enzimlerin hemen hepsi aspartik proteazlara aittir ancak sistein ve serin proteazlar gibi diğer gruplardan gelen enzimlerin de uygun koşullar altında sütü pıhtılaştırma yeteneğine sahip olduğu rapor edilmiştir (Shah ve ark., 2014).

Bira üretimi, nişasta içindeki şekerlerin maya etkisiyle etil alkole fermente edildiği bir üretim süreci olarak tanımlanmaktadır (Oliver, 2011). Malt yapımı ve mayşeleme aşamalarında fisin ve papain gibi proteazlar kullanılmaktadır. Malt yapımını ve fermantasyonu geliştirmek, berraklaştırmayı iyileştirmek, soğutma ve depolamada kaliteyi geliştirmek için proteazlara ihtiyaç duyulur (Gomaa, 2018). Proteaz proteinlerin çözünürlük derecesini artırır ve buna bağlı olarak biranın viskozitesini azaltır.

Enzimler, kastaki proteinleri parçalamak ve et yumuşatmaya yardımcı olan kollajen ve elastini hidrolize etmek için kullanılmaktadır. Bitkilerden bilinen üç tenderize edici enzim, yani papain, bromelain ve fisin sırasıyla papaya, ananas ve incirden elde edilir. Yapılan bir çalışmada et yumuşaklığı için doku ve et kalitesini iyileştiren papain dozu ile %0,6 olarak belirlenmiştir (Abdel-Naeem ve Mohamed, 2016).

Proteazlar endüstriyel fırıncılık ürünlerinde de kullanılmaktadır. Proteaz kullanımı hamurun gevşemesini ve ekmek hacminin iyileştirilmesini, hamurun büzülmesini önler ve veriminin daha fazla olmasına imkan verir (Tanabe ve ark., 1996). Bu proteazlar genellikle bitkilerde veya mikroorganizmalarda (bakteriyel veya fungal) bulunur. Bromelain, geniş pH ve sıcaklık koşullarına uymakta ve amilaz veya pentosanaz enzimlerine yan etkilerinin bulunmamasından dolayı fırıncılık endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca serbest amino gruplarını ortaya çıkaran proteazlar, Maillard reaksiyonlarını gerçekleştirmekte ve fırıncılık ürünlerinde rengin ve lezzetin iyileşmesini teşvik etmektedir (Aran, 2014).

Protein hidrolizi çözünürlük, jelleşme, emülsifiye edici ve köpüklenme özellikleri de dahil olmak üzere gıda sistemlerindeki proteinlerin fonksiyonel özelliklerinin değiştirilmesinde güçlü bir araçtır. Bununla birlikte fizyolojik fonksiyonlara sahip biyoaktif peptitlerin ve diğer protein hidroliz ürünlerinin üretimi için gıda endüstrisinde uygulamalar artmıştır. Özellikle biyoaktif peptitlerin potansiyel kullanımı yüksek olduğu için protein içeriği yüksek olan birçok gıda ve gıda olarak tüketilmeyen yan ürünler değerlendirilmiştir. Zanutto-Elgui ve ark. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada *in vitro* antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteye sahip süt türevli biyoaktif peptitler üretilmiştir. Rai ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada gıdaların raf ömrünü artırmak için doğal biyo-koruyucu olarak antimikrobiyal peptitler kullanılmıştır. Bu tür biyo-koruyucular gıdanın fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerini değiştirmeden yapıyı ve aromayı korumuştur.

BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Araştırmada, Sakarya Üniversitesi Gıda Biyoteknolojisi Laboratuvarı'ndan temin edilen *Bacillus subtilis* ZBP4 suşu kullanılmıştır. Sarımercimek unu ve soya unu yerel marketlerden; yağsız süt tozu ve peynir altı suyu tozu Sakarya Milkon Süt ve Gıda Mamulleri San. ve Tic. A.Ş.'den temin edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Kullanılan araç-gereçler ve kimyasallar

Çalışmada kullanılan araç-gereçlerin listesi Tablo 3.1.'de; kimyasalların listesi ise Tablo 3.2.'de verilmiştir. Kullanılan kimyasal maddeler analitik saflıkta olup aşağıda belirtilen firmalardan temin edilmiştir.

Tablo 3.1. Kullanılan araç-gereçlerin listesi

Araç Gereçler	Model-Üretici Firma
Çalkalamalı İnkübatör	Benchmark Incu-Shaker Mini, ABD
Çalkalamalı Su Banyosu	WiseBath WSB-30, Kore
Distile Su Cihazı	Nüve ND8, Türkiye
Etüv	Microtest min, Türkiye
Hassas Terazî	Radwag AS 220.R2, Polonya
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı	IKA CMAG HS 7, Almanya
Otoklav	WiseClave WAC-80, Kore
pH Metre	Mettler-Toledo SCompact S210, Kanada
UV-VIS Spektrofotometre	Shimadzu UVmini-1240, Japonya
Soğutmalı Santrifüj	Hettich Universal 320R, Almanya
Toplam Azot Tayin Cihazı	Behr, Almanya

Tablo 3.2. Kullanılan kimyasalların listesi

Kimyasallar	Üretici Firma
Agar agar	Merck, Darmstadt, Almanya
α -D-Glucose	Merck, Darmstadt, Almanya
Gliserin Carl ROTH GmbH	Merck, Darmstadt, Almanya
Tris base	Merck, Darmstadt, Almanya
Sodyum klorür	Merck, Darmstadt, Almanya
Sodyum hidroksit	Merck, Darmstadt, Almanya
Magnezyum sülfat heptahidrat	Merck, Darmstadt, Almanya
Dipotasyum fosfat	Merck, Darmstadt, Almanya
Hidroklorik asit	Merck, Darmstadt, Almanya
Sülfürik asit	Merck, Darmstadt, Almanya
Sitrik asit	Merck, Darmstadt, Almanya
Asetik asit	Labkim, İstanbul, Türkiye
Borik asit	Merck, Darmstadt, Almanya
Metilen mavisi	Merck, Darmstadt, Almanya
Metilen kırmızısı	Merck, Darmstadt, Almanya
Bromkresol yeşili	Merck, Darmstadt, Almanya
L-tirozin	Merck, Darmstadt, Almanya
Trikloroasetik asit	Merck, Darmstadt, Almanya
Sodyum asetat	Merck, Darmstadt, Almanya
Sodyum sitrat dihidrat	Horasan Kimya, Ankara, Türkiye
Sodyum bikarbonat	Merck, Darmstadt, Almanya
Sodyum karbonat (susuz)	Merck, Darmstadt, Almanya

3.2.2. Kullanılan çözelti ve tamponlar

Kullanılan çözelti ve tamponlar aşağıda açıklandığı şekliyle hazırlanmıştır.

Sodyum hidroksit çözeltisi (NaOH, 2 N): Besiyerlerinde pH ayarlamak için kullanılmıştır. NaOH 8,01 g tartılarak bir miktar destile su ile çözündürüldükten sonra 100 mL'lik balon jojeye konularak hacme tamamlanmıştır.

Sodyum hidroksit çözeltisi (NaOH, yaklaşık 1 N, % 32'lik): NaOH 32 g tartılarak 100 mL saf suda çözünmüştür.

Hidroklorik asit çözeltisi (HCl, 2 N): Besiyerlerinde ve tampon çözeltilerde pH ayarlamak için kullanılmıştır. Yoğunluğu $1,18 \text{ g/cm}^3$ olan %36'lık konsantre HCl çözeltisi 2 N 250 mL hacimde hazırlanmıştır. Bunun için 250 mL'lik balon jojeye 100 mL destile su konularak üzerine 43 mL HCl eklenmiştir ve destile su ile hacme tamamlanmıştır.

Hidroklorik asit çözeltisi (HCl, 0,1 N): Konsantrasyonu % 37 olan HCl'den 2,025 mL alınarak saf su ile 250 mL'ye tamamlanmıştır.

Sülfirik asit çözeltisi (H₂SO₄, 0,1 N): Konsantrasyonu % 98, yoğunluğu 1,84 g/mL olan derişik H₂SO₄ çözeltisinden 0,1 N 500 mL çözelti hazırlamak için 1,35 mL derişik çözeltiden alınıp destile su ile 500 mL'ye tamamlanır.

Borik asit çözeltisi (H₃BO₃, % 4): Borik asit 4 g tartılarak 100 mL saf suda çözündürülmüştür.

Borik asit belirteç çözeltisi: 0,2 g metil kırmızısı+0,1 g bromkresol yeşili, 100 mL %95'lik etil alkol içinde çözündürülmüştür.

Metilen mavisi-Metilen kırmızısı belirteç çözeltisi: 100 mL %95-96'lık etil alkolde çözündürülmüş 0,3 g metilen kırmızısı ile 100 mL %95-96'lık etil alkolde çözündürülmüş 0,1 g metilen mavisi eşit oranda karıştırılmıştır.

L-tirozin standart stok çözeltisi: 18,119 mg L-tirozin, 100 mL 200 mM pH 8 Tris-HCl tamponu ile çözündürülerek tirozin stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözelti standart eğri oluşturmak için belirli oranlarda seyreltilerek kullanılmıştır.

Trikloroasetik asit (TCA, %10): Proteaz aktivitesinin belirlenmesi esnasında reaksiyonu durdurmak ve proteinleri çöktürmek amacıyla kullanılmıştır. 25 g TCA tartılarak balon jojeye alınmış ve destile su ile 250 mL'ye tamamlanmıştır.

Sodyum asetat tamponu (0,1 M): pH 4,0 ve pH 5,0 ortamlarının proteaz aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla kullanılmıştır. pH 4,0 tamponu için; 3,08 g sodyum asetat tartılarak üzerine 4,643 g asetik asit ve bir miktar distile su eklenmiştir. Daha sonra çözeltinin hacmi destile su ile balon jojede 1 L'ye tamamlanmıştır. pH 5,0 tamponu için; 9,158 g sodyum asetat ve 4,643 g asetik asite aynı işlemler uygulanarak destile su ile balon jojede hacmi 1 L'ye tamamlanmıştır.

Sodyum sitrat tamponu (0,1 M): pH 6,0 ortamının proteaz aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla kullanılmıştır. 24,087 g Sodyum sitrat dihidrat ve 3,471 g sitrik asit tartılarak destile su ile balon jojede hacmi 1 L'ye tamamlanmıştır.

Tris-HCl tamponu (0,1 M): pH 7,0 ve pH 8,0 ortamlarının proteaz aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Her iki pH ortamı için 12,114 g Tris base ayrı ayrı tartılmıştır. Bir miktar destile su içinde çözündürülerek her iki balon jojenin hacmi 1 L'ye tamamlanmıştır. HCl ile istenilen pH'ya ayarlanmıştır.

Karbonat bikarbonat tamponu (0,1 M): pH 9,0 ve pH 10,0 ortamlarının proteaz aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla kullanılmıştır. pH 9,0 tamponu için; 7,644 g sodyum bikarbonat ve 0,954 g sodyum karbonat (susuz) tartılarak üzerine bir miktar destile su eklenmiştir. Daha sonra çözeltinin hacmi destile su ile balon jojede 1 L'ye tamamlanmıştır. pH 10,0 tamponu için; 3,876 g sodyum bikarbonat ve 5,709 g

sodyum karbonat (susuz) tartılarak destile su ile balon jodede hacmi 1 L'ye tamamlanmıştır.

3.2.3. Kullanılan substrat ve besiyerleri

Fermantasyon ortamında kullanılan besiyeri mikroorganizmanın tüm besinsel gereksinimini içermeli ve işlemin teknik amaçlarını karşılar nitelikte olmalıdır. İnokulumun çoğalması ve fermantasyondaki hedefler, genelde besiyeri formülasyonundaki değişikliklere bağlı olarak farklılık göstermektedir. Üretici mikroorganizmanın optimum gelişimine izin veren bir üretim ortamının sağlanması gerekmektedir. Bu noktada, bir veya daha fazla besin kaynağının (karbon, fosfor veya azot kaynağı) ortama eklenmesi gelişmeyi etkilemektedir. Birçok fermantasyon için formülize edilmiş besiyerinde bol miktarda su gerekmektedir. Genel besiyeri gereksinimleri, biyosentez için gerekli enerji ve karbon kaynağı ile azot kaynaklarını içermektedir. Ayrıca diğer minor ve iz miktardaki elementler fermantasyon ortamına eklenmelidir (Waite ve ark., 2014).

Nutrient Broth (NB): *Bacillus* kültürü için en popüler ve en çok kullanılan ortam olarak bakteriyi izole etmek ve geliştirmek için rutin olarak kullanılmıştır. Bunun için 8 g Nutrient Broth tartılarak destile su ile 1 L hacme tamamlanmıştır. Manyetik karıştırıcıda çözünmesi sağlandıktan sonra 100 mL'lik erlenlere 30'ar mL aktarılmıştır. Daha sonra ortam 121°C'de 1,5 atmosfer basınçta 15 dakika sterilize edilmiştir.

Nutrient Agar (NA): Nutrient Agar besiyeri, bakteriyel kültürlerin kısa süreli korunması ve alt kültürlenmesi amacıyla kullanılmıştır. Bunun için 8 g Nutrient Broth ve 12 g Agar tartılarak destile su ile 1 L hacme tamamlanmış ve kaynatılarak çözünmesi sağlanmıştır. 121°C'de 1,5 atmosfer basınçta 15 dakika sterilize edilmiştir. Daha sonra 50°C'ye soğutularak steril petri kaplarına aktarılmıştır. Nutrient Agar bileşimi pepton (5,0 g/L), sodyum klorür (5,0 g/L), sıgır ekstre (3,0 g/L) ve agardan (12,0 g/L) oluşmaktadır.

Skim Milk Agar (SMA): Agar ortamında proteaz enziminin üretilip üretilmediği test edilmiştir. Bu ortamda gelişen kolonilerin çevresinde oluşan metabolit diffüzyonunun oluşturduğu zon çapının ölçülmesiyle belirlenmiştir. 1 g yağsız süt tozu ve 1,2 g agar tartılarak, 100 mL destile su ile ısıtılmalı karıştırıcıda çözünmesi sağlanmıştır. Besiyeri ortamı 121°C’de 1,5 atmosfer basınçta 15 dakika sterilize edilmiştir.

Kazein çözeltisi: Proteaz enzim aktivitesinin ölçümü için substrat olarak kullanılmıştır ve analizler için günlük hazırlanmıştır. 100 mL 0,1 M Tris-HCl pH 8 tamponu içerisine 1 g kazein eklendikten sonra ısıtılmalı karıştırıcıda 80°C’de 10 dk bekletilerek kazeinin çözünmesi sağlanmıştır.

3.2.4. *Bacillus subtilis* ZBP4’ ün çoğaltılması ve proteaz üretimi

Bacillus subtilis ZBP4 suşu, %50 (h/h) gliserol ile tamamlanmış NB besiyerinde -65 °C’de stok kültür olarak saklanmıştır. İzolatın çoğaltılması için stok kültürden öze yardımıyla örnek alınmış, NA besiyeri içeren petri kabına sürme yöntemiyle ekilmiş ve 35°C sıcaklıkta 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra karakteristik koloni NB çözeltisinde 35°C sıcaklıkta 24 saat inkübasyona bırakılarak çoğaltılması sağlanmıştır. Elde edilen kültür, proteaz üretimi için aş kültür olarak kullanılmıştır.

Kazein hidroliz testinde *Bacillus subtilis* ZBP4 suşu, hazırlanan SMA besiyerine inoküle edilmiştir ve inkübatörde 35°C sıcaklıkta bir gece boyunca bekletilmiştir. Hücre dışı proteaz enzimi üretilmesi ile kolonilerin etrafında temiz, şeffaf bir bölge oluşmuş ve protein hidrolizinin gerçekleştiği doğrulanmıştır.

Proteaz üretimi için bakteri fermentasyonu sırasında bazal besiyeri ortamı kullanılmıştır. Bunun için öncelikle maya özütü (5 g/L), kazein (5 g/L), glukoz (5 g/L), K₂HPO₄ (1 g/L), NaCl (1 g/L) ve MgSO₄.7H₂O (0,1 g/L) bazal besiyeri faktörleri olarak tanımlanmıştır. Aşağıdaki ortamların her birinin pH’sı 7,0-7,5’e ayarlanmıştır ve 30’ar mL olarak erlenlere paylaştırılan ortam 121°C’de 1,5 atmosfer basınçta 15 dakika sterilize edilmiştir. *Bacillus subtilis* ZBP4, önce NB besiyerinde 24 saat inkübe

edilmiş, inkübasyon sonunda gelişen bakteriden bazal besiyerine %5 (h/h) oranda inokülasyon yapılmıştır ve çalkalamalı inkübatörde (120 rpm) 35°C, 48 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Alınan örneklerin proteaz aktivitesi belirlenmiştir.

Farklı azot kaynaklarının proteaz üretimi üzerindeki etkisini araştırmak için kazein ve maya özütü yerine amonyum sülfat, yağsız süt tozu, peynir altı suyu tozu, soya unu, pepton, sarımercimek unu kullanılmıştır. Karbon kaynağı olarak seçilen glukoz, azot kaynağı olarak seçilen sarımercimek unu ve maya özütü değişen konsantrasyonlarda incelenmiştir. Tüm deneyler üç paralel tekrar ile gerçekleştirilmiş ve ortalama değerler rapor edilmiştir.

3.2.4.1. Glukoz konsantrasyonunun proteaz üretimine etkisinin belirlenmesi

Glukoz konsantrasyonunun proteaz üretimine etkisinin incelenmesi amacıyla (a/h) bazal besiyerine 5 farklı miktarda glukoz (%0,2-2 a/h) eklenerek 100'er mL'lik besiyerleri hazırlanmıştır. 2 N NaOH ve 2 N HCl ile pH 7,0-7,5 değerine ayarlanmıştır. Her bir erlene 30'ar mL olacak şekilde paylaştırılmış ve 121°C de 1,5 atmosfer basınç altında 15 dakika süreyle sterilize edilmiştir. *Bacillus subtilis* ZBP4, NB besiyerinde 24 saat inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda gelişen bakteri 5 farklı miktarda glukoz içeren besiyerlerine %5 (h/h) oranda inoküle edilerek çalkalamalı inkübatörde (120 rpm) 35°C, 48 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Alınan örneklerin proteaz aktivitesi belirlenmiştir.

3.2.4.2. Çeşitli azot kaynaklarının proteaz üretimine ve mikrobiyal gelişime etkisi

İnorganik azot kaynakları amonyum tuzlarından ya da amonyaktan elde edilirken, organik azot kaynakları üreyi, amino asitleri ve proteinleri içermektedir. Organik azot kaynakları genelde endüstrinin mısır şurubu, maya ekstraktı, pepton ve soya unu gibi yan ürünlerinden elde edilmektedir (Sepahy ve Jabalameli, 2011). Çeşitli azot kaynaklarının proteaz üretimine etkisinin incelenmesi amacıyla bazal besiyerinden kazein ve maya özütü çıkarılarak yerine glukoz ve 8 farklı azot kaynağı (kazein, maya özütü, amonyum sülfat, yağsız süt tozu, peynir altı suyu tozu, soya unu, pepton,

sarımercimek unu) %1 (a/h) konsantrasyonda eklenmiştir. pH 7,0-7,5'e ayarlandıktan sonra *Bacillus subtilis* ZBP4, 8 farklı azot kaynağını içeren besiyerlerine %5 (h/h) oranda inoküle edilmiş ve çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Alınan örneklerin proteaz aktivitesi belirlenmiştir.

3.2.4.3. Maya özütü konsantrasyonunun proteaz üretimine etkisinin belirlenmesi

Maya özütü konsantrasyonunun proteaz üretimine etkisinin incelenmesi amacıyla bazal besiyerinden kazein ve maya özütü çıkarılarak yerine %1 (a/h) glukoz, %0-1,5 (a/h) arasında değişen 5 farklı oranda maya özütü eklenmiştir. Besiyeri pH'sı 7,0-7,5 ayarlanarak sterilize edilmiştir. *Bacillus subtilis* ZBP4, NB besiyerinde 24 saat inkübe edilmiş, inkübasyon sonunda gelişen bakteri 5 farklı konsantrasyonda maya özütü içeren besiyerine %5 (h/h) oranda inoküle edilerek inkübasyona bırakılmıştır. Alınan örneklerin proteaz aktivitesi belirlenmiştir.

3.2.4.4. Soya unu konsantrasyonunun proteaz üretimine ve mikrobiyal gelişime etkisinin belirlenmesi

Soya unu konsantrasyonunun proteaz üretimine etkisinin incelenmesi amacıyla bazal besiyerinden kazein ve maya özütü çıkarılarak yerine %1 (a/h) glukoz, %1-2 (a/h) arasında değişen konsantrasyonlarda soya unu eklenmiştir. Besiyeri pH'sı 7,0-7,5 ayarlanarak sterilize edilmiştir. *Bacillus subtilis* ZBP4, NB besiyerinde 24 saat inkübe edilmiş, inkübasyon sonunda gelişen bakteri, 3 farklı konsantrasyonda soya unu içeren besiyerine %5 (h/h) oranda inoküle edilerek inkübasyona bırakılmıştır. Alınan örneklerde proteaz aktivitesi ve mikrobiyal gelişme belirlenmiştir.

3.2.4.5. Sarımercimek unu konsantrasyonunun proteaz üretimine ve mikrobiyal gelişime etkisinin belirlenmesi

Sarımercimek unu konsantrasyonunun proteaz üretimine etkisinin incelenmesi amacıyla bazal besiyerinden kazein ve maya özütü çıkarılarak yerine %1 (a/h) glukoz, %1-2 (a/h) arasında değişen konsantrasyonlarda sarımercimek unu eklenmiştir.

Besiyeri pH'sı 7,0-7,5 ayarlanarak sterilize edilmiştir. *Bacillus subtilis* ZBP4, NB besiyerinde 24 saat inkübe edilmiş, inkübasyon sonunda gelişen bakteri, 3 farklı konsantrasyonda sarımercimek unu içeren besiyerine %5 (h/h) oranda inoküle edilerek inkübasyona bırakılmıştır. Alınan örneklerde proteaz aktivitesi ve mikrobiyal gelişme belirlenmiştir.

3.2.4.6. Soya ve sarımercimek ununda glukoz katkısının proteaz üretimine etkisinin belirlenmesi

Soya ve sarımercimek ununda glukoz katkısının proteaz üretimine etkisinin belirlenmesi amacıyla a/h olarak %0,1 K₂PO₄, %0,1 NaCl ve %0,01 MgSO₄ bileşimi içeren besiyeri %1 (a/h) soya ve %1 (a/h) sarımercimek unu ile ayrı ayrı katılanmıştır. Katkılanan her iki besiyerinden 100'er mL alınarak glukoz yokluğunda proteaz aktivitesinin değişimi incelenmiştir. Geriye kalan besiyeri 100'er mL olarak erlenlere paylaştırılmış ve glukoz varlığında proteaz aktivitesinin değişimini incelemek için %1 (a/h) glukoz eklenmiştir. Besiyeri pH'sı 7,0-7,5'e ayarlanarak sterilize edilmiştir. *Bacillus subtilis* ZBP4, NB besiyerinde 24 saat inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda gelişen bakteri hem %1 (a/h) glukoz içeren besiyerine hem de glukoz içermeyen besiyerine %5 (h/h) oranda inoküle edilerek inkübasyona bırakılmıştır. Alınan örneklerin proteaz aktivitesi belirlenmiştir.

3.2.4.7. Başlangıç pH'sının proteaz üretimine ve mikrobiyal gelişime etkisinin belirlenmesi

Maya özütü ve sarımercimek unu ile hazırlanan iki farklı besiyerinde gelişen *Bacillus subtilis* ZBP4 suşunun çoğalmasının ve proteaz üretiminin optimum olması için başlangıç pH'sının belirlenmesi amaçlanmıştır. Kazeinin proteaz üretimine etkisi az olduğundan bazal besiyerinden çıkarılarak yerine 10 g/L maya özütü veya 10 g/L mercimek unu eklenmiştir. Hazırlanan besiyerlerinin pH'ları 5, 6, 7, 8 ve 9 olarak ayarlanmış ve sterilize edilmiştir. *Bacillus subtilis* ZBP4, NB besiyerinde 24 saat inkübe edilmiş, inkübasyon sonunda gelişen bakteri farklı pH'lardaki besiyerine %5

(h/h) oranda inoküle edilerek inkübasyona bırakılmıştır. Alınan örneklerde proteaz aktivitesi ve mikrobiyal gelişme belirlenmiştir.

3.2.4.8. Sıcaklığın proteaz üretimine ve mikrobiyal gelişime etkisinin belirlenmesi

Bacillus subtilis ZBP4 suşunun çoğalma ve proteaz üretimini optimuma ulaştıracak sıcaklığı belirlemek amaçlanmıştır. Bunun için bazal besiyerine 10 g/L maya özütü eklenmiş, proteaz üretimine kazeinin etkisi az olduğundan besiyeri bileşiminden çıkarılmıştır. Ortam pH'sı 8'e ayarlanarak besiyeri sterilize edilmiştir. *Bacillus subtilis* ZBP4, NB besiyerinde inkübe edildikten sonra izolat %5 (h/h) oranda hazırlanan besiyerine inoküle edilmiştir. Çalkalamalı inkübatörde (120 rpm) 30, 35 ve 40°C sıcaklıklarda 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Alınan örneklerde proteaz aktivitesi ve mikrobiyal gelişme belirlenmiştir.

3.2.5. *Bacillus subtilis* ZBP4'ten üretilen proteaz enziminin bazı özelliklerinin belirlenmesi

3.2.5.1. Proteaz enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi

Bacillus subtilis ZBP4' ten üretilen proteaz enziminin optimum sıcaklık tayini için 500 µL seyreltik enzim çözeltisi üzerine 100 mM pH 8 Tris-HCl tamponunda hazırlanan %1 (a/h) 1000 µL kazein çözeltisi eklenmiştir. Karışım 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90°C sıcaklıklarının her birinde su banyosunda 15 dakika boyunca inkübasyona bırakılarak proteaz aktiviteleri belirlenmiştir.

3.2.5.2. Proteaz enziminin optimum pH'sının belirlenmesi

Bacillus subtilis ZBP4' ten üretilen proteaz enziminin optimum pH değerinin belirlenmesi amacıyla, pH 4 ve 5 için 100 mM Sodyum asetat tamponu, pH 6 için 100 mM Sodyum sitrat tamponu, pH 7 ve 8 100 mM Tris-HCl tamponu, pH 9 ve 10 için 100 mM Karbonat bikarbonat tamponu ile %1'lik kazein substratı hazırlanarak enzim aktiviteleri belirlenmiştir.

3.3. Analizler

3.3.1. Mikroorganizma gelişiminin belirlenmesi

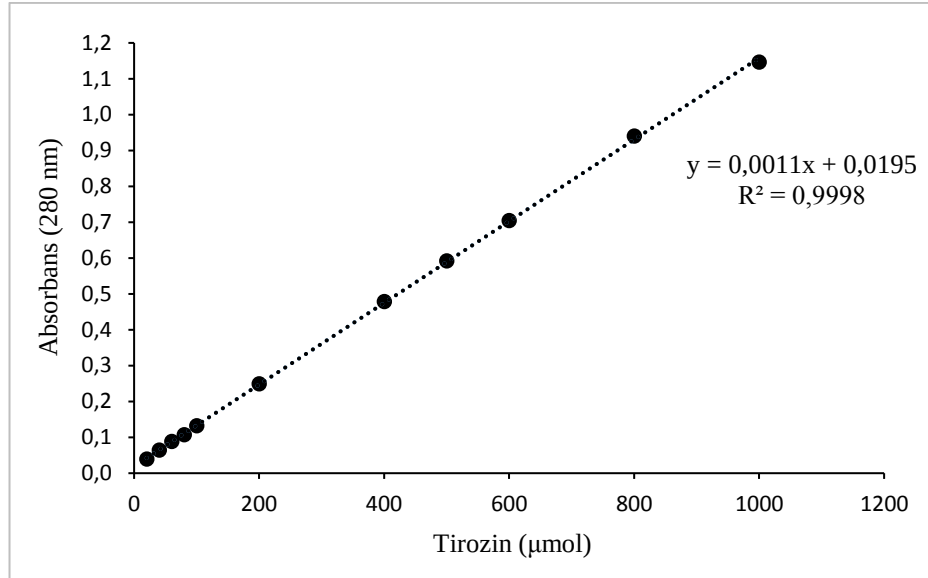
Besiyerlerinde *Bacillus subtilis* ZBP4 suşunun gelişmesi sırasında alınan örnekler destile su ile 1/10 oranda seyreltilmiştir. UV spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda absorbansı ölçülmüştür. Elde edilen değerler seyreltme faktörüyle çarpılarak *Bacillus subtilis* ZBP4 gelişimi belirlenmiştir.

3.3.2. Enzim aktivitesi

Prakasham ve ark. (2006) tarafından kullanılan yöntem modifiye edilerek enzim aktivitesi belirlenmiştir. Enzim çözeltisinden 0,5 mL alınarak 1 mL kazein çözeltisine (%1 a/h kazein çözeltisi, 200 mM Tris-HCl pH 8'de hazırlanmıştır) ilave edilmiştir ve 60°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. Reaksiyon sırasında tirozin amino asidi serbest kalmıştır. Süre sona erdiğinde örnekler hızlı bir şekilde buz banyosuna alınmış ve reaksiyon 2 mL %10'luk TCA ilave edilerek sonlandırılmıştır. Bu karışım 4°C, 9000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüjlenerek çökelen protein ve hücre kütlesi uzaklaştırılmıştır. Süpernatant alınarak, 1/5 oranında distile su ile seyreltilmiştir. Yukarıda belirtilen prosedürde 1 mL kazein çözeltisine enzim yerine saf su eklenen karışım, kör olarak kullanılmıştır. UV spektrofotometrede 280 nm dalga boyunda absorbansı ölçülmüştür.

3.3.3. Tirozin standart eğrisinin hazırlanması

Tolan (2007) ve Prakasham ve ark. (2006) tarafından kullanılan yöntemler modifiye edilerek Tirozin standart eğrisi hazırlanmıştır. Proteaz enzim aktivitesinin hesaplanmasında kullanılacak olan tirozin standart eğrisinin çıkartılması amacıyla tirozin stok çözeltisinden 0,02-1 mM arasında olacak şekilde seyreltilen konsantrasyonlarda standartlar hazırlanmıştır. 280 nm dalga boyunda her birinin absorbansı ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerlerine karşı tirozin standart eğrisi çizilmiş ve eğimi hesaplanmıştır (Şekil 3.1.)



Şekil 3.1. Tirozin standart eğrisi

Enzim aktivitesinin hesaplanmasında tirozin ile hazırlanan standart eğri ve aşağıdaki Denklem 3.1.'den yararlanılmıştır (Tolan, 2015).

$$\text{Enzim Aktivitesi} \left(\frac{\text{U}}{\text{mL}} \cdot \text{dk} \right) = \frac{\text{Standart eğriden bulunan değer (}\mu\text{mol)} \times \text{toplam hacim (mL)}}{\text{Enzim miktarı (mL)} \times \text{inkübasyon süresi (dk)}} \times \text{SF} \quad (3.1.)$$

SF: Seyreltme faktörü

Toplam hacim: 0,5 mL supernatant+1 mL kazein+2 mL TCA

3.3.4. Sarımercimek ununda protein miktarı tayini

Sarımercimek ununda protein miktarı AOAC'nin 981.10 Kjeldahl yöntemine göre hesaplanmıştır (Horwitz ve Latimer, 2006). Prensibi, proteinlerde bulunan azotu amonyak (NH_3) haline getirerek amonyaktan azotu ve protein miktarını hesaplamaktır. Analiz 3 aşamadan oluşmaktadır.

Yakma: Belli miktarda sarımercimek unu tartılarak Kjeldahl tüplerine aktarılmıştır. Tüplerin içine Cu, Hg, Fe, K gibi tuzları içeren, katalizör görevi yapacak olan Kjeldahl tabletlerinden birer tane eklenmiştir. Ayrıca yanma işleminde taşmaya engel olmak için tüp içerisine ikişer adet kaynatma taşı eklenmiştir. Yakma ünitesine dizilen tüplere 10'ar mL H_2SO_4 eklenmiştir. Yakma işlemi yaklaşık 1 saat boyunca devam etmiştir.

Bu süre boyunca oluşan vakum H_2SO_4 ve diğer organik asitlerin uzaklaşmasını sağlamıştır. Proteinin yapısında bulunan azot, H_2SO_4 ve katalizör tablet yardımıyla işlem bitiminde Amonyum sülfat haline gelmiştir. Renk dönüşümü gözlemlenmiştir.

Destilasyon: Destilasyon aşamasında yöntemin yakma sırasında oluşan amonyum sülfat- $(NH_4)_2SO_4$, H_2O ve $NaOH$ ile ayrıştırılarak önce NH_4OH , daha sonra NH_3 haline dönüştürülerek zayıf bir asitle tutulması sağlanmıştır. $NaOH$ yakma karışımının pH'sını yükseltmekte ve $(NH_4)_2SO_4$ 'ün NH_4 iyonlarının NH_3 gazına dönüşmesini kolaylaştırmaktadır ve NH_3 serbest hale gelmektedir. Kaynama noktası sıcaklığına kadar yükseltilmiş ve gaz haline gelmiş amonyak geri soğutucu yardımı ile yoğunlaştırılıp geri soğutucunun uç kısmına konan erlendeki belli miktar ayarlı borik asit içinde tutulmaktadır.

Titrasyon: Borik asit çözeltisinde tutulan ve amonyak miktarının belirlenmesi için titrasyon işlemi yapılmıştır. Kjeldahl protein tayin yönteminin titrasyon aşamasında; konsantrasyonu bilinen 0,1 N HCl çözeltisi, damıtma sırasında oluşan amonyum borat ile reaksiyona girmiştir. Titrasyon sonunda amonyak (zayıf bir baz), konsantrasyonu belli bir asitle nötralize edilmiştir. Amonyum borat hidroklorik asitle reaksiyona girdiğinde amonyum klorür ve tekrar borik asite dönüştüğünden erlendeki mavi-yeşil renk damıtmanın başlangıcındaki menekşe-mor renge dönüşür ve Denklem 3.2. ve 3.3.'de gösterildiği gibi yüzde azot ve yüzde protein miktarı hesaplanmıştır.

$$\%Azot = \frac{(V1-V0) \times N \times 0,014}{m} \times 100 = \dots g/100g \quad (3.2.)$$

$$\%Protein = \%Azot \times F \quad (3.3.)$$

$V1$ = Titrasyonda harcanan HCl miktarı (mL)

$V0$ = Kör deneme titrasyonda harcanan HCl miktarı (mL)

N = Titrasyonda kullanılan HCl çözeltisinin normalitesi (0,08 N)

m = Tartılan sarımercimek unu miktarı (g)

F = Protein kat sayısı (Un: 5,7)

Tablo 3.3. Protein miktarı tayininde gerçekleşen kimyasal reaksiyonlar

Yakma	Organik madde + H ₂ SO ₄ $\xrightarrow{\text{katalizör}}$ CO ₂ + H ₂ O + NH ₄ ⁺ + SO ₂
	NH ₄ ⁺ + SO ₂ ⁻² $\xrightarrow{\text{ISI}}$ (NH ₄) ₂ SO ₄
Destilasyon	(NH ₄) ₂ SO ₄ + 2NaOH $\longrightarrow$ Na ₂ SO ₄ + 2NH ₄ OH
	NH ₄ OH $\longrightarrow$ H ₂ O + NH ₃
	NH ₃ + H ₃ BO ₃ $\longrightarrow$ NH ₄ H ₂ BO ₃
Titrasyon	NH ₄ H ₂ BO ₃ + HCl $\longrightarrow$ NH ₄ Cl + H ₃ BO ₃

3.3.5. İstatistiksel analizler

Proteaz aktivitelerine ait analiz sonuçları ortalama değerler olarak verilmiştir. Sonuçların değerlendirilmesinde IBM SPSS Statistics (Versiyon 20.0) istatistik paket programı kullanılmıştır. Analiz sonuçları tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile belirlenmiştir (Raj ve ark., 2017). Ortalamalar arasındaki farkın belirlenmesinde Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testi kullanılmıştır (p<0.05).

BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. *Bacillus subtilis* ZBP4

Sakarya ilinden alınan bir toprak örneğinden izole edilen *Bacillus sp.* ZBP4 suşu, aerobik, çubuk şeklinde, gram pozitif ve endospor oluşturmaktadır. 16S rDNA çalışmaları, % 99.4 benzerlikte *Bacillus subtilis* olduğunu ortaya çıkarmıştır. Yapılan çalışmalarda *Bacillus subtilis* ZBP4 izolatının amilaz enzimi, antimikrobiyal madde (Avcı ve ark., 2017) ve ekzopolisakkarit üretme (Ergene ve Avcı, 2018) yeteneğinde olduğu belirlenmiştir.

4.2. Skim Milk Agarda Proteolitik Aktivitenin Belirlenmesi

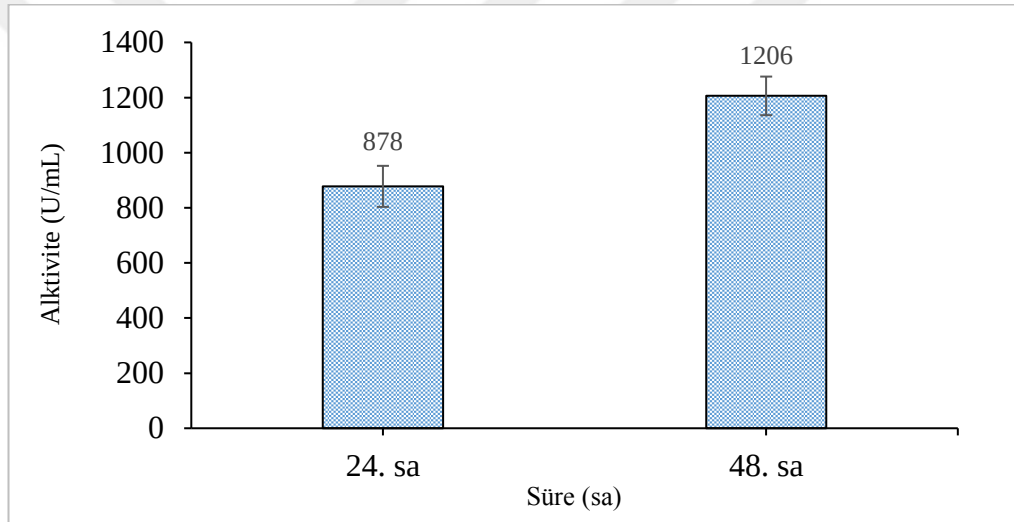
Bacillus subtilis ZBP4, proteolitik aktivitesinin belirlenmesi için SMA içeren petride inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra SMA petrisinde koloniler çevresinde belirgin bir şekilde berrak bir bölge oluşmasıyla izolatın önemli proteolitik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Proteaz üreticisi organizma olarak tanımlanmıştır ve elde edilen sonuç Şekil 4.1.'de verilmiştir.



Şekil 4.1. *Bacillus subtilis* ZBP4 suşunun SMA üzerindeki hidroliz bölgesi

4.3. *Bacillus subtilis* ZBP4' ün Çoğaltılması ve Bazal Besiyerinde Proteaz Üretimi

Bu amaçla *Bacillus subtilis* ZBP4 çoğaltılmış, bazal besiyerine %5 (h/h) oranda inokülasyon yapılmıştır. Çalkalamalı inkübatörde (120 rpm) 35°C'de 48 saatlik inkübasyon sonucu elde edilen süpernatantlar %1'lik (a/h) kazein çözeltisi ile reaksiyona bırakılmıştır ardından 280 nm dalga boyunda absorbanslarının ölçülmesi ile proteaz aktivitesi belirlenmiştir. Bazal besiyeri ortamında 24. ve 48. saat örneklerinden sırasıyla, 878 ve 1206 U/mL proteaz aktivitesi elde edilmiştir. İnkübasyon süresinin artmasına bağlı olarak %37,35 enzim aktivitesinin arttığı anlaşılmıştır (Şekil 4.2.).

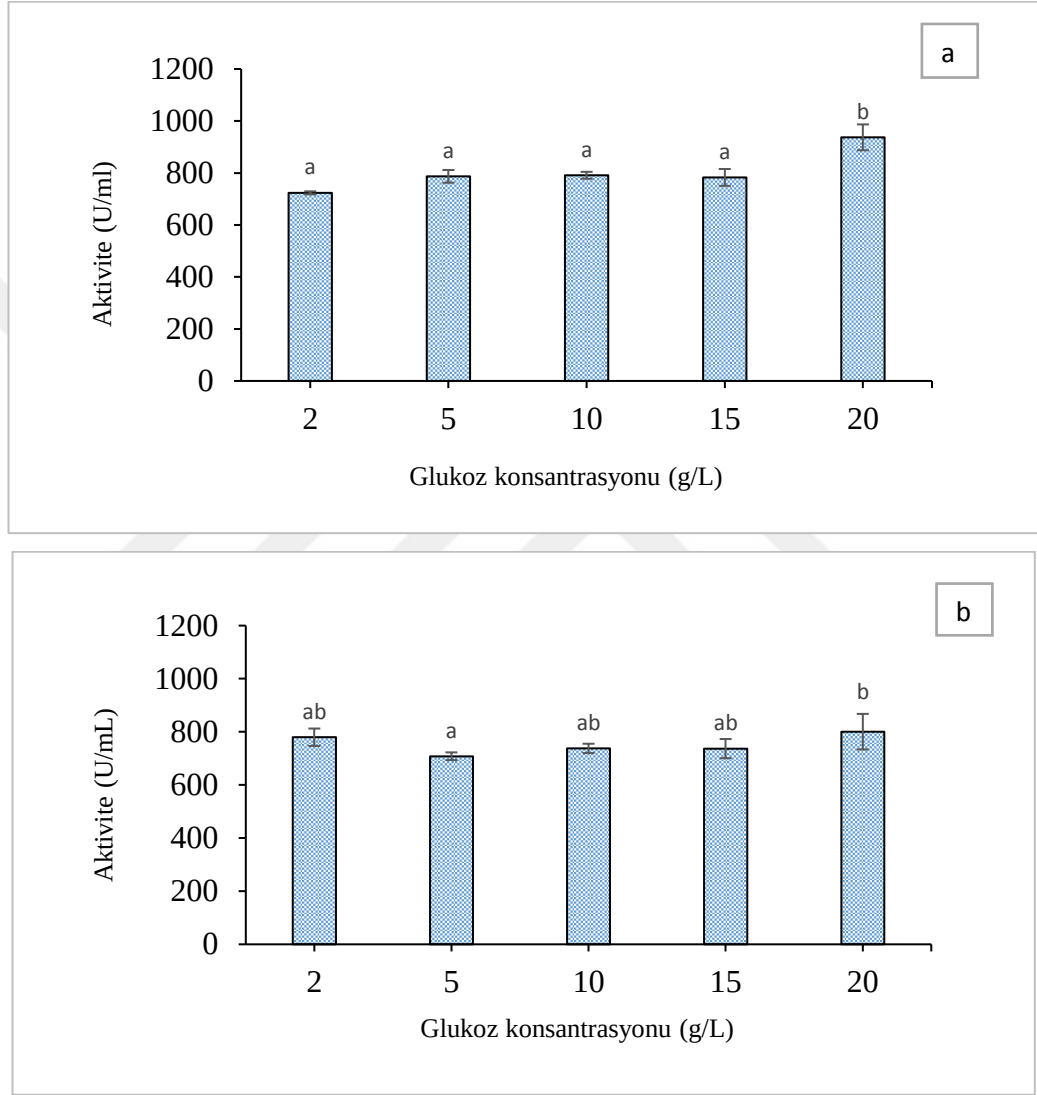


Şekil 4.2. Bazal besiyerinde proteaz aktivitesi

4.3.1. Glukoz konsantrasyonunun proteaz üretimine etkisi

Farklı karbon kaynaklarının hücre dışı enzim üretimini etkilediğine dair genel yorumlar vardır. Enzim üretimi fizyolojik mekanizmalar tarafından düzenlenir ve sıvı kültürde glukozun katabolitleri (katabolit baskısı) genellikle hidrolitik enzimlerin üretimini baskılar (Zambare ve ark., 2011). Karbon kaynağı olarak glukozun *Bacillus subtilis* ZBP4 tarafından üretilen proteaz enzimi üzerindeki etkisini araştırmak için, bazal besiyeri ortamının glukoz konsantrasyonları değiştirilmiştir. Bu amaçla izolat %0,2-2 (a/h) arasındaki 5 farklı glukoz konsantrasyonu içeren besiyerine %5 (h/h) oranda inoküle edilerek inkübasyona bırakılmıştır. Örnekler 24. ve 48. saatte

alınmıştır. Elde edilen sonuçlara göre; 24. saatte (Şekil 4.3.a.) en düşük aktivite 2 g/L konsantrasyonda $723 \pm 5,8$ U/mL, en yüksek aktivite ise 20 g/L konsantrasyonda $937 \pm 49,8$ U/mL olmuştur. 48. saatte (Şekil 4.3.b.) en düşük aktivite 5 g/L konsantrasyonda $708 \pm 14,6$ U/mL, en yüksek aktivite 20 g/L konsantrasyonda $801 \pm 66,9$ U/mL olarak elde edilmiştir.



Şekil 4.3. Farklı glukoz konsantrasyonlarındaki proteaz aktivitesi a) 24. sa; b) 48. sa. a-b: Aynı grafikte yer alan örnekler arasındaki fark istatistiki açıdan önemlidir ancak aynı harfe sahip olanlar istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p < 0,05$).

Glukoz konsantrasyonu 2 g/L'den 15 g/L'ye kadar arttırıldığında proteaz aktivitesinde önemli bir değişiklik olmamıştır. Ancak 20 g/L konsantrasyonda, her iki zamanda da ölçülen aktivitenin maksimum değere ulaştığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte

zamana bağılı olarak aktivitenin azaldığı belirlenmiştir. Proteaz aktivitesi istatistiksel olarak %95 güven düzeyinde anlaşılandırılmıştır.

4.3.2. Çeşitli azot kaynaklarının proteaz üretimine ve mikrobiyal gelişime etkisi

Yapılan çalışmada azot kaynaklarının proteaz üretimi üzerindeki etkisi, en uygun kaynakların tanımlanması ve mikrobiyal gelişimin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla *Bacillus subtilis* ZBP4 çoğaltılmış, %1 (a/h) konsantrasyondaki azot kaynaklarının bulunduğu besiyerine %5 (h/h) oranda inoküle edilmiştir. İnkübasyon sonrasında alınan örneklerde proteaz aktivitesi ve mikrobiyal gelişim belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar Tablo 4.1.'de gösterilmiş ve kullanılan azot kaynakları etki derecelerine göre amonyum sülfat, peynir altı suyu tozu, yağsız süt tozu, pepton, kazein, mercimek unu, soya unu, maya özütü olarak en düşükten en yükseğe sıralanmıştır. En düşük aktivite 24. saatte amonyum sülfat $27 \pm 4,7$ U/mL, en yüksek aktivite ise maya özütü $1348 \pm 29,7$ U/mL olarak elde edilmiştir. Maya özütünün 48 saatte %24'lük bir artışla $1678 \pm 52,5$ U/mL, soya ununun %46'luk artışla $1424 \pm 67,6$ U/mL ve mercimek ununun %32'lik artışla $863 \pm 21,4$ U/mL proteaz aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.1. Çeşitli azot kaynaklarının proteaz üretimine etkisi ve mikrobiyal gelişim

Azot Kaynakları	Proteaz aktivitesi		Mikrobiyel gelişme (OD ₆₀₀)	
	24. sa	48. sa	24. sa	48. sa
Kazein	$420 \pm 19,6^d$	$555 \pm 54,7^d$	$2,237 \pm 0,31^d$	$2,203 \pm 0,29^c$
Maya Özütü	$1348 \pm 29,7^g$	$1678 \pm 52,5^g$	$3,570 \pm 0,26^e$	$5,090 \pm 0,03^e$
Amonyum Sülfat	$27 \pm 4,7^a$	0.0^a	$0,370 \pm 0,08^{ab}$	$0,923 \pm 0,10^a$
Yağsız Süt Tozu	$333 \pm 8,1^c$	$635 \pm 11,5^d$	$0,743 \pm 0,22^{bc}$	$1,480 \pm 0,25^b$
Peynir Altı Suyu Tozu	$220 \pm 8,8^b$	$206 \pm 17,7^b$	$0,010 \pm 0,01^a$	$0,783 \pm 0,15^a$
Soya Unu	$975 \pm 105,0^f$	$1424 \pm 67,6^f$	$2,123 \pm 0,32^d$	$8,343 \pm 0,16^f$
Pepton	$361 \pm 18,1^{cd}$	$361 \pm 21,4^c$	$1,017 \pm 0,16^c$	$0,950 \pm 0,31^a$
Sarımercimek Unu	$655 \pm 6,6^e$	$863 \pm 21,4^e$	$3,840 \pm 0,48^e$	$4,595 \pm 0,49^d$

a-g: Aynı sütunda yer alan örnekler arasındaki fark istatistiki açıdan önemlidir ancak aynı harfe sahip olanlar istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p < 0,05$).

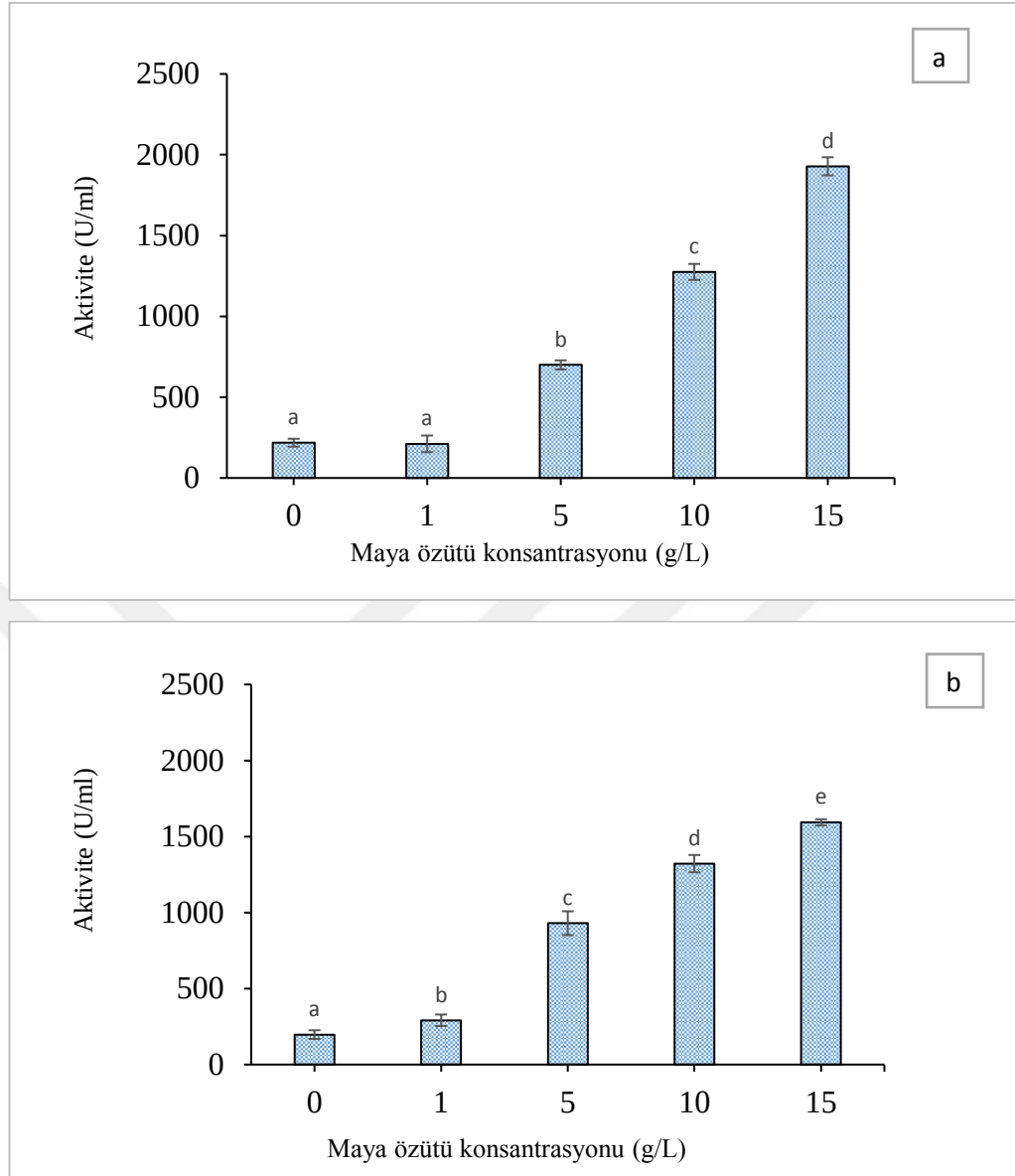
Azot kaynaklarından kazein, yağsız süt tozu ve pepton arasında istatistiki açıdan önemli bir fark görülmemiştir. Ayrıca azot kaynaklarının hücre gelişmesine yardımcı olduğu anlaşılmıştır. Mercimek unu, soya unu ve maya özütü içeren besiyerinde hücre yoğunluğunun yüksek olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.1.).

4.3.3. Maya özütü konsantrasyonunun proteaz üretimine etkisi

Azot kaynaklarından maya özütü ile yapılan çalışma en yüksek aktiviteyi verdiği için (Tablo 4.1.) farklı maya özütü konsantrasyonlarının da enzim üretimine etkisi araştırılmıştır. Maya özütü %0; 0,1; 0,5; 1 ve 1,5 (a/h) konsantrasyonda hazırlanarak besiyerine eklenmiştir.

Şekil 4.4.a.'da görüldüğü gibi 24. saatte maya özütünün bulunmadığı ortamda en düşük aktivite $218 \pm 24,6$ U/mL, en yüksek aktivite 15 g/L konsantrasyonda $1929 \pm 56,1$ U/mL olarak elde edilmiştir. Maya özütü bulunmayan ortamda 48. saatte ise $197 \pm 28,7$ U/mL en düşük aktivite; 15 g/L maya özütü konsantrasyonunda $1593 \pm 20,4$ U/mL en yüksek aktivite olarak elde edilmiştir (Şekil 4.4.b.).

Aynı zaman diliminde konsantrasyon arttıkça proteaz aktivitesinde belirgin bir artış tespit edilmiştir. Bununla birlikte her iki zamanda da ölçülen aktivite 15 g/L maya özütü konsantrasyonda maksimum değere ulaşmıştır. Ancak zamana bağlı olarak 15 g/L konsantrasyonda aktivitenin azaldığı belirlenmiştir.

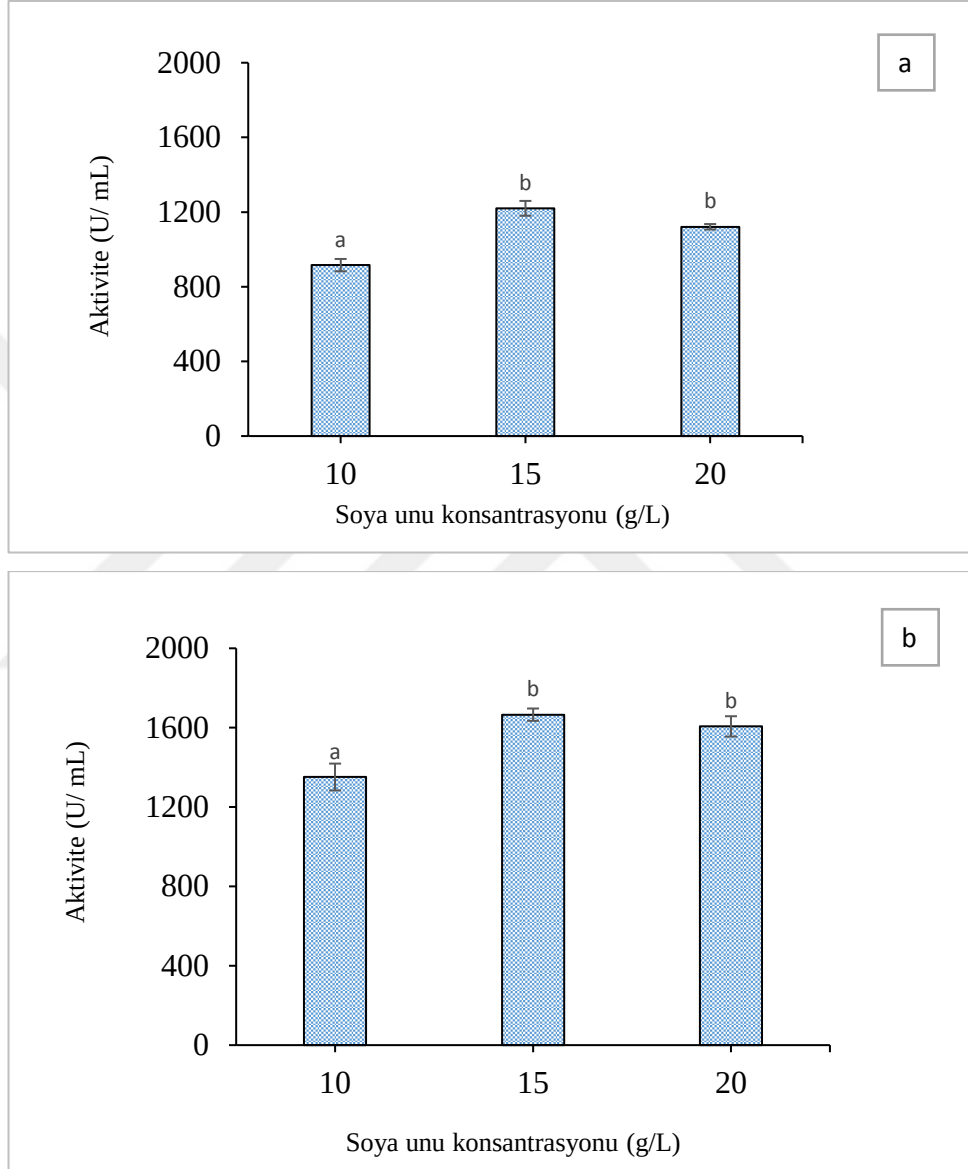


Şekil 4.4. Farklı maya özütü konsantrasyonlarında proteaz aktivitesi. a) 24. sa; b) 48. sa. a-e: Aynı grafikte yer alan örnekler arasındaki farkın istatistiki açıdan önemi. Aynı harfe sahip olanlar istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p < 0,05$).

4.3.4. Soya unu konsantrasyonunun proteaz üretimine ve mikrobiyal gelişime etkisi

Azot kaynağı olarak soya fasulyesi yenilenebilir ve ucuz bir tarımsal üründür. Yaklaşık %40 protein içeren soya arzu edilen amino asit içeriği, bulunabilirliği ve düşük maliyeti nedeniyle yüksek kullanım potansiyeline sahiptir (Liu ve ark., 2017). Ayrıca kültür ortamı için diğer organik ve inorganik bileşenler açısından da zengindir.

Proteaz enzimi üretimine soya ununun etkisini araştırmak için hazırlanan besiyerlerine %1, 1,5 ve 2 konsantrasyonlarda soya unu eklenmiş, *Bacillus subtilis* ZBP4 suşu %5 oranda inoküle edilmiş ve inkübasyon sonrası proteaz aktivitesi ve mikrobiyal gelişme belirlenmiştir.



Şekil 4.5. Farklı soya unu konsantrasyonlarında proteaz aktivitesi. a) 24. sa; b) 48. sa. a-b: Aynı grafikte yer alan örnekler arasındaki farkın istatistiki açıdan önemi. Aynı harfe sahip olanlar istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p < 0,05$).

Bacillus subtilis ZBP4 suşu 10 g/L, 15 g/L ve 20 g/L soya unu konsantrasyonlarında sırasıyla 24. saatte $916 \pm 33,0$ U/mL, $1220 \pm 39,8$ U/mL ve $1121 \pm 14,6$ U/mL aktivite vermiş (Şekil 4.5.a.); 48 saat sonunda ise $1351 \pm 67,6$ U/mL, $1666 \pm 31,1$ U/mL ve $1607 \pm 51,2$ U/mL olarak aktivite verdiği ve zamana bağlı olarak bir artış olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.5.b.). Soya unu konsantrasyonu 15 g/L olduğunda zamana ve mikrobiyal gelişime bağlı olarak aktivite maksimuma ulaşmıştır. Hazırlanan besiyerinde inoküle edilen *Bacillus subtilis* ZBP4, Tablo 4.2.'de gösterildiği gibi zamana bağlı olarak sırasıyla 3,92; 4,26 ve 1,91 kat artış göstererek gelişmiştir. Ayrıca Duncan Çoklu Karşılaştırma Testine göre ortalamalar arasında önemli bir fark oluşturduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$).

Tablo 4.2. Farklı konsantrasyonlarda soya unu içeren besiyerinde bakteri gelişimi

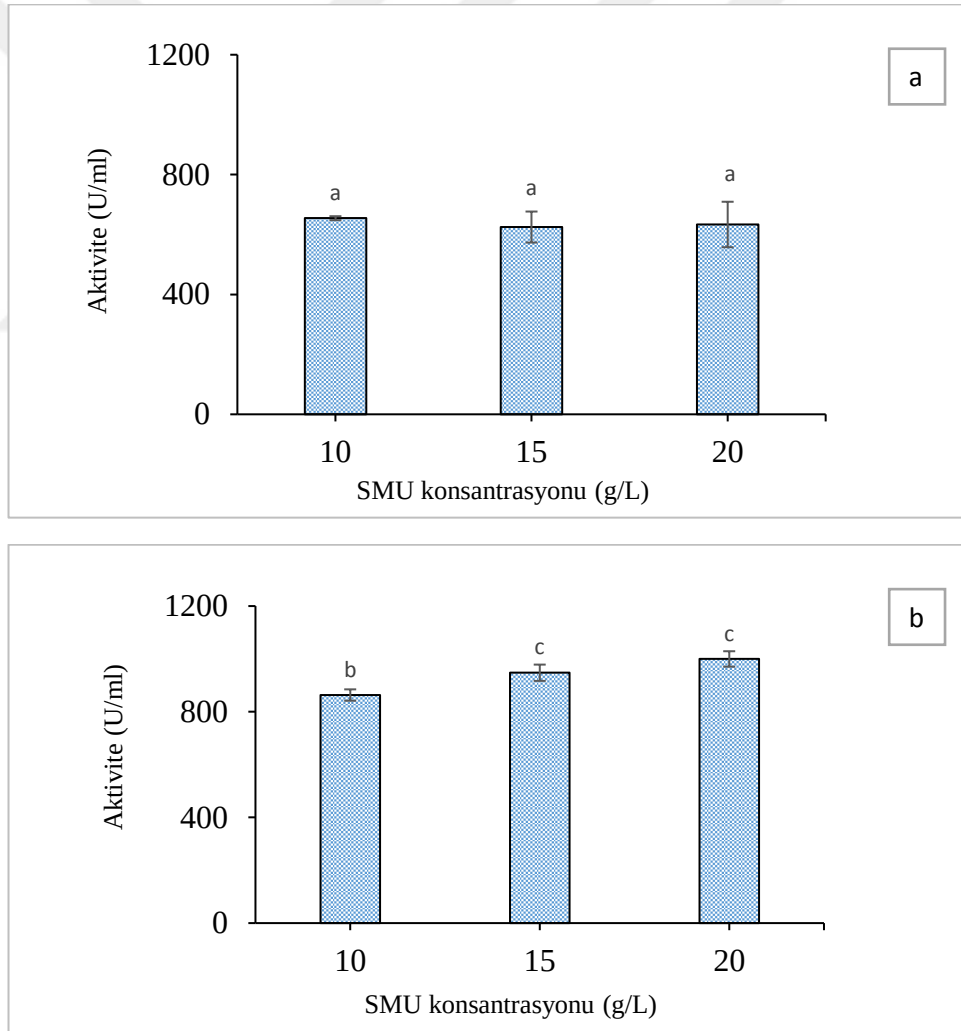
Soya unu Konsantrasyonu	Mikrobiyal Gelişme (OD ₆₀₀)	
	24. sa	48. sa
1	$2,123 \pm 0,32^a$	$8,343 \pm 0,16^c$
1,5	$1,933 \pm 0,50^a$	$8,247 \pm 0,39^c$
2	$3,183 \pm 0,06^b$	$6,077 \pm 0,25^b$

a-c: Aynı sütunda yer alan örnekler arasındaki farkın istatistikî açıdan önemi. Aynı harfe sahip olanlar istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p < 0,05$).

4.3.5. Sarımercimek unu konsantrasyonunun proteaz üretimine ve mikrobiyal gelişime etkisi

Mercimek (*Lens culinaris*) lif bakımından yüksek, yağ oranı düşük baklagillerdendir. %20,6-31,4 oranda protein içeren mercimek aynı zamanda karbonhidrat, yağ, tiamin, demir, fosfor ve bakır bakımından zengin enerji ve protein kaynağıdır (Jarpa-Parra, 2017). Mercimeğin yapısal, fizikokimyasal ve fonksiyonel özellikleri bir bileşen olarak potansiyel rolünü açıklamaktadır. Çevresel sürdürülebilirliği ve yeni azot kaynağı olarak kullanılabilirliği araştırmada etkili olmuştur. Yapılan çalışmada mercimek ununda bulunan azotu, amonyak (NH₃) haline getirerek bileşimindeki ham protein miktarını belirlemek için Kjeldahl metodu kullanılmıştır. Kimyasal analiz sonucunda mercimek ununun ham proteini %17,36 bulunmuştur.

Azot kaynağı olarak mercimek ununun *Bacillus subtilis* ZBP4 suşu gelişimine, proteaz üretimine ve aktivitesine etkisini araştırmak için bakteri %1; 1,5; 2 (a/h) konsantrasyonlarda hazırlanan besiyerine inoküle edilmiştir. İnkübasyon tamamlandıktan sonra hem proteaz üretimi hem de mikrobiyal gelişme belirlenmiştir. Mercimek unu konsantrasyonlarında proteaz aktivitesinin 24. saatte sırasıyla $655 \pm 6,6$ U/mL, $625 \pm 51,8$ U/mL, $634 \pm 75,9$ U/mL olduğu (Şekil 4.6.a); 48. saat sonunda ise $863 \pm 21,4$ U/mL, $948 \pm 30,8$ U/mL, $1000 \pm 29,2$ U/mL olarak aktivitenin arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.6.b). Tablo 4.3.'te gösterildiği gibi mercimek unu konsantrasyonu artırıldığında zamana ve mikrobiyal gelişime bağlı olarak aktivitenin arttığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.6. Farklı sarımercimek unu konsantrasyonlarında proteaz aktivitesi. a) 24. sa; b) 48. sa. b-c: Aynı grafikte yer alan örnekler arasındaki farkın istatistiki açıdan önemi. Aynı harfe sahip olanlar istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p < 0,05$).

Tablo 4.3. Farklı konsantrasyonlarda sarımercimek unu içeren besiyerinde bakteri gelişimi

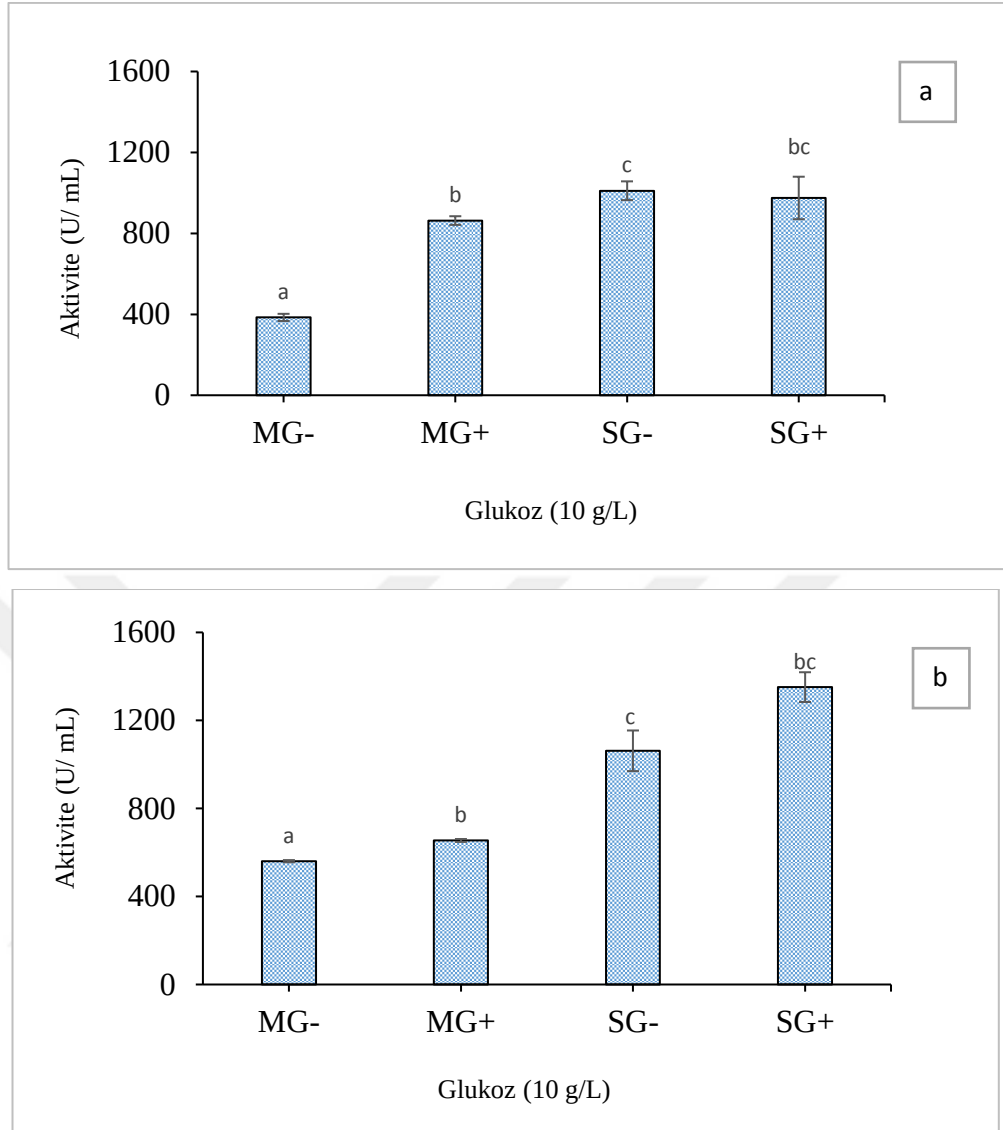
Soya unu konsantrasyonu	Mikrobiyal Gelişme (OD ₆₀₀)	
	24. sa	48. sa
	24.sa	48.sa
1	3,840 ± 0,48 ^b	4,595 ± 0,49 ^b
1,5	4,207 ± 0,24 ^b	4,837 ± 0,26 ^b
2	5,067 ± 0,32 ^c	5,800 ± 0,08 ^c

b-c: Aynı sütunda yer alan örnekler arasındaki farkın istatistiki açıdan önemi. Aynı harfe sahip olanlar istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p < 0,05$).

4.3.6. Soya ve sarımercimek ununda glukoz katkısının proteaz üretimine etkisi

Glukoz katkısının proteaz üretimine etkisinin belirlenmesi amacıyla soya ve sarımercimek unu %1 (a/h) konsantrasyonda besiyerine eklenmiştir. Şekil 4.7.a. ve b.'de gösterildiği gibi mercimek unu katkılı besiyerinden glukoz yokluğunda (MG-) 24. saatte $385 \pm 17,7$ U/mL, 48. saatte $560 \pm 4,9$ U/mL aktivite elde edilmiştir.

Aynı ortama %1 (a/h) konsantrasyonda glukoz eklendiğinde (MG+) proteaz aktivitesinde sırasıyla 2,24 ve 1,17 kat artış elde edilmiştir. Bununla birlikte soya unu katkılı besiyerinden glukoz yokluğunda (SG-) 24. saatte $1011 \pm 46,3$ U/mL aktivite elde edilirken 48. saatte $1062 \pm 92,3$ U/mL aktivite elde edilmiştir. Bu ortama %1 konsantrasyonda glukoz eklendiğinde (SG+) proteaz aktivitesi 24. saatte $916 \pm 33,0$ U/mL ölçülürken 48. saatte $1351 \pm 67,6$ U/mL ölçülmüştür (Şekil 4.8.a. ve b.).



Şekil 4.7. Soya ve sarımercimek ununun glukoz varlığında proteaz aktivitesine etkisi. a) 24. sa; b) 48. sa.

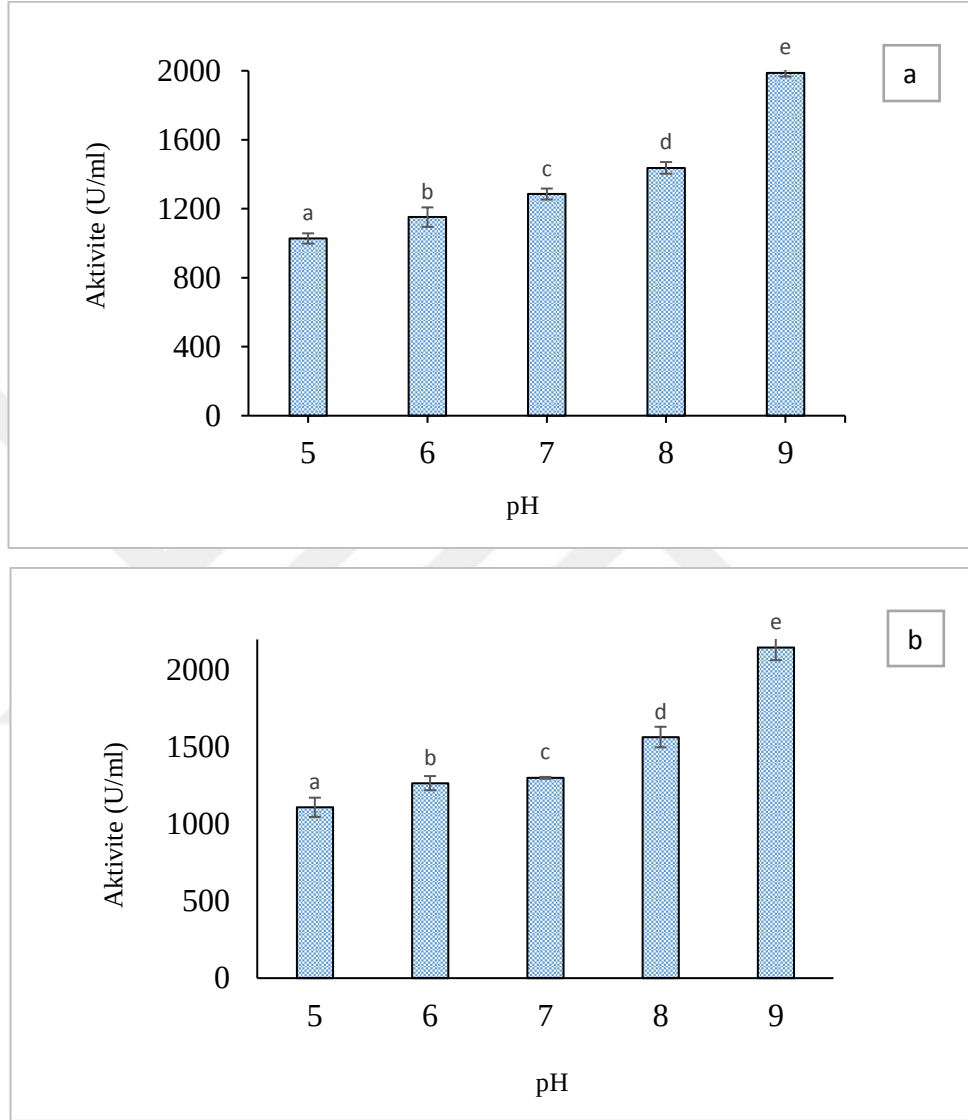
MG-: Mercimek ununda glukoz katkısı yok, MG+: Mercimek ununda glukoz katkısı var, SG-: Soya ununda glukoz katkısı yok, SG+: Soya ununda glukoz katkısı var. a-c: Aynı grafikte yer alan örnekler arasındaki farkın istatistiksel açıdan önemi. Aynı harfe sahip olanlar istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p < 0,05$).

4.4. Başlangıç pH'sı ve Sıcaklığın Proteaz Üretimi ve Mikrobiyal Gelişime Etkisi

4.4.1. Başlangıç pH'sının proteaz üretimine ve mikrobiyal gelişime etkisi

Bacillus subtilis ZBP4 suşundan en iyi proteaz üretimini elde etmek için izolatın optimum pH'sı belirlenmiştir. İzolat, ayrı ayrı maya özütü ve sarımercimek unu içeren besiyerlerine %5 (h/h) oranda inoküle edilmiştir.

İnkübasyon sonlandığında alınan örneklerde proteaz aktivitesi ve mikrobiyal gelişme belirlenmiştir. Beş farklı değerde pH'ları (pH 5, 6, 7, 8, 9) ayarlanmış besiyerlerinde proteaz üretimleri için test edilmiştir.



Şekil 4.8. Maya özütü ile hazırlanan besiyerinde pH değerine bağlı proteaz aktivitesi. a) 24. sa; b) 48. sa. a-e: Aynı grafikte yer alan örnekler arasındaki fark istatistiki açıdan önemlidir ancak aynı harfe sahip olanlar istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p < 0,05$).

Maya özütü içeren besiyerinde 24 saat inkübasyon sonunda aktivitenin sırasıyla $1028 \pm 29,7$ U/mL, $1152 \pm 56,6$ U/mL, $1285 \pm 31,8$ U/mL, $1437 \pm 33,8$ U/mL ve $1988 \pm 21,4$ U/mL olduğu (Şekil 4.8.a.); 48. saat sonunda ise sırasıyla %0,79; 1; 0,12; 0,9 ve 0,8 oranda arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.8.b.).

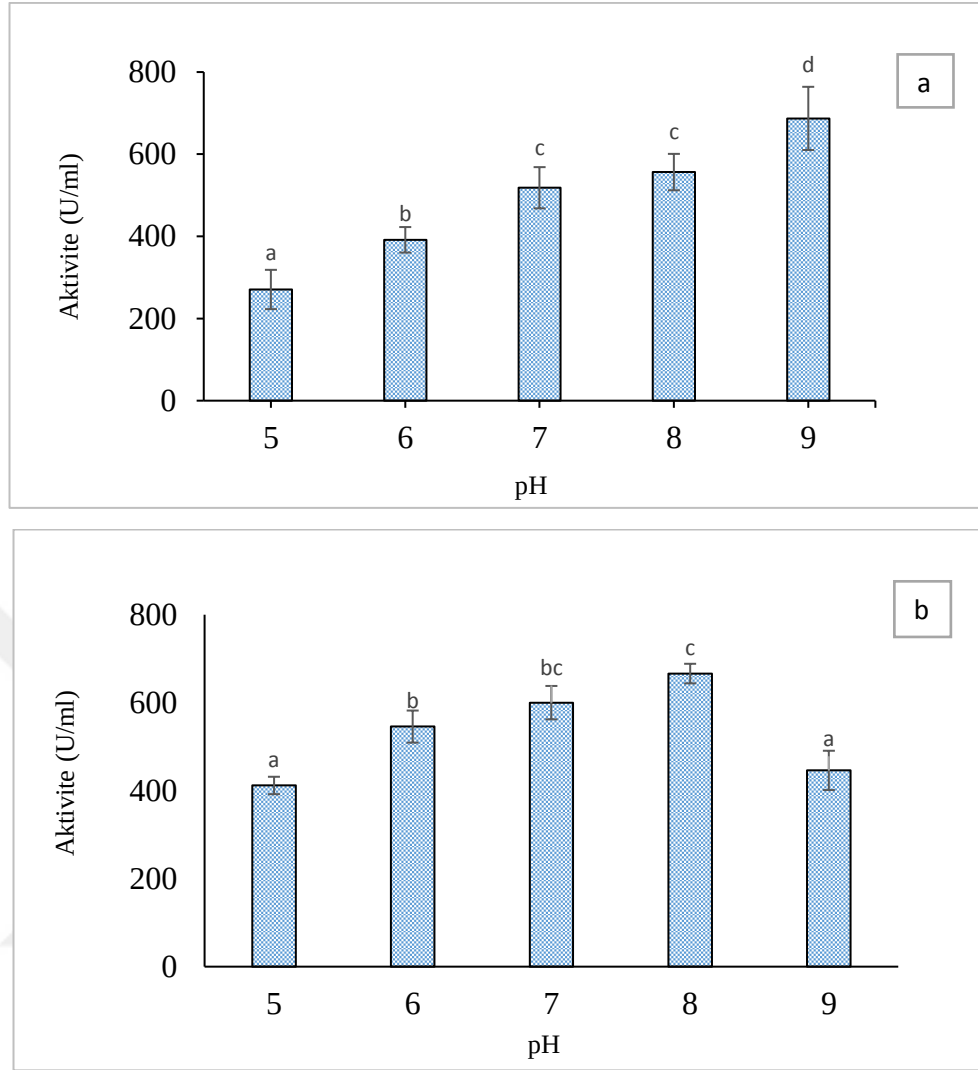
Bununla birlikte Tablo 4.4.'te gösterildiği gibi pH 5, 6 ve 7 ortamında inoküle edilen *Bacillus subtilis* ZBP4, zamana bağlı olarak sırasıyla 1,35; 1,39 ve 1,15 kat artışla mikrobiyal gelişme gösterirken pH 8 ve 9 ortamında 1,22 ve 1,36 kat azalış göstermiştir. pH 9'da maksimum proteaz aktivitesi, minimum bakteri gelişimi tespit edilmiştir.

Tablo 4.4. Maya özütü kullanılan ortamda pH değerine bağlı bakteri gelişimi

pH	Mikrobiyal Gelişme (OD ₆₀₀)	
	24. sa	48. sa
5	3,467±0,08 ^a	4,670±0,21 ^a
6	3,427±0,15 ^b	4,773±0,13 ^b
7	3,583±0,26 ^b	4,140±0,17 ^c
8	3,703±0,27 ^b	3,027±0,23 ^d
9	2,607±0,2 ^b	1,920± 0,19 ^d

a-d: Aynı sütunda yer alan örnekler arasındaki farkın istatistiki açıdan önemi. Aynı harfe sahip olanlar istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p < 0,05$).

Sarımercimek unu içeren besiyerinde izolatin çoğalması ve proteaz üretimi için optimum pH'sını belirlemek amacıyla besiyerinin pH'ları 5, 6, 7, 8 ve 9'a ayarlanmıştır. Bakteri hazırlanan bu ortama inoküle edilerek test edilmiştir. Örneklerle ait 24. saat proteaz aktivitesinin pH 5, 6, 7, 8 ve 9'da sırasıyla 271±47,8 U/mL, 392±31,1 U/mL, 518±50,2 U/mL, 557± 44,3 U/mL ve 687±76,9 U/mL olduğu (Şekil 4.9.a); 48. saat sonunda aktivite sırasıyla %52, %39,3, %15,8 %19,5 artmış, pH 9 ortamında ise %35,1 azaldığı görülmüştür (Şekil 4.9.b.). Bununla birlikte izolat, zamana bağlı olarak sırasıyla 1,64; 1,63; 1,19; 1,34 ve 1,16 kat artışla mikrobiyal gelişim göstermiş ve pH 8'de maksimum, pH 9'da minimum gelişim gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 4.5.). Duncan Çoklu Karşılaştırma Testine göre ortalamalar arasında pH 7 ve 8'de önemli bir fark olmadığı ancak pH değeri arttıkça aktivitede ölçülen farkın önemli olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$).



Şekil 4.9. Sarımercimek unu ile hazırlanan besiyerinde pH değerine bağlı proteaz aktivitesi. a) 24. sa; b) 48. sa. a-d: Aynı grafikte yer alan örnekler arasındaki fark istatistiki açıdan önemlidir ancak aynı harfe sahip olanlar istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p < 0,05$).

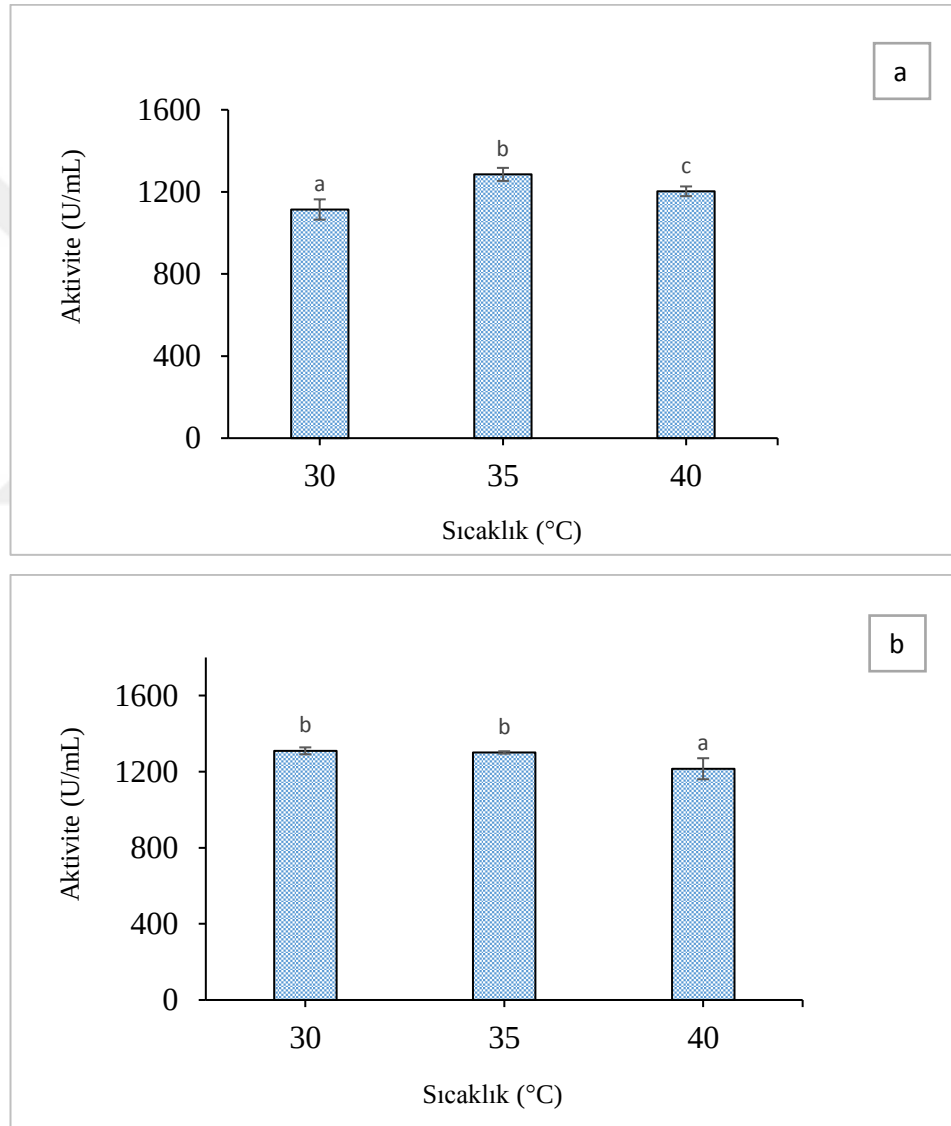
Tablo 4.5. Mercimek unu kullanılan ortamda pH'ya bağlı bakteri gelişimi

pH	Mikrobiyal Gelişme (OD ₆₀₀)	
	24. sa	48. sa
5	3,037±0,31 ^{ab}	4,990±0,23 ^c
6	2,990±0,29 ^{ab}	4,890±0,10 ^c
7	3,440±0,37 ^{bc}	4,100±0,22 ^b
8	3,607±0,09 ^c	4,827±0,21 ^c
9	2,813±0,21 ^a	3,283± 0,07 ^a

a-c: Aynı sütunda yer alan örnekler arasındaki farkın istatistiki açıdan önemi. Aynı harfe sahip olanlar istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p < 0,05$).

4.4.2. Sıcaklığın proteaz üretimine ve mikrobiyal gelişime etkisi

Proteaz üretim çalışmaları üç farklı ortam sıcaklığında (30, 35 ve 40°C) gerçekleştirilmiştir. Maya özütü içeren ortamda gelişen izolattan alınan örnekler 24. saatte sıcaklığa bağlı olarak sırasıyla $1114 \pm 49,5$ U/mL, $1285 \pm 31,8$ U/mL ve $1203 \pm 23,7$ U/mL aktivite göstermiştir (Şekil 4.10.a.). İnkübasyonun 48. saatinde ise proteaz aktivitesi sırasıyla %17,5; 1,2 ve 1 artmıştır (Şekil 4.10.b.).



Şekil 4.10. Maya özütü ile hazırlanan besiyerinde sıcaklığa bağlı proteaz aktivitesi. a) 24. sa; b) 48. sa. a-b: Aynı grafikte yer alan örnekler arasındaki fark istatistiki açıdan önemlidir ancak aynı harfe sahip olanlar istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p < 0,05$).

Tablo 4.6.'da gösterildiği gibi 30°C sıcaklıkta inoküle edilen izolatta minimum bakteri gelişimi gerçekleşmiş ancak maksimum proteaz aktivitesi tespit edilmiştir.

Duncan Çoklu Karşılaştırma Testine göre sıcaklık değerlerinin ortalamalar arasında önemli bir fark oluşturduğu belirlenmiştir ($p<0.05$).

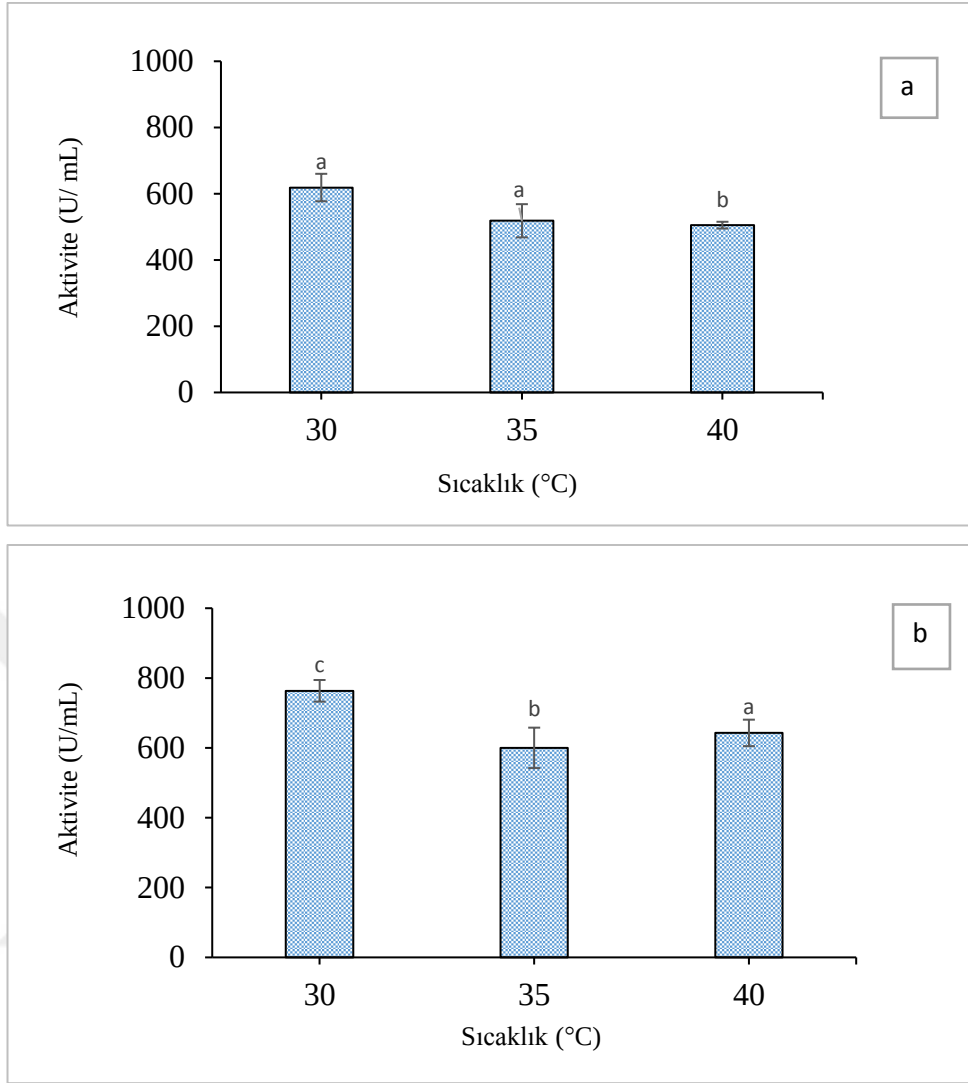
Tablo 4.6. Farklı sıcaklık değerlerinde maya özütü içeren besiyerinde bakteri gelişimi

Sıcaklık (°C)	Mikrobiyal Gelişme (OD ₆₀₀)	
	24. sa	48. sa
30	4,767±0,14	3,170±0,20
35	3,543±0,26	4,100±0,17
40	3,013±0,13	4,200±0,10

Sarımercimek unu içeren ortamda gelişen izolattan alınan örnekler 24. saatte sırasıyla 619±41,5 U/mL, 518±50,2 U/mL ve 505±10,2 U/mL aktivite elde edilmiştir (Şekil 4.11.a). İnkübasyonun 48. saatinde proteaz aktivitesi sırasıyla %23,3; 15,8 ve 27,3 artmıştır (Şekil 4.11.b.).

Farklı sıcaklıklarda inoküle edilen *Bacillus subtilis* ZBP4, maksimum bakteri gelişimini 30°C sıcaklıkta göstermiştir (Tablo 4.7.). Enzim aktivitesinin ve mikrobiyal gelişiminin 30°C'nin üstündeki sıcaklıklarda azalması, izolatin optimum sıcaklığının 30°C olduğuna işaret etmiştir.

Duncan Çoklu Karşılaştırma Testine göre ortalamalar arasında sıcaklığın önemli bir fark oluşturduğu belirlenmiştir ($p<0.05$).



Şekil 4.11. Sarımercimek unu ile hazırlanan besiyerinde sıcaklığa bağlı proteaz aktivitesi. a) 24. sa; b) 48. sa. a-b: Aynı grafikte yer alan örnekler arasındaki fark istatistiki açıdan önemlidir ancak aynı harfe sahip olanlar istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p < 0,05$).

Tablo 4.7. Farklı sıcaklık değerlerinde sarımercimek unu içeren besiyerindeki bakteri gelişimi

Sıcaklık (°C)	Mikrobiyal Gelişme (OD ₆₀₀)	
	24. sa	48. sa
30	2,777±0,23 ^a	4,310±0,04 ^b
35	3,440±0,37 ^{bc}	4,100±0,22 ^{bc}
40	3,747±0,15 ^c	2,887±0,21 ^a

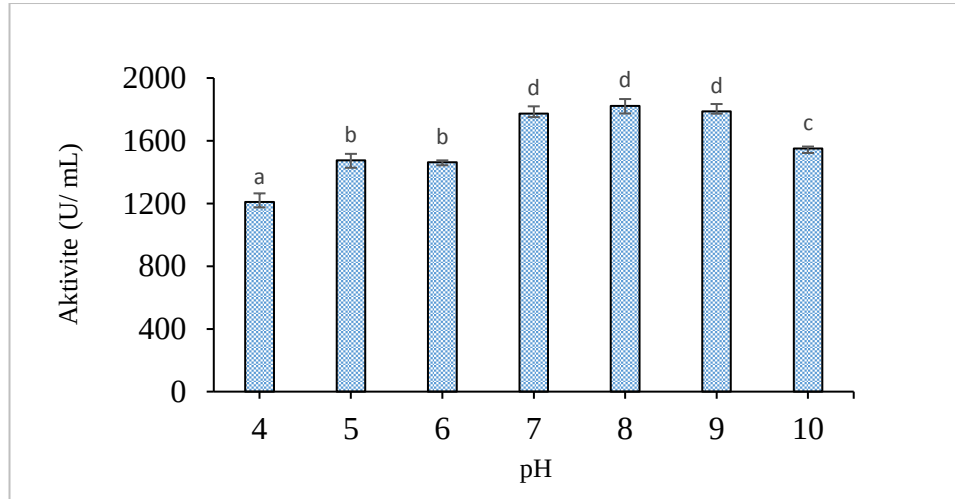
a-c: Aynı sütunda yer alan örnekler arasındaki farkın istatistiki açidan önemi. Aynı harfe sahip olanlar istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p < 0,05$).

4.5. Enzimin Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi

4.5.1. Proteaz enziminin optimum pH'sının belirlenmesi

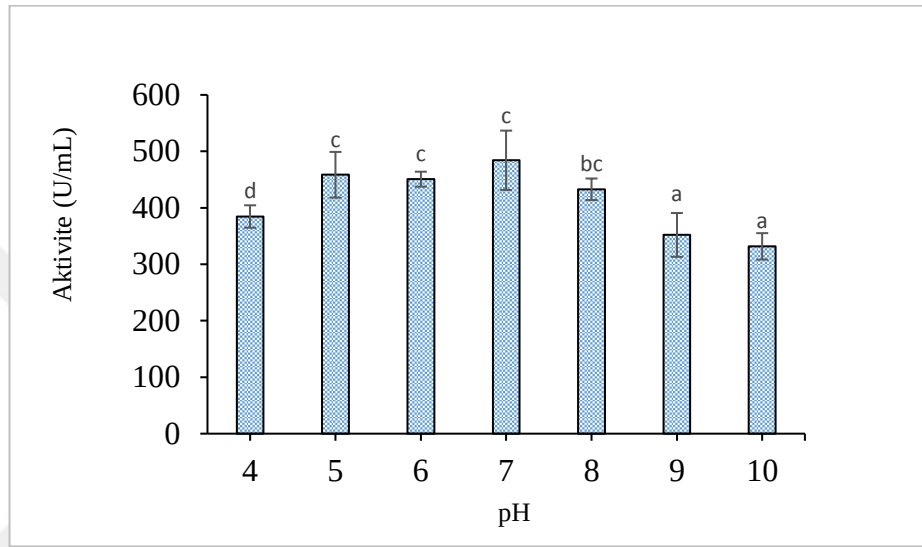
Bacillus subtilis ZBP4 suşu tarafından üretilen proteazın optimum pH'sının belirlenmesi için izolat, maya özütü ve mercimek unu ile hazırlanan iki farklı besiyerinde 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Optimum pH'nın belirlenmesinde pH 4 ve 5 için 100 mM Sodyum asetat tamponu, pH 6 için 100 mM Sodyum sitrat tamponu, pH 7 ve 8 için 100 mM Tris-HCl tamponu, pH 9 ve 10 için 100 mM Karbonat bikarbonat tamponları hazırlanmış %1'lik (a/h) kazein substratı ile enzim inkübe edilmiştir.

Maya özütüyle inkübe edilen izolatın aktivitesi sırasıyla $1209 \pm 34,0$ U/mL, $1474 \pm 46,7$ U/mL, $1462 \pm 18,2$ U/mL, $1772 \pm 21,4$ U/mL, $1823 \pm 49,0$ U/mL, $1787 \pm 14,8$ U/mL, $1550 \pm 27,8$ U/mL olarak belirlenmiştir ve izolatın maksimum aktivite gösterdiği pH değeri 8 olarak ölçülmüştür (Şekil 4.12.). Ancak Duncan Çoklu Karşılaştırma Testine göre pH 7, 8 ve 9 ortamlarında önemli bir fark tespit edilmemiştir ($p < 0,05$).



Şekil 4.12. Farklı pH değerlerinde maya özütü içeren besiyerinin proteaz aktivitesi, 48. sa. a-d: Aynı grafikte yer alan örnekler arasındaki fark istatistiki açıdan önemlidir ancak aynı harfe sahip olanlar istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p < 0,05$).

Mercimek unuyla inkübe edilen izolatın aktivitesi pH 4, 5, 6, 7, 8, 9 ve 10 tamponlarında sırasıyla $385 \pm 19,8$ U/mL, $459 \pm 40,5$ U/mL, $451 \pm 13,3$ U/mL, $484 \pm 52,5$ U/mL, $433 \pm 19,1$ U/mL, $352 \pm 38,9$ U/mL, $332 \pm 23,4$ U/mL olarak belirlenmiş ve izolatın maksimum aktivite gösterdiği pH değeri 7 olarak ölçülmüştür (Şekil 4.14.). Ancak Duncan Çoklu Karşılaştırma Testine göre pH 5, 6, 7 ve 8 ortamlarında önemli bir fark tespit edilmemiştir ($p < 0,05$).



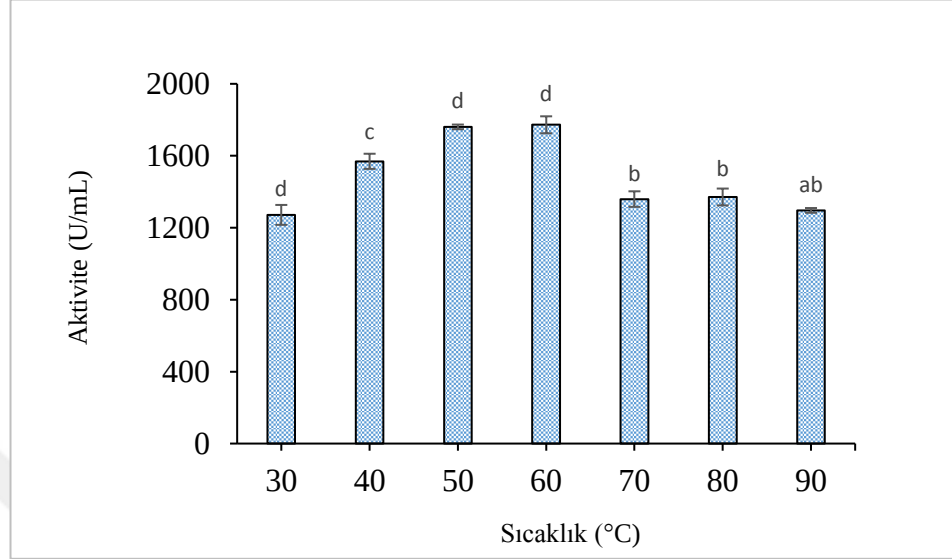
Şekil 4.13. Farklı pH değerlerinde sarımercimek unu içeren besiyerinin proteaz aktivitesi, 48. sa. a-d: Aynı grafikte yer alan örnekler arasındaki fark istatistiki açıdan önemlidir ancak aynı harfe sahip olanlar istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p < 0,05$).

4.5.2. Proteaz enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi

Bacillus subtilis ZBP4 suşu tarafından üretilen proteazın optimum sıcaklığının belirlenmesi için izolat, maya özütü ile hazırlanan besiyerinde 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Optimum sıcaklığın belirlenmesinde 100 mM Tris-HCl pH 8 tamponu ile hazırlanmış %1'lik (a/h) kazein substratı ile seçilen 7 farklı sıcaklıkta (30, 40, 50, 60, 70, 80 ve 90 °C) inkübe edilerek reaksiyon gerçekleştirilmiştir.

Seçilen sıcaklıklarda izolatın sırasıyla $1271 \pm 55,3$ U/mL, $1569 \pm 42,1$ U/mL, $1761 \pm 13,0$ U/mL, $1772 \pm 47,2$ U/mL, $1359 \pm 43,2$ U/mL, $1371 \pm 46,8$ U/mL ve $1296 \pm 13,2$ U/mL aktivite gösterdiği ve 60°C sıcaklıkta proteaz aktivitesinin maksimuma ulaştığı tespit edilmiştir (Şekil 4.15.).

Duncan Çoklu Karşılaştırma Testine göre ortalamalar arasında sıcaklık değişiminin önemli bir fark oluşturduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$).



Şekil 4.2. Farklı sıcaklık değerlerinde maya özütü içeren besiyerinin proteaz aktivitesi, 48. sa. a-d: Aynı grafikte yer alan örnekler arasındaki fark istatistiki açıdan önemlidir ancak aynı harfe sahip olanlar istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p<0,05$).

BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada *Bacillus subtilis* ZBP4 suşu tarafından hücre dışı proteaz enzimi üretimi araştırılarak enzim üretimini ve mikrobiyal gelişmeyi etkileyen parametreler incelenmiştir. Enzim aktivitesinin belirlendiği tüm çalışmalarda bakteri gelişimi sonucunda elde edilen hücresiz sıvı (süpernatant) kullanılmıştır.

Bakteriyel koloniler SMA besiyerinde proteolitik etkinlikleri açısından taranmakta ve proteolitik aktiviteye sahip olan kolonilerin çevresinde belirgin bir şekilde berrak bir bölge oluşmaktadır. Buna dayanarak, *Bacillus subtilis* ZBP4 suşu da proteolitik etkinliğin belirlenmesi için SMA besiyerinde inkübe edilmiştir. Kolonilerin çevresinde berrak bir bölge oluşmasıyla incelenen suş proteaz üreticisi organizma olarak tanımlanmıştır ve elde edilen sonuç Şekil 4.1.'de verilmiştir. Saggu ve Mishra (2017) tarafından yapılan çalışmada *Bacillus infantis* SKS1 suşunun alkalın proteaz üretebilme yeteneğinin tanımlanması için, bakteri suşu SMA Petrilerinde 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Petrilerin üzerinde berrak bölge oluşturan bakteriyel koloniler izole edilmiştir. Bazı çalışmalarda SMA bileşiminde modifikasyonlar yapılarak proteolitik etkinlik incelenmiştir. Marathe ve ark. (2018), SMA bileşimini %5 yağsız süt tozu, %0,25 pepton, %0,5 maya özütü, %1 glukoz, %2,5 agar ile hazırlayarak hücre dışı alkalın proteaz üretiminin gerçekleştiği hidroliz bölgelerini gözlemlemiştir.

Kültür koşulları maksimum enzim üretimi için optimize edilmiştir. Yapılan çalışmada *Bacillus subtilis* ZBP4 suşu öncelikle bazal besiyerine inoküle edilmiştir. Maya özütü (5 g/L), kazein (5 g/L), glukoz (5 g/L), K₂HPO₄ (1 g/L), NaCl (1 g/L), MgSO₄.7H₂O (0,1 g/L) ve pH 7 bazal besiyeri faktörleri olarak tanımlanmıştır. Bu ortamda proteaz enziminin üretimi incelenmiştir. İnkübasyon süresine bağılı olarak enzim aktivitesinin %37,35 artışla 1206 U/mL aktiviteye ulaştığı gözlemlenmiştir. İbrahim ve ark. (2015) tarafından yapılan benzer bir çalışmada *Bacillus sp.* NPST-AK15 suşundan alkalın

proteazın üretim ortamına maya özütü (7,5 g/L), fruktoz (20 g/L), K₂HPO₄ (1 g/L), NaCl (50 g/L), Mg₂SO₄.7H₂O (0,2 g/L), Na₂CO₃ (10 g/L) eklenmiştir ve pH 10,5'e ayarlanmıştır. Spesifik enzim aktivitesinin 469,4 U/mg olduğu belirlenmiştir. Başka bir çalışmada Farhadian ve ark. (2015) *B. subtilis* DR8806 suşuyla proteaz enzimi üretmiştir. Kullanılan besiyeri a/h cinsinden süktroz (%1), maya özütü (%1), pepton (%0,5), NaCl (%0,5), K₂HPO₄ (%0,1), Mg₂SO₄.7H₂O (%0,2) bileşenlerinden oluşmuştur.

Bacillus sp. tarafından üretilen proteaz enzimleri için gerekli karbon kaynağı incelendiğinde glukozun enzim aktivitesi üzerinde olumlu etki gösterdiğini bildiren çalışmalara rastlanmaktadır. Nadeem ve ark. (2008) glikozun *B. licheniformis* N2 için proteaz üretmesi için en iyi kaynak olarak bulunduğu, proteaz üretimindeki artışın glikoz ilavesinin bir sonucu olduğunu göstermişlerdir. Boominadhan ve Rajakumar (2009) farklı atıklardan izole ettikleri *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus megaterium* ve *Bacillus licheniformis* izolatlarının proteaz enzimi üretiminde en uygun karbon kaynağını araştırmıştır. Farklı kaynaklar arasından glukozun dört *Bacillus* izolatı için de en iyi karbon kaynağı olduğunu göstermişlerdir.

Hücre gelişmesi ve proteaz üretimi için azot kaynakları önemli bir ortam bileşenidir. Yapılan çalışmada azot kaynaklarının proteaz üretimi üzerindeki etkisi incelenmiş ve mercimek unu, soya unu, maya özütü içeren ortamlarda hücre yoğunluğunun arttığı, dolayısıyla proteaz aktivitesinin de arttığı tespit edilmiştir. Hücre gelişmesi ve hücre dışı proteaz üretimi arasındaki ilişkiyi araştıran Rachadech ve ark. (2010), karbon ve azot kaynaklarının optimizasyonunda maya ekstraktının hem hücre gelişmesini hem de proteaz üretimini desteklemek için önemli bir ortam bileşeni olduğunu ortaya koymuştur. Bu çalışmada, maya özütü konsantrasyonlarının *Bacillus subtilis* ZBP4 suşu tarafından üretilen proteaz enzimine önemli derecede etkisi olduğunu belirleyen çalışmalar bulunmaktadır. Benzer bir çalışmada, Cheong ve ark. (2013) tarafından *Bacillus subtilis* için en uygun azot kaynağı olduğu bulunmuş ve maya özütü konsantrasyonları optimize edilmiştir. Ortama maya özütü ekendiğinde proteaz aktivitesi 170,57±6,75 U/mL'den (kontrol) 253,143±56,81 U/mL'ye artış göstermiştir. Maya ekstraktı konsantrasyonları araştırılmış ve %3 (a/h) maya

ekstraktının, proteaz üretimini arttırmak için enzim aktivitesinde %33'lük bir artışla etkili konsantrasyon olduğu tespit edilmiştir. Anbu (2013) tarafından yapılan çalışmada proteaz üreten toplam 18 bakteri suşu Güney Kore'de SMA besiyeri kullanılarak deterjan atıklarından izole edilmiştir. Aralarından (BK-P21A) suşu seçilmiş ve *Bacillus koreensis* olarak tanımlanmıştır. Proteaz üretimi için organik azot kaynakları olarak pamuk tohumu unu, jelatin, yağsız süt, buğday unu ve maya özütü kullanılmıştır. Değerlendirilen azot kaynakları arasında maya özütü ortama eklendiğinde proteaz üretiminin en iyi olduğu anlaşılmıştır.

Bazı araştırmalarda ise soya ununun hem hücre gelişmesinde hem de proteaz üretiminde önemli bir ortam bileşeni olduğu belirlenmiştir. Joo ve Chang (2005) tarafından yapılan çalışmada *Bacillus sp.* I-312 izolatı, Chu (2007) tarafından yapılan çalışmada *Bacillus sp.* APP1 izolatı kullanılarak üretilen proteaz enzimleri için organik azot kaynakları test edilmiştir. Aralarından soya unu, izolatların üretim kabiliyeti üzerinde belirgin bir etki göstermiştir ve bazal besiyerine %1,5 (a/h) konsantrasyonda eklendiğinde daha yüksek proteaz verimi elde edilmiştir. Singh ve Bajaj (2015) tarafından yapılan çalışmada 10 farklı azot kaynağı arasında proteaz üretimini arttıran kaynak soya unu olmuştur. Ayrıca bu çalışmada soya unu ile katkılanan bazal besiyerinde glukoz varlığı ve yokluğu *Bacillus subtilis* ZBP4 suşunun proteaz üretimini etkilemiştir. Benzer şekilde Patel ve ark. (2019) yaptığı çalışmada glukoz yokluğunda soya ununun tek başına proteaz üretiminde yeterli olmadığını ancak %1 konsantrasyona kadar proteaz üretiminin arttığını gözlemlemişlerdir. Optimum konsantrasyondan daha fazla eklenen glukozun ise proteaz üretimini baskılayabileceği vurgulanmıştır.

Yapılan çalışmada *Bacillus subtilis* ZBP4 suşunun geliştirileceği ortama mercimek ununun eklenmesiyle $863 \pm 21,4$ U/mL proteaz aktivitesi elde edilmiştir. Organik azot kaynağı olarak kullanılan mercimek unu bazal besiyerine farklı konsantrasyonlarda eklenerek optimizasyon çalışması yapılmıştır. Konsantrasyon arttırıldığında zamana ve mikrobiyal gelişime bağlı olarak aktivitenin arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada mercimek unu ile katkılanan bazal besiyerinde glukoz varlığı ve yokluğu *Bacillus subtilis* ZBP4 suşunun proteaz üretimini etkilemiştir.

Çalışmada ayrıca *Bacillus subtilis* ZBP4 suşunun en uygun gelişme koşulları da araştırılmıştır. Fiziksel parametreler olarak sıcaklık ve pH değerlendirilmiştir. Hem maya özütü içeren besiyerinde hem de mercimek unu içeren besiyerinde izolatın pH 9'da ve 30°C sıcaklıkta en iyi geliştiği belirlenmiştir. Kalwasínska ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmada *Bacillus luteus* H11 için en uygun gelişme koşullarının pH 9 ve 30°C sıcaklık olduğu bildirilmiştir. Benzer bir çalışmada Joo ve Chang (2005), gelişme sıcaklığının proteaz üretimine etkisi incelenmiş ve *Bacillus sp.* I-312 için optimum gelişme sıcaklığı 32°C olarak belirlenmiştir. Mothe ve Sultanpuram (2016) pH 9'da 37°C sıcaklıkta optimum proteaz üretimi gerçekleştirmiştir. Das ve Prasad (2010), *Bacillus subtilis* tarafından üretilen proteazın 37°C sıcaklıkta pH 8'de optimum olduğunu vurgulamıştır.

Azot kaynaklarından maya özütü veya mercimek unu kullanılarak incelenen proteaz aktivitesinde pH ve sıcaklığın etkisi araştırılmıştır. Yapılan çalışmada maya özütü kullanıldığında pH 9'da, mercimek unu kullanıldığında pH 7'de optimum proteaz aktivitesi elde edilmiştir. Proteaz aktivitesine sıcaklığın etkisi incelendiğinde ise 60°C sıcaklıkta optimum aktiviteye ulaşılmıştır. Setyorini ve ark. (2006) tarafından *Bacillus subtilis* FP-133 suşundan hücre dışı proteazlar sentezlenmiş ve optimum proteaz aktivitesi pH 7,5 ve 8'de elde edilmiştir. Anandharaj ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada *Bacillus alkalitelluris* TWI3 izolatının ürettiği proteaz enzimi de en yüksek aktiviteye 60°C sıcaklıkta ulaşmıştır. Benzer bir çalışmada Rekik ve ark. (2018) tarafından rapor edilen *Bacillus safensis* RH12, Mothe ve Sultanpuram (2016) tarafından rapor edilen en yüksek proteaz aktivitesine pH 8'de ve 60°C sıcaklıkta ulaşmıştır. Gomaa ve ark. (2013) tarafından yapılan çalışmada *Bacillus pumillus* izolatından üretilen proteaz 50°C sıcaklıkta maksimum aktiviteye sahip olmuştur.

Proteaz üretimi reaksiyonu başlangıçta bazal besiyerinde gerçekleştirilerek spektrofotometrik olarak absorbans 1206 U/mL ölçülmüştür. İzolat 20 g/L konsantrasyona kadar glukozu kullanarak enzim üretimini arttırdığı için besiyerinde kullanılan konsantrasyon yüzdesi arttırılabilir. Ayrıca çeşitli azot kaynakları araştırılarak mikrobiyal gelişime buna bağlı olarak proteaz üretimine etkisinin olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada sarımercimek unu, soya unu ve maya özütünün etkisi en

yüksek olmuştur. Bu bileşenlerin ucuz, kolay bulunabilir ve istenilen üretim hacmini gerçekleştirebilme kapasitesi ile daha ileriki çalışmalarda önem kazanacağı düşünülmektedir. Enzimin bazı özellikleri belirlendikten sonra çalışmanın ilerletilmesi halinde endüstriyel potansiyele sahip olacağı, geniş uygulama alanlarında kullanılacağı düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

- Abdel-Naeem, H.H., Mohamed, H.M. 2016. Improving the Physico-chemical and Sensory Characteristics of Camel Meat Burger Patties Using Ginger Extract and Papain. *Meat Sci.* 118, 52-60.
- Adrio, J.L., Demain, A.L. 2014. Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes. *Biomolecules.* 4, 117-139.
- Aehle, W. 2008. Enzymes in Industry: Production and Applications. İçinde: *Industrial Enzymes.* Science. 154.
- Anandharaj, M., Sivasankari, B., Siddharthan, N., Rani, R.P., Sivakumar, S. 2016. Production, Purification, and Biochemical Characterization of Thermostable Metallo-Protease from Novel *Bacillus alkalitelluris* TWI3 Isolated from Tannery Waste. *Appl Biochem Biotechnol.* 178(8):1666-86.
- Anbu P. 2013. Characterization of Solvent Stable Extracellular Protease from *Bacillus koreensis* (BK-P21A). *Int J Biol Macromol.* 56: 162-168.
- Annamalai, N., Rajeswari, M.V., Balasubramanian, T. 2014. Extraction, Purification and Application of Thermostable and Halostable Alkaline Protease from *Bacillus alveyuensis* CAS 5 Using Marine Wastes. *Proteins: Struct Funct Bioinf.* 92: 335–42.
- Aran, N. 2014. Gıda Biyoteknolojisi. İçinde: *Enzimlerin Gıda Endüstrisinde Uygulama Alanları.* Nobel Yayın Dağıtım. 2.basım 107-118.
- Arlington, V.A. 1984. AOAC Official Methods of Analysis. AOAC Int, 14th ed.
- Aruna, K., Shah, J., Birmole, R. 2014. Production and Partial Characterization of Alkaline Protease from *Bacillus tequilensis* Strains CSGAB0139 Isolated from Spoilt Cottage Cheese. *Int J Appl Biol Pharmaceut Technol.* 5(3): 201-221.
- Avcı, A., Çağrı-Mehmetoğlu, A., Arslan, D. 2017. Production of Antimicrobial Substances by a Novel *Bacillus* strain Inhibiting *Salmonella Typhimurium* - LWT-Food Sci Technol. 265-270.
- Bach, E., Sant'Anna, V., Daroit, D.J., Corrêa, A.P.F., Segalin, J., Brandelli, A. 2012. Production, One-Step Purification, and Characterization of a Keratinolytic Protease from *Serratia marcescens* P3. *Process Biochem.* 47(12): 2455-2462.

- Barret, A.J., Rawlings, N.D., Woessner, J.F. 1998. Handbook of Proteolytic Enzymes. Academic Press, London. 1-1666.
- Bender, S.K., Buckley, D.H., Madigan M.T., Martinko, J.M., Stahl, D.A. 2017. Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi. İçinde: Mikrobiyal Metabolizma. Palme Kitabevi. 74-82.
- Beynon, R.J., Bond, J.S. 2001. Proteolytic Enzymes: A Practical Approach, Oxford University Press, London. 1-320.
- Bindu, D.R.A., Silpa, S., Rajesh, B., Reddy, I.B. 2013. Isolation and Identification of A Novel Strain *Bacillus stratosphericus* DF Producing Alkaline Protease and Optimization of Enzyme Production. Int J Sci Eng Res. Volume 4, Issue 11.
- Blanco, A.S., Durive, O.P., Pérez, S.B., Montes, Z.D., Guerra, N.P. 2016. Simultaneous Production of Amylases and Proteases by *Bacillus subtilis* in Brewery Wastes. Braz. J. Microbiol. 47; 665–674.
- Boer, C.G., Peralta, R.M. 1999. Production of Extracellular Protease by *Aspergillus tamarii*, J. Basic Microbiol. 40 75-81.
- Boominadhan, U., Rajakumar, R. 2009. Optimization of Protease Enzyme Production Using *Bacillus* sp. Isolated from Different Wastes. Bot. Res. Int. 2:83-87.
- Boominadhan, U., Rajakumar, R., Sivakumaar, P.K.V., Joe, M.M. 2009. Optimization of Protease Enzyme Production Using *Bacillus* sp. Isolated from Different Wastes. Bot. Res. Int. 2(2), 83-87.
- Campbell, M.K., Farrell O.S. 2011. Biochemistry. Cengage Learning; 7 edition, 139.
- Charles, J., Craik, S., Page, M.J., Madison, E.L. 2011. Proteases as Therapeutics. Biochem. 1; 435(1): 1-16.
- Cheong, J.Y., Mustafa, M., Aziz, N.A., Go, R., Adli, A.A. 2013. Enhancement of Protease Production by the Optimization of *Bacillus subtilis* Culture Medium. Malays. J. Microbiol. Vol 9(1); 43-50.
- Chew, L.Y., Toh, G.T., Ismail, A. 2018. Enzymes in Food Biotechnology: Production, Applications, and Future Prospects. 247-261.
- Chu, W.H. 2007. Optimization of Extracellular Alkaline Protease Production from Species of *Bacillus*. J Ind Microbiol Biotechnol. 34: 241-245.
- Craik, C.S., Page, M. J., Madison, E. L. 2011. Proteases as Therapeutics. Biochem J. 435(1): 1–16.

- Cuesta, S.M., Rahman, S.A., Furnham, N., Thornton, J.M. 2015. The Classification and Evolution of Enzyme Function. *Biophysical Journal*. Volume 109 Sept. 1082-1086.
- Çelik, S.Y. 2018. Çiğdem (*Crocus biflorus*) Yumrularından Proteaz Enziminin Saflaştırılması ve Saflaştırılan Enzimin Kazeinin Koagülasyonunda Kullanılabilirliğinin Araştırılması. *Gıda*. 43 (2): 231-239.
- Das, G., Prasad, M.P. 2010. Isolation, Purification & Mass Production of Protease Enzyme from *Bacillus subtilis*. *International Research J Microbiol* 026-031.
- Devanadera, M.K.P., Haw, S.O.V., Arzaga, M.J.J., Buenaflor, J.L., Gagarin, T.J.E., Vargas, A.G., Mercado, S.M., Santiago, L.A. 2016. Optimization, Production, Partial Purification and Characterization of Neutral and Alkaline Protease Produced by *Bacillus subtilis*. *J Microbiol Biotech Food Sci*. 6(2) 832-838.
- Erem F., İnan M., Certel, M. 2018. Optimisation of *Bacillus amyloliquefaciens* Fe-K1 Extracellular Peptidase Production By Response Surface Methodolog. *Trakya University Journal of Natural Sciences*. 19(2): 159-173.
- Ergene, E., Avci, A. 2018. Effects of Cultural Conditions on Exopolysaccharide Production by *Bacillus sp.* ZBP4. *Tarım Bilim Derg-J Agric Sci*. 386-393.
- Farhadian, S., Asoodeh, A., Lagzian, M. 2015. Purification, Biochemical Characterization and Structural Modeling of a Potential htrA-like Serine Protease from *Bacillus subtilis* DR8806. *J. Mol. Catal. B-Enzym*. 115, 51-58.
- Gomaa, A.M. 2018. Application of Enzymes in Brewing. *J Nutri Food Sci Forecast*. 2018; 1(1): 1002
- Gomaa, E.Z. 2013. Optimization and Characterization of Alkaline Protease and Carboxymethyl-Cellulase Produced by *Bacillus pumilus* Grown on Ficus nitida Wastes. *Braz J Microbiol*. 44, 2, 529-537.
- Gupta, R., Beg, Q.K., Lorenz, P. 2002. Bacterial Alkaline Proteases: Molecular Approaches and Industrial Applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 59(1), 15-32.
- Horwitz, W., Latimer, G.W. 2006. AOAC Official Methods of Analysis. AOAC Int, 18th ed.
- Ibrahim, A.S., Al-Salamah, A.A., El-Badawi, Y.B., El-Tayeb, M.A., Antranikian, G. 2015. Detergent, Solvent and Salt-Compatible Thermoactive Alkaline Serine Protease from Halotolerant Alkaliphilic *Bacillus sp.* NPST-AK15: Purification and Characterization. *Extremophiles*. 19: 961-971.
- Illanes, A. 2008. Enzyme Biocatalysis. İçinde: Catalysis and Biocatalysis. Springer, Netherland, USA. 1-3.

- Jarpa-Parra M. 2017. Lentil Protein: A Review of Functional Properties and Food Application. J. Food Sci. Technol. Volume 53, Issue 4.
- Jaswal, R.K., Kocher, G.S., Virk, M.S. 2008. Production of Alkaline Protease by *Bacillus circulans* Using Agricultural Residues: A Statistical Approach. Indian J Biotech. 7: 356-360.
- Jian, S., Wenyi, T., Wuyong, C. 2011. Kinetics of Enzymatic Unhairing by Protease in Leather Industry. J Clean Prod 19: 325-31.
- Jiang, L., Song, X., Li, Y., Xu, Q, Pu J., Huang, H., Zhong, C. 2018 Programming Integrative Extracellular and Intracellular Biocatalysis for Rapid, Robust and Recyclable Synthesis of Trehalose. ACS Catalysis. 8(3).
- Joo, H.S., Chang, C.S. 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.
- Kalwasińska, A., Jankiewicz, U., Felföldi, T., Burkowska-But, A., Brzezinska, S.M. 2018. Alkaline and Halophilic Protease Production by *Bacillus luteus* H11 and Its Potential Industrial Applications. Food Technol. Biotechnol. 56 (4) 553-561.
- Lakshmi, B.K.M., Hemalatha K.P.J. 2016. Production of Alkaline Protease from *Bacillus licheniformis* through Statistical Optimization of Growth Media by Response Surface Methodology. Ferment Technol 5: 130.
- Law B.A., Tamime A.Y. 2010. Technology of Cheesemaking. 2nd ed. Wiley-Blackwell. 1-512.
- Liu, J., Zhou, J., Wang, L., Ma, Z., Zhao, G., Ge, G., Zhu, H., Qiao, J. 2017. Improving Nitrogen Source Utilization from Defatted Soybean Meal for Nisin Production by Enhancing Proteolytic Function of *Lactococcus lactis* F44. Sci Rep. 7: 6189.
- Marathe, S.K., Vashistht, M.A., Prashanth, A., Parveen, N., Chakraborty, S., Nair, S.S. 2018. Isolation, Partial Purification, Biochemical Characterization and Detergent Compatibility of Alkaline Protease Produced by *Bacillus subtilis*, *Alcaligenes faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* Obtained from Sea Water Samples. J. Genet. Eng. Biotechnol.16;39-46.
- Mothe, T., Sultanpuram, V.R. 2016. Production, Purification and Characterization of a Thermotolerant Alkaline Serine Protease from a Novel Species *Bacillus caseinilyticus*. 3 Biotech. 6(1):53.
- Motyan, J.A., Ferenc, T., Jozsef, T. 2013. Research Application of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology. Biomolecules. 923-942.

- Nadeem, M., Qazi, J.I., Baig, S. 2010. Enhanced Production of Alkaline Protease by a Mutant of *Bacillus licheniformis* N-2 for Dehairing. Braz. Arch. Biol. Technol. 53; 5.
- Nadeem, M., Qazi, J.I., Syed, Q., Gulsher, M. 2013. Purification and Characterization of an Alkaline Protease from *Bacillus licheniformis* UV-9 for Detergent Formulations. J. Sci. Technol. 35 (2), 187-195.
- Oliver G. 2011. The Oxford Companion to Beer. 1st ed. Oxford University Press.
- Patel, R.A., Mokashe, U.N., Chaudharia, D.S., Jadhav, G.A., Patil, U.K. 2019. Production Optimisation and Characterisation of Extracellular Protease Secreted by Newly Isolated *Bacillus subtilis* AU-2 Strain Obtained from *Tribolium Castaneum* Gut. Biocatal Agric Biotechnol. Volume 19, 101122.
- Posovszky, C. 2016. Congenital Intestinal Diarrhoeal Diseases: A Diagnostic and Therapeutic Challenge. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 30: 187-211.
- Prakasham, R.S., Rao, C.S., Sarma, P.N. 2006. Green Gram Husk-An Inexpensive Substrate for Alkaline Protease Production by *Bacillus sp.* in Solid-state Fermentation. Bioresour Technol. 97: 1449-1454.
- Rachadech, W., Navacharoen, A., Ruangsit, W. 2010. An Organic Solvent-, Detergent and Thermostable Alkaline Protease from the Mesophilic, Organic Solvent-Tolerant *Bacillus licheniformis* 3C5. Microbiology. 79: 620-9.
- Raga, D., Bindu, A., Silpa, S., Rajesh, B., Reddy, I.B. 2013. Isolation and Identification of A Novel Strain *Bacillus stratosphericus* DF Producing Alkaline Protease and Optimization of Enzyme Production. Int J Sci Eng Res. Volume 4, Issue 11.
- Rai, M., Pandit, R., Gaikwad, S., Kövics, G. 2016. Antimicrobial Peptides as Natural Bio-Preservative to Enhance the Shelf-Life of Food. J Food Sci Technol. 53(9): 3381-3394.
- Raj, T., Nikhil, S., Savitri, Bhalla T.C. 2017. Bacterial Serine Proteases: Computational and Statistical Approach to Understand Temperature Adaptability. J Proteomics Bioinform. 10: 329-334.
- Raju, R.M., Goldberg, A.L., Rubin, E.J. 2012. Bacterial Proteolytic Complexes As Therapeutic Targets. Nat. Rev. Drug Discov. 11, 777-789.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V. 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62(3), 597–635.

- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., Bateman, A. 2012. MEROPS: The Database of Proteolytic Enzymes, Their Substrates and Inhibitors. *Nucleic Acids Res.* 40, D343-D350.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., Finn, R. 2016. Twenty Years of the MEROPS Database of Proteolytic Enzymes, Their Substrates and Inhibitors. *Nucleic Acids Res.* Vol. 44, 343-350.
- Rekik, H., Jaouadi, N.Z., Gargouri, F., Bejar W., Frikha F., Jmal N., Bejar S., Jaouadi B. 2018. Production, Purification and Biochemical Characterization of a Novel Detergent-Stable Serine Alkaline Protease from *Bacillus safensis* Strain RH12. *Int J Biol Macromol.* 121: 1227-1239.
- Robinson, P.K. 2015. Enzymes: Principles and Biotechnological Applications. *Essays Biochem.* 59, 1-41.
- Saggu, S.K., Mishra, P.C. 2017. Characterization of Thermostable Alkaline Proteases from *Bacillus infantis* SKS1 Isolated from Garden Soil. *PLoS One.* 12(11): e0188724
- Saravanamuthu, R., Dubey, R.C., Maheshwari, D.K. 2010. Industrial Exploitation of Microorganisms. I.K. International Publishing House. 227-235.
- Sarker, P.K., Talukdar, S.A., Deb, P.S.M., Mohsina, K. 2013. Optimization and Partial Characterization of Culture Conditions for the Production of Alkaline Protease from *Bacillus licheniformis* P003. *SpringerPlus.* 2: 506.
- Schallmeyer, M., Singh, A., Ward, O.P. 2004. Developments in the Use of *Bacillus* Species for Industrial Production. *Can J Microbiol.* 50: 1-17.
- Sepahy, A.A., Jabalameli, L. 2011. Effect of Culture Conditions on the Production of an Extracellular Protease by *Bacillus sp.* Isolated from Soil Sample of Lavizan Jungle Park. *Enzyme Res.* 219628, 7.
- Setyorini, E., Takenaka, S., Murakami, S., Aoki, K. 2006. Purification and Characterization of Two Novel Halotolerant Extracellular Proteases from *Bacillus subtilis* strain FP-133. *Biosci Biotechnol Biochem.* 70(2): 433-40.
- Shah, M.A., Mir, S.A., Paray, M.A. 2014. Plant Proteases As Milk-Clotting Enzymes in Cheesemaking: A Review. *Dairy Sci. & Technol.* 94: 5-16.
- Sharma, K.M., Kumar, R., Panwar, S., Kumar, A. 2017. Microbial Alkaline Proteases: Optimization of Production Parameters and Their Properties. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 15: 115-126.

- Shu, G., Zhang, Q., Chen, H., Wan, H., Li, H. 2015. Effect of Five Proteases Including Alcalase, Flavourzyme, Papain, Proteinase K and Trypsin on Antioxidative Activities of Casein Hydrolysate from Goat Milk. *Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food Techn.* 67 Vol. XIX, no. 2.
- Si, J.B., Jang, E.J., Charalampopoulos, D., Wee, Y.J. 2018. Purification and Characterization of Microbial Protease Produced Extracellularly from *Bacillus subtilis* FBL-1. *Biotech Bioproc E.* 23(2): 176-182.
- Singh, R., Mittal, A., Kumar, M., Mehta, P.K. 2016. Microbial Proteases in Commercial Applications. *J Pharm Chem Biol Sci.* 4(3): 365-374.
- Singh, S., Bajaj, B.K. 2015. Medium Optimization for Enhanced Production of Protease with Industrially Desirable Attributes from *Bacillus subtilis* K-1. *Chem. Eng. Commun.* 202: 1051-1060.
- Smith, J. E. 2004. *Biotechnology*. Cambridge University Press; 4 ed.
- Srilakshmi, J., Madhavi, J., Lavanya, S., Ammani, K. 2015. Commercial Potential of Fungal Protease: Past, Present and Future Prospects. *Int. J. Pharm. Chem. Biol. Sci.* 2(4):218-234
- Suberua, Y., Akandea, I., Samuela, T., Lawalb, A., Olaniran, A. 2019. Optimization of Protease Production in Indigenous *Bacillus* Species Isolated from Soil Samples in Lagos, Nigeria Using Response Surface Methodology. *Biocatal Agric Biotechnol.* 18; 101011.
- Sumantha, A., Larroch, C., Pandey, A. 2006. Microbiology and Industrial Biotechnology of Food-Grade Proteases. *Food Technol. Biotechnol.* 44 (2) 211-220.
- Sun, Q., Zhang, B., Jiang, Z.Q. 2016. Comparative Analysis on the Distribution of Protease Activities Among Fruits and Vegetable Resources. *Food Chem.* 213; 708-713.
- Sutiono, S. 2016. Enzyme Engineering of a Haloacid Dehalogenase-Like Phosphatase from *Thermotoga neopolitana* for Optimization of Substrate Specificity. Lund University, Faculty of Engineering, Division of Biotechnology, Master Thesis.
- Takenaka, S., Lim, L., Fukami, T., Yokota, S., Doi, M. 2019. Isolation and Characterization of an Aspartic Protease able to Hydrolyze and Decolorize Heme Proteins from *Aspergillus glaucus*. *J Sci Food Agric* 99: 2042–204.
- Tanabe, S., Arai, S., Watanabe, M. 1996. Modification of Wheat Flour with Bromelain and Baking Hypoallergenic Bread with Added Ingredients. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60(8): 1269-72.

- Tavano, O.L., Berenguer-Murcia, A., Secundo, F., Fernandez-Lafuente R. 2018. Biotechnological Applications of Proteases in Food Technology. Compr Rev Food Sci F. Vol.17.
- Tennalli, G., Udupudi, B., Naik, P. 2012. Isolation of Proteolytic Bacteria and Characterization of their Proteolytic Activity. Int J Adv Eng Sci Tech. 2(3).
- Tipton, K., Boyce, S. 2001. History of Enzyme Nomenclature System. Bioinformatics. 16;34-40.
- Tolan, M. 2015. Mikrobiyal Kökenli Proteaz Üretimi, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Topkaya, Ş., Ertunç, F. 2018. Bitki Patojeni Virüslerde Proteaz Tipleri ve Fonksiyonlar. S.Ü. Fen Fakültesi Fen Dergisi. 44 (2): 175-186.
- URL-1, www.fao.org/biotech/fao-statement-on-biotechnology/en/. Erişim Tarihi: 03.10.2017.
- URL-2, www.mordorintelligence.com/industry-reports/proteases-market/. Erişim Tarihi: 24.04.2019.
- Vijay, K.E., Srijana, M., Kiran, K.K., Harikrishna, N., Reddy, G. 2011. A Novel Serine Alkaline Protease from *Bacillus Altitudinis* GVC11 and its Application as a Dehairing Agent. Bioprocess Biosyst Eng. 34, 403-409.
- Waites, M.J., Morgan, N.L., Rockey, J.S., Higton, G. 2014. Industrial Microbiology: An Introduction. 46-92.
- Wang, X.C., Zhao, H.Y., Liu, G., Cheng, X.J., Feng, H. 2016. Improving Production of Extracellular Proteases by Random Mutagenesis and Biochemical Characterization of A Serine Protease in *Bacillus subtilis* S1-4. Genet Mol Res. 17;15(2).
- Wouters, A.G.B., Rombouts, I., Fierens, E., Brijs, K., Delcour, J.A. 2016. Relevance of The Functional Properties of Enzymatic Plant Protein Hydrolysates in Food Systems. Compr Rev Food Sci Food Saf 15: 786–800.
- Zambare, V., Nilegaonkar, S., Kanekar, P. 2011. A Novel Extracellular Protease from *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327: Enzyme Production and Its Partial Characterization. N Biotechnol 28: 173-181.
- Zanutto-Elgui, M.R., Vieira, J.C.S., Prado, D.Z.D., Buzalaf, M.A.R., Padilha, P.M., Elgui de Oliveira, D., Fleuri, L.F. 2019. Production of Milk Peptides with Antimicrobial and Antioxidant Properties through Fungal Proteases. Food Chem. 278: 823-831.

Zhou, C., Qin, H., Chen, X., Zhang, Y., Xue, Y., Ma, Y. 2018. A Novel Alkaline Protease from Alkaliphilic *Idiomarina* sp. C9-1 with Potential Application for Eco-Friendly Enzymatic Dehairing in the Leather Industry. Sci Rep. 7;8(1): 16467.



ÖZGEÇMİŞ

Merve DEĞİRMEN 08.11.1993 tarihinde Malatya’da doğdu. İlk ve ortaöğrenimini Malatya’da tamamladıktan sonra 2011 yılında Çukurova Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü’nde lisans eğitime başladı. Lisanstan 2016 yılında mezun oldu ve 2017 yılında Sakarya Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü’nde yüksek lisans eğitime başladı. Halen bulunduğu bölümde eğitime devam etmektedir.