

**T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TEMEL VE ENDÜSTRİYEL MİKROBİYOLOJİ BİLİM DALI**

**ÇEŞİTLİ SUBSTRATLARDAN PROTEOLİTİK *BACILLUS* CİNSİ ÜYELERİNİN
İZOLASYONU, KARAKTERİZASYONU VE ALKALİ PROTEAZ
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

Umut KOVANCILAR

**Danışman
Prof. Dr. A. Üsame TAMER**



MANİSA-2018

Umut
KOVANCIAR

ÇEŞİTLİ SUBSTRATLARDAN PROTEOLİTİK *BACILLUS* CİNSİ ÜYELERİNİN
İZOLASYONU, KARAKTERİZASYONU VE ALKALİ PROTEAZ AKTİVİTELERİNİN
BELİRLENMESİ

2018

TEZ ONAYI

Umut KOVANCILAR tarafından hazırlanan " Çeşitli substratlardan proteolitik *Bacillus* cinsi üyelerinin izolasyonu, karakterizasyonu ve alkali proteaz aktivitelerinin belirlenmesi" adlı tez çalışması 27/04/2018 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri önünde Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS** olarak savunulmuş ve **oyçokluğu** / **oybirliği** ile başarılı olarak kabul edilmiştir.

Danışman

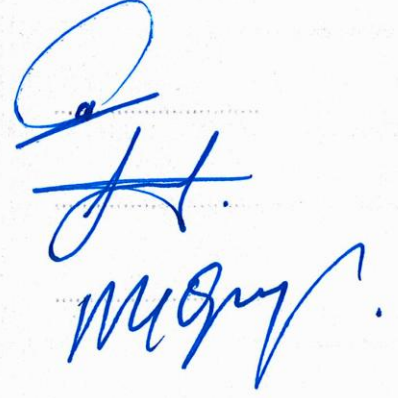
Prof. Dr. A. Üsame TAMER
Manisa Celal Bayar Üniversitesi

Jüri Üyesi

Prof. Dr. İhsan YAŞA
Ege Üniversitesi

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Mustafa OSKAY
Manisa Celal Bayar Üniversitesi



TAAHHÜTNAME

Bu tezin Celal Bayar Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde, akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Umut KOVANCILAR



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	I
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	III
ŞEKİLLER DİZİNİ	IV
TABLO DİZİNİ	V
TEŞEKKÜR	VI
ÖZET	VII
ABSTRACT	VIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Bacillus</i> Cinsinin Özellikleri.....	3
2.2. Proteaz Kaynakları.....	6
2.2.1. Bitkisel Proteaz Kaynakları.....	6
2.2.2. Hayvansal Proteaz Kaynakları.....	7
2.2.3. Mikrobiyal Proteaz Kaynakları.....	7
2.2.3.1. Bakteriyal Proteazlar.....	8
2.2.3.2. Viral Proteazlar.....	9
2.2.3.3. Fungal Proteazlar.....	9
2.3. Proteazların Sınıflandırılması.....	9
2.4. Bakteriyal Alkali Proteazlar.....	10
2.5. Alkali Proteazların Özellikleri.....	11
2.5.1. Optimum pH ve Sıcaklık.....	11
2.5.2. Stabilize Edicilerin Etkisi.....	11
2.5.3. Metal İyonlarının ve İnhibitörlerinin Etkisi.....	11
2.5.4. Substrat Spesifitesi.....	12
2.6. Alkali Proteazların Kullanım Alanları.....	12
2.6.1. Gıda Endüstrisi.....	12
2.6.2. Deterjan Endüstrisi.....	15
2.6.3. Tekstil Sanayisi.....	16
2.6.4. Endüstriyel ve Evsel Atıkların Giderilmesi.....	17
2.6.5. Fotoğraf Endüstrisi.....	17
2.6.6. Kozmatik ve İlaç Sanayisi.....	18
2.6.7. Peptit Sentezi.....	18
3. MATERYAL ve YÖNTEMLER	20
3.1. Materyal.....	20
3.1.1. Alınan Toprak Örnekleri.....	20
3.1.2. Kullanılan Ortam İçerikleri.....	22
3.1.3. Kullanılan Test Kitleri.....	23
3.1.4. Kullanılan Boyalar ve Kimyasal Çözeltiler.....	23
3.1.4.1. Kristal Violet Çözeltisi	23
3.1.4.2. Lugol	24
3.1.4.3. Safranin Solüsyonu	24
3.1.4.4. NaOH (1M) Çözeltisi.....	24
3.1.4.5. H ₂ O ₂ Çözeltisi (%3'lük).....	25
3.1.4.6. Malaşit Yeşili Solüsyonu.....	25
3.1.4.7. Metilen Mavisi Solüsyonu.....	25
3.1.4.8. FCR Solüsyonu.....	25

3.1.4.9. Trikloroasetikasit (%10'luk) Solüsyonu.....	25
3.2. Yöntemler.....	25
3.2.1. Proteaz Pozitif Bakterilerin İzolasyonu.....	25
3.2.2. İzolatların Morfolojik ve Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	26
3.2.2.1. Gram Boyama.....	26
3.2.2.2. Spor Boyama.....	27
3.2.2.3. Katalaz Testi.....	28
3.2.2.4. Hareketlilik Testi.....	28
3.2.2.5. API Test Kitlerinin Uygulanması.....	29
3.2.3. Proteaz Aktivitesine Fermentasyon Koşullarının Etkisinin Belirlenmesi.....	31
3.2.3.1. İnokulum Ortamında Geliştirme.....	31
3.2.3.2. Fermentasyon Ortamı, Bileşenleri ve Aşılama.....	31
3.2.3.3. İzolatlarda Proteaz Aktivitesi Tayini.....	31
3.2.3.4. Proteaz Üretimine Etki Eden Faktörlerin Belirlenmesi.....	32
3.2.3.4.1. İnkübasyon Süresi.....	32
3.2.3.4.2. Sıcaklık.....	32
3.2.3.4.3. pH.....	33
3.2.3.4.4. Farklı Karbon Kaynakları.....	33
3.2.3.4.5. Farklı Azot Kaynakları.....	33
3.2.3.5. Tirozin Standartının Hazırlanması.....	34
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	35
4.1. Araştırma Bulguları.....	35
4.1.1. Toprakтан İzolasyonu Yapılan ve Proteaz Aktivitesine Sahip İzolatlar.....	35
4.1.2. İzolatlara Uygulanan Fizyolojik, Biyokimyasal ve API Testi Sonuçları.....	37
4.1.3. Proteaz Üretimine Etki Eden Faktörlerin İncelenmesi.....	39
4.1.3.1. İnkübasyon Süresi Sonuçları.....	39
4.1.3.2. Sıcaklık Üzerine Yapılan Çalışma Sonuçları.....	41
4.1.3.3. pH Üzerine Yapılan Çalışma Sonuçları.....	43
4.1.3.4. Farklı Karbon Kaynakları Üzerine Yapılan Çalışma Sonuçları.....	45
4.1.3.5. Farklı Azot Kaynakları Üzerine Yapılan Çalışma Sonuçları.....	49
4.2. Tartışma.....	53
4.2.1. İzolasyon ve Tanı.....	54
4.2.2. İnkübasyon Süresi.....	55
4.2.3. Ortam Sıcaklığı.....	56
4.2.4. Ortam pH.....	56
4.2.5. Farklı Karbon Kaynakları.....	57
4.2.6. Farklı Azot Kaynakları.....	58
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	59
KAYNAKLAR.....	62
ÖZGEÇMİŞ.....	67

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

DFP	Di izo florofosfat
EDTA	Etilen daimin tetra asetik asit
FCR	Folin-Ciocalteu reaktifi
M	Molar
PMSF	Fenil metil sülfonil florid
RPM	Dakikada devir sayısı
TCA	Tri kloro asetik asit



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Mikrobiyal Enzimlerin Yıllık Kullanım Değerleri.....	8
Şekil 3.1. Toprak Örnekleme İçin Seçilen İstasyonlar	21
Şekil 3.2. Gram Pozitif Bakterilerin Görünümü.....	27
Şekil 3.3. Spor Boyama.....	27
Şekil 3.4. Katalaz Testi.....	28
Şekil 3.5. Hareketlilik Testi.....	29
Şekil 3.6. API 50CHB ve API 20E Test Kitlerinin Pozitif ve Negatif Sonuçları.....	30
Şekil 3.7. Tirozin Standartı.....	34
Şekil 4.1. S9-UKM İzolatının API 50 CHB ve API 20E Sonuçları.....	39
Şekil 4.2. S11-UKM İzolatının API 50 CHB ve API 20E Sonuçları.....	39
Şekil 4.3. S9-UKM ve S11-UKM İzolatlarının Meydana Getirdiği Enzimin En Fazla Üretildiği Zamanın Birbirleri ile Karşılaştırılması.....	41
Şekil 4.4. S9-UKM ve S11-UKM İzolatları İçin Enzimin En fazla Üretildiği Ortam Sıcaklık Aralığının Belirlenmesi, Birbirleriyle Karşılaştırılması.....	43
Şekil 4.5. S9-UKM ve S11-UKM İzolatları İçin Enzimin En fazla Üretildiği Ortam pH'nın Belirlenmesi, Birbirleriyle Karşılaştırılması.....	45
Şekil 4.6. S9-UKM ve S11-UKM İzolatları İçin Enzimin En fazla Üretildiği Karbon Kaynaklarının Belirlenmesi, Birbirleriyle Karşılaştırılması.....	49
Şekil 4.7. S9-UKM ve S11-UKM İzolatları İçin Enzimin En fazla Üretildiği Azot Kaynaklarının Belirlenmesi, Birbirleriyle Karşılaştırılması.....	53

TABLO DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. <i>Bacillus</i> Türlerinin Temel Özellikleri.....	4
Tablo 3.1. Kullanılan Besiyeri İçerikleri.....	22
Tablo 3.2. İnokulum (Aşı) Ortamının İçeriği.....	22
Tablo 3.3. Fermentasyon Ortam İçeriği.....	23
Tablo 3.4. Nutrient Agar İçeriği.....	23
Tablo 3.5. Kristal Violet Solüsyonu.....	24
Tablo 4.1. Özel Besiyerine Ekilen Toprak Örneklerinde Gözlenen Koloniler.	36
Tablo 4.2. Farklı İstasyonlardan Elde Edilen Aktif Kolonilerin Toplam Çap/Koloni Çapı Ortalamaları ve En Aktif İzolatın Toplam çap/Koloni Çapı Oranları.....	37
Tablo 4.3. İzolatlara Uygulanan Biyokimyasal Testleri.....	38
Tablo 4.4. S9-UKM İzolatında Enzimin En Fazla Üretildiği Zamanın Belirlenmesi Denemesi Bulguları.....	40
Tablo 4.5. S11-UKM İzolatında Enzimin En Fazla Üretildiği Zamanın Belirlenmesi Denemesi Bulguları.....	40
Tablo 4.6. S9-UKM İzolatı İçin Ortamın Sıcaklığına Bağlı Olarak Değişen Enzim Miktarları.....	42
Tablo 4.7. S11-UKM İzolatı İçin Ortamın Sıcaklığına Bağlı Olarak Değişen Enzim Miktarları.....	42
Tablo 4.8. S9-UKM İzolatı İçin Ortam pH Bağlı Olarak Değişen Enzim Miktarları.....	44
Tablo 4.9. S11-UKM İzolatı İçin Ortam pH Bağlı Olarak Değişen Enzim Miktarları.....	44
Tablo 4.10. S9-UKM İzolatı İçin Ortamda Bulunan Farklı Karbon Kaynaklarına Bağlı Olarak Değişen Enzim Miktarı.....	46
Tablo 4.11. S11-UKM İzolatı İçin Ortamda Bulunan Farklı Karbon Kaynaklarına Bağlı Olarak Değişen Enzim Miktarı.....	47
Tablo 4.12. S9-UKM İzolatı İçin Ortamda Bulunan Farklı Azot Kaynaklarına Bağlı Olarak Değişen Enzim Miktarı.....	50
Tablo 4.13. S11-UKM İzolatı İçin Ortamda Bulunan Farklı Azot Kaynaklarına Bağlı Olarak Değişen Enzim Miktarı.....	51

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında bana destek olan, bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren kendisini tanımaktan büyük onur duyduğum sevgili danışman hocam Sayın Prof. Dr. A. Üsame TAMER'e, bilgi ve tecrübesi ile lisansüstü öğrenim hayatımın tüm zorlu aşamalarında yardımcı olan Prof. Dr. Mustafa OSKAY'a, beni maddi ve manevi olarak daima destekleyen, hep yanımda olan Sevgili Eşim Meltem KOVANCILAR'a ve Aileme yürekten teşekkür ederim.

Bu çalışmamızın gerçekleşmesi için FBE 2010-105 nolu projemize desteğini esirgemeyen MCB Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne ayrıca teşekkür ederim.

Umut KOVANCILAR
Manisa, 2018



ÖZET

Yüksek Lisans

Çeşitli Substratlardan Proteolitik *Bacillus* Cinsi Üyelerinin İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Alkali Proteaz Aktivitelerinin Belirlenmesi

Umut KOVANCILAR

Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. A.Üsame TAMER

Bu çalışmada alkali proteaz üreten bakterilerin izolasyonu gerçekleştirilmiş ve bu enzimce en aktif (ekonomik açıdan değerli) suşlarının elde edilmesi amaçlanmıştır. İzmir, Manisa ve Aydın illerindeki (14 farklı istasyondan) toprak örnekleri alınmıştır. İzolasyonda dilüsyon ve petri plaka yöntemleri kullanılmıştır. Kazein hidroliz zonlarına göre seçilen izolatlar biyokimyasal testler ve bazılarında API testleri uygulanmıştır.

Bacillus cinsine ait olduğu öngörülen 2 izolat (S9-UKM ve S11-UKM) seçilmiş ve enzim aktivitesinin belirlenmesinde spektrofotometrik yöntem uygulanmıştır. Bu uygulama esnasında inkübasyon süresi, ortam sıcaklığı ve ortam pH'ı değiştirilmiş, farklı karbon ve farklı azot kaynakları denenmiştir.

S9-UKM İzolatı için en yüksek proteaz aktivitesi 3'ncü günün sonunda 30°C'de, pH 8.0'de, karbon kaynağı fruktoz ve azot kaynağı olarak ise skim milk kullanıldığında elde edilmiştir. S11-UKM izolatı ise en yüksek proteaz aktivitesini 3'ncü günün sonunda, 33°C'de pH 7.2'de, karbon kaynağı olarak maltoz, azot kaynağı olarak ise maya ekstresi kullanıldığında elde edilmiştir.

Proteazların kullanım alanları geçmişten günümüze oldukça gelişme göstermiştir. Hemen hemen her alanda sıklıkla kullanılmakta olup ve gelecekte de önemleri daha da artacaktır.

Elde edilen bulgular sonucunda aynı cinse ait bakterilerde üretilen alkali proteaz üretim parametrelerinde farklılıkların bulunabileceğini gösterilmiştir. Bu tip çalışmalarla en uygun üretici organizmanın tespit edilmesinin önemi ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Alkali Proteaz, *Bacillus* cinsi, İzolasyon.

2018, 67 Sayfa

ABSTRACT

Master of Science Thesis

Isolation, Characterization and Determination of Alkaline Protease Activity of *Bacillus* Genus from the Various Proteolytic Substrates

Umut KOVANCILAR

**Manisa Celal Bayar University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Department**

Supervisor: Prof. Dr. A.Üsme TAMER

In this study, we were performed isolation of the alkaline protease producer bacteria and the most active enzyme producer strains (economically valuable) was intended to obtain. The soil samples were collected from 14 different stations which is inside the Izmir, Manisa and Aydın provinces border. We used dilution and petri plate method was for bacteria isolation. Biochemical tests and API test kits were applied to the isolates, which was selected according to the hydrolyzed casein zones.

2 isolates (S9-UKM and S11-UKM) were selected, which was predicted to be involved in *Bacillus* genus, and spectrophotometric method was used to identification of the enzyme activity. During the study, different incubation time, medium temperature, medium pH, carbon and nitrogen sources was tried.

Maximum protease activity for S9-UKM isolate was reached at the end of the third day and in the conditions of 30⁰C, pH 8.0, fructose as carbone source and skim milk as nitrogen source. Also, maximum protease acitivity for S11-UKM isolate was reached at the end of the third day and in the conditions of 33⁰C, pH 7.2, maltose as carbone source and yeast extract as nitrogen source.

Usage of proteases area have increased quite progressively. Proteases are used almost in every area and importance of these enzymes will increased in the future.

The results obtained from the study, it is shown that there may be differences in the parameters of alkaline protease production among the same bacterias, which is in the same genus. With this type of studies, importance of detection of the most suitable organism putted forward.

Key Words: Alkaline protease, *Bacillus*, Isolation

2018, 67 pages

1. GİRİŞ

Endüstriyel mikrobiyolojide değerli ticari ürünleri üretebilmek veya önemli kimyasal reaksiyonları gerçekleştirebilmek için tipik olarak büyük ölçekte üretilen mikroorganizmalar kullanılır. Endüstriyel mikrobiyolojik prosesler, mikroorganizmaların kendisi için en uygun koşullarda gerçekleştirebildiği metabolik reaksiyonların pek çok durumda ilgilenilen ürünün olabildiğince çok üretimi amacıyla geliştirilmiş şeklindedir. Bu yüksek verimli üretim için kullanılan organizmalar; bakteriler, mayalar ve küfler başta olmak üzere daha çok prokaryotik hücre yapısındaki canlılardır [1].

Endüstriyel işlem için seçilen organizmanın da başta ilgili maddeyi en yüksek verimle üretebilmesinin yanında; büyük ölçekli kültürlerde üreme ve ürün oluşturma yeteneğinde olmalı, büyük fermentörlere (endüstriyel fermentasyonun gerçekleştiği tank) kolayca inoküle (aşılama) edilebilmesi için, tercihen spor ve diğer bazı formlarını meydana getirebilmeli, bunların yanı sıra hızlı ve kolay üremeli, istenilen ürünü en kısa zamanda meydana getirebilmelidir. Üretim için kullanılan organizma kesinlikle patojen olmamalıdır [1].

Mikroorganizmalardan elde edilen endüstriyel ürünlerin başlıcaları alkollü içecekler, enzimler, antibiyotikler, hormonlar, alkaloidler, organik asit ve diğer özel bazı kimyasallardır.

Her organizma az ya da çok miktarda üretilen ve hücresel yaşam süreçlerinde yer alan yüksek çeşitlilikte enzimlere sahiptir. Bazı enzimler çok fazla miktarda üretilir ve hücreden dış ortama salınır. Ekzoenzim adı verilen bu enzimler ortamdaki selüloz, protein ve nişasta gibi çözünmeyen polimerleri parçalamada kullanılırlar.

Enzimler tipik olarak tek kimyasal fonksiyonel grupları hedeflediklerinden ve tek bir molekül üzerindeki benzer fonksiyonel grupları ayırabildiğinden, özellikle yararlı biyokatalizörlerdir. Önemli mikrobiyal enzimler; proteaz, amilaz, invertaz, glukoz oksidaz, glukoz izomeraz, pektinaz, rennin, sellülaz, lipaz, laktaz, DNA polimerazdır. Dünya genelinde enzim satışlarının yarısından çoğunu oluşturan bakteriyal proteazlar endüstriyel enzimlerin en büyük sınıflarından biri haline gelmiştir. Geniş biyokimyasal çeşitlilikleri, mikroorganizmaların hızlı gelişmeleri,

hücre kültürleri için limitli alanların yeterli olması ve genetik manüplasyonlar ile yeni enzimlerin meydana getirilmesini sağladığı için mikrobiyal proteazlar enzim kaynağı olarak tercih edilmektedir. Gıda endüstrisinde kullanılabildiği gibi deterjanların yapısına da katılır. Ayrıca derilerin terbiyesinde (keratin ve benzeri maddeleri uzaklaştırmada) de kullanılır. Bu yöntem çok daha çevrecidir. Bunlar ayrıca ilaç ve preparatların yapımında da kullanılır. Fotoğraf filmlerinde bulunan gümüşün geri kazanımı için de proteazlardan yararlanır. Küçükbaş hayvanların artık tüylerini proteaz ile muamele ederek büyükbaş hayvanlar için yem olarak kullanılması sağlanabilir [1,2,3].

Birçok farklı sektörde kullanılan proteazlar içerisinde genellikle tercih edilen proteaz çeşidi ‘alkali proteazlar’dır. Bu iki önemli özelliğinden dolayı protein bazlı lekeleri çıkarmak için deterjanların yapısında kullanılır. Hücre dışı üretilen ve fermentasyon besiyerine direkt olarak salgılanan mikrobiyal proteazlar üretilmelerindeki kolaylık nedeni ile bitkisel ve hayvansal proteazlara göre tercih edilmektedirler [2].

Bacillus cinsine ait türler alkali proteaz üreticisi bakterilerin başında gelir. Bu cins içinde de en çok kullanılanları *B.licheniformis*, *B.subtilis*, *B.amyloliquefaciens* ve *B.mojavensis* türleridir. *Pseudomonas* sp. türleri de alkali proteaz üreticisi bakterilerdendir. Araştırmalara göre ticari alanda en büyük ilgi *Bacillus* sp. üzerinde yoğunlaşmaktadır [3].

Bu çalışmada alkali proteaz üreten *Bacillus* cinsi bakterilerin izolasyonu, en verimli suşların proteince zengin ortamlar yardımı ile belirlenmesi, fermentasyon sonucunda bu suşlar tarafından meydana getirilen enzimin miktarının; inkübasyon süresi, ortam sıcaklığı, pH ve kullanılan karbon/azot kaynakları değiştirilerek spektrofotometrik yöntem ile tespit edilmesi ve farklı parametrelerde denemeler yapılarak en yüksek verimlilikte enzim üretiminin elde edilmesi amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Bacillus* Cinsinin Özellikleri

Çubuk şeklinde düz ya da düze yakın hücrelerdir. Çok büyük bir kısmı gram pozitif ve peritrik flagella ile hareketlidir. Aerobik ya da fakültatif anaerobtur. Çoğu *Bacillus* üyesinde oksijen terminal elektron alıcısıdır. Ekstrem ortam şartlarına göre dayanıklı bir endospor meydana getirirler [2].

Bacillus cinsinin koloni morfolojisi çeşitlilik gösterir. Büyük bir kısmı beyaz ya da krem renkli kolonilere sahiptir. Bazı türlerde sarı, açık pembe, portakal rengi ve siyah renklerde pigmentli kolonilere de rastlanmaktadır (*Bacillus mycoides* kolonileri ise agarlı besi ortamı üzerinde rizoid şeklinde yayılır). *Bacillus* cinsi üyelerinin termofilik, mezofilik ve psikrofilik türleri bulunur. Çok yüksek sıcaklık derecelerinde bile canlı kalırlar. Genellikle 35-37 °C'de ve ortam pH'sı 7.0 civarında iyi ürerler. Karbon kaynağı olarak organik asit, şeker veya alkol içeren; azot kaynağı olarak amonyum bulunduran sentetik ortamlarda çok iyi gelişirler [2].

Bacillus cinsi üyeleri uygun olmayan şartlarda spor oluşturma yeteneğindedir. Oluşturduğu endospor ise; silindirik oval, yuvarlak veya böbrek şeklinde olabilir. Bununla beraber sporlar hücre içerisinde sentral ya da subterminal olarak yerleşebilir. *Bacillus*'ların hücre duvarı, hücre yüzeyini tamamı ile örten yüzey katmanı parakristalin oluşturur. *Bacillus*'lar genellikle kapsül bulundurur. Tipik yaşam alanları toprak olmasına rağmen doğada çok geniş olarak yayılış gösterirler (havada, suda, süt ve süt ürünlerinin içerisinde ve daha birçok gıda maddesinde bulunurlar). Katalaz pozitif olup ve şekerli ortamlarda asit üretirler. *Bacillus*'ların bazı türleri gıdalar için önemlidir. Bazı *Bacillus*'lar proteolitik enzimler üretirler ve buda peynir yapımında kullanılır. Bazı türleri ise böcek patojenidir. Birkaç türü ise polipeptit sınıfında antibiyotik üretir [4].

Bacillus cinsi mikroorganizmalar gram boyama uygulamasına pozitif sonuç veren, ortam şartlarına dayanıklı bir endospor oluşturabilen, çubuk (basil) şeklinde, aerob veya fakültatif anaerob olan mikroorganizmalardır [7]. Fakat yaşlı kültürler gram (-) gibi görülebilir. *Bacillus* cinsi mikroorganizmaların ayırt edilmesinde kullanılan temel özellikleri Tablo 2.1.'de verilmiştir.

Tablo 2.1. *Bacillus* Türlerinin Temel Özellikleri [1]

Özellikler	<i>Bacillus</i> cinsi	Özellikler	<i>Bacillus</i> cinsi
Çubuk şekli	+	Zorunlu anaerob üreme	D
Hücre çapı	< 2.5 µm	Fakültatif anaerob üreme	D
Filament varlığı	-	Homolaktik fermentasyon	D
Hareket yeteneği	+	Sülfatın sülfite reaksiyonu	-
Endospor oluşumu	+	Katalaz aktivitesi	+
Gram reaksiyonu	+	Nitratın nitrite redüksiyonu	D
Oksidaz aktivitesi	-	G+C oranı (% mol)	32-69
Glukozdan asit oluşumu	+		

Not: D, değişken

Bacillus cinsine ait sporlar vejetatif hücre formlarına göre deterjanlara, besin yetersizliğine, ısıya, UV'ye, radyasyona, dezenfektanlara ve hidrojen peroksit (H₂O₂) gibi okside edici ajanlarla muameleye karşı oldukça dirençlidir. Vejetatif hücrelerdeki endosporun yeri, türün özelliğine bağlı olarak sentral, subterminal ve terminal olmak üzere üç farklı pozisyonda olabilir. Ayrıca hücre içerisinde bulunan endospor yine türün özelliğine bağlı olarak hücrede deformasyon meydana getirebilir. Sporlar elipsoidal, küresel, oval, muz veya silindir gibi şekillerde olabilir. *Bacillus* sporları dıştan içe doğru gidildikçe ekzosporium, korteks, dış spor zarfı, iç spor zarfı ve öz kısımlarından oluşur. Spor protoplastı ve özündeki düşük su içeriği, spor zarfındaki kalsiyum ve dipiklonik asit gibi yüksek mineral seviyesi, azaltılmış spor geçirgenliği ve spor kromozomunun asitle çözünebilen bir grup proteinle doyurularak DNA hasarının önlenmesi yüksek direncinin en önemli nedenleridir. Ekstrem koşullarda spor oluşturabilme yeteneklerine bağlı olarak düşük sıcaklıklardan (kutuplar vb.), yüksek sıcaklıklara (kaplıcalar, volkanik alanlar vb.), asidik, alkali veya tuzlu ortamlara kadar çok çeşitli habitatlarda yaşayabilmektedirler. Bu nedenle hemen her ortamdan izole edilebilmişlerdir [7].

Logan ve ark., 1999'da yaptıkları çalışmaya göre *Bacillus* türlerinin teşhisi ve türler arasındaki farklılıklarının tespiti için spor ve sporangium morfolojilerini temel almışlardır. Buna göre *Bacillus* türleri 3 grupta toplanmıştır [9].

Birinci grup *Bacillus* cinsi üyeleri kendi içlerinde A ve B olmak üzere ikiye ayrılır. Bu her iki grupta sporangia gelişmemiştir. Sporlar elips veya silindirik şekilli, sentral veya terminal konumludur. Gram pozitiflerdir. İki grup arasındaki fark ise A alt grubunda hücre genişliği 1µm'dan küçük, B alt grubunda ise 1µm'dan büyüktür. A alt grubuna örnek olarak *Bacillus megaterium* ve *Bacillus cereus*, B alt grubuna örnek olarak ise *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus firmus* ve *Bacillus coagulans* verilebilir [9].

İkinci grupta yer alan *Bacillus* genusu üyelerinde sporangia kısmen gelişmiştir. Sporlar elips sentral ya da terminaldir. Bu grupta yer alan *Bacillus* türlerine örnek olarak; *Bacillus circulans*, *Bacillus alvei*, *Bacillus brevis*, *Bacillus laterosporus* verilebilir [9].

Üçüncü grupta yer alan *Bacillus* türlerinde de sporangia gelişmiştir. Sporlar küresel, subterminal veya terminal konumludur. *Bacillus sphaericus* bu gruba örnek olarak verilebilir [9].

Bacillus cinsinin üyelerinin hemen hepsi patojen değildir. İki türü insanlarda ve hayvanlarda hastalık oluşturan basillerdir. Bunlar *Bacillus anthracis* ve *Bacillus cereus* türüdür. *Bacillus subtilis* ise toz, toprak, gübre, bitki-hayvan kalıntıları ile süt ve süt ürünleri ve suda bulunan bir bakteri türüdür. Süt ve süt içeren ürünlerin, ekmeğin, sebze ve meyvelerin bozulmasında etkindir. *Bacillus subtilis* kültür süzüntülerinden elde edilen subtilin adı verilen bu maddenin bazı bakterilerin bulundukları ortamda gelişimlerini baskıladığı belirlenmiştir. Bu tür saprofit özellik göstermekle birlikte doğrudan doğruya ya da dolaylı yollar ile göz içerisine girmesi sonucunda panoftalmi, iridosilit gibi göz yangıları meydana getirebilir. *Bacillus subtilis* besin zehirlenmelerine de yol açabilmektedir [10].

Bacillus türlerinin birçoğu tabiatта genellikle saprofit olarak bulunmaktadır. *Bacillus* türleri doğada çürüyen organik materyallerde, toz, toprak, yeşil sebzelerde, suda ve bazı türlerde de normal vücut florasında bulunmaktadır. Bazı türler, memelilerde, bitkilerde ve böceklerde zorunlu patojen veya fırsatçı enfeksiyon etkenidirler [9]. *Bacillus* türleri arasında *Bacillus anthracis* ve *Bacillus cereus* insan ve hayvanlarda enfeksiyon oluşturmaları açısından en önemli türlerdir. Bunların

dışında kalan *Bacillus* türleri insanlarda veya hayvanlarda nadiren enfeksiyon etkenidirler [10].

Bacillus türü mikroorganizmalar endüstriyel olarak kullanılan hemen bütün enzim tiplerini üretebildiklerinden oldukça önemlidirler. Özellikle yüksek sıcaklık ve pH'larda üreyebilen bir *Bacillus* cinsinin üreteceği proteaz enzimleri, deterjanlara katkı maddesi olarak eklenmekte ve sıcak su ile daha etkin temizlik sağlayacak yıkama imkanı verebilmektedir [8,9].

2.2. Proteaz Kaynakları

Proteazlar bütün canlı organizmalar için gerekli olduğundan bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar gibi çok çeşitli kaynaklarda bulunurlar. Enzimler canlı hücrelerden ayrılabilir ve fizyolojik çevrelerinden bağımsız olarak kataliz gerçekleştirebilirler. Ticari öneme sahip proteazlar bitki ve hayvan dokularından ya da sıklıkla mikroorganizmalardan fermentasyon yoluyla elde edilirler [11].

2.2.1. Bitkisel Proteaz Kaynakları

Bitkilerin proteaz kaynağı olarak kullanılması kültür yapılan yerin ve büyüme için gerekli olan iklim koşullarının uygunluğu gibi bazı faktörler tarafından kontrol edilir. Bununla beraber bitkilerden proteaz üretimi zaman isteyen bir süreçtir. Papain, bromelain, keratinaz ve ficin bilinen bitkisel proteazlardır [11]. Papain papaya bitkisinin lateks kısmından, Bromelain ananas bitkisinin gövdesinden, ficin ise incir bitkisinin lateks kısmından elde edilir [12]. Papain, bromelain ve ficin pek çok endüstriyel, tıbbi, diyetik ve veterinerlik uygulamalarında kullanılmaktadır. Bazı bitki grupları saçların, kılların ve tüylerin yapısında bulunan keratini parçalayan keratinazı üretebilir. Bunlar derilerin terbiye edilmesinde ve atık su sistemlerindeki tıkanmaların giderilmesinde uygulanabilir [11].

2.2.2. Hayvansal Proteaz Kaynakları

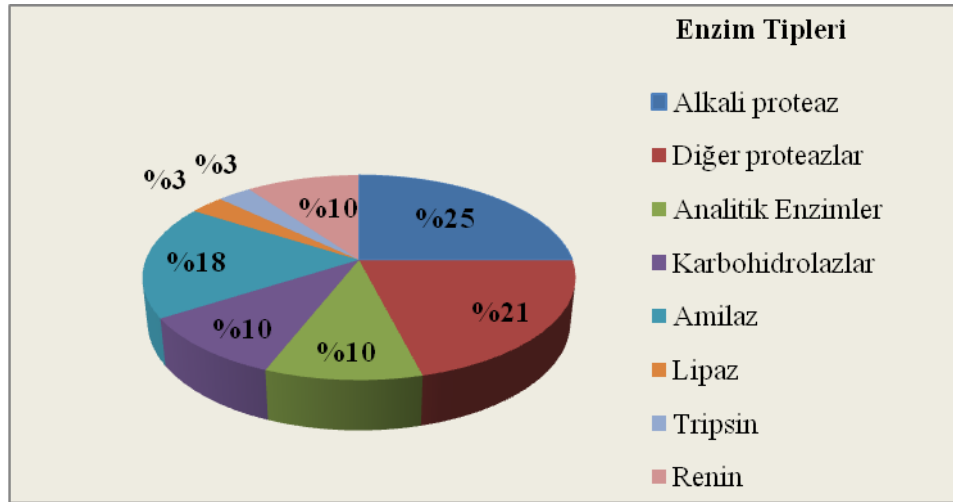
En çok bilinen hayvansal proteazlar pankreatik tripsin, kimotripsin, pepsin ve renindir. Bu enzimler saf olarak büyük miktarlarda hazırlanırlar. Tripsin besinlerdeki proteinlerin sindirilmesinden sorumlu olan temel bir sindirim enzimidir. Tripsin bakteriyel besi ortamlarının hazırlanmasında ve bazı özel tıbbi uygulamalarda

kullanılırken gıda uygulamalarında kullanımları ise diğerlerine göre oldukça sınırlıdır. Kimotripsin hayvansal pankreatik özütte bulunurlar. Saf kimotripsin oldukça pahalıdır ve diagnostik-analitik uygulamalarda kullanılırlar [11].

Pepsin ise bütün omurgalıların midelerinde bulunan asidik bir proteazdır. Pepsin, asit ekstrasyon ve filtrasyon yolu ile midenin alt kısmından elde edilir. Pepsin 1913 yıllarından itibaren çamaşır deterjanlarında kullanılırken günümüzde ise sabunlarda, yüksek sıcaklıklarda ve alkali koşullardan daha az etkilenen serin ve metal mikrobiyal proteazların karışımlarıyla etkili oldukları belirlenmiştir. Rennet ise bütün süt veren memelilerin midesinde inaktif öncül madde olan prorenin şeklinde üretilen pepsin benzeri bir proteazdır. Buda pepsinin aktivitesiyle ya da otokatalizi ile aktif reninne dönüştürülür. Renin süt endüstrisinde yaygın olarak tat vermek amacıyla çökelek üretiminde kullanılır [11].

2.2.3. Mikrobiyal Proteaz Kaynakları

Proteazlar, proteinlerin yapısındaki peptid bağlarının hidrolitik parçalanmasını katalize eden enzimlerdir. Alkali proteazlar deri, gıda, deterjan, eczacılık, fotoğrafçılık, atık yönetimi gibi birçok endüstriyel alanda kullanılan enzim grubudur. Son yıllarda, endüstride klasik yöntemler yerine enzimlere dayalı süreçlerin kullanımı giderek ağırlık kazanmaktadır. Çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılan enzimlerin, yıllık toplam satış tutarı bir milyar doların üzerindedir. Enzimlerin kullanıldığı endüstriyel işlemler daha ucuz ve kaliteli ürün elde edilmesine olanak sağlamaktadır. Alkali proteazlar geniş pH ve sıcaklık aralıklarında kararlı olduklarından birçok endüstriyel alanda kullanılmaktadırlar [11]. Bu nedenle enzim pazarında oldukça büyük bir paya sahiptir, proteaz enzimlerinin yıllık olarak tüketilen oranları Şekil 2.1.'de verilmiştir.



Şekil 2.1. Mikrobiyal Enzimlerin Yıllık Kullanım Değerleri [11]

Günümüzde en çok kullanılan proteaz kaynağı, bakteri, fungus ve virus orijinli olan mikrobiyal proteazlardır. Mikroorganizmaların biyoteknolojik uygulamalar için hemen tüm özelliklerinin istenen yönde değiştirilebilmesi, bitkisel ve hayvansal proteazlara göre daha saf elde edilebilmesi ve mikroorganizmaların uygun bir kültür ortamında üretilmesi gibi sebeplerden mikrobiyal kaynaklı proteazlar bitki ve hayvan kaynaklı proteazlara göre daha çok tercih edilmektedirler [13].

2.2.3.1. Bakteriyal Proteazlar

Ticari olan proteazların büyük bir kısmı *Bacillus* cinsi bakteriler tarafından nötral ve alkali olarak meydana getirilmektedir. Bakteriyal nötral proteazlar pH 5.0-8.0 aralığında aktivite göstermektedir ve nispeten termal stabiliteleri düşüktür. Nötral proteazlar, aktivite gösterdikleri pH aralığı ve hayvansal proteazlara göre hidrolize edilmiş gıda proteinlerinde daha az acı tat oluşturmaları nedeniyle gıda endüstrisinde tercih edilmektedir [14].

Bakteriyal nötral proteazların en karakteristik özelliği, hidrofobik amino asit çiftlerine yüksek afinite göstermeleridir. Termotoleranslarının az olması nedeni ile düşük sıcaklık hidrolizi ile gıda hidrolizatlarının üretiminde avantaj sağlamaktadır. Bakteriyal alkali proteazlar ise pH 10.0 gibi alkali koşullarda yüksek aktivite ve geniş substrat spesifikliği göstermeleriyle karakterize edilirler. Optimal sıcaklıkları

60°C civarındadır. Bakteriyal alkali proteazların bu özellikleri onları deterjan endüstrisi için uygun kılmaktadır [14].

2.2.3.2. Viral Proteazlar

AIDS ve kanser gibi oldukça tehlikeli ve ölümcül hastalıklara neden olan virüs proteinlerinin fonksiyonları nedeniyle viral proteazlar günümüzde giderek önem kazanmaktadırlar. Aspartik, serin ve sistein peptidazlar birçok virüste görülmektedir. Viral aspartik proteazlar viral tutunma ve homodimer replikasyonu ile poliprotein öncüleri olarak ifade edilmektedir. Olgun proteaz, öncü proteinin otolizi ile salınır. Retroviral aspartik proteazlar ve bunların mutantları ile saflaştırma, enzimatik analiz ve gen ifadesi ile ilgili çok geniş literatür mevcuttur. AIDS'in yayılımını ve öldürücü etkisini kaldırabilmek amacıyla etkili inhibitörlerin dizaynı için birçok araştırma viral proteazların üç boyutlu yapısı ve bunların sentetik inhibitörlerle interaksyonu üzerine odaklanmıştır [14].

2.2.3.3. Fungal Proteazlar

Funguslar bakterilere oranla daha çok çeşitli enzimler üretebilmektedirler. Örnek olarak *Aspergillus oryzae* verilebilir. Bu türler hem asidik, hem nötral hem de alkali proteaz üretebilmektedirler.

Fungal nötral proteazlar ya da metalloproteazlar, pH 7.0' de aktiftirler ve şelatlayıcı ajanlar tarafından inhibe olurlar. Protein hidrolizatlarının acılığının azaltılmasında kullanılmaktadırlar. Fungal alkali proteazlar ise gıda proteinlerinin modifikasyonunda kullanılırlar [15]. Fungal proteazlar endo ve ekzopeptidazlar olup, çok geniş çeşitlilikte salgılanabilmektedirler [16].

2.3. Proteazların Sınıflandırılması

'IUBMB'(The International Union of Biochemistry and Molecular Biology)'ye göre proteazlar hidrolazlar olarak adlandırılan 3. grubun 4. alt grubunda sınıflandırılmıştır (EC 3 Hidrolaz → EC 3.4 Proteazlar). Fakat proteazlar çok geniş etki mekanizmaları ve yapısal çeşitlilikleri sebebiyle genel enzim adlandırma sisteminde diğer enzim sınıfları gibi sınıflandırılmamaktadır. Şu ana kadar

proteazlar üç ana kritere göre sınıflandırılmıştır. Bunlar; katalizledikleri reaksiyon tipi, katalitik bölgenin kimyasal yapısı ve yapılarıyla ilgili evrimsel ilişkidir [14].

Proteazlar etki gösterdikleri yere göre endopeptidazlar ve ekzopeptidazlar olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Ekzopeptidazlar substratın amino ya da karboksil ucu tarafındaki peptid bağına parçalarken endopeptidazlar substratın terminal ucunun uzağındaki peptid bağlarını parçalamaktadır [14].

Aktif bölgelerindeki fonksiyonel amino asit köküne göre proteazlar dört ana grupta sınıflandırılırlar. Bunlar; Serin Proteazlar, Sistein/tiol Proteazlar, Aspartik Proteazlar ve Metalloproteazlar'dır [14].

Amino asit sekansları temel alındığında proteazlar dört familyada sınıflandırılır ve evrensel ataları olan peptidazlara göre familyalar klan olarak adlandırılan alt gruplara ayrılır. Her peptidaz ailesi katalizlediği reaksiyonu simgeleyen kod harfine sahiptir. Örneğin 'S' serin proteazlar, 'C' sistein proteazlar, 'A' aspartik proteazlar, 'M' metalloproteazlar ve 'U' bilinmeyen tip proteazı simgelemektedir [14].

2.4. Bakteriyal Alkali Proteazlar

Mikrobiyal proteazlar enzimoloji çalışmaları başladığından beri çok geniş kapsamlı olarak araştırılan hidrolitik enzimler içerisinde ilk sıralarda gelmektedir. Proteolitik enzim çalışmalarında bu enzimlerin hücresel metabolik aşamalarda önemli rol oynamalarının yanı sıra endüstriyel alanda da git gide önem kazanmasından dolayı dikkat çekmektedir. Bu enzimler 1914 yılından bu yana deterjanlara ilave edilmeleriyle deterjan endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Hücre içi proteazlar hücresel ve metabolik yollarda farklılaşma, sporulasyon, protein katlanması, enzimlerin olgunlaşması gibi birçok aşamada rol oynamaktadır. Hücre dışı proteazlar ise hücrenin etkileştiği çevresel koşullarda proteinlerin hidroliz edilerek absorbe edilmesi ve bunlardan yararlanılmasında görev almaktadır [17]. Aynı zamanda hücre dışı proteazlara birçok endüstriyel aşamada protein parçalanmasında ticari olarak ihtiyaç duyulmaktadır [18]. Günümüzde proteazlar endüstriyel pazarda satılan total enzimlerin %40'nı oluşturarak deterjan, gıda, ilaç, deri, atık su artımı ve gümüşün geri kazanılması gibi alanlarda

kullanılmaktadırlar. Bugüne kadar enzim piyasasında, deterjan endüstrisinde alkali proteazlar alkali pH aralığında stabil olmaları nedeni ile geniş yere sahip olmuşlardır [19,20].

2.5. Alkali Proteazların Özellikleri

2.5.1. Optimum pH ve Sıcaklık

Alkali proteazların optimum pH aralığı genellikle pH 9-11 arasında değişmektedir. Fakat çok sık görülmese de pH 11.0'in üzerindeki koşullarda aktivite gösteren alkali proteazlar bulunmaktadır. Yüksek izoelektrik nokta değerlerine sahiptirler ve genellikle pH 6-12 arasında stabildirler. Alkali proteazların optimum sıcaklık değerleri 50- 70°C arasındadır [19,20].

2.5.2. Stabilize Edicilerin Etkisi

Ticari olarak kullanılan alkali proteazların genellikle termostabilitesinin yüksek olması istenmektedir. Bu enzimin genellikle termal stabilitelerinin yüksek olması kullanım amaçlarına göre oldukça avantaj sağlamaktadır. Polietilen glikol, polihidrik alkoller ve nişastanın reaksiyon karışımına ilave edilmesi veya protein mühendisliği ile proteinin dördüncül yapısına müdahale edilerek alkali proteazların termostabiliteyi daha da artırılabilir [19, 20].

2.5.3. Metal İyonlarının ve İnhibitörlerin Etkisi

Alkali proteazlar yüksek aktivite gösterebilmek için Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} gibi divalent katyonlara veya bu katyonların kombinasyonlarına gerek duymaktadırlar. Bu katyonlar alkali proteazlarının stabilitesini artırmaktadır. Bu katyonların enzimi termal denatürasyona karşı koruduğu ve yüksek sıcaklıklarda enzimin aktif konformasyonunu korunmasını sağladığı düşünülmektedir [18]. Ba^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} ve Zn^{2+} gibi metal iyonları da alkali proteazların stabilitesini artırdığı bilinmektedir [20].

İnhibisyon çalışmaları kofaktör ihtiyacı ve aktif bölgesinin yapısı bakımından enzimin doğal yapısının anlaşılmasını sağlamaktadır. Alkali proteazların genellikle PMSF (Fenil Metil Sülfonil Florid) ve DFP (Diizopropil florofosfat) ile tamamen

inhibe olduğu bilinmektedir. PMSF aktif bölgede bulunan serin köklerine etki ederek enzim aktivitesinin kaybolmasına neden olmaktadır. Bu inhibisyon profili proteazların serin proteazlar olarak sınıflandırılmasını sağlamaktadır. Metal iyonlarında bağımlı olan proteazlar EDTA (Etilen Diamin Tetraasetik Asit) gibi şelat ajanlarına hassaslık göstermektedir. EDTA varlığında inhibe olan metal iyonlarına bağımlı proteazlar da metalloproteazlar olarak sınıflandırılmıştır [18].

2.5.4. Substrat Spesifitesi

Alkali proteazlar doğal proteinleri hidrolizledikleri başarı ile bazı sentetik substratları da hidrolizlerler. Enzim tirozin, fenilalanin ya da lösin gibi aromatik ya da hidrofobik amino asit kalıntılarına karşı da spesifik özellik gösterir [18].

2.6. Alkali Proteazların Kullanım Alanları

2.6.1. Gıda Endüstrisi

Gıda endüstrisinde proteazların kullanımı oldukça eski zamanlara dayanmaktadır. Günümüzde proteazlar rutin olarak peynir yapımı, fırıncılık, soya hidrolizatlarının hazırlanması ve et yumuşatma gibi çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır. Enzimler tarafından üretilen protein hidrolizatları genellikle acı bir tada sahiptir. Aminoasit türüne ve peptidin uzunluğuna göre bu hidrolizatların acılığı az veya çok olabilir. Acı peptidler, hidrofobik aminoasit içeriğinin yüksek olmasıyla, tatlı peptidler ise hidrofilik aminoasit içeriğinin yüksek olmasıyla karakterize edilirler. Kazein ve hemoglobinden üretilen hidrolizatlar; et, balık ve jelatinden elde edilen hidrolizatlardan daha acı olmaktadır [21].

Gıda endüstrisinde en fazla kullanılan proteaz enzimi ise papaindir. En önemli iki uygulama alanı, biranın soğukta saklanması ve yapay olarak etin gevrekleştirilmesidir. Etin gevrekleştirilmesinde karşılaşılan başlıca problem, enzimin ette dağılımının, et parçalanmaksızın sağlanmasındaki güçlölüdür. Enzim bir veya birden fazla kas doku bileşenini parçaladığı için, enzimin düşük konsantrasyonlarda kullanılmasına özellikle dikkat edilmesi gerekmektedir [3].

Buğday unu fırıncılıkta en önemli bileşendir. Fırın hamurlarının özelliklerini belirleyen gluten maddesi, suda çözünmeyen bir proteindir. *Aspergillus oryzae*

türünden elde edilen endo ve eksoproteinazlar sınırlı bir proteoliz ile buğday glutenini modifiye etmek için kullanılmaktadır. Fungal proteazlar, beyaz ekmek ve poğaçaların yapımında da başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Fungal proteazların aşırı miktarları, ekmeği hamurumsu bir hale getirmektedir. Enzim ilavesi özellikle sert ve elastiki hamurlar için uygundur. Hamura yapılan enzimatik muamele, hamurun elle veya makine ile üretimini kolaylaştırır, böylece ürünlerin daha geniş bir aralıkta üretilmesini sağlar. Proteazların ilavesi ile artan somun hacimlerinde karışma zamanını yaklaşık %25 oranında azaltmaktadır. Özellikle *Bacillus subtilis* proteazları kek, bisküvi ve kraker yapımında kullanılmaktadır. Bu proteazlar hamurların yumuşamasını geciktirmek için kullanılır ve özellikle kraker üretiminde çok önemlidir [3, 22]. Bu alanda asidik mantar proteazlar amilazlarla birlikte kullanılarak ürünün tadına ve aromasına da etki etmektedir [15, 23].

Aspartik proteaz grubuna dahil olan, sığır kimosini (rennin) uzun zamandır peynir yapımı sırasında sütün kesilmesi veya pıhtılaşması için kullanılmaktadır. Kaynağı nedeniyle sığır kimosini pahalı bir malzeme olduğundan alternatif olarak domuzdan elde edilen pepsin de kullanılmaktadır, ancak pepsinin yüksek proteolitik aktivitesi peynir özü için istenmeyen bir durumdur. Bu yüzden, süt kesme enziminin çeşitli mikrobik kaynakları araştırılmıştır. Sığır kimosinin içerdiği aktiviteye yakın olan peynir mayalarının mikrobik kaynakları, *Rhizomucor miehei*, *Mucor pusillus* ve *Endothia parasitica* türleridir. İlk iki organizma, termofilik mantar, üçüncüsü ise bir mayadır. Mikrobik kaynaklar ile sığır kimosini arasındaki farklılıkları en aza indirmeye çalışmalarına rağmen, farklar sığır kimosinin peynir yapımı için tercih edilmesine sebep olmaktadır [24].

Yüksek içerikte iyi kaliteli protein içerdiklerinden dolayı soya fasulyeleri zengin bir besin kaynağı olarak yüzyıllardır kullanılmaktadır. Proteazlar birçok soya ürünü ve soya sosu hazırlamak için kullanılmaktadır. Fungal alkali ve nötral proteazlar soya sosu prosesinde önemli bir rol oynamaktadır. Soya proteinlerinin proteolitik modifikasyonu onların fonksiyonel özelliklerini düzeltmeye yarar. pH 8.0'de alkalaz ile soya proteinleri muamelesi yüksek çözünürlük, iyi protein ürünü ve düşük acılıkta çözünür hidrolizatlar ile sonuçlanmaktadır [22].

Proteolitik enzimler yağ elde edilmesinde de uygulama alanına sahiptirler. Örneğin Nijerya kavun çekirdeğinden yağ eldesinde proteolitik enzimler

kullanılmaktadır. Kavun çekirdeği %30 yağ, %50 protein içermekte ancak yağın tamamı bilinen çözenlerle ekstrakte edilememektedir. Çekirdeklere proteolitik enzimlerin uygulanması ile ekstrakte olabilen yağ miktarını artmaktadır. Ayrıca proteazlar meyve sularını, alkolsüz içkileri kuvvetlendirmede ve proteince zengin diyet amaçlı yiyeceklerin üretiminde kullanılmaktadırlar [22].

Bakteriyel proteazlar, derinin kollajen olmayan yapılarının seçimli hidrolizinde, globulinler ve albüminler gibi fibril yapıda olmayan proteinlerin uzaklaştırılmasında, deriden kılların ayrılmasında ve derinin yumuşatılmasında kullanılmaktadır. Günümüzde deri prosesi; ıslatma, sepileme, kireçlik, kireç giderme, saman ve kıl giderme gibi bazı adımlar içerir. Ancak bu işlemler boyunca yüksek oranda kimyasal madde ve atık su ortaya çıkmaktadır. Son yıllarda, ham derilerdeki doğal yağın giderilmesinde enzimlerden yararlanılarak ilsem etkinliğinin artırılması ve yağ gidermede kullanılan kimyasal maddelerin azaltılarak deri sanayinin çevreyi daha az kirletmesi amaçlanmıştır [26]. Yapılan çalışmalara göre, zararlı kimyasallara alternatif olarak enzimlerin kullanımı, çevresel kirliliği azaltmada, deri kalitesini arttırmada başarılı olmuş ve deri sanayisindeki uygulamalar için daha ekonomik bir kullanım sağlamıştır [25].

Proteazlar, hayvan postlarını deriye dönüştürmede ıslatma, kireçleme, kıldan arındırma, yünden arındırma ve ayırma aşamalarında sıklıkla kullanılmakta ve yapılan araştırmalarda kimyasal maddelere göre daha yüksek aktivite göstermektedirler. Geleneksel deri üretim proseslerinden kireç giderme işlemi sonrasında alkali proteazların kullanımı ile gerçekleştirilmektedir. Ham deri yapısında bulunan globüler proteinler parçalanmakta ve strüktür açılımı sağlanmaktadır [27].

Günümüzde tıp, farmakoloji ve gıda sanayinde büyük ölçüde kullanım alanı bulan enzimler, aslında deri sanayinde dericilik sanatının başladığı günden bu yana kullanıla gelmiştir. Ancak, enzimlerden hazır ticari preparat olarak yararlanılmaya 1909 yılında Otto Rohm'un pankreas enzimini izole etmesi ve bu preparatı sama maddesi olarak kullanıma sunması ile başlamıştır [15]. Sonraki dönemlerde bitkisel, hayvansal, bakteri ve fungus kültürlerinden izole edilebilen çeşitli tür ve nitelikteki enzimlerden deri sanayinde; yumuşatma, kireçlik, kıl ve yağ giderme, pikle ve kromlu deri strüktürünün açılması, etleme ve kromlu deri atıklarının saflaştırılması

ve atık suların temizlenmesine kadar çok sayıda proseste kullanım alanı bulmuş, kullanımları giderek yaygınlaşmıştır [15,21]. Özellikle *Bacillus* sp. tarafından üretilen proteaz enzimi ticari olarak önem kazanmıştır.

Enzim uygulanması, derilerin dikiş ve günlük kullanımdan kaynaklanan darbelere dayanıklılığını etkilediğinden kullanım miktarı ve süresine oldukça dikkat edilmelidir [15].

2.6.2. Deterjan Endüstrisi

Dünya enzim üretiminin yaklaşık %30'unu deterjan enzimi üretimi oluşturmaktadır [28]. Proteazlar; protein moleküllerini parçalayarak çamaşırlardaki zor lekeleri çıkabilecek veya deterjan içeriğindeki diğer maddelerle çözünebilecek hale getirmektedir. İdeal deterjan proteazları, yiyecek, kan ve diğer vücut salgılarından dolayı lekelerin büyük bir kısmının uzaklaşmasını kolaylaştırmak için, geniş substrat özgülüğüne sahip olmalıdır. Deterjan içinde bir proteazın en iyi performansı için anahtar parametre onun izoelektrik nokta (pI)'sıdır. Deterjan çözeltisinin pH'ı ile pI'sı birbirine uyumlu ise proteazın bu uygulama için çok uygun olduğu kabul edilir. Ayrıca bir proteazın pI değeri ne kadar yüksekse, o proteaz o kadar yüksek pH' larda etki gösterebilmektedir [22].

Proteazlar, günümüzde tüm dünyada çamaşır deterjanı katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Proteazların bu alanda kullanımlarındaki artışın temel sebebi, çevresel kaygılardır. Sıcak yıkamalar için tasarlanmış olan deterjanlar, sodyum ve 60°C üzerindeki yüksek sıcaklıklarda aktif hale gelen bir beyazlatma maddesi olan sodyum perborat içermekteydi, ancak fosfat kirlenmesini azaltmak için ortaya çıkan çevresel baskılar ve polyester kumaşların kullanımının artması nedeniyle bu içerikler deterjanlarda azaltılmış hatta kaldırılmıştır [29]. Bunun sonucu olarak da bakteriyel enzimlerin kullanımı artmıştır [24].

Yıkama verimini arttıran proteazlar, enzimin karakterine bağlı olarak daha düşük sıcaklıklarda ve daha düşük surelerde temizlik sağlayabilmektedir. Proteazların özellikle kan ve çim gibi lekelerin çıkarılmasında çok etkili olduğu bilinmektedir. Yiyecek lekelerinin çıkarılmasında ise proteazların amilaz ve lipazlarla birlikte kullanıldığı kombinasyonları daha etkili olmaktadır. Ayrıca, deniz

solucanlarından elde edilen proteazlar lens yıkama çözeltilerinde kullanılmakta ve düşük sıcaklıklarda kontak lenslerin temizlenmesini sağlamaktadırlar [21,24,26].

Çamaşır deterjanlarında kullanılan enzimlerin yüksek verime sahip olması için, 1 saat boyunca 95°C'ye ulaşan sıcaklıklarda pH 9-11 arasında aktivitesini koruması, beyazlatıcı ve yüzey temizleyicilerin varlığında kararlı olması ve de deterjan içerisinde en az 1 sene aktivitesini kaybetmemesi gerekmektedir. Son yıllarda deterjanlarda kullanılan proteazlar, *Bacillus* türleri tarafından üretilen serin ve alkali proteazlardır. Çamaşır deterjanlarında kullanılan proteazlar; *B.licheniformis*, *B.amyloliquefaciens* veya *Bacillus* sp. den elde edilmektedir [15,21,30]. *Bacillus* suşları dışında, *Conidiobolus coronatus* türünden elde edilen bir alkali proteazın da Hindistan'da üretilen ticari deterjanlarda kullanıldığı belirtilmiştir. Endüstriyel alanda çalışan birçok firma, sürekli olarak katalitik aktiviteyi artıracak yeni enzimleri bulmaya, onları tanımlamaya ve büyük ölçekli proseslerde elde etmeye çalışmaktadır. Ayrıca protein mühendisliği metotlarıyla var olan suşların özelliklerinin geliştirilmesi ile de deterjan sanayisi için yeni proteazların üretilmesi yoluna gidilmektedir [31].

2.6.3. Tekstil Sanayisi

Tekstil sanayisinde proteazlar, protein esaslı ürünlerin enzimatik bir ilk işlem olan terbiyesinde uygulanmaktadır. Kumaş üretimi için gerekli olan maddeler değişik lif yapısındadır. Yün, ipek, angora, kaşmir doğal protein lifleri iken, soya fasulyesi ve mısır lifleri, kazein rejenere protein liflerindendir [33]. Protein esaslı liflerin özelliklerini aminoasitlerin cinsi, miktarı ve yerleşme şekli belirlemektedir. Bu özelliklere göre yün esaslı mamullere papain, pronaz ve pepsin ile müdahale edilerek liflerin esnekliği sağlanmış, doğal kirlerden arındırılmış ve daha beyaz bir renk elde edilmiştir. Bu işlemler proteolitik enzimlerle, kimyasal maddelere göre hem zamandan tasarruf ettirmiş hem de çok daha iyi sonuçlar vermiştir [34].

Yün gibi ipeğin de tekstilde kullanılabilmesi için proteazlarla muamele edilmesi gerekmektedir. Ham ipek ince, kesiksiz protein esaslı bir liftir. Ancak ham ipekte fibroin ve serisin adı verilen protein yapısında maddeler bulunmaktadır. Serisin maddesi ipeğin kaygan ve parlak bir görünümde olmasını engellediğinden istenmeyen bir maddedir. Bu madde ipeğin boyanmasında da oldukça zorluk çıkarır.

Proteolitik enzimlerle bu maddelerin giderilmesi gerekmektedir. Bu amaçla en çok pepsin, tripsin ve papain enzimleri kullanılmaktadır [33].

2.6.4. Endüstriyel ve Evsel Atıkların Giderilmesi

Proteazlar, gıda endüstrisinden üretim esnasında ve sonrasında meydana gelen atıklar ve evlerden çıkan atıkların geri dönüşümüne katkıda bulunurlar. Bu nedenle proteazlar oldukça çevrecidirler. Ayrıca, proteazların doğada atık olarak bol miktarda bulunan boynuz, kıl, tırnak ve saç gibi lifli proteinleri de yararlı biyokütle haline dönüştürebilmektedirler [36].

Bu konuda yapılan çalışmalarda, Venugopal ve ark. 1989'da *Bacillus megaterium* hücrelerini kalsiyum aljinat üzerine immobilize etmiş ve immobilize hücrelerle hücre dışı proteazları sararak balık etinin çözündürülmesini sağlamıştır [35].

1992 yılında Dalev ark. deri endüstrisindeki temel atıkları işlemek üzere *Bacillus subtilis* türünden ürettikleri alkali proteazla, atıklardan hayvansal tutkal ve bunların türevlerini yüksek verimlilikle üretmişlerdir. Ayrıca, Dalev *Bacillus subtilis* türünden üretilen alkali proteazların, kümes hayvanlarının kesim yerlerindeki kuş tüyü atıklarının işlenmesindeki kullanımını açıklamıştır [36]. Kümes hayvanlarının ağırlığının %5'ini tüyler oluşturur. Bu tüylerde bulunan sert keratin yapının tamamen parçalanması sonucu oluşan ürün önemli bir protein kaynağı olarak değerlendirilmektedir. Bu ürün yüksek protein içeriği nedeniyle yem olarak kullanılmaktadır [37].

2.6.5. Fotoğraf Endüstrisi

Alkali proteazlar, kullanılmış X-ışını filmleri ya da fotoğraf filmlerinden gümüş elde edilmesi amacıyla gerçekleştirilen proseslerde oldukça geniş kullanım alanına sahiptir. Kullanılmış filmler jelatin tabakalarında ortalama olarak %1.5-2 gümüş içermektedir. Bu gümüşün geri kazanılabilmesi için jelatin tabakasının filminden kesin bir şekilde ayrılması gerekmektedir. Geleneksel uygulamalarda, filmin yakılarak gümüşün geri kazanılması çevre kirliliğine sebep olmaktadır. Bu nedenle daha çevreci bir yöntem olan, jelatin tabakanın enzimatik hidrolizi tercih edilmekte ve bu yolla gümüşün yanında polyester filmin de geri kazanımı sağlanmaktadır. Bu

işlemede bakteriyel proteazların yanında pankreatik proteazlar kullanılabilir [38].

2.6.6. Kozmetik ve İlaç Sanayisi

Proteazlar; diş macunlarında, kozmetikte saç bakımı ürünlerinde, tüy dökücü ürünlerde ve kontak lens solüsyonlarında kullanılmaktadır. Cilt ve saç bakım ürünlerinde kullanılan kolajenoz hidrolizat ve elastin maddeleri sıkı tendonlarının proteolitik hidroliziyle elde edilmektedir [39].

Proteazların geniş spesifitesi ve çeşitliliği tedavi edici ajanların gelişiminde büyük bir avantaj olarak kullanılır. Subtilisin ya da kolajenaz yanık ve yara tedavisinde, antibiyotiklerin geniş bir aralıkta kullanımıyla kombine edilerek kullanılmaktadır. *Escherichia coli* türünden izole edilen asparajinaz lenfositik lösemilerin çeşitli formlarında kan akısından asparajini elimine etmek için kullanılmaktadır [8,11,20]. Şeker hastalarında yaraların geç iyileşmesine karşı proteaz absorban örtü tedavisinde metalloproteaz inhibitörleri kullanılarak, yaraların kronik halden akut hale geçmesi sağlanmıştır [40].

Proteazların geniş çeşitlilikleri ve özgünlükleri etkili tedavi edici ajanların geliştirilmesi amacıyla kullanılmasında büyük avantaj sağlamaktadır. *Aspergillus oryzae* küfünün proteazlarının ağız yoluyla alınması bazı litik enzim yetersizliği sendromlarının düzeltilmesine yardım etmek amacıyla sindirici olarak kullanılmaktadır [11].

2.6.7. Peptid Sentezi

Bergman ve ark, 1937'de yaptığı çalışma ile proteazlar yaygın olarak peptid sentezinde kullanılmaya başlanmıştır [41]. Bu çalışmada proteazların revers-enzimatik reaksiyonunu kullanarak proteaz katalizli peptid sentezinin gerçekleştirilebileceğini gösterilmiştir. Enzimatik peptid sentezi kimyasal metotlara göre birçok avantaja sahiptir. Reaksiyonlar steorospesifik olarak gerçekleştirilebilir ve reaktanlar yan-zincir korumasına ihtiyaç duymamaktadır [20,41].

Sentetik kimyada proteazların kullanılmasıdaki ana kısıtlayıcı faktör susuz koşullarda enzimatik aktivitenin azalmasıdır. Günümüzde Proteazlar kullanılarak dipeptidler ve tripeptidler başarılı bir şekilde sentezlenmektedir [42,43].



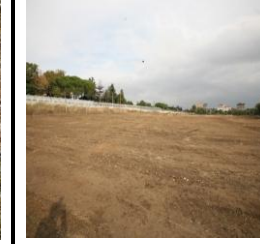
3. MATERYAL ve YÖNTEMLER

3.1. Materyal

3.1.1. Alınan Toprak Örnekleri

Ege Bölgesinden (Manisa, İzmir ve Aydın) önceden belirlenmiş 14 farklı alandan komposit örnekleme yöntemi ile alınmış toprak örnekleri laboratuara getirilmiş, izolasyon işlemleri için, +4 °C’de saklanmıştır. Toprak örneklerinin hangi lokasyonlardan alındıkları Şekil 3.1.’de verilmiştir.



1'nci İstasyon S1	2'nci İstasyon S2	3'nci İstasyon S3	4'nci İstasyon S4
			
Halil Beyli Köyü Besi Çiftliği	Halilbeyli Köyü Mezbahası	Bornova Şarap Yapım Evi Bahçesi	Aydın-Ortaklar Kesim Alanı
5'nci İstasyon S5	6'nci İstasyon S6	7'nci İstasyon S7	8'nci İstasyon S8
			
Kuşadası-Ortaklar Yolu Arası Makilik Alan	Kuşadası/Aydın Eski Yolu Baklagil Tarlası	Ortaklar Hayvan Kesim Alanı	Kuşadası – Aydın Kesim Artıkları Deşarj Alanı
9'nci İstasyon -S9	10'nci İstasyon -S10	11'nci İstasyon-S11	12'nci İstasyon S12
			
Tire Şeftali Tarlası	Tire Domates Bahçesi	Tire Nadas Alanı (Boş Ekim Tarlası)	Kuşadası - Davutlar Kesim Alanı
13'nci İstasyon S13		14'nci İstasyon S14	
			
Çiğli / Sasalı Arıtım Tesisi		Çiçekli Köyü Kangal Yetiştirme Çiftliği	

Şekil 3.1. Toprak örnekleme için seçilen istasyonlar

3.1.2. Kullanılan Besiyeri İçerikleri

İzolasyonda kullanılan Skim Milk Agarın içeriği Tablo 3.1.'de verilmiştir. Bu formülasyona göre hazırlanan besiyeri 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Ortamın pH'ı 1M NaOH ile 8.0'e ayarlanmıştır [61].

Tablo 3.1. Skim Milk Agar

Nutrient Broth (Merck)	8	gr
NaCl (Sigma)	10	gr
Skim Milk (Labm)	20	gr
MgSO ₄ .7H ₂ O (Sigma)	1	ml
Agar (Merck)	15	gr
Distile su	1000	ml
pH	8.0	

Fermentasyona başlamak için gerekli olan mikroorganizmanın geliştirilmesini ve aktif hale gelmesini sağlayan İnokulum (aşı) Ortamı içeriği Tablo 3.2'de, Fermentasyon Ortamı içeriği ise Tablo 3.3'de verilmiştir.

Tablo 3.2. İnokulum (Aşı) Ortamının İçeriği [61,63]

Nutrient Broth(Merck)	8	gr	Kazein (Labm)	4	gr
Pepton(Labm)	3	gr	Distile su	1000	ml
Maya Ekstratı (Labm)	4	gr	pH	8	

Tablo 3.3. Fermentasyon Ortamının İçeriği [61,63]

Glikoz (Merck)	10	gr	K ₂ HPO ₄ (Sigma)	2	gr
Kazein (Labm)	5	gr	MgSO ₄ .H ₂ O (Sigma)	1	gr
Maya ekstresi (Labm)	5	gr	Distile su	1000	ml
KH ₂ PO ₄ (Sigma)	2	gr			

İzolatların saflık kontrolleri ve stok kültürlerinin hazırlanmasında içeriği Tablo 3.4’de görülen Nutrient Agar (Merck) kullanılmıştır.

Tablo 3.4. Nutrient Agar İçeriği (Merck)

Pepton	5	gr	Distile su	1000	ml
Maya ekstresi	3	gr			
Agar	12	gr			pH 7.0 +/- 0.2

3.1.3. Kullanılan Test Kitleri

İzolatlar arasındaki *Bacillus* cinsi üyelerinin tayininde mikroskobik incelemelerle beraber API 50CHB ve API 20E biyokimyasal test kitleri kullanılmıştır. Bu kitler Biomeriaux firmasından temin edilmiştir.

3.1.4. Kullanılan Boyalar ve Kimyasal Çözeltiler

3.1.4.1. Kristal Violet Çözeltisi

Gram boyama için kullanılan bu çözeltinin içeriği Tablo 3.5.’de verilmiştir. Kristal violet ile Asit-fenik kristali porselen kapta havan yardımı ile ezilir. Alkol eklenerek çözülür ve 100 ml distile su eklenir [44].

Tablo 3.5. Kristal Violet Çözeltisi İçeriği

Kristal violet (Merck)	1	gr	Distile su	100	ml
Asit-Fenik Kristali (Sigma)	2	gr			
Etil Alkol %95'lik (Merck)	10	ml			

3.1.4.2. Lugol

Gram boyamada kullanılan bu çözeltiyi hazırlamak için bir gram iyot (Sigma) ile iki gram potasyum iyodür (Sigma) havanda 10 ml etanol (%95'lik) içinde ezilerek çözüldükten sonra 300 ml distile su eklenerek hazırlanır. [44].

3.1.4.3. Safranin Solüsyonu

Gram boyama için kullanılan bu çözelti 0.56 gr Safranin (Merck) 300 ml distile su içerisinde çözündürülerek hazırlanır.

3.1.4.4. NaOH Çözeltisi (1M)

pH ayarlama da kullanılan bu çözelti %98'lik NaOH (Merck)'den 20.41 gr alınıp 500 ml balon joje içerisinde 500 ml distile su ile çözülerek hazırlanır.

3.1.4.5. H₂O₂ Çözeltisi (%3'lük)

H₂O₂ (Merck)'den 15 ml alınır, 500 ml hacimli balon joje içerisine konur ve distile su ile hacim 500 ml'ye tamamlanarak hazırlanır. Katalaz testi için kullanılır.

3.1.4.6. Malaşit Yeşili Solüsyonu

Endospor boyamada kullanılan bu çözelti 1 gram Malaşit Yeşili (Merck) havan içerisinde ezilerek hafif bir şekilde 100 ml distile su içerisinde çözündürülerek hazırlanır. Hazırlanan solüsyon koyu renkli şişede +4C⁰'de saklanır [44].

3.1.4.7. Metilen Mavisi Solüsyonu

İlk olarak 1,5 gram Metilen Mavisi (Merck) 100 ml %95'lik Etil alkol içerisinde çözündürülerek stok solüsyonu hazırlanır. Ayrıca 0.01 gr Potasyum Hidroksit (Sigma) 100 ml distile su içerisinde çözündürülür. %0.01 KOH çözeltisi ile 30 ml stok solüsyonu karıştırılarak metilen mavisi solüsyonu hazırlanır [44].

3.1.4.8. Folin Ciocalteu Reaktif Solüsyonu

10 ml Folin Ciocalteu Reaktifi (Sigma) 10 ml distile su ile karıştırılır. Koyu renkli şişede +4C⁰'de saklanır. Proteaz aktivitesi belirlemede kullanılmıştır.

3.1.4.9. %10'luk TCA (Tri kloro asetik asit) Solüsyonu

25 ml TCA (Merck) 250 ml balon joje içerisinde distile su ile hacmen 250 ml'ye tamamlanır. Proteaz aktivitesi belirlemede kullanılmıştır.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Proteaz Pozitif Bakterilerin İzolasyonu

İzolasyon için Tablo 3.1.'de içeriği belirtilen Skim Milk Agar besiyeri kullanıldı. Besiyeri bileşenleri tamamen eriyinceye kadar sıcak tablada karıştırıldı. Sonrasında bu ortam 45-50 °C' ye kadar soğutuldu, ısı problu pH metre kullanılarak pH'ı 1M NaOH ile 8.0'e ayarlandı. Besiyeri 121 °C'de 15 dakika 1 atmosfer basınçta steril edildi. Aynı olarak steril su ile hazırlanmış kazein besiyerine eklendi. Ekleme işleminden sonra kazeinin çökmemesi için ısı uygulaması yapılmadan manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Dökme sıcaklığına kadar soğutulan besiyeri steril petri kaplarına 15-20 ml olacak şekilde konularak donmaya bırakılmıştır.

1 gram toprak örneği 10 ml distile suda, vorteks ile en az 15 dakika boyunca karıştırılarak, tamamen homojen hale gelmesi sağlandı. Sonrasında 85°C'de 10 dakika tutularak ön işleminden geçirilmiş toprak örneği dilüsyonlarından 10⁻⁴ ve 10⁻⁵'e kadar seyreltmeler hazırlanmış, uygun seyreltmelerden 1'er ml besiyeri üzerine aktararak steril ekivüyon ile yayma işlemi uygulanmıştır. 10 dakika oda sıcaklığında beklenerek besiyerinin örnekleri emmesi sağlanmış, sonrasında ekimi yapılmış petripler 30°C' de 7-10 gün inkübatörde inkübasyona alınmıştır. 2'nci

günden itibaren her gün gelişen kolonilerin kazein hidrolizi zonları kaydedilmiştir. Kazein hidroliz zonları büyük olan bakteri kolonileri seçilerek numaralandırılmıştır. Preparasyonları (Metilen Mavisi-Basit Boyama) yapılmış ve tipik endospor gözlenen basil formundaki kolonilerden alınarak çizgi plaka yöntemiyle Tablo 3.4. Nutrient Agar (Merck) besiyerinde saflaştırılarak yine aynı besiyerinde stok kültürleri oluşturulmuş, ileriki incelemeler için +4 °C' ye kaldırılmıştır.

3.2.2. İzolatların Morfolojik ve Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

İzolasyon yapılan her istasyonun en aktif izolatlarına sırasıyla gram boyama, spor boyama, katalaz testi, hareketlilik testi ve nişasta hidrolizi testi uygulanmıştır.

3.2.2.1. Gram Boyama

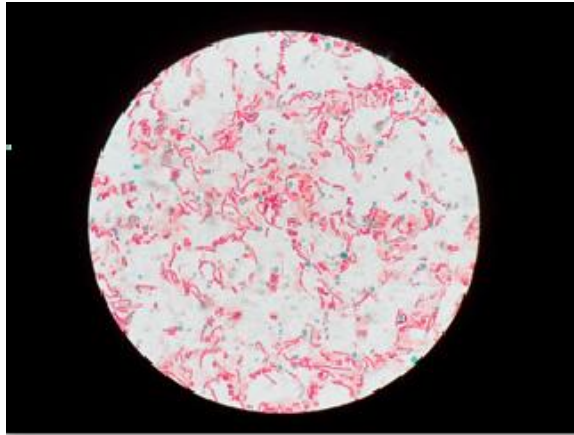
Gram boyama tekniği, mikrobiyolojide sıklıkla kullanılan bir yöntem olup mikroorganizmaların klasifikasyon ve identifikasyonunda yararlanır. Tek koloni olarak mikroorganizma öze ile alınır ve preparat hazırlanır. Bu preparat havada kurutulur ve kurutma işlemi biter bitmez bek alevinden 2-3 defa geçirilir. Bu şekilde smir tabakası hazırlanmış olur. Smir tabakasına ilk olarak kristal violet çözeltisi uygulanır. Bu boya ile 2 dakika muamele edilir. Fazlalık boya dökülür ve lugol solüsyonu eklenir. 1 dakika boyunca muamele edildikten sonra fazlası dökülür. Daha sonra etil alkol ile 10-15 saniye arasında muamele edilir. Bu işlem esnasında dikkat edilmesi gereken 2 önemli nokta vardır. İlk olarak alkol kesinlikle belirtilen süreleri aşmamalıdır. İkincisi ise boya uygulanırken alkol renksiz akıncaya dek uygulanmalıdır, yoksa artık boya kalabilir. Bu iki noktaya dikkat edilmezse yanlış sonuç alınabilir. Alkol uygulamasından sonra distile su ile alkol tamamen uzaklaştırılır. Daha sonra karşıt boya olarak safranin ile 45 saniye muamele edilir. Artık boya distile su ile uzaklaştırılır. Preparat son olarak havada kurutulur. Kurutma işlemi bitince immersiyon yağı preparata damlatılarak immersiyon objektifinde incelemeye alınır. İncelemede mor-mavi gözüken mikroorganizmalar gram pozitif (Şekil 3.2.), pembe-kırmızı gözüken mikroorganizmalar ise gram negatif olarak kabul edilir [44].



Şekil 3.2. Gram pozitif bakterilerinin görünümü

3.2.2.2. Spor Boyama

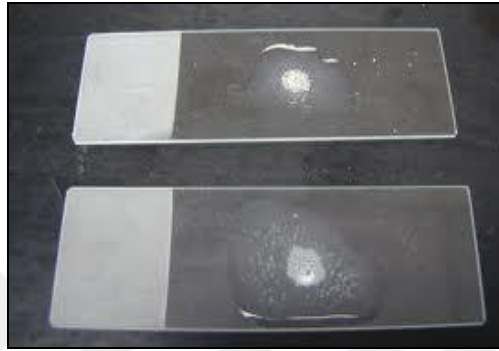
Endospor boyama işlemi “Özkaya ve ark., 2000” nın belirttiği yöntemle yapılmıştır [44]. Buna göre; 5 gün boyunca inkübasyona bırakılmış kültürlerden alınarak hazırlanan preparat havada kurutulmuş, ardından 3 kez alevden geçirilerek fikse edilmiştir. Preparatlar malaşit yeşili çözeltisi ile örtülüp bek alevinde 5 dakika ısıtılarak etkiye bırakılmış, çözelti buharlaştıkça ilave edilmiştir. Preparatların kurumamasına dikkat edilmelidir. Yoksa mikroorganizmalar zarar görebilir. Soğutulduktan sonra distile su ile yıkanan preparatlara karşıt boya olarak 30 saniye safranin uygulanmış, distile suyla tekrar yıkanıp havada kurutulduktan sonra bakteri sporlarının morfolojileri mikroskopta incelenmiştir (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. Spor Boyama sonucu mikroskopta preparat görüntüsü (Yeşil renkli yapılar endospordur).

3.2.2.3. Katalaz Testi

Katalaz testinde katı ve sıvı ortamlar kullanılarak, farklı yöntemlerle test yapılabilmektedir. Çalışmada ise Tablo 3.1’de ki formülasyona göre hazırlanan ortama ekilmiş bakteriler, 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda oluşan koloniler üzerine 1-2 damla %3’lük H_2O_2 damlatılmış ve gaz çıkışı (Şekil 3.4.) meydana getirenler katalaz enzimine sahip olduklarından dolayı pozitif, getirmeyenler ise negatif olarak değerlendirilmiştir [44].

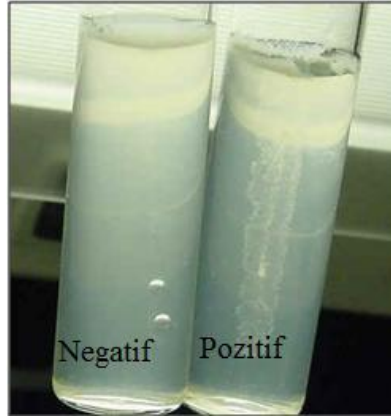


Şekil 3.4. Katalaz testi

3.2.2.4. Hareketlilik Testi

Bazı bakteriler, flagella adı verilen hücre organelleri sayesinde aktif hareket yeteneğine sahiptirler. Bakterilerde hareket daha çok flagella varlığının belirlenmesi değil, hareketin gösterilmesi şeklinde ortaya konmaktadır. Makroskobik ve mikroskobik olarak yapılabilen hareketlilik testinde, uygun koşullarda geliştirilmiş 18 - 24 saatlik genç kültürler ihtiyacı vardır [44].

Tüplere dağıtılan yumuşak agarlı besiyerinin, sterilizasyondan sonra dik olarak donması sağlanır. Bu besiyerine 18-24 saatlik genç bakteri kültüründen aşı iğnesi ile aşılama yapılır. Optimum sıcaklıkta 48 saatlik inkübasyon sonunda inokülasyon hattının yanlarına doğru yayılmış, bulanıklık şeklinde gözlenen büyüme bakterinin hareketli olduğu (Şekil 3.5), sadece inokülasyon hattında gözlenen bakteri gelişimi ise hareketsiz olduğunu gösterir [44].



Şekil 3.5. Hareketlilik testi

3.2.2.5. API Test Kitlerinin Uygulanması

API CHB ve API 20E test kitleri Biomeriaux firmasından tedarik edilmiş, izolatların tanılanması için kullanılmıştır.

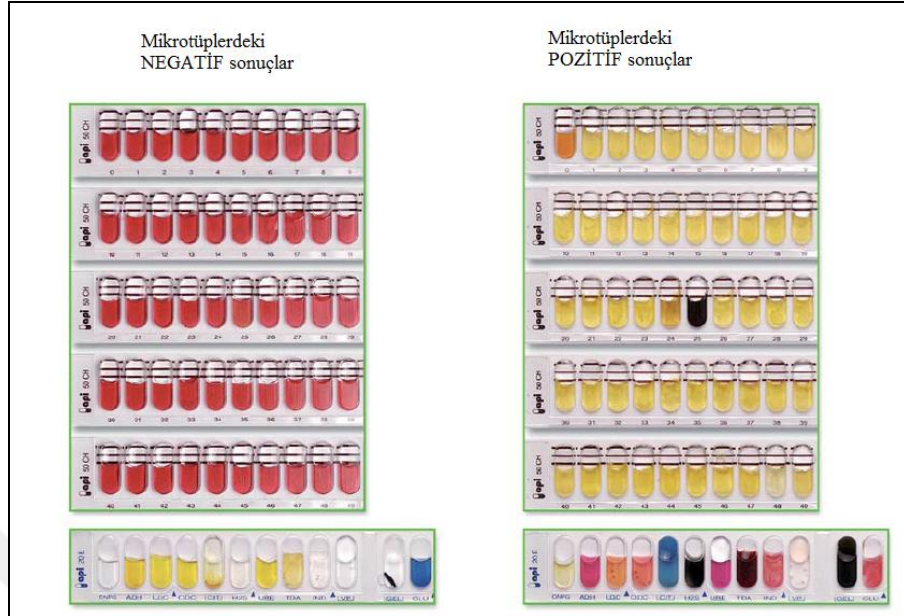
API 50CHB stribi, karbonhidrat ailesi ve onun türevlerine ait (heterositler, polialkoller, üronik asitler) olan substratların fermentasyonunu kullanan 50 mikrotüp içerir. Fermentasyon testleri için uygulacak örnekler içerisinde amonyum sülfat, maya özütü, fenol kırmızısı ve tripton içeren 10 ml ortamlara aşılanırlar. İnkübasyon sırasında, fermentasyon asidin anaerobik üretimi ile ve seçilen besiyerinde bulunan pH indükatörü tarafından saptanan tüpte renk değişimi ile ortaya çıkar.

Stribin hazırlanması; Bir inkübasyon kutusu hazırlanır (Tepsi ve kapak), steril distile su ile tepsinin bal peteği kuyucuklarına nemli bir ortam oluşturabilmek için steril pasteur pipeti ile dağıtılır. Stripler inkübasyon tepsisine yerleştirilir.

Ekimin hazırlanması; Üremesine uygun bir besiyerinde mikroorganizmanın kültürü yapılır. 24-48 saat arasında inkübasyona bırakılan mikroorganizma daha sonra öze ile alınır ve içeriğinde amonyum sülfat, maya özütü, fenol kırmızısı ve tripton bulunduran 10ml tüplere aşılanır. Tüplerin homojenliği sağlanır.

Striplerin ekimi; 10 ml tüplerden steril pipet kullanılarak 50 tüpe dağıtılır. İnkübasyon kutusu hafifçe öne doğru eğilir, küpül kenarına pipet ucunu dayıyarak hava kabarcığı oluşumundan kaçınılır. Tüp ve küpül tamamen dolduğu zaman, konkav veya kabarcık oluşumundan kaçınılmalıdır. Stripler 30 °C'de 24 saat

inkübasyona bırakılır. Tam gelişim göstermeyenler için bu süre 48 saate kadar uzatılır. 50 CHB'nin pozitif ve negatif sonuçları Şekil 3.6.'da verilmiştir.



Şekil 3.6. API 50 CHB ve API 20E test kitlerinin pozitif ve negatif sonuçları

API 20E stribi dehydrate substratlar içeren 20 mikrotüpten oluşmaktadır. Bu testler ortamın yeniden hazırlanmasını sağlayan bir bakteriyel süspansiyon ile inoküle edilir. İnkübasyon sırasında, metabolizma sonucu spontan olarak, ya da reaktiflerin eklenmesiyle renk değişimi oluşmaktadır.

Stribin hazırlanması; İnkübasyon kutusunu (tepsi ve kapak) hazırlayınız ve nemli bir ortam hazırlamak için tepsi kuyucuklarına distile su dağıtılır. Strip paketinden çıkartılır ve dikkatlice inkübasyon kutusuna yerleştirilir.

Ekimin hazırlanması; Üremesine uygun bir besiyerinde mikroorganizmanın kültürü yapılır. 24-48 saat arasında inkübasyona bırakılan mikroorganizma daha sonra öze ile alınır ve 2 ml'lik tüpler içerisinde bulunan 0.85'lik NaCl çözeltisine aktarılır. Tüpler karıştırılarak homojenliği sağlanır. Süspansiyon hazırlandıktan sonra hızlıca kullanılır.

Striplerin ekimi; Steril pipetle, strip tüplerine bakteri süspansiyonunu tüpün dibinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde dağıtılır. CIT, VP ve GEL testlerinin tüp ve küpülü bakteriyel süspansiyon ile doldurulur. Diğer testlerin sadece tüp bölümleri

(küpül değil) doldurulur. ADH, LDC, ODC, H₂S ve URE testlerinde anaerobik ortam oluşturmak için üst yüzey mineral yağ ile kaplanır. İnkübasyon kutusu kapatılır. 18-24 saat 36 °C’de inkübasyona bırakılır. API 20E’nin pozitif ve negatif sonuçları Şekil 3.5’de verilmiştir. Sonuç alınırken TDA tüpçüğüne TDA reaktifinden bir damla, IND tüpçüğüne JAMES reaktifinden bir damla eklenerek hemen bakılır. VP tüpçüğünde ise ilk olarak bir damla VP 1 ve bir damla VP 2 reaktifleri eklenerek 10 dakika sonra bakılır.

3.2.3. Proteaz Aktivitesine Fermentasyon Koşullarının Etkisinin Belirlenmesi

3.2.3.1. İnokulum Ortamı (Aşı Ortamı)’nda Geliştirme

Toprak örneklerinden izole edilmiş en aktif suşlar yatık nutrient agarlarda 4°C’de saklandı. Buradan öze ile alınan izolat Tablo 3.2’de formülü verilen aşı ortamına ekilerek 30°C’de 120 rpm çalkalama hızında pH 8.0’e ayarlanarak 24 saat inkübasyona bırakılmış. Süre sonunda inokulumun hacimce %1,5’u alınmış ve fermentasyon ortamına aktarılmıştır. Aşı ortamında herhangi bir kontaminasyon olup olmadığı da nutrient agarlara çizgi ekim yapılarak kontrol edilmiştir. Kontaminasyona uğramayan inokulum 2-3 hafta kullanılmıştır.

3.2.3.2. Fermentasyon Ortamı, Bileşenleri ve Aşılama

Tablo 3.3’de ki formüle göre hazırlanan fermentasyon ortamından 50 ml hazırlandı ve 250 ml’lik erlenlere konuldu. İlk denemelerde pH 8.0’e ayarlandı (1M NaOH’dan eklenerek). Hazırlanan ortamlara aşı ortamının hacimce %1,5’u alınarak ekildi. Fermentasyon sonrasında örneklerden 1.5 ml pipetle alındı ve ependorf tüplerine konuldu. Bu tüplerdeki örnekler 4°C’lik soğutmalı santifüjde 10 dk 10.000 rpm’de santifüj edildi. Tüplerin üst kısmında kalan süpernatant kısmı alındı.

3.2.3.3. İzolatlarda Proteaz Aktivitesi Tayini

Substrat solüsyonu olarak her işlemde yeniden hazırlanmak üzere 20 ml distile su içerisine 0.4 gramı suda çözünebilen kazein katılarak %2.0’lik kazein solüsyonu hazırlanmıştır. Kazeinin çözünmesi esnasında kesinlikle ısı işlemi uygulanmamıştır. Hazırlanan kazein solüsyonunun 10 ml’si ile buffer (tampon)

  zeltilerinin (pH 8.0) 10 ml'si ile karıştırılmış, Bu karışım 30  C'de 30 dakika inkübatörde bekletilmiştir. 0.5 ml enzim solüsyonu ile 0,5 ml substrat-tampon solüsyonu karıştırılmıştır. Enzimin kazeinle reaksiyona girebilmesi için 37  C'de 15 dakika su banyosunda bekletilmiştir. Reaksiyon sonunda karışım  i  beklemeden 1ml %10'luk TCA (trikloroasetik asit) eklenmiş ve 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu sayede reaksiyonun durdurulması sağlanmıştır. Tüm karışım 10.000 rpm'de 4 C'de 15 dk santifüj edilmiş. İşlem sonucunda dip kısımda bir miktar kazein çöktüğü gözlemlenmiştir. Üst kısımda kalan süpernatant kısmı alınmıştır. 1 ml 0.2M NaOH eklenmiştir. Bunun sonucunda karışım  daha sonra eklenecek FCR'nin rengini alabilmesi için pH 10.0'nun üzerine çıkartılmıştır. Bire bir seyreltilmiş olan FCR'den 0.25 ml tüm karışım  klenmiş ve en az 25 dakika olmak üzere 40 dakika karanlıkta bekletilmiştir. Dipte meydana gelen   kelektan dolayı tekrar bir santifüj uygulanmış (10.000 rpm 10 dk), üst kısımda kalan süpernatant pipetle alınarak spektrofotometrede 660 nm'de okutularak absorbans değerleri kaydedilmiştir [59, 61, 63 ve 72].

3.2.3.4. Proteaz  retimine Etki Eden Faktörlerin Belirlenmesi:

 lk olarak inkübasyon süresi belirlendi daha sonra sırasıyla sıcaklık, pH, farklı karbon ve farklı azot kaynakları çalışılmıştır.

3.2.3.4.1. İnkübasyon Süresi

Enzimin en fazla üretildiği zamanın belirlenmesi için S11-UKM ve S9-UKM izolatının 3 paralel aynı ortam kültürü hazırlanmıştır. Ortamların pH'ı NaOH (1 M) eklenerek 8.0'e, sıcaklık ise 30  C ye ayarlanmıştır. Bu ortamlara inokulum ortamının %1.5'u aşılanmış ve 120 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. Her 24 saatte bir alkali proteaz aktivitelerine bakılmıştır.

3.2.3.4.2. Sıcaklık

Enzimin hangi sıcaklıklarda daha fazla üretildiğinin belirlenmesi için S9-UKM ve S11-UKM izolatlarından 3 paralel aynı ortam kültürü hazırlanmıştır. Daha sonra NaOH (1M) eklenerek ortam pH'ları 8.0'e ayarlanmıştır. Bu ortamlara inokulum ortamının %1.5'u aşılanmış ve 72 saat 120 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. Bu deney farklı inkübasyon sıcaklıklarında (27 C, 30 C, 33 C ve

37°C’de) uygulanmıştır. Süreler sonunda bu ortamlardan kontaminasyona uğramayanlar analiz için işleme alınmıştır.

3.2.3.4.3. pH

Mikroorganizmaların ve enzimin hangi pH aralıklarında daha fazla üretildiğinin belirlenmesi için S9-UKM ve S11-UKM izolatlarından 3 paralel aynı ortam kültürü hazırlanmıştır. Daha sonra NaOH (1M) eklenerek ortam pH’ları sırasıyla 7.2 / 8.0 / 8.6 / 9.5’e ayarlanmış ve bu hazırlanan ortamlara inokulum ortamının %1.5’u aşılanmıştır. 33°C’de, 72 saat ve 120 rpm’de inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda bu ortamlardan kontaminasyona uğramayanlar analiz için işleme alınmıştır.

3.2.3.4.4. Farklı Karbon Kaynakları

Mikroorganizmaların üremesinde karbon kaynaklarının önemi göz önüne alınarak farklı karbon kaynakları ile çalışılmıştır. Bu amaçla, enzim üretim ortamında bulunan glikoz yerine, aynı oranda galaktoz, arabinoz, maltoz ve gliserol karbon kaynağı olarak kullanılmıştır.

Enzimin hangi karbon kaynaklarında daha fazla üretildiğinin belirlenmesi için S9-UKM ve S11-UKM izolatlarından 3 paralel aynı ortam kültürü hazırlanmış ve pH 7.2 ayarlanmıştır. Bu ortamlara inokulum ortamının %1.5’u aşılanmış ve 33 °C’de, 72 saat, 120 rpm’de inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda bu ortamlardan kontaminasyona uğramayanlar analiz için işleme alınmıştır.

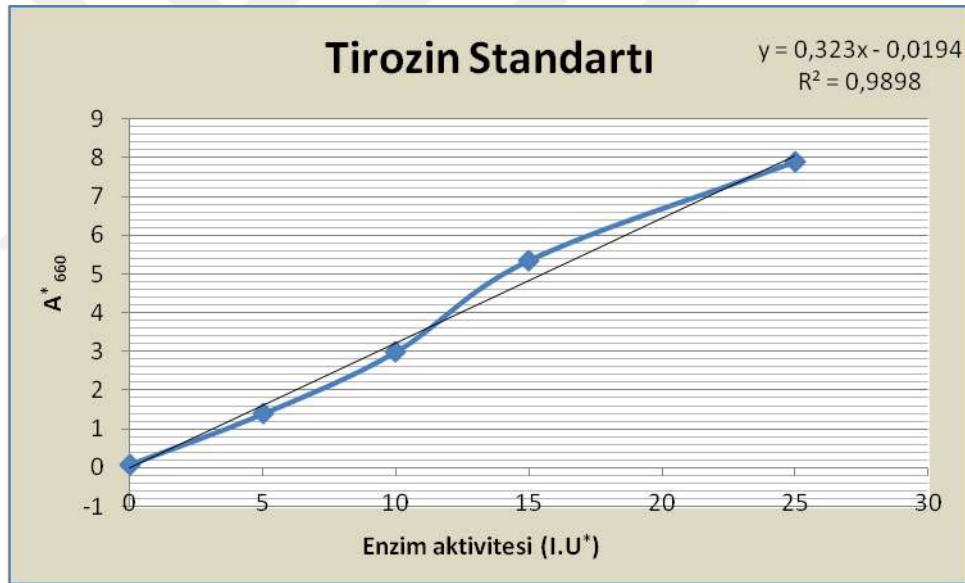
3.2.3.4.5. Farklı Azot Kaynakları

Azot kaynaklarının bakteri üremesi ve enzim üretimi üzerine etkilerini belirlemek amacıyla kazein ve maya ekstresi ortamdan çıkarılmıştır. Bunların yerine bakteriyolojik pepton, üre, maya ekstresi, asparajin ve amonyum sülfat kullanılmıştır. Bunlar içerisinde amonyum sülfat inorganik diğerleri ise organik bir azot kaynağıdır. Farklı azot kaynaklarının her birinden 250 ml erlenlere 50 ml aynı iki paralel ortam hazırlanmıştır. pH 7.2’e ayarlandıktan sonra inokulumdan hazırlanan ortamlara ortamın %1.5’u aşılanmıştır. Bu işlemten sonra ortamlar 33 °C’de, 72 saat,

120 rpm’de inkübasyona bırakılmış ve süre sonunda bu ortamlardan kontaminasyona uğramayanlar analiz için işleme alınmıştır.

3.2.3.5. Tirozin ile Standartın Hazırlanması

Proteaz aktivitesi ölçümlerinde enzimin yerine kullanılan çözelti hazırlanmıştır. Yönteme göre 1 mg/mL tirozin, 2 U/mL enzim aktivitesine karşılık gelmektedir. Bu sebeple 250 mg tirozin (Merck) 50 ml distile su içerisinde çözünmüştür. 121⁰C’de 10 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Daha sonra 0.5 ml’lik çözelti enzimle beraber aynı işlemlerden geçirilerek spektrofotometrede 660 nm’de okutularak absorbans değerleri kaydedilmiştir (Şekil 3.7). Enzim aktivitesi standart koşullarda, 1 U/mL tirozin açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır [45,61].



Şekil 3.7. Tirozin standartı

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Araştırma Bulguları

4.1.1. Toprakтан İzolasyonu Yapılan ve Proteaz Aktivitesine Sahip İzolatlar

İzmir, Aydın ve Manisa'daki toplam 14 farklı istasyondan elde edilen toprak örneklerinin 10^{-4} , 10^{-5} dilüsyonları hazırlanmıştır. Bunlardan Skim Milk Agar içeren petrilere 1'er ml ekilmiş ve 30 °C'de 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda petrilere gelişen koloniler tek tek sayılmış, her bir dilüsyonda kaç tane aktif (kazein hidroliz zonu meydana getiren) ve aktif olmayan kolonilerin bulunduğu Tablo 4.1'de verilmiştir. Hangi kolonilerin daha aktif olduğu; aktif koloninin meydana getirdiği kazein hidroliz zonu çapının, beraber ölçülen koloni çapına bölünmesiyle değerlendirilmiştir. Herbir istasyondan seçilen en aktif kolonilerin toplam çap/koloni çapı Tablo 4.2'de verilmiştir.

14 farklı istasyondan elde edilen toplam 361 koloniden 162 tanesi kazein hidroliz zonu meydana getirdi. Her istasyondan en aktif olan izolatlar seçilerek izolatın cinsinin belirlenebilmesi için fizyolojik ve biyokimyasal testlere geçildi.

Tablo 4.1. Ekilen Toprak Örneklerinde Gözlenen Proteazca Aktif Olan ve Olmayan Koloni Sayıları

İstasyon	Aktif Koloni Sayısı		Aktif Olmayan Koloni Sayısı	Toplam Koloni Sayısı
	10 ⁻⁴ 'lük dilüsyon	10 ⁻⁵ 'lik dilüsyon		
S1	14	8	26	48
S2	11	13	20	44
S3	6	3	15	24
S4	5	2	13	20
S5	7	2	16	25
S6	1	3	7	11
S7	7	2	16	25
S8	8	2	17	27
S9	15	1	5	21
S10	13	0	18	31
S11	8	5	19	32
S12	10	0	11	21
S13	4	1	7	12
S14	4	7	9	20
Toplam Koloni Sayısı	113	49	199	361

Tablo 4.2. Farklı istasyondan elde edilen proteazca aktif kolonilerin toplam çap/koloni çapı ortalamaları ve en aktif izolatın toplam çap/koloni çapı oranları.

İstasyonlar	Aktif Koloni Sayısı	Aktif Kolonilerin Toplam Çapı/Koloni Çapı Ortalaması	Seçilen En Aktif İzolatın Toplam Çapı/Koloni Çapı Oranı
S1	22	2,07	3,24
S2	24	2,24	3,15
S3	9	1,97	3,95
S4	7	1,92	2,98
S5	9	2,33	3,66
S6	4	2,85	3,29
S7	9	2,19	3,11
S8	10	2,47	3,08
S9	16	2,07	3,42
S10	13	2,60	3,66
S11	13	1,77	4,0
S12	10	2,18	3,25
S13	5	1,80	2,43
S14	11	1,83	3,33

4.1.2. İzolatlara Uygulanan Fizyolojik, Biyokimyasal ve API Testi

Sonuçları

Toprak örneklerinden izole edilen proteazca aktif 14 farklı istasyondan alınan en aktif 14 izolata ilk olarak Gram boyaması, Endospor boyama, Katalaz testi, Hareketlilik testi uygulanmıştır.

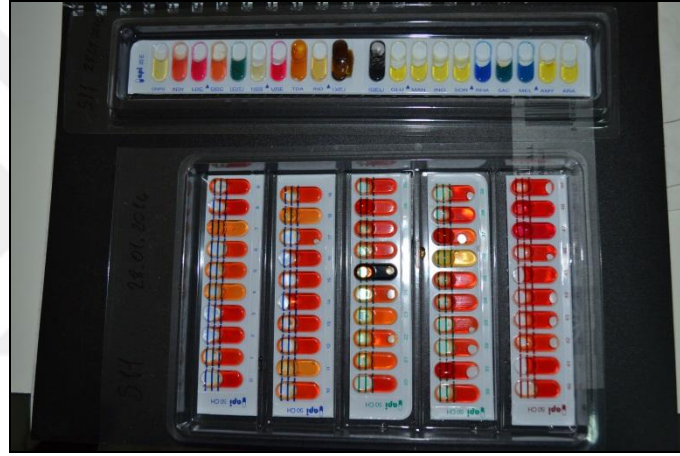
Tablo 4.3. İzolatlara uygulanan biyokimyasal testler

İzolat no	Morfolojik Şekil	Gram Boyama	Endospor Boyama	Hareketlilik Testi	Katalaz Testi
S1-UKM	Basil	+	+	+	+
S2-UKM	Basil	+	+	+	+
S3-UKM	Kok	-	-	-	-
S4-UKM	Basil	+	+	+	+
S5-UKM	Kok	-	-	-	+
S6-UKM	Basil	+	+	+	+
S7-UKM	Basil	+	+	+	+
S8-UKM	Basil	+	+	+	+
S9-UKM	Basil	+	+	+	+
S10-UKM	Kok	-	-	+	+
S11-UKM	Basil	+	+	+	+
S12-UKM	Basil	+	+	+	+
S13-UKM	Basil	+	+	+	+
S14-UKM	Basil	+	+	-	+

Uygulanan testler sonucunda *Bacillus* cinsi bakterilerin tipik özellikleri olan gram pozitiflik, spor oluşturma, hareketlilik ve katalaz testine pozitif reaksiyon verenler ayrılmıştır (Tablo 4.3). Bunlar içerisinde en yüksek kazein hidroliz zonunu meydana getiren S9-UKM ve S11-UKM izolatları seçilmiştir. Arkasından bu izolatlara API 50CHB ve 20E Testleri uygulanmıştır. Bu testlerin sonucu girildiği API Software programı S9-UKM izolatının *Bacillus thuringiensis*, S11-UKM izolatının ise *Bacillus subtilis* olduğunu öngörmüştür. S9-UKM izolatının API test sonuçları Şekil 4.1’de, S11-UKM izolatının ise Şekil 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.1.S9-UKM izolatının API50CHB(aşağıda) ve API20E(yukarıda) sonuçları



Şekil 4.2. S11-UKM izolatının API 50CHB (aşağıdaki) ve API 20E (yukarıdaki) sonuçları

4.1.3. Proteaz Üretimine Etki Eden Faktörlerin İncelenmesi

4.1.3.1. İnkübasyon Süresinin Proteaz Üretimine Etkisi Sonuçları

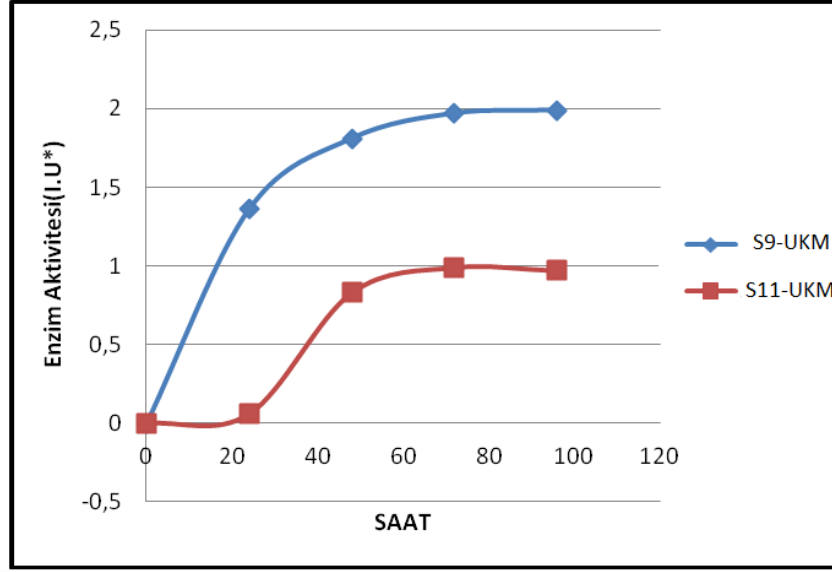
S9-UKM ve S11-UKM izolatları 30⁰C’de, pH 8’de ve 120 rpm çalkalama hızında 4 gün boyunca inkübasyona bırakıldı. Her 24 saat sonunda örnekler analize alındı. Bunun sonucunda hem S9-UKM hem de S11-UKM izolatlarında en fazla enzim miktarı 3’ncü günün sonunda elde edildi. S9-UKM izolatı ile bulgular Tablo 4.4’de, S11-UKM ile ilgili bulgular Tablo 4.5’de verilmiştir. S9-UKM ve S11-UKM izolatlarının ürettiği enzimin inkübasyon süreleri bakımından birbirleri ile karşılaştırılmaları Şekil 4.3’de verilmiştir.

Tablo 4.4. S9-UKM izolatında enzimin en fazla üretildiği zamanın belirlenmesi denemesi bulguları (*IU: International Unit; A: Absorbans)

	1.gün		2.gün		3.gün		4.gün	
	A [*] ₆₆₀	Enzim aktivitesi (I.U [*])	A [*] ₆₆₀	Enzim aktivitesi (I.U [*])	A [*] ₆₆₀	Enzim aktivitesi (I.U [*])	A [*] ₆₆₀	Enzim aktivitesi (I.U [*])
S9-UKM	0.3811	1.36	0.5416	1.81	0.5818	1.97	0.5950	1.99
Standart	1.3987	5	1.4951	5	1.4703	5	1.4901	5

Tablo 4.5. S11-UKM izolatında enzimin en fazla üretildiği zamanın belirlenmesi denemesi bulguları (*IU: International Unit; A: Absorbans)

	1.gün		2.gün		3.gün		4.gün	
	A [*] ₆₆₀	Enzim aktivitesi (I.U [*])	A [*] ₆₆₀	Enzim aktivitesi (I.U [*])	A [*] ₆₆₀	Enzim aktivitesi (I.U [*])	A [*] ₆₆₀	Enzim aktivitesi (I.U [*])
S11-UKM	0.0206	-	0.2535	0.83	0.2973	0.99	0.3015	0.97
Standart	1.6031	5	1.5169	5	1.4989	5	1.5397	5



Şekil 4.3. S9-UKM ve S11-UKM izolatlarının meydana getirdiği enzimin en fazla üretildiği zamanın birbirleriyle karşılaştırılması (*IU: International Unit)

4.1.3.2. Sıcaklığın Etkisi Üzerine Yapılan Çalışma Sonuçları

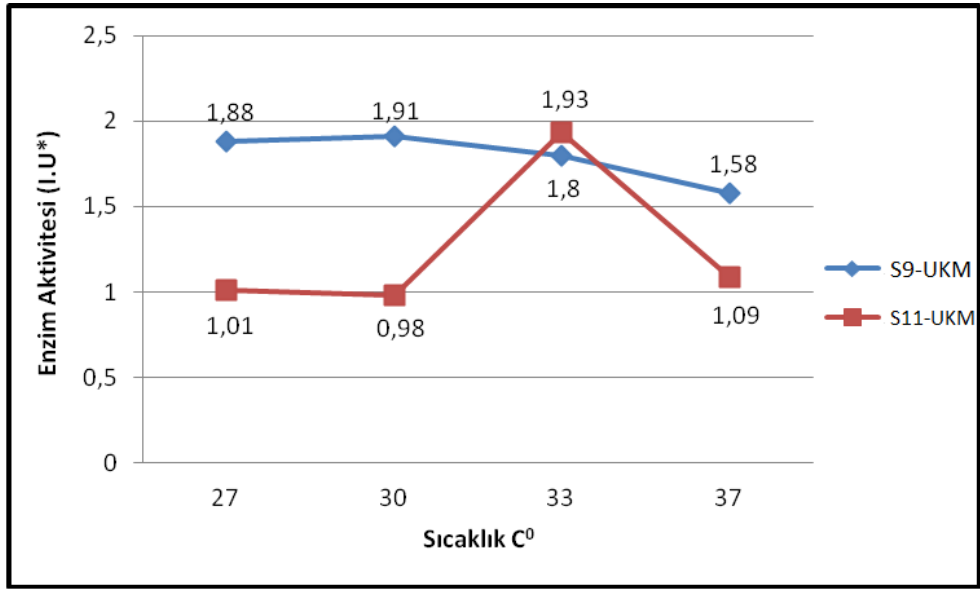
Ortamın sıcaklığının enzim üretimine etkisinin belirlenmesi için; S9-UKM ve S11-UKM izolatları 4 farklı ortam sıcaklığında her ikisi de 3 gün boyunca 120 rpm çalkalama hızında inkübasyona bırakıldı. Bunun deneme sonucunda S9-UKM izolatı için enzim miktarının en fazla olduğu sıcaklık derecesi 30⁰C iken (Tablo 4.6), S11-UKM izolatı için 33⁰C olarak (Tablo 4.7) belirlenmiştir. S9-UKM ve S11-UKM izolatlarının ürettiği enzimin inkübasyon sıcaklıkları bakımından birbirleri ile karşılaştırılmaları Şekil 4.4’de görülmektedir.

Tablo 4.6. S9-UKM izolatu için ortamın sıcaklığına bağlı olarak değişen enzim miktarları (*IU: International Unit; A: Absorbans)

	27°C		30 °C		33 °C		37 °C	
	A* ₆₆₀	Enzim aktivitesi (I.U*)	A* ₆₆₀	Enzim aktivitesi (I.U*)	A* ₆₆₀	Enzim aktivitesi (I.U*)	A* ₆₆₀	Enzim aktivitesi (I.U*)
S9-UKM	0.5544	1.88	0.5693	1.91	0.5383	1.80	0.5082	1.58
Standart	1.4696	5	1.5038	5	1.4919	5	1.6003	5

Tablo 4.7. S11-UKM izolatu için ortamın sıcaklığına bağlı olarak değişen enzim miktarları (*IU: International Unit; A: Absorbans)

	27°C		30 °C		33 °C		37 °C	
	A* ₆₆₀	Enzim aktivitesi (I.U*)	A* ₆₆₀	Enzim aktivitesi (I.U*)	A* ₆₆₀	Enzim aktivitesi (I.U*)	A* ₆₆₀	Enzim aktivitesi (I.U*)
S11-UKM	0.3036	1.01	0.2973	0.98	0.5432	1.93	0.3495	1.09
Standart	1.5082	5	1.5997	5	1.4021	5	1.6014	5



Şekil 4.4. S9-UKM ve S11-UKM izolatlarının meydana getirdiği enzimin en fazla üretildiği sıcaklıkların birbirleriyle karşılaştırılması (*IU: International Unit)

4.1.3.3. pH Üzerine Yapılan Çalışma Sonuçları

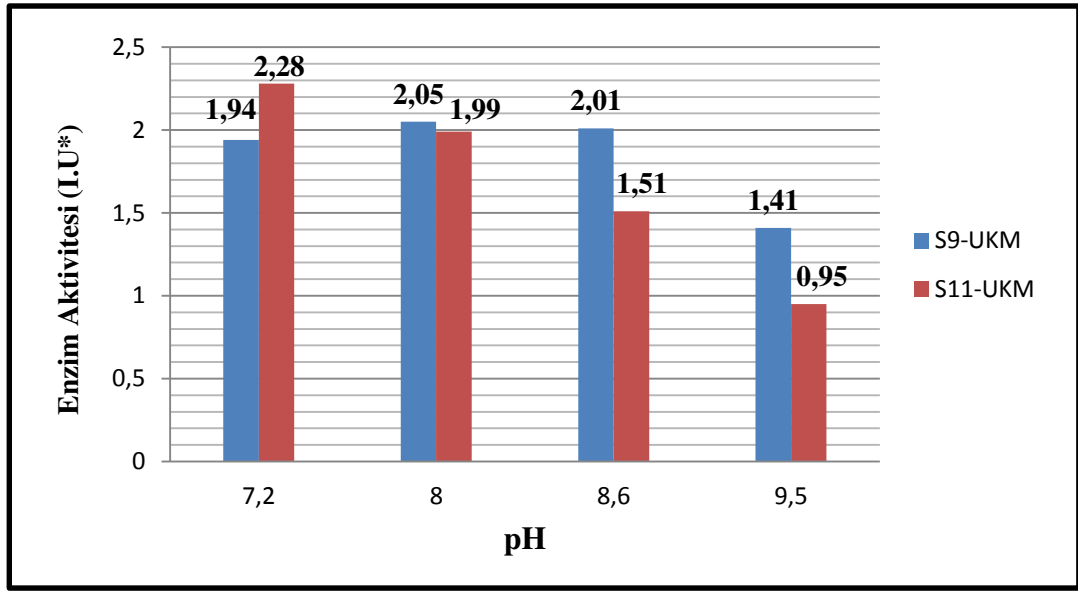
Ortamın pH'nın enzim üretimine etkisinin belirlenmesi için; S9-UKM ve S11-UKM izolatları için 4 farklı ortam hazırlandı. Bu ortamların pH'sı %1'lik sodyum hidroksit çözeltisi eklenerek sırasıyla 7.2, 8.0, 8.6 ve 9.5'ye getirildi. Her iki izolatta bu ortamlara aşılandı ve 3 gün boyunca 120 rpm çalkalama hızında inkübasyona bırakıldı. Bu inkübasyon sonucunda S9-UKM izolatı için enzim üretiminin yüksek olduğu ortam pH'sı 8 bulunurken (Tablo 4.8), S11-UKM izolatı için ise ortam pH'sı 7.2 bulundu (Tablo 4.9). S9-UKM ve S11-UKM izolatlarının ortam pH'nın enzim üretimine etkisinin sonuçlarının ve birbiriyle karşılaştırılmaları Şekil 4.5'de verilmiştir.

Tablo 4.8. S9-UKM izolatu için ortamın pH bağı olarak değişen enzim miktarları
(*IU: International Unit; A: Absorbans)

	pH 7.2		pH 8		pH 8.6		pH 9.5	
	A [*] ₆₆₀	Enzim aktivitesi (I.U [*])	A [*] ₆₆₀	Enzim aktivitesi (I.U [*])	A [*] ₆₆₀	Enzim aktivitesi (I.U [*])	A [*] ₆₆₀	Enzim aktivitesi (I.U [*])
S9-UKM	0.5764	1.94	0.5925	2.05	0.5592	2.01	0.4428	1.41
Standart	1.4803	5	1.4428	5	1.3883	5	1.5690	5

Tablo 4.9. S11-UKM izolatu için ortamın pH bağı olarak değişen enzim miktarları
(*IU: International Unit; A: Absorbans)

	pH 7.2		pH 8.0		pH 8.6		pH 9.5	
	A [*] ₆₆₀	Enzim aktivitesi (I.U [*])	A [*] ₆₆₀	Enzim aktivitesi (I.U [*])	A [*] ₆₆₀	Enzim aktivitesi (I.U [*])	A [*] ₆₆₀	Enzim aktivitesi (I.U [*])
S11-UKM	0.6340	2.28	0.5671	1.99	0.4255	1.51	0.2821	0.95
Standart	1.3876	5	1.4217	5	1.4009	5	1.4712	5



Şekil 4.5. S9-UKM ve S11-UKM izolatları için enzimin en fazla üretildiği pH aralığının karşılaştırmalı olarak belirlenmesi, (I.U*: İnternational Unit)

4.1.3.4. Farklı Karbon Kaynakları Üzerine Yapılan Çalışma Sonuçları

İlk denemelerde kullanılan karbon kaynağı glikozdu. Ortamdaki glikoz yerine sırasıyla galaktoz, arabinoz, maltoz, gliserol, fruktoz ve nişasta olmak üzere 7 farklı karbon kaynağı kullanıldı. S9-UKM izolatı için en yüksek enzim miktarının elde edildiği karbon kaynağı fruktoz olarak belirlendi. Daha sonra sırasıyla maltoz, arabinoz, glikoz, nişasta, galaktoz, gliserol gelmektedir. Tablo 4.10/a ve Tablo 4.10/b’de sonuçlar ayrıntılı olarak verilmiştir.

Tablo 4.10/a: S9-UKM izolatu için ortamda bulunan farklı karbon kaynaklarına bağlı olarak değişen enzim miktarları (*IU: International Unit; A: Absorbans)

	Galaktoz		Glikoz		Arabinoz		Maltoz	
	A [*] ₆₆₀	Enzim aktivitesi (I.U [*])	A [*] ₆₆₀	Enzim aktivitesi (I.U [*])	A [*] ₆₆₀	Enzim aktivitesi (I.U [*])	A [*] ₆₆₀	Enzim aktivitesi (I.U [*])
S9-UKM	0.4917	1.56	0.5973	1.98	0.6389	2.08	0.8859	2.81
Standart	1.5690	5	1.4989	5	1.5303	5	1.5773	5

Tablo 4.10/b: S9-UKM izolatu için ortamda bulunan farklı karbon kaynaklarına bağlı olarak değişen enzim miktarları (*IU: International Unit; A: Absorbans)

	Gliserol		Fruktoz		Nişasta	
	A [*] ₆₆₀	Enzim aktivitesi (I.U [*])	A [*] ₆₆₀	Enzim aktivitesi (I.U [*])	A [*] ₆₆₀	Enzim aktivitesi (I.U [*])
S9-UKM	0.1618	0.52	0.9572	3.39	0.4712	1.63
Standart	1.5479	5	1.4093	5	1.4385	5

S11-UKM izolatu ile ilgili yapılan farklı karbon kaynakları denemelerinde en yüksek enzim miktarının elde edildiği karbon kaynağı maltozdur. Daha sonra sırası ile fruktoz, glikoz, arabinoz, nişasta, galaktoz ve gliseroldür. Tablo 4.11/a ve Tablo 4.11/b’de sonuçlar ayrıntılı olarak verilmiştir.

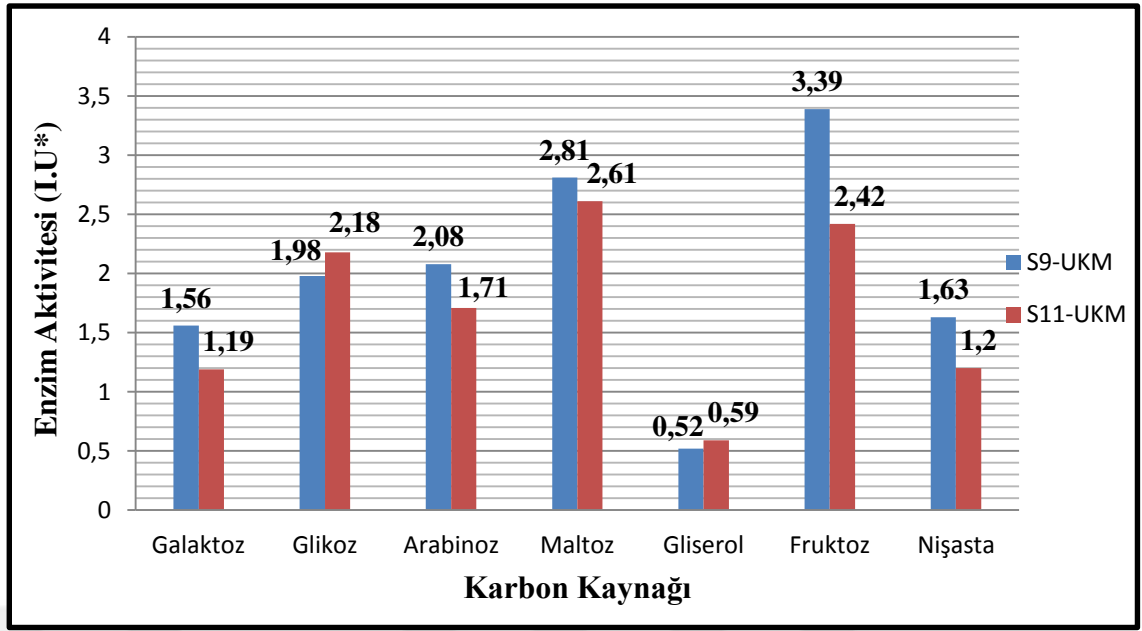
Tablo 4.11/a: S11-UKM izolatu için ortamda bulunan farklı karbon kaynaklarına bağlı olarak değişen enzim miktarları (*IU: International Unit; A: Absorbans)

	Galaktoz		Glikoz		Arabinoz		Maltoz	
	A* ₆₆₀	Enzim aktivitesi (I.U*)	A* ₆₆₀	Enzim aktivitesi (I.U*)	A* ₆₆₀	Enzim aktivitesi (I.U*)	A* ₆₆₀	Enzim aktivitesi (I.U*)
S11-UKM	0.3540	1.19	0.6078	2.18	0.5007	1.71	0.7813	2.61
Standart	1.4819	5	1.3817	5	1.4620	5	1.5011	5

Tablo 4.11/b: S11-UKM izolatu için ortamda bulunan farklı karbon kaynaklarına bağı olarak değişen enzim miktarları (*IU: International Unit; A: Absorbans)

	Gliserol		Fruktoz		Nişasta	
	A [*] ₆₆₀	Enzim aktivitesi (I.U [*])	A [*] ₆₆₀	Enzim aktivitesi (I.U [*])	A [*] ₆₆₀	Enzim aktivitesi (I.U [*])
S11-UKM	0.1045	0.32	0.7018	2.42	0.3595	1.20
Standart	1.5921	5	1.4497	5	1.5003	5

Çalışılan karbon kaynakları içerisinde en yüksek sonuçlar S9-UKM izolatu için fruktozda, S11-UKM izolatu için ise maltozda elde edildi. S9-UKM ve S11-UKM izolatının birbirleri ile karşılaştırılmaları Şekil 4.6.'de verilmiştir.



Şekil 4.6. S9-UKM ve S11-UKM izolatları için enzimin en fazla üretildiği karbon kaynaklarının belirlenmesi, birbirleriyle karşılaştırılması (I.U*: İnternational Unit)

4.1.3.5. Farklı Azot Kaynakları Üzerine Yapılan Çalışma Sonuçları

İlk denemelerde kullanılan ortamda azot kaynakları olarak kazein ve maya ekstresi aynı anda kullanıldı. Bu iki azot kaynağı ortamdaki çıkarıldı. Daha sonra azot kaynaklarının bakteri üremesi ve enzim üretimi üzerine etkilerini belirlemek amacıyla pepton, üre, maya ekstresi, kazein, yağsız süt tozu (skim milk), asparajin ve amonyum sülfat tek başına denendi. Azot kaynağı olarak fermentasyon ortamında kullanılan yedi farklı bileşikten (pepton, üre, maya ekstresi, kazein, yağsız süt tozu, asparajin ve amonyum sülfat) S9-UKM izolatu için en yüksek sonuçlar sırasıyla yağsız süt tozunda (skim milk) ve kazeinden alınmıştır. En düşük sonuçlar ise sırasıyla üre ve amonyum sülfattan elde edilmiştir. Sonuçlar Tablo 4.12/a ve 4.12/b’de ayrıntılı olarak verilmiştir.

Tablo 4.12/a: S9-UKM izolatu için ortamda bulunan farklı azot kaynaklarına bağlı olarak değişen enzim miktarları (*IU: International Unit; A: Absorbans)

	Pepton		Üre		Maya ekstratı	
	A [*] ₆₆₀	Enzim aktivitesi (I.U [*])	A [*] ₆₆₀	Enzim aktivitesi (I.U [*])	A [*] ₆₆₀	Enzim aktivitesi (I.U [*])
S9-UKM	0.7801	2.73	0.0121	0.04	0.7495	2.51
Standart	1.4274	5	1.4846	5	1.4961	5

Tablo 4.12/b: S9-UKM izolatu için ortamda bulunan farklı azot kaynaklarına bağlı olarak değişen enzim miktarları (*IU: International Unit; A: Absorbans)

	Kazein		Yağsız süt tozu		Asparajin		Amonyum sülfat	
	A [*] ₆₆₀	Enzim aktivitesi (I.U [*])	A [*] ₆₆₀	Enzim aktivitesi (I.U [*])	A [*] ₆₆₀	Enzim aktivitesi (I.U [*])	A [*] ₆₆₀	Enzim aktivitesi (I.U [*])
S9-UKM	0.9353	3.13	1.1703	3.95	0.5078	1.79	0.1172	0.38
Standart	1.4903	5	1.4778	5	1.4112	5	1.5361	5

Azot kaynağı olarak fermentasyon ortamında kullanılan yedi farklı bileşikten (pepton, üre, maya ekstratı, kazein, yağsız süt tozu, asparajin, ve amonyum sülfat) S11-UKM izolatu için en yüksek sonuçlar sırasıyla maya ekstresi ve yağsız süt tozundan alınmıştır. En düşük sonuçlar ise S9-UKM izolatıyla benzer olup sırasıyla üre ve amonyum sülfattır. Sonuçlar Tablo 4.13/a ve Tablo 4.13/b de ayrıntılı olarak verilmiştir.

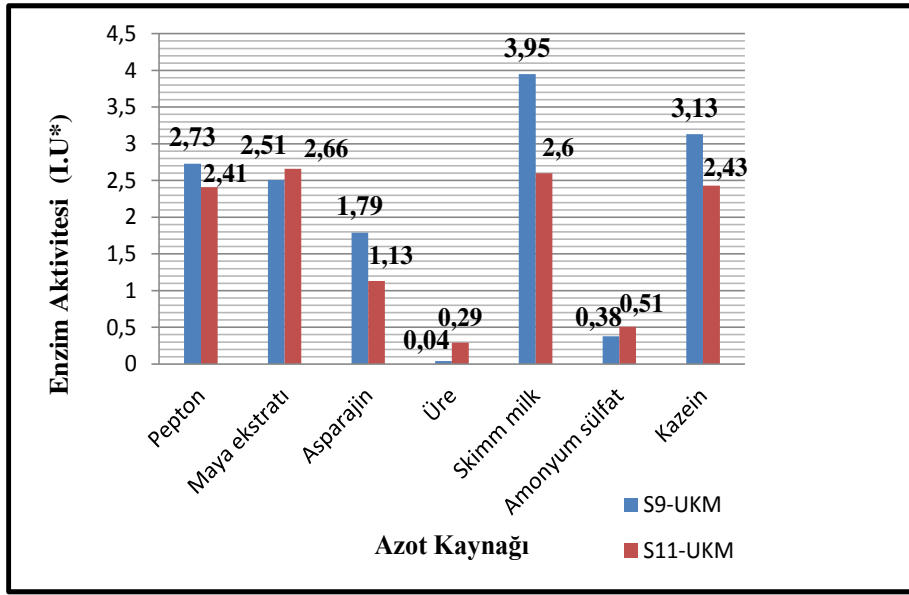
Tablo 4.13/a: S11-UKM izolatu için ortamda bulunan farklı azot kaynaklarına bağlı olarak değişen enzim miktarları (*IU: International Unit; A: Absorbans)

	Pepton		Üre		Maya ekstratı	
	A ₆₆₀ *	Enzim aktivitesi (I.U*)	A ₆₆₀ *	Enzim aktivitesi (I.U*)	A ₆₆₀ *	Enzim aktivitesi (I.U*)
S11-UKM	0.6912	2.41	0.0881	0.29	0.7313	2.66
Standart	1.4306	5	1.4920	5	1.3698	5

Tablo 4.13/b: S11-UKM izolatu için ortamda bulunan farklı azot kaynaklarına bağı olarak değışen enzim miktarları (*IU: International Unit; A: Absorbans)

	Kazein		Yağısız sūt tozu		Asparajin		Amonyum sūlfat	
	A [*] ₆₆₀	Enzim aktivitesi (I.U [*])	A [*] ₆₆₀	Enzim aktivitesi (I.U [*])	A [*] ₆₆₀	Enzim aktivitesi (I.U [*])	A [*] ₆₆₀	Enzim aktivitesi (I.U [*])
S11-UKM	0.6781	2.43	0.7312	2.60	0.3402	1.13	0.1503	0.50
Standart	1.3996	5	1.4047	5	1.5003	5	1.5171	5

S9-UKM izolatu için en yüksek enzim eldesi yağısız sūt tozu (skim milk) S11-UKM izolatu için ise maya ekstresinde elde edilmiştir. S9-UKM ve S11-UKM izolatları için enzimin en fazla üretildiğı azot kaynaklarının belirlenmesi ve birbirleriyle karşılaştırılması Şekil 4.7’de verilmiştir.



Şekil 4.7. S9-UKM ve S11-UKM izolatları için enzimin en fazla üretildiği azot kaynaklarının belirlenmesi, birbirleriyle karşılaştırılması (I.U*: İnternational Unit)

4.2. Tartışma

Enzimler, endüstride hemen her alanda geniş bir kullanım alanı gösterebilmekte ve bu alanların sayısı da gün geçtikçe hızla artmaktadır. Endüstride en sık kullanılan proteaz kaynakları kolay üretim şartları ve yüksek verimliliklerinden dolayı genellikle bakterilerdir. Bu nedenlerle, birçok bilim adamı doğal kaynaklardan bakteri izolasyonuna gitmekte ve böylece yeni, oldukça verimli türlerin ortaya çıkmasını sağlamaktadır.

Proteaz enzimi, dünya çapında kullanım alanı açısından oldukça geniş ve büyük bir potansiyele sahiptir. Birçok mikroorganizmadan, özellikle de *Bacillus* cinsinden elde edilmektedir. Belirli bir mikroorganizma tipi, aynı enzimi farklı ortamlarda farklı oranlarda üretebilmektedir. Bu nedenle, enzim üretim ortamı değiştirilerek, enzim üretim kapasitesinin artırılması yoluna gidilmesi, yüksek enzim üretimi için alternatif bir yoldur.

4.2.1. İzolasyon ve Tanı

Yapılan çalışmamızda İzmir, Aydın ve Manisa'dan 14 farklı istasyondan alınan topraklardan (toprak örneklerinin içeriğinin proteince zengin olması düşünülmüş bu sebeple mezbaha, arıtım tesisleri ve baklagil tarlalarından örnek alımı yapılmıştır) proteaz üreten toplam 162 adet seçici besiyerinde zon meydana getiren, aktif bakteri izole edilmiştir. Bu türlerin toplam proteaz aktivitelerine göre elenmesi işleminde ilk olarak katı besiyerleri denenmiştir. Kazeinli ve skim milk agarlı ortamlarda yapılan çalışmalarda en iyi proteaz pozitiflik tespitini gösteren zon oluşumu, skim milkli agarlı ortamdan elde edilmiştir. Çünkü kazein homojen bir şekilde çözünemediği için elde edilen zonlarda benzerlik gözlenememiştir. Bakterilerin toplam proteaz enzimi varlığını belirlerken, skim milk içeren agarlı ortamda 'eküvyon ile yayma' metodu kullanılmış 48 saat ve 30°C' de inkübasyon sonucu oluşan zonlar cetvelle ölçülerek, en yüksek proteaz pozitif özelliğe sahip olan her istasyondan 1 adet olmak üzere 14 adet izolat seçilmiştir. Bu izolatlara Gram Boyama, Endospor boyama, Katalaz testi, Hareketlilik testi uygulandı. Basil formda, gram pozitif, endospora sahip, katalaz pozitif ve hareketli izolatlar API 50CHB ve API 20E test kilerti uygulanmıştır. S9-UKM izolatının *Bacillus thuringiensis*, S11-UKM izolatının ise *Bacillus subtilis* olduğunu öngörmüştür. Sevinç 2010, çalışmasında *Bacillus*'ları tespit etmek için Gram Boyama, Katalaz, Endospor boyama ve hareketlilik testlerini uygulamış; Gram pozitif, katalaz testi pozitif, hücresinin bünyesinde endospor bulunduran ve hareketlilik testi pozitif olan izolatlar *Bacillus* spp olarak ayrılmıştır [61]. Sharmin ve ark., 2007 ile Nadeem ve ark. 2008'de yaptığı çalışmalarda, ilk olarak suşlar morfolojilerine çubuk şeklinde gözükkenlerine göre ayrılmış daha sonra sırası ile Gram boyama, endospor boyama, hareketlilik testi, katalaz testi, kazein ve jelatin hidrolizi yapılmıştır *Bacillus* spp olarak tespit etmişlerdir [47,73].

Carlisle ve ark., 1989'nın yaptığı çalışmada, skim milk agarlı plaklara *Bacillus* sp. kültürlerini 'damlatma' ve 'sürme' yöntemleriyle ekip, koloni etrafında meydana gelen zonları milimetrik olarak ölçüp grafiklemişlerdir [46]. Nadeem ve ark. 2008 topraktan izole ettikleri *Bacillus* cinsi bakterileri skim milki içerisinde bulunduran agarlı plaklara 'yayma' metodu ile ekerek, 37°C' de 18 saat inkübasyona bırakmış ve oluşan zon çaplarına göre, bakterilerin proteaz aktivitesi miktarını

belirlemişlerdir [47]. Sevinç 2010, çalışmada ise *Bacillus* suşları Türkiye'nin 21 farklı bölgesinden alınan toprak örneklerinden izole edilmiştir. Bu isolatlar içerisinde en yüksek proteaz aktivitesine sahip *Bacillus sp.*'ler, farklı içerikli ortamlarda üretilmiş ve bunlardan en iyi enzim üretenin saptandığı üreme ortamı ve *Bacillus sp.* tespit edilerek, çalışmaya bu bakteri ile devam edilmiştir [61]. Towatana ve ark., 1999 yaptıkları çalışmada hidrotermal kaynaklarından belirtilen biyokimyasal testler ve API kitlerini (API 50CHB ve API 20E) kullanarak termofilik *Bacillus* PS719 izolatını elde etmişlerdir [48]. Alpan'nın 2008, yaptığı bir çalışmasında ise, kaplıca çamurlarından *Bacillus* cinsi Ç ve RÇ3 isolatları izole etmiştir [49].

4.2.2. İnkübasyon Süresi

Çalışmamızda alkali proteaz enzimi veriminin en yüksek olduğu inkübasyon süresi isolatlarımız için 72 saat olarak tespit edilmiştir. Aynı cinse ait türlerin maksimum verime sahip oldukları inkübasyon sürelerinin birbirlerinden farklılık gösterebildiği literatür verilerinden anlaşılmaktadır.

Kazan ve ark., 2005, yaptığı bir çalışmada, *Bacillus clausii* GMBAE 42 suşu proteince zengin bir ortama aşılınmış ve inkübasyona bırakılmıştır. Suşun ürettiği alkali proteazın maksimum aktivitesinin, inkübasyon süresinin durağan evresinde ve 72. saatte olduğu belirlenmiştir [50]. Towatana ve ark., 1999 alkalifilik ve termofilik *Bacillus sp.* PS719' da, Mehrotra ve ark., 1999, izole edilen *Bacillus* türlerinde, Johnvesly ve ark., 2001 termofilik ve alkalifik *Bacillus* JB-99' da, Rahman ve ark., 2003 *Bacillus stearothermophilus* F1' de, Sousa ve ark., 2007 *Bacillus cereus*' ta, Shafee ve ark., 2005 *Bacillus cereus*' ta, Maurer 2004, *Bacillus mojavensis* A21' de, Shivanand ve ark., 2009, *Bacillus aquimaris* VITP4' te proteaz enziminin üretimi için en uygun inkübasyon süresini 24 saat olarak belirlemişlerdir [31, 32, 48, 51, 52, 53, 54, 57]. Ghorbel ve ark., 2004 *Bacillus cereus* BG1' de, Yossan ve ark., 2006 *Bacillus megaterium*' da proteaz enziminin üretimi için en uygun inkübasyon süresini 48 saat olarak belirlemişlerdir [58,59]. Nilegaonkar ve ark., 2007 ise *Bacillus cereus* MCM B-326' da bu süreyi 36 saat olarak belirlemişlerdir [60].

4.2.3. Ortam Sıcaklığı

Yapılan çalışmamızda izole ettiğimiz S9-UKM ve S11-UKM izolatlarımızın farklı ortam sıcaklık değerlerinde maksimum alkali proteaz enzim üretiminin S9-UKM izolatı için 30°C’de bulunurken, S11-UKM izolatı için ise 33°C’de meydana geldiği belirlenmiştir.

Towatana ve ark., 1999 yaptıkları bir çalışmada hidrotermal kaynaklarından izole ettikleri termofilik *Bacillus* PS719 izolatının 55°C sıcaklıkta proteaz üretiminin diğer sıcaklık değerlerine göre daha fazla olduğunu belirlemiştir [48]. Yossan ve ark., 2006 *Bacillus* cinsi üzerine yaptıkları incelemelerde, bakterinin ürettiği enzimin miktarının en yüksek 45 °C’de üretildiğini belirlemiştir [59]. Qadar ve ark., 2009 *Bacillus sp.*’den elde ettikleri proteazın maksimum miktara 35°C’de ulaştığını belirlemişlerdir [63]. Patel ve ark., 2005 yaptığı çalışmada, haloalkalifilik *Bacillus sp.* proteazının elde edilmesinde ortam sıcaklık değerlerini sırasıyla 40°C ve 37°C olarak bildirmişlerdir [62]. Tekin’in 2008 yaptığı bir çalışmada seçtiği izolatın (APT5) alkali proteaz aktivitesinin optimum 45-50°C arasında daha fazla üretildiğini belirlemiştir [2].

4.2.4. Ortam pH’sı

Çalışmamızda seçilen izolatlarımızın farklı pH değerlerinde ürettiği alkali proteaz enzim miktarının S9-UKM izolatı için pH 7.2’de maksimuma ulaşırken, S11-UKM izolatı için pH 8.0’de maksimuma ulaşmıştır.

Yossan ve ark., 2006 *Bacillus* cinsi üzerine yaptıkları incelemelerde, bakterinin maksimum enzimin miktarının pH 10.0’da gerçekleştiğini belirlemiştir [59]. Qadar ve ark.,2009 ise *Bacillus sp.*’den elde ettikleri proteazın maksimum miktara pH 7.0’de ulaştığını belirlemişlerdir [63]. Patel ve ark., 2005 haloalkalifilik *Bacillus sp* ile yaptığı çalışmada, pH 10.0’da maksimum enzim miktarına ulaşılmıştır [62]. Tekin’in 2008 yaptığı bir çalışmada seçtiği izolatın (APT5) alkali proteaz aktivitesinin ortam pH’sının 9.0’da daha fazla olduğunu belirlemiştir [2]. Yapılan diğer bir çalışmada ise *Bacillus sp.* N-40 bakterisinin ürettiği proteaz enzimi için optimum pH değeri ise 7.0 olarak saptanmıştır. Diğer yandan, enzimin alkali pH

değerlerinde aktifliğini koruması sebebiyle, enzim alkalofilik bir enzim olarak belirlenmiştir [61].

4.2.5. Farklı Karbon Kaynakları

Yaptığımız fermentasyon çalışmasında 7 farklı karbon kaynağı (glukoz, fruktoz, maltoz, gliserol, galaktoz, arabinoz ve nişasta) ortam içeriğinde denenmiştir. S9-UKM izolatu için fruktoz, S11-UKM izolatu için ise maltoz'da en yüksek enzim üretimi sonucuna ulaşılmıştır. Her iki izolat içerisinde en düşük sonuçlar ise mikroorganizmaların çok kullanmadığı gliserol ve suda tam olarak çözünmeyen galaktozdan alınmıştır.

Ashnaei ve ark., 2007 *Bacillus subtilis* ve *Pseudomonas fluorescens*'in enzim üretimi üzerine farklı karbon kaynaklarının etkisine bakmışlar ve en yüksek aktiviteyi, her iki mikroorganizma üzerinde de maya ekstratı ile birlikte sükröz varlığında aldıklarını bildirirken, Ahmed ve ark., 2008 *Streptomyces avermectinus* NRRL B-8165'un proteaz üretimi üzerine en yüksek aktiviteyi, üretim ortamında %7 oranında sükröz varlığında elde ettiklerini belirtmişlerdir [64,65].

Puri ve ark., 2001 alkali proteaz üreten bir *Bacillus* sp. suşuna, içerisinde glukoz da bulunan çeşitli karbon kaynaklarının etkisini incelemiş ve en yüksek enzimatik aktiviteyi nişastanın varlığında sağlamışlardır [4]. Benzer şekilde Nascimento ve ark., 2004 ile Falahatpishe ve ark., 2007'nin, topraktan izole ettikleri *Bacillus* sp.'ler üzerine yaptıkları incelemede en yüksek proteaz aktivitesini nişasta varlığında elde etmişlerdir [66,67]. Yüksekdağ ve ark., 2004 *Bacillus subtilis* ve *Bacillus megaterium* üzerinde yaptıkları çalışmada en yüksek proteaz aktivitesi sağlayan karbon kaynağının glukoz olduğunu belirtirken, Safey ve ark., 2004 *Bacillus subtilis* ile yaptığı çalışmada, en yüksek proteaz eldesini laktoz varlığında, Fincan ve ark., 2007 yine *Bacillus* sp. üzerine yaptıkları çalışmada, en yüksek proteaz eldesini nişasta ve galaktoz varlığında elde etmişlerdir [55, 56, 68, 69]. Jamuna ve ark., 1992 tarafından yapılan bir çalışmada, sükröz kullanılması halinde nişasta ve glukoz oranla daha fazla enzim oluşumu saptanırken, Nadeem ve ark., 2008'nin alkali proteaz üreten bir *Bacillus licheniformis* üzerine yaptıkları çalışmada, en yüksek proteaz aktivitesinin nişasta varlığında olduğu tespit edilmiştir [47,56]. Naidu ve

ark., 2005'nin araştırmalarına göre ise *Bacillus* cinsinde proteaz üretiminde en uygun karbon kaynaklarının laktoz, nişaşta ve sükroz olduğu saptanmıştır [70].

4.2.6. Farklı Azot Kaynakları

Yaptığımız fermentasyon çalışmasında denenen farklı azot kaynaklarından S9-UKM izolatu için yağsız süt tozunda (skim milk), S11-UKM izolatu için ise maya ekstraktında alkali proteaz enzimi üretiminin diğer azot kaynaklarına oranla daha fazla olduğu belirlenmiştir. En düşük sonuçlar ise her iki izolat için üre ve amonyum sülfatta elde edilmiştir. Bu sonuçlar her iki izolatında farklı azot kaynakları varlığında, farklı enzim üretim kapasitelerine sahip olduğunu g stemiştir.

Frikha ve ark., 2005'nin yaptığı bir çalışmada, *Bacillus cereus* BG1'in azot kaynağı olarak % 0.2 oranında maya ekstresi kullanıldığında proteaz üretiminin önemli miktarlarda arttığını tespit etmişlerdir [71]. Patel ve ark., 2005 yaptığı çalışmada ise, haloalkalifilik *Bacillus* sp' in azot kaynağı olarak jelatin ve kazamino asit kullanıldığında proteaz üretiminin arttığını, tripton ve soya pepton kullanıldığında ise proteaz üretiminin büyük bir oranda azaldığını belirtmişlerdir [62]. Shafee ve ark., 2005 *Bacillus cereus* 146' ın organik azot ve inorganik azot kaynaklarından sırasıyla beef ekstrakt ve üre kullanıldığında en yüksek proteaz aktivitesinin elde edildiğini belirtmişlerdir [32]. Nilegaonkar ve ark., 2007 *Bacillus cereus* MCM B-326' ın azot kaynağı olarak %1,0 soya küspesi kullanıldığında en yüksek proteaz aktivitesinin elde edildiğini belirtmişlerdir [60]. Farklı azot kaynaklarından Banerjee ve ark.,1999 *Bacillus brevis*' in %1,0 soya tozunun yanı sıra %1.0 maya ekstresi kullanıldığında, Johnvesly ve ark., 2001 termofilik ve alkalifik *Bacillus* JB-99' da %1 NaNO₃ ve %0.4 maya ekstresi kullanıldığında maksimum proteaz üretiminin sağlandığını belirtmişlerdir [52, 72].

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Proteince zengin olan topraklarda proteaz aktivitesi yüksek bakterilerin bulunma olasılığı oldukça fazladır. Alınan toprak örneklerinden *Bacillus* cinsinin izolasyonunda ilk olarak çubuk (basil) hücre şeklinin görülmesi, gram boyama, endospor boyama, katalaz ve hareketlilik testleri uygulanmıştır. Bu testlerden geçen izolatlardan proteaz aktivitesi en yüksek olan iki izolat seçilmiştir. Bu iki izolata API 50CHB ve API 20E test kitleri uygulanmıştır. API software programından girilen veriler sonucunda S9-UKM izolatının *Bacillus thuringiensis* ve S11-UKM izolatının ise *Bacillus subtilis* olduğunu düşünülmektedir.

Her izolat içinde 3'ncü gününde (72'nci saatte) proteaz miktarı en fazladır. 4'ncü günde ise her iki izolattada proteaz miktarında değişme meydana gelmemiştir. Logaritmik üreme fazında enzim miktarı daha yeni meydana geldiğinden dolayı sonuçlar ilk günlerde düşüktür. İzolatların durağan fazın başlangıcında proteaz miktarın en fazla olduğu düşünülmektedir.

Sıcaklık mikroorganizmaların üremesini ve yaşamalarını sürdürebilmesini etkileyen en önemli çevresel faktörlerden birisidir. Sıcaklık canlı organizmaları iki şekilde etkiler. Sıcaklık arttıkça, hücredeki kimyasal ve enzimatik tepkimeler daha hızlı meydana gelir ve bunun sonucunda üreme hızlanır. Bununla birlikte, belirli bir sıcaklığın üstünde, belirli proteinler geri dönüşümsüz olarak bozulurlar yani denatüre olurlar. Dolayısıyla verilen bir aralık içerisinde sıcaklık arttıkça, üreme ve metabolik işlemler denatürasyon reaksiyonlarının başladığı noktaya kadar artar. Bu noktanın üstünde, hücre fonksiyonları sıfıra doğru düşer. Her organizma için minimum, optimum ve maksimum gelişme sıcaklıkları vardır. Minimum sıcaklığın altında üreme gerçekleşmezken, optimum sıcaklıkta üreme en üst düzeydedir. Maksimum sıcaklığın üstünde ki sıcaklıklarda ise üreme mümkün olmaz sadece canlı zorda olsa yaşamını devam ettirir. Çalışmamızda ise en yüksek proteaz aktivitesini S9-UKM için 30°C'de iken S11-UKM izolatında ise 33°C'de göstermiştir. Sıcaklık arttırıldıkça her iki izolatın proteaz üretimi düşmektedir.

Mikroorganizmaların üremeleri için, besiyerinin pH 'sının optimal sınırlar içinde bulunması gereklidir. Minimal ve maksimal pH limitlerine yanaştıkça üreme azalır ve durur. Üremeyi olumsuz yönde etkileyen pH değişmesini önlemek için,

besiyerine tampon maddeler katılır. Bu amaçla K_2HPO_4 ve KH_2PO_4 kullanıldı. Bunlar meydana gelen hidrojen (H) ve hidroksil (OH) iyonlarının serbest kalmasının önüne geçer ve onlarla birleşikler oluşturur. Bu nedenle de, ortamın pH 'sı hemen asit veya alkali olmaz bir süre optimal limitler arasında kalır ve doğru sonuçlar alınır. Yapılan çalışmada ortam pH'sı S9-UKM izolatu için pH 8.0 bulunurken, S11-UKM izolatu için ise pH 7.2 bulunmuştur. pH'ın optimal sınırlar içerisinde kalması gerekir, üst sınırlarda proteaz üretimi azalır.

Prokaryotların çoğu karbon kaynağı olarak organik maddeye gereksinim duyar. Kuru ağırlığı esas alındığında tipik bir hücrenin %50'si ve tüm makromolekül sınıflarında ki en temel element karbondur. Bakteriler farklı organik karbon bileşiklerini özümseyebilir ve yeni hücre materyallerini yapmak için bunları kullanırlar. Amino asitler, yağ asitleri organik asitler, şekerler, azotlu bazlar, aromatik maddeler ve çok sayıdaki diğer organik maddelerin biri yada birden fazlası bakteriler tarafından kullanılırlar.

Galaktozun karbon kaynağı olarak kullanılması sonucunda enzim miktarının her iki izolatta da düşük çıkmasının nedeni suda homojen bir şekilde çözünememesidir. Nişasta ise amilaz enziminin varlığında maltoza ilerleyen safhalarda da glukoza parçalanır bu nedenle proteaz enzimi etki edememiştir. Gliserol ise mikroorganizmalar içerisinde çok sıklıkla kullanılan bir karbon kaynağı değildir. Bu nedenle her iki izolattada en düşük sonuçlar gliserolde alınmıştır. Glikoz, fruktoz, arabinoz ve maltoz ise mikroorganizmalar içerisinde sıklıkla kullanılan karbon kaynaklarındandır. Bu nedenle S9-UKM izolatu için fruktoz, S11-UKM izolatu için ise maltoz'da en iyi sonuçlar elde edilmiştir. Glikoz, fruktoz, arabinoz ve maltozun fermentasyon ortamında karbon kaynağı olarak kullanılması önerilmektedir.

Karbondan sonra hücrede en bol bulunan element azottur. Tipik bir bakteri hücresinin kuru ağırlığının yaklaşık %12'si azottan oluşur. Azot proteinler, nükleik asitler ve diğer bazı hücre bileşenleri için gereklidir. Doğada azot hem organik hem de inorganik şekilde bulunabilir.

Azot kaynağı olarak kullanılan Amonyum sülfat inorganik bir azot kaynağıdır ve mikroorganizmalar için pek tercih edilmezler. Üre ise parçalandığında amonyak

meydana getirir ve ortamda toksik etki yaparak üremeyi engeller. Bunun sonucunda da enzim miktarının düşmesine sebep olurlar. Bu nedenle her iki izolat içinde amonyum sülfat ve üre en düşük sonuçları vermiştir. En yüksek proteaz aktivitesi S9-UKM izolatı için yağsız süt tozu (skim milk), S11-UKM izolatı için ise maya ekstresinde gösterilmiştir. Yağsız süt tozu, maya ekstresi, pepton ve kazein mikroorganizmaların sıklıkla tercih ettikleri azot kaynaklarıdır ve çalışmalarda bunların kullanılması önerilmektedir.

Bunun yanında farklı karbon kaynakları ve azot kaynakları ile yapılan çalışmalardan farklı sonuçların elde edilmesi, kullanılan mikroorganizma çeşidine, karbon ve azot kaynaklarına, ortamdaki diğer bileşenlerin etkileşimlerine bağlı olarak değişmektedir. Dolayısıyla bu da göstermektedir ki, mikroorganizmaların kullandığı metabolik yollar farklı olabilmektedir.

Her iki izolatta katı ortamda gösterdiği alkali proteaz aktivitesini sıvı ortamda tam anlamıyla gösterememiştir. S9-UKM izolatı S11-UKM izolatına göre kısmen daha yüksek proteaz aktivitesine sahiptir. Elde edilen bulgular sonucunda aynı cinse ait bakterilerde alkali proteaz üretim parametrelerinde farklılıklar bulunabileceğini gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Madigan M.T, Martinko J.M Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi, (Çeviri editörü Çökmüş C.) Palme Yayıncılık, Ankara, 2010. E-2, 941-946 s.,
2. Tekin, N. Türkiye Kaynaklı *Bacillus* spp.'lerin Alkali Proteaz Üretim Kapasiteleri ve Enzimlerin Kısmen Karakterizasyonu, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara Üniversitesi, Ankara, 2008. 88-91s. (Yüksek Lisans Tezi).
3. Fadiloğlu, S., O., Erkmen, Gıda sanayinde enzimlerin önemi, Gaziantep Üniversitesi, Bilimsel yayınlar kataloğu, Gaziantep, 2004, 1-16 s.
4. Puri, S., Beg, Q.K., Gupta,R., Optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. by response surface methodology. Cur Micobiol 2001, 44: 286-290 s.
5. Woese, C.R and Wolfe, R.S., The bacteria, Volume VII, Academic Press, USA, 1985, ISBN: 0-12-307208-5.
6. Woese, C.R. Procaryote Systematics. The evolution of a science In: The procaryotes. A handbook on the biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, 1999. Applications, 3rd. Edt., (Dwarkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H. and Stackebrandth, E., Eds). Springer- Verlag, New York (electronic publication), 72-89 s.
7. Claus, D. and Berkeley, C.W. The genus *Bacillus* In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. (Editörler)Volume 2. Williams and Wilkins 1986, 11-13 s.
8. Kurdya, V.A, I.A., Simonenko, Alkaline serine proteinase and lectin isolation from the culture fluid of *Bacillus subtilis*, Applied Microbiology and Biotechnology, 1994, 41-505 s.
9. Logan N.A. and Turnbull P.C.B., *Bacillus* and recently derived genera. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH (Editors). Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology, Washington, U.S.A. 1999, 357-358 s.
10. Banwart, G.J.,. Basic Food Microbiology Avi. Publishing Company Inch. 1983, 118- 120 s.
11. Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1998, Vol 62, 597-635 s.
12. Jones I.K. and Glazer A.N. Comparative studies on four sulfhydryl endopeptidases of *Ficus Glabrata* latex. J. Biol. Chem. 1970. 245:2765-2772 s.
13. Kıran, E.O., U., Çömlekçiöğlu, N., Dostbil. Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları, KSU. Journal of Science and Engineering, Türkiye 2006, 9(1)12-19 s.
14. Deshpande, V.V., Rao, M., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1998, Vol 62, No.3, 597-635 s.
15. Uhlig, H., Industrial Enzymes and Their Applications, John Wiley & Sons, USA, 1998. 116-144 s.
16. Gripon, J.C.. Encyclopedia of Dairy Sciences, Academic Press, 2003, 410- 406 s.
17. Kalisz, H.M., Microbial proteinases. Advance Biochem Eng. Biotechnol 1988, 36:1-65s.
18. Kumar, C.G., Takagi, H., Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. Biotechnology Advances 1999, 17: 561-594 s.
19. Gupta, R., Gupta K., Saxena, R.K., Khan S., Bleach-stable, alkaline protease from *Bacillus* sp. Biotechnology letters 1999, 21:135-138 s.

20. Gupta, R., Beg, Q. K., Khan, S., Chauhan, B., An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Applied Microbial Biotechnology* 2002, 60: 381 –395 s.
21. Aehle, W., *Enzymes in Industry Production and Applications*, Wiley- VCH, Weinheim. Germany, 2004, 28: 335- 340 s.
22. Çelik, N., *Bacillus clausii* GMBAE 42' den saflaştırılan Alkali Proteazın termal inaktivasyon kinetiğinin belirlenmesi ve Cu^{+2} iyonları ile termostabilizasyonu. Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Kocaeli, Türkiye, 2006, 11-56 s. (Yüksek Lisans Tezi).
23. Krajewska, B., Application of Chitin and Chitosan Based Materials for Enzyme Immobilizations: A Review, *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 35:126-139s.
24. Orhan, E., *Bacillus subtilis* ve *Bacillus cereus* Bakterilerinden Proteaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması ve Özelliklerinin İncelenmesi, İ.T.U. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, 2003, 24-38 s (Yüksek Lisans Tezi).
25. Afşar, A., A Research on Increasing The Effectiveness of Degreasing Process by Using Enzymes. *Microbiol. Res.*, 2008, 45-53s.
26. Öztürk, M.H., Partial Purification and Characterization of Alkaline Proteases from Isolated *Bacillus* Strains, İ.T.U. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye, 2004, 16-51s. (Yüksek Lisans Tezi).
27. Mukhtar, H., Haq, I., Production of alkaline protease by *Bacillus subtilis* and its application as a depilating agent in leather processing. *Institute of Industrial Biotechnology, G.C. University, Lahore 54000, Pakistan*, 2008, 8-12 s.
28. Horikoshi, K., Alkaliphiles from an industrial point of view. *FEMS Microbiology Reviews*, 1996, 18-259 s.
29. Kasavi, C., Kovalent bağlanma ve Fiziksel adsorbsiyon metodları ile proteaz enziminin immobilizasyonu, İ.T.U. Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, İstanbul, 2006, 22-49s (Yüksek Lisans Tezi).
30. Uludağ, Y.B., İmmobilize Glukomilaz ile Maltodekstrinden Glukoz Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Gebze İleri Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 2000, 25-39 s.
31. Maurer, K.H., Detergent Proteases, *El Sevier. Germany*, 2004, 3:25-33 s.
32. Shafee. N., Aris, S.N., Rahman, R.N.Z.R.A., Basri, M., Salleh, A.B., Optimization of Environmental and Nutritional Conditions for The Production of Alkaline Protease by a Newly Isolated Bacterium *Bacillus cereus* Strain 146. *Journal of Applied Sciences Research*, 2005, 1(1): 1-8s.
33. Duran, K., E., Bozacı, H.A., Karahan, Protein Esaslı Mamullerin Enzimatik Ön Terbiyesi, Ege Üniversitesi Tekstil Mühendisliği Bölümü. *Tekstil ve Konfeksiyon Araştırma Uygulama Merkezi Yayını, İzmir, Türkiye* 2007, 17-3s.
34. Karmakar S.R., *Chemical Technology in The Pretreatment Process of Textiles*, Elsevier Science B.V., 1999, 18-24s.
35. Venugopal, V., M.D., Alur, D.P., Nerkar, Solubilization of fish proteins using immobilized microbial cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 1989, 3:1098-1103s.
36. Dalev, P.G., Simenova, L.S., An enzyme biotechnology fort he total utilisation of leather wastes. *Biotech. letters*, 1992, 14:531-534 s.
37. Anwar, A., M., Saleemuddin, Alkaline Proteases: A Review, *Bioresource Technology*, 1997, 64:175-183 s.
38. Horikoshi, K., Enzymes of alkalophilies. In: *Microbial Enzyme and isolation, production and characterization. FEMS Microbiology Reviews Appl. Microbiolgy*. 1999, 12 :34-39 s.

39. Langmaier, F., M., Mladek, K., Kolomaznik, S., Sukop, Isolation of elastin and collagen polypeptides from long cattletendons as raw material for the cosmetic industry. Czech Rep. 2002, 1-9 s.
40. Lobmann, R., C., Zemlin, M. Motzkau, K. Reschke, H., Lehnert, Proteaz absorban örtü ile tedavi edilmiş diyabetik ayak yaralarında matriks metalloproteinazlar ve büyüme faktörlerinin ekspresyonu. Department of Endocrinology and Metabolism, Published by Magdeburg University Medical School, Germany, 2005, 1-4 s.
41. Bergman, M and Frankel-Conrat, The role of specificity in the enzyme synthesis of proteins: synthesis with intracellular enzymes. J Biol Chem, 1937, 119:707-720 s.
42. Barros, R.J., Wehtje, F., Adlercreutz, P., Enhancement of immobilized protease catalyzed dipeptide synthesis by the presence of insoluble protonated nucleophile. Enzyme Microbiolgy Technology, 1999, 24:480-488 s.
43. So, J.E., Shin, J.S., Kim, B.G., Protease-catalysed tripeptide (RGD) synthesis. Enzyme Microb Technol, 2000, 26:108-114 s.
44. Özkaya-Durlu, F., Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Armoni Matbaacılık Ltd. Sti. Ankara, 2000, 320- 358 s.
45. Keay, L., M.H. Moseley, R.G. Anderson, R.J. O'Connor, B.S. Wildi, Production and isolation of microbial proteases, B.L. Wingard (Editor) Enzyme Engineering. Biotechnology and Bioengineering Symposium. New York, USA, 1998, 3:63-92 s.
46. Carlisle, G.E., J.O., Falkinham, Enzyme activities and antibiotic susceptibility of colonial variants of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. Appl Environ Microbiol., 1989, 55(11): 3026–3028 s.
47. Nadeem, M., Qazi, J.I., Baig, S., Syed, Q., Effect of Medium Composition on Commercially Important Alkaline Protease Production by *Bacillus licheniformis* N-246 (4) 2008, 388–394 s.
48. Towatana-Hutadilok, N., Pamupong, A., Suntinanalert, P., Purification and Characterization of An Extracellular Protease from Alkaliphilic and Thermophilic *Bacillus* sp. PS7 19. Journal of Bioscience and Bioengineering, 1999, 87(5): 581-587 s.
49. Alpan L.G., “Bazı ekstrem termofil anaerobik bakterilerin Alkali proteazlarının özelliklerinin belirlenmesi”, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye, 2008, 36-44 s (Yüksek Lisans Tezi).
50. Kazan, D., Denizci, A.A., Kerimak Öner, M.N. and Eraslan, A., Purification and characterization of a serine alkaline protease from *Bacillus clausii* GMBAE- 42. J Ind Microbiology Biotechnology, 2005, 32:335-344 s.
51. Mehrotra, S., Pandey, P.K., Gaur, R., Darmwal, N.S., The Production of Alkaline Protease by a *Bacillus* Species Isolate. Bioresource Technology, 1999, 67: 201-203s.
52. Johnvesly, B., Naik. G.R., Studies On Production of Thermostable Alkaline Protease from Thermophilic and Alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 On a Chemically Defined Medium. Process Biochemistry, 2001, 37: 139–144 s.
53. Rahman, R.N.Z.R.A., Basri, M., Salleh, A.B., Thermostable Alkaline Protease From *Bacillus stearothermophilus* F1; Nutritional Factors Affecting Protease Production. Annals of Microbiology, 2003, 53: 199-210 s.
54. Sousa, F., Jus, S., Erbel, A., Kokol, V., Cavaco-Paulo, A., Gubitz, G.M., A Novel Metalloprotease From *Bacillus cereus* For Protein Fibre Processing. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 40: 1772–1781 s.
55. Safey, E. M., Abdul, U. M., Production, Purification, Characterization of Protease Enzyme from *Bacillus subtilis*. International Conferences For Development And The Environment In The Arab World, Assiut Univ., 2004, 23-25 s.

56. Jamuna, R., Ramakrishna, S.V., Continuous synthesis of thermostable α - amylase by *Bacillus* cells immobilized in calcium alginate. *Enzyme Microbiol. Techn.*, 1992, 14: 36-41 s.
57. Shivanand, P., Jayaraman, G., Production of Extracellular Protease From Halotolerant bacterium, *Bacillus aquimaris* strain VITP4 İsolated from Kumta Coast. *Process Biochemistry*, 2009, 44: 1088–1094 s.
58. Ghorbel, B., Sellami-Kamoun, A., Nasri, M, Stability Studies of Protease From *Bacillus cereus* BG1. *Enzyme and Microbial Technology*, 2004, 32: 513–518 s.
59. Yossan, S., Reungsang, A., Yasuda, M., Purification and Characterization of Alkaline Protease from *Bacillus megaterium* Isolated from Thai Fish Sauce Fermentation Process. *ScienceAsia*, 2006, 32: 377-383 s.
60. Nilegonkar, S.S., Zambare, V.P., Kanekar, P.P., Dhakephalkar, P.K., Sarnaik, S.S., Production and Partial Characterization of Dehairing Protease from *Bacillus cereus* MCM B-326. *Bioresource Technology*, 2007, 98: 1238–1245 s.
61. Sevinç N., Türkiye Topraklarından İzole Edilen *Bacillus sp.* Suşlarından Proteaz Üretimi, Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Bursa, 2010, 79-82 s.
62. Patel, R., Dodia M., Singh, S.P., Extracellular Alkaline Protease from a Newly İsolated Haloalkaliphilic *Bacillus sp.* : Production and Optimization. *Process Biochemistry*, 2005, 40: 3569–3575 s.
63. Qadar, S. A., Shireen, E., Iqbal, S., Anwar, A., Optimization of protease and lipase production by *Bacillus pumilus* SG 2 isolated from an industrial effluent. *Indian Journal of Biotechnology.*, 2009, Vol:8, 286-290 s.
64. Ashnaei, P., Tehrani, S., Ahmedzadet, M., Behboudi, K., Effect of carbon and nitrogen sources on growth and biological efficacy of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* against *Rhizoctonia solani*, the causal agent of bean damping-off. *Commun Agric Appl Biol Sci.*, 2007, 72(4):951-6 s.
65. Ahmed, S., Ramadan, A., M.A. El-Shayeb, A. Saleh, Optimization, Immobilization of Extracellular Alkaline Protease and Characterization of its Enzymatic Properties. *Microbiol. Res.*, 2008, 25-30 s.
66. Nascimento, A.C.W., Martins, L. L. M., Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus sp.* *Brazilian Journal of Microbiology.*, 2004, 35: 91-96 s.
67. Falahatpishe, H., Mahmoud, J., Naser, B., Nadia, M., Production and purification of a protease from an alkalophilic *Bacillus sp.* 2-5 strain isolated from soil. *Iranian Journal of Biotechnology*, 2007, Vol. 5, No. 2., 9-14 s.
68. Yüksekdağ, N., Aslım, B., Beyatlı, Y., Mercan, N., Effect of carbon and nitrogen sources and incubation times on poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) synthesis by *Bacillus subtilis* 25 and *Bacillus sp.* *African Journal of Biotechnology*, 2004, Vol. 3 (1), 63-66 s.
69. Fincan, S., Okumuş, V., *Citrullus lanatus* L. (Karpuz) ve *Cucumis melo* L. (Kavun) Kabuğu Kullanılarak Katı-Faz Fermentasyon Tekniği (SSF) ile Topraktan izole Edilen *Bacillus sp.*’ den Alkali Serin Proteaz Eldesi. *D.U.Ziya Gökalp Eğitim Fakültesi Dergisi*, 2007, Sayı 9, 104-114 s.
70. Naidu, K. S. B., Devi, K.L., Optimization of thermostable alkaline protease production from species of *Bacillus* using rice bran. *African Journal of Biotechnology*, 2005, Vol. 4 (7), 724-726 s.
71. Frikha, B.G., Sellami-Kamoun, A., Fakhfakh, N., Haddar, A., Manni, L., Nasri, M., Production And Purification of a Calcium-Dependent Protease from *Bacillus*

cereus BG1. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2005, 32: 186–194 s.

72. Banerjee, U.C., Sani, R.K., Azmi, W., Soni, R., Thermostable Alkaline Protease from *Bacillus brevis* and Its Characterization as a Laundry Detergent Additive. Process Biochemistry, 1999, 35: 213-219 s.

73. Sharmin, F., Rahman, M. Isolation and Characterization of Protease Producing Bacillus strain FS-1. Agricultural Engineering International, 2007, 9:6-9 s.

74. Baygın E. , Demirhan E., Topraktan Fitaz enzimi üreten *Bacillus* spp suşlarının taraması ve besinsel faktörlerin fitaz üretimi üzerine etkisi, Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Bursa , 2015, 37-38s. (Yüksek Lisans Tezi).



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Umut KOVANCILAR

Doğum Yeri ve Yılı : İzmir, 1987

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : umut@birlikas.com

Eğitim Durumu

Lise : Mustafa Kemal Lisesi, 2004

Lisans : Celal Bayar Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, 2008

Mesleki Deneyim

A&G Pür Gıda Analiz Laboratuvarı 2014-2016

Ekiz Yumurta / Kalite İhracat Sorumlusu 2016

Birlik Tütün ve Baharat AŞ 2016-..... (halen)

Yayınları