

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Selma GÜRZ UĞURLUER

**DENİZEL KÖKENLİ ASİDİK PROTEAZ ENZİM ÜRETİCİSİ
Bacillus sp. SUŞLARININ İZOLASYONU, ENZİM ÜRETİMİ,
KARAKTERİZASYONU VE BİYOTEKNOLOJİK KULLANIM
OLANAKLARI**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2022

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DENİZEL KÖKENLİ ASİDİK PROTEAZ ENZİM ÜRETİCİSİ *Bacillus sp.* SUŞLARININ İZOLASYONU, ENZİM ÜRETİMİ, KARAKTERİZASYONU VE BİYOTEKNOLOJİK KULLANIM OLANAKLARI

Selma GÜRZ UĞURLUER

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Danışman : Prof. Dr. Burhan ARIKAN
Yıl: 2022 Sayfa: 101
Jüri : Prof. Dr. Burhan ARIKAN
: Prof. Dr. Fuat BUDAK
: Prof. Dr. Osman KOLA

Bu çalışmada Adana/Karataş bölgesi deniz suyundan *Bacillus sp.* suşları izole edilmiştir. KAZEİN substratı içeren katı besiyerinde bakterilerin farklı Ph ve farklı sıcaklık koşullarında üreme ve enzim üretme yetenekleri incelenmiştir.

Bacillus sp. SG-11 suşunun enzim üretimi için optimum pH ve optimum sıcaklık değerleri tespit edilmiştir. Diğer aşamada kısmi olarak saflaştırılan enzimin karakterizasyonu yapılmış ve biyoteknolojik kullanım olanakları araştırılmıştır. Kısmi olarak saflaştırılan enzim optimum aktivitesini 70 °C ph 5.0 de göstermiştir. Enzim pH 5.0-6.0 aralığında aktivitesini %92 oranında korumuştur. Enzim 20 °C ve 150 °C arasında %96 dan fazla aktif olduğu saptanmıştır. Farklı NaCl konsantrasyonlarında %3 ve %40 aralığında enzim aktivitesi %97 den fazla aktivite göstermiştir. Enzim EDTA, CoCl₂, SDS, Üre, PMSF, β-merkaptetanol, CaCl₂, ZnCl₂, H₂O₂, Triton-X-100 varlığında %99 ve %118 aralığında aktivite göstermiştir. Yıkama performansında deterjan katkısı olarak kullanıldığında salça +yağ, bebek maması, kan, çikolata, ketçap lekelerinde %100 yakın etki göstermiştir. Yapılan TLC analizinde proteaz enzimi kazeini L-sistin, L-Glisin, Prolin ve Tyrozine aminoasitlerine hidroliz etmiştir.

Anahtar Kelimeler: Proteaz , *Bacillus sp.*,SG-11, Asidik, Mezofil ,TLC

ABSTRACT

MsC THESIS

ACIDIC PROTEASE ENZYME MANUFACTURER OF MARINE ORIGIN *Bacillus sp.* ISOLATION, ENZYME PRODUCTION, CHARACTERIZATION AND BIOTECHNOLOGICAL OPPORTUNITIES OF STRAINS

Selma GÜRZ UĞURLUER

DEPARTMENT OF BIOLOGY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF ÇUKUROVA

Supervisor : Prof. Dr. Burhan ARIKAN
Year: 2022 Pages: 101
Jury : Prof. Dr. Burhan ARIKAN
: Prof. Dr. Fuat BUDAK
: Prof. Dr. Osman KOLA

In this study, *Bacillus sp.* strain was isolated from seawater in Adana/Karataş region.

Bacteria's reproduction and enzyme producing abilities in solid growth medium that consist of KAZEIN substrain were analyzed. Optimum pH and optimum temperature levels were determined for *Bacillus sp.* SG-11 strain's enzyme production. In the next phase, partially purified enzyme's characterization was conducted and its usage opportunities were researched. Partially purified enzyme performed its optimum activity at 70°C pH 5.0. Enzyme preserved its activity at %92 rate between pH 5.0 and 6.0. It was observed that the enzyme was active over 96% between 20°C and 150°C. At different NaCl concentrations, between 3% and 4%, enzyme activity was over 97%. Enzyme presented 99% to 118% activity at the existence of EDTA, CoCl, SDS, Urea, PMSF,

β -merkaptoetanol, CaCl₂, ZnCl, H₂O₂, Triton-X-100. As for the washing performance, it presented almost 100% effect for tomato sauce + butter, baby formula, blood, chocolate and ketchup stains when used as detergent additive. In TLC analysis, protease enzyme caseum was hydrolyzed to L-sistin, L-Glisin, Prolin and Tyrozine aminoacids.

Keywords: Protease, *Bacillus sp.*, SG-11, Asidic, Mesophyll, TLC

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Bu çalışmada, Karataş bölgesinden alınan deniz suyu örneklerinden *Bacillus sp.* bakterileri izole edilmişlerdir. Alınan su örnekleri ön işleminden geçirildikten sonra pH'sı 5.0 olan katı besiyerlerine (N1 agar) tek koloni düşecek şekilde sulandırılarak ekilmişler ve mezofil koşullarda 24 saat inkübasyona bırakılmışlardır.

N1 agar besiyerinde tek koloni oluşturan bakterilerden koloni morfolojileri *Bacillus sp.* olduğu düşünülen suşlar steril kürdan ile alınarak pH'sı 5.0 olan N1 agar besiyerine çizgi şeklinde ekilerek üretilmişlerdir. İzole edilen örnekler pH'sı 5.0 e ayarlanmış skimmilk agar besiyerine çizgi şeklinde ekilerek 24 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda ekim çizgisi etrafında hidroliz zonu oluşturan örnekler proteaz pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Deniz suyundan toplam 125 adet suş elde izole edilmiş olup, bunların 21 adedi proteaz pozitif olarak saptanmıştır. İzole edilen suş sayısına göre asidik proteaz enzimi sentezleyenlerin oranı yaklaşık %16.8 bulunmuştur.

Proteaz pozitif özellik gösteren örneklerden SG-11 olarak adlandırılan suş pH 5.0-7.0 aralığında en geniş hidroliz zonu oluşturduğu için enzim üretimi ve karakterizasyonu için seçilmiş ve kullanılmıştır.

Enzim üretimi için seçilen suş morfolojik, gram boyama ve biyokimyasal yöntemler kullanılarak analiz edilmiş ve *Bacillus sp.* olarak tanımlanmıştır.

SG-11 suşundan üretilen ve kısmi saflaştırma ile elde edilen asidik proteaz enzimi optimum aktivite gösterdiği pH değeri, optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri, pH stabilitesi, termal stabnilite, farklı NaCl konsantrasyonlarında gösterdiği aktivite, çeşitli metal iyonu, inhibitör, şelatör, okside edici ajanlar, yüzey aktif bileşikler ile muamele edilerek karakterizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Enzim farklı substratlar ile muamele edilerek ortaya çıkan hidroliz ürünlerinin saptanması için TLC, moleküler ağırlık için PAGE çalışmaları ile ileri düzeyde karakterizasyon gerçekleştirilmiştir. Enzimin performansını ortaya koymak için salça+yağ, bebek

maması, kan, çikolata ve ketçap ile önceden kirletilmiş olan ham bez yıkama performansına tabi tutulmuş ve enzimin lekeleri gidermedeki başarısı araştırılmıştır.

SG-11 enzimi optimum aktivitesini pH 5.0 te gösterirken, pH 4.0-10 aralığında ortalama %96.85 aktivite elde edilmiştir. Enzim bu özellikleri ile asido-alkali özelliğe sahiptir. İzole edilen enzim optimum aktivitesini 70 C’de göstermiştir. Bununla birlikte 20-100C aralığında ortalama %98 aktiviteye sahiptir. Bu zellikleri ile termofil ve termostabil karakterdedir.

SG-11 proteaz enzimi 20-150 C sıcaklık aralığında 60 dakika süreyle n inkübasyona bırakıldığında tüm sıcaklık değerleri için yaklaşık %98 oranında orijinal aktivitesini koruduğu gözlemlenmiştir. Enzim 120C de %107 ile orijinal aktiviteye göre indüklenerek yüksek bir stabilite göstermiştir. Bu zellikler enzimin yüksek düzeyde termostabil (hiper termofil) olduğunu göstermektedir.

İzole edilen enzim %3-40 aralığındaki NaCl konsantrasyonlarında orijinal aktivitesini ortalama %98 devam ettirmiştir. Enzimin %40 konsantrasyonda bile yaklaşık %98 aktivite göstermesi hiper halofilik özelliktir.

SG-11 ‘den İzole edilen proteaz enzimi kullanılan kimyasallardan etkilenmemiş, bazıları aktiviteyi artırıcı yönde etki göstermiştir. Enzim aktivitesi 0 mM CaCl₂ %100, 10mM ZnCl₂ % 99, %5 H₂O₂ %99, 3mM PMSF %100 ve 10 mM Üre ile %99 oranında korunmuştur.

Enzim %5 Triton X-100 %118, 10 mM EDTA %101, , %5 SDS %101 katalitik aktivite göstermiştir. Triton X-100 ile kontrole göre %18 oranında indüklenmiştir. Aktivitenin kontrole göre Triton X-100 ‘de %18, EDTA ve SDS’de %1 oranında arttığı saptanmıştır. Enzim sistin proteaz karakterinde olup, bu özellikleri ile deterjanlardan etkilenmeyen, okside edici ajanlara dayanıklı özellik göstermektedir.

Enzimin yıkama performansı denemelerinde salça yağ karışımı şeklindeki uygulamada en düşük performans elde edilirken, bebek maması, çikolata, yemek sosu, kan örnekleri ile yapılan uygulamada yaklaşık %100 temizleme başarısı göstermiştir.

Deniz kökenli *Bacillus sp.* SG-11 suşundan elde edilen proteaz enzimi, asido alkali, termofil ve hipertermostabil, hiperhalofil, inhibe edici ajanlara yüksek düzeyde dirençli, deterjan ve okside edici ajanlardan etkilenmeyen, deterjan katkısı olarak kullanıldığında temizleme performansı çok yüksek olan sistin proteaz özelliğe sahiptir.

Bu özellikleri nedeni ile enzim bulaşık ve çamaşır deterjan formülasyonu, biyoremediasyon uygulamaları gibi biyoteknolojik uygulamalar için ideal özelliكتedir.





TEŞEKKÜR

Lisans dönemimden itibaren, mesleki gelişimime büyük katkılar sağlayan, çalışmamın her aşamasında desteğini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Burhan ARIKAN'a

Çalışmalarım boyunca yanımda olan arkadaşım Süreyya KOCAMAZ'a

Deneyisel çalışmalarında sağladığı ortam ve manevi desteklerinden dolayı Tekin TAYLANCI'ya

Doğduğum günden itibaren desteklerini esirgemeyen bu tezin yazıldığını göremesede varlığını hep yanımda hissettiğim yol gösterenim canım babam ŞEFİK GÜRZ'e

Varlığıyla gücüme güç katan canım annem Fazile GÜRZ'e,

Her daim arkamda olan kardeşlerim Selçuk-Seçil-Sevil-Doğan'a

Yoğun çalışmalarım sırasında sabır gösterdiği ve destek olduğu için hayat arkadaşım Gökhan UĞURLUER'e sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR.....	VII
İÇİNDEKİLER	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	XII
ŞEKİLLER DİZİNİ	XIV
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XVI
1. GİRİŞ	1
1.1. Enzimler	4
1.2. Proteazların Genel Özellikleri.....	9
1.3. Proteazların Sınıflandırılması	12
1.4. Proteaz Kaynakları.....	16
1.4.1. Bitkisel Kaynaklı Proteazlar	16
1.4.2. Hayvansal Kaynaklı Proteazlar	17
1.4.3. Mikrobiyal kaynaklı proteazlar	17
1.5. Proteazların Kullanım Alanları	20
1.5.1. Gıda Endüstrisi.....	22
1.5.2. İçecek Endüstrisi	24
1.5.3. Antialerjik Ürünler, Yapay Tatlandırıcılar ve Enzim Takviyeleri	25
1.5.4. Biyoaktif Peptid Üretimi	25
1.5.5. Hayvan Yem ve Mamalarının Üretimi.....	28
1.5.6. Deterjan ve Kuru Temizleme Endüstrisi	29
1.5.7. Tekstil Endüstrisi	30
1.5.8. Kağıt ve Kağıt Hamuru Endüstrisi	31
1.5.9. Farmasötik Teknoloji	31
1.5.10. Kişisel Bakım ve Kozmetik	32

1.5.11. Atık Yönetimi	32
1.5.12. Deri endüstrisi	33
1.6. Bacillus Cinsinin Genel Özellikleri	34
1.7. Bacillus Cinsi Proteazının Genel Özellikleri	36
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	39
3. MATERYAL VE METOD	41
3.1. Materyal	41
3.1.1. Bakteri İzolasyonunda Kullanılan Besiyerleri	41
3.1.1.1. N ₁ Agar	41
3.1.1.2. Proteaz Enzimi Üretim Besiyeri (Skimmilk Besiyeri)	41
3.1.2. Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar	42
3.1.2.1. H ₂ SO ₄ ve NaOH Çözeltisi	42
3.1.2.2. Etanol	42
3.1.2.3. Sodyum Fosfat Tamponu (100 mM, pH 7.0)	42
3.1.2.4. Sitrat Tamponu	42
3.1.2.5. Sodyum Fosfat Tamponu	43
3.1.2.6. Glisin-NaOH Tamponu	43
3.1.2.7. TCA (Trikloro Asetik Asit)	44
3.1.2.8. Yıkama Performansı için Çözeltiler	44
3.1.3. İnce Tabaka Kromatografisi Solüsyonları	44
3.1.3.1. Butanol-Asetik Asit-Distile Su Çözeltisi	44
3.1.3.2. Ninhidrin Çözeltisi (%0.25)	44
3.1.3.3. L-prolin (% 1) (w/v), L-Glisin (%1) (w/v), L-Sistein (%1) (w/v), L-Histidin (%1) (w/v) ve L-Tirosin (%1) (w/v)	45
3.2. Metod	45
3.2.1. Bakteri İzolasyonu ve Teşhisi	45
3.2.1.1. <i>Bacillus sp.</i> Suşlarının İzolasyonu	45
3.2.2. Bakterilerin Teşhisi	45
3.2.3. Katı Besiyerinde Proteaz Aktivitesinin Saptanması	46

3.2.4. Bakterinin Ürettiği ve Enzim Sentezinin Gerçekleştiği pH	
Aralığının Saptanması.....	46
3.2.5. Bakterinin Ürettiği ve Enzim Sentezinin Gerçekleştiği Sıcaklık	
Aralığının Saptanması.....	46
3.2.6. Enzim Üretimi ve Kısmi Saflaştırma	46
3.2.7. Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değerinin Saptanması ...	47
3.2.8. Enzimin Optimum Sıcaklık Aktivitesinin Saptanması	48
3.2.9. Enzimin Termal Stabilitesinin Saptanması	48
3.2.10. Enzimin Ph Stabilitesinin Saptanması	49
3.2.11. Enzim Aktivitesi ve Stabilitesine Farklı NaCl	
Konsantrasyonlarının Etkisi.....	49
3.2.12. Enzim Aktivitesine İnhibitör, Şelatör, Deterjan ve Metal	
İyonlarının Etkisi	50
3.2.13. İnce Tabaka Kromatografisi Yöntemiyle Reaksiyon Ürünlerinin	
Saptanması	50
3.2.14. Yıkama Performansı Testi	51
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	53
4.1. Deniz Suyundan <i>Bacillus sp.</i> Suşlarının İzolasyonu ve Tanımlanmasına	
Ait Bulgular	53
4.2. Bakterinin Katı Besiyerinde Ürettiği ve Enzim Sentezini	
Gerçekleştirdiği Optimum pH ve Sıcaklık Değerine Ait Bulgular	54
4.3. Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değerine Ait Bulgular	56
4.4. Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Değerlerine Ait Bulgular	58
4.5. Enzimin Termal Stabilitate Analizlerine Ait Bulgular	60
4.6. Enzim Aktivitesi ve Stabilitesine Farklı NaCl Konsantrasyonlarının	
Etkisi.....	63
4.7. Enzim Aktivitesine İnhibitör, Şelatör, Deterjan ve Metal İyonlarının	
Etkisi.....	66
4.8. Enzimin İnce Tabaka Kromatografisi Sonuçları	68

4.9. SG-11 Proteaz Enzimi Yıkama Performansı Sonuçları	69
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	75
KAYNAKLAR	85
ÖZGEÇMİŞ	101



ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 4.1. Asidik proteaz enzimi optimum pH değeri	57
Çizelge 4.2. Asidik proteaz enzimi optimum aktivite sıcaklığı	59
Çizelge 4.3. Asidik proteaz enzimi termal stabilite değerleri	61
Çizelge 4.4. Enzim Aktivitesine Farklı NaCl Konsantrasyonlarının Etkisi.....	64
Çizelge 4.5. Enzim Aktivitesine İnhibitör, Şelatör, Deterjan ve Metal iyonlarının Etkisi.....	66





ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 4.1. <i>Bacillus sp.</i> SG-11 suşunun besiyerinde 30°C 48 saatte pH 5 değerinde gösterdiği koloni ve zonu.....	55
Şekil 4.2. <i>Bacillus sp.</i> SG-11 suşunun besiyerinde 30°C 24 saatte pH 5 değerinde gösterdiği koloni ve zonu.....	56
Şekil 4.3. SG-11 Proteaz Enzimine Ait Optimum pH Değeri	58
Şekil 4.4. SG-11 Proteaz Enziminin Optimum Sıcaklık Değeri	60
Şekil 4.5. SG-11 Proteaz Enzimi Termal Stabilite Değerleri	62
Şekil 4.6. SG-11 Proteaz Enzimi Aktivitesine Farklı NaCl Konsantrasyonlarının Etkisi	65
Şekil 4.7. Enzim Aktivitesine İnhibitör, Şelatör, Deterjan ve Metal iyonlarının Etkisi	67
Şekil 4.8. TLC (İnce Tabaka Kromatografisi) analizi	69
Şekil 4.9. <i>Bacillus sp.</i> SG-11 Enziminin Salça-Yağ Lekesine Karşı Gösterdiği Yıkama Performansı	70
Şekil 4.10. <i>Bacillus sp.</i> SG-11 Enziminin Bebek Maması Lekesine Karşı Gösterdiği Yıkama Performansı	71
Şekil 4.11. <i>Bacillus sp.</i> SG-11 Enziminin Çikolata Lekesine Karşı Gösterdiği Yıkama Performansı	72
Şekil 4.12. <i>Bacillus sp.</i> SG-11 Enziminin Yemek Sosu Lekesine Karşı Gösterdiği Yıkama Performansı	73
Şekil 4.13. <i>Bacillus sp.</i> SG-11 Enziminin Kan Lekesine Karşı Gösterdiği Yıkama Performansı.....	74



SİMGELER VE KISALTMALAR

PMSF : Fenil metil sülfonil florid

Rpm : Dakikada Devir Sayısı

EDTA : Etilen diamino tetraasetik asit

SDS : Sodyum Dodesil Sülfat

TCA : Trikloro asetik asit

L : Litre

Nm : Nanometre

mL : Mililitre

Mm : Milimolar



1. GİRİŞ

Biyoteknoloji, çok çeşitli alanlarda gelişme gösteren ve günümüzde moleküler biyolojik yöntemlerinde yaygın şekilde kullanımıyla birlikte, giderek moleküler biyoteknoloji şeklinde değişime uğrayan, çok yeni ve geleceğe damgasını vuracak bir alandır. Ticari alanda kullanılan ürünlerin üretilmesi ile ilgili çalışmaların giderek hız kazanması sonucu, önemi her geçen gün daha da artmaktadır.

Dünyada, 1980-1983 yılları arasında sadece 300 küçük biyoteknoloji şirketi çalışma yaparken, bu sayı 1985 yılında sadece Amerika Birleşik Devletlerinde (A.B.D.) 400 düzeyine ulaşmıştır. Günümüzde A.B.D. de 900, bütün dünyada ise yaklaşık 1200 biyoteknoloji şirketi çalışmalarını çeşitli alanlarda sürdürmektedirler. Örneğin sadece farmasötik alanında 2000’li yıllarda kullanılacak biyoteknolojik ürünlerin toplam değerinin yaklaşık 60 milyar dolar/yıl düzeyinde olacağı düşünülmektedir. Biyoteknoloji kaynaklı çalışmalar A.B.D. de odaklanmış olmakla birlikte, günümüzde, Japonya ve Kanada, biyoteknolojiyi (özellikle moleküler biyoteknolojiyi) stratejik alan kategorisinde değerlendirerek, özel şirketlerin yanı sıra, hükümetler düzeyinde destekleme ve geliştirme kararı almışlardır (Glick ve Pasternak, 1994)

Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitli ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle, biyoteknolojinin endüstriyel enzimlerle ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar, daha da önem kazanmaktadır. Özellikle birkaç ülke dışında diğer ülkelerin bu konuda tamamen dışa bağımlı oldukları görülmektedir.

Alkalifilik özellikteki organizmalar, prokaryot, eukaryot, archaea grubu içerisinde yer almaktadır. Alkalifiller arasında çok değişik taksonomik gruplar olmakla birlikte, bunların bazıları taksonomiye yeni girmişlerdir. Alkalifiler, bahçe toprağı gibi normal çevresel ortamlardan izole edilebileceğı gibi, yüksek alkalik özellik gösteren topraklardan da izole edilebilirler. Alkalifilik enzimler endüstriyel

uygulamalarda büyük öneme sahiptirler. Alkaline selüloz, alkaline proteaz ve alkaline amilaz gibi alkalifilik organizmalardan izole edilen enzimler, çeşitli deterjanların içerisine karıştırılmışlar ve biyolojik deterjanlar şeklinde tanımlanmışlardır.

Dünyada üretilen toplam alkalifilik enzimlerin %30 dan büyük kısmı çamaşır deterjanları içerisine karıştırılarak değerlendirilmektedir (Horikoshi, 1996). Alkalifilik amilaz, selüloz ve proteazlar aynı zamanda endüstrinin diğer birçok alanında da yoğun şekilde değerlendirilmektedirler. Bunlar arasında dericilik, tekstil, gıda endüstrisi, içecek endüstrisi, ekmek ve pasta ürünleri, çeşitli soya ürünlerinin üretimi protein hidrolizatlarının tatlandırılması, farmasötik endüstrisi ve tıbbi uygulamalar, kimya endüstrisi, atıkların temizlenmesi, nişastadan etanol üretimi gibi kendi içlerinde birer endüstri olan çok değişik alanlar vardır (Rao ve ark., 1998; Igarashi ve ark., 1998; Kumar ve Takagi, 1999).

Endüstriyel alanda kullanılan enzimler bitkisel, hayvansal ve mikroorganizma kökenli olmakla birlikte ağırlıklı olarak mikroorganizmalardan izole edilebilmektedir. Bunun nedeni, mikroorganizma kaynaklı enzimlerin katalitik aktivitelerinin yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve daha ucuz olmaları, büyük boyutlarda ve yüksek saflıkta elde edilmesi gibi avantajlara sahip olmasıdır. Örneğin mikrobiyal enzimler ekstrem sıcaklık ve pH'larda çok yüksek düzeyde aktivite gösterirler (Wiseman, 1987; Horikoshi, 1999).

Mikrobiyal enzimlerin dünya genelinde yıllık kullanım değerlerine bakıldığı zaman, alkaline proteaz %25, diğer proteazlar %21, Amilaz %18, Renin %10, Trypsin %3, Lipaz %3 diğer karbonhidrat parçalayan enzimler (selüloz ve ksilanaz gibi) %10, analitik ve farmasötik enzimler %10 şeklinde bir dağılım göstermektedir (Zeman ve Mccres, 1985; Rao ve ark., 1998).

Bakteriyel kökenli proteaz enzimleri nötral ve alkaline ağırlıklı enzimler olup, *Bacillus* cinsindeki organizmalar tarafından üretilmektedirler. Bakteriyel nötral proteazlar pH 5-8 aralığında optimum aktivite gösterirler ve

termotoleranslığı nispeten düşüktür. Termotoleranslıklarının düşük olması gıda ürünlerinin üretilmesi sırasında reaksiyonların kontrol edilebilmesi açısından bir avantajdır. Bazı nötral proteaz enzimleri metalloprotein yapısına sahiptir ve aktiviteleri için iki değerlikli metal iyonlarına gereksinim duyarlar. Bakteriyal alkaline proteazlar yüksek pH değerlerinde (pH 10.0 gibi) aktivite göstermeleriyle karakterize olup, substrat sipesifiteleri oldukça geniştir (Rao ve ark., 1998).

Alkaline proteaz üretiminde *Halobacterium* sp., *B. licheniformis*, *B. megatherium*, *Aspergillus* sp., *Micrococcus*, *Pseudomonas* ve *Streptomyces* türleri vardır (Horikoshi, 1996; Horikoshi,1999; Kumar ve Takagi,1999).

Düşük sıcaklıklara adapte olmuş mikroorganizmalar ekstremofillerin bir üyesi olup, 0°C de bile üreyebilirler. Literatürde psikrofil bakterilerin optimum 15°C, maksimum 20°C, minimum 0°C veya daha düşük sıcaklıklarda üredikleri bildirilmiştir (Morita ve ark., 1998). Psikrofiller, soğuğa uyumlu (soğuk habitatlara adapte olmuş) mikroorganizmalardır ve bunlar düşük sıcaklıklarda yüksek aktivite gösteren enzimler üretmektedirler. Bu enzimler cold-active (düşük sıcaklıklarda aktif) şeklinde tanımlanırlar (Kulakova ve ark.,1998; He ve ark., 2009). Cold-active enzimler 3 genel özelliğe sahiptir.

1. Sıcaklıkla birlikte enzim aktivitesinin düşük sıcaklığa doğru değişmesi,
2. Spesifik aktivitesinin ve fizyolojik verimin düşük sıcaklıklarda mezofilik koşullara göre daha yüksek olması
3. Mezofil sıcaklıkta enzimin termal stabilite sınırının hızlı bir şekilde düşmesi (Morita ve ark., 1998).

Cold active enzimler, derin denizler, yüksek dağlar ve kutuplarda sürekli yaşayan organizmalar tarafından üretilmektedirler. Bu enzimlerin en önemli grubunu düşük termal stabiliteleri ve düşük sıcaklıkta yüksek katalitik aktivite göstermeleri nedeniyle cold aktif proteazlar oluşturur. Bu özelliği nedeniyle temizlik deterjanları, deri işletmeleri, gıda endüstrisi ve moleküler biyoloji gibi çok

farklı alanlarda kullanılmaktadırlar (Wang ve ark., 2008). Örneğin Novozim firması savinaz markası ile enkapsüle deterjan üretmektedir. Japon bilim enstitüsü CP-58 ve CP-70 patent numaralı iki cold aktif proteaz enzimi geliştirmiştir (Quamrul ve Eiichi, 1998).

Bir başka Japon firması Cao-corporation deterjanda kullanmak için cold active proteaz enzimine patent almıştır. Bütün bunlardan daha önemlisi cold active protease enziminin kullanıldığı alanlarda önemli bir enerji tasarrufu sağlanmaktadır (çok pahalı olan ısıtma işlemlerine gerek olmamakta, kış mevsimi boyunca soğuk koşullarda aktivite devam etmekte, reaksiyon veriminde artış sağlanmakta, yüksek sıcaklıklarda ortaya çıkabilecek istenmeyen kimyasal teaksiyonlar minimize edilmekte ve ihtiyaç duyulduğu anda enzim kolayca inhibe edilebilmektedir).

Örneğin gıda endüstrisinde sıcaklığa hassas ürün ve substratların orijinalliklerinin değişmesi önlenmektedir. Bunların dışında cold active proteaz enzimi içecek ve şarap endüstrisi, peynir üretimi, hayvansal gıdaların eldesi ve meyve suyu endüstrisi gibi alanlarda da mezofilik enzimlere karşı iyi bir alternatiftir. Ayrıca cold active proteazların düşük sıcaklıkta yüksek katalitik aktivite göstermeleri nedeniyle gıda endüstrisinde tatlandırıcı enzimler şeklinde kullanılması da söz konusudur (örneğin, buzdolabında saklanan et ürünlerinin lezzetlerinin artırılmasında) (He ve ark., 2004).

1.1. Enzimler

Enzimler, canlı organizmalardaki çoğu fizyolojik faaliyetin yürütülmesinde, dolayısıyla hayatın devamlılığının sağlanması için gerçekleşen biyokimyasal reaksiyonların neredeyse tamamında görev yapan, doğal olarak canlılar tarafından sentezlenen, genellikle protein yapısında olan özgül biyolojik katalizörlerdir. Antik çağlarda ne olduğunu ve nasıl çalıştığı bilinmeden asırlar boyunca şarap, sirke, bira, peynir, ekmek gibi yiyecek ve içeceklerin yapımında kullanılmış olan enzimatik reaksiyonlar, bu açıdan düşünüldüğünde farkında olunmadan gerçekleştirilen ilk biyoteknolojik uygulamalardır. Antik çağlardan günümüze uzanan enzim

teknolojisindeki hızlı gelişmeler ile birlikte enzimler çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere gündelik ve ekonomik hayata girmiştir. Ekonomik olarak üretilibilmeleri, biyolojik olarak bozunabilir olmaları, spesifik olmaları, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, konvensiyonel yöntemlerle karşılaştırıldığında daha az atık oluşturmaları, çalışan ve çevre sağlığı açısından tehlikesiz olmaları, reaksiyon ortamından kolaylıkla geri kazanılmaları gibi birçok avantaja sahip olan kompleks yapılu bu organik makromoleküller birçok endüstriyel alanda yavaş yavaş inorganik katalizörlerin yerini almaktadır (Choi ve ark. 2015, Seager ve ark. 2018).

Enzimler hayvanlar ve bitkiler tarafından da üretilmesine rağmen, kontrollü koşullarda kısa sürede elde edilmesinden dolayı mikroorganizmalar enzim üretiminde asıl kaynağı oluşturmaktadır. Endüstriyel amaçlı kullanılan enzimlerin yaklaşık %96'sı mikroorganizmalardan üretilmektedir. Bunların yaklaşık %60'ı filamentöz funguslerden, %24'ü bakterilerden, %6'sı hayvanlardan, %4'ü mayalardan ve %2'si *Streptomyces*'den elde edilmektedir (Lowe 2001).

Günümüzde enzimler deri, tekstil, yem, gıda, içecek, deterjan, ilaç, atık giderimi, biyoyakıt ve kağıt endüstrisinde kullanılmaktadır (Van Beilen ve Li 2002). Ayrıca kişisel bakım, kozmetik, kuru temizleme, enantiyoselektif sentez, filmlerden gümüşün geri kazanımı, sanat eseri restorasyonu ve biyoaktif peptid, antialerjik ürün, yapay tatlandırıcı üretimi gibi spesifik alanlarda da kullanımları yaygın hale gelmiştir (Anonim 2020a).

Enzimlerin kullanım alanları arttıkça pazarı da genişlemektedir. Küresel enzim pazarının 2007 yılından bu yana her yıl %7.6'lık bir oranla büyüdüğü belirlenmiştir. 2018 yılında pazarın yıllık değerinin 7.1 milyar ABD doları olduğu ve bu değer yıllık 5.5'lik büyüme hızı ile 2026 yılında 11.03 milyar ABD dolarına ulaşacağı tahmin edilmektedir.

Enzimler 2 farklı organizmadan elde edilebilmekte fakat küresel enzim pazarında en büyük pay sahibi mikrobiyal kaynaklı enzimlerdir. Mikrobiyal kaynaklı enzimlerin 2018 yılında küresel enzim pazarının yaklaşık olarak %37'lik kısmını

elinde tuttuğu ve bu oranın %5.8'lik büyüme oranı ile 2026 yılında %38'e ulaşacağı tahmin edilmektedir (Anonim 2019a).

Dünya genelinde proteazlar yaklaşık %60 pazar payı ile pazardaki en çok satan enzimdir ve bunu karbohidrazlar (amilazlar, glukanaazlar, selülazlar), fitazlar ve lipazlar takip etmektedir (Kumar ve ark. 2014).

Hidrolazların endüstriyel enzim pazarının üçte ikisinden fazlasını (yaklaşık olarak %75-80) elinde tuttuğu buna ek olarak hidrolazların arasında ise endüstriyel açıdan en fazla rağbet gören grup ise proteazlardır (Anonim 2018).

Proteazların yıllık %6.4'lük büyüme hızı ile 2022 yılında değerinin 3.29 milyar ABD dolarına ulaşacağı tahmin edilmektedir (Anonim 2019a).

Proteazlar, proteinlerdeki peptid bağlarının hidrolizini katalizleyen enzimlerdir, biyoteknoloji ve endüstrinin birçok sektöründe yaygın olarak kullanılmaktadır.

Gıda endüstrisinde kurabiyelerin lezzet ve renginin geliştirilmesinde, unlu mamullerin üretiminde unun işlenerek hamur dokusunun iyileştirilmesinde, peynir üretiminde lezzet ve aromanın geliştirilmesinde, etlerin yumuşatılmasında, bazı antialerjik ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır (Singh ve ark. 2016).

Deri endüstrisinde kıl giderimi, sama ve ıslatma gibi aşamalarda kullanılmaktadır

Hayvan yemlerinde sindirilebilirliğinin arttırılmasında, temizleme ajanı olarak çamaşır ve bulaşık deterjanlarının formülasyonlarında kullanılmaktadırlar.

Deterjanlara ek olarak gıda (et ve süt) endüstrisinde kullanılan malzemelerin, ameliyatlarda kullanılan cerrahi aletlerin ve kontakt lens gibi bazı spesifik materyallerin temizlenmesinde kullanılmaktadırlar. Buna ek olarak röntgen ve fotoğraf filmlerinden gümüşü çıkarmakta ve en fazla da deri endüstrisinde kullanılmaktadırlar (Joo ve Chang 2006, Jellouli ve ark. 2011).

Deri endüstrisi, deri kullanılarak ayakkabı, çanta, giysi gibi birçok ürünün üretiminin gerçekleştirildiği çok eski bir imalat sektörüdür. Bilinen en kirletici sektörlerden biri olan dericilikte, toksik ve tehlikeli kimyasalları içeren bol miktarda

katı ve sıvı atık oluşumuna yol açmaktadır; deri endüstrisinden kaynaklanan bu atıklar ise canlılar ve çevre üzerinde zararlı etkilere yol açmaktadır. Bu atıklara örnek olarak tabaklama işleminde kullanılan arsenik ve krom gibi ağır metallerin yanı sıra klorür, sülfat, hidrokarbon, amin, aldehit 3 içeren bileşikler verilebilir (Sivaram ve Barik 2019).

Geleneksel (konvansiyonel) yöntem olarak da adlandırılan ve yüksek oranda kireç ve sülfürlü bileşikler kullanılarak yapılan kıl giderimi işlemi, deri üretimi kaynaklı kirliliğinin ortalama olarak % 80-90'ına sebep olduğu için üretimin en kirlletici aşaması olarak kabul edilmekte ve çevre, arıtım tesisi ve kanalizasyon sistemine verdiği zararların yanında deri sektöründe çalışanlarında kanser gibi hastalıklara hatta ölümlere bile sebebiyet vermektedir (Balasubramanian ve Pugalenth 2000).

Günümüzde dünya çapında yaklaşık olarak 9 000 tabakhanede deri üretimini yapıldığı tahmin edilmektedir (Anonim 2019b). Ortalama atık su deşarjı günde yaklaşık 15 milyon tondur. Yıllık yaklaşık olarak 1,8 milyar m² işlenmiş haldeki deri piyasaya sürülmekte ve bu işlem sonunda 2,4 milyon ton çamurlaşmış atık ve 250 milyon ton sıvı atık oluştuğu tahmin edilmektedir (Chowdhury ve ark. 2013). Tüm bu olumsuz etkilerden dolayı, deri işlenmesi kırmızı kategoridedir (Fathima ve ark. 2012).

Son yıllarda deri endüstrisinde ıslatma, kıl giderimi, sama ve yağ giderimi gibi işlemlerde biyoteknolojinin kullanımı artmıştır. Özellikle kıl gidermede kimyasal işlemler yerine enzimatik işlemler alternatif olarak kabul edilmiştir. Böylece, proteolitik enzimler sayesinde sülfürlü kimyasallar kaynaklı çevresel kirlilik ve yarattığı toksik etkinin azaltılabilirliği sağlanmıştır (Padmapriya ve ark. 2012). Bu sayede kılın iyi kalitede geri kazanımı (Hidrolize kıl gübre, ilaç, kozmetik ürün, aminoasit, hayvan yem ve mama üretiminde kullanılmaktadır), çalışanlar ve çevre açısından temiz bir atmosfer yaratılması mümkün olmaktadır (Arunachalam ve Saritha 2009).

Proteazlar, deri endüstrisinde ıslatma, kıl giderimi ve samada kullanılmaktadır. Bakteriyel proteazlar, derinin kollajen olmayan yapılarının seçimli hidrolizinde, globulinler ve albuminler gibi fibril yapıda olmayan proteinlerin uzaklaştırılmasında, deriden kılların ayrılmasında ve derinin yumuşatılmasında kullanılmaktadır (Anwar ve Saleemuddin 1998).

Enzim teknolojisindeki hızlı gelişmeler ile birlikte, deri endüstrisinde mikrobiyal proteazlara olan talebi de arttırmıştır. Ürüne artan talep doğrultusunda sanayide maliyet düşürmek ve reaksiyon verimliliğini arttırmak gibi unsurlar öne çıkmaktadır. Bu sebeple sanayide kullanılabilecek yeni biyokatalizörlerin keşfi ve bu unsurlarla mücadelede aslında kilit taşı görevi görmektedir. Yeni biyokatalizörlerin keşfi ile verimlilikte artma; maliyet, zaman, tüketilen enerji miktarı, kullanılan kimyasal madde miktarı ve üretilen atık miktarı, bertarafı yapılması gereken atık miktarı gibi unsurlarda ise azalma hedeflenmektedir (Castilla ve ark. 2018).

Mikrobiyal yolla enzim üretiminin ilk aşaması uygun mikroorganizmanın seçimidir. Birçok mikroorganizma proteaz üretebilmektedir. Fakat sadece yeterli miktarda ekstraselüler proteaz üretebilen mikroorganizmaların endüstriyel açıdan önemi vardır. Endüstride kullanılmakta olan mikrobiyal proteazların en önemli kaynakları maya, küf ve bakterilerdir.

Bakteriler içerisinde ise Bacillus cinsi proteaz üretiminde en fazla kullanılan mikroorganizmadır (Si ve ark. 2018). Bunun nedeni, çok çeşitli ortamlardan izolasyonlarının nispeten kolay olması, hem kompleks hem de sentetik besi yerinde gelişebilmeleri, bol miktarda ekstraselüler proteaz üretebilmeleri ve dirençli sporlara sahip olmalarıdır (Mabrouk ve ark. 1999). Diğer yandan, organizmanın enzim üretimi, besi yeri bileşenleri ve kültürel koşullardan fazlaca etkilenmektedir. Dolayısıyla bu parametrelerin optimizasyonu enzim üretimi açısından çok önemlidir (Das ve Prasad 2010, Vanitha ve ark. 2014).

1.2. Proteazların Genel Özellikleri

Proteazlar (proteolitik enzimler, peptidazlar, proteinazlar) protein moleküllerindeki peptid (amit) bağlarının hidrolizini katalizleyen enzim alt sınıfıdır (Motyan ve ark. 2013).

Proteinlerdeki peptid bağlarını hidroliz ederek, proteinleri parçalayan enzimlerin adlandırılmasında uzun yıllar sadece proteaz terimi kullanılmıştır. Sonraları proteazların iki türünün olduğunu fark edilmiştir. Buna göre bazı proteazlar, sadece bozulmamış proteinlerin hidrolizini; bazı proteazlar ise küçük peptidlerin hidrolizini gerçekleştirmektedir.

Spesifik olarak sağlam proteinlerin hidrolizini gerçekleştiren proteazlar için "proteinaz" terimi kullanılmaya başlanmıştır.

Günümüzde proteazlar, etki ettikleri peptid bağının yerine göre endopeptidaz (proteinaz) ve ekzopeptidaz olmak üzere 2 grupta incelenmektedir.

Endopeptidazlar, protein molekülü içindeki peptid bağlarını parçalayabilen proteazlardır. Endopeptidazlara örnek olarak pepsin, rennin, elastaz, tripsin ve kimotripsin verilebilmektedir.

Ekzopeptidazlar ise proteinlerin terminal bölgesinden tek bir aminoasit kopararak etkilerini gösteren proteazlardır. Ekzopeptidazlara örnek olarak karboksipeptidaz ve aminopeptidaz verilebilmektedir.

Endopeptidazların kataliz reaksiyonu sonucunda peptid zincirleri oluşurken; ekzopeptidazların reaksiyonu sonucunda tek bir aminoasit ve peptid zinciri meydana gelmektedir. Kısacası ekzopeptidazlar sadece serbest karboksil veya amino uç içeren proteinlerin hidrolizini gerçekleştirebilirken, endopeptidazlarda böyle bir sınırlama yoktur (Bergmann ve Ross 1936, Barrett ve McDonald 1986).

Endüstriyel açıdan en fazla endopeptidazlar tercih edilmektedir. Buna ek olarak katepsin gibi bazı enzimler hem endopeptidaz hem de ekzopeptidaz aktivitesi göstermektedir (McKay ve ark. 1983). Bunlar ayrı grup olarak ele alınmak yerine endopeptidazlar içine dahil edilmektedir.

Proteazlar, inhibitör varlığındaki inhibisyon profillerine göre sınıflandırılabilir. Spesifik olarak EDTA'nın metalloproteazları, DIFP ve PMSF'nin serin proteazları, iyodoasetatın sistein proteazları, pepstatin A'nın ise aspartik proteazları inhibe ettiği bilinmektedir (Zambare ve ark. 2011).

Bir metal şelatörü olan EDTA, metal iyonları ile altıya kadar bağ yapabildiği için ortamdaki metal iyonlarına özellikle de iki değerlikli katyonlara bağlanmaktadır. EDTA, enzimin aktif merkezindeki metalleri şelatlayarak; enzimin belirli bir aminoasit kalıntısının spesifik olarak bağladığı metalleri şelatlayarak; enzimin kofaktörü olarak ortamda bulunan metalleri şelatlayarak etkisini gösterebilmektedir. EDTA, metalloenzimlerin aktif merkezindeki metal iyonlarını şelatladığında enzim inhibe olmaktadır. Çünkü enzimin aktif merkezinde bulunan metal iyonları, enzim stabilitesi ve yapısal bütünlüğü açısından çok önemlidir.

EDTA'nın inhibitör etkisinin az olması, enzimin kofaktör olarak metal iyonlarına çok az gereksinimi olduğunu göstergesidir. Bu sebeple EDTA'nın enzim aktivitesi üzerindeki zayıf etkisinin olması, enzimin aktivitesinin kofaktörlerden (genellikle iki değerlikli katyon) bağımsız olduğunu ve enzimin metalloproteaz olmadığını düşündürmektedir (Singh ve ark. 2016).

EDTA, tarafından etkinliğini inhibe olduğu halde, metal iyonları tarafından uyarılan ve etkinliği artan proteazların metalloproteaz olduğu düşünülmektedir (Rehman ve ark. 2017).

Serin proteazların aktif bölgesindeki serin kalıntısını PMSF ve DIFP gibi ajanlar geri dönüşsüz olarak bloke etmekte bu durum enzimin inaktivasyonu ile sonuçlanmaktadır (Beg ve Gupta 2003).

Fe^{2+} , Hg^{2+} , Cr^{2+} metal iyonları; izopropanol, metanol, DMSO, DTT, 2- β -mercaptoetanol çözücüler; SDS, Tween 20, Tween 80, Triton X-100 deterjanları genellikle proteazları inhibe etmekte fakat spesifik olarak inhibe ettikleri bir aile bulunmamaktadır (Briki ve ark. 2016).

Ditiotreitol (DTT), disülfid bağlarını indirgeyerek, bu kovalent bağların kopmasına neden olmaktadır, bu sebeple genel bir proteaz inhibitörüdür. Güçlü

şekilde anyonik olan SDS ve iyonik olmayan Tween 80 ve Triton X-100 gibi deterjanlar proteaz aktivitesini genellikle düşürmektedir (Annamalai ve ark. 2014).

β -merkaptoetanol bazen disülfid bağlarına atak yaparak, proteinlerin tersinmez inhibisyonuna sebep olmakta bazen de enzimin yüzeyindeki aminoasitlerdeki hidrojen bağlarının sayısını değiştirerek, katalitik aktivite ve stabiliteyi düşürmektedir.

β -merkaptoetanol ve SDS etkisiyle proteinin yapısal olarak yeniden organizasyonunun gerçekleşebileceği de belirlenmiştir. Örneğin; β -merkaptoetanol'un, sistein proteazların stabilizasyonunda görev aldığı; bunu proteindeki sülfidril gruplarını oksidasyondan koruyarak gerçekleştirdiği belirlenmiştir (Uddin ve ark. 2014).

SDS'in proteaz aktivitesini arttırdığı; bunun SDS ile bazı elektrostatik etkileşimlerle proteazın yeniden modellenerek daha stabil ve kararlı konformasyona kavuşmasıyla gerçekleştiği düşünülmektedir (Rehman ve ark. 2017).

Genellikle s-blok metalleri (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Li^{3+}), yüksek sıcaklıklarda enzimin tersiyer yapısını korumasına yardımcı olmakta yani enzimi termal denatürasyondan korumaktadır. Bu metaller enzimlere genellikle tersinir şekilde iyonik olarak bağlanmaktadır. Ca^{2+} iyonu protein içi etkileşimleri kuvvetlendiremekte; proteindeki belirli bölgelere bağlanarak otoliz ve sıcaklıkla etkisiyle meydana gelebilecek 12 tersiyer yapıdaki açılmaları engellemekte; bazen de katalitik reaksiyonlarda yer almaktadır.

Kısacası Ca^{2+} iyonu proteazın aktivitesini ve termal stabilitesini arttırmaktadır (Annamalai ve ark. 2014).

Mg^{2+} iyonu da proteazları stabilize etmekte ve aktivitesini arttırmaktadır. Çünkü Mg^{2+} katyonu, çözeltideki çözülmüş oksijeni azaltarak, tiyol gruplarını oksidasyona karşı korumaktadır.

Bazı çalışmalar Ca^{2+} katyonunda aynı mekanizmayı kullandığı ifade etmektedir (Silva ve ark. 2018).

Na^+ ve Mg^{2+} iyonları, enzimin aktif merkezdeki iki bitişik aminoasit arasında tuz köprüsü görevi görerek enzimin tersiyer yapısının stabilizasyonunu sağlamaktadır (Ahmetoglu ve ark. 2015).

Geçiş metalleri genellikle proteazların aktivitesini azaltmakta veya inhibe etmektedir. Çünkü d-blok (geçiş) metalleri (Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cr^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+}) kararlı kompleksler vermek üzere tercihen kovalent bağlarla enzime tersinmez şekilde bağlanmaktadır (Shah ve ark. 2010). Örneğin, Hg^{2+} iyonu, enzimdeki karboksilik gruplar ve triptofan kalıntılarına bağlanarak enzimi inhibe etmektedir (Sinha ve Khare 2013).

Bazı araştırmacılar ise bazı d blok metallerinin spesifik olarak bazı enzimlerin aktivitesini arttırdığını; bunu enzimin konformasyon ve stabilizasyonunu bozabilecek olan güçlere karşı bir koruyucu bariyer gibi davranarak gerçekleştirdikleri düşünülmektedir (Adinarayana ve ark. 2003). Örneğin, özellikle Zn^{2+} iyonu varlığında enzimatik stabilitede artış olması, proteazın Zn^{2+} bağımlı metalloproteaz olduğunu göstermekte ve bu metal iyonlarının substrat hidrolizi sırasında nükleofilik atak için su moleküllerini uyardığı bilinmektedir (Wu ve Chen 2011).

1.3. Proteazların Sınıflandırılması

Proteazlar, hidrolazlar sınıfına dahil olan çok geniş ve kompleks bir enzim grubudur. Bu sebeple günümüze kadar aktivitelerinin olduğu sıcaklık ve pH değeri, köken aldıkları organizma, substrat spesifikliği, stabilite profilleri, aktif merkezleri, katalitik mekanizmaları gibi birçok parametre baz alınarak sınıflandırılmışlardır. Örneğin maksimum aktiviteye sahip oldukları pH değerine göre asidik, nötral ve alkalin olmak üzere 3 gruba ayrılmaktadırlar (Briki ve ark. 2016). Fakat proteazların sınıflandırılmasında gerçekten işlevsel olan 3 sistem bulunmaktadır. Bu sistemlerdeki sınıflandırmada baz alınan kriterler, reaksiyonun çeşidi, reaksiyonun kimyasal mekanizması ve enzimin moleküler yapısı olmak üzere 3'e ayrılmaktadır.

1.Serin (S) proteazlar; aktif merkezinin katalitik bölgesinde nükleofilik serin kalıntısı taşımaktadır. Katalitik bölgedeki serin amino asitinin hidroksil grubu nükleofil olarak hareket etmektedir. Katalitik bölgelerinde serine ek bazen histidin, lizin, aspartik asit ve glutamik asit bulunabilmektedir. Serin proteazlarda proton alıcısı baz, genellikle histidin bazen de lizindir. Proton alıcı baz histidin olduğunda üçüncü bir aminoasit kalıntısı da histidinin daha iyi bir proton alıcısı dolayısıyla nükleofilin de daha iyi proton vericisi olmasını sağlamak için görev yapmaktadır. Katalitik triad (üçlü) denilen bu durum bütün serin proteazlarda görülmemektedir. Kimotripsin, subtilisin gibi birçok serin proteazda katalitik triad yapısının üçüncü üyesi aspartik asittir. Omptin gibi bazı serin proteazlarda ise serin ve histidin aminoasitlerini içeren katalitik dyad (ikili) yapısı görülmektedir. Serin proteazlarda önemli olan dördüncü bir aminoasit kalıntısı bulunmaktadır. Bu aminoasit kalıntısı substrat ürüne dönüşürken oluşan ara maddenin stabilizasyonunu sağlamaktadır. Dördüncü aminoasit kalıntısı değişkendir, kimotripsin için glisin, subtilisin için asparajindir. Bazı serin proteazlar ise tek bir katalitik aminoasit kalıntısı taşımaktadır. Bu aminoasit kalıntısının enzimin amino terminalinde bulunması sebebi ile bu proteazlara Nterminal nükleofil (Ntn) hidrolazlar denilmektedir (Barrett ve ark. 2012).

Serin proteinazlara örnek olarak tripsin, kimotripsin, elastaz, trombin, plazmin, subtilisin verilebilir (Polaina ve MacCabe 2007).

2.Sistein (C) proteazlar; tüm canlı organizmalarda görülmektedir ve tiyol proteazlar olarak da adlandırılmaktadır. Katalitik bölgesinde nükleofilik sistein aminoasiti kalıntısı bulunmaktadır.

Sistein proteazlarda katalitik reaksiyon sırasında katalitik bölgedeki sistein amino asitinin sülfidril grubu nükleofil olarak hareket etmektedir (Hartley 1960). Bazıları ise katalitik bölgesinde sisteine ek histidin, glutamik asit, aspartik asit kalıntısı içermektedir.

Sistein proteazlarda genellikle proton alıcısı baz histidin bazen de lizindir. Proton alıcı baz histidin olduğu zaman üçüncü bir aminoasit kalıntısı da histidinin

daha iyi bir proton alıcısı dolayısıyla nükleofilin de daha iyi proton vericisi olmasını sağlamak için görev yapmaktadır. Katalitik triad (üçlü) denilen bu durum bütün sistein proteazlarda görülmemektedir. Sistein proteazda katalitik triad yapısının üçüncü üyesi değişkendir. Örneğin papain için asparajin, ubiquitin hidrolaz için aspartik asittir. Çoğu sistein proteazda sistein ve histidin aminoasitlerini içeren katalitik dyad (ikili) yapısı 18 görülmektedir.

Sistein proteazlarda önemli olan dördüncü bir aminoasit kalıntısı bulunmaktadır. Bu aminoasit kalıntısı substrat ürüne dönüşürken meydana gelen ara maddenin stabilizasyonunu sağlamaktadır. Dördüncü aminoasit kalıntısı değişkendir. Örneğin papain için glutamik asittir. Bazı sistein proteazlar ise sadece tek bir katalitik aminoasit kalıntısı taşımaktadır. Bu aminoasit kalıntısının enzimin amino terminalinde bulunmasından dolayı bu proteazlara N-terminal nükleofil (Ntn) hidrolazlar denilmektedir. Sistein proteazlara örnek olarak kaspaz, papain, bromelain ve fisin verilebilir (Sari 2011).

3. Aspartik (A) proteazlar; kataliz mekanizmasıyla ilişkili aminoasit kalıntısı olarak aspartik asit bulundurmaktadır. Aspartik proteazların hepsinin katalitik bölgelerinde iki aspartik asit kalıntısı bulundurmakta ve aktifleştirilmiş olan bir su molekülü ise nükleofil olarak hareket etmektedir.

Aspartik proteazlar aynı zamanda karboksil proteaz ve asidik proteaz olarak da adlandırılmaktadır. Çünkü peptid bağlarını hidrolizinin katalizine enzimin katalitik bölgesinde iki aspartik asit katılmaktadır. Aspartik asitlerden birinin karboksil grubu peptid bağı hidrolizinde rol oynamaktadır. Ortamda bulunan su molekülünün hidrojen iyonunun aspartik asitin karboksil grubu tarafından alınması sonucunda, su molekülü kaynaklı hidroksil iyonu proteindeki peptid bağının hidrolizine katılmaktadır. Aspartik proteazlarda su molekülü direkt olarak enzimin aspartik kalıntısının yan zincirine bağlanmaktadır. En iyi bilinen üyeleri kimozin ve pepsindir (Polaina ve MacCabe 2007).

4. Metallo (M) proteazlar; kofaktörü metal iyonu olan proteaz enzimleridir. Metallo proteazlarda genellikle aktifleştirilmiş olan bir su molekülü nükleofil olarak

hareket etmektedir. Metallo proteazlar katalitik aktiviteleri için iki değerlikli metal iyonlarına ihtiyaç duymaktadır.

Metallo proteazlar, yüklü olan aminoasit yan zincirlerine metal iyonları ile bağlanmaktadır. Kısacası metal iyonları su moleküllerinin kullanabilmesini sağlamaktadır (Cerde-Costa ve Gomis-Ruth 2014).

Çoğu metallo proteaz aktivitesi için çinkoya ihtiyaç duymaktadır. Bazıları ise kobalt, manganez, nikel veya bakıra ihtiyaç duymaktadır. Bu metal iyonu enzimin aktif merkezindeki 3 aminoasit ve 1 su molekülü vasıtasıyla çevrelenerek, koordine edilmektedir. Kısacası tek bir metal iyonu genellikle üç aminoasit ve bir aktive olmuş su molekülü ile bağlanmaktadır. Dolayısıyla bu metal iyonu tetrahedral yapıyı oluşturan moleküldür ve önemi çok büyüktür. Bu aminoasitler, glutamik asit, histidin, aspartik asit, lizin, arjinin olabilmektedir. Glutamik asidin çoğu 19 metallo proteaz aktivitesinde önemli olduğu bilinmektedir. Bazı metallo proteazlarda ise iki metal iyonu birlikte hareket etmektedir. İki katalitik metal iyonuna sahip metallo proteazlarda ise genellikle glutamik asit ve aspartik asit olmak üzere iki aminoasit kalıntısı bulunmaktadır (Reunanen ve Kahari 2013). Neprilysin ve jelatinaz metallo proteaza örnek olarak verilebilir.

5.Treonin (T) proteazlar; aktif merkezinde treonin, metiyonin ve bir amit taşımaktadır. Treonin proteazlarda katalitik bölgedeki treonin amino asitinin hidroksil grubu nükleofil olarak hareket etmektedir. Bütün treonin proteazlar tek katalitik aminoasit kalıntısı taşımaktadır. Bu kalıntı enzimin amino terminalinde bulunduğundan, bu proteazlar Nterminal nükleofil (Ntn) hidrolazlar olarak da bilinmektedir (Barrett ve ark. 2012).

6.Glutamik (G) proteazlar; katalitik merkezinde bir glutamik asit ve bir glutamin kalıntısı bulunmaktadır. Proteazların %1'lik kısmını oluşturmaktadır. Pepstatin adlı mikrobiyal proteaz inhibitörlerine karşı dayanıklı olan bu enzim grubu, eskiden pepsitazin-duyarsız karboksil peptidazlar olarak tanımlanmaktaydı (Sari 2011).

Her serin proteazın katalitik reaksiyon bölgesinde nükleofil olarak bir serin aminoasiti kalıntısı içermesi ve çoğunun PMSF'den etkilenmesi bu sınıflandırma sistemin iyi çalıştığını göstermektedir. Fakat serin proteazların farklı moleküler yapılara sahip olması, bazı serin proteazların farklı katalitik mekanizma kullanması bu sistemin sınırlamalarıdır.

1.4. Proteaz Kaynakları

Proteazlar, arke, bakteri, maya, küf, bitkisel ve hayvansal doku gibi canlılar ve virüsler tarafından ortak olarak sentezlendiği bilinen en önemli enzim gruplarından (Anandharaj ve ark. 2016).

Proteazlar kaynak aldığı organizmaya göre farklı pH değerlerinde aktivite göstermektedir. Örneğin, genellikle pankreas kaynaklılar pH 7.5- 8.5; fungal kaynaklılar pH 3.5-5.0, bakteriyel kaynaklılar ise pH 6-11 aralığında aktivite göstermektedir (Afşar ve ark. 2003).

Fungal asidik proteazlar ve bitki kaynaklı nötral proteazlara göre bakteriyel alkalen ve nötral proteazlar endüstriyel açıdan daha fazla tercih edilmektedir (Razzaq ve ark. 2019).

1.4.1. Bitkisel Kaynaklı Proteazlar

Bitkilerden izole edilerek biyoteknolojik uygulamalarda kullanılmış proteazlardan bazılarını örnek olarak actinidin (kivi, *Actinidia deliciosa*), bromelain (ananas, *Ananas comosus*), cardosin (yabani enginar, *Cynara cardunculus*), cucumisin (kavun, *Cucumis melo*), ficin (incir, *Ficus sp.*), oryzasin (pirinç, *Oryza sativa*), papain (papaya, *Carica papaya*), phytesin (arpa, *Hordeum vulgare*), Zingipain (zencefil, *Zingiber officinale*) verilebilir (Arshad ve Amid 2014, Tavano ve ark. 2018). Bunların içinde en iyi bilinenleri papain, bromelain ve fisindir (Işık 2014).

1.4.2. Hayvansal Kaynaklı Proteazlar

Günümüze kadar birçok hayvanın mide ve bağırsak ve kas gibi organları proteaz kaynağı olması açısından incelenmiştir. Bunlara örnek olarak, balık, sucul omurgasızlar, geniş getiren hayvanlar verilebilir (Yanar 2015).

En iyi bilinen hayvansal proteazlar pankreastan salgılanan tripsin ve kimotripsin, mideden salgılanan pepsin ve rennindir. Daha çok buzağı midesi (genç geniş getiren hayvanların şirdenlerinin iç mukozasından) elde edilen rennin kullanılmaktadır (Işık 2014).

1.4.3. Mikrobiyal kaynaklı proteazlar

Günümüzde kullanılan endüstriyel enzimlerin yaklaşık olarak % 37-40'ı mikroorganizmalardan elde edilmektedir (Giri ve ark. 2011).

Mikrobiyal proteazlar için en önemli enzim kaynağı maya, küf ve bakterilerdir. Mikrobiyal proteazlar, dünyadaki toplam enzim satışının yaklaşık % 60-65'ini oluşturdıklarından endüstriyel enzim pazarının lideridir (Rai ve Mukherjee 2010).

Birçok enzim gibi proteazlarında daha çok mikroorganizmalardan elde edilmesi hem organizmanın hem de üretilen enzimin cazip karakteristik özellikleri taşımasıdır (Singhal ve ark. 2012, Hosseini ve ark. 2016).

Mikroorganizma kullanımının avantajları; mikroorganizmaların daha yüksek biyokimyasal çeşitliliğe sahip olması, hücre yapılarının genetik manipülasyonlara uygun olması (bu sayede ilgili enzim üretiminin kolaylıkla geliştirilebilmesi), yüksek üretim potansiyeline sahip olmaları, ekonomik, hızlı ve kolay üretilibilmeleri (hatta çok küçük alanlarda bile çok fazla miktarlarda üretilibilmeleri), yenilenebilir kaynakların üretimde kullanılabilmesi, iklim ve mevsim değişimlerinden etkilenmemeleri, ilgili enzim üretimi için mikroorganizmaların kolaylıkla indüklenebilmesi, üretim süresinin kısa olması, genellikle ekstrasellüler enzim üretmeleri dolayısıyla üretim ortamından enzim izolasyonunun kolay olması ayrıca enzimin hücre dışına çıkarılmasının oluşturacağı

zahmet ve maliyetin olmamasıdır (Tufvesson ve ark. 2011, Puvanakrishnan ve ark. 2012).

Mikrobiyal enzimlerin, tercih edilmesinin sebebi ise; enzimin daha cazip karakteristik özellikleri taşımasıdır. Bu özelliklere örnek olarak ekstrem sıcaklık ve pH değerlerinde stabil olmaları, yüksek katalitik aktivite, substrat spesifikliği, verim ve biyokimyasal çeşitliliğe sahip olmaları verilebilir (Hosseini ve ark. 2016).

Enzim üretiminde bitki ve hayvan kullanımının ise ayrıca bazı dezavantajları vardır. Bunlar; enzim üretim, izolasyon ve saflaştırma işlemlerinin daha fazla komplikasyona açık olması, hayvan kullanımında etik açıdan aşılması gereken sorunların olması kısacası hem işlevsel hem de pratik olmamasıdır (Ormandy ve ark. 2011).

Mikroorganizmaların kullanımında dikkat edilmesi gereken tek husus mikroorganizmanın patojen olmaması ve toksin yan ürün üretmemesidir (Demain ve Solomon 1981).

Mikrobiyal proteazların moleküler ağırlığı genellikle 40-130 kDa aralığındadır (Bashir ve ark. 2018). Mikrobiyal kaynaklar arasında ise en cazibi bakterilerdir. Çünkü fungal proteazlar genelde intraselülerdir. İzolasyon, saflaştırma, tasarımı kolaylık sağladığından genelde bakteri tercih edilir (Belmessikh ve ark. 2013).

Asidik proteazlar genellikle fugalardan, nötral proteazlar ise başta bakteriler olmak üzere bitkilerden izole edilmektedir. Alkalen proteazlar ise daha çok bakterilerden olmakla birlikte fungal kaynaklardan izole edilmektedir (Razzaq ve ark. 2019).

Bakteriyel proteazlar; endüstriyel olarak üretilen proteazların % 70'inden fazlasını oluşturmaktadır. Birçok mikroorganizma proteaz üretebilmektedir. Fakat sadece yeterli miktarda ekstraselüler proteaz üretebilen mikroorganizmaların endüstriyel açıdan önemi vardır. Bu açıdan bakteriyel proteazların eldesinde *Bacillus* cinsi öne çıkmaktadır (Kim ve ark. 2016, Si ve ark. 2018).

Ticari olarak kullanılan proteazların çoğunun *Bacillus* cinsi mikroorganizmalar tarafından üretilen nötr veya alkali koşullarda aktivitesini sürdürebilen enzimlerdir (Gupta ve ark. 2002, Hakim ve ark. 2018).

Bakteriyel nötral proteazlar pH 5.0-8.0 değerleri aralığında aktiviteye sahiptir ve nispeten termotoleransı düşüktür (Razzaq ve ark. 2019).

Orta seviyede bir reaksiyon hızına sahip olması sebebi ile gıdalarda hayvansal kaynaklı proteazlara göre daha fazla kullanılmaktadırlar. Çünkü bakteriyel proteazlar tarafından hidrolizi gerçekleştirilmiş olan gıdalarda hayvansal kaynaklı enzimlere göre daha az acımtırak tad oluşturması sebebi ile gıda endüstrisinde çok rağbet görmektedir (Rao ve ark. 1998).

Bakteriyel alkalen proteazlar ise pH 9.0-11.0 değerleri aralığında aktiviteye sahip iken, optimal pH değerleri genellikle 10.0 civarındadır. Geniş çapta substrat spesifikliğine sahip olmaları ile karakterize edilmektedirler (Razzaq ve ark. 2019, Sharma ve ark. 2019).

Endüstriyel enzimlerin çok büyük bir kısmının orijini *Bacillus* cinsi bakterilerdir. Bu durumun en önemli sebebi, diğerlerine nazaran üretim kapasitesi (Bazı *Bacillus sp.* üyeleri besiortamına en az 20 g/L ekstrasellüler protein salgılamaktadır.) ve aktivitelerinin yüksek olmasıdır (Razzaq ve ark. 2019).

Bacillus subtilis suşlarının ise hızlı şekilde çoğalmaları, GRAS statüsünde olmaları, ürettikleri proteazların veriminin yüksek olması ve ölçeklenebilir olması yani kullanım kapasitesindeki artışın performansını etkilememesi özelliğine sahip olması gibi avantajlarından dolayı proteaz üretiminde diğer *Bacillus* üyelerine göre daha fazla kullanılmaktadırlar (Anonim 1999).

Fungal proteazlar; *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Humicola*, *Thermoascus*, *Thermomyces* cinslerinin üyelerinin de içinde bulunduğu çok sayıda fungus tarafından sentezlenmektedir (Souza ve ark. 2015).

Aspergillus cinsinin endüstriyel ölçekte enzim üretiminde tercih edilmesinin sebebi, ucuz tarımsal atıkları kullanarak, büyük ölçekte ekstrasellüler enzim üretebilmesidir. Funguslar bakterilerden daha çok enzim çeşitliliğine sahiptir.

Örneğin, *A. oryza* asidik, nötral ve alkalen proteaz sentezleyebilmektedir. Yani bazı funguslar çok geniş pH (3.0-12.0) aralığında proteaz sentezleyebilmekte; geniş aralıkta substrat spesifikliğı göstermektedirler. Ancak termotoleransları ve aktiviteleri bakteriler kadar yüksek değildir (Vishwanatha ve ark. 2009, Yadav ve ark. 2019).

Fungal asidik proteazların aktivitelerini pH 3.8-5.6 aralığında koruduğı ve optimal pH değeri 4.0-4.5 olduğı bilinmektedir. *Aspergillus*, *Penicillium*, *Humicola*, *Phanerochaete*, *Endothia*, *Rhizopus*, *Thermoascus* cinsi üyeleri kullanılarak asidik proteazın üretildiğı rapor edilmiştir (Souza ve ark. 2015, Razzaq ve ark. 2019).

Fungal nötral proteazların aktivitelerini pH 6.0-8.0 aralığında koruduğı; optimal pH'larının 7.0 olduğı; genellikle metallo proteaz olduğı bildirilmiştir. *Aspergillus* sp. ve *Penicillium* sp. kullanılarak nötral proteaz üretildiğı bildirilmiştir (Wang ve ark. 2007).

Fungal alkalen proteazların aktivitelerini pH 8.0-13.0 aralığında korumaktadır. Başta *Aspergillus* ve *Penicillium* olmak üzere *Beauveria*, *Botrytis*, *Conidiobolus*, *Engyodontium*, *Metarhizium*, *Myceliophthora* cinsi üyeleri kullanılarak alkalen proteazın üretildiğı rapor edilmiştir (Sandhya ve ark. 2005, Vranova ve ark. 2013).

Viral proteazlar; virüslerin genetik materyali (DNA veya RNA) tarafından kodlanan intraselüler enzimlerdir (Steinkuhler 2008). Virüsler, konak hücrenin ribozomunu kullanarak protein sentezledikleri için, bütün enzimleri gibi proteazları da intraselülerdir. Bazı virüslerde serin, aspartik, sistein peptidazların bulunduğı belirlenmiştir. Viral proteazların hiçbirisi metallopeptidaz değildir (Babe ve Craik 1997).

1.5. Proteazların Kullanım Alanları

Endüstriyel gelişimin yarattığı tek kötü unsur atıkların çoğalmasıdır. Bu durum yeşil kimya ve ekolojik tasarım gibi yaklaşımlara ilgiyi arttırmıştır (Vaccaro 2016). Yeşil kimya, kimyasal ürün ve işlemlerde güvenilirlik ve yenilenebilirliğin

artmasını; solvent ve enerji kullanımını, atık ve yan ürün miktarının azalmasını sağlayan ilkelerin benimsenmesidir.

Ekolojik tasarım (Eco-Design), çevreye duyarlı malzemelerin üretilip kullanılmasını savunan bir yaklaşımdır; endüstriyel faaliyet kaynaklı kirliliği azaltmak için çevre dostu yöntemleri desteklemektedir. Enzimler de güvenilir ve sürdürülebilir oldukları için yeşil kimyasallardandır (Selamet 2012, Sheldon ve Woodley 2018).

Endüstriyel enzim üretimi daha çok Danimarka (Novo Nordisk), ABD (DuPont Industrial Biosciences, Enzyme Development), Japonya (Nagase Biochemicals, Amano Enzyme, Godo Shusei), Almanya (Henkel, Solvay, AB Enzymes), Çin (Wuxi Syder BioProducts), Hindistan (Advanced BioChemicals) ülke ve şirketleri tarafından gerçekleştirilmektedir (Kalia ve Saini 2017). Küresel enzim pazarının değerinin 2018’de 7,1 milyar ABD doları olduğu ve bu değer yıllık % 5,5’lik büyüme hızı ile 2026’da 11,03 milyar ABD dolarına ulaşacağı tahmin edilmektedir.

Kullanımı en fazla olan enzimler proteaz, lipaz, karbohidraz, polimeraz, nükleazdır. Küresel enzim pazarında en 25 büyük pay sahibi, mikrobiyal enzimlerdir.

Mikrobiyal enzimlerin 2018’de pazarın % 37’lik kısmını oluşturduğu ve bu oranın % 5,8’lik büyüme hızı ile 2026’da % 38’e ulaşacağı tahmin edilmektedir. Hidrolazların, 2018’de küresel enzim pazarının % 24’ünü oluşturduğu ve bu oranın yıllık % 6’lık büyüme hızı ile 2026’da %26’ya ulaşacağı tahmin edilmektedir (Anonim 2019a). Hidrolazların endüstriyel enzimlerin yaklaşık olarak % 75- 80’ini oluşturduğu buna ek olarak hidrolazların arasında ise endüstriyel açıdan en fazla rağbet gören grubun ise proteazlar ardından karbohidrazlar olduğu rapor edilmiştir (Anonim 2018).

Proteazların ise endüstriyel enzimlerin yaklaşık olarak % 60-65’ini oluşturduğu ve yıllık % 6,4’lük büyüme hızı ile 2022’de değerinin 3,29 milyar ABD

dolarına ulaşacağı tahmin edilmektedir (Anonim 2019a). Proteazlar gıda, içecek, deri, tekstil, yem, deterjan, ilaç gibi birçok endüstriyel alanda kullanılmaktadır.

1.5.1. Gıda Endüstrisi

Gıda endüstrisinde proteazlar daha çok olgunlaştırma ve aroma sağlayıcı olarak kullanılmaktadır. Süt ve süt ürünleri endüstrisinde proteazlar, pıhtı oluşumu, verimin arttırılması, olgunlaşmanın hızlanması, raf ömrünün uzatılması; aroma, lezzet ve renk gibi özelliklerin geliştirilmesini sağlamaktadır. Rennet, kimozen (rennin) ve pepsin denilen iki enzimin kombinasyonundan oluşmuş bir enzim karışımıdır; peynir üretiminde sütteki kazeini pıhtılaştırmaktadır. Küresel olarak üretilen peynirin yaklaşık % 33'ünde mikrobiyal rennet kullanılmaktadır (Qureshi ve ark. 2015).

Buzağı renneti % 95 kimozen ve % 5 pepsinden oluşurken, ticari rennet % 70 kimozen ve % 30 pepsinden oluşmaktadır. Peynir üretiminde baskın olarak bir asidik proteaz olan kimozen kullanılmasının nedeni kimozen haricindeki asidik proteazların genellikle peyniri acılaştırmasıdır. Kimozindeki artış peynirin geç olgunlaşmasını, lezzetli olmasını sağlarken; pepsindeki artış acılaşmaya neden olmaktadır (Akın 2003, Çakmakçı ve ark. 2017).

Süt kazeinini pıhtılaştırıcı enzimler, geviş getiren genç hayvanların midelerinin şirdeni; incir (*Ficus carica*), teleme otu (*Euphorbia maculata*), altın çilek (*Physalis peruviana*) gibi bitkiler; şirdenki hücrelerin ilgili rennin enzimi genlerinin fungus (*A. niger*) veya bakteride (*E. coli*) klonlanmasıyla üretilen rekombinant organizmalar; fungal kaynaklar (*A. oryzae*, *C. parasitica*, *R. miehei* ve *R. pusillus*) kullanılarak elde edilmektedir. Pıhtılaştırıcı enzim olarak *Bacillus* suşlarının kullanılmamasının en önemli sebebi bakteriyel pıhtılaştırıcı enzimlerin çok yüksek aktiviteye sahip olması sebebi ile olgunlaşmanın aşırı hızlı olmasıdır. Bu sebeple mikrobiyal kaynak kullanılacak ise asidik fungal proteazlar kullanılmaktadır (Say ve Güzeler 2016, Çakmakçı ve ark. 2017).

Proteinlerin kısmi olarak hidrolizinden oluşan ve kompleksten basite proteoz > pepton > peptid şeklinde sıralanan moleküller oluşmakta ve bunlar peynir kalitesini etkilemektedir. Proteozlar, amonyum sülfat tuzları çökelirken; peptonlar çökelmemektedir.

Proteoz ve peptonların yapısında aminoasit, yağ, tuz, metal ve vitamin gibi yan gruplar bulunabilirken; peptidler yalnızca aminoasitlerden oluşmaktadır (Chittenden ve Hartwell 1891). Proteoz, pepton, peptid, aminoasitler süt ürünlerin olgunlaşmasını (karakteristik aroma ve lezzet ve doku özelliklerini kazanmasını) sağlamaktadır (Akın 2003).

Ozcan ve Kurdal (2012), Bursa'nın yöresel Mihaliç peynirinin üretiminde; Fernandez-Garcia ve arkadaşları (1994), Manchego ve Çedar peynirlerinin üretiminde *B. subtilis* proteazı ve *M. miehei* lipazı kullanımının olgunlaşmayı kısılttığını, lezzet, aroma ve dokuyu iyileştirdiğini bildirilmiştir. Bu enzimler kombine kullanılmadığında proteaz ve lipazın birbirini baskılamadığından ya acılaşma ya da yağlı tad olduğu saptanmıştır.

Fırıncılıkta proteazlar, yüksek gluten içeren hamurların yumuşatılarak yoğurma ve işleme kolaylaştırmak; bazı unlu mamüllerin (kraker, bisküvi, gofret, kurabiye ve pizza) üretiminde kabarmayı engellenmek için kullanılmaktadır. Buğday ununun yapısında bulunan gluten proteini su ile karıştığında elastik bir yapı oluşturmaktadır. Bu elastik yapıda hava kabarcıkları hapsediğinde hamur kabarmaktadır. Kabarması istenmeyen mamüllerde proteazlar kullanılarak glutenin yapısının parçalanması sağlanmaktadır. Proteazlar ekmek yapımında da önemlidir. Çünkü glutenin parçalanması hamurun yumuşamasını sağladığından yoğurmayı kolaylaştırmaktadır. Ayrıca glutenin parçalanmasıyla açığa çıkan aminoasitlerin maya tarafından kullanılması ekmeğin lezzet ve kabuk rengini arzulanan düzeye getirmektedir (Kara ve ark. 2005, Buehler 2006).

Et ve et ürünlerinin tenderizasyonu (yumuşatılması) amacıyla bitkisel (papain, bromelain, aktinidin, fisin) ve mikrobiyal (*A. oryzae*, ve *B. subtilis*) proteazlar kullanılmaktadır. Fakat bakteriyel proteazlar elastin ve kollajeni çok iyi

parçalarken; miyofibrilleri pek parçalayamaktadır. Kısacası bakteriyel proteazların aktivite sergileyebilmesi için öncelikle bitkisel proteazların miyofibrilleri parçalaması gereklidir. Bu sebeple tenderizasyonda daha çok bitkisel proteazlar kullanılmaktadır (Arshad ve ark. 2016).

1.5.2. İçecek Endüstrisi

İçecek endüstrisinde proteazlar, alkollü (bira ve şarap) ve alkolsüz (sebze ve meyve suyu) içeceklerin üretiminde kullanılmaktadır.

Proteazlar, sebze ve meyve suyu üretiminde protein kaynaklı bulanıklığın giderilmesi ve berraklığın devamlılığının sağlanması için kullanılmaktadır. Bu sayede berrak sebze ve meyve suyu üretiminin en önemli aşaması olan durultma işleminin verimi artmakta, viskozitenin düşmesine bağlı olarak meyve suyunun parçalama, presleme ve filtrasyonu kolaylaşmakta ve kullanılan enzimler ekstraksiyonu arttırdığı için verim artmaktadır. Kısacası proteaz kullanımı ürünün kalitesini iyileştirirken, üretimi kolaylaştırmaktadır (Uçan ve Akyıldız 2012).

Proteazlar, bira endüstrisinde maltlaşmanın hızlı olmasını, fermentasyonun süresinin kısılmasını sağlayarak fermentasyonun gelişmesini, biranın berraklığının artmasını ve en önemlisi biranın soğutulması ve soğuk olarak depolanması sırasında berraklığını korumasını sağladığı için maltlama, ezme ve depolama işlemlerinde kullanılmaktadırlar. Bira üretiminin ilk aşaması olan buğday ve arpa tanelerinin malt denilen hale dönüştürülmesinde ve maltın ezilmesinde proteazlar kullanılmaktadır. Bira endüstrisinde, biraların donup çözüldükten sonra tadında ve yapısında meydana gelen bozulmaların engellenmesi için kısacası soğuğa karşı dayanıklılığının artırılması için proteazlar kullanılmaktadır (Van Donkelaar ve ark. 2016, Goma 2018).

Şarap üretiminde fermantasyonu gerçekleştiren mikroorganizmalardan kaynaklanan çok sayıda enzimin rol oynamasının yanında ticari enzim preparatları da kullanılmaktadır. Şarap üretiminde proteazlar, protein kaynaklı bulanıklığın

giderilmesinde yani berraklaştırma işleminde kullanılmaktadır (Dönmez 1986, Höhn ve ark. 2005).

1.5.3. Antialerjik Ürünler, Yapay Tatlandırıcılar ve Enzim Takviyeleri

Spesifik bir proteini içeren ürüne (gluten, soya, yer fıstığı, yumurta, süt vb.) alerjisi olan yetişkinler ve inek sütüne alerjisi olan bebekler için antialerjik besinler üretilmektedir.

Yeni doğan bebeklerin % 2-3'ünde parçalanmamış proteinlere karşı aşırı duyarlılık vardır ve bu durum yaklaşık olarak 1 yaşına kadar sürmektedir. Bu alerjinin sebebi inek ve koyun sütünde yüksek oranda bulunan β -laktoglobulin proteindir. Bu proteinin tripsin ve kimotripsin ile parçalanması alerjiyi ortadan kaldırmaktadır (Kondo ve ark. 2007). Kısacası bu bebeklerin beslenmesinde kullanılan antialerjik mamaların üretiminde proteazlar kullanılmaktadır (Mahmoud ve Cordle 2000).

Spesifik bir protein türüne olan alerjilerin en bilinen iki örneği soya alerjisi, çölyak hastalarında görülen gluten alerjisidir (Qureshi ve ark. 2015). Yapay tatlandırıcı olarak yaygın olarak kullanılan dipeptid türevi aspartamın üretiminde proteazlar kullanılmaktadır. Aspartam sentezi *B. thermoproteolyticus* tarafından sentezlenen termolisin'in katalizörlüğünde gerçekleşmektedir (Murakami ve ark. 1996). Çeşitli firmaların ürettiği proteaz içeren enzim takviyeleri de bulunmaktadır.

Özellikle veganların tercih ettiği, bromelain ve papain içeren bu enzim takviyelerinin proteinlerinin sindirilebilirliğini arttırdığı ve bu yolla kas, eklem ve immün sistemi desteklediği bildirilmiştir (Mahmoud ve Cordle 2000).

1.5.4. Biyoaktif Peptid Üretimi

Proteinlerin, proteazlarla belirli bir aşamaya kadar hidrolizi sonucunda oluşan peptidlere hidrolizat denilmekte ve bu hidrolizatlar bazen sağlık açısından önemli biyolojik fonksiyonlara sahip olmakta ve biyoaktif peptid olarak adlandırılmaktadır (Bhat ve ark. 2015).

Biyoaktif peptitler, insan ve hayvan sağlık ve vücut fonksiyonları üzerinde geleneksel olarak tanımlanmış olan beslenme fonksiyonlarının ötesinde olumlu etkiler yapan proteinlerin spesifik parçalanma ürünleridir.

Biyoaktif peptidlerin antioksidan, antimikrobiyal, antihipertansif, opioid (narkotik analjezik, örn. morfin), antitrombotik, hepatoprotektif, immünomodülatör, yorgunluk giderici, osteoprotektif, antikaryojenik ve büyümeyi teşvik edici gibi özelliklere sahip olabildiği bilinmektedir.

Antioksidan ve antimikrobiyal özelliklere sahip biyoaktif peptidler sağlık dışında gıda katkı maddesi olarak da kullanılmaktadır. Buna ek olarak bazen tek bir biyoaktif peptid bu özelliklerden bir kaçına aynı anda sahip olabilir (Mares-Mares ve ark. 2017, Tavano ve ark. 2018). Biyoaktif peptidler bu özelliklerini aminoasit kompozisyonu ve sekansına borçludur. Biyoaktif peptid üretiminde bazen fermentasyon bazen enzimler (örn. termolisin, alkalaz) kullanılmaktadır.

İnsan sağlığı açısından yararlı olabilecek biyoaktif peptidlerin üretiminde farklılık yaratması için insan tarafından sentezlenmeyen termolisin ve alkalaz gibi farklı proteazlar kullanılmaktadır. Biyoaktif peptid üretiminde kullanılan enzim ve ilgili enzimin spesifikliği kadar kullanılan substratın seçimi de önemlidir (Vij ve ark. 2016). Bu peptitlerin üretiminde substrat olarak süt (kazein ve peynir altı suyu), yumurta (albümin), soya, proteinli atıklar (balık ve et endüstrisi atıkları) kullanılabilir. Örneğin, proteinli katı hayvan atıklarından, yüksek tansiyon ve kan şekerinin dengelenmesinde kullanılan ilaç öncülü peptidler üretilmiştir (Brandelli ve ark. 2015).

Kazeinden, antioksidan özellikte, hipertansiyon ve kalp yetmezliği tedavisinde kullanılan ilaç fonksiyonuna sahip peptid üretilmiştir (Vij ve ark. 2016).

Denizati proteinlerinden papain katalizörlüğünde yorgunluk giderici etkiye sahip peptidler üretilmiştir (Guo ve ark. 2017). Somon balığı atıklarından Corolase® PP katalizörlüğünde diyabet, hipertansiyon ve kalp yetmezliği tedavisinde kullanılan ilaçların fonksiyonuna sahip olan hidrolizatlar üretilmiştir (Neves ve ark. 2017).

Alamdari ve Ehsani (2017) ise süt proteinden ürettikleri hidrolizatların antimikrobiyal özellikte olduğunu bildirmiştir.

Biyoaktif peptitlerin, hücrelerin canlılığı, proliferasyonu, farklılaşması ve apoptozunun gerçekleşmesinde rol oynadığını ve ayrıca kanser hücrelerini inhibe edebildiğini kanıtlamıştır (Stiuso ve ark. 2013, Yu ve ark. 2014).

Protein hidrolizatları kanser hastalarının ve AIDS'li bireylerin beslenmesi için tasarlanmış diyet ürünlerinde kullanılmaktadır (Mahmoud ve Cordle 2000). Opioid peptitler ise opioid kimyasallar (narkotik analjezik, örn. morfin) gibi davranmaktadır. Sütten türetilen opioid peptid tirozin-glisin-glisin-fenilalanin birleşiminden oluşmaktadır (Silva ve Malcata 2005).

Crohn hastalığı, kısa bağırsak sendromu, pankreatit hastaları proteinleri özümseyemediğinden aminoasit eksikliği çekmektedir. Bu hastalar diyetlerinde protein hidrolizatları kullanmaktadır. Protein hidrolizatlarını kilo kontrolü sağladığı için sporcular da kullanmaktadır. Hatta lösin içeriği yüksek olanların kas ve bağ dokusu hasarlarının iyileşmesine yardımcı olduğu bildirilmiştir (Bougatef ve ark. 2012).

Gıda endüstrisinde kullanılan biyoaktif peptidler genellikle et endüstrisi atıklarından üretilmektedir. Bu atıklar yağsız etin % 25'i kadar protein içermektedir. Atıkların değerlendirilmemesi çevre kirliliğine sebep olmasının yanında israftır. Bu atıkların proteazlarla hidrolizinden oluşan hidrolizatlar gıdalarda, antioksidan, aroma geliştirici, koyulaştırıcı ve besin değeri arttırıcı gibi katkı maddeleri olarak kullanılmaktadır.

Antioksidan peptidler, gıdalarda zamanla meydana gelebilecek acı tad, renk değişimi, aroma ve lezzette bozulma, gıdanın toksikleşmesi gibi durumları engellemektedir. Jelatin hidrolizatları ise et, peynir, konserve, puding, jöle, dondurma gibi gıdalarda koyulaştırıcı katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Aylangan ve Öztan 2008).

1.5.5. Hayvan Yem ve Mamalarının Üretimi

Yem endüstrisinde enzim kullanımı 1980’li yıllarda başlamış olup, yemdeki besinlerin sindirilebilirliğini arttırdığı ve dolayısıyla hayvanın yemden daha yüksek oranda yararlanımını sağlaması açısından önemlidir.

Yemlerde kullanılan enzimlerinin değerinin 2016 yılında 842,9 milyon ABD doları olduğu ve yıllık % 9,3’lük büyüme hızı ile 2022 yılında 1 428,6 milyon ABD dolarına ulaşacağı öngörülmektedir (Anonim 2019f).

Proteazlar, ruminant, domuz ve kanatlıların yemdeki proteinden yararlanımını arttırmakta dolayısıyla gelişim ve doğurganlığı desteklemekte; süt ve et verimini arttırmaktadır. Çünkü yemdeki aminoasitleri hayvanın yararlanabileceği şekilde açığa çıkarmaktadırlar (Rodney ve ark. 2016).

Buna ek olarak proteazlar, yemde düşük kalitede protein kullanımına olanak sağlamakta, yemlere katılan protein olmayan azot takviyesinin miktarını azaltmakta, bu durum hem yem maliyeti hem de çevreye atılan azot miktarını düşürmektedir (Li ve ark. 2012).

Proteazlar, dolaylı olarak nişasta sindirimini de hızlandırarak, yem üreticilerine zamandan tasarruf sağlamaktadır. Bunun sebebi proteazların gıda matrisini parçalaması sonucu yemdeki diğer enzimlerin substratına ulaşabilirlik süresini yaklaşık % 70 kısaltmasıdır (Windle ve ark. 2014). Büyükbaş, küçükbaş, kanatlı ve balık işlenmesi sırasında meydana gelen boynuz, tırnak, kanatlı derisi, toynak, kemik, tüy, kılçık, pul, bazı organ ve doku parçaları gibi protein yapıdaki katı atıklar başta proteazlar olmak üzere çeşitli enzimlerin katalizörlüğünde ile kullanılabilir yem, mama ve gübreye dönüştürülmektedir. Bu amaçla daha çok keratinazlar kullanılmaktadır.

Proteazlar, ham tüy gibi yüksek keratin içeriğinden dolayı yaklaşık % 5 oranında olan sindirilebilirliğe sahip ucuz protein kaynaklarının da monogastrik (domuz, balık, kanatlı, kedi, köpek) ve ruminant yem ve mamalarında kullanılmasına olanak sağlamaktadır (Csapo ve Albert 2018). Özellikle kedi ve köpek mamalarında ucuz maliyetli aminoasit kaynağı olması açısından tüyler fazlaca kullanılmaktadır.

Proteaz kullanılmadan keratinin yapısının parçalanması ancak yüksek sıcaklık (145°C) ve yüksek basınç (0,5 MPa) altında gerçekleşmektedir. Fakat bu şartlar bazı aminoasitlerin yapısında bozulmaya neden olmaktadır. Dolayısıyla tüyler için fiziksel yöntemler yerine proteazların kullanımı daha uygundur (Pacheco ve ark. 2016).

1.5.6. Deterjan ve Kuru Temizleme Endüstrisi

Proteazlar, protein kaynaklı kir ve lekelerin çıkarılması amacı ile deterjan endüstrisinde kullanılmaktadır. Bu lekeler örnek olarak süt, yoğurt, bebek maması, çikolata, yumurta, çimen, kan, idrar, kusmuk, dışkı ve ter verilebilir.

Ter, bol miktarda antimikrobiyal peptidleri içerdiğinden proteinli kirler arasındadır.

Çimen lekeleri ise çimenlerdeki protein-pigment kompleksleri sebebiyle oluşmaktadır. Çünkü protein-pigment kompleksleri kumaş fiberlerine bağlanmaktadır. Çimen lekelerinin temizliği bu komplekslerin proteazlarla parçalanması ile sağlanmaktadır (Schitteck ve ark. 2001).

Proteazların çamaşır deterjanlarında kullanılması fikri ilk olarak 1913'te Otto Röhm tarafından önerilmiştir (Röhm 1913). Röhm, domuz pankreasından izole ettiği tripsini deterjana katmış, fakat deterjanın alkali olduğundan tripsin pek aktivite ve stabilite gösterememiştir.

1963 yılında ise Novo® (Novozyme®), alkalaz adlı alkali şartlara daha uygun enzimi geliştirmiş ve iki deterjan üreticisi bu enzimi kullanmıştır. Biri BIO-40 ve diğeri Boitex ile adı altında piyasaya sürmüştür. Üreticiler bu deterjanların kan lekelerini çıkardığı için hastane ve mezbahanelerde kullanılabileceğini ifade etmiştir.

Kumaştaki birçok leke yüksek sıcaklık ve kuvvetli mekanik hareket birlikte kullanıldığında çıkarılabilmektedir. Fakat suyun ısıtılması maliyetlidir; yüksek sıcaklık ve kuvvetli mekanik hareket birçok kumaşta kaliteyi düşürmektedir.

Proteazlar ise bu işlemi düşük sıcaklık ve kısa yıkama süresinde gerçekleştirebilmektedir (Aehle 2006). Deterjanlarda özellikle Bacillus cinsi kullanılmaktadır. Çünkü Bacillus kaynaklı alkalen proteazlar deterjan, sürfaktan ve oksitleyici bileşiklere karşı daha yüksek stabiliteye sahiptir.

Bacillus kaynaklı proteazların Alo®, Ariel®, OMO®, Rinso®, Tide®, Surf Excel® deterjanlarıyla uyumlu olduğu bildirilmiştir (Sinha ve Khare 2013).

Bulaşık makinası deterjanlarında ise sıcak suyla giderilemeyen, çökelmiş proteinli gıdaların giderilmesinde proteazlar kullanılmaktadır. Böylece fosfat kullanımı azalmakta ve düşük sıcaklıkta yıkama yapılarak enerji tasarrufu sağlanmaktadır (Contesini ve ark. 2018).

Araştırmalara göre deterjanlarda kullanılan kimyasal maddelerin biyolojik olarak bozunabilirliği çok düşüktür. Bu kimyasal maddeler, alerjik reaksiyon, tahriş, kısırlık gibi sorunlara yol açmaktadır. Buna ek olarak sulardaki fosforun yaklaşık olarak % 20-60'ının deterjan kaynaklı olduğu düşünülmekte ve bu fosforun akarsu ve göllerde yol açtığı ötrofikasyon çevre açısından çok yıkıcıdır (Anonim 1994).

Proteazlar kuru temizleme endüstrisinde de kullanılmaktadır. Kuru temizlemede kullanılan çözücüler kumaşlardan süt, yumurta, kan, çimen gibi protein içeren lekelerini kolayca çıkaramamaktadır.

Özellikle bakteriyel proteazlar ise bu lekeleri kumaşa zarar vermeden çıkarabilmektedir (Agasthya ve ark. 2013). Bazı çalışmalarda ise B. subtilis ve B. licheniformis proteazlarının kumaştaki saç boyasını çıkarmada etkili olduğunu ve bu amaçla kullanılabileceğini bildirmiştir (Prabakaran ve ark. 2015).

1.5.7. Tekstil Endüstrisi

Proteazlar, tekstil endüstrisinde keçeleşmenin engellenmesi, ürüne parlaklık ve beyazlık kazandırmak için kullanılmaktadır. Keçeleşme, sıcak su, buhar, yıkama sırasında kullanılan kimyasal maddeler veya yıkama sırasında meydana gelen sert mekanik hareketlerden dolayı yün lifleri birbirine yaklaşması ve sonuç olarak kumaşın çekmesidir. Bu durumun engellenmesi için tekstilde klor gazı, klorlu

bileşikler, organik çözücüler, potasyum permanganat, hidrojen peroksit, sodyum peroksit, perborat, reçine gibi kimyasallar kullanılmaktadır.

Bunların yerine papain, pepsin ve tripsin gibi proteazlar kullanılarak keçeleşme engellenebilmektedir. Buna ek olarak bu sayede kumaş ipeksi bir parlaklık kazanmakta ve beyazlamaktadır (Anonim 2011). İpeklerde ise papain, pepsin ve tripsin enzimleri kullanılarak ipeklerin hem beyazlaması hem de parlak ve kaygan olan görünümüne kavuşması sağlamaktadır (Gunay 2013). Ham ipek yapısında bulunan sericin proteini ipeği matlaştırmaktadır. Sericin'in giderilmesi ipeğin kaygan ve parlak olmasını sağlamaktadır (Freddi ve ark. 2003, Liu ve ark. 2013).

1.5.8. Kağıt ve Kağıt Hamuru Endüstrisi

Kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde, makinalardaki kalın biyofilm tabakalarının temizliğinde başta proteazlar olmak üzere lipaz ve glikosidazlar kullanılmaktadır.

Mikroorganizmaların birbirine, canlı, cansız maddelere tutunması, mikroorganizmalar tarafından sentezlenmiş olan ekstraselüler polimerik maddelerle gerçekleşmektedir. Mikroorganizmalar, ekstraselüler polimerik maddeler ve canlı, cansız maddelerin birleşiminden oluşan bu yapıya biyofilm denilmektedir.

Ekstraselüler polimerik maddeler daha çok proteinlerden oluştuğundan biyofilm gideriminde en fazla proteazlar kullanılmaktadır (Nahar ve ark. 2018).

Kağıt üretiminde ortaya çıkan çamurun arıtımı ve içeriğindeki değerli organik bileşenlerin geri kazanılması için proteaz, lipaz ve amilaz enzimleri kullanılmaktadır (Karn ve Kumar 2019).

1.5.9. Farmasötik Teknoloji

Proteazlar, ilaç olarak çok büyük umut vadeden bir enzim grubudur. Proteaz enzimlerinin kullanıldığı ilaçlar bulunmaktadır.

1965 yılından beri kullanılan Clostridial kollajenaz merhem, USFDA onayına sahip proteaz içerikli ilk ilaçtır. Clostridium histolyticum türünden izole

edilmiş bir proteolitik enzim olan kollajenaz, ciddi yanık, yara ve kronik dermal ülserlerin tedavisinde antibiyotiklerle birlikte kullanılmaktadır. Nekrotik dokudaki kollajeni parçalayarak sağlıklı dokuya zarar vermeden kötü dokuyu seçici olarak çıkarmakta ve dokunun iyileşmesini kolaylaştırmaktadır. Bu merhemin diğer avantajları kullanımının kolaylığı, kan kaybını minimuma indirmesi, dokunun proliferasyonunu arttırmasıdır (Gilligan ve ark. 2017).

Ölü ve keratinize hücrelerden oluşan nasırların tedavisinde de asitlerin yerine proteazlar kullanılmaktadır (Gupta ve ark. 2013, Singh ve ark. 2016).

Proteazların en önemli diğer kullanımı ise fibrinolitik enzimler vasıtasıyla pıhtıların giderilmesidir (Okafor 2007).

1.5.10. Kişisel Bakım ve Kozmetik

Bu alanda papain, bromelain, subtilisin içeren ürünler üretilmektedir. Bu ürünler ciltte soyma (peeling) ve temizleme etkisi yapmaktadır. Bu soyma işleminde ölü ve hasarlı olan cilt bölgelerinin soyulması, böylece cildin pürüzsüz bir görünüme kavuşması sağlanmaktadır (Li ve ark. 2012).

Kozmetik için kullanılan proteaz enzimlerinin eldesinde kullanılan kaynaklar B. subtilis, A. niger ve A. flavus'tur. Günümüzde kırışıklar için uygulanan Botox® tedavisinde de proteaz enzimi kullanılmaktadır.

Diş macunu ve ağız bakım sularında yaygın olarak kullanılan proteaz ise papain olup, dişlerdeki plak ve birikintilerin giderilmesinde kullanılmaktadır (Singh ve ark. 2016).

Proteazlar ayrıca kontakt lens temizleyicilerinde kullanılmakta, lens üzerinde oluşan protein filmlerinin nazikçe temizlenmesini sağlamaktadır (Alfa ve Jackson 2001).

1.5.11. Atık Yönetimi

Endüstriyel ve evsel atıkların yönetiminde de enzimler (proteaz, lipaz, karbohidraz, oksidoredüktaz) kullanılabilir. Bu atıklar canlılar ve ekosistem için tehlikeli ve toksik olan birçok kimyasal madde içermektedir.

Özellikle toksik kirleticilerin (örn. fenol, aromatik amin, nitril vb. içeren) parçalanarak zararsız ürünlere dönüşmesi yani detoksifikasyonu için kullanılan ve genellikle mikrobiyal kaynaklı olan bu enzimler uygulamada bazen tek bazen de kombine olarak kullanılmaktadır (Singh ve ark. 2016).

1.5.12. Deri endüstrisi

Enzimler, deri endüstrisinde kılların, epidermis tabakasının, yapısal olmayan artık bileşenlerin, yağlı bileşenlerin giderilmesini; atık miktarında azalmayı sağlamaktadır. Deri işlemede kimyasal maddelerin yerine enzim kullanımına imkan vermeyen tek işlem tabaklamadır.

Tabaklama öncesi işlemlerde proteaz enziminin kullanımı öne çıkmaktadır. Çünkü dericilikte enzim kullanımının temelini sama prosesi oluşturmakta; ıslatma ve kıl giderimi gibi iki önemli proste de proteazlar kullanılmaktadır.

Islatmada nötral proteazlar, kıl gideriminde alkale proteazlar, samada ise asidik proteazlar kullanılmaktadır (Kallel ve ark. 2017). Proteazlar, kıl ve diğer istenmeyen proteinlerin (kazein, elastin albümin, globülin) hidrolizini; protein yapısındaki kirlerin yapısının parçalanıp giderilmesini; derideki kılların giderilmesini; deri liflerinin açılmasını; derinin daha iyi su çekerek şişmesini ve yumuşamasını (esnemesini); deri endüstrisi kaynaklı hayvan atıklarının bertarafının sağlanmasında kullanılmaktadır (Sanghi ve Singh 2012).

Lipazlar ise deriye gömülü haldeki yağları gidererek derinin su geçirmezliğini arttırmaktadır (Puvanakrishnan ve ark. 2015).

Pankreas preparatlardaki karbohidrat sindirimini sağlayan amilaz gibi enzimlerin deriye etkisinin olmadığı düşünülmüştür; sonraları bu enzimlerin derinin yumuşak ve esnek olmasını sağladığı; kıl giderimini desteklediği belirlenmiştir (Hammami ve ark. 2017).

Dericilikte en fazla tripsin, kimotripsin, elastaz, papain, katepsin, pepsin, kollejenazlar kullanılmaktadır. Deri işlemede ilk önceleri pankreatik tripsin

kullanılmıştır ancak sonraları yerini bakteriyel ve fungal proteazlar almıştır (Thorstensen 1993).

Günümüzde derinin işlenmesinde kullanılan ve *Bacillus sp.* kaynaklı olan birçok ticari proteaz bulunmaktadır. Örneğin PrimaTan® (*Bacillus sp.*), NovoBate® WB (*Bacillus sp.*), Proleather® FG-F (*Bacillus subtilis*, optimum pH: 10.0) samada kullanılmaktadır. Kireçleme aşamasında yardımcı olarak Nue® (*Bacillus sp.*, optimum pH: 12.0-13.0) kullanılmaktadır. Sama ve kıl gideriminde ise Thermoase® (*Bacillus stearothermophilus*, optimum pH: 7.0-8.5) kullanılmaktadır (Schaechter 2009, Rampelotto 2016).

Kıl gideriminde kullanılabileceği kabul görmüş ve en bilinen fungal proteaz enzimi *Aspergillus flavus* kaynaklı Clarizyme® adı ile patentlenmiş alkalin proteazdır. Hatta bu enziminin samada da kullanılabileceği belirlenmiş ve bu sayede aynı anda kıl giderimi ve samanın yapılabileceğinin de mümkün olduğu bildirilmiştir (Anonim 2015a).

1.6. *Bacillus* Cinsinin Genel Özellikleri

Bir cins ismi olarak *Bacillus* ilk kez Ferdinand Cohn (1872) tarafından kullanılmıştır. Christian Gottfried Ehrenberg (1835) tarafından *Vibrio subtilis* olarak isimlendirilmiş bakterinin ismi 1872 yılından itibaren *Bacillus subtilis* olarak değişmiştir. 16S ribozomal RNA dizilerinin karşılaştırılmasına dayalı sınıflandırmada *Bacillus* cinsi üyeleri bakteri (eubakteria) domainine dahil edilmiştir.

Firmicutes şubesinde bulunduğu için bütün türleri Gr(+) olarak boyanmaktadır. Çubuk (çomak) şeklinde olan bu cinsin üyeleri bazen tek başlarına bazen de çiftler ya da gruplar halinde gelişmektedir (Mounier ve ark. 2017).

Genetik açıdan bilinen *Bacillus* cinsi türlerinin guanin ve sitozin bazlarının %mol oranı 32-69 arasında değişmektedir. Genomlarının büyüklüğü ise 3.35-5.5 Mb aralığındadır (Contesini ve ark. 2018).

Bacillus cinsi türlerin hücre boyutları genellikle $3-5 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ aralığındadır. *Bacillus* cinsinin genelinde R tipi denilen kenarları pürüzlü, yüzeyi pürüzlü ve mat görünümde olan koyu beyaz renkli koloniler görülmektedir (Lu ve ark. 2018). Çoğu mezofildir yani gelişimleri için genellikle $35-37^{\circ}\text{C}$ sıcaklığı tercih etmektedir. Gelişimleri için genellikle en uygun pH değeri nötral değerlerdir.

Aerobik veya fakültatif anaerobik solunum yapan türlere sahiptir (Claus ve Berkeley 1986). Üyeleri katalaz (+) olan bu cinsin bazı türleri (örn. *B. subtilis*) hareketli peritrik kamçısı sayesinde hareket edebilirken, bazı türleri (örn. *B. anthracis*) hareketsizdir (Guttenplan ve ark. 2013).

Toprak, deniz ve göl sedimenti, tuz bataklığı, termal su, kanalizasyon, dışkı gibi neredeyse tüm ortamlarda bulunmaktadır. Serbest yaşayan veya patojen olan türleri içermektedir. Genellikle nemi, oksijeni ve organik madde içeriği iyi toprakların ilk 10-15 cm'lik kısımda bulunmaktadır.

Toprağın şartlarına göre değişmekle birlikte genellikle 1 g toprakta yaklaşık olarak 106 -109 tane bakteri bulunmaktadır (Yılmaz 2003).

Bacillus cinsinin karakteristik özelliklerinden birisi oldukça dayanıklı yapıya sahip endosporları üretmeleridir. Bu endosporlar elipsoit, oval, yuvarlak, silindirik, böbrek veya muz şeklinde olup, hücre içerisinde sentral, subterminal veya terminal olarak yerleşmektedir. Endospor yapısının bazen vejetatif hücreden geniş olabildiği de görülmektedir (Silva ve ark. 2013). *Bacillus* cinsi, endospor yapısını oluşturmaları sayesinde geniş bir çevreye yayılmaktadır. Genellikle prototrof (örn. *B. subtilis*) oldukları halde, oksotrof (*B. polymyxa*) türleri de vardır. Çoğu saprofit olarak beslenen bu mikroorganizmaların yağ ve protein gibi besinleri parçalama yeteneği çok gelişmiştir.

B. anthracis, *B. cereus*, *B. pumilus* türleri hariç neredeyse tamamı insan ve hayvanlar için zararsızdır (Borsa ve ark. 2016).

Çok sayıda endüstriyel enzimi üretmelerine ek olarak antibiyotik de üretmeleri *Bacillus* cinsinin önemli olmasının bir diğer sebebidir. Örneğin, *B. licheniformis* (basitrasin) ve *B. subtilis* (basitrasin, basilisin, subtilin), *B. polymyxa*

(polimiksin) ve *B. brevis* (gramisidin, tirosidin) tarafından üretilen antibiyotikler ilaç olarak kullanılmaktadır (Yang ve Yousef 2018). Ayrıca *B. subtilis* tarafından üretilen itürin bitki patojeni funguslar ile mücadelede kullanılmaktadır (Kim ve ark. 2010).

B. cereus tarafından üretilen zwittermisin, bitkilerde hastalık oluşturan bazı bakterilere karşı kullanılmaktadır (Shafi ve ark. 2017). Bazı *Bacillus* türleri logaritmik artış fazında polihidroksi alkanoat sentezlemektedir, bu biyolojik olarak bozunabilir plastik üretiminde kullanılmaktadır (Zaki 2018).

Bacillus cinsinin endüstride bazı alanlarda diğer mikroorganizmalara göre daha fazla kullanılmasının en önemli nedeni güvenilir statüsünde olmalarıdır. Örneğin, *B. subtilis* ve *B. licheniformis* suşlarının güvenilir (GRAS) statüsünde olduğunu USFDA tarafından onaylamıştır. Buna ek olarak *Bacillus* cinsi hızlı üremeleri sebebi ile kısa fermentasyon döngüsüne sahip olmaları, çok yüksek miktarda proteini hücre dışına salgılama kapasitesine sahip olmaları, bu sayede zaman ve maliyetten tasarruf sağlamaları onların daha fazla kullanılmasına yol açmaktadır (Sewalt ve ark. 2016).

1.7. *Bacillus* Cinsi Proteazının Genel Özellikleri

Proteaz enzimlerinin yaklaşık olarak % 70'i *Bacillus* cinsi kullanılarak elde edilmektedir (Johnevelsy ve Naik 2001). *Bacillus* cinsine ait çoğu bakteri, proteaz enzimini logaritmik artış fazı sonrasında yani durağan fazda sentezlemektedir (Ahmetoglu ve ark. 2015).

Bacillus cinsi ekstraselüler proteazların çoğunun serin, sistein ve metallo olduğu rapor edilmiştir. Bu proteazların optimal sıcaklık değerinin 37-60°C; optimal pH değerinin ise genellikle pH 6.0-10.0 arasında olduğu bildirilmiştir. Baskın olarak alkalen proteaz üreten bu cins nötral proteazlar da üretmektedir (Contesini ve ark. 2018). *Bacillus* proteazları 8-90 kDa moleküler ağırlığa sahiptir (Kato ve ark. 1992, Devanadera ve ark. 2016). Fakat bunların çoğunluğu 50 kDa veya daha düşük moleküler ağırlığa sahiptir (Vijayaraghavan ve ark. 2012). *Bacillus sp.* alkalen

proteazları genellikle 15-38 kDa moleküler ağırlığa sahiptir (Adinarayana ve ark. 2003, Ali ve ark. 2016).

Fakat bazı *Bacillus sp.* alkalen proteazının 8 kDa olduğu saptanmıştır (Devanadera ve ark. 2016). 53 *Bacillus subtilis* proteazları genellikle 18-35 kDa moleküler ağırlığa sahiptir. Fakat *B. subtilis* (natto) proteazının moleküler ağırlığı 90 kDa, *B. subtilis* USTCMS 1011 alkalen proteazının moleküler ağırlığı 8 kDa'dır (Kato ve ark. 1992, Devanadera ve ark. 2016). *Bacillus subtilis* metalloproteazları ise 20-30 kDa moleküler ağırlığa sahiptir (Park 2004).

Bacillus proteazları gıda, ilaç, deterjan ve deri endüstrilerinde, atık arıtımı, oligopeptit sentezi gibi alanlarda kullanılmaktadır (Briki ve ark. 2016).

Bacillus cinsi üyeleri endüstride en fazla talep gören proteazlar olan nötral ve alkalen proteazları üretebilmektedir (Contesini ve ark. 2018). Ürettikleri proteazların aktivitesinin, sıcaklık ve pH değerlerine olan tolerans ve stabilitesinin yüksek olması da yine endüstriyel açıdan tercih edilmelerini sağlamaktadır (Briki ve ark. 2016). Buna ek olarak bazı türleri yüksek kapasitede protein sekresyonu yapabilmektedir. Örneğin besiyerine litrede 20 gramdan fazla protein sekresyonu yaptığı rapor edilmiş *Bacillus* türleri bulunmaktadır (Harwood 2008).

Kısacası aktivitesi yüksek, pH ve sıcaklık gibi çeşitli fiziksel etkenlere karşı toleransı ve stabilitesi yüksek proteaz enzimi üretmeleri *Bacillus* cinsinin proteaz üreticisi olarak tercih edilmesine neden olmaktadır (Thangam ve Rajkumar 2000). *Bacillus subtilis* ise hızlı üremesi, farklı özellikte birçok ekstraselüler proteaz üretmesi ve GRAS mikroorganizmalar grubunda olmasıyla proteaz üretimi için en fazla tercih edilen kaynaklardanır. Ayrıca iyi standardize olmuş biyokimyasal protokollerin varlığı proteaz üretiminde daha fazla kullanılmasına yol açmaktadır (Farhadian ve ark. 2015).



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Morita ve ark (1997), 10°C’ de gelişen *Serratia marcescens* AP3801 suşunda proteaz aktivitesi saptamışlar. İyon değiştirme ve gel filtrasyon kromatografisi ile besi yerinden saflaştırmışlardır. Moleküler ağırlığının 58kDa olduğunu ve izoelektirik noktasının 6.0 olduğunu saptamışlardır. Enzimde 40°C ve pH 6.5- 8 arasında maksimum aktivite gözlemişlerdir. Aktivitede 1,10-phenanthroline ile kuvvetle inhibe olması bu enzimin bir metalloproteaz olduğunu düşündürmüştür.

Morita ve ark (1998) Somon’un (*Oncorhynchus keta*) barsaklarından *Flavobacterium balustinum* P104 suşunu izole edip besi yerinde proteaz aktivitesini tespit ettiler. İyon değiştirme ve gel filtrasyon kromatografisi ile besi yerinden saflaştırmışlardır. Moleküler ağırlığı 70 kDa olduğunu ve izoelektrik noktasının 3.5 olduğunu tespit etmişlerdir. pH 7-9 ve 40°C de azocasein doğrultusunda maksimum aktivite gözlemişlerdir. Phenylsulfonyl fluoride ile kuvvetle inhibe olması bu enzimin bir serine proteaz olduğunu düşündürmüştür.

Zeng ve ark (2002), *Pseudomonas* DY-A suşundan cold-active serine alkaline protease enzimi saflaştırdılar. Suşun optimal gelişimi ve proteaz üretim sıcaklığı 10°C’ dir. Suş sadece 20°C’ nin altında proteaz salgılıyor. Enzimin 40°C ve pH 10.0’da oldukça aktif olduğu görülmüş. Phenylmethyl sulfonylfluoride ve diisopropyl fluorophosphate ile inhibe olduğu gösterilmiş. EDTA, EGTA, 1,10-phenanthroline ve 2,2-bipyridyl aktivitede 8 azalma görülmüş. Native PAGE ve SDS-PAGE ile moleküler ağırlığının 25 kDa olduğunu tespit etmişlerdir.

Wang ve ark (2005), *Colwellia* NJ341 suşundan alkaline serine protease izole ettiler. Enzimin SDS-PAGE ve MALDI-TOF analizi sonucunda moleküler ağırlığı 60 kDa olduğu görülmüştür. İzole enzimin optimum aktivite sıcaklığı 35°C ve optimum pH sı 5-12 aralığında bulunmuştur. Phenylmethysulfonyl fluoride ile tamamen inhibe olduğu görülmüştür.

Wang ve ark (2007) Psikrofil bakteri olan *Pseudoalteromonas* NJ276 suşundan ekstraselüler cold-active proteaz saflaştırdılar. Saflaştırılan enzimin SDS-

PAGE ile moleküler ağırlığının 28kDa olduğu gösterilmiştir. Enzimin optimum pH'nın 8 ve pH 7-9 arasında stabil ve optimum sıcaklığının 30°C olduğu gösterilmiştir. Enzim PMSF ile tamamen inhibe olmaktadır. Metal tuzları ile kısmen inhibe olmaktadır özellikle (0-3M) NaCl konsantrasyonlarına yüksek derecede toleranslıdır.



3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Bu çalışmada materyal olarak deniz suyundan bakteri izolasyonu ve identifikasyonunda kullanılan kimyasal malzemeler, deniz suyundan izole edilen *Bacillus sp.* suşları, enzim karakterizasyonunda gerekli çözeltiler materyal olarak kullanılmıştır. Hassas terazi, su banyosu, etüv, otoklav, yağ banyosu, soğutmalı santrifüj, -20°C +4°C buzdolabı, TLC sistemi, UV Visible spektrofotometre, SDS PAGE sistem düzeneği kullanılarak deneyler yürütülmüştür.

3.1.1. Bakteri İzolasyonunda Kullanılan Besiyerleri

3.1.1.1. Nı Agar

Deniz suyu örneklerinden bakterilerin izolasyonu, tek düşen suşların seçilmesi, çoğaltılması ve saklanması amacıyla kullanılmıştır (Anonymous, 1978).

<u>Bileşimi</u>	<u>g/L</u>
Pepton	10
Et özütü	10
Maya	5
Glikoz	1
Agar	15
Distile su	1000 mL

3.1.1.2. Proteaz Enzimi Üretim Besiyeri (Skimmilk Besiyeri)

Katı besiyerinde proteaz aktivitesinin belirlenmesi için kullanılmıştır (Singh ve ark, 2001). Araştırmada kullanılan besiyeri Singh ve ark.'nın tanımladığı besiyeri modifiye edilerek elde edilmiştir.

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

Skimmilk pH' sı 5.0'a ayarlanarak ayrı steril edilmiş ve besiyerine sonradan eklenmiştir.

3.1.2. Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar

3.1.2.1. H₂SO₄ ve NaOH Çözeltisi

Besiyerlerinin pH'sını ayarlamak ve enzimin aktivite analizinde kullanılacak tamponların pH'larını ayarlamak için 0.2 N ve 2 N olarak farklı derişimlerde hazırlanmışlardır.

3.1.2.2. Etanol

Sıvı besiyerlerinde üretilen enzimlerin çöktürülmesi için soğutulmuş % 96'lık etanol kullanılmıştır.

3.1.2.3. Sodyum Fosfat Tamponu (100 mM, pH 7.0)

Enzimin çöktürölme işleminden sonra enzimin çözölerek sıvı hale getirilmesi için kullanılmıştır.

3.1.2.4. Sitrat Tamponu

Enzimin pH 4.0-5.0 aralığında gösterdiği aktivitenin belirlenmesi için kullanılmıştır. Sitrik Asit 0.2 M (19.21 g/L) ve Na₂HPO₄ 0.2 M (53.65 g/L)

çözeltilerden istenilen pH değerlerine göre tabloda belirtilen miktarlarda alınır ve son hacim 100 mL'ye tamamlanır(Aygan, 2008).

pH	0.2M Sitrik Asit (19.21 g/L) mL	0.2M Na ₂ HPO ₄ (53.65 g/L) mL	Distile Su mL
4	30.7	19.3	50
5	24.3	25.7	50

3.1.2.5. Sodyum Fosfat Tamponu

Enzimin pH 6.0-8.0 aralığında gösterdiği aktivitenin belirlenmesi için kullanılmıştır. NaH₂PO₄ 0.2M (27.8 g/L) ve Na₂HPO₄ 0.2M (53.65 g/L) çözeltilerden istenilen pH değerlerine göre tabloda belirtilen miktarlarda alınır ve son hacim 100 mL'ye tamamlanır(Aygan, 2008).

pH	0.2 M NaH ₂ PO ₄ (27.8 g/L) mL	0.2 M Na ₂ HPO ₄ (53.65 g/L) mL	Distile Su mL
6	43.85	6.15	50
7	19.5	30.5	50
8	2.65	47.35	50

3.1.2.6. Glisin-NaOH Tamponu

Enzimin pH 9.0-10.0 aralığında gösterdiği aktivitenin belirlenmesi için kullanılmıştır. Glisin 0.2M (15.01 g/L) ve NaOH (8 g/L) çözeltilerden istenilen pH değerlerine göre tabloda belirtilen miktarlarda alınır ve son hacim 100 mL'ye tamamlanır(Aygan, 2008).

pH	0.2 M Glisin (15.01 g/L) mL	0.2 M NaOH (8 g/L) mL	Distile Su mL
9	4.4	25	70.6
10	16	25	59

3.1.2.7. TCA (Trikloro Asetik Asit)

Enzimin aktivitesini durdurmak için kullanılmıştır.10 g TCA 60 mL distile su içerisinde çözüldükten sonra son hacim 100 mL 'ye tamamlanır(Chi ve ark., 2007)

3.1.2.8. Yıkama Performansı için Çözeltiler

Yıkama performansında deneyinde kullanılmak üzere 1 mL Fairy bulaşık deterjanı ve 1 mL Vanış sıvı leke çıkarıcı deterjan musluk suyu ile son hacmi 100 mL' ye tamamlanır.

3.1.3. İnce Tabaka Kromatografisi Solüsyonları

3.1.3.1. Butanol-Asetik Asit-Distile Su Çözeltisi

Proteaz enziminin kazeini parçalamasından sonra açığa çıkan hidroliz ürünlerinin belirlenmesinde harekeketli faz olarak kullanılmıştır. Butanol- asetik asit asit-distile su (3:1:1) şeklinde hazırlanmıştır (Arabacı ve ark,2012).

3.1.3.2. Ninhidrin Çözeltisi (%0.25)

Ninhidrin 0.25 g.
Aseton (100 ml'ye tamamlanmıştır)

3.1.3.3. L-prolin (% 1) (w/v), L-Glisin (%1) (w/v), L-Sistein (%1) (w/v), L-Histidin (%1) (w/v) ve L-Tirosin (%1) (w/v)

İnce tabaka kromatografisinde son ürünlerin karşılaştırılarak tanımlanması amacı ile marker olarak kullanılmışlardır.

3.2. Metod**3.2.1. Bakteri İzolasyonu ve Teşhisi****3.2.1.1. *Bacillus sp.* Suşlarının İzolasyonu**

Adana/Karataş bölgesi farklı lokasyonlardan alınan deniz suyu örnekleri 2mL ölçüm yapıldıktan sonra pH'sı 5-7 'ye ayarlanmış 20 mL N₁ besiyerine süspanse edilip 30°C' de 24 saat inkübe edildikten sonra 80°C 'de 10 dakika ısı uygulaması gerçekleştirilmiştir(Lennette ve ark, 1985).Örnek 30°C' de 24 saat çalkalayıcıda üremeye bırakılmıştır. Üreme sonunda tek koloni elde edebilmek için hazırlanan örneklerden 10⁻⁵ ve 10⁻⁶ seri sulandırma yapılarak pH 5-7 olan N₁ besiyerine yayma şeklinde ekim yapılmış ve 30°C' de 72 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir(Arıkan,2008).

İnkübasyondan sonra farklı morfolojik görünüme sahip koloniler seçilmiş ve N₁ ve Skim milk' li besiyerine çizgi şeklinde ekilerek identifikasyon ve proteaz aktivitesinin belirlenmesi için stok kültürler şeklinde +4°C' de buzdolabında saklanmıştır(Turus,2011).

3.2.2. Bakterilerin Teşhisi

Seçilen bakteri örneklerini tanımlamak amacı ile indol, hidrojen sülfür, hareket, asit, katalaz, jelatin ve kazeini kullanma gibi biyokimyasal testler ile spor, yüzeyde zar oluşturma, dipte çökelti oluşturma ve gram boyama testleri yapıldı (Jin ve ark., 1990).

3.2.3. Katı Besiyerinde Proteaz Aktivitesinin Saptanması

Tanımlamaları yapılan *Bacillus sp.* suşları pH 5.0 olan skim milk agar besiyerine çizgi ekim tekniği kullanılarak ekim yapılmış ve 30°C lik etüvde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda SMA besiyerinde üreyen bakterilerin etrafında skimmilk'in hidrolizi nedeniyle şeffaf zonlar oluşmuştur. Oluşan bu şeffaf zonlar proteaz aktivitesinin varlığını göstermiştir. (Adinarayana ve ark, 2003).

3.2.4. Bakterinin Ürediği ve Enzim Sentezinin Gerçekleştiği pH Aralığının Saptanması

Bu amaçla 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 pH değerlerine sahip skimmilk agar besiyerlerine, tanımlanması yapılan ve proteaz pozitif özellik gösteren suşlardan çizgi şeklinde ekim yapılmıştır. Örnekler 30°C'de 24 saat üretildikten sonra hangi pH değerlerinde ve pH aralığında üreme gerçekleştiği saptanmıştır. Besiyerinde üremenin gerçekleştiği ve proteaz pozitif olan bölgelerde şeffaf zon oluşacağından pH aralığı ve optimum pH değeri saptanmıştır(Hols ve ark.,1994 ; Burhan ve ark.2003).

3.2.5. Bakterinin Ürediği ve Enzim Sentezinin Gerçekleştiği Sıcaklık Aralığının Saptanması

Bakteriler skimmilk bulunan farklı pH değerlerine (pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0) sahip agar besiyerlerine çizgi şeklinde ekilerek 20, 30, 40, 50, 60, 70,80,90,100° C' de 24 saat inkübe edilmiş. Üremenin ve enzim sentezinin gerçekleştiği sıcaklık aralığı ve optimum sıcaklık değerleri saptanmıştır(Voget ve ark, 2006).

3.2.6. Enzim Üretimi ve Kısmi Saflaştırma

En yüksek aktiviteyi gösteren suş enzim üretimi için en iyi üremenin sağlandığı pH' değerine ayarlanmış skimmilk'li sıvı besiyerine aşılansak 72 saat

süre ile en iyi aktivite zonunun elde edildiği sıcaklık değerinde 240 rpm/dk da çalkalamalı kültür üretimi gerçekleştirilmiştir. İnkübasyondan sonra örnek +4°C ve 8000 rpm de 10 dakika santrifüj edilerek organizmalar kültürden uzaklaştırılıp, süpernatant alınarak enzim eldesinde kullanılmıştır. Süpernatanta örnek hacminin %70'i oranında soğuk etanol eklenerek enzim presipite edilmiştir. Presipitasyonun daha güçlü olması için hazırlanan karışım -20°C'lik derin dondurucuda 24 saat bekletilmiştir. Örnek +2°C ve 10000 rpm de 10 dakika çöktürülerek enzim presipitatu toplanıp uygun hacimde 100 mM fosfat tamponunda (ph 7.0) çözülmüştür. Hazırlanan örnek enzim aktiviteleri için stok şeklinde kullanılacaktır (Srivastava, 1987; Arikan, 2007).

3.2.7. Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değerinin Saptanması

Kısmi saflaştırma yöntemi ile elde edilen enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin saptanması için %1 kazein içeren Sitrik Asit(pH 4-5.0), Na-fosfat (pH 6.0-8.0) ve Glisin-NaOH (pH 9.0-10.0) tamponları kullanılmıştır (Anonymous, 1917).

Aktivite tayini için 0.5 mL enzim çözeltisi ve her pH değerindeki substrat çözeltisinden 1.5mL substrat (farklı pH değerlerine sahip tamponlarda hazırlanmış substrat) alınarak tüplere konulmuştur. Her pH değeri için üç seri tüp analiz edilmiştir. Hazırlanan enzim substrat karışımları enzimin üretildiği sıcaklık olan 20°C'lik su banyosunda 60 dakika süreyle inkübe edilmiştir (Arikan,2007). İnkübasyon sonunda her bir tüpe %10'luk trikloroasetik asit (TCA) çözeltisinden 2 ml eklenerek reaksiyon durdurulmuştur.

Örnekler 20 dakika buz üzerinde tutularak proteinlerin presipite olması sağlanmıştır. Karışım 4 °C'de 10000 rpm' de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Hazırlanan örnek UV-visible spektrofotometre kullanılarak 280 nm dalga boyunda köre (distile su) karşı okuma yapılarak absorbans değeri elde edilmiştir (Abdelnassar ve ark, 2007) (Pandhare j., 2002).

En yüksek absorbans değerinin elde edildiği pH değeri 100 kabul edilerek diğer pH değerleri buna göre oranlanarak rölatif enzim aktivitesi saptanmıştır (Gessesse ve Gashe.,1997; Burhan ve ark.,2003).

3.2.8. Enzimin Optimum Sıcaklık Aktivitesinin Saptanması

Kısmi saflaştırma işlemi ile elde edilen enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerinin saptanması için 20,30,40,50,60,70,80,90,100°C sıcaklık değerlerinde su banyosunda inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Aktivite tayini için 0.5 mL enzim ve 1.5 mL optimum pH'nın elde edildiği tamponda hazırlanmış substrat solüsyonu tüp içerisinde karıştırılarak seçilen sıcaklık değerinde 60 dakika süreyle inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda standart aktivite tayini yapılmıştır (AiBa ve ark., 1983; Srivastava ,1987; Burhan ve ark., 2003).

3.2.9. Enzimin Termal Stabilitesinin Saptanması

Proteaz enziminin termal stabilitesinin saptanması için 20,30,40,50,60,70,80,90,100°C arasındaki sıcaklık değerlerinde 60 dakikalık ön inkübasyon gerçekleştirilmiştir .Ön inkübasyon işleminden sonra optimum pH değerine sahip substrat çözeltisi 1.5 mL ve 0.5 mL enzim karıştırılarak optimum aktivitenin gerçekleştiği sıcaklık değerinde(70°C) 60 dakika süreyle inkübasyon gerçekleştirilerek standart aktivite tayini yapılmıştır (AiBa ve ark., 1983; Srivastava, 1987; Gessesse ve Gashe 1997; Mehrotta ve ark., 1999; Burhan ve ark., 2003 ; Arikan, 2007).

Ön işleminden geçirilmemiş enzim örneğinin analizi sonucu elde edilen absorbans değeri 100 kabul edilerek farklı sıcaklıklar kullanılarak ön işleminden geçirilen örneklerden elde edilen değerlerin oranlanması sonucu kalan enzim aktivitesi saptanmıştır (AiBa ve ark, 1983; Srivastava, 1987; Burhan ve ark, 2003).

3.2.10. Enzimin Ph Stabilitesinin Saptanması

Proteaz enziminin pH stabilitesinin saptanması için 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 pH değerleri çalışılacaktır.

Uygun şartlarda saklanmış stok sıvı enzim örneğinden 2 mL eppendorf tüplerine alınarak +4°C 'de 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz (süpernatant) atılarak enzim üzerine test edilecek farklı pH' lar için kullanılan tamponlardan 2'şer mL eklenerek örnekler 24 saat oda sıcaklığında ön inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyondan sonra örneklerden 0.5'er mL alınarak optimum aktivitenin görüldüğü pH aralığında hazırlanmış substratlı tampon çözelti ile karıştırılarak, optimum aktivitenin görüldüğü sıcaklıkta (70°C) 60 dk ön inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda standart aktivite tayini yapılmıştır.

Kontrol örneğini hazırlamak için, ön işleminden geçmemiş enzim ve substrat kullanılarak standart aktivite tayini yapılmıştır. Okunan absorbans değeri 100 kabul edilmiş ve test edilen örneklerin absorbans değerleri buna göre değerlendirilip, oranlanıp kalan aktivite hesaplanmıştır (Aygan ve Arıkan, 2008) (Coral ve ark., 2002; Burhan ve ark., 2003).

3.2.11. Enzim Aktivitesi ve Stabilitesine Farklı NaCl Konsantrasyonlarının Etkisi

Uygun şartlarda saklanmış stok enzim örneğinden 2 mL eppendorf tüplerine alınarak 10000 devirde 10 dakika +4 °C' de santrifüj edilmiştir. Üst faz atıldıktan sonra çökeltiye daha önceden hazırlanmış 2'şer mL'lik %3, %5, %10, %15, %20, %25, %30, %35, %40'luk NaCl çözeltilerinden eklenerek enzim tekrar sıvılaştırılmıştır. Sıvılaştırılan enzim oda sıcaklığında 60 dakika ön inkübasyona bırakılmıştır. Ön inkübasyon işleminden sonra 0.5 mL enzim ve 0.5 mL substrat ile karıştırılıp 60 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Süre bitiminde standart aktivite tayini yapılmıştır.

Kontrol örneği için ön işlemiden geçmemiş enzim ile substrat karışımı optimum sıcaklıkta 70°C’de 60 dakika süre ile inkübe edildikten sonra aynı şekilde aktivite tayini yapılmıştır. Okunan absorbans değeri 100 kabul edilip, örneklerin absorbans değerleriyle orantılanarak kalan enzim aktivitesi belirlenmiştir (Aygan ve Arıkan, 2008)

3.2.12. Enzim Aktivitesine İnhibitör, Şelatör, Deterjan ve Metal İyonlarının Etkisi

Stok enzim çözeltisinden her bir inhibitör için eppendorf tüplerine 1.2 mL enzim eklenerek +4°C’ de 10000 rpm ‘de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üst sıvı faz (süpernatant) atılarak her farklı eppendorf tüplere 1.2 mL inhibitör, şelatör, metal iyonu, oksidant ve deterjan eklenmiştir. Bu amaçla 10mM EDTA, 10mM CaCl₂, 3mM PMSF, %5v/v β-Merkaptoetanol, %5w/v SDS, %5 v/v Triton X-100, 10mM ZnCl₂, 10 M üre ve % 5 H₂O₂ kullanılmıştır (Burhan ve ark., 2003, Arıkan, 2007).

Örnekler oda sıcaklığında (37°C) 60 dakika ön inkübasyona bırakılmıştır. Ön işleme tutulan her enzim çözeltisinden 0.5 mL ve optimum pH’nın elde edildiği substrat çözeltisinden 1.5 mL karıştırılarak optimum aktivitenin elde edildiği sıcaklık değerinde standart aktivite tayini gerçekleştirilmiştir.

Ön işlemiden geçirilmemiş enzim örneğinin analizi sonucu elde edilen absorbans değeri 100 kabul edilerek farklı inhibitör, şelatör, metal iyonları, oksidant ve deterjan kullanılarak ön işlemiden geçirilmiş örneklerden elde edilen değerlerin oranlanması sonucu kalan enzim aktivitesi saptanmıştır (Aygan, 2008; Arıkan, 2008).

3.2.13. İnce Tabaka Kromatografisi Yöntemiyle Reaksiyon Ürünlerinin Saptanması

Enzim aktivitesi sonucu açığa çıkan hidroliz ürünlerinin kalitatif olarak saptanması için TLC analizi yapılmıştır. Sabit faz olarak TLC Silica Gel 60 F254 plakalar ve Hareketli faz olarak Butanol: Asetik asit: distile su (4:1:1) kullanılmıştır.

Hazır levhalar levha üzerine reaksiyon ürününden 20 µL, markerdan (tirosin, prolin, glisin, histisin, sistein) ise 5 µL örnek yüklemesi yapılmıştır.

Reaksiyon ürünü % 1'lik kazein içeren optimum pH'daki tampon + enzim karışımının 12 saatlik optimum aktivite sıcaklığındaki inkübasyonu sonunda elde edilmiştir. Hazırlanan jel plağı tank içerisine yerleştirilip yaklaşık 2 saat süreyle yürütme işlemi yapılmıştır. Reaksiyon ürünlerinin jel üzerinde görünür hale gelmeleri için plaka üzerine yürütme işleminin ardından asetonda çözülmüş % 0,25 Ninhidrin püskürtülerek son ürün görünür hale getirilmiştir. Püskürtme işleminden sonra levhalar yaklaşık 1-2 saat kadar kurumaya bırakılmıştır ve 35-40 dk süreyle 110 °C'de inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Oluşan reaksiyon ürünleri ile marker karşılaştırılarak son ürün saptanmıştır (Arabaci ve ark., 2012).

3.2.14. Yıkama Performansı Testi

Saflaştırılmış proteaz enziminin salça-yağ (zeytin yağı), bebek maması (Herobaby), kan, çikolata (Ülker), yemek sosunun neden olduğu lekeleri giderme yeteneği açısından performansını değerlendirmek için yıkama analizleri yapılmıştır. 4x4 büyüklüğünde hazırlanan beyaz pamuklu kumaş parçaları yukarıda belirtilen ürünlerle lekenmiştir. Bir gece oda sıcaklığında lekelerin kuruması ve kumaşlara nüfuz etmesi için bekletilmiştir. 5 farklı lekenin uygulandığı kumaşlar ayrı ayrı aşağıda anlatıldığı şekilde hazırlanmış karışımların bulunduğu beherlere konulmuştur.

1. 25 ml çeşme suyu içeren beherler (Lekelenmemiş kumaş, kontrol)
2. %1 (v/v) oranında ticari deterjan (Fairly bulaşık deterjanı) ve çeşme suyu bulunan, hacmi 25 ml olarak hazırlanmış karışımın olduğu beherler
3. 500 U/ml enzim ve çeşme suyundan oluşan 25 ml'lik karışımların olduğu beherler
4. %1 (v/v) oranında ticari deterjan ve 500 U/ml enzim içeren toplam 25 ml çeşme suyundan oluşan karışımların olduğu beherler.

Yukarıda belirtilen şekillerde hazırlanan ve lekeli kumaşların bulunduğu beherler 50 °C’ de 60 dakika 100 rpm/dk hızda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi bittikten sonra kumaş parçaları beherlerden çıkarılarak durulanmış ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

Enzimin leke çıkarma kapasitesi sadece suda bekletilen lekeli kumaşlar, herhangi bir işlem görmemiş lekeli kumaşlar (kontrol) ve lekesiz kumaşlarla kıyaslanarak görsel olarak belirlenmiştir. (Srivastava ve Kapoor, 2013)



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Toplanan deniz suyu örnekleri 2 mL'lik, pH 5.0-7.0 olan N₁ besiyerine süspanse edilip 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda örnek diğer mikroorganizmaların elemine edilmesi ve ortamda yalnızca sporlu aerobik bakteri olan *Bacillus* suşlarının ayırt edilebilmesi için su banyosunda ısı şoku şeklinde ön işlemden (80°C' de 10 dakika) geçirilmiştir. (Lennette ve ark, 1985).

Ön işlem sonrası *Bacillus* suşları 30°C'de 24 saat süre ile çalkalamalı kültür şeklinde üretildikten sonra pH'sı 5.0-7.0 olan N₁ agar besiyerine tek koloni düşecek şekilde ekilmiş ve 30°C'de 24 saatlik inkübasyon sonunda koloni morfolojilerine göre toplam 21 adet suş seçilmiştir.

4.1. Deniz Suyundan *Bacillus* sp. Suşlarının İzolasyonu ve Tanımlanmasına Ait Bulgular

Adana Karataş sahilinden izole edilen denizel örneklerden 125 adet *Bacillus* suşu elde edilmiştir. Elde edilen suşların 21 adedi katı besiyerinde proteaz aktivitesi göstermiştir.

Aktivite gösteren suşlardan seçilen 6 *Bacillus* suşu katı besiyerinde optimum üreme ve aktivite gösterdikleri sıcaklık pH'nın belirlenmesi için analiz edilmiş, *Bacillus* sp. SG-11 suşu enzim sentezi ve karakterizasyonu için seçilerek stok kültür olarak hazırlanmıştır.

Sadece proteaz aktivitesine sahip suşlar geniş, beyaz renkli ve dalgalı kenarlı koloni morfolojisine sahiptirler. Suşlar gram pozitif, spor oluşturan, aerob, çubuk şekilli ve hareketli bakterilerdir. Seçilen suşlar; glikoz, ksiloz ve mannitolü asit olarak parçalamaktadır ve katalaz pozitif özellik göstermektedir. Bu özelliklerine göre seçilen suşlar *Bacillus* sp. olarak tanımlanmıştır.

4.2. Bakterinin Katı Besiyerinde Ürettiği ve Enzim Sentezini Gerçekleştirdiği Optimum pH ve Sıcaklık Değerine Ait Bulgular

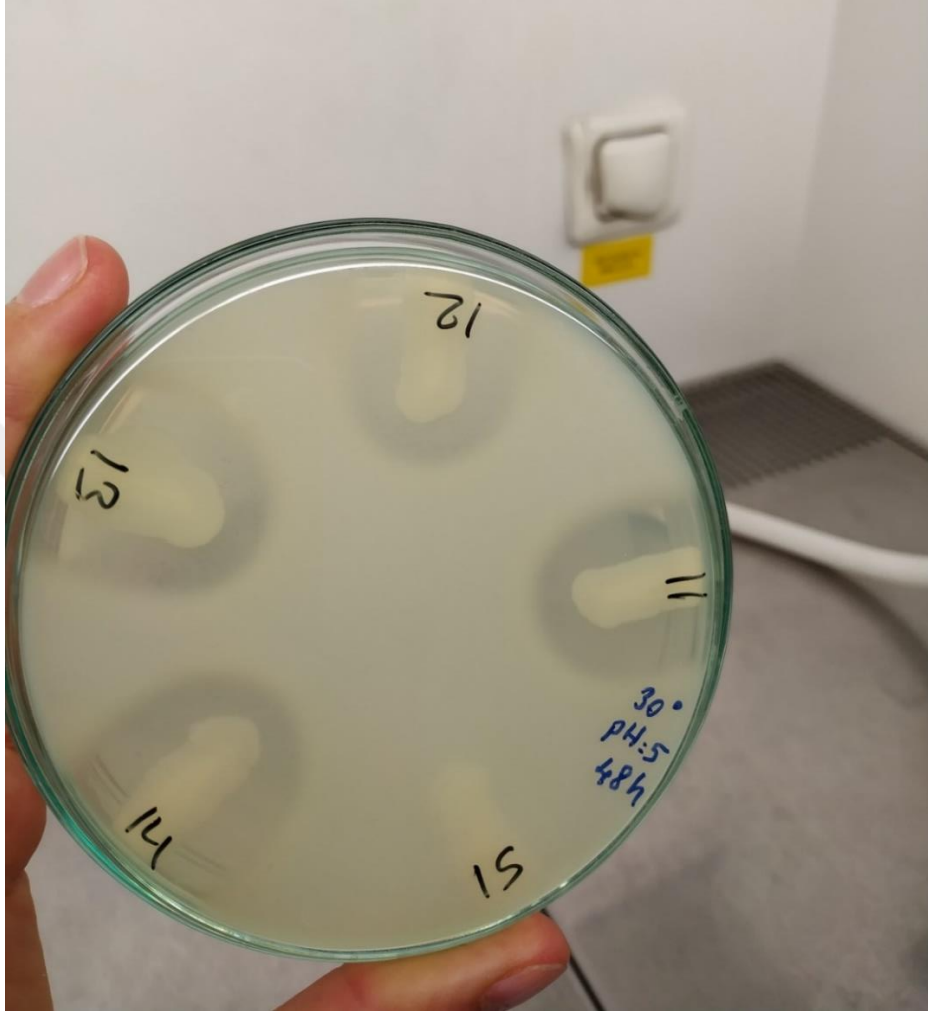
Proteaz enzim izolasyonu için seçilen *Bacillus sp.* SG-11 suşu 30°C sıcaklık ve pH 5.0 aralığında katı besiyerinde üreme ve enzim sentezleme analizi için test edilmiştir. Yapılan çalışmalarda seçilen suş 30°C’de pH 5.0’da 24 saatlik inkübasyon sonunda üremekle birlikte aktivite zonu saptanmıştır.

İnkübasyon sıcaklığı 30°C olarak seçildiğinde test edilen bütün pH’larda üreme ve enzim üretimi gerçekleşmiştir. İnkübasyon sıcaklığı 30°C seçildiği zaman test edilen SG-11 suşunun bütün pH’larda üreme ve enzim üretme yeteneğinde olduğu belirlenmiştir. Özellikle pH 5.0 da aktivite zonunun daha geniş olması suşun asidik özellikte enzim sentezlediğinin göstergesidir.

Zon çaplarındaki bu daralma suşun ürettiği halde enzim sentezleme yeteneğinin zayıfladığını göstermektedir. Bu gösterge enzimin soğukta aktif özellik gösterdiğinin belirtisidir. Farklı sıcaklık ve pH’larda üretilen SG-11 suşuna ait bulgular Şekil 1, 2, 3, 4’de gösterilmiştir.

Bacillus sp. MLB-2 suşundan izole edilen soğukta aktif proteaz enziminin 25- 35°C aralığındaki sıcaklıklarda maksimum üretildiği belirtilmiştir (Bhardwaj ve Satvanarayana, 2005; Joshi ve ark, 2007).

Bakterinin 20-45°C’lik sıcaklık aralığında ürettiği maksimum enzim üretiminin ise 30°C’de ve Ph 5.0’da gerçekleştirdiğini belirtmişlerdir. Elde edilen veriler farklı araştırmacıların soğukta aktif proteaz üretim sonuçları ile benzerlik göstermektedir.



şekil 4.1. *Bacillus sp.* SG-11 suşunun besiyerinde 30°C 48 saatte pH 5 değerinde gösterdiği koloni ve zonu



Şekil 4.2. *Bacillus sp.* SG-11 suşunun besiyerinde 30°C 24 saatte pH 5 değerinde gösterdiği koloni ve zonu

4.3. Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değerine Ait Bulgular

Kısmi saflaştırma işlemi sonrasında elde edilen optimum aktivite gösterdiği PH değerinin saptanması için Sitrik Asit (PH 4.0 -5.0) , Sodyum Fosfat (Ph 6.0-7.0-8.0) ve Glisin- NaOH (Ph 9.0-10.0) tamponları kullanılarak optimum aktivite değerinin saptanması için analiz edilmiştir.

Çizelge 4.1. Asidik proteaz enzimi optimum pH değeri

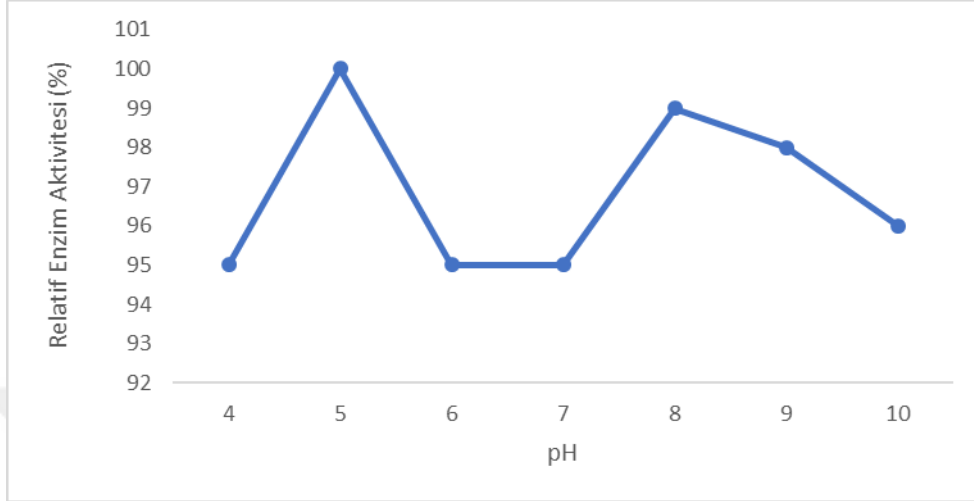
pH	İnk. Sıc.	İnk. Sür.	AB1	AB2	ABO	Relatif Aktivite(%)
4	30 °C	60 dk.	3.159	3.184	3.174	95
5	30 °C	60 dk.	3.178	3.469	3.323	100
6	30 °C	60 dk.	3.175	3.174	3.174	95
7	30 °C	60 dk.	3.178	3.169	3.173	95
8	30 °C	60 dk.	3.306	3.319	3.312	99
9	30 °C	60 dk.	3.306	3.216	3.261	98
10	30 °C	60 dk.	3.205	3.203	3.204	96

İnk: İnkübasyon, Sıc: Sıcaklık, AB: Absorbans

Proteaz enziminin 4.0-10.0 aralığındaki tüm pH değerlerinde yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir. SG-11 suşundan elde edilen enzimin en yüksek aktivite gösterdiği pH değeri 5.0'dır. pH değerleri incelendiği zaman pH 4.0'da %95, pH 5.0'da %100, pH 6.0'da %95, pH 7.0'da %95, pH 8.0'da %99, pH 9.0'da %98, pH 10.0'da %96 olarak bulunmuştur.

Bütün pH değerleri dikkate alındığında, enzim ortalama olarak %96.85 aktivite göstermiştir.

SG-11 suşundan elde edilen enzimin bütün pH değerlerinde oldukça yüksek aktivite göstermesi tüm pH değerlerinde kullanılabileceğini göstermektedir. Bu özellikleri ile enzim ekstrem alkali özellik göstermektedir.



Şekil 4.3. SG-11 Proteaz Enzimine Ait Optimum pH Değeri

Birçok araştırmacı farklı organizmalarda alkali veya asidik özellik gösteren proteaz enzim izolasyonu gerçekleştirmişlerdir.

4.4. Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Değerlerine Ait Bulgular

SG-11 enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerinin belirlenebilmesi için 20-30-40-50-60-70-80-90-100 °C 'lik sıcaklık değerleri seçilmiştir. Optimum pH'da hazırlanmış (pH 5.0) substrat kullanılarak standart aktivite tayini gerçekleştirilmiştir.

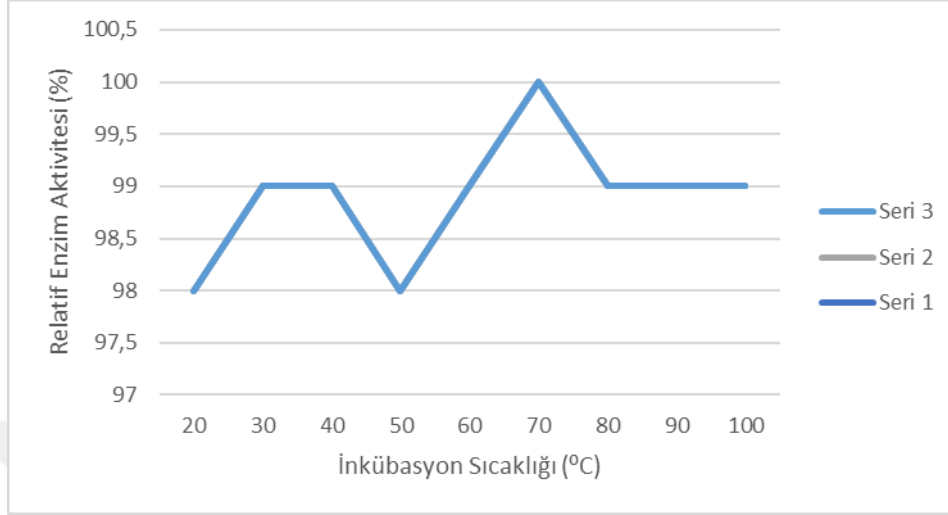
Çizelge 4.2. Asidik proteaz enzimi optimum aktivite sıcaklığı

İnk. Ph	İnk. Sıc. °C	İnk. Sür.	AB1	AB2	ABO	Relatif Aktivite(%)
5	20	60 dk.	3.283	3.325	3.304	98
5	30	60 dk.	3.310	3.326	3.318	99
5	40	60 dk.	3.324	3.310	3.317	99
5	50	60 dk.	3.277	3.290	3.283	98
5	60	60 dk.	3.335	3.322	3.228	99
5	70	60 dk.	3.310	3.367	3.338	100
5	80	60 dk.	3.29	3.324	3.307	99
5	90	60 dk.	3.324	3.320	3.322	99
5	100	60 dk.	3.329	3.299	3.314	99

İnk: İnkübasyon, Sıc: Sıcaklık, AB: Absorbans

Farklı sıcaklık değerlerinde pH 5.0'da proteaz enzim aktivitesinin optimum sıcaklık aktivitesi 70 °C'dir. SG-11 enzim sıcaklık değerleri incelendiğinde 20°C de %98, 30°C de %99, 40°C de %99, 50°C de %98, 60°C de %98, 70°C de %100, 80°C de %99, 90°C de %99 ve 100°C de %99 relatif aktivite elde edilmiştir.

SG-11 enzimi test edilen tüm sıcaklık değerlerinde ortalama %98,88 aktivite göstermiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda SG-11 enzimi yüksek ve düşük sıcaklık gerektiren farklı endüstriyel uygulama alanlarında kullanım alanı bulacaktır.



Şekil 4.4. SG-11 Proteaz Enziminin Optimum Sıcaklık Değeri

Joshi ve ark (2007) *Bacillus cereus* MTCC 6840 suşundan izole edilen proteaz enziminin optimum aktivitesini pH 9.0 ve 20°C olduğunu bildirmişlerdir. Enzimin 15 °C’deki relatif aktivitesinin %82 olduğunu bulmuşlardır.

Jinsong ve ark (2006), *Bacillus cereus* SYP-A2-3 suşundan izole edilen proteaz enziminin 0°C’ de %6, 25°C’de %60 relatif aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Düşük sıcaklıktaki bu özelliğin psikrofil enzimler için karakteristik olduğu bildirilmiştir.

İzolasyonu yapılan SG-11 proteaz enziminin 20°C ‘de %98, 30°C’de %99 ve 70°C’de %100 aktivite göstermesiyle literatür bulgularından çok daha yüksek relatif aktivite gösterdiği bulunmuştur. Bu enzim düşük ve yüksek sıcaklıklarda optimum aktivite göstermiştir. Bu özellikleri dikkate alındığında deterjan endüstrisi, et ürünleri ve peynirlerin olgunlaştırılması çalışmaları için ideal özellik göstermektedir

4.5. Enzimin Termal Stabilité Analizlerine Ait Bulgular

SG-11 proteaz enziminin termal stabilitesini belirlemek için farklı sıcaklıklarda (20-150°C) 60 dakikalık ön inkübasyon gerçekleştirilmiş ve standart

aktivite tayini yapılmıştır. Enzimin aktivitesini ne kadar koruduğu saptanmıştır. SG-11 enzimi termal stabilitesine ait sonuçlar Çizelge 4.4 Ve Şekil 4.3 gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Asidik proteaz enzimi termal stabilite değerleri

Ön İnk. Sıc.	Ön İnk. Sür.	İnk. pH	İnk. Sıc.	İnk. Sür.	AB1	AB2	ABO	Relatif Aktivite (%)
Kontrol	60dk.	5	70 °C	60 dk.	3.283	3.325	3.304	100
20 °C	60dk.	5	70 °C	60 dk.	3.213	3.198	3.205	97
30 °C	60dk.	5	70 °C	60 dk.	3.198	3.202	3.200	96
40 °C	60dk.	5	70 °C	60 dk.	3.247	3.196	3.221	97
50 °C	60dk.	5	70 °C	60 dk.	3.191	3.202	3.196	96
60 °C	60dk.	5	70 °C	60 dk.	3.193	3.194	3.193	96
70 °C	60dk.	5	70 °C	60 dk.	3.208	3.208	3.208	97
80 °C	60dk.	5	70 °C	60 dk.	3.198	3.272	3.235	97
90 °C	60dk.	5	70 °C	60 dk.	3.319	3.287	3.303	99
100 °C	60dk.	5	70 °C	60 dk.	3.325	3.292	3.308	100
110 °C	60dk.	5	70 °C	60 dk.	3.335	3.320	3.327	100
120 °C	60dk.	5	70 °C	60 dk.	3.562	3.547	3.554	107
130 °C	60dk.	5	70 °C	60 dk.	3.250	3.281	3.265	98
140 °C	60dk.	5	70 °C	60 dk.	3.362	3.351	3.356	101
150 °C	60dk.	5	70 °C	60 dk.	3.127	3.332	3.129	94

SG-11 proteaz enzimi 20-150 °C sıcaklık aralığında 60 dakika süreyle ön inkübasyona bırakıldığında tüm sıcaklık değerleri için yaklaşık %98 oranında orijinal aktivitesini koruduğu gözlenmiştir. En düşük enzim aktivitesi %94 ile 150 °C, en yüksek enzim aktivitesi %127 ile 120°C 'de saptanmıştır.

Sıcaklık değerleri ayrı ayrı incelendiğinde 20°C'de % 97, 30°C 'de %96, 40°C'de %97, 50°C 'de %96, 60°C 'de %96, 70°C 'de %97, 80°C 'de %97, 90°C 'de %99, 100°C 'de %100, 110°C 'de %100, 120°C 'de %107, 130°C 'de %98, 140°C'de %101, 150 °C'de %94 enzim aktivitesi bulunmuştur.

Enzim 60 dakikalık ön inkübasyon işleminden sonra tüm sıcaklık değerlerinde %94 ve üzerinde aktivitesini koruyarak stabil kalmıştır. Bu veriler sonucunda izole edilen SG-11 proteaz enzimi düşük ve yüksek sıcaklıklarda yüksek katalitik etkiye sahip termostabil özelliktedir.



Şekil 4.5. SG-11 Proteaz Enzimi Termal Stabilite Değerleri

Zhu ve ark (2009), *Penicillium chrysogenum* FS010'dan izole edilen proteaz enziminin 15-35°C aralığında nispeten yüksek katalitik aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir. Enzimin 0°C'de proteolitik aktivitesini %41 koruduğu bununla birlikte 60°C'de 5 dakikalık ön inkübasyon sonunda orijinal aktivitesini %90 kaybettiğini saptamışlardır.

Tang ve ark (2010), *Pseudomonas aeruginosa* PT121'den izole ettikleri enzimin 30-50°C sıcaklıklarda 1 saat inkübe edildiği zaman orijinal aktivitenin %90 korunduğunu belirlemişlerdir. Buna karşılık 60°C'de 1 saat ön inkübasyon gerçekleştirildiğinde kalan aktivitenin %25, 70°C'de ise %3 olarak ölçüldüğünü saptamışlardır.

Morita ve ark (1998), *Flavobacterium balustinum* P104 suşundan izole edilen CP-70 proteaz enziminin 60 dakika süreyle 30°C'ye kadar stabilitenin korunduğunu 40°C'de ise orijinal aktivitenin %40 kaybolduğunu bildirmişlerdir.

Joo ve ark (2000), *Periserrula leucophyra*'dan izole ettikleri enzimin 45°C'de 1 saat süreyle stabil olduğunu, sıcaklık 50°C'ye yükseltildiğinde ise stabilitenin 20 dakikalık inkübasyon sonunda önemli derecede azaldığını bildirmişlerdir.

Jinsong (2006), *Bacillus cereus* SYP-A2-3 suşundan izole edilen proteaz enziminin 10 dakika süreyle 45°C de aktivitesini %100 korurken, 50°C'de aktivitenin hızla düştüğünü, 60°C'de ise aktivitenin tamamen kaybolduğunu bildirmiştir.

SG-11 proteaz enzimi literatür verilerinden çok daha yüksek bir termostabilite göstermektedir.

4.6. Enzim Aktivitesi ve Stabilesine Farklı NaCl Konsantrasyonlarının Etkisi

SG-11 izole edilen proteaz enzimi %3, %5, %10, %15, %20, %25, %30, %35, %40'luk NaCl çözeltilerinde 37 °C' de 60 dakika ön inkübasyona bırakılmıştır. Standart enzim aktivitesi ölçülmüş olup kalan relatif enzim aktivitesi saptanmıştır.

Çizelge 4.4. Enzim Aktivitesine Farklı NaCl Konsantrasyonlarının Etkisi

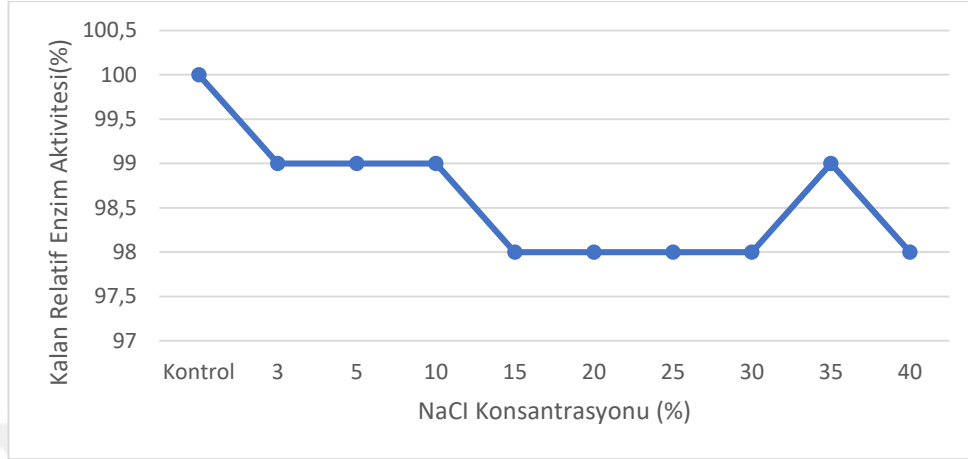
% NaCl	Ön. İnk. Sıc.	Ön İnk. Sür.	İnk. pH	İnk. Sıc.	İnk. Sür.	AB1	AB2	ABO	% Kalan Aktivite
Kontrol	37 °C	60dk.	5	70°C	60dk.	3.134	3.191	3.162	100
3	37 °C	60dk.	5	70°C	60dk.	3.129	3.158	3.143	99
5	37 °C	60dk.	5	70°C	60dk.	3.139	3.145	3.142	99
10	37 °C	60dk.	5	70°C	60dk.	3.199	3.146	3.132	99
15	37 °C	60dk.	5	70°C	60dk.	3.116	3.118	3.117	98
20	37 °C	60dk.	5	70°C	60dk.	3.131	3.116	3.123	98
25	37 °C	60dk.	5	70°C	60dk.	3.118	3.134	3.126	98
30	37 °C	60dk.	5	70°C	60dk.	3.117	3.130	3.123	98
35	37 °C	60dk.	5	70°C	60dk.	3.135	3.128	3.131	99
40	37 °C	60dk.	5	70°C	60dk.	3.123	3.108	3.115	98

Enzim aktivitesine farklı NaCl konsantrasyonlarının etkisinin araştırılması amacıyla %3-%40 NaCl çözeltileri kullanılarak 60 dakikalık ön inkübasyon işlemleri sonunda enzim önemli ölçüde stabilite göstermiştir.

Enzim tüm konsantrasyonlarda yaklaşık olarak %98 oranında stabil kalmıştır.

SG-11 suşundan izole edilen proteaz enzimi %3-%10 NaCl konsantrasyonlarında aktivitesini %99 oranında korumuştur. %15-%30 NaCl konsantrasyonlarında %98, %35 ‘de %99 ve %40’da %98 oranında enzim aktivitesi ölçülmüştür.

Farklı oranlarda NaCl konsantrasyonu ile işlem gören SG-11 suşundan izole edilen enzimin halofilik özellik gösterdiği kanıtlanmıştır.



Şekil 4.6. SG-11 Proteaz Enzimi Aktivitesine Farklı NaCl Konsantrasyonlarının Etkisi

Nedra ve ark (2007), *Bacillus licheniformis* NH1'den izole edilen enzimin 0.1, 1 ve 2M NaCl ile muamele edildiğinde aktivitenin 0.1M'da önemsenmeyecek kadar az düştüğünü buna karşılık 1M'da %44, 2M'da %6 inhibisyon gerçekleştiğini saptamışlardır.

Olivera ve ark (2006), *Bacillus patagoniensis* PAT 05T suşundan izole ettikleri enzimi sırası ile 0.3, 0.9 ve 2M NaCl ile muamele ettiklerinde %100, %86 ve %63 kalan aktivite saptadıklarını bildirmişlerdir. Literatürde soğukta aktif proteazlarda tuz toleransı ile ilgili bilgilerin çok sınırlı olduğu belirtilmiştir (Joo ve Chang, 2005).

Bhardwaj ve Satyanarayana (2005), *Bacillus* sp. MLB-2 suşundan izole edilen soğukta aktif proteaz enziminin %3 NaCl de %100, %5'de %100, % 7'de %72, %10'da %40 aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir.

Enzime ait veriler literatür bulgularından oldukça yüksektir. İzole edilen enzim tüm NaCl konsantrasyonlarında 60 dakika ön inkübasyon işleminden sonra ortalama %98 aktivite göstermekte ve aktivitesini koruması nedeniyle halofilik özelliğindedir.

4.7. Enzim Aktivitesine İnhibitör, Şelatör, Deterjan ve Metal İyonlarının Etkisi

Bacillus sp. SG-11 Proteaz enziminin metal iyonları, şelatör, inhibitör ve deterjanlar ile 37 °C sıcaklıkta 60 dk. ön inkübasyon işleminden sonra kalan enzim aktivitesi hesaplanmıştır. Kalan aktivite ile ilgili veriler Çizelge 4.6 Ve Şekil 4.7 'de gösterilmiştir.

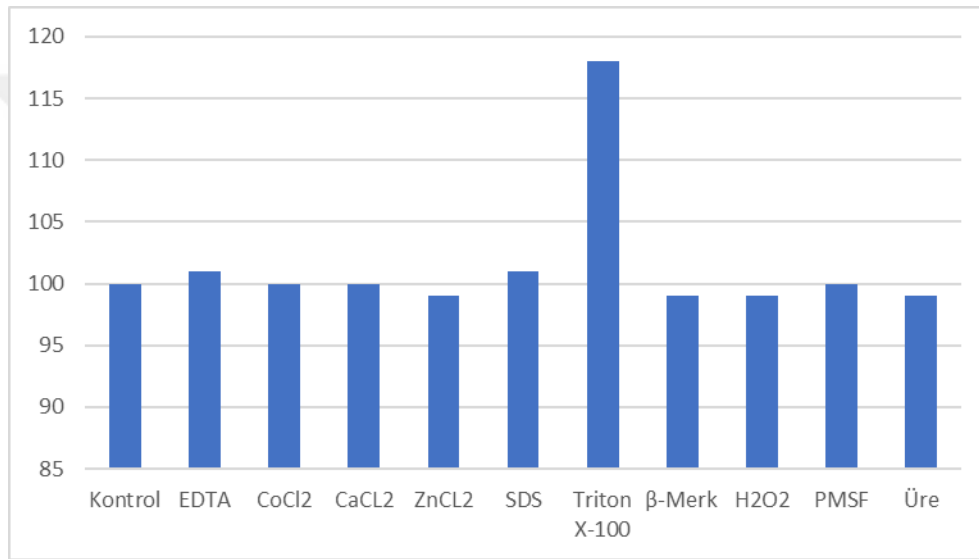
Çizelge 4.5. Enzim Aktivitesine İnhibitör, Şelatör, Deterjan ve Metal iyonlarının Etkisi

Bileşik	Konst.	Ön ink. Sür. Dk.	Ön ink. Sıc. °C	İnk. Sür. Dk.	İnk. Sıc. °C	AB1	AB2	AB0	%Kalan Aktivite
Kontrol	-	-	-	60 dk	70 °C	3.147	3.147	3.147	100
EDTA	10 Mm	60 dk	37 °C	60 dk	70 °C	3.168	3.201	3.184	101
CoCL ₂	10mM	60 dk	37 °C	60 dk	70 °C	3.146	3.166	3.156	100
CaCL ₂	10mM	60 dk	37 °C	60 dk	70 °C	3.145	3.149	3.147	100
ZnCL ₂	10mM	60 dk	37 °C	60 dk	70 °C	3.147	3.145	3.146	99
SDS	% 5	60 dk	37 °C	60 dk	70 °C	3.197	3.171	3.184	101
Triton X-100	% 5	60 dk	37 °C	60 dk	70 °C	3.664	3.796	3.73	118
B- Merk.	% 5	60 dk	37 °C	60 dk	70 °C	3.136	3.148	3.142	99
H ₂ O ₂	% 5	60 dk	37 °C	60 dk	70 °C	3.143	3.143	3.143	99
PMSF	3mM	60 dk	37 °C	60 dk	70 °C	3.143	3.155	3.149	100
Üre	10mM	60 dk	37 °C	60 dk	70 °C	3.129	3.126	3.127	99

SG-11 'den izole edilen proteaz enzimi kullanılan bileşiklerden hemen hemen etkilenmemiş, denemesi yapılan bazı bileşikler aktiviteyi artırmıştır. Kullanılan bileşikler incelendiği zaman 10 mM CoCL₂-10 mM CaCL₂ %100, 10mM ZnCL₂ % 99, %5 β-merkaptetanol-% H₂O₂ %99, 3mM PMSF %100 ve 10 mM Üre ile %99 oranında enzim aktivitesi tayin edilmiştir.

Enzim %5 Triton X-100 %118, 10 mM EDTA %101, , %5 SDS %101 kalan enzim aktivitesi elde edilmiştir. Triton X-100 ile kontrole göre %18 oranında indüklenmiştir. Her üç bileşikte enzim aktivitesini artırıcı yönde etki göstermiştir. Aktivitenin kontrole göre Triton X-100 'de %18, EDTA ve SDS' de %1 oranında arttığı saptanmıştır.

İnhibitör, Şelatör, Deterjan ve Metal iyonları



Şekil 4.7. Enzim Aktivitesine İnhibitör, Şelatör, Deterjan ve Metal iyonlarının Etkisi

Deng ve ark (2010), *Bacillus* sp. BOO1 suşundan izole edilen proteaz (AprB) enziminin 5mM PMSF, EDTA, β-merkaptotanol ve %1 H₂O₂ ile muamele edildiğinde sırasıyla %36, % 80, %108 ve %99 aktivite saptandığını bildirmişlerdir.

Olivera ve ark (2006), *Bacillus patagoniensis* suşundan izole edilen proteaz enzimin %1 SDS ile muamele edildiğinde orijinal aktivitesini yaklaşık % 73 koruduğunu saptamışlardır.

Farhadian ve arkadaşları (2015), *Bacillus subtilis* DR8806 suşundan izole ettikleri proteazının aktivitesinin 2-βmerkaptotanol'den etkilenmediğini bildirmiştir. Rehman ve arkadaşları (2017), 125 *Bacillus subtilis* KT004404

şusundan izole ettikleri proteazın aktivitesinin belirli oranlardaki SDS ve 2-β-mercaptoetanol etkisi altında aktivitesinin arttığı bildirilmiştir.

Uddin ve arkadaşları (2014), *Bacillus sp.* suşu proteazının aktivitesinin Mg²⁺ iyonu etkisi ile arttığını, Na⁺ ve K⁺ iyonları ve EDTA etkisi ile değişmediğini, Zn²⁺ etkisi ile azaldığını, 2-β-merkaptoetanol etkisi ile inhibe olduğunu saptamıştır. Chatterjee ve arkadaşları (2015), *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşu proteazının aktivitesinin EDTA ve SDS'ten etkilenmediğini saptamıştır.

Joo ve ark (2004), *Bacillus sp.* I-312'den izole ettikleri enzimin %5 H₂O₂ muameleden sonra % 87.5 kalan aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

(2006), *Bacillus cereus* SYP-A2-3 suşundan izole edilen proteaz enziminin 25°C'de 30 dakika inkübe edildiği zaman 1mM Zn, Fe, Mn, Mg, β-merkaptoetanol, üre, ve SDS kullanıldığında sırası ile %116, %112, %107, %106, %68, %101 ve %102 kalan aktivite elde edildiğini saptamıştır.

İzole edilen enzimin Triton X-100 ile %118 aktivite göstermesi enzimin aktif bölgesinde önemli miktarda sistin amino asitlerinin bulunduğunu göstermektedir.

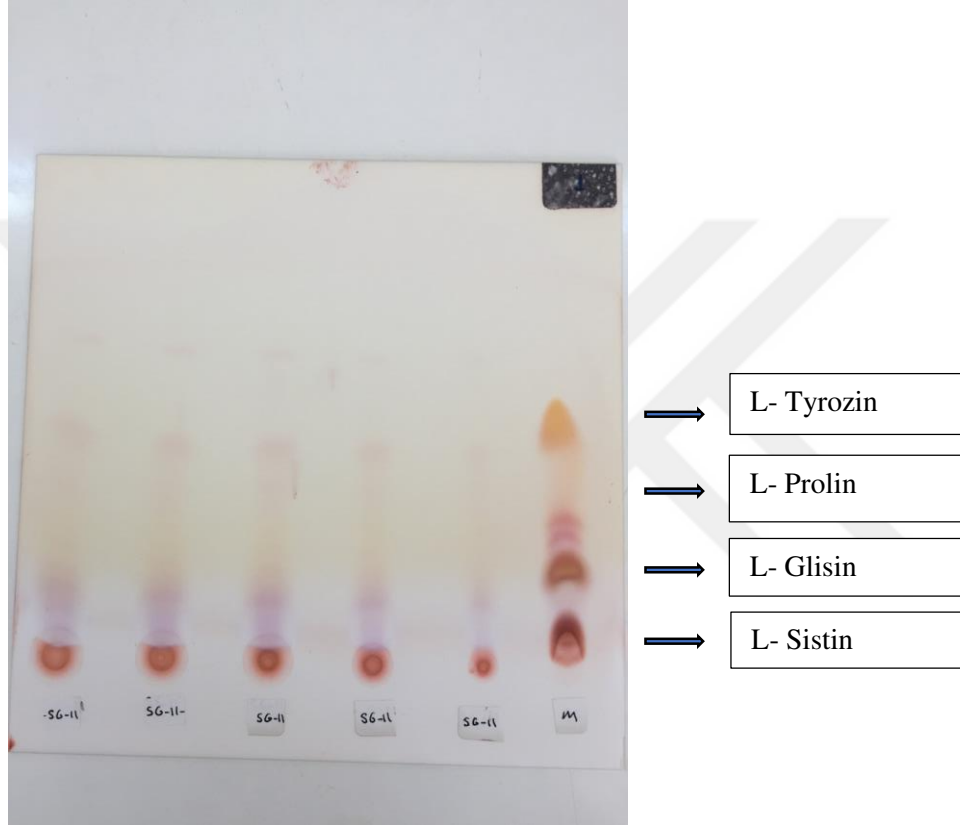
4.8. Enzimin İnce Tabaka Kromatografisi Sonuçları

Reaksiyon ürünlerinin saptanması amacı ile gerçekleştirilen TLC analizinde SG-11 proteaz enzimi kazeini çok sayıda amino aside hidroliz etmiştir. Marker amino asitlerle yapılan karşılaştırma sonunda kazeinin L-sistin, L-glisin, prolin ve tyrosine amino asitlerine hidroliz edildiği bulunmuştur..

Wei ve ark. (2012), *Bacillus cereus* Wu2 suşundan elde ettikleri keratinaz ile tüy keratinini optimum koşullarda muamele ettiklerinde lizin, metionin ve treonin gibi hidroliz ürünü oluştuğunu saptamışlardır.

Sangali ve ark (2000), *Vibrio sp.* suşundan elde ettikleri keratinaz ile tüy keratinini optimum koşullarda muamele ettiklerinde zengin miktarda serin, tirosin, lösin, alanin, glutamin ve az miktarda histidin ve metiyonin gibi hidroliz ürünü oluştuğunu saptamışlardır.

Enzimimizden elde edilen sonuçlar Wei ve ark. (2012),’nın bulguları ile karşılaştırıldığında SG-11 suşunun hidroliz aktivitesinin çok daha yüksek olduğu görülmektedir.



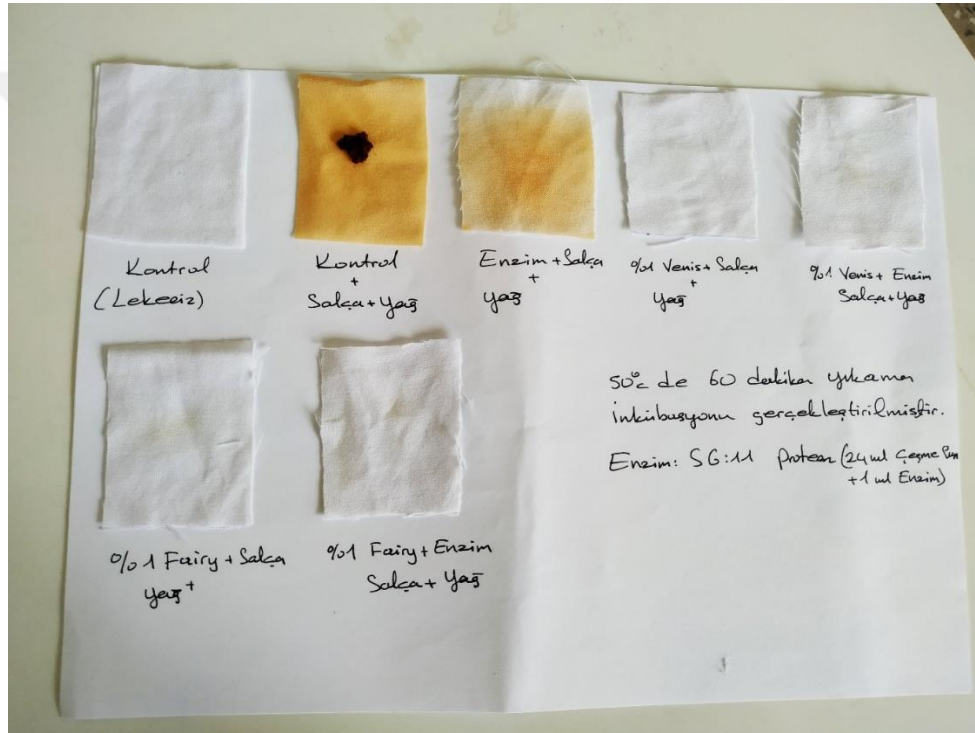
Şekil 4.8. TLC (İnce Tabaka Kromotografisi) analizi

4.9. SG-11 Proteaz Enzimi Yıkama Performansı Sonuçları

Bacillus sp. SG-11 suşundan elde edilen proteaz salça+yağ(zeytin yağı) ,bebek maması(Herobaby) ,kan, çikolata (Ülker), yemek sosunun neden olduğu lekeleri giderme yeteneği açısından performansını değerlendirmek için yıkama analizleri yapılmıştır ve test sonuçları Şekillerde gösterilmiştir.

Yıkama performansı 50°C sıcaklıkta 100 rpm hızda çalkalama yapılarak gerçekleştirilmiştir.

Yıkama performansının görsel olarak değerlendirilmesi için lekesiz kumaş, işlem görmemiş salça+yağ lekeli kumaş (kontrol), yalnızca enzim ile yıkanmış salça+yağ lekeli kumaş, yalnızca %1'lik Vanish deterjan ile yıkanmış salça+yağ lekeli kumaş, %1 Vanish deterjan ve enzim karışımı ile yıkanmış salça+yağ lekeli kumaş, yalnızca %1 'lik Fairy deterjan ile yıkanmış salça+yağ lekeli kumaş ve %1'lik Fairy deterjan ve enzim karışımı ile yıkanmış kumaş değerlendirilmiştir.



Şekil 4.9. *Bacillus sp.* SG-11 Enziminin Salça-Yağ Lekesine Karşı Gösterdiği Yıkama Performansı

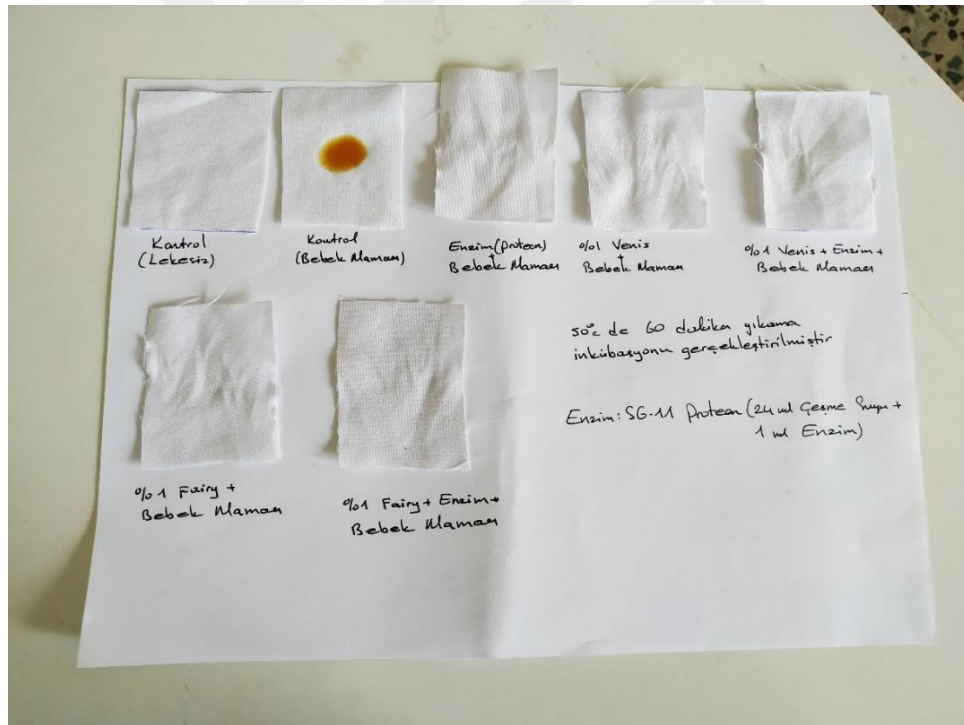
Salça+yağ ile muamele edilen kumaş SG-11 suşundan elde edilen enzim ile yıkandığında işlem görmemiş salça+yağ lekeli kumaşa göre % 50 oranında leke giderimi sağladığı görülmüştür.

Salça+yağ ile kirlenmiş kumaş %1 Vanish ve %1 Fairy deterjan ile yıkanan kumaşlar işlem görmemiş kumaşa göre %90 oranında leke giderme performansı göstermiştir.

Salça+yağ ile kirlenmiş kumaş %1 Vanish+enzim, %1 Fairy+enzim karışımı ile yıkandığında işlem görmemiş kumaşa göre %95 oranında leke giderme performansı göstermiştir.

SG-11 suşundan elde edilen proteaz enzimi salça+yağ lekesi gidermede diğerlerine oranla daha az leke giderimi gerçekleştirmiştir.

Deterjan katkısı olarak kullanılmak istendiğinde SG-11 suşundan elde edilen proteaz enzimi salça+yağ lekesi gibi zor leke gideriminde diğer enzimler ile kullanıldığında leke gidermede tam performans gösterebilir.

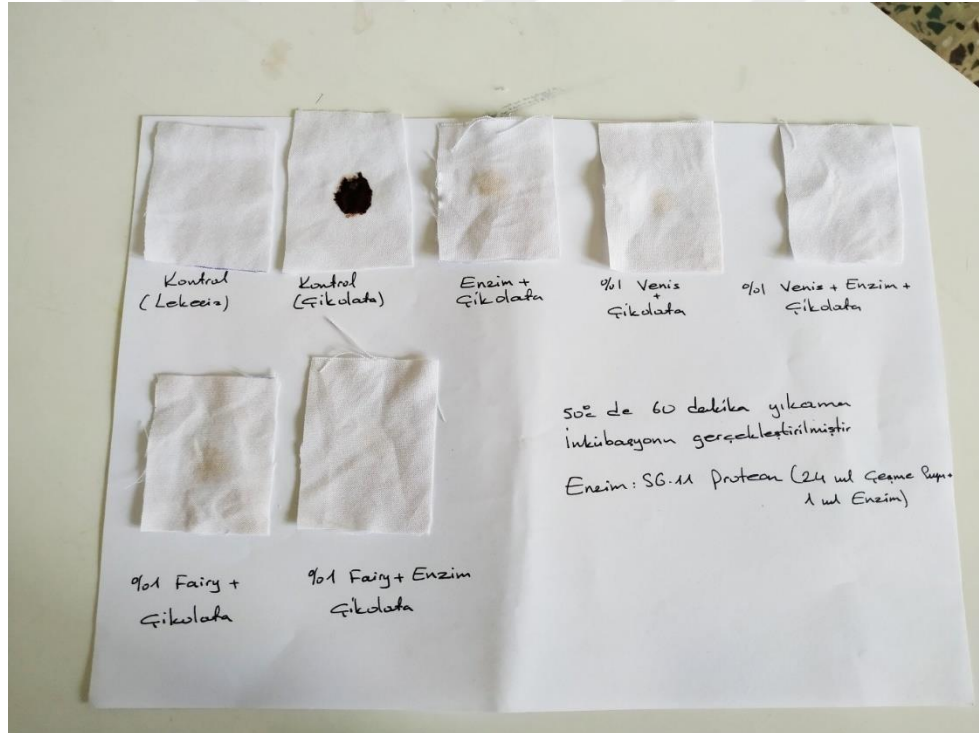


Şekil 4.10. *Bacillus sp.* SG-11 Enziminin Bebek Maması Lekesine Karşı Gösterdiği Yıkama Performansı

Bebek maması ile kirletilmiş kumaşların leke giderimi %100 'e yakın performans göstermiştir.

Bebek mamaları farklı sebze ve meyvelerin karıştırılıp püre halinde ezilmesiyle elde edilip satışa sunulmaktadır. Bebeklerin giysilerinin yıkanırken hijyen açısından ve giysilerin farklı lekelerle kirlenmesinden dolayı ebeveynler tarafından yüksek yıkama sıcaklıkları tercih edilmektedir.

Yapılan yıkama performans denemelerinde ve literatür karşılaştırmasında gündelik yiyeceklerle kirlenen kumaşların temizlenmesinde deterjan katkısı olarak kullanılabileceği açıkça görülmüştür.

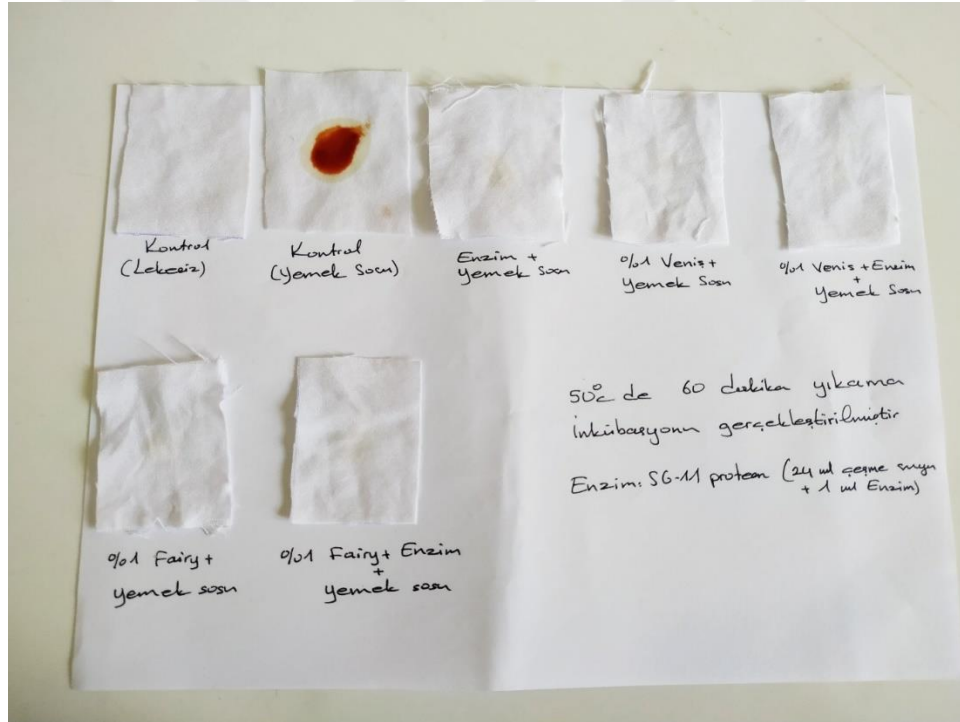


Şekil 4.11. *Bacillus sp.* SG-11 Enziminin Çikolata Lekesine Karşı Gösterdiği Yıkama Performansı

Çikolata ile kirletilmiş kumaşların %1 Vanish+enzim ve %1 Fairy+enzim ile leke giderimi çikolata ile kirletilmiş kumaşa göre %100'e yakın oranda leke giderimi sağladığı görülmüştür.

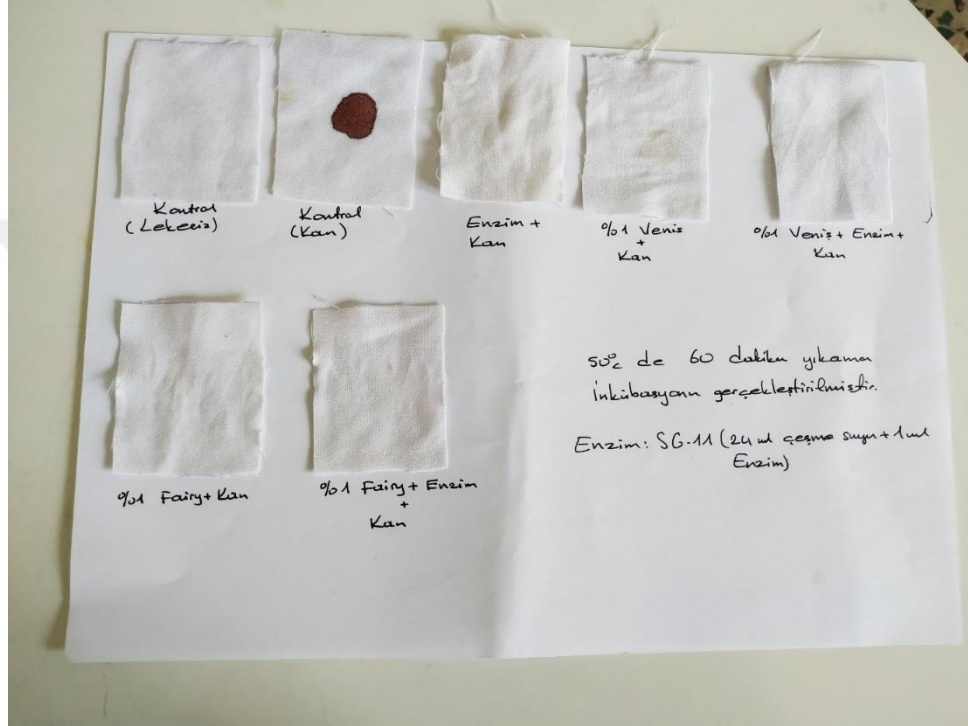
Yalnız SG-11 suşundan elde edilen proteaz enzimi ile çikolata lekesinde yalnız % 1'lik deterjanların kullanıldığı denemeye göre daha az leke giderimi olduğu görülmüştür.

Deterjan katkısı olarak kullanılmak istendiğinde SG-11 suşundan elde edilen proteaz enzimi çikolata lekesi gibi zor bir lekenin giderilmesinde belirtilen deterjanlarla kullanıldığında tam giderme etkisi gösterebilir.



Şekil 4.12. *Bacillus sp.* SG-11 Enziminin Yemek Sosu Lekesine Karşı Gösterdiği Yıkama Performansı

Yemek sosu ile kirletilmiş kumaşların yalnız enzim,%1 Vanish-Fairy, %Vanish-Fairy+enzim ile yıkanan kumaşlar kontrole göre %100 leke giderimi sağlamıştır.



Şekil 4.13. *Bacillus sp.* SG-11 Enziminin Kan Lekesine Karşı Gösterdiği Yıkama Performansı

Kan ile kirletilmiş kumaşlarda SG-11 suşundan elde edilen proteaz enzimi ile yıkanan kumaş %1 Vanish-Fairy+enzim karışımı ile yıkanan kumaşlarla karşılaştırıldığında enzim tek başına %95 oranında leke giderimi sağlamıştır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin yüksek olması nedeniyle, endüstriyel enzimlerle ilgili alanda yapılan çeşitli araştırmalar, giderek daha da önem kazanmaktadır (Gözükara, 2009).

Enzimler, canlılar tarafından sentezlenen protein yapısında ve kimyasal reaksiyonların meydana gelmesinde rol alan kompleks organik moleküllerdir.

Enzimler, binlerce yıldır içecek, ekmek ve peynir yapımı gibi işlemlerde varlığı ve görevi bilinmeden kullanılmıştır (Uhlig, 1998).

Biyokimyasal çeşitlilikleri ve genetik uygulamalara elverişli olmaları nedeniyle endüstriyel alanda kullanılan enzimlerin yaklaşık %90'ı mikroorganizmalardan üretilmektedir (Rao ve ark, 1998; Wolfgang, 2004).

Bunun nedeni, katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, ekstrem koşullarda aktivite gösterebilmeleri ve büyük boyutlarda üretilibilmeleridir. Endüstride yaygın şekilde kullanılan enzimler arasında *Bacillus* cinsine ait tür ve alttürleri tarafından sentezlenen ondan fazla enzim vardır. *Bacillus sp.* suşları, proteolitik enzimler ve karbohidratazların önemli bir kaynağını oluşturmaktadırlar.

Ekstremofil organizmalar termofil ve psikrofil sıcaklık değerleri, ekstrem pH, yüksek tuz konsantrasyonu ve yüksek basınç gibi çok farklı ekolojik koşullara uyum sağlamışlardır. Bu mikroorganizmalar, üreyebildikleri her koşulda fonksiyonel olan biyokatalistik ürünler sentezlemektedirler. Bu ürünler arasında amilaz, pullulanaz, selüloz, ksilanaz, kitinaz, proteazlar, esterazlar, glikoizomerazları saymak mümkündür.

Sentezlenen enzimler gıda, tekstile, ekmek üretimi, deterjan, çeşitli içecekler, deri işlemleri, biyoremediasyon, yenilenebilir enerji kaynaklarından alkol üretimi, kozmetik alanı, kiral bileşiklerin sentezi gibi kimya ve farmasötik

alanında dahil olduğu çok yaygın bir yelpazede kullanım alanı bulmuşlardır (Niehaus ve ark, 1999).

Bacillus türleri çeşitli kompleks substratlara karşı aktivite gösteren çok sayıda ve çeşitli hidrolitik enzimler üretmekte ve salgılamaktadırlar. Bu nedenle *Bacillus*cinsindeki organizmalar, endüstriyel alanda α -amilaz, proteaz, glukonaz, glukoz izomeraz ve ksilanaz gibi enzimlerin üretiminde yaygın şekilde kullanılmaktadırlar (Uhlir, 1998).

Alkali koşullarda yaşayan bahçe toprağı gibi normal çevresel ortamlardan izole edilebileceğı gibi, yüksek alkalik özellik gösteren topraklardan da izole edilebilirler. Alkalik selüloz, alkalik proteaz ve alkalik amilaz gibi alkalofilik organizmalardan izole edilen enzimler, özellikle deterjan katkı maddesi şeklinde yaygın bir kullanıma sahiptirler. Dünyada üretilen toplam alkalifilik enzimlerin %30'dan fazlası deterjanlarda kullanılmaktadır (Horikoshi, 1996; Rao ve ark, 1998; Igarashi ve ark, 1998; Kumar ve Takagi, 1999).

Proteaz enzimlerinin asıl kullanım alanları çamaşır makinaları, bulaşık makinaları ve endüstriyel temizleme işlemleridir. Çamaşır deterjanlarında çim, kan, gıda ve insan teri gibi protein içeren kirliliklerin temizlenmesi amacıyla kullanılır.

Deterjanda kullanılan proteaz enziminin performansı deterjanın pH'sı, iyonik gücü, yıkama sıcaklığı, deterjanın bileşimi, kullanılan ağartıcı gibi çeşitli faktörlere bağılı olarak değişiklik gösterir. Bu nedene kullanılan enzimin deterjandaki stabilitesi performansta anahtar rol oynamaktadır (Beq ve Gupta, 2003).

Proteazlar üç büyük endüstriyel enzim grubundan biri olup, dünya genelinde satılan endüstriyel enzimlerin %60 ını oluşturmaktadırlar (Bassem ve ark, 2008).

Proteazların kullanım alanları oldukça geniştir. Tekstil, gıda, deri, deterjan ve kozmetik endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Kirletici sektörlerden biri olan deri sektöründe geleneksel yöntem olarak adlandırılan ve kireç, zırnık (Sodyum sülfür, Na₂S) gibi kimyasal maddeler kullanılarak yapılan kıl giderimi işlemi, deri üretimi kaynaklı kirliliğinin ortama olarak %80-90'ına sebep olduğu için üretimin en kirletici aşaması olarak kabul edilmektedir. Diğer yandan kullanılan kimyasallar deri

sektöründe çalışanlar için ciddi sağlık problemlerine neden olmaktadır. Bu olumsuz durumlar son yıllarda kimyasal işlemler yerine enzimatik işlemlerin tercih edilmesine neden olmuştur. Deri işlemede en önemli enzim grubu proteazlardır (Sanghi ve Singh 2012).

Proteaz enzimleri, tekstil materyalindeki proteinli bileşiklerin uzaklaştırılması çalışmalarında enzimatik olmayan deterjanların yetersiz kalmaları nedeniyle deterjan endüstrisinde en fazla kullanılan enzimlerdir. Cold aktif proteazların kullanımı fosfat içermeyen deterjanlar ile uyumlu olması ve temizleme kapasitelerinin çok yüksek olması nedeniyle hızla yaygınlaşmaktadır. Temizleme kapasitesinin yüksek olmasının yanı sıra, düşük sıcaklıklarda yıkamaya uygun olması ve yıkama süresinin kısalığı enerji tasarrufu ile doğrudan ilişkilidir (Margesin ve Schinner, 1994).

Cold aktif enzimlerin en önemli grubunu düşük termal stabiliteleri ve düşük sıcaklıkta yüksek katalitik aktivite göstermeleri nedeniyle proteazlar oluşturmaktadır.

Cold aktif proteaz enzimi bu özelliği nedeniyle temizlik deterjanları, deri işlemleri, gıda endüstrisi ve moleküler biyoloji gibi çok farklı alanlarda kullanılmaktadırlar (Wang ve ark, 2008). Örneğin Novozim firması savinaz markası ile enkapsüle deterjan enzimi üretmektedir.

Düşük sıcaklıklarda proteinleri hızlı şekilde parçalayan mikroorganizmalar yoğun protein kirliliği içeren atıksuların arıtılmasında oldukça önemlidir (bu tür atık suların drenaj sıcaklıkları yaklaşık 5°C -25°C aralığındadır (Joshi ve ark, 2007).

Çalışmada izole edilen toplam 21 adet *Bacillus sp.* içerisinde 6 adedi optimum üreme ve aktivite göstermiştir. Enzim üretimi amacı ile proteaz pozitif *Bacillus sp.* SG-11 suşu kullanılmıştır.

Bacillus sp. SG-11 suşundan izole edilen proteaz enzimi optimum aktivitesini pH 5.0 ve 70 °C'de göstermiştir. Test edilen bütün pH'larda (pH 4.0-10.0) enzim aktivitesi ortalama %96.80 düzeyinde gerçekleşmiştir.

Enzim asidik ve alkali pH aralığında aktivite göstermekte olup pH 4.0 %95 aralığında, pH 5.0 %100 aralığında, pH 6.0-10.0'da yaklaşık %, pH 96.6 aralığında aktivite değeri elde edilmiştir.

Wang ve ark (2008), *Pseudoalteromonas* NJ276 suşundan ekstraselüler coldaktif proteaz, izolasyonunu gerçekleştirmişler ve enzimin optimum pH 5-12 arasında aktivite gösterdiğini belirtilmiştir.

Bacillus sp. SG-11 suşundan izole edilen enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değeri literatür verilerinden (Wang ve ark, 2008; Nedra ve ark, 2007) hemen hemen aynı düzeydedir.

Aktivite değerinin pH yükseldikçe giderek artması izole edilen enzimin ekstrem alkali özellikte olduğunu göstermektedir. Enzimin yüksek alkali aktivite değerine sahip olması ise özellikle deterjan uygulamaları için ideal olduğunu göstermektedir.

İzole edilen *Bacillus* sp. SG-11 proteaz enzimi aktivite ölçümü optimum aktivitesini 70°C'de gösterirken, yapılan bütün sıcaklık değerlerinde ortalama %98 relatif aktivite değeri elde edilmiştir.

İzole elden enzim 20°C'de %98 aktivite değerine sahiptir. Özellikle 20 °C'de %98 düzeylerinde aktivite elde edilmesi soğukta aktif enzimler için karakteristik olup, çok yüksek bir katalitik aktiviteyi göstermektedir.

Joshi ve ark (2007), *Bacillus cereus* MTCC 6840 suşundan izole edilen proteaz enziminin optimum aktivitesini pH 9.0 ve 20°C'de gösterdiğini belirtmişlerdir. Bununla birlikte enzimin 15°C'deki relatif aktivitesinin %82 olduğunu bulmuşlardır.

Jinsong ve ark (2006), *Bacillus cereus* SYP-A2-3 suşundan izole edilen proteaz enziminin 0°C'de %6, 25°C'de %60 relatif aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir.

Düşük sıcaklıktaki bu özelliğin soğukta adaptif enzimler için karakteristik olduğu bildirilmiştir.

Bacillus sp. SG-11 suşundan izole edilen proteaz enzimine ait veriler (sırası ile 20°C ve 50°C 'de %98, 30°C-40°C-60°C-90°C-100°C 'de %99 ve 70 °C 'de %100 relatif aktivite) literatür bulguları ile karşılaştırıldığı zaman düşük ve yüksek sıcaklıklarda katalitik aktivitenin çok daha yüksek olduğu görülmektedir.

Enzim bu özellikleri ile soğukta aktif karakter göstermekte olup literatür verilerinden daha yüksek aktiviteye sahiptir.

Asidik *Bacillus sp.* SG-11 suşundan izole edilen proteaz enzimi 37°C'de pH 4.0-10.0 aralığındaki farklı pH'larda 24 saat süreyle ön inkübasyona bırakıldığı zaman, bütün pH aralığında ortalama %94 oranında orijinal aktivitesini koruyarak stabil kalmıştır. En yüksek stabilite değeri %94.37 ile pH 9.0 ve 37°C'de elde edilmiştir.

Jinsong ve ark (2006), *Bacillus cereus* SYP-A2-3 suşundan izole edilen proteaz enziminin 4°C'de 24 saat inkübe edildiği zaman, pH 6.0-9.5 aralığında orijinal aktivitesini yaklaşık %89 oranında koruduğunu saptamışlardır.

Venugopal ve Saramma (2007), *Bacillus circulans* BM15 izole ettikleri enzimin 1 saat süreyle pH 7.0-11.0 arasında stabilitesini koruduğunu, pH 11.0'ın üzerinde ise stabilitenin %50 azaldığını saptamışlardır.

Asidik *Bacillus sp.* SG-11 suşundan izole edilen proteaz enzimine ait sonuçlar enzimin geniş bir pH aralığında (pH 4.0-10.0) 24 saat süreyle yüksek düzeyde stabil kaldığını göstermektedir. Elde edilen bulgular literatür değerlerinden oldukça yüksek olup pH stabilitesinin uygulamadaki önemi dikkate alındığında çok farklı alanlarda kullanılma potansiyeline sahiptir.

Mikrobiyal orijinli alkaline proteaz enzimleri gıda endüstrisi, farmakolojik formülasyonlar, deterjanlar, atıksu arıtma, gümüşün geri kazanımı ve aminoasit karışımlarının saflaştırılması gibi endüstriyel alanlardaki uygulamaları ve biyokimyasal özellikleri nedeni ile önemli endüstriyel potansiyele sahiptirler.

Yılda yaklaşık 13 milyar ton alkaline proteaz enzimi ev deterjanlarında kullanılmak üzere üretilmektedir (Nehra ve ark, 2002).

Asidik *Bacillus* sp. SG-11 suşundan izole edilen proteaz enzimi 20°C-150°C aralığındaki sıcaklık değerlerinde 60 dakika süreyle ön inkübasyona bırakılmış ve bütün sıcaklık değerleri için ortalama %76 stabil kalmıştır. En yüksek kalan enzim aktivitesi %101 ile 140°C de elde edilirken, en düşük %94 ile 150°C de saptanmıştır.

Jinsong (2006), *Bacillus cereus* SYP-A2-3 suşundan izole edilen proteaz enziminin 10 dakika süreyle 45°C'de aktivitesini %100 korurken, 50°C'de aktivite hızla düştüğünü, 60°C'de ise aktivitenin tamamen kaybolduğunu bildirmiştir. İzole asidik proteaz enzimine ait termal stabilite değerleri literatür verileri ile karşılaştırıldığında oldukça geniş bir aralıkta (20°C-150°C aralığında yaklaşık %76.28) çok yüksek bir stabiliteye sahiptir.

Asidik *Bacillus* sp. SG-11 proteaz enzimi %3, %5, %10, %15, %20, %25, %30, %35, % 40 NaCL kullanılarak 60 dakika süreyle 37°C'de ön inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiş ve bütün konsantrasyonlarda ortalama %98.44 kalan aktivite değeri elde edilmiştir.

Olivera ve ark (2006) ,*Bacillus patagoniensis* PAT 05T suşundan izole ettikleri enzimi sırası ile 0.3, 0.9 ve 2M NaCl ile muamele ettiklerinde %100, %86 ve %63 kalan aktivite saptadıklarını bildirmişlerdir.

Bhardwaj ve Satyanarayana (2005), *Bacillus* sp. MLB-2 suşundan izole edilen cold aktif proteaz enziminin %3 NaCl'de %100, %5'de %100, % 7'de %72, %10'da %40 aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir.

Asidik *Bacillus* sp. SG-11 suşundan izole edilen proteaz enziminin farklı NaCl konsantrasyonlarıyla elde edilen yüksek stabilite değerleri literatüre önemli bir katkı yapacak niteliktedir.

Literatürde cold aktif proteazlarda tuz toleransı ile ilgili bilgilerin çok sınırlı olduğu belirtilmiştir (Joo ve Chang, 2005).

Asidik *Bacillus* sp. SG-11 suşundan izole edilen proteaz enzimi farklı konsantrasyonlarda inhibitör, metal iyonu, şelatör ve deterjan 37°C'de 60 dakika süreyle muamele edilmiştir. Aktivite analizi sonunda sırası Triton X-100, SDS ve

EDTA kullanıldığında enzim aktivitesi uyarılarak %118, %101 ve %101 kalan aktivite elde edilmiştir.

Anandharaj ve arkadaşları (2016), *Bacillus alkalitelluris* TWI3 suşu proteazının aktivitesinin Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} iyonları ile artarken, Zn^{2+} , K^{+} , Fe^{2+} iyonları ile azaldığını, EDTA ile tamamen inaktive olduğu bildirmiştir.

Singh ve arkadaşları (2017), *Bacillus subtilis* K-1 suşu proteazının aktivitesinin Ca^{2+} iyonu ile arttığını, K^{+} , Mg^{2+} , Na^{+} , Mn^{2+} ile değişmediğini, Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} etkisiyle azaldığını rapor etmiştir. Buna ek olarak enzimin PMSF etkisiyle inhibe olduğunu, EDTA ve SDS'in ise aktiviteyi çok az bir miktar azalttığını rapor etmiştir.

Si ve arkadaşları (2018), *Bacillus subtilis* FBL-1 suşunun proteazının Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} , K^{+} iyonları etkisi ile aktivitesinin arttığını, EDTA etkisi ile tamamen inhibe olduğunu saptamıştır. Buna ek olarak aktivitesinin SDS ve 2- β -merkaptoetanol etkisi ile azaldığı rapor edilmiştir.

Rehman ve arkadaşları (2017), *Bacillus subtilis* KT004404 suşunun proteazının aktivitesinin SDS ve 2- β -merkaptoetanol kullanımı arttığını rapor etmiştir.

Literatürde cold aktif alkali proteaz enzimi ile yapılan çalışmalarda β -merkaptoetanol ile %99 (Deng ve ark, 2010), Üre ile %99 (Jinsong,2006), kalan aktivite elde edildiği saptanmıştır.

Enzim aktivitesinin β -merkaptoetanol ile sitümüle olması enzimin tiol grupları içerdiğini göstermektedir.

İzole edilen asidik proteaz enzimi PMSF ile %0, CaCl_2 ile %0, ZnCl_2 ile %1, H_2O_2 ile %1, Triton x-100 ile %0 ve SDS ile %0 oranında inhibe olmuştur. Bu sonuçlar enzimin oldukça kompleks bir yapıya sahip olduğunu ve metaller ile güçlü bir etkileşim gösterdiğinin göstergesidir.

Joo ve ark (2004), *Bacillus sp.* suşundan izole edilen çamaşır suyuna dirençli alkaline proteaz enziminin %1 H₂O₂ ile muamele edildiğinde %91 kalan aktivite saptandığını belirtmişlerdir.

Enzimin H₂O₂ ve Triton x-100'e dirençli olması sürfaktan ve okside edici ajanlardan etkilenmediğini, bu nedenle özellikle H₂O₂ kullanılan testil, kağıt endüstrisi ve deterjan endüstrisi gibi alanlarda önemli bir uygulama potansiyeli olduğu düşünülmektedir. Litratürde (Joshi ve ark, 2007), Deterjan proteazlarının sahip olması gereken özellikleri arasında sıcaklık ve pH stabilitelerinin yanı sıra, yüzey aktif bileşikler bulunduğu da inhibe olmadan çalışabilmesinin oldukça önemli olduğunu belirtmişlerdir.

Joo ve Chang (2005), *Bacillus clausii* I-52 suşundan izole edilen enzimin %1 SDS ile 4°C'de 2 saat inkübe edildiği zaman orijinal aktivitenin %25 kaybolduğunu, Mn ve Ca ile %58, ve %92 korunduğunu saptamışlardır.

İzole edilen enzime ait sonuçlar özellikle metal iyonları dikkate alındığında literatür ile büyük benzerlik göstermektedir.

Bacillus sp. SG-11 suşundan izole edilen asidik proteaz enziminin karakterizasyon sonuçları incelendiği zaman;

1. Enzim özellikle yüksek pH değerlerinde olmak üzere pH 4.0-10.0 aralığında oldukça yüksek bir katalitik aktivite ve stabilite göstermiştir. Asidik ve Alkaline aralıkta aktif ve 24 saat süreyle yüksek düzeyde stabil olması enzimin özellikle deterjan endüstrisinde yeni formülasyonların oluşturulmasında kullanılma potansiyelini ön plana çıkarmaktadır.
2. İzole edilen enzimin düşük sıcaklık değerlerinde (20°C'de yaklaşık %97 relatif aktivite göstermesi) oldukça yüksek katalitik aktivite değerine sahip olması ve optimum aktivite sıcaklığının 70°C'de olması bir çok alanda kullanılma potansiyeli yaratmaktadır.

Günümüzde özellikle enerji tasarrufunun ön plana çıktığı uygulamalarda (gıda işletmeleri, özellikle deterjan ve biyoremediation gibi bazı endüstriyel uygulamalarda potansiyel öneme sahiptir) oldukça yaygın bir kullanımı söz konusu olacaktır.

3. Çeşitli deterjan ve okside edici bileşiğe karşı dirençli olması farklı endüstriyel alanda (kağıt, tekstil ve deterjan gibi) kullanılma potansiyelini artırmaktadır.

Lakshmi ve ark. (2018), *Bacillus cereus* suşu S8 (MTCC NO 11901) tarafından üretilen alkalın serin proteazın aktivitesinin spesifik bir substrat olan kazein ile pH ve sıcaklığa karşı yüksek stabilite gösterdiğini ifade etmişlerdir.



KAYNAKLAR

- Adinarayana, K., Ellaiah, P., Prasad, D.S. 2003. Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* PE-11. *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 4(4): 440-448.
- Aehle, W. 2006. *Enzymes in industry: products and applications*. 2nd, Completely revised edition, John Wiley & Sons, New Jersey, USA, 508 pp.
- Afşar, A., Gülümser, G., Mutlu, M.M., Özgünay, H. 2003. Enzimatik etki ile kromlu derilerdeki kırıxıklıkların giderilmesi ve işlemin dayanım özellikleri üzerine etkilerinin araştırılması. *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 40(2): 137-144.
- Agasthya, A.S., Sharma, N., Mohan, A., Mahal, P. 2013. Isolation and molecular characterisation of alkaline protease producing *Bacillus thuringiensis*. *Cell Biochem. Biophys.*, 66: 45-51.
- Ahmetoglu, N., Bekler, F., Acer, O., Guven, R., Guven, K. 2015. Production, purification and characterisation of thermostable metallo-protease from newly isolated *Bacillus* sp. KG5. *Eurasia J. Biosci.*, 9: 1-11.
- Akın, N. 2003. Peynirin olgunlaşmasında enzimlerden kaynaklanan proteoliz. *Gıda ve Yem Bilimi-Teknolojisi Derg.*, 3: 37-45.
- Alfa, M.J., Jackson, M. 2001. A new hydrogen peroxide-based medical device detergent with germicidal properties: comparison with enzymatic cleaners. *Am. J. Infect. Control.*, 29(3): 168-177.
- Ali, N., Ullah, N., Qasim, M., Rahman, H., Khan, S.N., Sadiq, A., Adnan, M. 2016. Molecular characterization and growth optimization of halo-tolerant protease producing *Bacillus subtilis* Strain BLK-1.5 isolated from salt mines of Karak, Pakistan. *Extremophiles*, 20: 395-402.
- Anandharaj, N., Sivasankari, B., Siddharthan, N., Rani, R.P., Sivakumar S. 2016. Production, purification, and biochemical characterization of thermostable metalloprotease from novel *Bacillus alkalitelluris* TWI3 isolated from tannery waste. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 178: 1666-1686.

- Annamalai, N., Rajeswari, M.V., Balasubramanian, T. 2014. Extraction, purification and application of thermostable and halostable alkaline protease from *Bacillus alveyuensis* CAS 5 using marine wastes. *Food Bioprod. Process.*, 92: 335-342.
- Anonim, 1994. Detergents 'are bad for health and environment'. <https://www.independent.co.uk/news/uk/detergents-are-bad-for-health-and-environment-study-says-people-wash-clothes-too-often-1422265.html>-(Erişim tarihi: 24.01.2020).
- Anonim, 1999. Affirmation of GRAS status as direct food ingredients. <https://www.govinfo.gov/content/pkg/FR-1999-04-23/pdf/99-10011.pdf>-(Erişim tarihi: 04.12.2019).
- Anonim, 2015a. De-hairing hide without polluting. <https://www.downtoearth.org.in/news/dehairing-hide-without-polluting-30007>-(Erişim tarihi: 28.11.2019).
- Anonim, 2018. Global enzymes market expected to reach \$10,519 Million by 2024. <https://www.prnewswire.com/news-releases/global-enzymes-market-expected-to-reach10-519-million-by-2024-898959866.html>-(Erişim tarihi: 12.12.2019).
- Anonim, 2019a. Enzymes market by type (protease, carbohydrase, lipase, polymerases and nucleases, and other types), by source, by reaction type, by formulation, by application, and segment forecasts, 2017-2026. <https://www.reportsanddata.com/reportdetail/enzymes-market>-(Erişim tarihi: 11.12.2019).
- Anonim, 2019f. <https://www.marketsandmarkets.com/market-reports/feed-enzymemarket-1157.html>-(Erişim tarihi: 29.05.2019).
- Anonim, 2020a. Industrial enzyme market-growth, trends, and forecast (2020-2025). <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/industrial-enzymes-market>-(Erişim tarihi: 17.07.2020).

- Anonim, 2020b. <https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/rules.html>-(Erişim tarihi: 27.05.2020).
- Anonim,2019b. Leather manufacturing. <https://www.satara.com/spotlight/article.php?id=194>-(Erişim tarihi: 05.12.2019).
- Anwar, A., Saleemuddin, M., 1998. Alkaline proteases: a review., *Bioresource Technology*, 64: 175-183.
- Arshad, Z.I., Amid, A. 2014. Bromelain: an overview of industrial application and purification strategies. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 98(17): 7283-7297.
- Arunachalam, C., Saritha, K. 2009. Protease enzyme: an eco-friendly alternative for leather industry. *Indian Journal of Science and Technology*, 2(12): 29-32.
- Aylangan, A., Öztan, A. 2008. Hayvansal gıda sanayisi yan ürünleri kullanılarak protein hidrolizatları üretimi. *Türkiye 10. Gıda Kong.* 21-23 Mayıs 2008, Erzurum.
- Babe, L.M., Craik, C.S. 1997. Viral proteases: evolution of diverse structural motifs to optimize function. *Cell*, 91: 427-430.
- Balasubramanian, S., Pugalenth, V., 2000. A comparative study of the determination of sulphide in tannery waste water by ion selective electrode (ISE) and iodimetry. *Water Res.*, 34: 4201-4206.
- Barrett, A J., McDonald, J.K. 1986. Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. *Biochem. J.*, 237(3): 935.
- Barrett, A., Rawlings, N., Woessner, J. 2012. *Handbook of proteolytic enzymes*, 3rd Edition. Elsevier, Academic Press, London, UK, 4094 pp.
- Bashir, F., Asgher, M., Hussain, F., Randhawa, M.A. 2018. Development and characterization of cross-linked enzyme aggregates of thermotolerant alkaline protease from *Bacillus licheniformis*. *Int. Journal of Biological Macromolecules*, 113: 944-951.

- Beg, Q.K., Gupta, R. 2003. Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 32(2): 294-304.
- Belmessikh, A., Boukhalfa, H., Mechakra-Maza, A. 2013. Statistical optimization of culture medium for neutral protease production by *Aspergillus oryzae*, Comparative study between solid and submerged fermentations on tomato pomace. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*, 44: 377-385.
- Bergmann, M., Ross, W.F. 1936. *J. Biol. Chem.*, 114: 717-726.
- Bhat, Z.F., Kumar, S., Bhat, H.F. 2015. Bioactive peptides of animal origin: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(9): 5377-5392.
- Borsa, B.A., Aldağ, M.E., Tunalı, B., Dinç, U., Dalar, Z., Özalp, V.C. 2016. Nadir görülen fırsatçı patojen *Bacillus pumilus*'un neden olduğu bir sepsis olgusu. *Mikrobiyol Bul.*, 50(3): 466-470.
- Bougatef, A., Balti, R., Haddar, A., Jellouli, K., Souissi, N., Nasri, M. 2012. Protein hydrolysates from Bluefin Tuna (*Thunnus thynnus*) heads as influenced by the extent of enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 17: 841-852.
- Brandelli, A., Sala, L., Kalil, S.J. 2015. Microbial enzymes for bioconversion of poultry waste into added-value products. *Food Research International*, 73: 3-12.
- Briki, S., Hamdi, O., Landoulsi, A. 2016. Enzymatic dehairing of goat skins using alkaline protease from *Bacillus sp.* SB12. *Protein Expression and Purification*, 121: 9- 16.
- Buehler, E. 2006. *Bread Science: the chemistry and craft of making bread*. Two Blue Books Publisher, Hillsborough, NC, USA, 254 pp.
- Buxbaum, E. 2007. *Fundamentals of protein structure and function*. Springer International Publishing, Switzerland, pp. 59-63.
- Castilla I.A., Woods D.F., Reen F.J., O'Gara F. 2018. Harnessing marine biocatalytic reservoirs for green chemistry applications through

- metagenomic technologies. *Marine Drugs*, 16(7): 227. doi:10.3390/md16070227.
- Cerda-Costa, N., Gomis-Ruth, F.X. 2014. Architecture and function of metallopeptidase catalytic domains. *Protein Society*, 23(2): 123-144.
- Chittenden, R.H., Hartwell, J.A. 1891. The relative formation of proteases and peptones in gastric digestion. *The Journal of physiology*, 12(1): 12-22.
- Choi, J.M., Han, S.S., Kim, H.S. 2015. Industrial applications of enzyme biocatalysis: current status and future aspects. *Biotechnol. Adv.*, 33: 1443-1454.
- Chowdhury, M., Mostafa, M.G., Biswas, T., Saha, A. 2013. Treatment of leather industrial effluents by filtration and coagulation processes. *Water Resources and Industry*, 3: 11-22.
- Contesini, F.J., Melo, R.R., Sato, H.H. 2018. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(3): 321-334.
- Csapo, J., Albert, C. 2018. Methods and procedures for the processing of feather from poultry slaughterhouses and the application of feather meal as antioxidant. *Acta. Univ. Sapientiae, Alimentaria*, 11: 81-96.
- Çakmakçı, S., Cantürk, A., Çakır, Y. 2017. Peynir üretimi için sütü pıhtılaştıran enzimlere genel bir bakış ve güncel gelişmeler. *Akademik Gıda*, 15(4): 396-408.
- Demain, A.L., Solomon, N.A. 1981. Industrial microbiology. *Sci. Am.*, 245: 67-75.
- Devanadera, M.K.P., Haw, S.V.O., Arzaga, M.J.J., Buenaflor, L.J., Gagarin, T.J.E., Vargas, A.G., Mercado, S.M., Santiago, L.A. 2016. Optimization, production, partial purification and characterization of neutral and alkaline proteases produced by *Bacillus subtilis*. *J. Microbiol. Biotech. Food Sci.*, 6(2): 832-838.
- Fathima, N.N., Rao, J.R., Nair, B.U. 2012. Tannery solid waste to treat toxic liquid wastes: a new holistic paradigm. *Environ. Eng. Sci.*, 29: 363-372.

- Freddi, G., Mossotti, R., Innocenti, R. 2003. Degumming of silk fabric with several proteases. *J. Biotechnol.*, 106(1): 101-112.
- Gilligan, A.M., Waycaster, C.R., Bizier, R., Chu, B., Carter, M.J., Fife, C.E. 2017. *Advances in Wound Care*, 6(4): 125-134.
- Giri, S.S., Sukumaran, V., Sen, S.S., Oviya, M., Banu, B.N., Jena, P.K. 2011. Purification and characterization of a detergent and oxidizing agent stabler alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* VSG-4 of tropical soil. *The Journal of Microbiology*, 49(3): 455-461.
- Gunay, M. 2013. Eco-friendly textile dyeing and finishing. In Tech Publishing, Rijeka, Croatia, 270 pp.
- Guo, Z., Lin, D., Guo, J., Zhang, Y., Zheng, B. 2017. In vitro antioxidant activity and in vivo anti-fatigue effect of sea horse (*Hippocampus* sp.) peptides. *Molecules*, 22: 482.
- Gupta, R., Beg, Q., Lorenz, P. 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59(1):15–32.
- Gupta, R., Rajput, R., Sharma, R., Gupta, N. 2013. Biotechnological applications and prospective market of microbial keratinases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97(23): 9931- 9940.
- Guttenplan, S.B., Shaw, S., Kearns, D.B. 2013. The cell biology of peritrichous flagella in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology*, 87(1): 211-229.
- Hammami, A., Fakhfakh, N., Abdelhedi, O., Bayoudh, A. 2017. Proteolytic and amylolytic enzymes from a newly isolated *Bacillus mojavensis* SA: characterization and applications as laundry detergent additive and in leather processing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 108. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.11.148.
- Harwood, C.R. 2008. *Bacillus* protein secretion: an unfolding story. *Trends Microbiol.*, 16(2): 73-79.

- Işık, B. 2014. Biyosensörlere farklı bir bakış açısı enzim aktivitesi tayinlerine yönelik sistemler. Yüksek Lisans Tezi, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Tekirdağ.
- Jellouli, K., Ghorbel-Bellaaj, O., Ayed, H.B., Manni, L., Agrebi, R., Nasri, M. 2011. Alkaline-protease from *Bacillus licheniformis* MP1: Purification, characterization and potential application as a detergent additive and for shrimp waste deproteinization. *Process Biochemistry*, 46: 1248-1256.
- Joo, H.S., Chang, C.S. 2006. Production of an oxidant and SDS-stable alkaline protease from an alkaphilic *Bacillus clausii* I-52 by submerged fermentation: feasibility as a laundry detergent additive. *Enzyme and Microbial Technology*, 38: 176-183.
- Kalia, V.C., Saini, A.K. 2017. Metabolic engineering for bioactive compounds: strategies and processes. Springer International Publishing, Switzerland, 412 pp
- Kallel, A., Ksibi, M., Dhia, H.B., Khelifi, N. 2017. Recent advances in environmental science from the euro-mediterranean and surrounding regions. *Advances in Science, Technology & Innovation*, pp. 133-135. Doi: 10.1007/978-3-319-70548-4.
- Kallel, A., Ksibi, M., Dhia, H.B., Khelifi, N. 2017. Recent advances in environmental science from the euro-mediterranean and surrounding regions. *Advances in Science, Technology & Innovation*, pp. 133-135. Doi: 10.1007/978-3-319-70548-4.
- Kara, M., Sivri, D., Köksel, H. 2005. *Food Research International*, 38: 479-486.
- Karn, S.K., Kumar, A. 2019. Protease, lipase and amylase and optimization from activated sludge of pulp and paper industry. *Indian Journal of Experimental Biology*, 57: 201-205.
- Kato, T., Yamagata, Y., Arai, T., Ichishima, E. 1992. Purification of a new extracellular 90 kDa serine proteinase with isoelectric point of 3.9 from

- Bacillus subtilis* (natto) and elucidation of its distinct mode of action. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 56(7): 1166-1168.
- Kim, P.I., Ryu, J., Kim, Y.H., Chi, Y.T. 2010. Production of biosurfactant lipopeptides Iturin A, fengycin and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 20(1): 138-45.
- Kondo, M., Fukao, T., Shinoda, S., Kawamoto, N., Kaneko, H., Kato, Z., Matsui, E., Teramoto, T., Nakano, T., Kondo, N. 2007. Lymphocyte responses to chymotrypsin or trypsin v-digested beta-lactoglobulin in patients with cow's milk allergy. *Official Journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*, 3(1): 1-9.
- Kousoulis, A.A., Tsoucalas, G., Armenis, I., Marineli, F., Karamanou, M., Androustos, G. 2012. From the "hungry acid" to pepsinogen: a journey through time in quest for the stomach's secretion. *Annals of gastroenterology*, 25(2): 119-122.
- Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M., Wang, X. 2012. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2: 1-11.
- Liu, B., Zhang, J., Li, B., Liao, X., Du, G., Chen, J. 2013. Expression and characterization of extreme alkaline, oxidation-resistant keratinase from *Bacillus licheniformis* in recombinant *Bacillus subtilis* WB600 expression system and its application in wool fiber processing. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 29(5): 825-832.
- Lowe, D.A. 2001. *Basic Biotechnology*. (Ed: Ratledge C and Kristionsen B.), Second Edition, Cambridge University Press, Cambridge, U.K., 679 pp.
- Lu, Z., Guo, W., Liu, C. 2018. Isolation, identification and characterization of novel *Bacillus subtilis*. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 80(3): 427-433.

- Mabrouk, S.S., Hashem, A.M., El-Shayeb, N.M.A., Ismail, A.M.S., Abdel-Fattah, A.F. 1999. Optimization of alkaline protease productivity by *Bacillus licheniformis* ATCC 21415. *Bioresource Technology*, 69: 155-159.
- Mahmoud, M.I., Cordle, C.T. 2000. Protein hydrolysates as special nutritional ingredients. *Developments in Food Science*, 41: 181-215.
- Mares-Mares, E., Gutierrez-Vargas, S., Perez-Moreno, L., Ordonez-Acevedo, L.G., Barboza-Corona, J.E., Leon-Galvan, M.F. 2017. Characterization and identification of cryptic biopeptides in *Carya illinoensis* storage proteins. *BioMed Research International*, 2017: 1549156. doi:10.1155/2017/1549156.
- Matthews, B.W., Jansonius, J.N., Colman, P.M., Schoenborn, B.P., Dupourque, D. 1972. Three dimensional structure of thermolysin. *Nature*, 238: 37-41.
- Miller, D., Millar, I., Millar, J., Millar, M. 2002. The cambridge dictionary of scientists, 2nd ed., Cambridge University Press, Cambridge, U.K., pp. 320-321.
- Motyan, J.A., Toth, F., Tozser, J. 2013. Research applications of proteolytic enzymes in molecular biology. *Biomolecules*, 3(4): 923-942.
- Mounier, J., Coton, M., Irlinger, F., Landaud, S., Bonnarme, P. 2017. Smear-ripened cheeses. In *cheese chemistry, physics and microbiology*, Fourth Edition, Academic Press, Cambridge, Massachusetts, USA, 1302 pp.
- Murakami, Y., Hirata, M., Hirata, A. 1996. Mathematical approach to thermolysincatalyzed synthesis of aspartame precursor. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82(3): 246-252.
- Nahar, S., Mizan, M.F.R., Ha, A.J.W., Ha, S.D. 2018. Advances and future prospects of enzyme-based biofilm prevention approaches in the food industry. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(6): 1484-1502.
- Neves, A.C., Harnedy, P.A., O'Keeffe, M.B., FitzGerald, R.J. 2017. Bioactive peptides from atlantic salmon (*Salmo salar*) with angiotensin-converting

- enzyme and dipeptidyl peptidase IV inhibitory, and antioxidant activities. Food Chem., 218: 396-405.
- Ormandy, E.H., Dale, J., Griffin, G. 2011. Genetic engineering of animals: ethical issues, including welfare concerns. The Canadian Vet. J., 52(5): 544-550.
- Pacheco, G.F.E., Pezzali, J.G., Kessler A.M., Trevizan, L. 2016. Inclusion of exogenous enzymes to feathers during processing on the digestible energy content of feather meal for adult dogs. R. Bras. Zootec., 45(6): 288-294.
- Padmapriya, B., Rajeswari, T., Nandita, R., Raj, F. 2012. Production and purification of alkaline serine protease from marine *Bacillus* species and its application in detergent industry. Europ. J. Appl. Sci., 4(1): 21-26.
- Park, C.H., Lee, S.J., Lee, S.G., Lee, W.S., Byun, S.M. 2004. Hetero and autoproducting of the extracellular metalloprotease (Mpr) in *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology, 186(19): 6457-6464.
- Polaina, J., MacCabe, A.P. 2007. Industrial enzymes structure, function and applications. 1st Edition, Springer International Publishing, Switzerland, 641 pp.
- Prabakaran, V., Soma-Prabha, A., Blessy-Thayalin, T.S. 2015. Screening and production of protease enzyme from marine microorganism and its industrial application, IOSR Journal of Biotechnology and Biochemistry, 1(4): 33-41
- Puvanakrishnan, R., Sivasubramanian, S., Hemalatha, T. 2015. Microbes and enzymes: basics and applied. MJP Publishers, Chennai, India, 558 pp.
- Qureshi, M.A., Khare, A.K., Pervez, A. 2015. Enzymes used in dairy industries. Int. J. Appl. Res., 1(10): 523-527.
- Rai, S.K., Mukherjee, A.K. 2010. Statistical optimization of production, purification and industrial application of a laundry detergent and organic solvent-stable subtilisin-like serine protease (alzwiprase) from *Bacillus subtilis* DM-04. Biochemical Engineering Journal, 48: 173-180.
- Rampelotto, P.H. 2016. Biotechnology of extremophiles: advances and challenges. 1st Edition, Springer International Publishing, Switzerland, 720 pp

- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 62(3): 597-635.
- Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A., Ashraf, M. 2019. Microbial proteases applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 7: 110. doi: 10.3389/fbioe.2019.00110
- Rehman, R., Ahmed, M., Siddique, A., Hasan, F., Hameed, A., Jamal, A. 2017. Catalytic role of thermostable metalloproteases from *Bacillus subtilis* KT004404 as dehairing and destaining agent. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 181: 434-450.
- Rodney, R.M., Hall, J.K., Westwood, C.T., Celi, P., Lean, I.J. 2016. Precalving and early lactation factors that predict milk casein and fertility in the transition dairy cow. *Journal of Dairy Science*, 99(9): 7554-7567.
- Röhm, O., 1913. Trypsin in detergents. Patent No. DE 2839323, German Patent and Trade Mark Office.
- Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G., Pandey, A. 2005. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 40: 2689-2694.
- Sanghi, R., Singh, V. 2012. *Green chemistry for environmental remediation*, 1st Edition, Wiley-Scrivener, New York City, USA, 800 pp.
- Sari, E. 2011. *Bacillus circulans* M34'ten proteaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Ankara, 103 s.
- Say, D., Güzeler, N. 2016. Süt pıhtılaştırılmasında kullanılan bazı bitkiler. *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi*, s: 253-261.
- Schaechter, M. 2009. *Encyclopedia of microbiology*. 3rd Edition, Academic Press, San Diego, CA., USA, 4600 pp.
- Schitteck, B., Hipfel, R., Sauer, B., Bauer, J., Kalbacher, H., Stevanovic, S., Schirle, M., Schroeder, K., Blin, N., Meier, F., Rassner, G., Garbe, C. 2001.

- Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nat. Immunol.*, 2(12): 1133- 1137.
- Seager, S.L., Slabaugh, M.R., Hansen, M.S. 2018. *Chemistry for today: general, organic, and biochemistry*, 9th Edition. Cengage Learning, Boston, USA, 886 pp.
- Selamet, S. 2012. Sürdürülebilirlik ve grafik tasarım. *ZKÜ Sosyal Bilimler Dergisi*, 8(15): 125-148.
- Sewalt, V., Shanahan, D., Gregg, L. 2016. The generally recognized as Safe (GRAS) process for industrial microbial enzymes. *Indus. Biotechnol.*, 12: 295-302.
- Shafi, J., Tian, H., Ji, M. 2017. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 31(3): 446-459.
- Shah, K., Mody, K., Keshri, J., Jha, B. 2010. Purification and characterization of a solvent, detergent and oxidizing agent tolerant protease from *Bacillus cereus* isolated from the Gulf of Khambhat. *J. Mol. Catal. B-Enz.*, 67: 85-91.
- Sharma, M., Gat, Y., Arya, S., Kumar, V., Panghal, A., Kumar, A. 2019. A review on microbial alkaline protease: an essential tool for various industrial approaches. *Industrial Biotechnology*, 15(2): 69-78.
- Sheldon, R.A., Woodley, J.M. 2018. Role of biocatalysis in sustainable chemistry. *Chem. Rev.*, 118: 801-838.
- Si, J.B., Jang, E.J., Charalampopoulos, D., Wee, Y.J. 2018. Purification and characterization of microbial protease produced extracellularly from *Bacillus subtilis* FBL-1. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 23: 176-182.
- Silva, C., Martins, M., Jing, S., Fu, J., Cavaco-Paulo, A. 2018. Practical insights on enzyme stabilization. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(3): 335-350.
- Silva, N., Taniwaki, M.H., Junqueira, V.C., Silveira, N., Nascimento, M.S., Gomes, R.A.R. 2013. *Microbiological examination methods of food and water: a laboratory manual*. 1st Edition, CRC Press, London, UK. 484 pp.

- Singh, R., Mittal, A., Kumar, M., Mehta, P.K. 2016. Microbial proteases in commercial applications. *J. Pharm. Chem. Biol. Sci.*, 4(3): 365-374.
- Singhal, P., Nigam, V.K., Vidyarthi, A.S. 2012. Studies on production, characterization and applications of microbial alkaline proteases. *Int. J. Adv. Biotechnol. Res.*, 3: 653-669.
- Sinha, R., Khare, S. 2013. Characterization of detergent compatible protease of a halophilic *Bacillus sp.* EMB9: differential role of metal ions in stability and activity. *Bioresource Technology*, 145: 357-361.
- Souza, P.M., Bittencourt, M.L.A., Caprara, C.C., Freitas, M., Almeida, R.P.C., Silveira, D., Fonseca, Y.M., Filho, E.X.F., Junior, A.P., Magalhaes, P.O. 2015. A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2): 337-346.
- Steinkuhler, C. 2008. Viral Proteases. In: encyclopedia of molecular pharmacology, Offermanns, S., Rosenthal, W. (eds.), Springer International Publishing, Berlin, Heidelberg.
- Stiuso, P., Caraglia, M., De-Rosa, G., Giordano, A. 2013. Bioactive peptides in cancer: therapeutic use and delivery strategies. *Journal of Amino Acids.*, 568953.
- Tavano, O.L., Berenguer-Murcia, A., Secundo, F., Fernandez-Lafuente, R. 2018. Biotechnological applications of proteases in food technology. *Comp. Rev. Food Sci. Food Safety*, 17(2): 412-436.
- Thangam, E.B., Rajkumar, G.S., 2000. Studies on production of extracellular protease by *Alkaligenes faecalis*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 16: 663-666.
- Thorstensen, T.C. 1993. *Practical Leather Technology*. 4th edition, Kieger Publishing Company, Malabar, Florida, ISBN 0-8946-689-3.
- Tipton, K. 2018. Translocases (EC 7): A new EC Class. <https://iubmb.org/wpcontent/uploads/sites/2790/2018/10/Translocases-EC-7.pdf>-(Erişim tarihi: 16.01.2020).

- Uddin, E., Maitra, P., Faruquee, H., Alam, F. 2014. Isolation and characterization of proteases enzyme from locally isolated *Bacillus* sp.. American Journal of Life Sciences, 2(6): 338-344.
- Van Donkelaar, L.H.G., Mostert, J., Zisopoulos, F.K., Boom, R.M., Vander Goot, A. 2016. The use of enzymes for beer brewing: thermodynamic comparison on resource use. Energy., 115: 519-527.
- Vanitha, N., Rajan, S., Murugesan, A.G., 2014. Production of alkaline protease by PD4 strain and its application in leather process. IJPCBS, 4(3): 545-550.
- Vij, R., Reddi, S., Kapila, S., Kapila, R. 2016. Transepithelial transport of milk-derived bioactive peptide VLPVPQK. Food Chem., 190: 681-688.
- Vijayaraghavan, P., Vijayan, A., Arun, A., Jenisha, J.K., Vincent, S.G.P. 2012. Cow dung: a potential biomass substrate for the production of detergent-stable dehairing protease by alkaliphilic *Bacillus subtilis* strain VV. SpringerPlus, 1: 76.
- Vishwanatha, K.S., Rao, A.G.A., Singh, S.A. 2009. Characterisation of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. Food Chem., 114: 402-407
- Vranova, V., Rejsek, K., Formanek, P. 2013. Proteolytic activity in soil: a review. Applied Soil Ecology, 70: 23-32.
- Wang, B., Wu, W., Liu, X. 2007. Purification and characterization of a neutral serine protease with nematocidal activity from *Hirsutella rhossiliensis*. Mycopathol., 163: 169- 176.
- Windle, M.C., Walker, N., Kung, J.L. 2014. Effects of an exogenous protease on the fermentation and nutritive value of corn silage harvested at different dry matter contents and ensiled for various lengths of time. J. Dairy Sci., 97: 3053-3060.
- Wu, J.W., Chen, X.L. 2011. Extracellular metalloproteases from bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology, 92(2): 253-262.

- Yadav, A.N., Singh, S., Mishra, S., Gupta, A. 2019. Recent advancement in white biotechnology through fungi: perspective for value-added products and environments. Springer International Publishing, New York, USA. 504 pp.
- Yanar, Y., 2015. Seafood enzymes and their application in the seafood industry. Ege J. Fish Aqua Sci., 32(2): 105-113.
- Yang, X., Yousef, A.E. 2018. Antimicrobial peptides produced by *Brevibacillus* spp.: structure, classification and bioactivity: a mini review. World J Microbiol Biotechnol., 34(4): 57.
- Yılmaz, M. 2003. Topraktan izole edilen *Bacillus* cinsi bakterilerin bazı metabolik özelliklerinin belirlenmesi plazmid DNA ve protein profillerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Ankara Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara
- Yu, L., Yang, L., An, W., Su, X. 2014. Anticancer bioactive peptide-3 inhibits human gastric cancer growth by suppressing gastric cancer stem cells. Journal of Cellular Biochemistry., 115(4): 697-711.
- Zaki, N. 2018. Biodegradable plastic production by *Bacillus* spp. isolated from agricultural wastes and genetic analysis of PHA synthesis. Al-Mustansiriyah Journal of Science, 29(1): 67-74.
- Zambare, V., Nilegaonkar, S., Kanekar, P. 2011. A novel extracellular protease from *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327: enzyme production and its partial characterization. New Biotechnology, 28(2): 173-181.



ÖZGEÇMİŞ

İlköğretim ve lise öğrenimini Hatay’da tamamladı. 2010-2014 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’de lisans eğitimini tamamladı. 2016-2017 öğretim yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisansa başladı.

