ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BACILLUS SP.'DEN PROTEAZIN TESPİTİ, OPTİMİZASYONU, SAFLAŞTIRILMASI VE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

Saif Shamsaldeen Mohammed AL-GBURI

BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

ÇANKIRI
2023

Her hakkı saklıdır.

TEZ ONAYI

Saif Shamsaldeen Mohammed AL-GBURI tarafından hazırlanan **"Bacillus Sp.'den Proteazın Tesipiti, Optimizasyonu, Saflaştırılması ve Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi"** adlı tez çalışması 16/3/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Tamer KEÇELİ

Eş Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Mohammed Fadhil ABOKSOUR

Jüri Üyeleri :

Başkan : Dr. Öğr. Üyesi Şenol ALAN
Biyoloji Ana Bilim Dalı
Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Filiz SARIKAYA PEKACAR
Biyoloji Ana Bilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Tamer KEÇELİ
Biyoloji Ana Bilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Hamit ALYAR

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum "***Bacillus sp.'den*** **Proteazin Tesipiti, Optimizasyonu, Saflaştırılması ve Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi**" konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu, çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel İntihal Tespit Programı"yla tarandığını, "intihal içermediğini" beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim (15/3/2023).

Saif Shamsaldeen Mohammed AL-GBURI

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BACILLUS SP.'DEN PROTEAZIN TESPİTİ, OPTİMİZASYONU, SAFLAŞTIRILMASI VE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

Saif Shamsaldeen Mohammed AL-GBURI

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Ana Bilim Dalı

Advisor: Prof. Dr. Tamer KEÇELİ
Co-Advisor: Dr. Öğr. Üyesi Mohammed Fadhil ABOKSOUR

Bu çalışmada, Bağdat(Irak) hastanelerinden yüz on iki farklı örnekten numune toplanmış olup örnekler balgam, idrar, dışkı, yara, yanık ve hastane atıklarını içermektedir. Toplanan örneklerden 21 *Bacillus subtilis* izolatı izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Izole edilen tüm bakteriler proteaz enzimi üretme yeteneklerini belirlemek amacıyla test edilmiştir ve sonuçlar bakteri izolatlarının farklı derecelerde proteaz enzimi üretme değerine sahip olduğunu göstermektedir. Proteaz üretim testinin sonucuna göre proteaz üretiminin optimum koşullarını belirlemek için B8 izolatı seçilmiştir. Optimum karbon, azot ve fosfor kaynaklarının türü ve konsantrasyonları, ayrıca pH ve sıcaklık derecesi de belirlenmiştir. Sonrasında, mevcut çalışmada belirlenen optimum koşulda proteaz üretmek için B8 izolatı kullanılmıştır. Proteaz enzimi dört adım kullanılarak saflaştırılmıştır ve her adımdan sonra bunların spesifik aktiviteleri, protean konsantrasyonu ve ayrıca toplam aktivitesi belirlenmiştir. Son olarak salgılanan enzimin birçok patojenik bakteriye karşı antimikrobiyal etkileri tespit edilmiştir.

2023, 46 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: *Bacillus subtilis,* Proteaz, Enzim saflaştırma, Antimikrobiyal aktivite

ABSTRACT

Master of Science Thesis

DETECTION, OPTIMIZATION, PURIFICATION AND DETERMINATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF PROTEASE FROM BACILLUS SP.

Saif Shamsaldeen Mohammed AL-GBURI

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Danışman: Prof. Dr. Tamer KEÇELİ
İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Mohammed Fadhil ABOKSOUR

In this study, one hundred-twelve sample were collected from different specimens from Baghdad hospitals, the specimens included sputum, urine, stool, wound and burn, as well as hospital wastes. Twenty-one *Bacillus subtilis* isolates were isolated and identified from the collected samples, All the isolated bacteria were undergoing tested to determine their ability to produce protease enzyme, and the results showed that the bacterial isolates possesseddifferent degreess of production values of protease enzyme. B8 isolate was chosen to determine the optimum conditions of protease production due to its result in the protease production test. The optimum type of carbon, nitrogen, and phosphor sources as well as their concentrations were determined, in addition, pH and temperature degree were determined too. Afterwards, B8 isolate was used to produce protease at the optimum condition determined in the current study. The protease enzyme was purified using four steps, and after each step their specific activities, protean concentration as well as total activity were determined. Finally the antimicrobial effects of the secreted enzyme were detected against many pathogenic bacteria.

2023, 46 pages

Keywords: *Bacillus subtilis*, Protease, Enzyme purification, Antimicrobial activity

TEŞEKKÜR

Tez danışmanım Prof. Dr. Tamer KEÇELİ'ye sabrı, rehberliği ve anlayışı için teşekkür ederim.

Saif Shamsaldeen Mohammed AL-GBURI

Çankırı, Mart 2023

İÇİNDEKİLER

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
İÇİNDEKİLER iv
SİMGELER DİZİNİ vi
KISALTMALAR DİZİNİ vii
ŞEKİLLER DİZİNİ viii
ÇİZELGELER DİZİNİ ix
1. GİRİŞ 1
2. LİTERATÜR ÖZETİ 4
2.1 Basiller 4
2.1.1 *Bacillus sp.* tarafından antimikrobiyal peptitlerin üretimi. 6
2.2 *Bacillus Subtilis* 7
2.2.1 *B. subtilis'in* taksonomik ağacı 8
2.2.2 *B. subtilis'in* epidemiyolojisi 8
2.2.3 *B. subtilis* ve gen ifadesi. 9
2.2.4 *Bacillus subtilis* protein salgılama sistemleri 10
2.2.5 *Bacillus subtilis'ten* elde edilen kimyasallar endüstride kullanılmaktadır. 12
2.3 Proteaz Enzimi 13
2.3.1 Proteaz sınıflandırması 14
2.3.2 Proteaz kaynakları 14
2.3.3 Proteaz enzim uygulamaları 15
3. MATERYAL VE METOT 17
3.1 Materyal 17
3.2 Bakteriyel İzolasyon 18
3.3 Bakteriyel Tanımlama 19
3.3.1 Biyokimyasal testler kullanılarak bakteri tanımlaması 19
3.3.2 VITEK 2 sistemi kullanılarak bakteri tanımlama 19
3.4 Bakteriyel İzolatların Korunması 19
3.5 Proteaz Üreten Bakterilerin Belirlenmesi 20

3.6 Proteaz Enzimi Üretiminin Optimum Koşullarının Belirlenmesi 20
3.7 Proteaz Salgılayan Enzimin Saflaştırılması 22
3.8 Proteaz Karakterizasyonu 24
3.9 Proteaz Enziminin Antibakteriyel Aktivitesinin Tespiti 24
3.10 İstatistiksel Değerlendirme 25
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 26
4.1 Bakteri Tanımlama Sonuçları 26
4.2 Proteaz Üreten *B. subtilis* İzolatlarının Taranması 26
4.3 Proteaz Üretiminin Optimum Koşullarının Sonuçları 27
4.3.1 Optimum karbon kaynağının sonuçları 27
4.3.2 Optimum karbon konsantrasyonunun sonuçları 28
4.3.3 Optimum azot kaynağının sonuçları 29
4.3.4 Optimum nitrojen konsantrasyonunun sonuçları 30
4.3.5 Optimum fosfat kaynağının sonuçları 31
4.3.6 Optimum pH değerinin sonuçları 32
4.3.7 Optimum sıcaklık derecesinin sonuçları 33
4.4 Proteaz Enzim Saflaştırmasının Sonuçları 34
4.5 Proteaz Karakterizasyonunun Sonuçları 36
4.5.1 Proteaz aktivitesi ve stabilitesi üzerindeki pH etkilerinin sonuçları 36
4.5.2 Proteaz aktivitesi ve stabilitesi üzerindeki sıcaklık etkilerinin sonuçları 37
4.6 B8 İzolatının Proteaz Enziminin Antimikrobiyal Etkilerinin Sonuçları 38
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 39
KAYNAKLAR 40
ÖZGEÇMİŞ 46

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
C	Santigrat
mg	Miligram
mL	Mililitre
U	Birimi
U/mg	Birim/miligram

KISALTMALAR DİZİNİ

IMViC	İndol, metil kırmızısı, voges proskauer ve sitrat testi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Dünyada *B. subtilis* epidemiyolojisi 9
Şekil 2.2 *B. subtilis'teki* üç klasik protein salgılama mekanizması (Su *et al.* 2020) 12
Şekil 4.1 Proteaz üreticisi *B. subtilis* izolatlarının taranması. 27
Şekil 4.2 B8'in proteaz üretiminin optimum karbon kaynağı. 28
Şekil 4.3 B8'in proteaz üretiminin bir karbon kaynağı olarak sakarozun optimum konsantrasyonu. 29
Şekil 4.4 B8'in proteaz üretiminin optimum nitrojen kaynağı. 30
Şekil 4.5 B8'in proteaz üretiminin bir nitrojen kaynağı olarak triptonun optimum konsantrasyonu. 31
Şekil 4.6 B8'in proteaz üretiminin optimum fosfat kaynağı. 32
Şekil 4.7 B8'in proteaz üretiminin optimum pH değeri 33
Şekil 4.8 B8'in proteaz üretiminin optimum sıcaklık derecesi. 34
Şekil 4.9 Proteaz üretiminin aktivitesi ve stabilitesi üzerindeki pH etkileri 37
Şekil 4.10 Proteaz üretiminin aktivitesi ve stabilitesi üzerindeki sıcaklık etkileri. 38

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Aletler ve ekipmanlar 17
Çizelge 3.2 Kimyasal maddeler ve bileşenler 18
Çizelge 3.3 Kültür ortamı..... 18
Çizelge 4.1 *Bacillus subtilis'in* mikroskobik ve biyokimyasal sonuçları..... 26
Çizelge 4.2 B8 izolatı tarafından salgılanan proteaz enziminin saflaştırma aşamaları .. 36
Çizelge 4.3 Proteaz enziminin antimikrobiyal etkileri. 39

1. GİRİŞ

Basiller (Latincede "sopa" anlamına gelen) 266 bilinen türe sahip Gram pozitif, çubuk şeklindeki bakterilerin filum Firmicutes cinsidir. Bu terim aynı zamanda bazı bakterilerin formunu (çubuk) tanımlamak için de kullanılır ve çoğul Basiller, bu türün ait olduğu bakteri sınıfının adıdır. Basil türleri zorunlu aeroblar (oksijene bağımlı) veya fakültatif anaeroblar (oksijen yokluğunda yaşayabilir) olabilir. Oksijen kullanılmış veya mevcutsa, kültürlenmiş Basil türleri katalaz enzimi için pozitif test meydana getirir (Paul *et al.* 2021, Yılmaz *et al.* 2016).

Bacillus subtilis, toprakta, geviş getiren hayvanların bağırsaklarında, insanlarda ve deniz süngerlerinde bulunan Gram pozitif bir bakteridir. Basiller cinsinin bir üyesi olan *B. subtilis*, çubuk şeklindedir ve sert iklim koşullarına dayanmasını sağlayan sağlam, koruyucu bir endospor geliştirebilir. Kanıtlar, *B. subtilis*'in fakültatif bir anaerob olduğunu öne sürse de, genellikle zorunlu bir aerob olarak kategorize edilmiştir. *B. subtilis* en çok araştırılan Gram pozitif bakteridir ve bakteri kromozomal replikasyonu ve hücre farklılaşmasını incelemek için model organizma olarak kullanılır. Salgılanan enzimlerin üretiminde bakteriyel bir şampiyondur ve biyoteknoloji işletmeleri tarafından endüstriyel olarak kullanılır (Shortt 2005).

Sonuç olarak, Archaea ile *E. coli'den* çok daha fazla ilişkilidir. Ökaryotik genlerle özdeş olan *B. subtilis'teki* genleri tanımlamak nadir olmasına rağmen, özellikle poliamin sentezinde yer alan birçok metabolik gen (Yılmaz *et al.* 2016). Gupta, ilkel bakterilerin gram-pozitif bakterilere ve Archaea'ya dallanmış monoderm bir varlık olduğunu ve gram-pozitif bakterilerin karakteristik çift zarlarıyla gram-negatif bakterilere yol açtığını öne sürmüştür. Bu düşünce, ilk hücrenin oluşumuyla ilgili şiddetli ama büyüleyici bir tartışmaya yol açmıştır. Basiller, en az beş farklı aileye ayrılabilen çeşitli bir bakteri ailesidir (Wassmann *et al.* 2012, Saito *et al.* 2006).

Başlangıçta, Christian Ehrenberg buna *Vibrio subtilis* adını vermiştir, ancak Ferdinand Cohn, 1872'de *Bacillus subtilis* olarak yeniden adlandırmıştır. *B. subtilis'in* hücreleri

genellikle çubuk şeklindedir, 4-10 mikrometre uzunluğunda ve bir mikrometreden küçük çaptadır. Basil cinsinin diğer türleri gibi, yüksek sıcaklık ve kuruma koşullarına dayanmak için bir endospore geliştirebilir. *B. subtilis* fakültatif bir anaerobdur ve daha önce zorunlu bir aerob olduğu düşünülmüştür (Paul *et al.* 2021, Euzéby 2008).

B. subtilis, yüksek oranda kamçılıdır, bu sıvılarda hızlı hareket etmesini sağlar. *B. subtilis*, genetik modifikasyona çok açık olduğunu göstermektedir ve laboratuvar araştırmaları, özellikle sporülasyon içerenler için model bir organizma olarak sıklıkla kullanılır hale gelmiştir. *B. subtilis'*in genetik değişikliklere çok duyarlı olduğu gösterilmektedir ve laboratuvar araştırmaları, özellikle hücresel farklılaşmanın basitleştirilmiş bir örneği olan sporülasyon için popüler bir model organizma haline gelmiştir. Bir laboratuvar modeli organizması olarak popülerlik açısından, *B. subtilis* önemli araştırmalar yapılmış olan Gram negatif bakteriler *Escherichia coli*'nin Gram pozitif karşılığı olarak kabul edilir (Errington and Aart 2020).

Bir proteaz, proteolizi harekete geçiren, proteinleri daha basit polipeptitlere veya sadece bir amino aside parçalayan ve yeni protein ürünlerinin oluşturulmasını teşvik eden bir enzimdir. Bunu, suyun bağları kopardığı bir prosedür olan proteinlerin içindeki peptit bağını hidrolize ederek başarmaktadır (Skoreński and Sieńczyk 2013). Proteazlar, protein sindirimi, protein katabolizması (eski proteinlerin parçalanması) ve hücre sinyalizasyonu dahil olmak üzere çeşitli biyolojik görevlerde bulunur (Oda 2012). Proteoliz, yüzlerce yıl gerektiren fonksiyonel hızlandırıcıların yokluğunda çok yavaş olmaktadır. Proteazlar, virüslerin yanı sıra tüm yaşam formlarında bulunmaktadır. Bağımsız olarak sayısız kez evrimleşmişlerdir ve çeşitli proteaz türleri, tamamen farklı katalitik yollar kullanarak aynı işlemi gerçekleştirebilmektedir (Yilmaz *et al.* 2016, Oda 2012).

Proteolitik mekanizması, hidroliz yerine bir eliminasyon reaksiyonu gerçekleştirmesi bakımından benzersizdir. Aynı işlem sırasında, katalitik asparajin, doğru koşullar altında proteinlerdeki asparajin kalıntılarında kendisini parçalayan döngüsel bir kimyasal yapı üretir. Bir peptidaz olarak dahil edilmesi, temelde farklı mekanizması nedeniyle tartışmalı olabilir (King *et al.* 2014). Proteazlar, amino asit kalıntılarını birbirine bağlayan peptit bağlarını keserek büyük protein zincirlerini küçük parçalara ayıran enzimlerdir. Bazıları,

aminopeptidazlar ve karboksipeptidaz A gibi protein zincirinin terminal amino asitleri ekzopeptidazlarını çıkarır, diğerleri pepsin, tripsin, elastaz, papain gibi bir proteinin iç peptit bağlarını hedefler (Yilmaz *et al.* 2016).

Bu çalışmanın amacı, *Bacillus subtilis* izolatlarından proteaz enzimi üretmenin en iyi yöntemini tespit etmek, proteaz üretiminin optimum fiziksel ve kimyasal faktörlerini belirlemek ve saflaştırılmış proteazın antimikrobiyal etkilerini araştırmaktır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Basiller

Hücreler çubuk şeklinde, düz veya hafifçe bükülmüş olup tek tek, çiftler halinde, zincirler halinde veya uzun filamentler halinde bulunabilirler. Endosporlar, bir hücrede üretilir, bu sporlar birçok zorlu ortama son derece dayanıklıdır. Yalnızca gelişimin erken aşamalarında Gram-pozitif veya Gram-negatiftir. Dejenere peritrik kamçı yoluyla hareketsiz veya hareketli olabilir. Aeroblar veya fakültatif anaeroblar olarak bulunurlar, ancak yalnızca birkaç tür tamamen anaerobiktir (Cedo *et al.* 2018). Bazı türlerde, terminal elektron alıcısı, alternatifleriyle değiştirilebilen oksijendir. Türlerin çoğu, beslenme agarı ve kanlı agar gibi standart besiyerinde büyüyebilir (Fira *et al.* 2018, Borriss 2015, Bacon *et al.* 2006).

Kolonilerin görünümü ve boyutu türler arasında ve tür içinde büyük farklılıklar gösterir. Fizyolojik kapasiteler, psikrofilikten termofiliğe ve ayrıca asidofilikten alkalifiliğe kadar değişir, birçok suş tuza dirençliyken diğerleri halofilik bakterilerdir. Katalaz, hayvanların çoğu tarafından üretilir. Pozitif veya negatif oksidaz olabilir. Bazı türler prototroflardan oksotroflara çeşitli büyüme uyaranları gerektiren fakültatif kemolitotroflardır. Toprak tarafından doğrudan veya dolaylı olarak kirlenmiş ancak su, gıda ve klinik örneklerde de tespit edilen topraktan veya ortamlardan izole edilmiştir. Isıya, radyasyona, dezenfektanlara ve kurumaya karşı dirençleri nedeniyle sporlar ameliyathanelerde, cerrahi pansumanlarda, farmasötik ürünlerde ve yemeklerde sıkıntı yaratır (Caulier *et al.* 2019, Fira *et al.* 2018).

Bacillus bakterileri, Firmicutes filumunun I. sınıfına, yani basillere ait olarak sınıflandırılır. *Bacillus* üyeleri, çubuk şeklindeki hücre morfolojisi, katalaz üretimi ve yaygın dağılımı ile ayırt edilen Gram pozitif, aerobik, endospor oluşturan bakterilerdir. Toprakta ve killerde, kayalarda, tozda, su habitatlarında, bitkilerde, yiyeceklerde ve çok sayıda böcek ve hayvanın gastrointestinal sistemlerinde bulunabilirler (Kaspar *et al.* 2019, Turnbull and Kramer 1985).

Bu kadar çeşitli habitatlarda yaşama ve gelişme kapasitesi, esnek endosporların oluşumuna, fizyolojik çeşitliliğe ve büyüme ihtiyaçlarına bağlıdır. *Bacillus* türleri fenotipik ve genotipik olarak çeşitlidir ve sonuç olarak proteinler, selüloz, hidrokarbonlar, nişasta ve biyoyakıtlar dahil olmak üzere çok çeşitli bitki ve hayvan substratlarını sindirme kapasitesi gibi çok çeşitli fizyolojik özellikler sergilerler (Fira *et al.* 2018). Sporlar, ısıya, ışınlara, dezenfektanlara ve kurumaya karşı dirençleri nedeniyle ameliyathanelerde, cerrahi pansumanlarda, farmasötik ürünlerde ve yemeklerde sorun yaratabilirler. Pek çok türün patojenik potansiyeli yok gibi görünmekte olup ve hayvanlarda veya insanlarda nadiren hastalıkla ilişkilendirilmektedir, tek istisna *Bacillus anthracis*, şarbondur, diğer pek çok tür gıda zehirlenmesine ve fırsatçı enfeksiyonlara yol açabilmekte olup *Bacillus thuringiensis* suşları omurgasızlar için patojeniktir (Fira *et al.* 2018, Akhmetova *et al.* 2013).

Bacillus bakterilerinin çeşitli türleri aynı zamanda heterotrofik azotlayıcı veya fakültatif kemolitotrofik bakterilerdir, bunların diğer kısmı asidofiller ve alkalofillerdir, türünün diğer bir kısmı azotu sabitleme, demiri çökeltme, oksidaz selenyum, manganez oksitleyiciler ve indirgeyicilere sahiptir. Çok sayıda *Bacillus* suşunda temsil edilen bu fizyolojik özelliklerdeki çeşitlilik, bu mikroorganizmaların çok çeşitli ekolojik ortamlarda kolonize olmasına olanak sağlar. Büyük ekolojik çeşitliliğin bu potansiyeli, şaşırtıcı dayanıklılıkları ile ayırt edilen sporların oluşumuyla desteklenmektedir. Gıda işleme işindeki ekonomik önemi nedeniyle, gıdalarda ısıya, kurutmaya, dezenfektanlara ve diğer sterilizasyon yöntemlerine karşı spor direnci son derece önemlidir. Çok sayıda *Bacillus* suşunun temsil ettiği fizyolojik özelliklerin çeşitliliği nedeniyle, bu bakteriler çok çeşitli ekolojik durumları kolonize edebilir (Caulier *et al.* 2019, Contesini *et al.* 2018).

Bacillus türlerinin, bakteriyosinlerin yanı sıra polipeptit ve lipopeptit ilaçları gibi antimikrobiyal bileşiklerin etkili üreticileri olduğu düşünülmektedir. *Bacillus* suşları, çeşitli ortamlarda hayatta kalabilmek için antibiyotik bileşiklerinin üretiminden ve sporlaşma yeteneğinden yararlanır. Gıdalardaki *Bacillus* türleri her zaman bozulma veya gıda zehirlenmesine işaret etmez ve Avrupa'da birçok ülkede gıda fermenter bakteri olarak kullanılan *Bacillus subtilis* suşları gibi bazı türler veya suşlar insan ve hayvan gıda üretiminde bile kullanılmaktadır. Ek olarak, belirli *B. subtilis* suşları, soya fasulyelerinin

fermente edilmesi veya Afrika mesquite tohumlarının geleneksel Nijerya yemeğine fermente edilmesi için bir başlangıç kültürü olarak kullanılır (Liu *et al.* 2018, Harwood *et al.* 2008).

2.1.1 Bacillus sp. tarafından antimikrobiyal peptitlerin üretimi.

Gram pozitif bakteriler, antimikrobiyal peptitler oluşturma kabiliyetinde yüksek prevalansa sahiptir. Bu bileşikler rakip bakterilere yöneliktir ve üreticilerine seçici bir avantaj sağlar. Ribozom sentezi yoluyla üretilen bakteriyel antimikrobiyal peptitler, bakteriyosinler olarak bilinir ve bunlar, tüm ana soylardan bakteriler tarafından üretilen proteinli antimikrobiyal bileşiklerin heterolog bir kategorisidir (Plotnikov *et al.* 2009). Birçoğu daha geniş bir etki spektrumuna sahip olmasına rağmen, belirli bakterilere karşı yüksek düzeyde seçiciliğe sahiptirler. Proteinli yapıları, insanların ve hayvanların gastrointestinal kanallarında dejenere olabilir ve bu da gıda koruması olarak kullanılabileceğini gösterir (Mienda *et al.* 2014, Haward and Cranenburgh 2008).

Bacillus durumunda gerçek bakteriyosinlerin ribozomal sentezini doğrulamak özellikle hayati önem taşımaktadır çünkü bu bakteri grubu, ribozomal olmayan sentez yoluyla antimikrobiyal bileşiklerin üretilmesinde üretkendir. *Bacillus* türleri tarafından üretilen bakteriyosin bileşenleri veya bakteriyosin benzeri inhibitör maddeler, LAB bakteriyosinlerinden sonra ikinci en önemli olarak kabul edilebilir. *Bacillus* suşları, çeşitli temel kimyasal konfigürasyonlara sahip çok çeşitli antimikrobiyal peptitler üretir (Haward and Cranenburgh 2008, Turnbull and Kramer 1985).

Bacillus bakteriyosinlerinin bir sınıflandırma şeması yoktur. Bu büyük olasılıkla, tüm bu bakteriyosin peptitleri veya basiller tarafından üretilen peptit/protein çeşitliliği hakkında bilgi eksikliğinden kaynaklanmaktadır. Daha önce bahsedilen gruplamalar, bazı antimikrobiyal peptitler içermektedir. Laktik asit bakterileri bakteriyosin sınıflandırma şemasının I. Sınıfında sınıflandırılan *Bacillus* antimikrobiyal peptitlerinin ayrı bir ailesi olan lantibiyotiklere bir örnektir (Contesini *et al .,* 2018, Klaenhammer *et al.* 2005). Bunun yanı sıra *Bacillus* türleri tarafından üretilen bazı bakteriyosinler ve/veya bakteriyosin benzeri inhibitör maddeler Sınıf II laktik asit bakterisi bakteriyosinleri olarak

sınıflandırılır. Bunun yanı sıra, *Bacillus* türleri tarafından üretilen bazı bakteriyosinler ve/veya bakteriyosin benzeri inhibitör maddeler, pediosin benzeri bakteriyosinler ve iki peptit bakteriyosinler içeren Sınıf II laktik asit bakteri bakteriyosinleri (Klaenhammer *et al.* 2005), olarak sınıflandırılır (Kuebutornye *et al.* 2019).

2.2 Bacillus subtilis

Bacillus subtilis, heterolog protein sentezi için sıklıkla kullanılan aerobik, Gram pozitif bir bakteridir. Çok çeşitli substratları parçalayan ve bakterilerin sürekli değişen bir ortamda gelişmesine izin veren çok sayıda enzim salgılar. Bu tür ve yakın akrabalarının birçoğu yüksek protein salgılama yeteneklerine sahip olduklarından, terapötik proteinlerin ve endüstriyel enzimlerin üretimi için önemli konakçılardır. Bu nedenlerle heterolog proteinlerin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır (Kaspar *et al.* 2019).

Ayrıca, mükemmel fizyolojik özelliklere ve oldukça esnek bir metabolizmaya sahiptir, bu da düşük maliyetli substratlarda üretilmesini kolaylaştırır. Sonuç olarak, *B. subtilis* hızla gelişir ve fermantasyon döngüsü genellikle yaklaşık 48 saat daha kısadır, oysa *Saccharomyces cerevisiae'nin* fermantasyon süresi yaklaşık 180 saattir. Ek olarak, bu organizma genetik stabilitesi olan güçlü ekspresyon sistemlerine sahip ve önemli bir kodon tercihine sahip değildir. *B. subtilis, E. coli'*nin aksine, protein üretimini teşvik eden, aşağı akış işlemlerini basitleştiren ve proses maliyetlerini düşüren tek bir hücre zarına sahiptir. Sonuç olarak, bu türün güvenli olduğu yaygın olarak kanıtlanmıştır (Latorre *et al.* 2016, Miranda *et al.* 2014).

Biyoreaktörlerde etkili bir konakçı olmasının yanı sıra, *B. subtilis,* patojenik bakteri gelişimini engellemek ve besinsel sindirimi artırmak için muazzam bir potansiyele sahip çok amaçlı bir probiyotiktir. *B. subtilis* ayrıca vitamin, asetoin ve diğer bileşiklerin üretimi için bir endüstriyel hücre fabrikası olarak da yaygın olarak kullanılmaktadır. Farklı kalıtsal geçmişleri ve hücresel metabolizmasının yeniden inşasına izin veren iyi gelişmiş gen düzenleme teknolojileri ve halka açık yıkım koleksiyonlarının mevcudiyeti, onu bir metabolik mühendislik ev sahibi olarak çekici kılmaktadır (Latorre *et al.* 2016).

Komposta uygun miktarda *B. subtilis* eklemek humus ve karbon içeriğini büyük ölçüde artırabilir, bu da toprak özelliklerini artırabilir ve mahsul gelişimini teşvik edebilir. *B. subtilis* ayrıca, tıbbi materyaller için antimikrobiyal peptitler dahil olmak üzere büyüme faktörleri, antibiyotikler, lizozim dahil olmak üzere çok çeşitli fonksiyonel biyomateryaller üretmek için canlı biyolojik materyaller olarak kullanılabilen karmaşık biyofilmler oluşturabilir (Latorre *et al.* 2016, Turnbull and Kramer 1985).

2.2.1 *B. subtilis'in* taksonomik ağacı

B. subtilis, aşağıda gösterildiği gibi, Bacillaceae familyasının bir parçası olarak sınıflandırılır (Turnbull and Kramer 1985).

Alem: Bakteri

Şube: Firmicutes

Sınıf: Bacilli

Takım: Bacillales

Aile: Bacillaceae

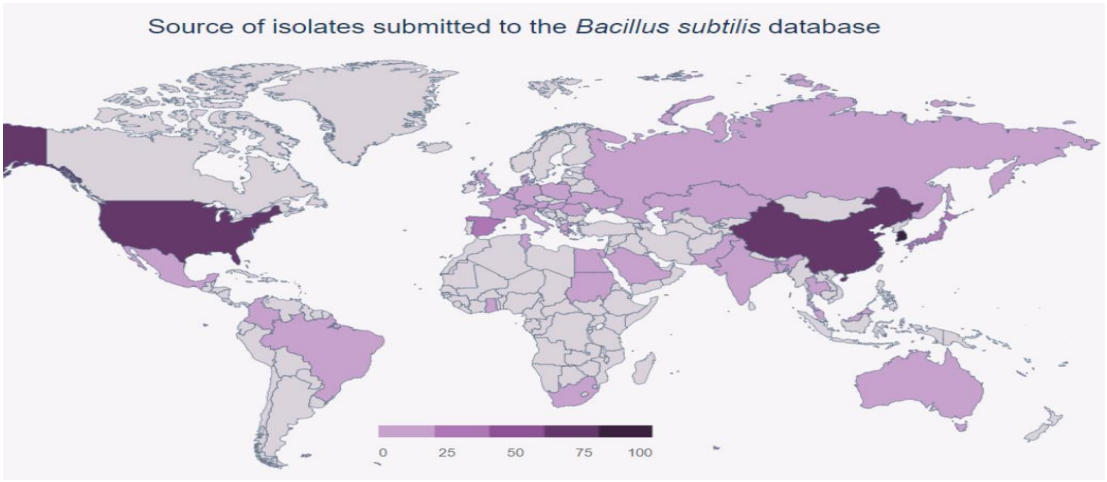
Cins: *Bacillus*

Tür: *B. subtilis*

2.2.2 *B. subtilis'*in epidemiyolojisi

B. subtilis enfeksiyonları küresel olarak zaten gözlemlendiğinden, bu enfeksiyonlarla ilgili araştırmaların çoğu, Izole ülkelerdeki gastroenterit salgınlarına odaklanmaktadır.

(Şekil 2.1)'de gösterildiği gibi çoğu *B. subtilis* bulaşıcı hastalığının semptomlarının hafif kısa süreli olması ve kendi kendini sınırlayan bir doğaya sahip olması ki bu da bireyin tıbbi yardım almadığı anlamına gelir ve enfeksiyonu kanıtlayacak bilimsel testlerin olmaması *B. subtilis* enfeksiyonları hakkında dünya çapında epidemiyolojik veri eksikliğine neden olmaktadır (Mitrofanova *et al.* 2017).



Şekil 2.1 Dünyada *B. subtilis* epidemiyolojisi

2.2.3 *B. subtilis* ve gen ifadesi.

Gen ifade seviyelerini iyileştirmek ve etkili bir şekilde değiştirmek için *B. subtilis*'te transkripsiyon seviyelerini yöneten promotörleri araştırmak çok önemlidir. *B. subtilis'te,* indüklenebilir ve ayrıca yapıcı promotörler, heterolog genlerin ekspresyonunu yönlendirmek için sıklıkla kullanılır. Promotörlere ek olarak, bağlanma bölgesinin gücü, protein ekspresyon seviyelerini etkiler ve çeşitli kopya numaralarına sahip plazmitler, gen ekspresyon seviyelerini değiştirmek için seçenekler sunar. Çeşitli genlerin farklı ekspresyon özellikleri vardır ve ekspresyonları belirli bir metabolik yol için kabul

edilebilir bir düzeye değiştirilmelidir, bu da mühendislik nedenleriyle değişen yoğunluklarda promotörlerin kullanılmasını gerektirir (Razzaq *et al.* 2019, Peng *et al.* 2004).

Promotör kütüphaneleri, RBS kütüphanesi ve çeşitli proteolitik etiketlerden oluşan sentezlenmiş bir gen ifadesi araç takımı, yalnızca 5 büyüklük dinamik aralığı ile gen düzenlemesi sağlayabilir. Promotör ve RBS'den farklı olarak, *B. subtilis*'te gen ekspresyonunu düzenlemek için başka bileşenler kullanılır. Daha önce, *B. subtilis*'ten 96 kodlama dizisi çalışılmış ve çeviri aşamasında gen ekspresyonunu nasıl etkilediğini görmek için istatistiksel incelemeler yapılmıştır (Mitrofanova *et al.* 2017).

Gen ekspresyonunun arttırılması için NCS ikamesinin, promotör ikamesinden daha etkili ve kolay olduğu keşfedilmiştir. Başka bir araştırmada karmaşık kütüphanelerin yanı sıra kombinatoryal optimizasyon metodolojilerinin oluşturulması incelenmiştir. Ancak incelemelerindeki örnekler, *Escherichia coli, Saccharomyces cerevisiae* ve diğer bakterilerin *B. subtilis*'ten daha sık konakçı olarak kullanıldığını ortaya koymaktadır.

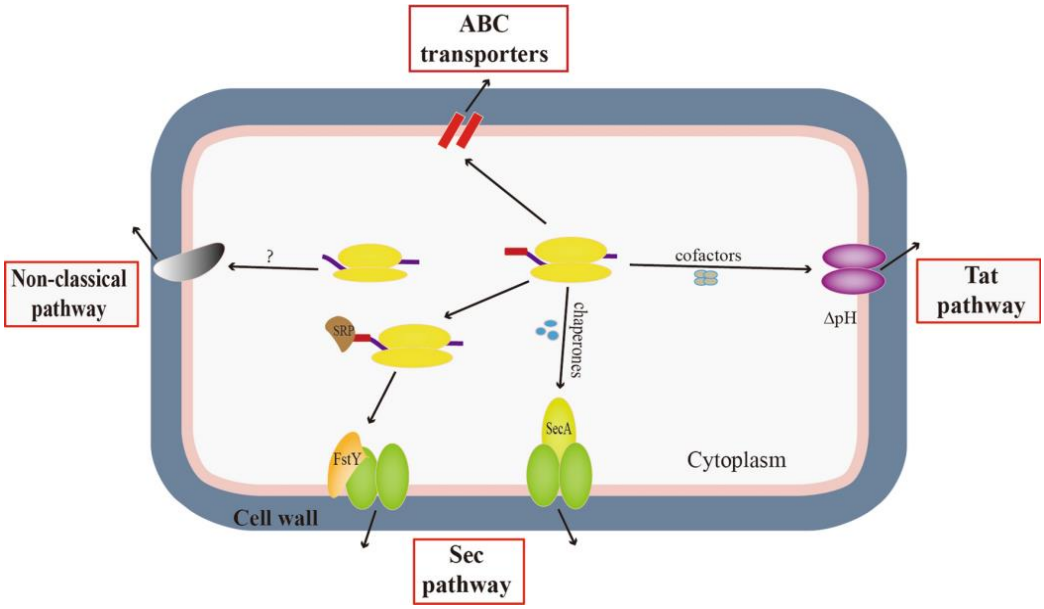
2.2.4 *Bacillus subtilis* protein salgılama sistemleri

Bacillus subtilis, endüstriyel enzim preparatlarının oluşturulmasında yaygın olarak uygulanmasına yol açan yüksek bir protein ekspresyonu ve salgılama kabiliyetine sahiptir. *B. subtilis*, protein salgılama taleplerini karşılamak için yukarıda tartışılan birçok promotöre ve plazmit ekspresyon sistemine ek olarak mükemmel bir protein salgılama sistemine sahiptir. Genel protein salgılama sistemi, ikiz arginin translokasyon yolu ve ATP bağlayıcı kaset taşıyıcıları, şekilde gösterildiği gibi *B. subtilis'teki* üç kanonik protein salgılama mekanizmasıdır (Şekil 2.2) (Wassmann *et al.* 2012, Saito *et al.* 2006).

Çok sayıda dışarıya gönderilen proteini taşıyabilen ana taşıma yolu, genel protein salgılama yoludur. Sinyal tanıma parçacığı en önemli bileşenlerden biridir (Ling *et al.* 2007, Zhao *et al.* 2017). Öncü proteinin sentezinden sonra protein salgılama yolu üzerinde iki yol vardır. Sinyal peptidi, bir sitoplazmik şaperon yardımıyla sinyal

tanımlama parçası ile tanımlanır, protein reseptörü ile bağlanmak için zara taşınır ve ilkinde protein salgılama yolu translokaz kompleksinin kanalına iletilir. İkinci yöntem, hücre içi şaperonlar tarafından tam katlanmasını önleyerek öncü proteinin yer değiştirme kapasitesini korur, ardından salgı yolu translokaz kompleksine gönderilir.Sinyal peptidazları daha sonra sinyal peptid dizisini keser. Son olarak, hücre dışı şaperonların yardımıyla, yer değiştiren protein hücrenin dış bölgesinde paketlenir (Song *et al.* 2015, Ling *et al.* 2007).

İkiz-arginin translokasyon sistemi, katlanmamış substratlara dayanan genel protein salgılama yolunun aksine, sinyal peptid dizilerinde korunmuş bir ikiz-arjin modeli içeren sıkıca katlanmış proteinleri taşır. Öncüller, sitoplazmik membran boyunca pH gradyanından gelen enerjiyi kullanan ikiz-arjin translokasyon yolu protein kompleksi tarafından atılmadan önce kofaktörlerin yardımıyla sitoplazmada katlanır (Zhao *et al.* 2017). İki transmembran alanı, substrat reseptörlerini oluşturur ve iki sulu nükleotid bağlama bölgesi, ATP bağlayıcı kaset taşıyıcılarında motor alanları olarak çalışır. Substratları için nispeten seçicidirler ve proteinler, antibiyotikler ve iyonlar dahil olmak üzere çeşitli bileşikleri ihraç ve ithal edebilirler (Zhao *et al.* 2017, Ling *et al.* 2007). Yukarıda listelenen üç ana protein salgılama yolunun yanı sıra, daha önce yapılan birkaç çalışma, bilinen herhangi bir sinyal peptidi veya salgılanmış motifi olmayan klasik olmayan molekülleri serbest bırakmak için birkaç klasik olmayan salgı yolunun kullanıldığını keşfetmiştir (Zhang and Wu 2020, Zhao *et al.* 2017).



Şekil 2.2 *B. subtilis'teki* üç klasik protein salgılama mekanizması (Su *et al.* 2020)

2.2.5 *Bacillus subtilis'ten* elde edilen kimyasallar endüstride kullanılmaktadır.

B. subtilis'in endüstriyel uygulanabilirliği son yıllarda hızla artmaktadır ve enzimler, heterolog proteinler, antibiyotikler, vitaminler ve amino asitler dahil olmak üzere çok çeşitli ticari ürünler üreten önemli bir mikrobiyal hücre fabrikası haline gelmiştir. *B. subtilis* tarafından üretilen kimyasallar, gıda, yem, kozmetik, kimyasallar ve ilaçlar dahil olmak üzere çeşitli endüstrilerde de gerekli olmaktadır. Bu incelemede B2 vitamini, K vitamini, scyllo-inositol, hyaluronik asit ve N-asetilglukozamin dahil olmak üzere *B. subtilis* tarafından üretilen vitaminler ve diğer maddeler incelenmiştir (Gupta *et al.* 2014).

*B. subtilis'*in çeşitli üretim suşları üretilmiştir. Endüstriyel ölçekte, B2 vitamini en verimli mikrobiyal fermantasyon ürünlerinden birini temsil etmektedir. Genellikle riboflavin olarak bilinen B2 vitamini, antioksidan, bağışıklık güçlendirme, antikanser ve gıda ve yem iyileştirme özellikleri için yaygın olarak kullanılmaktadır. B vitaminlerine ek olarak, *B. subtilis*, diğer nutrasötik ve terapötik özelliklerin yanı sıra kan pıhtılaşma potansiyelini destekleyen önemli vitamin K2 ailesinin bir parçası olan menaquinone-7'yi oluşturabilir (Razzaq *et al.* 2019, Peng *et al.* 2004).

B. subtilis, uygun fiyatlı substratlar üzerinde hızlı büyümesi, sağlam protein üretim kabiliyeti, patojenik olmaması ve avantajlı aşağı akış prosesi nedeniyle artık çok sayıda endüstriyel enzimin üretimi için uygun bir ekspresyon konakçısı haline gelmiştir. Ön verilere göre, *B. subtilis* tarafından üretilen enzimler, toplam enzim pazarının yüzde 50'sini oluşturmaktadır. Proteazlar, selülazlar, amilazlar ve diğerleri dahil olmak üzere birçok enzim, *B. subtilis'*te etkili bir şekilde eksprese edilmiştir (Liu *et al.* 2017). Ayrıca, spor hizmeti yöntemi son zamanlarda protein polimerlerinin, aşıların ve endüstriyel enzimlerin sentezinde etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Lipaz ve kitinaz, endosporların yüzeyinde etkili bir şekilde ifade edilmiştir (Razzaq *et al.* 2019, Liu *et al.* 2017).

2.3 Proteaz Enzimi

Enzimler, normal olarak hücresel metabolik aktivitenin bir parçası olarak çeşitli biyokimyasal reaksiyonları başlatan canlı hücrelerde bulunan biyokatalizörlerdir. Ekstrakte edilen tüm enzimler proteindir. Çeşitli kimyasal reaksiyonlar için etkili biyokatalizörler olan enzimler, dezenfeksiyon, beslenme, farmasötik, terapötik ve endüstriyel faaliyetlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Enzimler, çevre teknolojisi ve ekolojik araştırmalarda giderek daha popüler hale gelmektedir. Proteazlar, toplam enzim arzının %60'ından fazlasını oluşturan üretilmiş bir enzim sınıfıdır. Proteazlar, fizyolojik ve ticari kullanımlarda başı çeken enzim türüdür (Bhat *et al.* 2021). Tüm proteazlar arasında mikrobiyal proteazlar, biyoteknolojik uygulamalar için çok önemlidir. *Bacillus* cinsi de dahil olmak üzere çok sayıda suş, çeşitli habitatlarda yaşayan mikrobiyal topluluklarda ekolojik ve biyoteknolojik araştırmacıların ilgisini çekmektedir. Bu bakterinin cinsi, çeşitli organik ve inorganik kirleticilerin ayrıştırılması, filtrelenmesi ve uzaklaştırılmasında çok önemlidir (Gupta *et al.* 2014).

Proteazlar, patofizyolojik davranışın normal süreçlerinde ve koşullarında yer alan proteinlerdir. Proteaz katılımı, kanser veya AIDS gibi ölümcül hastalıklara karşı terapötik bir ürünün yaratılmasına yardımcı olabilmektedir. Proteazlar, artrit, maligniteler ve hatta metastatik tedavi dahil olmak üzere çeşitli bozukluklarda önemli bir yere sahiptir. Ayrıca, bir veya daha fazla proteazın varlığı, nörolojik hastalıkların gelişimi kadar enfeksiyonla da ilişkilendirilmiştir (Boyer and Carroll 2013, Rawlings *et al.* 2006).

2.3.1 Proteaz sınıflandırması

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği'nin Taksonomi Komitesi, Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği'ne Mikrobiyal Proteaz Kategori Şeması hakkında tavsiyelerde bulunmuştur. Proteazlar, etki biçimlerine göre iki tipte sınıflandırılır: endopeptidazlar ve ekzopeptidazlar. Ekzopeptidazlar, amino veya karboksil ucunda peptit bağlarını kıran enzimlerdir, buna karşın endopeptidazlar, peptit bağlarını substrat ucundan daha fazla kırar. Erişilebilir amino asit uçlarında işlev gören ekzopeptidazlar, tek bir amino kalıntısını serbest bırakırken, mevcut karboksi uçlarında çalışanlar tek bir kalıntıyı serbest bırakacaktır. Ekzopeptidazlar ve endopeptidazların her ikisi de "sekans özgüllüğü" sergiler, bu da onları parçalarken peptit bağlarına yakın çeşitli amino asitler için değişken tercihlere sahip oldukları anlamına gelir. Bir proteaz aktif bölgesi genellikle yüzeyindeki bir oyukta bulunur (Barret *et al.* 1985).

Substrat özgüllüğü, peptit bağı hidrolizinden sorumlu aktif bölgenin bir veya her iki tarafı ile oluk boyunca herhangi bir yerde konumlandırılan bağlanma bölgelerinin özellikleri ile belirlenir. Proteazlar ayrıca beş ana gruba ayrılır: aspartik, sistein, treonin, metalloproteaz ve serin (Gupta *et al.* 2014, Hoge *et al.* 2010).

2.3.2 Proteaz kaynakları

Küresel ticarette proteazlara duyulan ihtiyaç, dünyanın her yerinde, çoğunlukla bitkilerde, hayvanlarda ve mikroplarda bulunduğundan, giderek artmaktadır. Aksi takdirde bromelain, keratinazlar ve fisin gibi bitki proteazlarının üretilmesi zaman almaktadır. Pepsin ve tripsin gibi hayvansal proteazlar seri olarak üretilmiş ve saf halde tüketilmiştir. Bununla birlikte, hayvan proteazlarının arzı dünyanın en yüksek endüstriyel talebini karşılamak için yetersiz olacağından, araştırmacılar çalışmalarını bakteriyel proteaz üretimine doğru genişletmişlerdir. Mikroplar, çok çeşitli biyokimyasal değişiklikler ve basit genetik manipülasyon nedeniyle çok sayıda proteaz üretmektedir (Rani *et al.* 2012, Kuhad *et al.* 2011).

2.3.3 Proteaz enzim uygulamaları

Mikrobiyal proteazların geniş çeşitliliği ve özgünlüğü, tedavi ve teşhis için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bakteriyel ve fungal proteazlar, pıhtı çözücü, kanser önleyici, antibakteriyel, iltihap önleyici ve benzeri gibi etkili terapötik bileşiklerin yaratılmasında son derece yararlı olma potansiyeline sahiptir. Proteazlar da dahil olmak üzere akut ve kronik inflamatuar ilaçlar uygun maliyetli olacak ve bilinen hiçbir yan etkisi olmayacaktır. Serratiopeptidaz, *Serratia* türlerinden türetilen iltihaplanmaya karşı özellikle etkili bir proteaz gibi görünmektedir (Sharma *et al.* 2019, Baweja *et al.* 2016).

Çok sayıda proteazın mikrobiyal kaynaklardan elde edilen antimikrobiyal özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, dermatofitoz aşıları hazırlamak için keratinize cildi parçalamak için proteazlar kullanılabilir. Bu hidrolitik enzimler travma tıbbında yara izinin giderilmesine, epitel dokularının yeniden oluşturulmasına ve iyileşme süreçlerinin hızlandırılmasına yardımcı olmak için kullanılır (Souza *et al.* 2015).

Enzimatik peptid gelişimi daha önceki yıllarda son derece arzu edilmekteydi. Birçok küçük peptit, özellikle dipeptit ve tripeptit, bakteri, mantar, bitki ve hayvanlardan türetilen proteazlar kullanılarak başarıyla üretildi. Peptit bağları, termodinamik veya kinetik olarak düzenlenmiş bir şekilde proteaz kullanılarak oluşturulur. Mikrobiyal proteazların, peptit bağı hidrolizinin yanı sıra peptit bağı oluşumu için etkili olduğu bulunmuştur. Birçok küçük peptit, özellikle dipeptit ve tripeptit, bakteri, mantar, bitki ve hayvanlardan türetilen proteazlar kullanılarak başarıyla üretilmiştir. Peptit bağları, termodinamik veya kinetik olarak düzenlenmiş bir şekilde proteaz kullanılarak oluşturulur (Razzaq *et al.* 2019, Baweja *et al.* 2016).

Mikrobiyal proteazların hem peptit bağı oluşumunda hem de peptit bağının parçalanmasında etkili olduğu gösterilmiştir. Sınırlı su sistemlerinde, mikrobiyal proteaz peptit sentezinde zaten kullanılmıştır. Enzim aracılı tekniklerle üretilen di ve tripeptitler gibi küçük peptitler, beslenme ve tıbbi ürünlerde kullanılabilir (Baweja *et al.* 2016, Kaspar, *et al.* 2008).

Süt üretiminde, kazein ve makropeptitler üretmek ve güçlü peptit bağlarını sindirmek için sıklıkla proteazlara ihtiyaç duyulur. Proteazların yumuşak doku ve kas proteinlerini hidrolize etme kapasitesi eti yumuşatmak için kullanılmaktadır. Alkali proteazlar, soya sosu ve diğer soya ürünlerinde başka bir önemli işleve sahiptir. Proteaz, hamur simetrisi oluşturmak, hamur yoğunluğunu ortadan kaldırmak, ekmeğin glüten gücünü korumak ve ekmek lezzetini/dokusunu iyileştirmek için fırınlamada kullanılır. Bu hidrolitik enzimler, sıvılardaki ve alkol bazlı likörlerdeki proteinlerden türetilen bulanıklık kompleksini çözmenin yanı sıra jelatin hidrolizi ve et proteini geri kazanımı için kullanılır (Sharma *et al.* 2019, Kaspar *et al.* 2008).

Son olarak, enzimlerin deterjanlarda kullanılması, yıkama ve çalkalama süresinin kısaltılması yoluyla çevre dostu olması gibi çeşitli avantajlar sağlar. Ancak, küçük konsantrasyonlarda bile, geniş bir pH aralığı boyunca deterjan kimyasalları olarak kullanılan enzimler ve uzun bir saklama süresine sahip sıcaklıklarda etkili olabilir (Mane *et al.* 2015, Srilakshmi *et al.* 2014).

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

Bu çalışmada aşağıdaki laboratuvar ekipmanları, aparatları, kimyasal maddeler ve kültür ortamları kullanılmıştır Çizelge 3.1, Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3.

Çizelge 3.1 Aletler ve ekipmanlar

Aparatlar	Şirket ve Ülkesi
Otoklav	Oxford (İngiltere)
Santrifüj	Hettich (Almanya)
Soğutma santrifüjü	Beckman (Amerika Birleşik Devletleri)
Soğutma mikrofüj	Hettich/Almanya
Damıtıcı	Buchi / İsviçre
Elektrik dengesi	KERN/ Almanya
Elektroforez aparatı	Cleaver / Tayvan
Gradyan termocycler	TechNet-5000 / Amerika Birleşik Devletleri
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı	Gallen Kamp (İngiltere)
Kuluçka makinesi	Gallen Kamp (İngiltere)
Işık mikroskobu	Sigma/ Amerika Birleşik Devletleri
Membrane filters (0.22µm)	Schleicher / Amerika Birleşik Devletleri
mikrosantrifüj	Hittish/ Almanya
Fırın	Memmert (Almanya)
PCR thermal cycler	Bioneer/ Kore
Faz-kontrast mikroskobu	Olympus (Japonya)
pH ölçer	Lkb / İsveç
Buzdolabı	Crafft/ Suudi Arabistan
Spektrofotometre	Schleicher / Amerika Birleşik Devletleri
Vorteks	Schleicher / Amerika Birleşik Devletleri
Su Banyosu	Memmert / Almanya

Çizelge 3.2 Kimyasal maddeler ve bileşenler

Kimyasal malzemeler	Şirket ve Ülkesi
Mutlak etanol	Merk / İngiltere
Agaroz	INC/ Kanada
Alfa-naftol	BDH/İngiltere
Katalaz, Hidrojen peroksit (H2O2)	BDH (İngiltere)
Etanol %70	BDH (İngiltere)
Etidyum bromür boya	INtRON/ Kore
Gliserol	BDH / İngiltere
Hidrojen peroksit %3	Promega/ABD
Kovac reaktifi	Himedia/Hindistan
Metanol	BDH (İngiltere)
Normal Tuz (Steril)	PSI /Suudi Arabistan
Nükleaz içermeyen su	Promega / ABD
Oksidaz reaktifi	Hi media /Hindistan
Pepton	BDH (İngiltere)
Pepton	Oxoid/İngiltere
Sephadex G-200	BDH (İngiltere)
Sodyum klorit	BDH (İngiltere)
Sodyum hidroksit	BDH (İngiltere)
TBE (Tris –Borate EDTA) Tamponu	INC/ Kanada
Tris–HCl	BDH (İngiltere)
Üre çözeltisi %40	Promega / ABD

Çizelge 3.3 Kültür ortamı

Kültür Ortamı	Şirket /Ülke
Beyin-kalp infüzyon agar	Oxoid /İngiltere
Beyin-kalp infüzyon suyu	Himedia / Hindistan
Eozin metilen mavisi (EMB)	Oxoid / İngiltere
Kligler demir agarı	Oxoid / İngiltere
MacConkey agarı	Himedia / Hindistan
Besin agarı	Oxoid / İngiltere
Besin suyu	Oxoid / İngiltere
Besin suyu	Oxoid/ İngiltere
Simmon sitrat agar	Mast / İngiltere
Üre agar tabanı	Oxoid / İngiltere

3.2 Bakteriyel İzolasyon

Bazı Bağdat hastanelerinden yüz on iki numune 3 Mayıs - 14 Haziran 2021 tarihleri arasında toplandı. Numuneler balgam, idrar, dışkı, yara ve yanık ile hastane atıklarını içermektedir. Numuneler, besleyici agar üzerinde kültürlendi ve 37°C'de 18-24 saat

süreyle inkübe edildi. Daha sonra büyüyen koloniler, tanımlama için yeni nütrient agar plakalarına aktarıldı.

3.3 Bakteriyel Tanımlama

3.3.1 Biyokimyasal testler kullanılarak bakteri tanımlaması

Toplanan örneklerden izole edilen saflaştırılmış bakteri izolatları, bakteri izolatlarını tanımlamak için birçok mikroskobik, morfolojik ve biyokimyasal testlerden geçirildi, bu testler arasında gram boyama, mikroskopta şekil, katalaz enzimi, oksidaz, endospor boyama ile spor oluşturma, üreaz enzimi, jelatin hidroliz ve IMViC testleri (indol, metil kırmızısı, voges proskauer ve sitrat testleri) bulunmaktadır. Sonuçlar bu bakterinin sonuçlarıyla karşılaştırıldı (Brooks *et al.* 2013, Jawetz *et al.* 2013, Kumar 2010).

3.3.2 VITEK 2 sistemi kullanılarak bakteri tanımlama

Üretici yönergelerine göre, Identification-Gram pozitif Bakteri (GPB) kartları kullanılarak tür düzeyinde izolatların tanımlanmasını doğrulamak için VITEK 2 sistemi kullanılmıştır. Belirli bir bilgisayar ve yazıcıya sahip VITEK 2 cihazı, sistemin bir parçasıdır. Veri analiz modülleri, VITEK 2 kompakt sistem yazılımına dahildir.

3.4 Bakteriyel İzolatların Korunması

Bu çalışmada bakteri izolatlarını aşağıdaki koşullara göre korumak için üç yöntem kullanılmıştır (Tortora 2004, WHO 2003).

- **Kısa süreli koruma**

B. subtilis izolatları nütrient agar, beyin kalp infüzyon agar, kanlı agar baz ve MacConkey besiyeri gibi temel besiyerlerinden birine aşılandı, ve sonra 37°C'de 18 saat inkübe edildi. Ardından 4°C'de birkaç hafta saklandı.

● **Orta süreli koruma**

B. subtilis izolatları beyin kalp infüzyon slant agar üzerine inoküle edildi ve 37°C'de 18 saat inkübe edildi, daha sonra 4°C'de korunup taze slant agar üzerinde yeniden kültürlenmeden önce beyin kalp infüzyon suyunda her dört ayda bir yeniden aktive edildiler.

● **Uzun süreli koruma**

Her *Bacillus subtilis* izolatı, %20 gliserol içeren BHI sıvı besi yeri içinde saf bir izole koloni ile aşılandı ve 37°C'de 40 dakika inkübe edildi. Tüp daha sonra parafin film ile sıkıca kapatıldı ve -20°C'de (derin dondurma) saklandı.

3.5 Proteaz Üreten Bakterilerin Belirlenmesi

Her bakteri izolatı, besleyici suyu ile aktive edildi ve bir yağsız süt agar besiyeri plakasına aktarılmadan önce 37°C'de 18 saat inkübe edildi ve 24 saat süreyle 37°C'de inkübe edildi. Bakteriyel izolatların proteaz üretme kapasitesi, üretici proteaz enziminin aktivitesi nedeniyle kolonilerin çevresinde berrak bir halo bölgesinin varlığı ile değerlendirildi ve maksimum berrak bölgeye sahip izolat seçildi ve en yüksek proteaz üreten bakteri olarak kabul edildi (Ruan, 2013).

3.6 Proteaz Enzimi Üretiminin Optimum Koşullarının Belirlenmesi

Optimum pH ve sıcaklık derecelerine ek olarak, en iyi proteaz üretim koşullarını veren karbon, azot ve fosfor kaynakları ve konsantrasyonları hesaplandı (Hüseyin 2016, Ruan 2013).

● **Karbon kaynağının türü**

Proteaz salgılama sürecinde hangisinin en iyi karbon kaynağı olduğunu belirlemek için ortama çeşitli karbon kaynakları (glukoz, laktoz, fruktoz ve sakaroz gibi) ilave edildi. Yüzde 0,5'lik bir nihai konsantrasyonda, bu kaynakların tümü imalat ortamına eklendi. Ortamın pH'ı, 18 saat boyunca 30°C'ye eşit bir sıcaklıkta inkübe edilmeden önce 8.0'a ayarlandı. İzole edilen bakteriden salgılanan proteaz enziminin aktivitesi, o proteinin miktarı ve proteazın spesifik aktivitesi ölçüldü.

● Karbon kaynağının konsantrasyonu

Optimum karbon kaynağı konsantrasyonunun seçilen bakteri izolatı tarafından proteaz sentezi üzerindeki etkisini araştırmak için üretim ortamına (%5, 10, 15, 2, 25, 30, 35 ve 40) konsantrasyonlarda optimum bir karbon kaynağı verildi. Optimizasyonun sonraki aşamalarında, üretim ortamını artırmak için optimum konsantrasyon kullanıldı.

● Azot kaynağı türleri

Üretim ortamında

birçok türde nitrojen kaynağı (pepton, tripton, maya özütü ve kazein) kullanılmıştır. Yüzde 0,5'lik bir nihai konsantrasyonda, *Bacillus subtilis* izolatlarında proteaz üretiminin en iyi nitrojen kaynağının hangisi olduğunu belirlemek için belirtilen tüm bu kaynaklar üretim ortamına eklenmiştir. Ortamın pH değeri 8.0 olacak şekilde modifiye edilmiş ve ardından bakteri izolatları 30°C'de 18 saat inkübe edilmiştir. Proteazın aktivitesi, proteinlerin miktarı ve proteazın spesifik aktivitesinin tümü ölçülmüştür.

● Azot kaynağının konsantrasyonu

Optimum azot kaynağı konsantrasyonunun seçilen *Bacillus* izolatı tarafından proteaz sentezi üzerindeki etkisini araştırmak için üretim ortamına 0,5, 1, 1,5, 2, 2.5 ve 3 konsantrasyonlarında optimum bir azot kaynağı verildi. Optimizasyonun sonraki aşamalarında, üretim ortamını artırmak için optimum konsantrasyon kullanıldı.

● **Fosfat kaynağı türleri**

Proteaz sentezi için optimal fosfat kaynağı, çeşitli fosfat kaynakları (Disodyum hidrojen fosfat (Na2HP04), Dipotasyum hidrojen fosfat (K2HP04), potasyum dihidrojen fosfat (KH2PO4) ve Sodyum dihidrojen fosfat (NaH2PO4)) kullanılarak belirlendi. %0.5'lik (a/h) bir nihai konsantrasyonda, tüm bu kaynaklar üretim ortamına ilave edildi. Aşağıdaki testlerde en iyi fosfat kaynağı kullanılmıştır

● **Optimum pH'ın belirlenmesi**

Üretim ortamının pH'ının farklı değerlere (4, 5, 6, 7, 8, 9 ve 10) ayarlanması ve 30°C'de 18 saat inkübe edilmesi, proteaz üretimi için optimal pH'ı verdi. Sonraki optimizasyon testlerinde en yüksek miktarda proteaz enzimi olarak görünen pH kaydedilmiştir ve proteaz sentezi için optimum pH'ı temsil etmektedir.

● **Optimum sıcaklığın belirlenmesi**

Üretim ortamı, *Bacillus subtilis* izolatları ile proteaz sentezinin optimum sıcaklığını bulmak için çeşitli sıcaklıklarda (20, 25, 30, 35 ve 40) °C'de seçilen *Bacillus* izolatı ile enfekte edildi. Sonraki optimizasyon deneyinde proteaz sentezi için optimum sıcaklık kullanıldı.

3.7 Proteaz Salgılayan Enzimin Saflaştırılması

Bacillus subtilis'in seçilmiş bakteri izolatlarından salgılanan proteaz enziminin saflaştırma işlemi, daha önce yapılan birçok çalışmaya göre belirli aşamalarda gerçekleştirilmiştir (Masi *et al.* 2021, Wang et al.2019, Hussein 2016, Salwan and Kasana 2013).

● **Proteaz üretici bakterilerden hücre içermeyen süzüntünün hazırlanması**

Yüksek proteaz üreticisi bakteriler seçildi ve enzim üretiminin optimum koşulları altında inkübe edildi, ham süzülmüş proteaz enzimi, hücresiz süzüntü elde etmek için 4°C'de 20 dakika boyunca 6000 rpm'de santrifüjlendi. Daha sonra proteaz enzimleri içeren hücresiz süzüntüler sterilize edilmiş kapta toplandı ve protein konsantrasyonları belirlendi.

● **Amonyum sülfat çökeltme**

Amonyum sülfatın çökeltilmesi, %30 ila %70 arasında değişen doyma oranlarında buz üzerinde sabit karıştırma ile ham enzime aşamalı olarak amonyum sülfatın eklenmesiyle gerçekleştirildi. Çözelti daha sonra 4°C'de 20 dakika 6000 rpm'de santrifüjlendi. Santrifüjden sonra önceden oluşturulmuş pelet 50 mL 0.05M Tris-HCl tamponu (pH8) içinde çözüldü. Son olarak, hem protein konsantrasyonunun hem de proteolitik aktivitesinin belirlenmesi gerçekleştirilmiştir.

● **Ham enzim diyalizi**

Amonyum sülfat çökeltilerinin çökeltileri, 3 saat boyunca Tris-HCl tamponuna (0.5M) karşı diyalize tabi tutuldu, daha sonra aynı tampon ile diyaliz, 10.000 MW'lık kesmelerle yapıldı.

● **Molekül ağırlığının belirlenmesi**

Albümin, sığır serum albümini, tripsin ve transferrin gibi proteazın moleküler ağırlığını ölçmek için referans proteinlerin varlığında poliakrilamid jel üzerinde elektroforez kullanıldı. Poliakrilamid jel üzerinde elektroforez yapıldıktan sonra anoda göç eden proteinlerin mesafeleri belirlendi.

3.8 Proteaz Karakterizasyonu

Bacillus subtilis bakteri izolatlarından salgılanan proteaz enziminin özellikleri Archana ve Abraham'a (2011) göre yapıldı, bu özellikler proteaz enziminin hem aktivitesi hem de stabilitesi üzerine pH ve sıcaklık etkilerini içermektedir.

● pH değerlerinin proteaz aktivitesi ve stabilitesi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi

1 mL kazein (%1 h/h) Tris-HCl tampon solüsyonu içinde aynı hacimde saflaştırılmış proteaz içeren 4'ten 10'a kadar farklı pH değerlerinde eklenmiş ve yarım saat inkübe edilmiştir, daha sonra tüpteki karışım iki kısma ayrıldı, ilk kısım proteaz aktivitesinin optimum pH değerini belirlemek için kullanıldı, ikinci kısım ise 0,5 mL kazein çözeltisine 0,5 mL enzim eklenerek proteaz stabilitesinin optimum pH değerini belirlemek için kullanıldı ve daha sonra 3 dakika buz banyosuna koyuldu.

3.9 Proteaz Enziminin Antibakteriyel Aktivitesinin Tespiti

Bazı seçilmiş yaygın patojen bakterilere karşı proteaz aktivitesi, (Anamika *et al.* 2018)'e göre kuyu difüzyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yaygın patojenik bakterilerin bazılarının bakteri süspansiyonu, bakteri süspansiyonu yapmak ve bunu yaklaşık olarak 1.5 x 108 CFU/mL olan 0.5 McFarland çözeltisine eşit yapmak için gece boyunca taze saf bakteri kolonisi 5 mL normal tuz aktarılarak hazırlandı. 100 mikron bakteri süspansiyonu biyolojik bir yayıcı ile Muller-Hinton agar plakasının tüm yüzeyleri üzerinde ayrıldı, bir agar plakası üzerinde steril bir mantar delici kullanılarak 6 mm çapında üç oyuk kesildi. Her kuyucuğa 100 mikron proteaz enzimi eklendi. Negatif kontrol olarak distile su merkeze aktarıldı. Plakalar 18 saat boyunca 37°C'de ters çevrildi ve proteaz enziminin seçili patojenik bakterilere karşı antibakteriyel aktivitelerini belirlemek için berrak bölgelerin çapları milimetre cinsinden ölçüldü.

3.10 İstatistiksel Değerlendirme

Verileri değerlendirmek için Graph-Pad Prism kullanıldı (üç kopya) ve sonuçlar ortalama S.E.M. olarak gösterildi. Farklılıklar, p 0.01'e ulaştıklarında önemli olarak değerlendirildi (Albukhaty *et al.* 2018).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Bakteri Tanımlama Sonuçları

Toplanan yüz on iki örnekten (idrar, gaita, yara, yanık ve hastane atıkları) 21 *B. subtilis* izolatının biyokimyasal test sonuçlarına göre izolasyon oranı %18,75 olarak belirlenmiştir. Çizelge 4.1, *B. subtilis* izolatlarının sonuçlarını göstermektedir. VITEK2 sonuçları, yirmi bir izolatın tamamının *B. subtilis* bakterisine ait olduğunu doğrulamıştır.

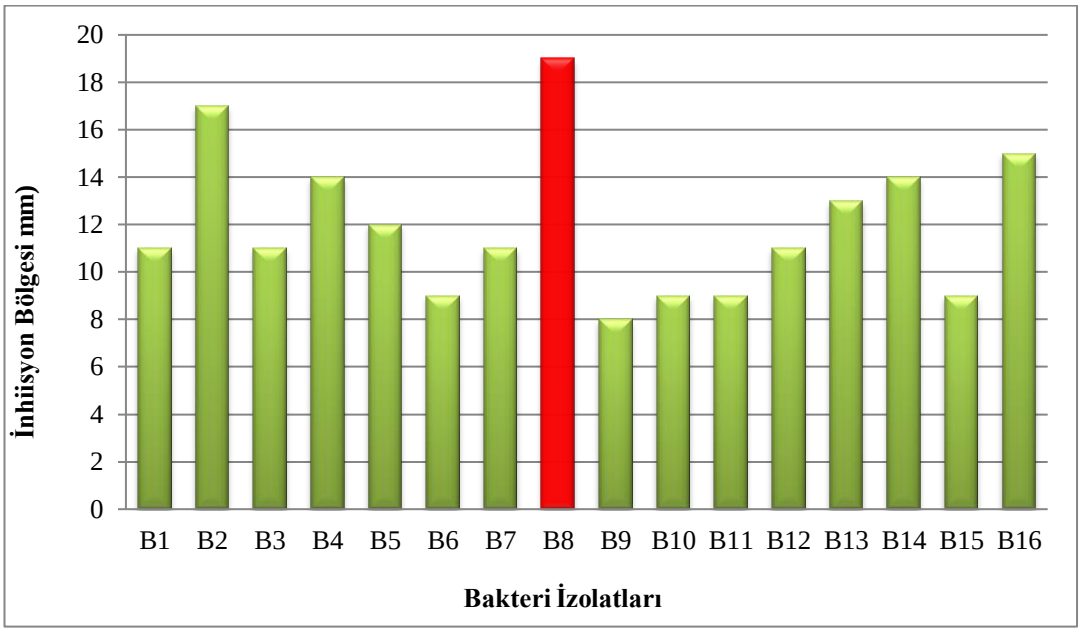
Çizelge 4.1 *Bacillus subtilis'in* mikroskobik ve biyokimyasal sonuçları

Tanımlama testleri	Sonuçlar
Indole	Negatif
Motility	Pozitif
Methyl Red	Negatif
Oxidase	Değişken
Pigment	Negatif
Shape	Çubuklar
Spore	Pozitif
Urease	Negatif
Voges Proskauer	Pozitif
Gram Staining	Pozitif
Catalase	Pozitif
Citrate	Pozitif
Flagella	Pozitif
Gelatin Hydrolysis	Pozitif

4.2 Proteaz Üreten *B. subtilis* İzolatlarının Taranması

B. subtilis toplanan izolatların klinik izolatlarının yağsız süt agar besiyerinde çoğalma ve üreme yetenekleri proteaz üretim taramaları kullanılarak belirlendi. Yağsız sütlü agarda 21 *B. subtilis* izolatı proteaz üretimi için test edildi. Sonuçlar, on altı bakteri izolatının yağsız süt agar besiyerini hidrolize edebildiğini ve koloniler etrafında farklı derecelerde bir inhibisyon veya berrak bölge oluşturabildiğini ortaya koymaktadır. Ayrıca bu bakteri izolatları proteaz üreten bakteriler olarak tanımlanmıştır. Daha önceki birçok çalışma, *B. subtilis* izolatları tarafından en yüksek proteaz üretim yüzdesini göstermiştir (Bano *et al.* 2011, Setyorini 2006).

Şekil 4.1, toplanan bakteri izolatları tarafından proteaz üretiminin sonuçlarını göstermektedir. Kaydedilen sonuçlara göre, B8 izolatı, en yüksek inhibisyon bölgesi nedeniyle proteaz üretiminin optimum koşullarını belirlemek için seçilmiştir.



Şekil 4.1 Proteaz üreticisi *B. subtilis* izolatlarının taranması.

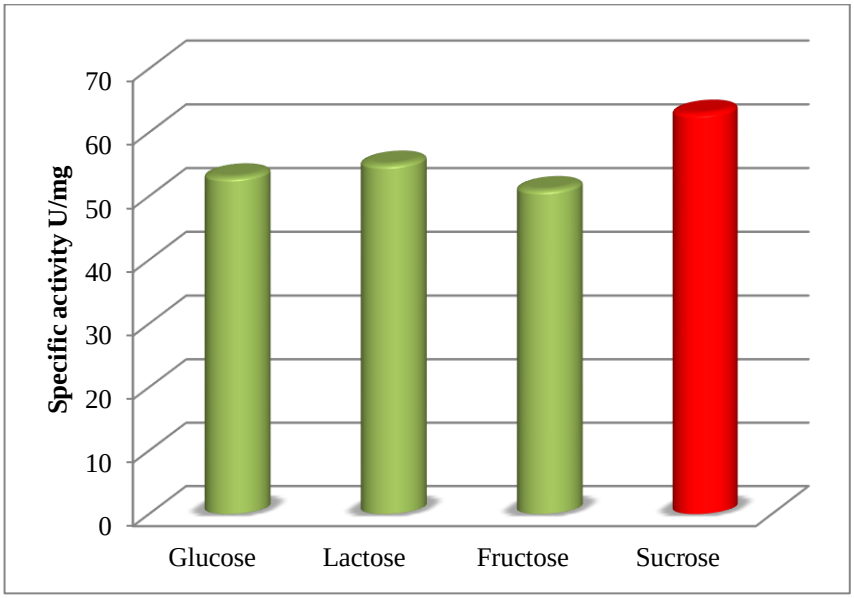
4.3 Proteaz Üretiminin Optimum Koşullarının Sonuçları

4.3.1 Optimum karbon kaynağının sonuçları

B8 izolatı ile proteaz sentezi için optimal olanı belirlemek için, tek karbon ve enerji kaynağı olarak dört karbon kaynağı (glukoz, laktoz, fruktoz ve sakaroz) kullanıldı. Sonuçlara göre, seçilen bakteri izolatları B8, Şekil 4.2'de gösterildiği gibi kültür filtratında 55 U/mg spesifik aktivite ile tek karbon ve enerji kaynağı olarak sakaroz kullanıldığında en fazla proteazı üretti. Önceki çalışmaya göre, yüzde 0,5'lik bir konsantrasyonda sakaroz, bakteri *A. hydrophila'da* proteaz sentezi için büyüme ortamının optimum karbon kaynağıydı (Oreilly and Day 1983).

Başka bir çalışma, kültür ortamına glikoz veya fruktoz eklenmesinin en düşük proteaz üretimiyle sonuçlandığını keşfetmesine rağmen (Secardes and Guijarro 1999) başka bir

araştırma, proteaz sentezi için en uygun karbon kaynağının yüzde 0,5'lik sakaroz olduğunu keşfetmiştir.

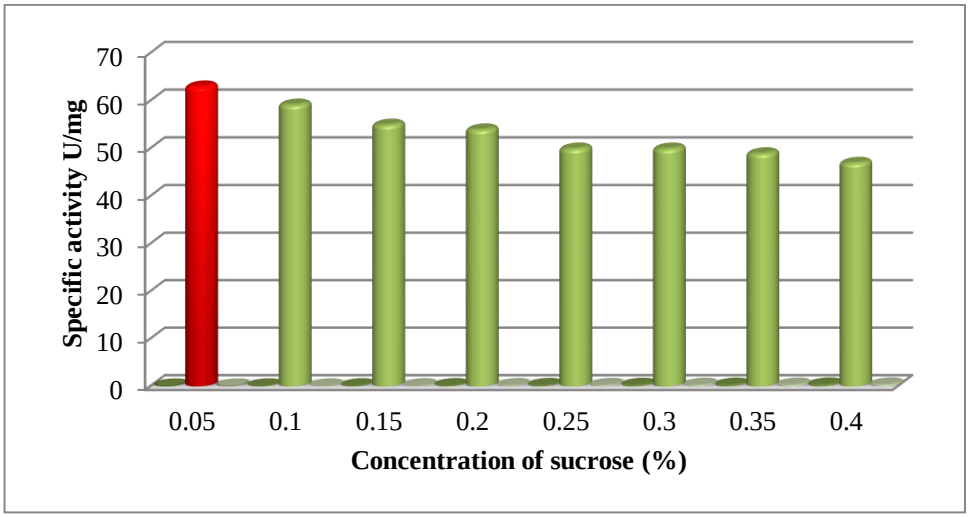


Şekil 4.2 B8'in proteaz üretiminin optimum karbon kaynağı

4.3.2 Optimum karbon konsantrasyonunun sonuçları

B8 proteaz sentezi için en iyi karbon kaynağı yüzdesini belirlemek için, proteaz üretimi için optimum sakaroz konsantrasyonunu belirlemek üzere ayrı ayrı sekiz sakaroz dozu kullanıldı (yüzde 0,05, yüzde 0,1, yüzde 0,15, yüzde 0,2, yüzde 0,25, yüzde 0,3, yüzde 0,35 ve yüzde 0,4). Sonuçlar, üretim ortamına yüzde 0,5 sakaroz eklendiğinde, B8 izolatının proteaz ürettiğini ve bu karbon kaynağı seviyesinde spesifik aktivitenin 62.3 U/mg'ye ulaştığını göstermiştir.

Bu, bir karbon konsantrasyonu olarak 0.05 sükroz konsantrasyonunun, bakterilere büyümek için ihtiyaç duyduğu enerjiyi sağlamada en etkili olduğunu göstermektedir. Mevcut sonuç, optimum karbon kaynağı konsantrasyonunun ortamın %1'inden daha az olduğunu gösteren diğer birçok sonuçla aynı sonuçtaydı ve sonuçları diğer çalışmanın sonuçlarına göre çok daha benzerdi (Şekil 4.3).

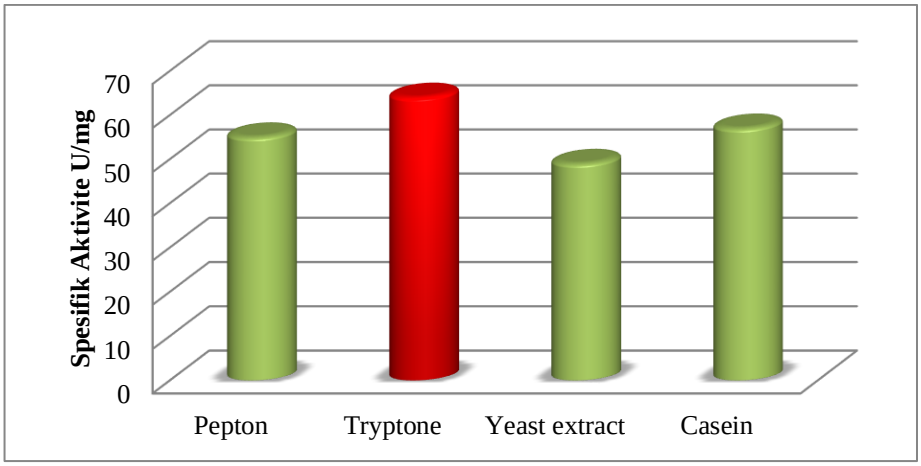


Şekil 4.3 B8'in proteaz üretiminin bir karbon kaynağı olarak sükrozun optimum konsantrasyonu

4.3.3 Optimum azot kaynağının sonuçları

B8 izolatından proteaz sentezi için en iyi nitrojen kaynağı, dört farklı nitrojen kaynağı kullanılarak belirlenmiştir. Bu nitrojen kaynakları, üretim ortamına yüzde 0,5'lik bir konsantrasyonda eklenen pepton, tripton, maya özütü ve kazeini içermektedir. Sonuçlar, nitrojen kaynağının türünün B8 proteaz sentezi üzerinde bir etkisi olduğunu göstermiştir. En yüksek proteaz üretimi, üretim ortamı tripton ile desteklendiğinde elde edilmiştir, çünkü bu nitrojen kaynağı kullanıldığında enzim spesifik aktivite 64 U/mg'ye yaklaşmış olup, en düşük proteaz üretimi ise nitrojen kaynağı olarak pepton kullanıldığında elde edilmiştir.

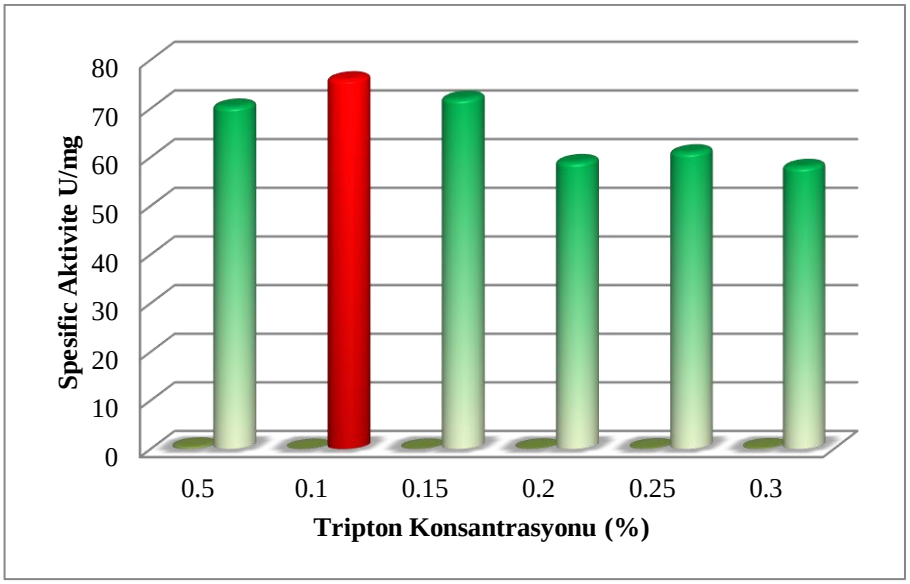
Bunun nedeni, triptonun kültür ortamında büyüme, hücre proliferasyonu ve çeşitli metabolitlerin üretilmesi ihtiyaçlarını karşılamak için mikropların diğer kaynaklardan daha kolay kullanması olabilir. Triptonun, tarafından bakteri izolatlarından proteaz sentezi için optimum nitojen kültür ortamı kaynağı olduğu keşfedilmiştir. Tripton, (Al-Taee 2005) tarafından *A. hydrophila* proteaz sentezi için optimum nitrojen kaynağı olarak keşfedilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 B8'in proteaz üretiminin optimum nitrojen kaynağı

4.3.4 Optimum nitrojen konsantrasyonunun sonuçları

B8 ile proteaz sentezi için en iyi nitrojen kaynağı seviyesini bulmak için en etkili nitrojen kaynağının (tripton) çeşitli konsantrasyonları (yüzde 0,5, 1, 1.5, 2, 2.5 ve 3) kullanıldı. Şekil 4.5, üretim ortamını %1'lik bir konsantrasyonda geliştirmek için tripton kullanılmasının en yüksek proteaz üretimiyle sonuçlandığını göstermektedir. Bu mutantın kültür filtratındaki proteazın spesifik aktivitesi, %1 oranında bir nitrojen kaynağı olarak tripton kullanıldıktan sonra 76 U/mg iken, %2 konsantrasyonda tripton kaynağı kullanıldığında en düşük aktivite 59 bulundu. (Weihua ve Chengping'e 2003) göre, üretim ortamına yüzde 0,2 oranında tripton eklendiğinde en büyük proteaz üretimi gerçekleştirilmiştir.



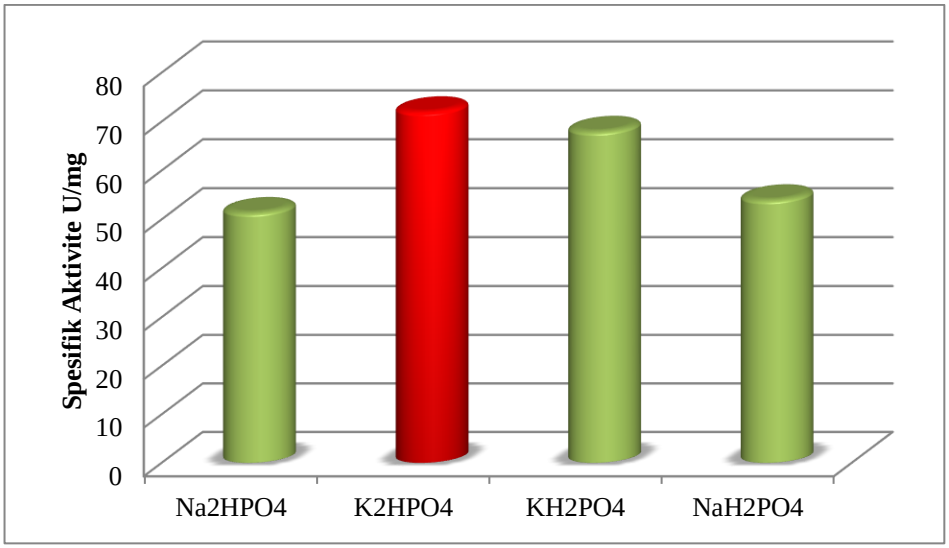
Şekil 4.5 B8'in proteaz üretiminin bir nitrojen kaynağı olarak triptonun optimum konsantrasyonu

4.3.5 Optimum fosfat kaynağının sonuçları

Fosfat kaynağının B8 proteaz sentezi üzerindeki etkisi araştırıldı. Proteaz sentezi için en iyi fosfat kaynağı, dört farklı fosfat kaynağı kullanılarak belirlendi. Bu fosfat kaynakları, üretim ortamına yüzde 0,5 konsantrasyonda eklenen Na2HP04, K2HP04, KH2P04 ve Na2HP04 idi.

Şekil 4.6, B8 tarafından üretilen proteaz miktarının, kullanılan fosfat kaynağının tipine bağlı olarak değiştiğini göstermektedir. Üretim ortamına K2HP04 eklendiğinde proteaz üretimi maksimize edildi. Enzim spesifik aktivitesi, fosfor kaynağı olarak K2HP04 kullanıldığında 72 U/mg ile Na2HP04 kullanıldığında 51.4 U/mg arasında değişmiştir.

Bu aslında, salgılama ortamının pH'ı üzerinde önemli bir etkiye sahip olan tamponlama kapasitesi üzerindeki fosfat kaynağı seviyelerinin bir sonucu olabilir. Tamponlama kapasitesi, belirli bir pH'ın korunmasını içerir, bu, tampon bileşenlerinin daha fazla partikülünün girdiğini, daha fazla sayıda H ve OH iyonunun ph seviyesini değiştirmeden gerçekten absorbe edilebileceğini gösterir (Mane, P. ve Tale, V. 2015).

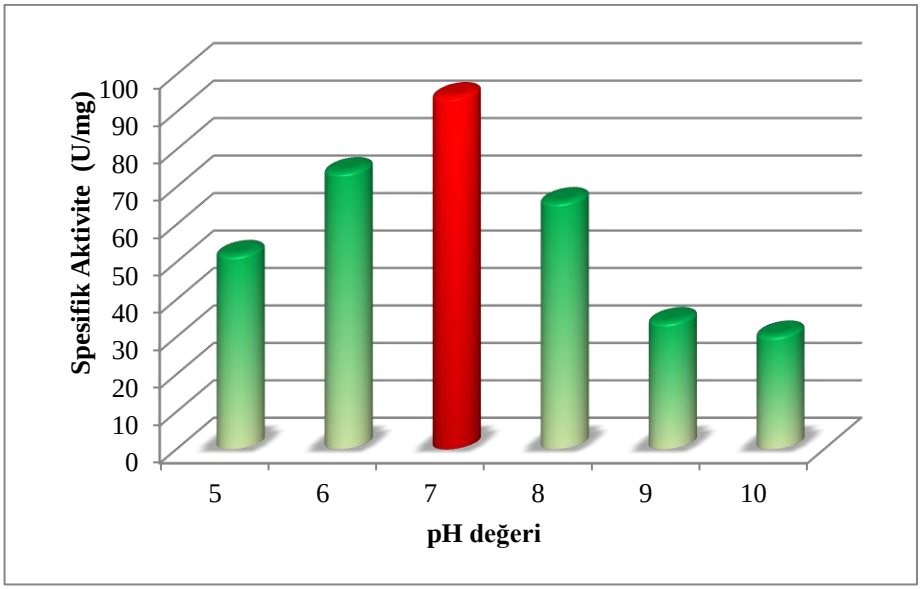


Şekil 4.6 B8'in proteaz üretiminin optimum fosfat kaynağı

4.3.6 Optimum pH değerinin sonuçları

Üretim ortamı, başlangıç ortamı pH'ının B8 izolatı tarafından proteaz sentezi üzerindeki etkisini incelemek için pH 6 ila pH 9 arasında değişen çeşitli pH değerlerine modifiye edildi. Şekil 4.7'de gösterilen sonuçlar, üretim ortamının pH'ı 7'ye değiştirildiğinde en yüksek proteaz üretimine ulaşıldığını ve enzime özgü aktivitenin 94.1 U/mg olarak kaydedildiğini göstermektedir.

Büyüme ortamındaki hidrojen iyonlarının miktarındaki bir değişiklik, proteinlerin üç boyutlu yapısında önemli değişikliklere neden olabilen pH dalgalanmaları üretir, çünkü H+ ve/veya OH-, bir enzimdeki h - bağları ve iyonik bağlar ile rekabet ederek protein bozulmasına yol açar (Tortora *et al.* 2004). pH'ın enzim sentezi üzerindeki etkisi ise, besin elementlerinin çözünürlüğündeki işlevinden, substratın iyonize etkisinden ve mikrop tarafından kullanılabilir hale gelmesinden ve oluşturulan enzimin stabilitesi üzerindeki etkisinden kaynaklanmaktadır(Yokoyama et al. 2002).

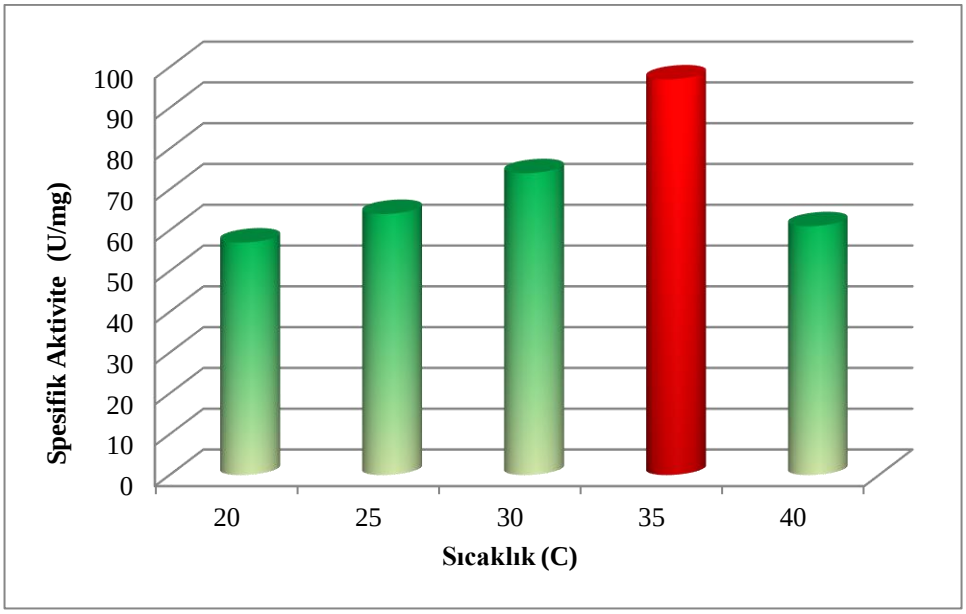


Şekil 4.7 B8'in proteaz üretiminin optimum pH değeri

Diğerleri, büyüme ortamının başlangıç ve nihai pH'ının proteaz sentezini etkilediğini belirtmişlerdir. Proteaz üretimi için içeren ortamın optimal pH'ı 6.9 ve 7 iken, pH 8.5, büyüme ve biyokütle oluşumu için uygundur (Oreilly and Day 1983). Önceki çalışma, bakterilerden proteaz üretiminde kullanılan pH aralığının bu şekilde olduğunu belirtmiştir (Secades and Guijarro 1999). Başka bir araştırma, *Aeromonas sobria* tarafından üretilen enzimler için optimal pH'ın 7.5 olduğunu bildirmiştir (Yokoyama *et al.* 2002).

4.3.7 Optimum sıcaklık derecesinin sonuçları

B8 proteaz sentezi için en uygun sıcaklığı bulmak için bu çalışmada birçok inkübasyon sıcaklığı derecesi (25, 30, 35, 37 ve 40 C) kullanılmıştır. Şekil 4.8 mikroorganizmanın en fazla proteazı 35oC'de desteklenen üretim ortamında yetiştirildiğinde ürettiğini göstermektedir. Proteaz spesifik aktivitesi bu parametreler altında 97 U/mg'ye ulaşırken, 20 C sıcaklıkta 57 U/mg idi.



Şekil 4.8 B8'in proteaz üretiminin optimum sıcaklık derecesi

Optimum sıcaklığın altındaki veya üzerindeki sıcaklıklar, herhangi bir enzim işleminin hızını önemli ölçüde sınırlayacaktır. Bunun nedeni proteinin denatürasyonu veya üç boyutlu yapısal özelliklerin kaybı olabilir. Protein denatürasyonu, hidrojen bağlarının ve diğer birçok kovalent olmayan bağın kırılmasıdır (Tortora *et al.* 2004).

Sıcaklık ayrıca ortamdaki oksijen çözünürlüğü, moleküllerin kinetik enerjisi ve moleküllerin reaksiyon hızı yoluyla mikrop gelişimini etkiler. (Weihua ve Chengping 2003) proteaz sentezi için optimal sıcaklığın 28°C olduğunu keşfettiler. (Al-Taee 2005) de bakteri proteaz üretimi için optimal sıcaklığın 30°C olduğunu belirtmiştir.

4.4 Proteaz Enzim Saflaştırmasının Sonuçları

B8, yukarıda belirtilen optimum koşullar altında üremek için seçilen bir proteaz üreten bakteri olarak kullanıldı, 0,5 mL'lik bir inokulum boyutunda 200 mL sıvı besi yeri kültürüne üretken bir kültür olarak inoküle edildi ve 200 rpm'lik bir çalkalama inkübatöründe 24 saat 37ºC'de inkübe edildi, daha sonra 4ºC 6000'de 20 dakika boyunca soğutma santrifüjü kullanılarak 6000 rpm santrifüjlendi, ardından süzme işleminden sonra süpernatan, enzimin ham ekstraktını ortaya çıkardı. Hücresiz ekstreler, %60'lık bir

doyma seviyesinde amonyum sülfat ile çökeltildi. Çizelge 4.2'de gösterildiği gibi, bu seviyenin spesifik aktivite ile sonuçlandığı, 100 U/mg protein olduğu keşfedildi. Bu sonuç, ham özüt (91.2 U/mg) ile karşılaştırıldığında spesifik aktivitenin arttığını göstermektedir.

yüzde 20 ila 60 arasında değişen konsantrasyonlarda amonyum sülfat ile çökeltme yoluyla *Bacillus subtilis'ten* proteazı kısmen saflaştırdı ve yüzde 55 amonyum sülfat çökeltmesinde görülen 740U/mL'lik yüksek bir enzimatik aktivite tespit edildi. Genel olarak, protein biyokimyasındaki en eski prosedürlerden biri, amonyum sülfat kullanarak tuzlamadır. Bir zamanlar protein fraksiyonasyonu için sıklıkla kullanılmaktaydı, bununla birlikte, şu anda çoğunlukla protein ekstraktını konsantre etmek için düşük maliyetli bir yöntem olarak kullanılmaktadır(Saito et al. 2006)

Diyaliz, Tris/HCl tamponlu 10000 moleküler ağırlık kesmeli bir diyaliz torbası kullanılarak gerçekleştirildi. Çizelge 4.2'deki sonuçlar, sırasıyla 9 ve 225 U/mg olan hem proteaz aktivitesinde hem de spesifik aktivitede bir artış gösterdi. Amonyum sülfat çökeltmesi ve diyalizden sonra, B8 izolatı tarafından üretilen negatif yüklü proteaz, iyon değişim kromatografisi kullanılarak saflaştırıldı. 280 nm'nin altındaki sonuçlar, yıkama aşaması sırasında bir protein zirvesinin oluştuğunu ortaya koydu, sonuçlar proteinlerin en yüksek proteaz aktivitesine sahip olduğunu ve 14 U/mL'ye ulaştığını gösterdi. Ayrıca, proteaz enzimi bu adımdan sonra daha fazla saflaştırılmıştır, konsantrasyon proteaz enzimi 0.02 mg/mL, proteaz aktivitesi 14 U/mL iken spesifik aktivite, Çizelge 4.2'de gösterildiği gibi 700 U/mg olmuştur.

Proteazla üretilen B8 izolatının saflaştırılmasındaki son aşama, jel filtrasyon kromatografisiydi. Proteaz aktivitesini gösteren saflaştırma aşaması fraksiyonları toplandı ve Tris-HCl tamponu ile sefakril S-200'e uygulama için iyon değiştirme saflaştırmasından sonra havuzlandı. Sephacryl S-200, (5000-300.000 D) arasında değişen ayırma sınırlarına sahiptir ve yüksek saflaştırma derecesi ile yüksek verimli ayırmaya olanak tanımaktadır. Önceki araştırma, jelin protein ayırmalarında sayısız kez yeniden kullanılmasına izin vererek, hazırlanma kolaylığı, hızlı çalışması, yüksek geri kazanımı ve uzun vadeli stabilitesi ile ayırt edildiğini göstermektedir. Son olarak, tüm parametreler

değerlendirildi, Çizelge 4.2'deki veriler, %46'ya ulaşana kadar protein veriminde azalmaya ek olarak hem saflaştırılmış enzimin aktivitesinin hem de saflaştırma katının arttığını göstermektedir.

Çizelge 4.2 B8 izolatı tarafından salgılanan proteaz enziminin saflaştırma aşamaları

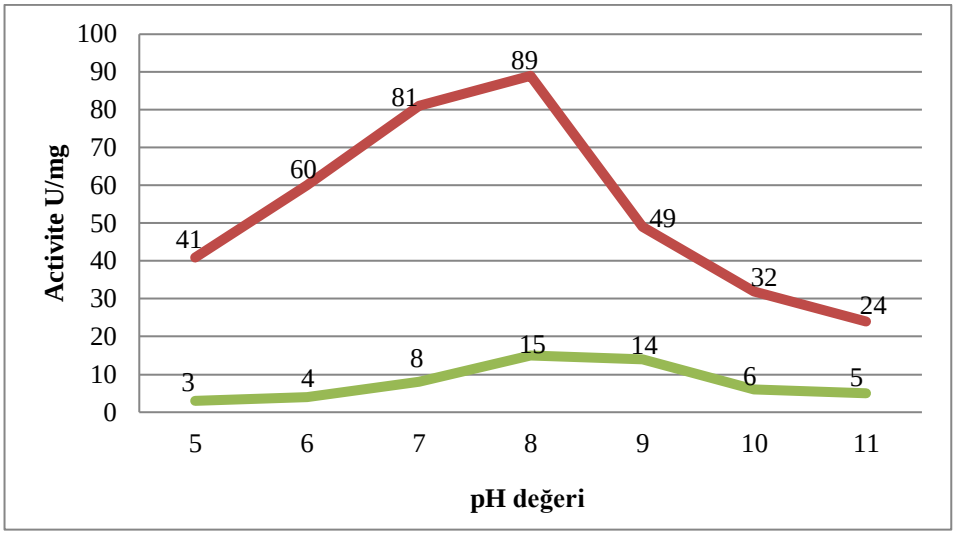
	Enzim aktivitesi	SpesifikAktivite	Toplamaktivite	Protein konsantrasyonu	Katlama	Verim
Ham enzim	6.2	70	340	0.072	1	100
Amonyum sülfat	7	95	460	0.11	1.5	68
Diyaliz	10	315	280	0.057	4.8	58
DEAE-selüloz	12	680	210	0.029	5.8	52
Ephadex-200	14	1310	140	0.017	9.8	37

4.5 Proteaz Karakterizasyonunun Sonuçları

4.5.1 Proteaz aktivitesi ve stabilitesi üzerindeki pH etkilerinin sonuçları

Proteaz aktivitesi için optimal pH, izole edilmiş proteazın pH değerleri 5 ila 11 arasında değişen tamponlarda inkübe edilmesiyle tanımlandı. Şekil 4.9, pH 5 ve pH 12 arasında daha az aktivite ile optimal pH'ın 8 olduğunu ortaya koymaktadır. Proteaz stabilitesi için optimal pH'ı bulmak için saflaştırılmış proteaz birkaç pH seviyesinde kültürlenmiştir. Enzim aktivitesinin tahlilinden sonra, kalıntı aktivite ölçüldü ve enzim bu pH'ta en fazla kalan aktiviteyi kazandığından, proteaz pH 8.5'te daha stabil göründü (Yüzde 100).

Bu gözlem, üretilen proteazın optimal aktivitesinin pH8'de olduğunu bulan önceki araştırmalarla tutarlı bulunmuştur (Yokayama *et al.* 2002)'a göre, A. sobria tarafından üretilen proteaz aktivitesi için optimal pH 7.5 idi. Başka bir araştırmada, *Yersinia ruckeri* proteazının proteaz aktivitesi için optimal pH 8.1 idi (Secades and Guijarro 1999).



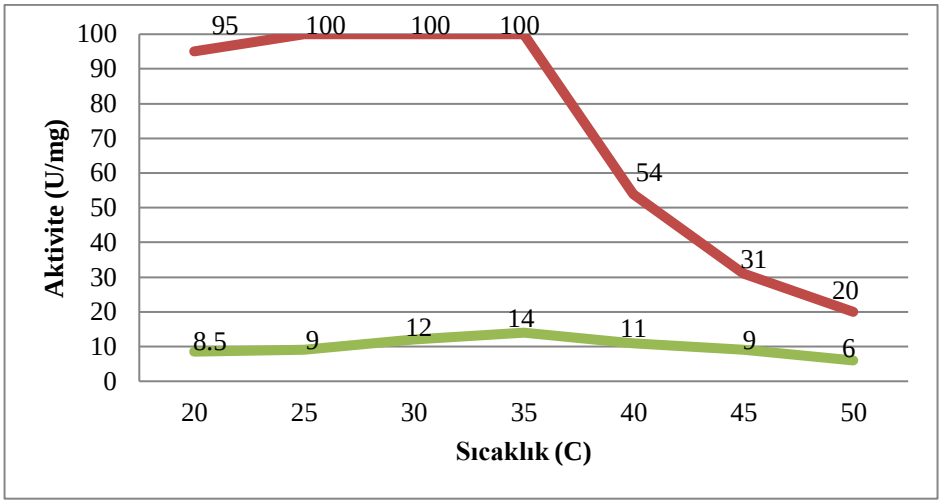
Şekil 4.9 Proteaz üretiminin aktivitesi ve stabilitesi üzerindeki pH etkileri

4.5.2 Proteaz aktivitesi ve stabilitesi üzerindeki sıcaklık etkilerinin sonuçları

Sıcaklık, enzim aktivitesi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Proteaz eylemi için optimal sıcaklık, proteaz kaynağına bağlı olarak değişir. Enzim aktivitesi, proteaz aktivitesi için en uygun sıcaklığı bulmak için 20 ila 50°C arasındaki sıcaklıklarda ölçülmüştür. Şekil 4.10'daki sonuçlar, 35°C'nin proteaz aktivitesi için optimal sıcaklık olduğunu, enzim aktivitesinin daha düşük veya daha yüksek inkübasyon sıcaklıklarında 60°C'de kaybolana kadar azaldığını göstermiştir.

Enzim, proteaz stabilitesi için en uygun sıcaklığı bulmak için çeşitli sıcaklıklarda kültürlenmiş ve enzim aktivitesi tahlil edildikten sonra kalıntı aktivite değerlendirilmiştir. Şekil 4.10, enzimin bu sıcaklıklarda maksimum kalıntı aktivite elde etmesi nedeniyle, proteazın 20 ila 50°C arasındaki sıcaklıklarda çok daha kararlı olduğunu göstermiştir (Yüzde 100).

40°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda inkübasyondan sonra artık aktivite azalmış ve proteaz aktivite kaybetmeye başlamıştır.Enzim aktivitesinin artan sıcaklıkla azalması, proteinin üç boyutlu yapısını bozarak enzimin denatürasyonuna ve rastgele polipeptit zincirlerinin oluşmasına neden olabilir. Bu, aktif bölgede, enzimin yüksek sıcaklıklarda inaktive olmasına neden olan bir modifikasyonla sonuçlanır.



Şekil 4.10 Proteaz üretiminin aktivitesi ve stabilitesi üzerindeki sıcaklık etkileri

4.6 B8 İzolatının Proteaz Enziminin Antimikrobiyal Etkilerinin Sonuçları

Staphylococcus aureus, Candida albicans, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa ve *Klebsiella pneumoniae* dahil olmak üzere çeşitli patojenik patojenlere karşı ham ve hücre dışı saflaştırılmış proteaz enziminin antibakteriyel aktivitesi çeşitlidir. *Klebsiella pneumoniae* dışında, veriler proteaz antimikrobiyal aktivitesinin Çizelge 4.3 gösterildiğini belirtmektedir. Çalışma bulguları, rafine proteazın ham proteazdan daha güçlü bir antibakteriyel etkiye sahip olduğunu göstermektedir. *S. aureus* bakterileri, sırasıyla 14 mm ve 16 mm inhibisyon bölgeleriyle hem ham hem de saflaştırılmış proteazdan en çok etkilenen zararlı bakteriler olarak belirlenmiştir. *C. albicans* mayasına karşı proteaz aktivitesi iyi olarak belirtilmiş ve inhibisyon bölgesi 12 mm ile 15 mm arasında değişmiştir, ayrıca, *P. aeruginosa*, sırasıyla 9 mm ve 12 mm inhibisyon bölgeleriyle, ham ve saflaştırılmış proteazdan en az etkilenen zararlı bakteri olmaktadır.

Çizelge 4.3 Proteaz enziminin antimikrobiyal etkileri

Patojenik bakteri	Ham enzim	Saflaştırılmış enzim
S. aureus	14	16
C. albicans	12	15
E. coli	11	14
K. pneumonia	yok	yok
P. aeruginosa	9	12

5. Önceki araştırmalar, proteazın birçok farklı tehlikeli bakteri türü üzerindeki etkisini göstermiştir. Proteaz, S. aureus üzerinde bir inhibisyon aktivitesi göstermiştir ve bu bulguya dayanarak, proteazın sadece gram pozitif bakterilere karşı antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu sonucuna varılmıştır (Indarmawan et al. 2016). Başka bir çalışma, proteazın K. pneumoniae ve S. aureus'a karşı antibakteriyel aktivitesini araştırmıştır. Enzim, 18 mm'lik bir inhibisyon bölgesi ile patojen S. aureus'u önemli ölçüde bastırmış, ancak K. pneumoniae'nin net bölgesi sadece 8 mm bulunmuştur (Rachanamol et al. 2017). K. pneumonia'nın direnci, bakteri izolatına çevresel koşullara direnme yeteneği veren kapsülü ile ilgili olabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

pH 7 ve 35oC'de sakaroz (%0.5), Tripton (%1) ve K2HP04, B. subtilis proteaz sentezi için optimal koşullardır. B8 izolatı tarafından üretilen proteaz, dört aşamada tamamen saflaştırılmıştır: amonyum sülfat çökeltmesi (yüzde 60), Selüloz selüloz ile iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyonu. Proteaz, gram pozitif ve bazı gram negatif bakterilere karşı iyi bir aktiviteye sahiptir ve Candida albicans'a karşı etkisinden dolayı bir mantar önleyici olarak kullanılabilir, ayrıca saflaştırılmış proteaz enzim aktivitesi, hem bakteri hem de maya izolatlarına karşı ham enzimden üstün bulunmuştur.

KAYNAKLAR

Akhmetova, A. I., Nyamsuren, C., Balaban, N. P. and Sharipova, M. R. 2013. Isolation and characterization of a new bacillary phytase. Bioorg. Chem, 39: 384–389.

Anamika, Albukhaty, S. Naderi-Manesh, H. Tiraihi, T. and Sakhi Jabir, M. 2018. Poly-l-lysine-coated superparamagnetic nanoparticles: a novel method for the transfection of pro-BDNF into neural stem cells. Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology, 46(3): S125-S132.

Archana, S. and Abraham, J. 2011. Comparative analysis of antimicrobial activity of leaf extracts from fresh green tea, commercial green tea and black tea on pathogens. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 1(8): 149.

Bacon, C. W., Hinton, D. M. and Hinton, A. 2006. Growth-inhibiting effects of concentrations of fusaric acid on the growth of Bacillus mojavensis and other biocontrol Bacillus species. J. Appl. Microbiol, 100: 185–194.

Bano, S., Ul Qader, S. A., Aman, A., Syed, M. N. and Azhar, A. 2011. Purification and characterization of novel α-amylase from Bacillus subtilis KIBGE HAS. AAPS PharmSciTech, 12: 255–261.

Barret, A. J. and McDonald, J. K. 1985. Nomenclature: protease, proteinase and peptidas. Biochemistry J., 237: 9-35.

Baweja, M., Tiwari, R., Singh, P. K., Nain, L. and Shukla, P. 2016. An alkaline protease from Bacillus pumilus MP 27: functional analysis of its binding model toward its applications as detergent additive. Frontiers in microbiology, 7: 1195.

Bhat, B., Chandrashekar, K. S. and Pai, A. 2021. Microbial screening: Insights into production of enzymes with emphasis on proteases. Annals of the Romanian Society for Cell Biology, 5(12): 3399-3405.

Borriss, R. 2015. Bacillus, a plant-beneficial bacterium, in Principles of Plant-Microbe Interactions, 3rd ed. B. Lugtenberg, 3: 379–391.

Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A. and Mietzner, T. A. 2013. Medical Microbiology. Jawetz , Melnick and adelberg's. 26th ed. McGraw-Hill Companies, Inc. USA.

Caulier, S., Nannan, C., Gillis, A., Licciardi, F., Bragard, C. and Mahillon, J. 2019. Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. Front. Microbiol, 10: 302.

Cedo, J. Z., Chiorean, S., Vederas, J. C. and van Belkum, M. J. 2018. The expanding structural variety among bacteriocins from Gram-positive bacteria. FEMS Microbiol. Rev, 42, 805–828.

Contesini, F. J., Melo, R. R., and Sato, H. H. 2018. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. Crit. Rev. Biotechnol, 38: 321–334.

Errington, J. and Aart, L. T. 2020. Microbe Profile: *Bacillus subtilis*: model organism for cellular development, and industrial workhorse. Microbiology, 166 (5): 425–427.

Euzéby, J. P. 2008. *Bacillus*. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature.

Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J. and Stanković, S. 2018. Biological control of plant pathogens by *Bacillus species*. J. Biotechnol, 285: 44–55.

Gupta, G. N., Srivastava, S., Khare, S. K. and Prakash, V. 2014. Extremophiles: an overview of microorganism from extreme environment. International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology, 7(2): 371.

Harwood, C. R. and Cranenburgh, R. 2008. *Bacillus* protein secretion: an unfolding story. Trends Microbiol, 16: 73–79.

Hoge, R., Pelzer, A., Rosenau, F. and Wilhelm, S. 2010. Weapons of a pathogen: protease and their role in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. Institute of Microbiology and Biotechnology, UIM- University, Germany, (12): 111-120

Hussein, H. A. 2016. Production and purification of protease from mutant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical samples. MSc. Thesis, Al-Nahrain University, 45 page, Iraq.

Jawetz, G. F., Melnick, E. J. and Adelberg, E. A. 2013. Jawetz, Melnick and Adelberg's medical microbiology (26th edition). New York : London: McGraw-Hill Medical , McGraw-Hill

Kaspar, F., Neubauer, P. and Gimpel, M. 2019. Bioactive secondary metabolites from *Bacillus subtilis*: a comprehensive review. J. Nat. Prod, 82: 2038–2053.

King, J. V., Liang, W. G., Scherpelz, K. P., Schilling, A. B., Meredith, S. C. and Tang, W. 2014. Molecular basis of substrate recognition and degradation by human presequence protease. Structure, 22 (7): 996–1007.

Klaenhammer, T. R., Barrangou, R., Buck, B. L., Azcarate-Peril, M. A. and Altermann, E. 2005. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. FEMS Microbiol Rev, 29: 393–409.

Kuebutornye, F. K. A., Abarike, E. D. and Lu, Y. 2019. A review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture. Fish Shellfish Immunol, 87: 820–828.

Kuhad, R. C., Gupta, R. and Singh, A. 2011. Microbial cellulases and their industrial applications. Enzyme Res, 11: 280-296.

Kumar, N., Singh, R. K., Mshra, S. K., Singh, A. K. and Pachaori, U. P. 2010. Isolation and Screening of Soil Actinomycetes as Source of Antibiotics Active Against Bacteria, International Journal of Microbiology, 2 (2): 12-16.

Latorre, J. D., Hernandez-Velasco, X., Wolfenden, R. E., Vicente, J. L., Wolfenden, A. D., Menconi, A. and Tellez, G. 2016. Evaluation and selection of *Bacillus species* based on enzyme production, antimicrobial activity, and biofilm synthesis as direct-fed microbial candidates for poultry. Frontiers in veterinary science, 3: 95.

Ling F. Z., Xu, Z. R., Li, W. F., Shuai, J. B., Lu, P. and Hu, C. X. 2007. Protein secretion pathways in *Bacillus subtilis*: implication for optimization of heterologous protein secretion. Biotechnology advances, 25(1): 1-12.

Liu, Y., Kyle, S. and Straight, P. D. 2018. Antibiotic stimulation of a *Bacillus subtilis* migratory response. mSphere 3, 4(4): 6-17.

Liu, Y., Li, J., Du, G., Chen, J. and Liu, L. 2017. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* fueled by systems biology: recent advances and future directions. Biotechnol Adv, 35: 20–30.

Indarmawan, Mustopa, Budiarto, & Tarman, 2016. purified enzyme was completely inhibited by phenylmethylsulfonyl fluoride.

Mane, P. and Tale, V. 2015. Overview of microbial therapeutic enzymes. Int J Curr Microbiol App Sci, 4(4): 17-26.

Masi, C., Gemechu, G. and Tafesse, M. 2021. Isolation, screening, characterization, and identification of alkaline protease-producing bacteria from leather industry effluent. Ann. Microbiol, 91: 124

Mienda, B. S., Yahya, A., Galadima, I. A. and Shamsir, M. S. 2014. An overview of microbial proteases for industrial applications. Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci, 5: 388–396.

Mitrofanova, O., Mardanova, A., Evtugyn, V., Bogomolnaya, L. and Sharipova, M. 2017. Effects of *Bacillus* serine proteases on the bacterial biofilms. Biomed. Res. Int, 17: 85-91.

Oreilly and Day1983, Oda, K. 2012. New families of carboxyl peptidases: serine-carboxyl peptidases and glutamic peptidases. Journal of Biochemistry, 151(1): 13–25.

Paul, S. I., Rahman, M. M., Salam, M. A., Khan, M. A. and Islam, M. T. 2021. Identification of marine sponge-associated bacteria of the Saint Martin's island of the Bay of Bengal emphasizing on the prevention of motile *Aeromonas septicemia* in *Labeo rohita*. Aquaculture, 545: 737156.

Peng, Y., Yang, X. J., Xiao, L. and Zhang, Y. Z. 2004. Cloning and expression of a fibrinolytic enzyme (subtilisin DFE) gene from *Bacillus* amyloliquefaciens DC-4 in *Bacillus subtilis*. Res. Microbiol, 155: 167–173.

Plotnikov, M. B., Dygai, A. M., Aliev, O. I., Chernyshova, G. A., Smol'yakova, V. I., Vasil'ev, A. S. and Madonov, P. G. 2009. Antithrombotic and Thrombolytic Effects of a New Proteolytic Preparation Trombovazim (Russia). Bulletin of experimental biology and medicine, 147(4): 438-440.

Rani, K., Rana, R. and Datt, S. 2012. Review on latest overview of proteases. Int. J. Curr. Life Sci, 2: 12–18.

Rawlings, N. D., Morton, F. R. and Barrett, A. J. 2006. MEROPS: the peptidase database. Nucleic acids research, 34: 270-272.

Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A. and Ashraf, M. 2019. Microbial proteases applications. Front bioeng Biotechnol, 7: 110.

Ruan, J. 2013. Bergey's manual of systematic bacteriology volume 5 and the study of actinomycetes systematic in China. Acta microbiologica Sinica, 53(6): 521-530.

Saito, Y., Taguchi, H. and Akamatsu, T. 2006. DNA taken into Bacillus subtilis competent cells by lysed-protoplast transformation is not ssDNA but dsDNA". Journal of Bioscience and Bioengineering, 101(4): 334–339.

Salwan, R. and Kasana, R. C. 2013. Purification and characterization of an extracellular low temperature-active and alkaline stable peptidase from psychrotrophic *Acinetobacter sp.* MN 12 MTCC (10786). Indian journal of microbiology, 53(1): 63-69.

Setyorini, E., Takenaka, S., Murakami, S. and Aoki, K. 2006. Purification and characterization of two novel halotolerant extracellular protease from *Bacillus subtilis* strain FP-133. Biosci. Biotechnol. Biochem, 70: 433–440.

Sharma, M., Gat, Y., Arya, S., Kumar, V., Panghal, A. and Kumar, A. 2019. A review on microbial alkaline protease: an essential tool for various industrial approaches. Industrial Biotechnology, 15(2): 69-78.

Secardes and Guijarro 1999 Shortt, C. 2005. Perspectives on foods for specific health uses. Food Science and Technology Bulletin : Functional Foods, 1: 7.

Skoreński, M. and Sieńczyk, M. 2013. Viral proteases as targets for drug design. Current Pharmaceutical Design, 19(6): 1126–53.

Song, Y., Nikoloff, J. M. and Zhan, D. 2015. Improving protein production on the level of regulation of both expression and secretion pathways in *Bacillus subtilis*. Journal of microbiology and biotechnology, 25(7): 963-977.

Souza, P. M. D., Bittencourt, M. L. D. A., Caprara, C. C., Freitas, M. D., Almeida, R. P. C. D., Silveira, D. and Magalhães, P. O. 2015. A biotechnology perspective of fungal proteases. Brazilian Journal of Microbiology, 46(2): 337-346.

Srilakshmi, J., Madhavi, J., Lavanya, S. and Ammani, K. 2015. Commercial potential of fungal protease: past, present and future prospects. Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences, 2(4): 218-234.

Su, Y., Liu, C., Fang, H. and Zhang, D. 2020. *Bacillus subtilis*: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. Microbial cell factories, 19(1): 1-12.

Tortora, G. J., Funke, B. R., Case, C. L. and Johnson, T. R. 2004. Microbiology: an introduction, 9: 123-125.

Turnbull, P. C. B. and Kramer, J. M. 1985. Intestinal carriage of *Bacillus cereus*: faecal isolation studies in three population groups. Epidemiology & Infection, 95(3): 629-638.

Wang, H., Zhang, X., Qiu, J., Wang, K., Meng, K., Luo, H. and Yao, B. 2019. Development of *Bacillus* amyloliquefaciens as a high-level recombinant protein expression system. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 46(1): 113-123.

Wassmann, M., Moeller, R., Rabbow, E., Panitz, C., Horneck, G., Reitz, G. and Rettberg, P. 2012. Survival of spores of the UV-resistant *Bacillus subtilis* strain MW01 after exposure to low-earth orbit and simulated martian conditions: data from the space experiment ADAPT on EXPOSE-E. Astrobiology, 12(5): 498-507.

World Health Organization. 2003. Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. 2nd ed. Geneva, Switzerland.

Yokoyama, R., Sirasawa, M., & Pike, R. (2002). Visualizing Topography by Openness: A New Application of Image Processing to Digital Elevation Models. Photogrammetric Engineering and Remote Sensing, 68, 257-265.

Yilmaz, N. K., Swanstrom, R. and Schiffer C. A. 2016. Improving Viral Protease Inhibitors to Counter Drug Resistance. Trends in Microbiology, 24 (7): 547–557.

Zhang, K., Su, L. and Wu, J. 2020. Recent advances in recombinant protein production by *Bacillus subtilis*. Annual Review of Food Science and Technology, 11: 295-318.

Zhao, L., Chen, J., Sun, J. and Zhang, D. 2017. Multimer recognition and secretion by the non-classical secretion pathway in *Bacillus subtilis*. Scientific reports, 7(1): 1-18.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Saif Shamsaldeen Mohammed AL-GBURI

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2020-Halen
Lisans	Al Farabi Üniversitesi Fen Bilimleri Fakültesi Biyoloji Bölümü	2015-2019