T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TOPRAKTAN İZOLE EDİLEN *Bacillus subtilis* A8'DEN PROTEAZ ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

DUYGU ÇELİK ALGÜL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR
Haziran-2019

T.C

DİCLE UNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

DİYARBAKIR

Duygu ÇELİK ALGÜL tarafından yapılan "Topraktan İzole Edilen *Bacillus subtilis* A8'den Proteaz Üretimi ve Karakterizasyonu" konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir

Jüri Üyesinin

Ünvanı	Adı Soyadı
Başkan: Prof. Dr.	Veysel TOLAN
Üye : Doç. Dr.	Sema FİNCAN
Üye : Dr. Öğr. Üyesi	Nurullah AKCAN

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 08/07/2019

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

...../...../20

Prof. Dr. Sevtap SÜMER EKER

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmalarımın her aşamasında yardımını, bilimsel desteğini, tecrübelerini, ilgisini, sabrını benden esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Sema AGÜLOĞLU FİNCAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel aşamada ve tez yazım aşamasında ihtiyaç duyduğum yardımı esirgemeyen değerli arkadaşlarım Dr. Ögr. Üyesi Barış ENEZ ve Veysi ORTAKAYA ile tez çalışması boyunca her konuda yardımını, manevi desteğini gördüğüm değerli doktora arkadaşım Nazenin AHMETOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım boyunca hep yanımda olup sürekli gösterdikleri fedakârlıktan ötürü canım aileme ve biricik eşim Bulut ALGÜL'e sonsuz şükranlarımı sunarım.

Duygu ÇELİK ALGÜL

Temmuz 2019

İÇİNDEKİLER

		Sayfa
TEŞEKKÜR		I
İÇİNDEKİLER		II
ÖZET		V
ABSTRACT		VI
ÇİZELGE LİSTESİ		VII
ŞEKİL LİSTESİ		VIII
KISALTMA VE SİMGELER		IX
1.	**GİRİŞ**	1
1.1.	Biyoteknoloji	1
1.2.	Enzimler	2
1.3.	Proteazlar	4
1.4.	Proteazların Sınıflandırılması	4
1.4.1.	Ekzopeptidazlar	5
1.4.2.	Endopeptidazlar	5
1.4.2.1.	Serin Proteazlar	6
1.4.2.2.	Sistein Proteazlar	6
1.4.2.3.	Aspartik Proteazlar	7
1.4.2.4.	Metalo Proteazlar	7
1.5.	Proteazların Başlıca Kullanım Alanları	7
1.6.	*Bacillus*'lar	10
2.	**KAYNAK ÖZETLERİ**	13
3.	**MATERYAL VE METOT**	25
3.1.	Materyal	25
3.1.1	Biyolojik Materyal	25
3.1.2	Kimyasal Maddeler	25
3.1.2.1.	Besiyeri Maddeleri	25
3.1.2.2.	Azot Kaynakları	25
3.1.2.3.	Karbon Kaynakları	25
3.1.2.4.	Kimyasallar ve Deterjanlar	25
3.1.3.	Cihaz	26
3.1.4.	Bakteri İzolasyonu ve Tanımlamasında Kullanılan Besiyerleri	26
3.1.4.1.	Sıvı Besiyeri	26
3.1.4.2.	Katı Besiyeri	26

3.1.4.3. Üreaz Agar Besiyeri..... 26
3.1.4.4. Kazein Besiyeri..... 26
3.1.5. Kullanılan Çözeltiler..... 27
3.1.5.1. Kristal Viyole Çözeltisi..... 27
3.1.5.2. Lugol Çalışma Solüsyonu..... 27
3.1.5.3. Sulu Fuksin Solüsyonu..... 27
3.1.5.4. Alkalin Çözeltisi..... 27
3.1.6. Tamponlar..... 27
3.2. Metot..... 27
3.2.1. *Bacillus subtilis* A8'in Eldesi ve Tanımlanması..... 27
3.2.2. Gram Boyama..... 28
3.2.3. Biyokimyasal Testler..... 28
3.2.4. Proteaz Eldesi..... 29
3.2.5. Proteaz Aktivitesi Tayini..... 29
3.2.6. Protein Miktar Tayini..... 30
3.2.7. *Bacillus subtilis* A8 Üretim Ortamının Optimizasyonu..... 31
3.2.7.1. İnkübasyon Sürelerinin *Bacillus subtilis* A8 Üremesi Üzerine Etkisi..... 31
3.2.7.2. Sıcaklığın *Bacillus subtilis* A8 Üremesine Etkisi..... 31
3.2.7.3. pH'ın *Bacillus subtilis* A8 Üremesine Etkisi..... 31
3.2.8. *Bacillus subtilis* A8'den Elde Edilen Proteazın Optimizasyonu..... 31
3.2.8.1. İnkübasyon Süresinin Proteaz Üretimine Etkisi..... 31
3.2.8.2. Sıcaklığın Proteaz Üretimi Üzerine Etkisi..... 31
3.2.8.3. pH'ın Proteaz Üretimi Üzerine Etkisi..... 32
3.2.8.4. Farklı Karbon ve Azot Kaynaklarının Proteaz Üretimine Etkisi..... 32
3.2.9. Proteaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması..... 32
3.2.9.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi..... 32
3.2.9.2. Diyaliz..... 33
3.2.10. Kısmi Saflaştırılan Proteazın Sıcaklık Stabilitesinin Saptanması..... 33
3.2.11. Kısmi Saflaştırılan Proteazın pH Stabilitesinin Saptanması..... 33
3.2.12. Bazı Deterjanların Kısmi Saflaştırılan Proteaz Aktivitesi Üzerine Etkisi..... 33
3.2.13. Kısmi Saflaştırılan Proteaz Aktivitesi Üzerine Bazı İnhibitörlerin Etkisi..... 34
4. ARAŞTIRMA BULGULARI..... 35
4.1. *Bacillus subtilis* A8'in İzolasyonu ve Tanımlanması..... 35
4.1.1. *Bacillus subtilis* A8'in İzolasyonu..... 35
4.1.2. Gram Boyama..... 36
4.1.3. Biyokimyasal Testler..... 37

4.2.	*B. subtilis* A8 'in Üretim Ortamının ve B. subtilis A8'den Elde Edilen Proteazın Optimizasyonu.....	41
4.2.1.	İnkübasyon Sürelerinin *B. subtilis* A8 Üremesine ve Proteaz Üretimine Etkisi.....	41
4.2.2.	Sıcaklığın *B.subtilis* A8 Üremesine ve Proteaz Üretimine Etkisi.....	41
4.2.3.	pH'ın *B. subtilis* A8 Üremesine ve Proteaz Üretimine Etkisi.....	42
4.2.4.	Karbon ve Azot Kaynaklarının Proteaz Üretimine Etkisi.....	43
4.3.	Proteaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması.....	45
4.3.1.	Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz.....	45
4.4.	Kısmi Saflaştırılan Proteazın Sıcaklık Stabilitesinin Saptanması.....	46
4.5.	Kısmi Saflaştırılan Proteazın pH Stabilitesinin Saptanması.....	46
4.6.	Bazı Deterjanların Kısmi Saflaştırılan Proteaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	47
4.7.	Kısmi Saflaştırılan Proteaz Aktivitesi Üzerine Bazı İnhibitörlerin Etkisi.....	48
5.	**TARTIŞMA VE SONUÇ**.....	49
6.	**KAYNAKLAR**.....	57
ÖZGEÇMİŞ.....		65

ÖZET

TOPRAKTAN İZOLE EDİLEN *Bacillus subtilis* A8'DEN PROTEAZ ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Duygu ÇELİK ALGÜL

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2019

Bu çalışmada, Ergani Makam Dağı'ndan alınan toprak örneğinden bakteri izole edildi. İzole edilen bakteri biyokimyasal ve 16S rRNA analizleri yardımıyla *Bacillus subtilis* A8 olarak tanımlandı. Bakteri üremesinin optimum koşulları 24. saat, 37°C ve pH 9.0 olarak belirlendi. Proteaz aktivitesine bakıldığında optimum üretim zamanı 24 saat, optimum sıcaklık 37°C, optimum pH ise 9.0 olarak tespit edildi.

Bakterinin üretim ortamına karbon ve azot kaynakları ilave edilerek proteaz üretimi üzerine etkisi araştırıldı. Karbon kaynaklarında; nişasta, glukoz, maltoz, laktozun proteaz üretiminde kontrole göre yaklaşık üç kat artış, galaktoz ilavesiyle de enzim üretiminde azalış gözlendi. Azot kaynakları içinde en yüksek değere üre ile ulaşılırken amonyum sülfat etkisi ile de enzim üretiminde önemli ölçüde inhibisyon tespit edildi.

Enzimin optimum koşulları belirlendikten sonra kısmi saflaştırma gerçekleştirildi. Kısmi olarak saflaştırılan enzim üzerine %0.5'lik SDS, BRIJ, Tween- 40, Tween-80 ve TritonX-100 kullanılarak deterjan etkisi araştırıldı. SDS'nin proteaz aktivitesini %80 oranında inhibe ettiği görülürken diğer deterjanların enzim aktivitesi üzerine önemli bir etki yapmadığı tespit edildi. Kısmi saflaştırılması yapılan proteaz üzerine inhibitör etkisi incelendiğinde; EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit), PMSF (Fenilmetilsulfonil florid), DTT (Ditiyothreitol ve β-merkaptoetanol gibi inhibitörler arasında en yüksek inhibisyon etkisi 10 mM PMSF (%92) ile elde edildi.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus subtilis* A8, proteaz, üretim, kısmi saflaştırma.

ABSTRACT

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF PROTEASE FROM *Bacillus subtilis* A8 ISOLATED FROM SOIL

MSc THESIS

Duygu ÇELİK ALGÜL

DEPARTMENT OF BIOLOGY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF DICLE

2019

In this study, bacteria were isolated from soil sample taken from Mount Ergani Authority. Bacteria which isolated with the help of biochemical tests and 16S rRNA analysis defined as Bacillus subtilis A8. Optimal conditions of bacterial growth were determined at 24th hour, 37°C and pH 7.0, respectively. Optimum production time was 24 hours, optimum temperature was 37°C and optimum pH was 9.0.

Carbon and nitrogen sources were added to the production medium of the bacteria to investigate their effect on the production of protease. In carbon resources; starch, glucose, maltose, lactose protease production of approximately three-fold increase, galactose addition of enzyme production was observed to decrease. Among the nitrogen sources, the highest protease activity was reached with urea, while the addition of ammonium sulfate decreased the enzyme production significantly.

After optimum conditions was determined, the enzyme partial was purified. To determine the effect of some detergents on the partially purified enzyme 0.5% SDS, Tween-40, Tween-80 and TritonX-100, BRIJ was used. While it was seen that SDS inhibited protease activity by 80%, it was found that other detergents had no significant effect on enzyme activity. When the effect of inhibitors such as EDTA (Ethylenediamintetra acetic acide), PMSF (Phenylmethylsulfonyl flüoride), DTT (Dithiothreitol) and β-mercaptoethanol on the partially purified protease was examined, the highest inhibition effect was obtained with 10 mM PMSF (92%).

Key Words: *Bacillus subtilis* A8, protease, production, partial purification.

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge No		Sayfa
Çizelge 1.1.	Endüstriyel enzimler ve kullanım alanları (Önal 2010)	**3**
Çizelge 1.2.	Proteazların Sınıflandırması (Rao ve ark. 1998)	**5**
Çizelge 4.1.	*B. subtilis* A8'in tanımlanmasında kullanılan test sonuçları	**37**
Çizelge 4.2.	İnhibitörlerin Proteaz Üzerindeki Etkisi	**48**

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 3.1.	Proteaz Aktivitesi Tayin Yöntemi	**30**
Şekil 4.1.	*Bacillus subtilis* A8'in koloni görünümü	**35**
Şekil 4.2.	*Bacillus subtilis* A8'in filogenetik ağacı	**36**
Şekil 4.3.	*B. subtilis* A8'in Gram boyama görüntüsü	**36**
Şekil 4.4.	*B. subtilis* A8'in fosfataz testi	**37**
Şekil 4.5.	*B. subtilis* A8'in katalaz testi	**38**
Şekil 4.6.	*B. subtilis* A8'in üreaz testi	**39**
Şekil 4.7.	*B. subtilis* A8'in hareket testi	**39**
Şekil 4.8.	*B. subtilis* A8'in hemoliz testi	**40**
Şekil 4.9.	*B. subtilis* A8'in kazein testi	**40**
Şekil 4.10.	İnkübasyon Sürelerinin *B. subtilis* A8 Üremesi ve Proteaz Üretimi Üzerine Etkisi	**41**
Şekil 4.11.	Sıcaklığın *B. subtilis* A8'in Üremesi ve Proteaz Üretimi Üzerine Etkisi	**42**
Şekil 4.12.	pH'nın *B. subtilis* A8'in Üremesi ve Proteaz Üretimi Üzerine Etkisi	**43**
Şekil 4.13.	Farklı Karbon Kaynaklarının Proteaz Üretimine Etkisi	**44**
Şekil 4.14.	Farklı Azot Kaynaklarının Proteaz Üretimine Etkisi	**45**
Şekil 4.15.	Kısmi Saflaştırılan Proteazın Sıcaklık Stabilitesi	**46**
Şekil 4.16.	Kısmi Saflaştırılan Proteazın pH Stabilitesi	**47**
Şekil 4.17.	Deterjanların Kısmi Saflaştırılan Proteaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	**47**

KISALTMA VE SİMGELER

NB	:	Nutrient broth
NBA	:	Nutrient Broth Agar
FCR	:	Folin-Ciocalteu reaktifi
PMSF	:	Phenylmethylsulfonyl fluoride
DTT	:	Dithiothreitol
EDTA	:	Ethylenediamintetra acetic acid
TCA	:	Trichloro acetic acid
SDS	:	Sodyum dodesil sülfat 3, 5
rpm	:	Dakikadaki devir sayısı
U/mg	:	Ünite/miligram
OD	:	Optik density
mM	:	Milimolar
M	:	Molarite
g	:	Gram
L	:	Litre
µl	:	Mikrolitre
nm	:	Nanometre
µmol	:	Mikromol
MA	:	Molekül ağırlığı
dk	:	Dakika

1. GİRİŞ

1.1. Biyoteknoloji

Biyoteknoloji, ilk olarak 1919 yılında Macar mühendisi Karoly Ereky tarafından "Biyolojik sistemler aracılığıyla hammaddelerin yeni ürünlere dönüştürülmesi işlemleridir" şeklinde tanımlamıştır (Fari ve Kralovansky 2006). Tarihsel süreç içinde geleneksel ve modern biyoteknoloji olmak üzere 2 döneme ayrılmıştır (Erçetin 1999). Geleneksel biyoteknoloji 'Fermantasyon teknolojisi' ağırlıklı olup bu dönemde biyolojik sistemler, sirke, peynir, yoğurt, ekmek, çeşitli alkollü içkiler gibi maddelerin üretilmesinde kullanılmıştır. Modern biyoteknoloji ise mutant ya da transgenik organizmaların endüstri ve diğer alanlarda kullanılması şeklinde modern tekniklerin biyolojik sistemlere uygulanmasına ilişkin çalışmaları kapsamaktadır.

Bugün, biyoteknoloji denildiğinde ilk akla gelen daha çok, genetik ve embriyonik manipulasyonların da içinde bulunduğu "Moleküler genetik ve rekombinant DNA teknolojisi"dir. Bu bağlamda 20. yüzyılın son yıllarında biyoteknoloji, uygulamalı ve disiplinler arası bir alan olarak tanımlanmaktadır. Bu gelişmelere paralel olarak 1982 yılında, Avrupa Ekonomik İşbirliği Örgütü (OECD)'nün raporunda ise "Temel bilimlerin ve mühendislik ilkelerinin, ham maddelerin biyolojik araçlar yardımı ile ürünlere dönüştürüldüğü süreçlere uygulandığı bir teknoloji" olarak ifade edilmiştir.

2000'li yıllarda biyoteknoloji ile ilgili çalışmalar altın çağını yaşamakta ve kozmetikten sağlığa, tarımdan madenciliğe kadar pek çok alanda biyoteknoloji kullanılmaktadır (Bayraç ve ark 2011).

Biyoteknoloji kullanım alanlarına göre çeşitli şekillerde isimlendirilir; tarım, hayvancılık, tıbbi, gıda, mikrobiyal ve endüstriyel biyoteknoloji vb. çevresel ya da beyaz biyoteknoloji olarak da bilinen endüstriyel biyoteknoloji; yenilenebilir kaynakları, canlı hücreleri ve enzimleri kullanarak minimum oranda atık üretimi ve enerji tüketimi ile daha temiz prosesleri ortaya koymayı amaçlamaktadır (Maury ve ark. 2005).

1.2 Enzimler

Enzimler binlerce yıldır bilinçsizce de olsa insanlar tarafından peynir, ekmek, yoğurt, bira ve şarap yapımında kullanılmışlardır. İlk bulgular eski Mısır'a kadar dayanmaktadır.

Biyoteknolojik işlemlerin gelişmesi ile endüstriyel enzimlerin gerek üretiminde gerekse kullanımında önemli artış dikkat çekmektedir. Enzimlerin kullanıldığı endüstriyel işlemler daha ucuz, kaliteli ve çevre dostu ürün elde edilmesine olanak sağlamaktadır. Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi ile endüstriyel enzimler alanında yapılan araştırmalar daha fazla önem kazanmaktadır.

Enzimler hücre içerisinde meydana gelen binlerce tepkimenin hızını ve özgüllüğünü düzenleyerek çoğu kez hücre dışında da etkinliklerini korurlar.

Günümüzde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler; kimya, kâğıt, biyoyakıt, kauçuk, fotoğraf, gıda endüstrisinde, ziraatte, kontak lens temizleyicilerinden, tıpta teşhis ve tedavi ile biyolojik savaşa kadar geniş alanlarda da geniş kullanım alanı bulmuştur (Adams 1983, Agüloğlu-Fincan ve ark. 2014, Özdemir ve ark 2018).

Enzimler, subsrat adı verilen katalitik etki gösterdikleri bileşiklerin adının sonuna '-az' eki getirilerek isimlendirilir. Uluslararası Biyokimya Birliği, EC numaraları denen, enzimler için bir adlandırma sistemi geliştirmiştir; her enzim "EC (Enzyme Commission)" harflerinden sonrasında dört rakamdan oluşan bir kod dizisi ile tanımlanır. 1. rakam grup no, 2. rakam sınıf no, 3. rakam alt sınıf no, 4. rakam ise enzimin seri numarasını göstermektedir (Selen 2006).

Enzimlerin kod numaralarına göre sınıflandırılması:

I. Oksidoredüktazlar: İndirgenme ve yükseltgenme reaksiyonlarını katalizlerler.

II. Transferazlar: Hidrojen dışındaki grupların iki subsrat arasında aktarımını katalizleyen enzimlerdir.

III. Hidrolazlar: Ester, eter, peptid, glikozid, C-C, C-N, C-O gibi bağlarını bir su molekülünün katılmasıyla hidrolize eden enzimlerdir.

IV. Liyazlar: Hidrolitik olmayan başka bir yoldan çift bağ oluşumunu

katalizleyen enzimlerin dahil olduğu gruptur.

V. İzomerazlar: Molekül içindeki geometrik ya da yapısal izomerlerin birbirine dönüştürülmesini katalizleyen enzim grubudur.

VI. Ligazlar: ATP ve GTP gibi bileşiklerden fosfat bağının kopmasıyla açığa çıkan enerji ile iki molekülü birbirine bağlayan enzim grubudur (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Çizelge 1.1. Endüstriyel enzimler ve kullanım alanları (Önal 2010)

Endüstri	Enzim	Uygulama Alanı
Deterjan	Proteaz	Protein uzaklaştırma
	Amilaz	Nişasta uzaklaştırma
	Lipaz	Yağları uzaklaştırma
	Selülaz	Renkleri ağartma ve temizleme
Nişasta ve yakıt	Amilaz	Nişasta sakkarifikasyonu
	Glukozizomeraz	Glukoz-fruktoz dönüşümü
	Ksilanaz	Viskositeyi düşürme
	Amiloglukozidaz	Şekerleştirme
Gıda	Proteaz	Sütlerde tat ve lezzet geliştirme
	Lipaz	Peynir lezzetleştirme
	Laktaz	Laktoz uzaklaştırma
	Transglutaminaz	Visko-elastik özelliklerin modifikasyonu
Fırıncılık	Amilaz	Ekmek yumuşaklığı ve kabarması
	Ksilanaz	Hamur işleme
	Fosfolipaz	Hamur kararlığı
	Proteaz	Bisküvi üretimi
	Glukoz oksidaz	Hamurun güçlendirilmesi
Hayvan besleme	Fitaz	Fitik asit yıkımı
	Ksilanaz	Sindirim
	Glukanaz	Sindirim
Meşrubat	Pektinaz	Pektin yıkımı
	Amilaz	Meyve suyu işleme
	Laktaz	Meyve suyu berraklaştırma
Tekstil	Selülaz	Pamuk yumuşatma
	Amilaz	Ağartma ve taşlama
	Pektat liyaz	Kir giderme
	Peroksidaz	Boya fazlasının giderilmesi
Kağıt	Lipaz	Pitch kontrolü
	Amilaz	Nişasta kaplaması

1.3. Proteazlar

Proteazlar veya proteolitik enzimler, peptit bağlarını hidrolize ederek proteinleri parçalayan enzimler için kullanılan terimdir. Hücre metabolizmasında gerçekleşen ve canlılar için en büyük öneme sahip olan metabolik olaylar şüphesiz hidroliz reaksiyonlarıdır. Bu reaksiyonları katalizleyen en önemli enzim ise proteazdır. Proteazlar endüstriyel sektörde büyük önem taşımaktadır (Banik ve Prakash 2006). Belirli bir substrata spesifik olmayıp peptid zincirinin belirli yapı biçimlerine spesifiktirler. Ticari proteazların büyük bir kısmı *Bacillus* suşlarından türetilmektedir (Mehrato ve ark. 1999).

Kumaşlardan kan lekelerinin çıkarılması için deterjan formülasyonları, biyoaktif peptidlerin üretimi, gıda işlemesi ve ciltlerin bozulmasının giderilmesi gibi çok sayıda uygulama nedeniyle proteazlar hakkında geniş araştırmalar yapılmıştır (Agüloğlu-Fincan ve Okumuş 2007, Müderriszade 2001).

1.4. Proteazların Sınıflandırılması

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği -Numaralandırma Komitesine göre proteazlar sınıf 3'ün (hidrolazlar) alt sınıf 4'e aittirler. Fakat yapılarının ve işlevlerinin çeşitliliğinden dolayı genel bir enzim sınıflandırılmasına uymadığından proteazlar 3 ana kriterle sınıflandırılmaktadır. Bunlar;

I. Katalizledikleri tepkime çeşidi

II.Katalitik bölgelerinin yapısı

III.Evrim ile ilişkilendilirmeleri (Rao ve ark. 1998).

Proteazlar, büyük bir aile (E.C 3.4) oluşturduğundan Avrupa Biyokimya Komitesi'nce tarafından EC sisteminde, endopeptidazlar ve ekzopeptidazlar ve olmak üzere 2 gruba ayrılmışlardır (Sevinç 2010).

Çizelge 1.2. Proteazların Sınıflandırması (Rao ve ark. 1998)

Proteaz			**E.C. Sayısı**
1.Ekzopeptidazlar			
	1.1. Aminopeptidazlar		3.4.11
		1.1.1 Dipeptildil peptidazlar	3.4.14
		1.1.2.Tripeptidil peptidazlar	3.4.14
	1.2. Karboksipeptidazlar		3.4.16-3.4.18
		1.2.1. Serin proteaz	3.4.16
		1.2.2. Metallo proteaz	3.4.17
		1.2.3. Sistein proteaz	3.4.18
		1.2.4. Peptidil dipeptidaz	3.4.15
		1.2.5. Dipeptitaz	3.4.13
	1.3. Omega peptidaz		3.4.19
2. Endopeptidazlar			3.4.21-3.4.34
	2.1. Serin proteazlar		3.4.21
	2.2. Sistein protezlar		3.4.22
	2.3. Aspartik proteazlar		3.4.23
	2.4. Metalo proteazlar		3.4.2
	2.5. Endopeptidaz (bilinmeyen katalitik mekanizmanın)		3.4.99

1.4.1. Ekzopeptidazlar

Ekopeptidazlar, polipeptit zincirinin ucundaki amino asitler arasında, daha spesifik olarak N- veya C-terminalinde amino asitler arasında peptit bağlarını kıran ve buna göre aminopeptidazlar, karboksipeptidazlar ve omegapeptidazlar olarak alt sınıflara ayrılırlar.

1.4.2. Endopeptidazlar

Endopeptidazlar N ve C uçlarından uzak polipeptidin iç bölgelerinin peptid bağlarındaki işlevleriyle tanımlanır. Endopeptidazlar, sağlam proteinler üzerinde en iyi etki gösterir ve bir proteinaz veya bir endopeptidaz; bu tip enzimin endo bir etki şekli vardır ve genel olarak molekül içinde, terminal olmayan amino asitlerin peptit bağlarını kırar.

Endopeptidazlar katalitik mekanizmalarına göre serin proteaz, aspartik proteaz, sistein proteaz, metalloproteaz olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır (Rao ve ark. 1998).

1.4.2.1. Serin Proteazlar

Serin proteaz aktif merkezlerindeki serin grubunun varlığıyla ifade edilir. Organizmalar için gerekli olduğundan ökaryotlar, bakteri ve virüslerde bulunur. Serin proteazlar genellikle pH 7.0-11.0 aralığında aktiftirler. İzoelektrik noktaları pH 4.0-6.0 aralığındadır (Deshpande ve ark. 1998).

Serin proteazları (EC 3.4.21), substrat tercihlerine göre 4 ana grupta toplamak mümkündür:

- Tripsin benzeri serin proteazlar, Lys (lisin) veya Arg (arjinin) aminoasitlerin sonrasındaki peptid bağını hidrolizlemektedir.
- Kimotripsin türevi serin proteazlar, aromatik aminoasitlerin bulunduğu peptid bağını hidrolizlerler.
- Elastaz benzeri serin proteazlar, yan zincirlerdeki hidrofobik aminoasit sonrasındaki peptid bağını hidrolize ederler.
- Subtilisinler ise prokaryotlardaki peptid bağını hidrolizlerler (Gisha 2014).

Serin alkalen proteazlar bakteriler, mayalar, küfler ve mantarlar tarafından üretilirler. Alkalin proteazların en iyi aktivite gösterdikleri pH 10.0 ve izoelektrik noktaları da pH'sı 9.0 civarındadır. Molekül kütleleri ise 15-30 kDa arasındadır. PMSF (fenilmetilsülfonilflorür), DFP (diizopropilflorofosfat), TLCK (tosil-Llizinklorokumarin) serin proteazların inhibitörleridir (Rao ve ark. 1998).

1.4.2.2. Sistein Proteazlar

Tiyol proteazlar olarak bilinen sistein proteazlar, aktif merkezlerinde bulunan sistein (Cys), histidin (His) ve aspartik asit (Asp) üçlüsü ile ayırt edilirler. Sistein, substrat ile kompleks oluşturarak ve aktif merkezinde içerdiği -SH grubu dolayısıyla ağır metal ve okside edici moleküllerle inhibe edildiği için oldukça önemli enzimlerdir.

Sistein proteazlar, aktif bölgesinde –SH grubu bulundurmaları, ağır metaller ve okside edici ajanlar varlığında inhibe olmalarından dolayı önemli enzim grubudur. Papain benzeri tiyol, tripsin benzeri tiyol, glutamik aside özel tiyol ve diğer tip tiyol proteazlar olmak üzere dört gruba ayrılarak incelenir (Genckal ve Tari 2006; Dubey ve ark. 2007).

Sistein proteazlar gerek prokaryot gerekse ökaryot tüm organizmalarda görülmektedir. Sistein proteazların aktivitesi, histidin veya sisteine bağlıdır. Sistein proteazların en iyi bilineni "papain"dir. Sistein proteazlardan bazıları nötral, bazıları da (lizozomal proteazlar gibi) asidik pH' larda aktivite gösterirler (Rao ve ark. 1998).

1.4.2.3. Aspartik Proteazlar

Katalitik bölgelerinde iki aspartik asit içerirler ve bunlar asit proteazlar olarak da bilinirler (Dash ve ark. 2003).

Molekül ağırlıkları 30-45 kDa arasında olup genellikle düşük pH değerlerinde aktivite gösterirler. Pepsin, renin aspartat, katepsin D ve katepsin E en iyi bilinen endopeptidazlardır.

Çoğu aspartik proteazlar düşük pH değelerinde aktiftirler. Molekül kütlesi 30-45 kDa arasında değişir. Pepsin, katepsin D ve E, renin aspartat en iyi bilinen aspartik proteazlardır İzoelektrik noktaları pH 3.0 ile 4.5 arasında değişmektedir (Bugg 1996).

1.4.2.4. Metalo Proteazlar

Metalo proteazların katalitik etkisi diğer proteazlardan farklıdır. Aktiviteleri için iki değerlikli özellikle çinko gibi metallere ihtiyaç duyarlar (Divakar ve ark. 2010). Metallo proteazların doku morfogenezi ve farklılaşmasında rolü vardır. Ayrıca kanser hastalıkların tedavisinde kullanılabilirler. En yaygın metallo proteazlar bakterilerdeki termolizin ile yılan zehrinde bulunan hemorhagic toksindir (Rao ve ark. 1998). Metalloproteazlar EDTA varlığında inhibe edilirler (Rao ve ark. 1998). Katalitik aktivite göstermeleri için +2 değerlikli metallere ihtiyaç duyarlar. Çinko, enzim aktivitesi, kalsiyum da protein yapısının korunması için gereklidir (Deshpande ve ark. 1998). Metaloproteazların yaklaşık otuz sınıfı tanımlanmıştır.

1.5. Proteazların Başlıca Kullanım Alanları

Dünya genelinde toplam enzim satışının yaklaşık %60'ını proteaz oluşturmaktadır (Li ve ark. 2013). Proteazlar; deterjan, deri, ilaç, gıda, kozmetik, hayvan yemi, peptid sentezi, X-ışını filmi vb. gibi çeşitli endüstrilerde ve aynı zamanda tabakhane atık muamelesinde geniş uygulamaları nedeniyle yaygın kullanım alanına sahiptir.

- Deterjan Sanayisi

Günümüzde enzimler en zor lekeleri bile çıkarmaları nedeniyle deterjanlarda sıklıkla kullanılmaktadır. Çamaşır deterjanlarında aktif bir bileşen olarak proteolitik enzimlerin uygulanması ilk olarak 1913'te önerilmiştir. Çamaşır deterjanlarında ilk kullanılan enzim proteazdır. Ancak, proteolitik enzim içeren ilk ticari deterjan 1956 yılında üretilmiştir. Deterjan endüstrisi alkali pH'da çalışan hidrolitik enzimlerin en önemli tüketicisi olup enzim üretiminin %25'den fazlasını kullanır. Alkalin proteazlar ise deterjan sanayinin üçte ikilik bir payına sahiptir. Proteazların deterjan katkı maddesi olarak kullanılması ticari olarak gelişimini canlandırmış ve çalışmaları bu yöne çekmiştir. Çevre kirliliğini önlemek amacıyla proteazların bu alanda kullanımı dikkat çekici bir şekilde artmaktadır. Yüksek sıcaklıkta deterjanlarla çoğu lekeyi çıkarmak mümkündür. Bununla birlikte, ısıtma suyunun maliyeti yüksektir. Bu nedenle, fosfat kirlenmesini azaltmak ve maliyeti düşürmek için düşük sıcaklıktaki yıkama için uygun formüle edilmiş, düşük fosfat içeriğine sahip enzimler, deterjanların önemli bir bileşiği haline gelmiştir (Lagzian ve Asoodeh 2012, Kıran ve ark. 2006). Diğer proteolitik enzimler allerjik reaksiyona sebep olduğundan deterjan endüstrisi için en uygun proteolitik enzim alkalin serin proteazdır. Kumaşlardaki protein içeren çim, kan, ter, süt ve yumurta lekeleri yüksek pH derecelerinde stabil kalabilen alkalin proteazlar ile kolayca çıkmaktadır (Sinha ve Khare 2013). Bu nedenle, *Bacillus* suşlarından elde edilen proteazlar, bu enzimlerin alkalofilik yapıları ve yüzey aktif cisimleri, deterjanlar ve oksitleyici bileşiklerle temas halindeyken ortaya koydukları olağanüstü stabilite nedeniyle deterjan endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Hmidet ve ark 2009, Lagzian ve Asoodeh 2012).

Bulaşık makinesi deterjanlarında da nişasta ve protein bazlı lekelerin çıkarılması için proteazlar kullanılmaktadır.

- Gıda Endüstrisi

Proteazlar gıda endüstrisinde peynir yapımından, etlerin yumuşatılmasına, soya hidrolizinden fırıncılığa kadar önemli bir uygulama alanı bulmuşlardır (Mahajan ve Badgujar 2010). Proteazların temel işlevi proteinleri hidroliz etmektir. Protein hidrolizatları kan basıncının düzenlenmesinde, bebek mamalarının formulasyonlarında, meyve suyu ve meşrubatların raf ömrünü uzatmada ve özel diyet ürünlerinde önemli

role sahiptir. Bakteriyel proteazlar hamurun kuvveti ve uzama kabiliyetini arttırmak için kullanılır. *Bacillus subtilis*'den elde edilen proteazlar; bisküvi ve krakerlere gevreklik kazandırmak ve yumuşamayı geciktirmek için kullanılır. Ayrıca proteazlar; biranın soğukta saklanması ve etin yumuşatılması, zengin bir besin kaynağı olan soyadan pek çok soya ürünü (örneğin, soya sosu) eldesi ve çekirdeklerden ekstrakte olabilen yağ miktarının arttırılmasında da yaygın bir biçimde kullanılmaktadır (Çelik 2006).

- Hayvan Yemi Endüstrisi

Hayvan yemleri çoğunlukla bitkisel olup tahıl ve sebze proteinleri içerirler, bu proteinler tek mideli hayvanlar tarafından tamamiyle sindirilemez. Ancak doğrudan hayvan yeminin içine eklenecek olan proteazlar yardımıyla besinlerin kullanılabilirliği ve sindirimi daha kolay olur.

- Dericilik

Kurutulmuş veya tuzlanmış halde tabakhaneye gelen derilerin yumuşatılması, geleneksel yöntemlerle 15-20 saatte yapılırken, alkalin veya nötr proteazlar kullanılması ile 1-2 saat içinde gerçekleştirilmektedir. Islatılan derilerden kılların dökülmesi için kullanılan sönmüş kireç kalıntılarının uzaklaştırılması yani sama işlemi sırasında tripsin kullanılırken, günümüzde bu işlem daha çok alkalin proteaz ile yapılmaktadır.

- Fotoğrafcılık

Alkalin proteazlar X ışını veya fotoğrafik filmlerden gümüşün geri kazanımında önemli rol oynarlar. Kullanılmış röntgen filmleri toplam ağırlık olarak %1.5-2 küçük gümüş partikülleri içermektedir. Bu nedenledir ki, kullanılmış röntgen filmleri atılmadan önce depolanarak üzerindeki gümüş tekrar kullanılmak üzere geri kazanılır. Geleneksel gümüşün geri kazanımı "yakma metodu" ile yapılır. Ancak bu yöntem hem pahalıdır, hem de çevre kirliliğine yol açmaktadır. Ayrıca bu yöntemle polyesterden yapılmış filmlerden gümüş geri kazanılamaz. Son dönemlerde filmler üzerindeki jelatinin proteaz yardımıyla parçalanarak gümüş geri kazanılması, proteazların film sektöründe de önemli bir almasına neden olmuştur.

- Tekstil Endüstrisi

Proteazlar, tekstil alanında ham ipeğin işlenmesi aşamasında tercih edilen bir

enzim çeşididir. İpek parlaklığının ve yumuşaklığının ortaya çıkabilmesi için ham ipeğin etrafındaki "sericin" adı verilen mat ve mumsu protein kılıfın ağartma adı verilen işlemle çözünmesi gerekmektedir. Bu işlem geleneksel yollarla yapıldığında kayıplara neden olmaktadır. Ancak alkalin proteaz uygulaması ile kısa sürede ekonomik bir şekilde ağartma yapılarak aynı zamanda ipek kalitesi de yükseltilir.

- Atık Arıtımı ve Dönüşümü Endüstrisi

Proteazların proteolitik aktivitesi ile protein içerikli bu atıkların parçalanarak giderimi sağlanmaktadır. Bu etkileri ile çeşitli evsel ve gıda endüstrisinden gelen atıkların arıtımında alkalin proteaz kullanımı büyük önem kazanmıştır. Günümüzde doğada atık olarak bulunan boynuz, tüy, tırnak ve saç gibi lifli proteinler proteaz etkisiyle yararlı hale dönüştürülmekte ya da yok edilmektedirler. Proteazların kullanımı ile kümes atıkları atıkları ve tüy birikintileri de giderilebilmektedir (Alpan 2008). Ayrıca balıkçılıkta da proteazların proteolitik aktivitelerinden yaralanılarak birikmesi ciddi sorunlar yaratabilecek yüzgeç ve kemik gibi atıklar protein, lipid, enzim ve kitin gibi değerli biyomateryallere dönüştürülmektedir (Kandasamy ve ark. 2011).

- Kozmetik ve ilaç endüstrisi

Enzimlerin kozmetik ürünlerinde kullanımı her geçen gün artmaktadır. Bu alanda proteazlar; saç bakım ürünlerinde, diş macunlarında, kontak lens solüsyonlarında ve istenmeyen tüylerden kurtulmak için sıklıkla kullanılmaktadır (Langmaier ve ark. 2002).

- Klinik Çalışmalar

Proteazlar son dönemlerde kanda uyuşturucu madde tanımlanmasında kullanılmaktadır. Bu işleme göre; ara ürünler vücutta bazı proteinlere bağlanır, bu ara ürünlerin bağlandığı proteinler, proteazla ayrıştırılarak açığa çıkan maddenin analizleri yapılır.

1.6. *Bacillus*'lar

Günümüzde endüstriyel alanda kullanılan enzimlerin yaklaşık %90'ı mikroorganizmalardan elde edilmektedir (Gupta ve ark. 2003). Mikroorganizmalar, enzim kaynağı olarak büyük bir potansiyele sahip olması, bitki ya da hayvan kaynaklı

enzimlere göre, daha stabil ve ucuz olup kültür ortamında daha kolay çoğaltılabilmeleri nedeniyle tercih edilmektedir (Woodley 2000). Bitkisel kaynaklı enzimler gelişim döngüsü, toprak ve iklim gibi faktörlerden etkilenmektedir (John 1987). Hayvansal kökenli enzimlerin üretiminde de, birçok ülkede yerli ticari hayvan popülasyonlarının korunması ve ayrıca hastalıkların bir ülkeden diğerine yayılması olasılığı gibi sebeplerle gerek hayvan gerekse hayvansal ürün ticareti oldukça kısıtlanmaktadır. Mikroorganizmaların, memeli ve bitki hücrelerinden daha kolay ve daha hızlı enzimler üretmesi ve enzim üretiminin, iklim koşullarından veya mevsimsel değişikliklerden veya hayvan kesimi veya ağaç veya bitki kesilmesi ile ilgili düzenleyici veya etik konulardan etkilenmemesi gibi konular tüm ilgiyi mikroorganizma kaynaklı enzimlere yöneltmiştir.

Endüstride kullanılan enzimlerin büyük bir kısmı, mikroorganizmalar içerisinde doğada geniş bir alana sahip olan *Bacillus* türleri tarafından üretilmektedir (Wolfgang 2007, Agüloğlu-Fincan ve Enez 2014, Ortakaya ve ark 2017, Rezzukoğlu ve ark 2018).

Bacillus suşları, doğada yaygın olarak bulunan, endospor oluşturan, patojen olmayan, çomak şeklinde Gram (+) bakteriler olup gen klonlama çalışmalarında önemli bir yere sahiptirler. *Bacillus*'ların en önemli özelliği endüstriyel enzim üretmeleridir. Bu enzimler arasında başlıca proteaz, amilaz, ksilanaz, β-glukanaz (sellülaz), alkalin fosfataz, glukoz izomeraz, β-laktamaz ve pullulanaz sayılabilir (Boyce ve ark. 2007). Özellikle proteazlar *Bacillus*'lardan elde edilen endüstriyel enzimlerin en önemli grubudur ve toplam enzim payının yaklaşık %60'ına sahiptir. Çeşitli bakteri, maya ve mantarlar da proteaz üretebilir, ancak yalnızca yeterli miktarda hücre dışı proteaz üreten mikroorganizmalar endüstriyel öneme sahiptir (Kim ve ark. 2016).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

El-Safey ve Abdul-Raouf (2004), *Bacillus subtilis*'ten proteaz üretimi, saflaştırlması ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. *Bacillus subtilis* proteazı üretimi için optimum koşulları; %0.5'lik bir optimum substrat (jelatin) konsantrasyonu; optimum inkübasyon süresi 30 saat; optimum inkübasyon sıcaklığı 40°C; optimum pH 7.0 olarak belirlemişlerdir. Proteaz üretimi için en iyi besin kaynağı, beef ekstraktı ve NaCl; optimum karbon ve azot kaynağı olarak da sırasıyla laktoz ve $(NH_4)_2.S0_4$ olarak tespit etmişlerdir. Farklı konsantrasyonlarda kullanılan organik asitler, asetik, sitrik, laktik asit proteaz üretimini azalttığını belirtmişlerdir. Proteazı, amonyum sülfat çöktürmesi ve sephadex G-200 filtrasyonuyla 7.87 kez saflaştırmışlardır.

Nascimento ve ark. (2004), termofilik *Bacillus* sp. SMIA-2 suşunun ürettiği proteaz üzerinde çalışmışlardır. Proteazı, trisodyum sitrat içeren sıvı kültüründe 9 saatte maksimum değerde ürettiklerini belirterek proteaz üretiminde en iyi karbon ve azot kaynağının nişaşta ve amonyum nitrat olduğunu tespit etmişlerdir. Proteazın sıcaklık ve pH değerlerinin 60°C ve pH 8.0'de en uygun olduğunu rapor etmişlerdir. Mn^{+2} ve Ca^{+2} iyonları aktiviteyi stimüle ettiğini, K^{+}, Hg^{+2} ve Cu^{+2} ise kuvvetli inhibisyon etkisi yaptığını bulmuşlardır.

Kazan ve ark. (2005), *Bacillus clausii* GMBAE 42'den proteince zengin besiyeri ortamında 3 gün pH 10.5 da 37°C de serin alkali proteaz üretmişlerdir. Enzimi, amonyum sülfat çöktürmesi ve DEAE selüloz iyon exchange kromatografisi yöntemiyle 16 kat, %58 verimle saflaştırıp SDS-PAGE yöntemiyle de molekül ağırlığını 26.50 kDa olarak bulmuşlardır. Enzimin optimal pH ve sıcaklığının 11.3 ve 60°C olduğunu, aynı zamanda Tween-20, Tween-40, Tween-60, Tween-80 ve SDS varlığında 30°C'de 1 saat boyunca stabil kaldığını rapor etmişlerdir.

Agüloğlu-Fincan ve Okumuş (2007) topraktan izole ettikleri *Bacillus sp.*'den çevre kirliliğine yol açan karpuz ve kavun kabuğunu katı substrat olarak kullanarak SSF yöntemi ile yüksek miktarda alkalin serin proteaz elde etmişlerdir. Alkalin serin proteaz için optimum pH'nın 10.0 ve maksimum aktivitenin 65°C olduğunu tespit etmişlerdir. Hg^{2+} ve Cu^{2+} 'nun enzim aktivitesini inhibe ettiğini ve Ca^{2+} ve Ba^{2+}'nın ise enzim aktivitesini kısmen arttırdığını bildirmişlerdir.

Patel ve ark. (2005), *Bacillus* sp.'den alkalin proteazı %10 NaCl, kazamino asit ve kazamino asidinden oluşan besi ortamında pH 9.0'da ürettiklerini belirtmişlerdir. Soya pepton ve triptonun ise enzim inhibisyonu oluşturduğunu bulmuşlardır.

Bhaskar ve ark. (2007), *Bacillus proteolyticus* CFR3001 alkali proteaz üretimini, optimum koşullar olan 37°C da 96 saat boyunca pH 9.0 da gerçekleştirmişlerdir. Enzimin molekül ağırlığını yaklaşık 29 kDa olduğu ve *Escherichia coli, Listeria monocytogenes, Bacillus cereus ve Yersinia enterocolytica* gibi patojenik organizmanın büyümesini inhibe ettiğini belirterek SEM sonuçlarıyla da bunu desteklemişlerdir.

Doddapaneni ve ark. (2007), izolasyonunu yaptıkları *B. cereus* proteazını saflaştırarak karakterize etmişlerdir. Enzimi kolon değiştirici kromatografisi yöntemiyle 1.8 kat ve % 49 verimle saflaştırarak enzimin molekül ağırlığını 28 kDa, optimal pH ve sıcaklık değerlerini de sırasıyla 10.0 ve 60°C olduğunu bulmuşlardır. Proteazın pH 7.0-12.0 değerleri arasında stabilitesini koruduğunu, enzim aktivitesinin, Cu^{+2} iyonlarının varlığında 4 kat artarken EDTA ile inhibe edildiğini ifade etmişlerdir. Enzim aktivitesinin, Cu^{+2} iyonlarında artmasının çalışılan proteazın metalloproteaz olduğunu ve enzimin deterjan, anyonik surfaktan ve organik çözücülerin varlığında bile stabil kaldığını göstermişlerdir.

Joshi ve ark. (2007), *Bacillus cereus* MTCC 6840'ın ekstraselüler alkalin proteaz üretimiyle ilgili çalışmalar yaparak enzimin optimal koşullarının 25°C, pH 9.0 ve 24. saatte olduğunu rapor etmişlerdir. Karbon kaynağının fruktoz, azot kaynağının da maya özütü ve pepton olması durumunda enzim üretiminin arttığını bulmuşlardır. Enzim aktivitesinin Ca^{+2}, Cu^{+2}, K^{+}, Mg^{+2} ve Mn^{+2} varlığında inhibe olduğunu, Fe^{+2} ve Co^{+2} iyonları varlığında ise stimüle edildiğini gözlemlemişlerdir. Proteazın SDS ve aseton varlığında önemli derecede stabilitesini koruduğunu, EDTA ve PMSF'nin ise aktivitede ciddi bir inhibisyona sebep olduğunu belirtmişlerdir.

Reddy ve arkadaşları (2008) topraktan aldıkları *Bacillus* sp. RKY3'ten proteazı amonyum sülfat çöktürmesi ve anyon değişim kromatografisi yöntemiyle saflaştırarak saf enzimin molekül ağırlığının 38 kDa olduğunu bulmuşlardır. Enzimin en ideal pH'ını 7.0-9.0 aralığında ve en ideal sıcaklığını 60°C olarak gözlemlemişlerdir. PMSF (1 mmol/l) ile inhibe olan enzimin serin proteaz olduğu sonucuna ulaşılarak enzimin

yükseltgenlere (% 2'lik H_2O_2), indirgeyici reaktiflere (%2'lik SDS) ve benzen, hekzan, toluen gibi organik çözücülere karşı oldukça kararlı olduğunu tespit etmişlerdir.

Almas ve ark. (2009), *Bacillus strain* SAL1'den ürettikleri alkali proteazın saflaştırılması ve karakterizesini gerçekleştirerek; enzimi kromatografik yöntemlerin kombinasyonuyla 11.8 kat saflaştırmışlardır. MA'sını 27 kDa hesaplamışlardır. pH 7.0-10.0 arasında ve 50°C'de 1 saat aktivitesini koruyabildiğini belirtmişlerdir.

Das ve Prasad (2010), *B. subtilis*'ten proteaz izolasyonu ve saflaştırılması işlemini yapmışlardır. Bangalore'deki çeşitli yerlerden toplanan dört farklı toprak örneğinden proteaz üreten bakteri suşu izole edilerek yağsız süt agarında (%1) pozitif olan proteaz üreten suşu belirlemişlerdir. Çeşitli biyokimyasal testlere tabi tutulan mikroorganizmayı *Bacillus subtilis* olarak tanımlanmışlardır. Optimum üreme koşullarını 37°C ve pH 8.0 olarak tespit etmşlerdir. Enzim üretimini 37°C'de 48 saat pH 8.0'de gerçekleştirmişlerdir. Amonyum sülfat çöktürmesi ve DEAE kolon kromatografisi yöntemleriyle saflaştırmışlardır.

Deng ve ark. (2010), *Bacillus* sp. B001'den alkalen proteazın saflaştırılması ve karakterizasyonunu gerçekleştirerek proteazın optimal pH ve sıcaklığını 10.0 ve 60°C olarak bulmuşlardır.

Haddar ve ark. (2010), *Bacillus mojavensis* A21'in ürettiği proteazın karakterizasyonunu gerçekleştirerek tavuk tüylerinin hidrolizindeki etkisini tespit etmeye çalışmışlardır. Proteolitik aktivite için optimal pH 8.0-11.0 ve optimal sıcaklığı 60°C olarak bulmuşlardır. Proteazın Tween 80, Triton X-100, SDS ve çeşitli kimyasal maddelere karşı kararlılık gösterdiğini belirleyerek enzimin farklı deterjanlara karşı iyi bir stabilite ve uyum gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca *Bacillus mojavensis* A21 proteazının kan lekelerinin giderilmesinde etkili olduğunu rapor etmişlerdir.

Ghafoor ve Hasnaın (2010), *Bacillus subtilis* EAG-2'den ekstrasellüler proteazı saflaştırmışlardır. Saf proteazın SDS-PAGE'te 27 kDa molekül ağırlığına sahip olduğunu ve optimum proteolitik aktivitesinin pH 8.5 ve 65°C'de olduğunu gözlemlemişlerdir. Enzimin, 30-50°C'den sonra 60 dk boyunca %80'e kadar yüksek düzeyde stabil olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca 37°C'de 4 saatlik inkübasyondan sonra pH 6.5-9.0'da stabil kaldığını tespit etmişlerdir. Aktivitesinin, serin protezlara ilgisini

gösteren APMSF ve PMSF ile %25 ve %16'e düşürüldüğünü bulmuşlardır. Ca^{+2}, Zn^{+2} ve Ba^{+2} ile aktivitenin arttığını bulmuşlardır.

Shah ve ark. (2010), AK187'in ürettiği serin alkali proteazın saflaştırılması ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. 58 kat saflaştırdıkları enzimin optimal değerlerini pH 9.0 ve 60°C bulmuşlardır. Cr^{+3}, Hg^{+2} ve Cu^{+2} ile enzim inhibe edilirken, Li^{+}, Ba^{+2}, K^{+}, Mg^{+2} ve Mn^{+2} ile aktivitenin değişmediğini ifade etmişlerdir.

Ahmetoğlu (2011), *B. cereus* KG5'ten kısmi olarak saflaştırdığı proteazın aktivitesi için bazı metal ve deterjanların etkisini çalışmıştır. $CaCl_2$, $MgCl_2$ ve $MnCl_2$'nin proteaz aktivitesini belirli oranlarda arttırdığını, $CuCl_2$, $HgCl_2$ ve $ZnCl_2$'nin güçlü bir şekilde inhibisyona neden olduğunu gözlemlemiştir. EDTA, SDS ve PMSF'nin de proteazı güçlü bir şekilde inhibe ettiğini tespit etmiştir.

Kumar ve ark. (2011), alkalifilik *Bacillus altitudinis* GVC11'den serin alkalin proteazın karakterizasyonu gerçekleştirmişlerdir. %15.25 verimle 7.3 kat saflaştırdıkları alkalin serin proteazın molekül ağırlığını elektroforez ve zimogram analiziyle 28 kDa olarak ifade etmişlerdir. Enzimin optimal pH'sının 9.5 olduğunu bulmuşlardır. Saflaştırılmış olan enzimin optimal sıcaklığını 45°C ve termal stabilitesinin Ca^{+2} iyonları ile arttırıldığı belirlenmiştir. Aktivitenin Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyonlarınca arttırıldığını ve Hg^{+2} ile de inhibisyonunu gözlemlemişlerdir.

Sevinç ve Demirkan (2011), topraktan izole ettikleri elli dört *Bacillus* suşundan maksimum proteaz üreten *Bacillus* sp. N-40'dan proteaz üretimini gerçekleştirmişlerdir. Karbon, azot kaynakları ve metal iyonları gibi ana ortam bileşenlerinin enzimin üretimi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Kullanılan karbon kaynakları arasında fruktoz ile üretimin en yüksek değere ulaştığını ve en iyi azot kaynağının da yağsız süt olduğunu belirtmişlerdir. Saflaştırdıkları proteazın MA'sını, elektroforezle 52 kDa olarak hesaplamışlardır. Saflaştırılmış proteaz için optimal değerleri pH 7.0 ve 55°C olduğunu bulmuşlardır. Stabilite çalışmasında; enzimin 6.0-9.0 pH aralığında ve 40-70°C arasındaki sıcaklıklarda stabil olduğunu göstermişlerdir. Mn^{2+} ve Ca^{2+} ilavesiyle enzim aktivitesinin arttığını tespit etmişlerdir.

Kumar ve ark. (2011), *Bacillus* sp. HPE10'u izole ederek amilaz ve proteaz elde edebilmek için uygun fiziksel ve kimyasal koşullar (pH, sıcaklık, inkübasyon periyodu, uygun karbon ve nitrojen kaynakları) sağlamışlardır. Amilaz üretiminin 120 saatlik

inkübasyon sonrasında pH 6.0'da laktoz ve sodyum nitrat içeren ortamda 50°C de, proteaz üretiminin ise 120 saatlik inkübasyon sonrasında pH 9.0'da glukoz ve pepton içeren ortamda 45°C'de elde etmişlerdir. Enzimlerin saflaştırılması kolon kromatografisi ile saflaştırdıkları her iki enzimin de molekül ağırlığını 30 kDa civarında tek bir band olarak bulmuşlardır.

Ravishankar ve ark. (2012), alkalin proteazın *Bacillus subtilis* AKRS3'ten izolasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Çalışmalarında mikrobiyolojik, biyokimyasal ve 16S rRNA filogenetik analizi ile izole edilmiş bakteriyi tanımladıktan sonra, optimizasyon çalışması (karbon, azot, inkübasyon süresi, sıcaklık, pH ve sodyum klorür konsantrasyonu) yoluyla daha yüksek alkalin proteaz üretimi üzerine odaklanmışlardır. Proteaz varlığını kazein hidroliz metoduyla tespit ettikten sonra optimum alkalin proteaz üretiminin 24 saatlik inkübasyon süresinde, 37°C ve pH 9.0'da olduğunu ortaya koymuşlardır. Çeşitli azot kaynakları arasında sığır ekstraktının maksimum alkalin proteaz üretimi için en iyi indükleyici olduğunu ve karbon kaynakları arasında ksilozun da maksimum proteaz üretimine neden olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca maksimum proteaz aktivitesini sağlamak için %3 sodyum klorüre ihtiyaç olduğunu göstermişlerdir.

Padmapriya ve Williams (2012), *Bacillus subtilis*'ten nötral proteaz izolasyonunu ve kısmi saflaştırılmasını gerçekleştirmişlerdir. *B. subtilis*'in üretim ortamını farklı pH, sıcaklık, karbon ve azot kaynakları kullanarak optimize etmişlerdir. Proteazın pH 7.0'de optimum, pH 6.0'dan 9.0'a kadar da stabil olduğunu belirtmişlerdir. Optimum sıcaklığının ise 37°C olduğunu ve 30-60°C arasında stabil kaldığını kanıtlamışlardır. Proteaz üretiminde en iyi karbon ve azot kaynaklarının nişasta ve peynir altı suyu olduğunu belirtmişlerdir. Proteazı, amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz ile kısmi olarak saflaştırmışlardır. Proteolitik aktiviteyi, kazein zimografisi ile de tespit etmişlerdir. Saflaştırdıkları proteazın MA'sını, elektroforez ile 50 kDa olarak hesaplamışlardır.

Bundela ve Mandal (2013), yaptıkları çalışmada *B. subtilis*'ten yüksek alkali ortamda (pH 10.0) ürettikleri serin alkali proteazı amonyum sülfat çöktürmesi ve jel filtrasyonu yöntemleriyle iki aşamalı olarak saflaştırmışlar ve kısmi karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Saf proteazın MA'sını elektroforez ile yaklaşık 30 kDa olarak

hesaplayarak, en iyi aktivite verdiği değerleri pH 10.5 ve 55°C olarak belirlemişlerdir. Enzimin serin alkali proteaz olduğunu PMSF inbitörü ile teyit etmişlerdir.

Imtiaz ve ark. (2013), yaptıkları çalışmada *Bacillus subtilis*'in alkalin proteaz üretimi için optimum koşulları; 48 saat 37°C ve pH 9.5 olarak açıklamışlardır. Karbon ve azot kaynaklarının enzim üretimi üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. En iyi karbon kaynağının % 1 konsantrasyonda sukroz ve benzer şekilde en iyi organik ve inorganik azot kaynağının da NB (%1.5) ve diamonyum hidrojen fosfat (%0.1) olduğunu belirlemişlerdir.

Nadeem ve ark. (2013), yaptıkları çalışmada *B. licheniformis* UV-9'dan alkali proteazı saflaştırarak deterjan formülasyonlarında kullanımı için karakterize etmişlerdir. Enzimi amonyum sülfat çöktürmesi ve Sefadex G-100 jel filtrasyon kromatografisiyle 36.83 kat ve %11 verimle saflaştırmış ve molekül ağırlığını SDS-PAGE ile 36.12 kDa olarak bulmuşlardır. En yüksek enzim aktivitesini pH 11.0 ve 60°C sıcaklıkta elde ederek pH 8.0-11.0 arası ve 30-50°C aralığında enzimin %80 aktivitesini koruduğunu gözlemlemişlerdir. Enzimin 10 mM Ca^{2+} varlığında pH 11.0 ve 60^{o}C'de enzim aktivitesinin %90'dan fazlasını koruduğunu belirtmişlerdir. Enzimde, PMSF etkisiyle inhibisyon gözlenmesinin, serin proteaz olduğunu düşündürdüğünü ifade etmişlerdir. Saflaştırdıkları enzimin, Tween-20, Tween- 45, Tween-65 ve Triton X-45 gibi yüzey aktif maddelere karşı aşırı kararlılık gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Shankar ve ark. (2014), *Beauveria* sp MTCC 5184 alkali proteazını saflaştırarak karakterizasyonunu yapmışlardır. Proteazın optimum değerlerini pH 9.0 ve 50°C maksimum alkali proteaz ürettiğini vurgulamışlardır. Alkali proteaz 10.2 kez ve % 38.6 verim ile saf hale getirilmiştir. MA'sının 29 kDa olduğunu belirleyerek, 40°C ve pH 3.0-11.0 arasında kararlı olduğunu ifade etmişlerdir. Proteazın Cd^{+2}, Hg^{+2} ve Mn^{+2} iyonlarınca inhibisyonunu ifade etmişlerdir. Ortamda 1 mM PMSF ile kaybolan enzim aktivitesinden ötürü serin proteaz olduğu vurgulanmıştır.

Vanitha ve ark. (2014), gıda endüstrisi atıklarından izole edilmiş *Bacillus subtilis* 168'den alkalin proteaz enziminin optimizasyonu ve üretimini gerçekleştirmişlerdir. Çalışmalarında daha yüksek verimle alkalin proteazı izole etmeyi amaçlamışlardır. Proteaz üreten organizmayı gıda endüstrisi atıklarından izole ettikten sonra mikroskobik, biyokimyasal ve 16S rRNA filogenetik analiziyle *Bacillus subtilis*

168 olarak tanımlamışlardır. Maksimum alkali proteaz üretiminin pH 13.0 ve 35°C sıcaklıkta, %2 inokülum büyüklüğü ile ideal karbon ve azot kaynağı olarak maltozla maya özütü ve substrat olarak da buğday kepeğini kullanarak elde ettiklerini belirtmişlerdir. *B. subtilis* 168 alkalin proteazını amonyum sülfat ve diyaliz aşamaları ile kısmi saflaştırarak moleküler ağırlığını 55 kDa olarak belirlemişlerdir.

Hashem ve ark. (2015), *Bacillus sphaericus* SI-1'den ekstraselüler proteazı saflaştırarak karakterize etmişlerdir. Amonyumsülfat fraksiyonlama, diyaliz, filtrasyon ile sephadex G-75 kolon kromatografisiyle enzimi saflaştırmışlardır. Proteazın moleküler ağırlığının 41.70 kDa, optimum pH 8.4 ve sıcaklığının 38°C olduğunu ifade etmişlerdir. İzole edilen proteaz aktivitesinin, Ca^{++} ve Mg^{++} iyonları tarafından aktive edildiğini, ancak EDTA, Cu^{++}, Fe^{++} ve Zn^{++} iyonları tarafından önemli ölçüde inhibe edildiğini belirtmişlerdir. Ayrıca proteazın PMSF (fenil metil sülfonil florür), DTT (Dithiothreitol) ve 2-ME (2-mercaptoethanol) ile inhibe edildiğini orataya koymuşlardır.

Kamran ve ark. (2015), termofilik *Bacillus* sp.'de serin alkalin proteazın saflaştırılması ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Alkalin serin proteazı; %80 amonyum sülfat çökeltmesi, CM-selüloz ve DEAE-selüloz iyonu değişim kolon kromatografisi ile 16.5 kat saflaştırmışlardır. Proteazın, pH 8.0 ve 80°C'de kazeine karşı maksimum aktivite sergilediğini ve pH 8.0 ve 80°C sıcaklıkta 2 saate kadar stabil kaldığını belirtmişlerdir. Mn^{2+} ve Ca^{2+}'nin, proteolitik aktiviteyi sırasıyla %44 ve %36'ya kadar arttırdığını, bununla birlikte; Zn^{2+}, K^{+}, Ba^{2+}, Co^{2+}, Hg^{2+} ve Cu^{2+}'nin enzim aktivitesini önemli ölçüde azalttığını belirtmişlerdir. PMSF'nin proteaz aktivitesini tamamen inhibe ettiğini, 5 mM 2-mercaptoethanol varlığında proteaz aktivitesinin iki kata kadar uyarıldığını gözlemlemişlerdir. Enzimin ayrıca Tween-80 ve diğer ticari deterjanlarda (SDS, Triton X-100) kararlı olduğunu belirtmişlerdir.

Pant ve ark. (2015), biyoteknolojik öneme sahip proteaz izolasyonunda yaygın kullanılan *Bacillus subtilis*'ten termostabil proteazın üretimini ve karakterizasyonu üzerinde çalışarak, en yüksek proteaz üretimini 45°C'de, 36 saatte ve pH 10.0'da bulmuşlardır. Azot ve karbon kaynakları ile ortamda galaktoz ve peptonun bulunmasının enzim üretimini %0.5 oranında arttırdığını bulmuşlardır.

Al-Abdalall ve Al-Khaldi (2016), alkalofilik *Bacillus subtilis*'ten alkalin proteaz üretimini gerçekleştirmişlerdir. Alkalin proteazı zirai ve hayvansal atıklar kullanarak pH

8.0 ve 37°C'de üretmişlerdir. Çeşitli azot kaynakları arasında maya özütünün en iyi alkalin proteaz indükleyicisi olduğunu, metal tuzları arasında KNO_3 ve NH_4Cl'in proteaz üretimini arttırdığını bulmuşlardır. En yüksek enzim aktivitesinin nar kabuğu, maya özütü amonyum klorür ve potasyum nitratın varlığında bulunduğunu belirtmişlerdir.

Kapilan (2016), *Bacillus subtilis* BS166'dan proteaz kısmi saflaştırması ve karakterizasyonunu gerçekleştirmiştir. Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz ile kısmi saflaştırdığı enzimin, optimal koşullarının pH 9.0 ve 40°C olduğunu belirtmiştir.

Shine ve ark. (2016), çöl topraklarından izole ettikleri *Bacillus cereus* RS3'ten alkalin proteaz üretimini ve optimizasyonu gerçekleştirmişlerdir. Maksimum Alkalin proteazın üretimini, pH 9.0 da, 45°C'de ve 24 saatte elde etmişlerdir. Alkalin proteaz üretimi için en iyi karbon kaynaklarının fruktoz, sükroz, galaktoz ve maya ekstraktının da en iyi azot kaynağı olduğunu belirtmişlerdir.

Yılmaz ve ark. (2016), *Bacillus licheniformis* A10'dan alkalin proteazı saflaştırarak saf enzim üzerine deterjan ve organik çözücülerin etkilerini incelemişlerdir. Amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve DE52 anyon değiştirme kromotografisi yöntemlerinden yararlanarak %9.44 verim ile 1.38 kat saflaştırıldığını belirtmişlerdir. Enzimin; SDS-PAGE ile molekül ağırlığı yaklaşık 40.55 kDa hesaplanmış, optimal pH ve sıcaklık 9.0 ve 70°C olarak belirtilmiştir. Proteazın PMSF tarafından tamamen inhibe edildiğini kanıtlamışlardır.

Asha ve Palaniswamy (2018), topraktan izole ettikleri *Bacillus cereus* FT 1 tarafından üretilen alkalin proteazın optimizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Topraktan izole ettikleri bakterilerde, yağsız süt agar plaklarında proteaz analizi yaptıktan sonra, en yüksek alkali proteaz üretimini gösteren izolatı seçerek mikroskobik, makroskobik, biyokimyasal ve 16S RNA filogenetik analizleri ile *Bacillus cereus* FT 1 olarak tanımlamışlardır. Maksimum enzim üretimini 35°C'de; pH 9.5'de; 48 saat inkübasyondan sonra karbon kaynağı olarak %2 laktoz ve azot kaynağı olarak %3.5 kazein'de elde etmişlerdir. Surfaktanlar arasında tween 20, tween 80 ve poli etilen glikol; metal iyonlarından da Mn^{2+} ile proteaz üretiminin arttığını görmüşlerdir. Proteaz üretimi için en iyi organik çözücünün benzin olduğunu bulmuşlardır.

Hadjidj ve ark. (2018), *Bacillus licheniformis* suşu K7A'dan SAPHM adı verilen

yeni bir ekstrasellüler alkalin proteazın saflaştırılmasını, biyokimyasal ve moleküler karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Amonyum sülfat çöktürmesi (40–%70) - diyaliz, FPLC ve HPLC ile saflaştırılan enzimin molekül ağırlığını 30325.12 Da olarak bulmuşlardır. Enzimin, fenilmetansülfonil florür (PMSF) ve diiyodopropil florofosfatlar (DFP) tarafından tamamen inhibe edilmesinin onun serin proteaz ailesine ait olduğunu ifade etmişlerdir. Saflaştırılmış enzimin, pH 10.0'da ve 70°C sıcaklıkta optimal olarak aktif olduğunu belirtmişlerdir. SAPHM'ın, deterjanlara karşı mükemmel stabilite gösterdiğini ve yıkama performansı analizi, kan lekelerini etkili bir şekilde giderebileceğini gösterdiğini belirtmişlerdir.

Harer ve ark. (2018), *Bacillus thuringinsis*-SH-II-1A'dan serin alkalin proteazın izolasyonunu, saflaştırarak karakterize etmişlerdir. Proteazı amonyumsülfatla çöktürme, diyaliz ve Sephadex G-200 jel kromatografisi ile %8.47 lik bir verimle 17.04 kat saflaştırmışlardır. SDS-PAGE ile saflaştırılmış enziminin MA'sını 67 kDa gözlemlemişlerdir. Maksimum bakteri üremesi ve enzim üretimi için optimum koşulları 45°C, 48 saat olarak belirlerken, en yüksek proteaz aktivitesini pH 10.0 ile 11.0 gözlemlemişlerdir. Denenen farklı doğal substratlar arasında kazeinin, ideal substrat olduğunu bulmuşlardır. Enzim aktivitesinin Ca^{2+}, Mg^{2+} ve Mn^{2+} gibi metal iyonları ile kuvvetli bir şekilde arttırıldığını, buna karşın PMSF ile enzim aktivitesinin %100 ve diizopropil fluorofosfat (DFP) ile %92'ye varan inhibisyonun serin proteazı doğruladığını belirtmişlerdir.

Lakshmi ve ark. (2018), *Bacillus cereus* suşu S8 (MTCC NO 11901) tarafından üretilen alkalin serin proteazı, amonyumsülfat çöktürmesi (%50), filtrasyon (Sephadex G-100) ve kromatografik teknikleri ile saflaştırıp karakterize etmişlerdir. Bu saflaştırma işleminin sonucunda, saflaştırma katsayısını 17.04 ve verimi %34.6 olarak bulmuşlardır. Saflaştırılmış proteazın moleküler ağırlığını 71 kDa ve indirgeyici koşullar (35 kDa ve 22 kDa) altında SDS-PAGE kullanarak belirlemişlerdir. Zymogram analizin proteolitik aktivitenin sadece 22 kDa ile ilişkili olduğunu ve bu sonuçların, enzimin doğal durumunda dimer olarak bulunduğunu belirttiler. Proteazın optimum aktivitesinin, pH 10.0 ve sıcaklık 70°C'de spesifik bir substrat olan kazein ile pH ve sıcaklığa karşı büyük stabilite gösterdiğini belirtmişlerdir. Enzimin, PMSF ve TLCK (Tosyl-L-lysyl-chlorometan ketone) tarafından tamamen inhibe edilmesinin tripsin tipi bir serin proteaz olduğu anlamına geldiğini belirtmişlerdir. Enzimin; organik çözücülere ve oksitleyici

maddelere karşı büyük bir stabilite gösterdiğini, Li^{2+} ve Co^{2+} metal iyonlarından olumsuz yönde etkilendiğini bulmuşlardır.

Si ve ark. (2018), *Bacillus subtilis* FBL-1'den üretilen ekstraselüler proteazın saflaştırılması ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. *Bacillus subtilis* FBL-1 tarafından üretilen proteazı amonyumsülfat çöktürmesi, DEAE-Selüloz ve Sephadex G-75 kromatografisi kullanarak 2.9 kat saflaştırmışlardır. Elektroforez ile proteazın MA'sını yaklaşık 37.6 kDa olarak bulmuşlardır. Saf proteazın 45°C ve pH 9.0'da maksimum aktivite gösterdiğini; aktivitenin 30-50°C sıcaklık ve pH 7.0- 9.0 aralığında sabit kaldığını tespit etmişlerdir. Proteaz aktivitesinin, Ca^{2+} Mg^{2+}, Mn^{2+}, Fe^{2+}, Ca^{2+} ve K^{+} gibi metal iyonlar tarafından aktive edildiğini, fakat 10 mM Fe^{3+}'in, enzim aktivitesini önemli ölçüde inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir. Proteaz aktivitesinin, deterjanlara ve organik solventlere karşı iyi bir stabilite gösterdiğini belirtmişlerdir. Proteaz aktivitesi için tercih edilen substratların kazein (%100) ve soya unu (%71.6) olduğunu bulmuşlardır.

Shaikh ve ark. (2018), toprakdan izole edilen *Bacillus* sp. APP-07' den deterjan uyumlu alkali proteazın saflaştırılması ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Kültürü, 100 ml'lik bir işlem hacmine sahip 1000 ml kapasiteli bir şişede büyütüp ve 55°C'de 33 saat boyunca döner bir çalkalayıcıda inkübe etmişlerdir. İnkübasyondan sonra 50 K ve 10 K filtreleri kullanarak nominal moleküler ağırlık limiti (NMWL) kesim alkalin proteazı, aseton çökeltme, ultrafiltrasyon ve Sephadex G-100 jel filtrasyonu ile kısmen %66.67 nihai verimle 3.12 kat saflaştırmışlardır. Enzimin MA'sını 33 kDa olarak tespit etmişlerdir. Saflaştırılmış enzimin, optimum pH 10.5 ve sıcaklığı 55°C olduğunu; daha yüksek pH ve sıcaklık aralığında stabil kaldığını belirtmişlerdir. PMSF ve DFP ile enzimatik aktivitede tamamen inhibisyon meydana getirmesi nedeniyle enzimin serin proteaz ailesine ait olduğunu ifade etmişlerdir.

Rekik ve ark. (2018), açık deniz petrol sahasından izole edilmiş *Bacillus safensis* RH12'den yeni bir deterjan uyumlu serin alkalin proteaz (SAPRH) üretimi, saflaştırılması ve biyokimyasal karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Enzimi tuzla çöktürme, ısıl işlem ve FPLC anyon değiştirme kromatografisi kullanılarak saflaştırmışlardır. Saflaştırılmış enzimin, 28 kDa'lık bir moleküler kütleye sahip bir monomer olduğunu belirtmişlerdir. SAPRH'nin NH2-terminal 23 amino asit dizisi,

Bacillus proteazlarınkilerle yüksek homoloji gösterdiğini ve SAPRH'in pH 9.0 ve 60°C'de optimum aktivitesinin olduğunu göstermişlerdir. Enzimin, PMSF ve DFP tarafından kuvvetlice inhibe edildiğini, bunun da serin proteazlar ailesine ait olduğu anlamına geldiğini belirtmişlerdir. Enzimin, yüzey aktif maddeler ve ticari deterjanlarla mükemmel stabilite ve uyumluluk sergilediğini SDS ile %90 stabilite ve ticari sınıf çamaşır deterjanı ile %100 stabilite ortaya koyduğunu gözlemlemişlerdir.

3.MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Biyolojik Materyal

Çalışmamızda kullandığımız biyolojik materyal olan *Bacillus subtilis* A8, Ergani Makam dağından izole edilmiştir.

3.1.2. Kimyasal Maddeler

3.1.2.1. Besiyeri Maddeleri

Nutrient Broth (NB) ve Nutrient Agar Merck'ten tedarik edilmiştir.

3.1.2.2. Azot Kaynakları

Amonyum sülfat, amonyum klorür, amonyum nitrat, sodyum nitrat ve üre Merck'ten, pepton Oxoid'ten, tripton ise Sigma'dan satın alınmıştır.

3.1.2.3. Karbon Kaynakları

Laktoz, maltoz ve fruktoz Sigma'dan; glukoz, galaktoz, sükroz ve nişasta Merck'ten tedarik edilmiştir.

3.1.2.4. Kimyasallar ve Deterjanlar

Brij ve TritonX-100 Sigma'dan, SDS, Tween 80, Tween 40 ise Merck'ten temin edilmiştir. Sodyum hidroksit (NaOH), hidroklorik asit (HCl), amonyum sülfat $(NH_4)_2SO_4$, sodyum bikarbonat $(NaHCO_3)$, sodyum karbonat (Na_2CO_3), TCA (trikloroasetikasit) Merck Dermstad'ten, Na-K-Tartarat Fluka Bichemica'dan; Folin reaktifi (FCR) Sigma'dan; bakır sülfat **(**$CuSO_4.5H_2O$**)** Riedel-De Haen'den temin edilmiştir.

3.1.3. Cihaz

CİHAZ	MARKA
İnkübatör	Sanyo
Steril Kabin	Telstar AV-100
Spektrofotometre	UV Mini 1240 Shimadzu
Çalkalayıcı	P Selecta Unitronic OR
Soğutmalı Santrifüj	Sigma 2K-15
Vorteks	VWR International
Magnetik Karıştırıcı	Stuart
İnkübatör	Heraus
Hassas Terazi	Gec, Avery
Otoklav	Hiclave HV
Ph Metre	Metler Toledo MP220
Kuru Hava Sterilizatörü	Heraus
Mikropipet	Eppendorf

3.1.4. Bakteri İzolasyonu ve Tanımlamasında Kullanılan Besiyerleri

3.1.4.1. Sıvı Besiyeri

8 g NB saf suyla 1000 ml'ye (1 lt) tamamlandıktan sonra otoklava kondu.

3.1.4.2. Katı Besiyeri

20 g Nutrient agar saf suyla 1000 ml'ye (1 lt) tamamlanıp otoklavlandı.

3.1.4.3. Üreaz Agar Besiyeri

1 g Pepton, 2 g KH_2PO_4, 5 g NaCl, 1 g D-Glukoz, 20 g Üre, 12 mg Fenol kırmızısı, 1.5 g Agar-agar, 100 ml saf su kullanılarak pH 7.0 hazırlandı.

3.1.4.4. Kazein Besiyeri

10 g/l Pepton, 5 g/l Maya Özütü, 15 g/l Agar-agar, %10 Süt Tozu

3.1.5. Kullanılan Çözeltiler

3.1.5.1. Kristal Viyole Çözeltisi

40 g Kristal viyole, 400 ml %95'lik Etanol kullanıldı. Cam havanda kristal viyole ezilerek üzerine etanol ilave edildi. Gram boyama sırasında kullanıldı.

3.1.5.2. Lugol Çalışma Solüsyonu

Koyu renkli bir şişede 60 ml stok lugol solüsyonu, 60 ml %5'lik $NaHCO_3$, 220 ml saf su karıştırılarak hazırlandı. Gram boyama sırasında kullanıldı.

3.1.5.3. Sulu Fuksin Solüsyonu

10 ml Bazik fuksin (stok), 100 ml saf su ile karıştırıldı. Gram boyama sırasında kullanıldı.

3.1.5.4. Alkalin Çözeltisi

Bir erlende 1000 ml %4 Na_2CO_3 hazırlanarak üzerine %4 Na-K tartarat ve %2 $CuSO_4.5H_2O$'dan 10'ar ml ekleyip karıştırıcıda karışmaları sağlanarak koyu renkli bir şişede oda sıcaklığında saklandı. Hazırlanan alkalin çözeltisi protein miktar tayini amacıyla kullanıldı.

3.1.6. Tamponlar

Değişik pH tamponları hazırlanırken, 0.1 M HCl, 0.1 M Sitrik Asit, 0.1 M Tris-HCI ile 0.1 M Karbonat/Bikarbonat tampon çözeltilerinden yararlanıldı.

3.2. Metot

3.2.1. *Bacillus subtilis* A8'in Eldesi ve Tanımlanması

Doç.Dr. Sema AGÜLOĞLU-FİNCAN tarafından Ergani Makam Dağı'ndan izole edilen *B. subtilis* A8 katı besiyerinden steril plastik öze yardımıyla alınıp NB sıvı besiyerine ekimi yapıldı. 37°C'de çalkalamalı su banyosunda 120 rpm'de, 24 saat inkübe edildi. Organizmanın biyokimyasal testleri ve 16S rRNA analizi yapıldı.

3.2.2. Gram Boyama

NB agarda bir gece bekletilerek üretilen bakterilerden steril plastik öze yardımıyla koloni alınarak temiz lamın uç kısmına bırakıldı. Üzerine serum fizyolojik damlatılarak kolonilerin yayma işlemi gerçekleştirildi. Preparat kurutulup alevden geçirildi. Preparatlar kurutulduktan sonra kristal viyole çözeltisine alındı. Boyanan preparatlar üzerine lugol çözeltisi bırakılarak bekletildikten sonra yıkama işleminden geçirildi. Preparat %96'lık alkolde 15-20 saniye tutuldu. Son aşamada preparat, sulu fuksinde bekletiltikten sonra yıkanarak fazla boyadan arındırıldı. Kurutulan preparatlar gerek morfolojik ve gerek Gram özelliklerini belirlemek için mikroskop altında incelendi.

3.2.3. Biyokimyasal Testler

Bakteri morfolojisini belirlemek için gram boyama ve fosfataz, katalaz, üreaz, hareket, hemoliz, kazein testi gibi çeşitli biyokimyasal testler gerçekleştirildi.

- Fosfataz Testi

B.subtilis A8'in fosfataz enzimi sentezleyip sentezlemediğini belirlemek amacıyla %0.5 fenolftaleindifosfat içeren NB sıvı besi ortamına ekilerek bir gün süreyle etüvde bekletildi. İnkübasyon sonrasında 1 damla %40 NaOH çözeltisi ile kırmızı rengin oluşup oluşmadığı tespit edildi.

- Katalaz Testi

Bakterilerin katalaz sentezleyip sentezleyemediklerini belirlemek için katalaz testi yapıldı. 18-24 saatlik kültür çizgi ekim yötemiyle ekim yapılaldıktan sonra gecelik inkübasyona bırakıldı. %3'lük H_2O_2 yeni kültürlerin üzerine yavaş yavaş eklenerek incelendi. H_2O_2 eklenmesinden sonra kolonilerin olduğu yerlerde hava kabarcıkları oluşup oluşmadığı kontrol edildi.

- Üreaz Testi

Bakterilerin üreyi hidroliz eden üreaz enzimini sentezlediklerini tespit etmek amacıyla üreaz tesiti yapıldı. Bu analiz bakterilerin cins ve tür tayinini belirlemede önemlidir. 15 ml'lik tüplerde üre agarlı besi ortamı hazırlanarak yeni bakteri kültürlerinden bu tüplere ekim yapıldı. 2-5 gün süreyle inkübe edilerek renk değişiminin

olup olmadığı gözlemlendi.

- Hareket Testi

Bakterilerin hareket yeteneklerinin olup olmadığını belirlemek için hareket testi kullanıldı**.** %0.4-0.5 yarı katı agarlı besiyeri, içinde kapiler tüpler barındıran 15 ml hacimli tüplere aktarıldı.

Bakteri kültürü iğne öze ile kapiler tüp içine daldırılarak ekimi gerçekleştirildi ve 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnokülasyon hattından çeşitli yönlere doğru üremenin oluşması bakterinin hareket testini doğrular.

- Hemoliz Testi

Bakterilerin hemoliz yeteneği olup olmadığını belirlemek amacıyla kullanıldı. Bu test %5 koyun kanı içeriğine sahip olan kanlı agarda gelişen bakterilerin, içerdikleri hemoliz enzimleriyle eritrositleri parçalaması prensibine göre belirlenir. Oluşturdukları kolonilere göre; bulanık ve yeşilimsi bir bölge oluşturanlar α-hemolitik; saf ve şeffaf bir hemoliz bölgesi oluşturanlar β- hemolitik ve zon oluşturmayanlar γ-hemolitik tepkime verenler olarak tespit edilir. Gecelik kültürden kanlı agar besi ortamına tek koloni olacak şekilde çizgi ekim yapıldı. Optimum sıcaklıkta değerinde 1–7 gün süreyle inkübe edildi.

- Kazein Testi

Bakterilerin kazeini kazeinaz ile parçalayıp parçalamadıklarını belirlemek için yapılır. %10'luk süt tozu içeren besiyeri hazırlanıp ekim yapılarak 1 gün boyunca inkübasyona bırakıldı. Daha sonrasında %1'lik HCl damlatıldı ve kolonilerin çevresinde şeffaf bölgelerin oluşup oluşmadığı tespit edildi.

3.2.4. Proteaz Eldesi

24 saat inkübasyondan sonra NB besiyeri 10 dk ve 10000 rpm'de santrifüjlenerek proteaz aktivitesi deneylerinde kullanıldı.

3.2.5. Proteaz Aktivitesi Tayini

Enzim aktivitesi Leighton yöntemine göre test edildi (Leington ve ark.1973). Bu yönteme göre %0.5 'lik azokazein, 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0) çözeltisinde vortekslenerek

hazırlandı. Bu çözeltiden 250 µl azokazein çözeltisi alınarak 150 µl enzim solüsyonuna (üst sıvıya) eklenerek 37°C de 30 dk bekletildi. 30 dk sonunda %10'luk TCA (Trikloroasetik asit) çözeltisinden 1 ml ilave edilerek reaksiyon durduruldu. Buzlukta 15 dk bekletme işlemi sonrasında 4^{o}C sıcaklıkta, 10000 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Süpernatant'dan 1ml alınarak üzerine 500 µl 1.8 N NaOH ilave edildikten sonra 420 nm'de spektrofotometrede absorbans ölçümü yapıldı.

Ünite (U/mg):1 dakikada 1 µmol substratı ürüne çeviren enzim miktarına denir.



Şekil 3.1. Proteaz Aktivitesi Tayin Yöntemi

3.2.6. Protein Miktar Tayini

Proteinin miktar analizi Lowry metoduyla gerçekleştirildi (Lowry 1951). 450 µl distile su, üzerine 50 µl üst sıvı ve daha sonra 5 ml alkalin solüsyonu bırakıldı. Tüplerin 15 dk 40°C'de inkübasyon işlemi, arkasından 500 µl FCR distile su ile bire bir seyreltilerek (FCR, Sigma) eklendi. 30 dk ışıksız ortamda bekletildikten sonra 660 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapıldı.

3.2.7. *Bacillus subtilis* A8 Üretim Ortamının Optimizasyonu

3.2.7.1. İnkübasyon Sürelerinin *Bacillus subtilis* A8 Üremesi Üzerine Etkisi

Farklı inkübasyon sürelerinin *B. subtilis* A8'in üremesi üzerindeki etkisini belirlemek için 25 ml NB ortamında (pH 7.0) bulunduran 100 ml' lik erlenlere 2 ml bakteri ekimi yapıldı. 37°C'de üretilen bakterilerin 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68, 72 saatlerinde 460 nm'de spektrofotometrik ölçüm alındı.

3.2.7.2. Sıcaklığın *Bacillus subtilis* A8 Üremesine Etkisi

Farklı sıcaklıkların *B. subtilis* A8'in üremesi üzerindeki etkisini belirlemek için, 100 ml'lik erlenlerin içinde bulunan 25 ml NB sıvı ortamına (pH 7.0) bakteri ekildikten sonra 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55°C'lerde 120 rpm'de çalkalamalı olarak üretildi. 460 nm'de spektrofotometrik ölçüm alındı.

3.2.7.3. pH'ın *Bacillus subtilis* A8 Üremesine Etkisi

100 ml'lik erlenlerin içinde bulunan 25 ml NB'de pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 olacak şekilde hazırlanarak otoklava bırakıldı. Besiyerlerinin her birine 2 ml bakteri ekildi. *B. subtilis* A8, optimal değerlerde 120 rpm'de çalkalayıcıda inkübe edilerek ve 460 nm'de absorbansları ölçüldü.

3.2.8. *Bacillus subtilis* A8*'den* Elde Edilen Proteazın Optimizasyonu

3.2.8.1. İnkübasyon Süresinin Proteaz Üretimine Etkisi

25 ml NB besiyeri (pH 7.0) bulunduran 100 ml' lik erlenlere 2 ml kültür ekildi ve 37°C'de inkübe edildi. NB besiyerinden 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68, 72 saatlerinde süpernant alınarak enzim ve protein miktarı hesaplandı.

3.2.8.2. Sıcaklığın Proteaz Üretimi Üzerine Etkisi

NB besiyerinde üreyen bakterilerin olduğu ortam santrifüj edildi ve elde edilen üst sıvıların 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55°C'lerde proteaz aktivite tayini ölçüldü ve optimum sıcaklık belirlendi.

3.2.8.3. pH'ın Proteaz Üretimi Üzerine Etkisi

NB besiyerinde üreyen bakterilerin olduğu ortam santrifüj edilerek üst sıvı proteaz olarak kullanıldı. Substrat olan %0.5'lik azokazein tek tek sitrik asit (0.1 M pH 4.0-6.0), Tris-HCl (0.1 M pH 7.0-9.0) ve karbonat/bikarbonat (0.1 M pH 10.0-11.0) tamponları içinde hazırlandı ve optimal pH tespit edildi.

3.2.8.4. Farklı Karbon ve Azot Kaynaklarının Proteaz Üretimi Üzerindeki Etkisi

100 ml'lik erlenlerin içinde bulunan 25 ml NB otoklava bırakıldı. NB besi ortamlarında %1 konsantrasyonunda karbon kaynakları olarak kullanılan glukoz, fruktoz, galaktoz, laktoz, maltoz, nişasta ve sükroz NB'ye ayrı ayrı eklenerek 2 ml bakteri ekildi. 37°C'de 24 saat süreyle bekletildi. Bu numunelerin 460 nm'de spektrofotometrik ölçümleri yapılarak üst sıvıda proteaz aktivitesi test edilerek protein içeriği hesaplandı.

100 ml'lik erlenlerin içinde bulunan 25 ml NB'ye konsantrasyonun %1'ini içerecek azot kaynaklarından pepton, tripton, üre, amonyum klorür, amonyum sülfat, amonyum nitrat, sodyum nitrat eklendikten sonra otoklavlandı. Her bir erlene ekim yapılarak 24 saat ve 37°C'de inkübe edildi. Örneklerde spektrofotometrik ölçümler yapılarak proteaz aktivitesine ve protein miktarına bakıldı.

3.2.9. Proteaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması

1000 ml'lik erlende 350 ml NB hazırlanarak (pH 7.0), otoklava koyularak bakteri ekimi yapılıp 37°C ve 24 saatte inkübe edildi. Sonrasında besiyeri santrifüjlenerek süpernatantlar toplandı. Enzim iki aşamadan geçirilerek kısmi olarak saflaştırıldı. Bu aşamalar "amonyumsülfat çöktürmesi ve diyaliz"dir.

3.2.9.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Magnetik karıştırıcı üzerinde bulunan steril beher içinde toplanan süpernatanta %40-80'lik olacak şekilde azar azar amonyum sülfat [$(NH_4)2SO_4$] ilave edilerek çözünmesi beklendi. Çözünme işlemi gerçekleştikten sonra santrifüj yapıldı.

3.2.9.2. Diyaliz

Elde edilen pelet 0.1 M pH 7.0 Tris-HCl tamponu içinde çözdürüldü. Diyaliz hortumu, distile suda 5 dk kaynatıldıktan sonra tekrar saf sudan geçirilip temizlenerek içine çözünmüş pelet bırakıldı. Diyaliz hortumu içindeki enzim çözeltisini, amonyum sülfattan ayırmak için saf suda +4°C'de magnetik karıştırıcı üzerinde karıştırarak 1 gece beklemeye alındı. Diyaliz işleminden sonra hacim ölçümü, protein tayini ve enzim aktivite tayinleri yapıldı.

3.2.10. Kısmi Saflaştırılan Proteazın Sıcaklık Stabilitesinin Saptanması

Kısmi saflaştırılması yapılan proteazın sıcaklık stabilitesini belirlemek için 30°C, 40°C ve 50°C sıcaklıklarda yalnızca proteaz kullanılıp 15, 30, 45, 60, 90 ve 120 dk'lık ön inkübasyonlar geçirildi. Enzim aktivitesini belirlemek amacıyla ön inkübasyon işlemlerini takiben 50 µl proteaz ve 350 µl azokazein karışımı enzimin optimal sıcaklığı 37°C'de 30 dk inkübe edildi.

3.2.11. Kısmi Saflaştırılan Proteazın pH Stabilitesinin Saptanması

Kısmi saflaştırılması yapılan proteazın pH stabilitesinin belirlemek amacıyla 0.1 M Tris- HCI (pH 7.0, 8.0 , 9.0) kullanıldı.

Tüplere proteazla farklı tampon çözeltileri aktarılarak 60 dk ön inkübasyon aşamasından geçirildi. Saf suyla hazırladığımız azokazein eklenerek Leighton metoduyla proteaz aktivite analizi edildi. En iyi absorbansın pH değerinin 100 olduğu kabul edilip öteki pH verilerinin bu değere göre oranlanarak rölatif proteaz aktivitesi bulundu.

3.2.12. Bazı Deterjanların Kısmi Saflaştırılan Proteaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

%0.5 oranında kullanılan SDS, Tween-40, Tween-80, Brij ve TritonX-100 0.1 M pH 7.0 Tris-HCl çözeltisinde hazırlanan sürfaktanlardan 100 µl sonra 50 µl enzim koyup 30 dk 37°C'de ön inkübasyona tabi tutuldu. Sonrasında tüplere 350 µl azokazein bırakılıp optimum şartlarda proteaz aktivite tayini yapıldı.

3.2.13. Kısmi Saflaştırılan Proteaz Aktivitesi Üzerine Bazı İnhibitörlerin Etkisi

EDTA (Ethylenediamintetra acetic acide) (1-10 mM), PMSF (Phenylmethylsulfonyl flüoride) (1-10 mM), DTT (Dithiothreitol) (1-10 mM), β-mercaptoethanol (1-10 mM) stok çözeltileri hazırlandı. PMSF etanol içinde öteki kimyasal maddeler ise 0.1 M pH 7.0 Tris-HCl tamponunda çözülerek enzimle 30 dk. beraber bırakılıp azokazein ilavesiyle proteaz aktivitesi belirlendi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. *Bacillus subtilis* A8'in İzolasyonu ve Tanımlanması

4.1.1. *Bacillus subtilis* A8'in İzolasyonu

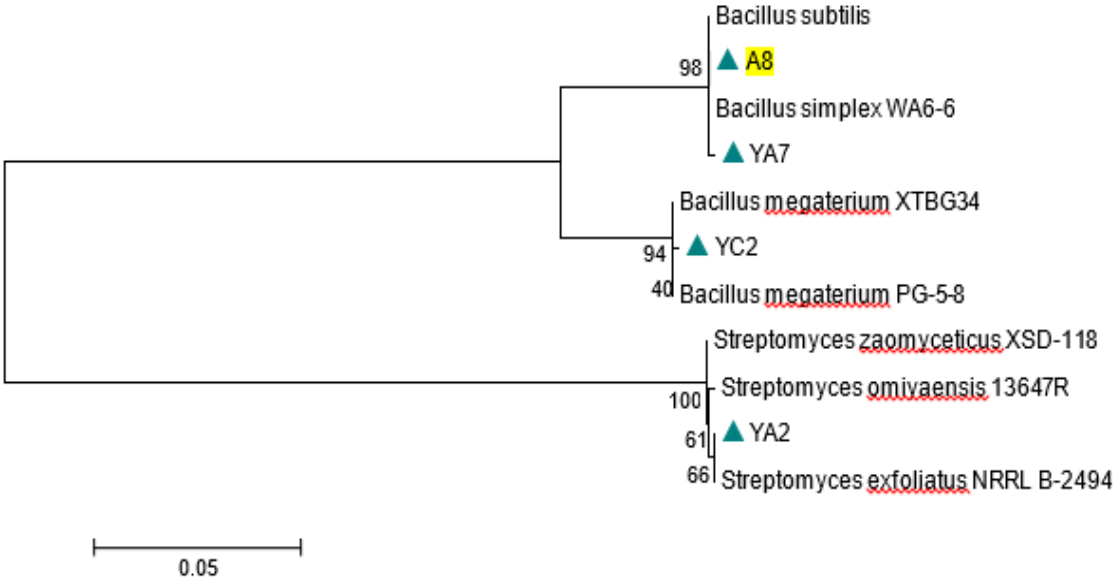
Çalışmamızda kullandığımız biyolojik materyal olan *Bacillus subtilis* A8 Ergani Makam dağından 38.2944 enlem ile 39.7610 boylamları arasından alınan toprak örneğinden Doç.Dr. Sema AGÜLOĞLU-FİNCAN tarafından izole edilmiştir.

1 g toprak örneği tartılarak 10 ml steril saf su ile süspansiyon haline getirildi ve 37°C'de 30 dk inkübe edildi. Üst kısımdan alınan 2 ml'lik örnek NB (pH 7.0) besiyerine inoküle edilerek çalkalamalı su banyosunda 2 saat inkübasyona bırakıldı. Saf halde *Bacillus subtilis* A8'in kültürünü hazırlayabilmek için bir seri sulandırmalar yapılarak (10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} ve 10^{-7}) katı besiyerlerine yayma metoduyla ekilip 37°C'de bir gece inkübe edildi. İnkübasyon sonrası besiyerindeki koloniler saf kültür olarak seçildi. Seçilen koloniler NB agara çizgi şeklinde ekim yapıldıktan sonra 37°C'de 24-72 saat etüvde inkübe edildi. (Şekil 4.1)



Şekil 4.1. *Bacillus subtilis* A8'in koloni görünümü

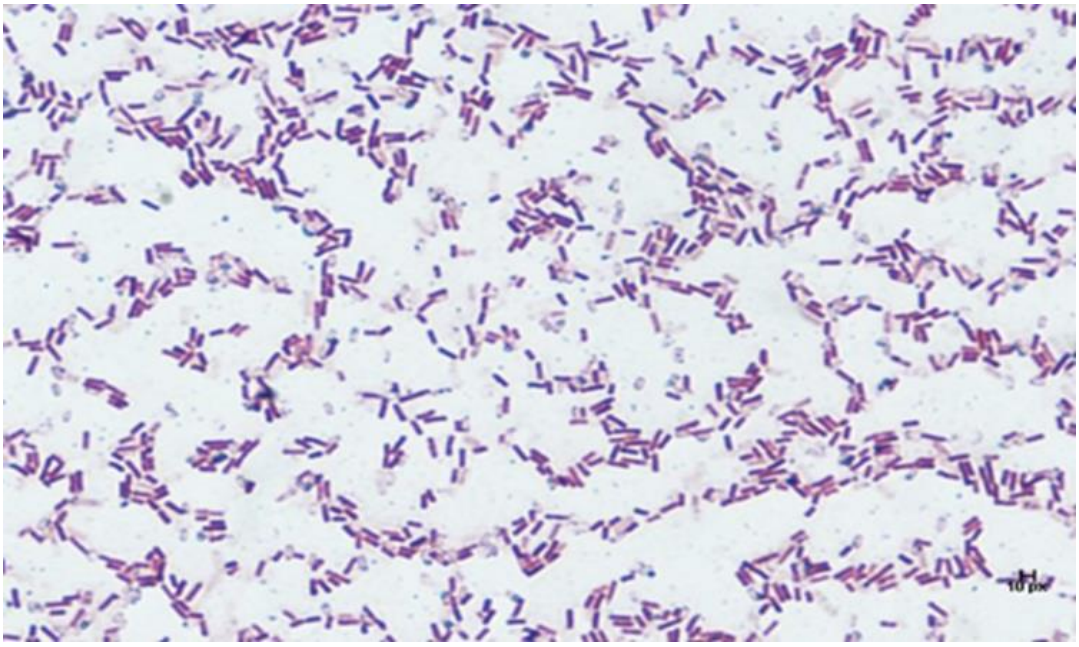
Bakteriyi tanımlamaya yönelik 16 S rRNA analizi Ref-Gen (METU Technocity/ Ankara) tarafından yapıldı (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. *Bacillus subtilis* A8'in filogenetik ağacı

4.1.2. Gram Boyama

NB agarda gece boyunca üretilen bakteri örneklerinden hazırlanan preparatların morfolojik ve Gram özelliklerini belirlemek için mikroskobik incelemeleri yapıldı (Şekil 4.3.)



Şekil 4.3. *B. subtilis* A8'in Gram boyama görüntüsü

4.1.3. Biyokimyasal Testler

Bakteri örneğini teşhis edebilmek amacı ile gram boyama ve katalaz, üreaz, fosfataz, hareket, hemoliz, kazein gibi çeşitli biyokimyasal testler yapıldı.

Çizelge 4.1. *B. subtilis* A8'in tanımlanmasında kullanılan test sonuçları

Özellikleri	***Bacillus subtilis A8***	***Bacillus***
Gram boyama	(+)	D
Koloni morfolojisi	Basil	Basil, Kok, virgül
Hareketlilik	Haraketli	Hareketli-Hareketsiz
Katalaz	(+)	(+)
Hemoliz	(+)	D
Üreaz	(+)	(+)
Kazein	(+)	D
Sıcaklık aralığı	20-45	20-75
pH aralığı	4-10	4-10
Fosfataz	(+)	(+)

(+) pozitif, (–) negatif, (D) değişken.

- Fosfataz Testi

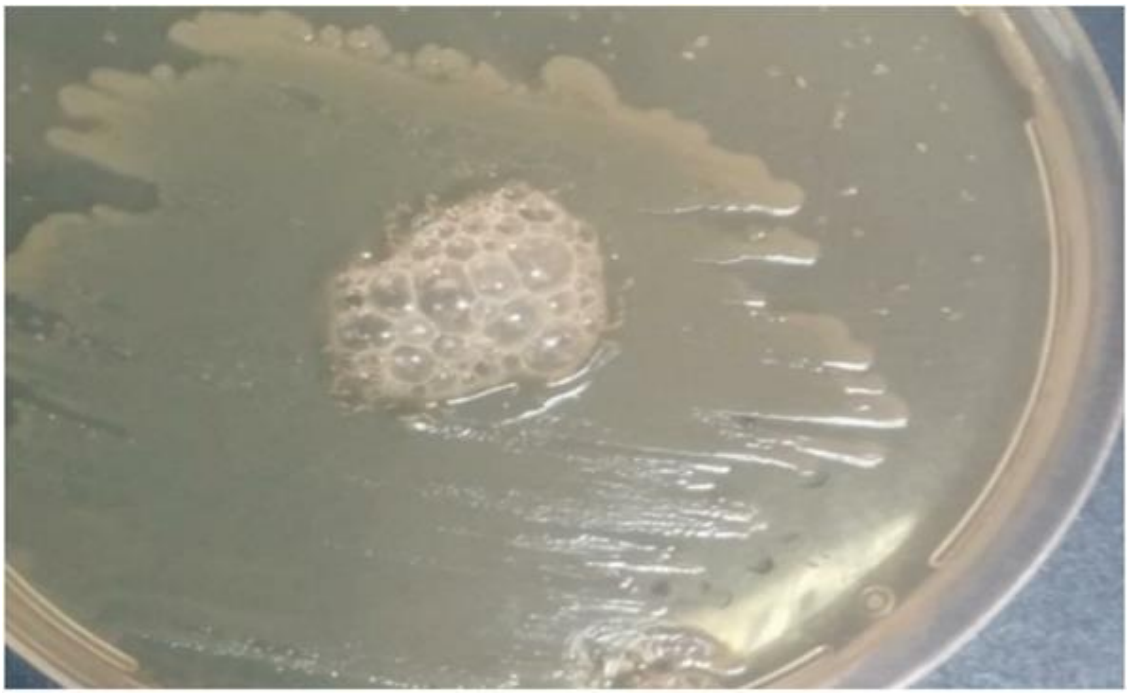
B. subtilis A8'in fosfataz enzimini sentezleyip sentezlemediğini belirlemek amacıyla yapılan deneyde, *B. subtilis* A8'in bulunduğu tüp kontrolle karşılaştırıldığında kırmızı renk oluşumunun gözlenmesi ile bakterinin fosfataz sentezlediği tespit edildi (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. *B. subtilis* A8'in Fosfataz testi

- Katalaz Testi

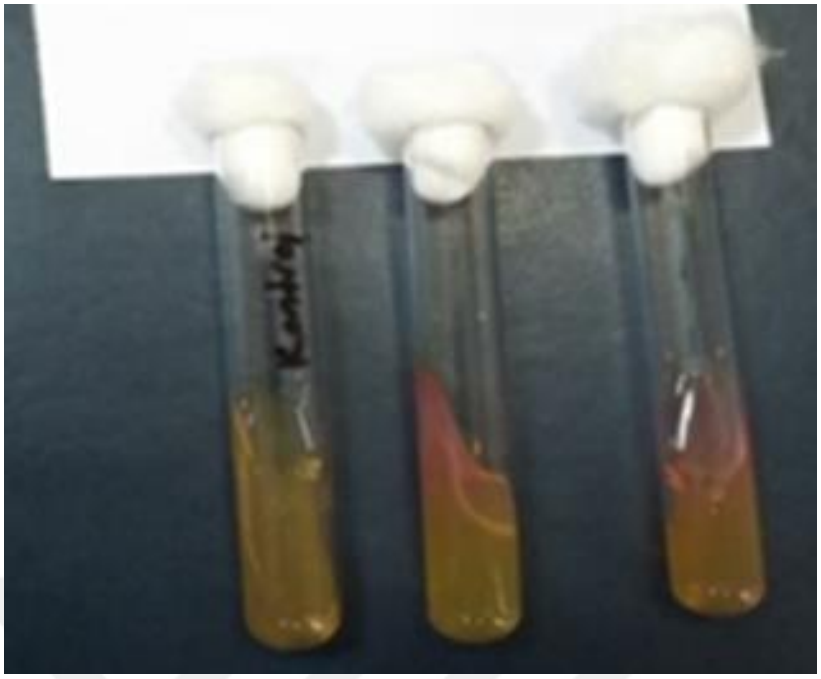
Bakterilerin katalaz sentezleyip sentezleyemediklerini belirlemek için katalaz testi yapıldı. Kullandığımız bakteri kültürü üzerine taze hazırlanmış %3'lük H_2O_2 ilave edildiğinde gaz çıkışı gözlendiğinden *B. subtilis* A8 bakterisinin katalaz pozitif olduğu belirlendi (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. *B. subtilis* A8'in katalaz testi

- Üreaz Testi

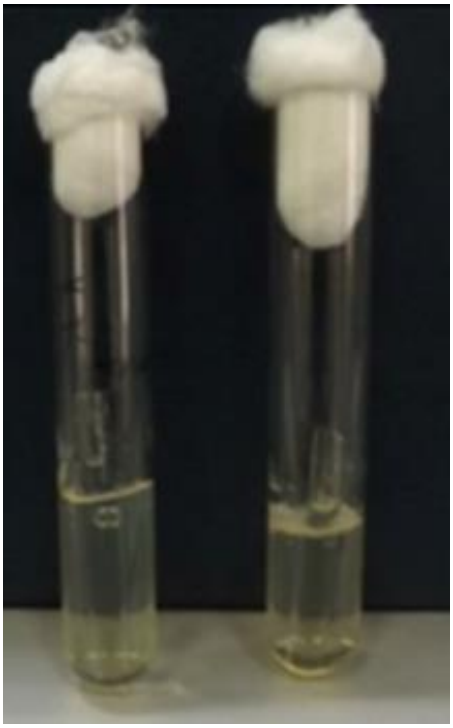
Bakterilerin üreyi hidroliz eden üreaz enzimini sentezlediklerini tespit etmek amacıyla üreaz testi yapıldı. Bu analiz bakterilerin cins ve tür tayinini belirlemede önemli olan bu test sonucunda Şekil 4.6.'te görüldüğü gibi görülen renk değişimi *B. subtilis* A8'in üreyi hidroliz eden üreaz enzimi sentezlediğini göstermektedir.



Şekil 4.6. *B. subtilis* A8'in üreaz testi

- Hareket Testi

Bakterilerin hareket yeteneklerinin olup olmadığını belirlemek için hareket testi kullanıldı. Kontrolle karşılaştırıldığında inokülasyon hattınca çoğalmanın olması ve inokülasyon hattından agarın iç kısmına doğru yayılmanın gözlenmesi ile *B. subtilis* A8'in hareketli olduğu kabul edildi (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. *B. subtilis* A8'in hareket testi

- Hemoliz Testi

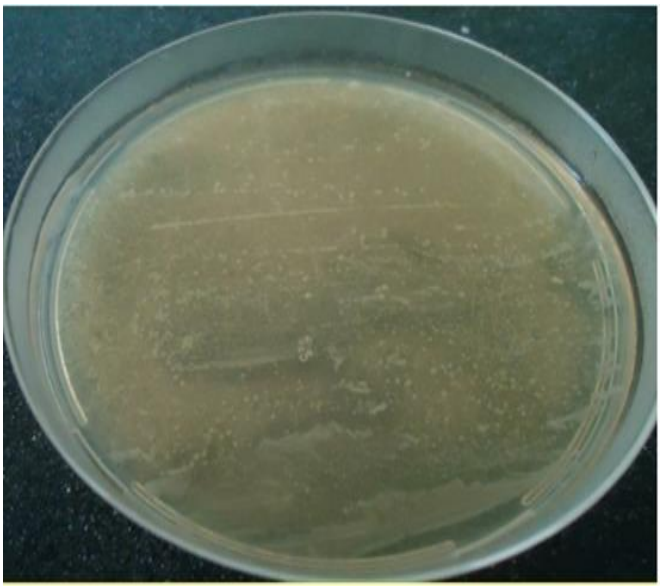
Bakterilerin hemoliz yeteneği olup olmadığını belirlemek amacıyla gecelik kültürden %5 koyun kanı içeren besi ortamına tek koloni olacak şekilde özeyle çizgi şeklinde ekimi yapılan kolonilerin etrafındaki zona bakılarak bakterinin hemoliz yeteneğinde olduğu bulundu (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8. *B. subtilis* A8'in hemoliz testi

- Kazein Testi

Bakterilerin süt proteinini oluşturan kazeini kazeinazla hidrolizleyip hidrolizleyemediklerini belirlemek amacıyla yapılan kazein testi sonucu Şekil 4.9'da görüldüğü gibi kolonilerin etrafında görülen şeffaf zonlar *B. subtilis* A8'in kazein içeren agarda kazeinazla süt proteinini parçaladığını göstermektedir.

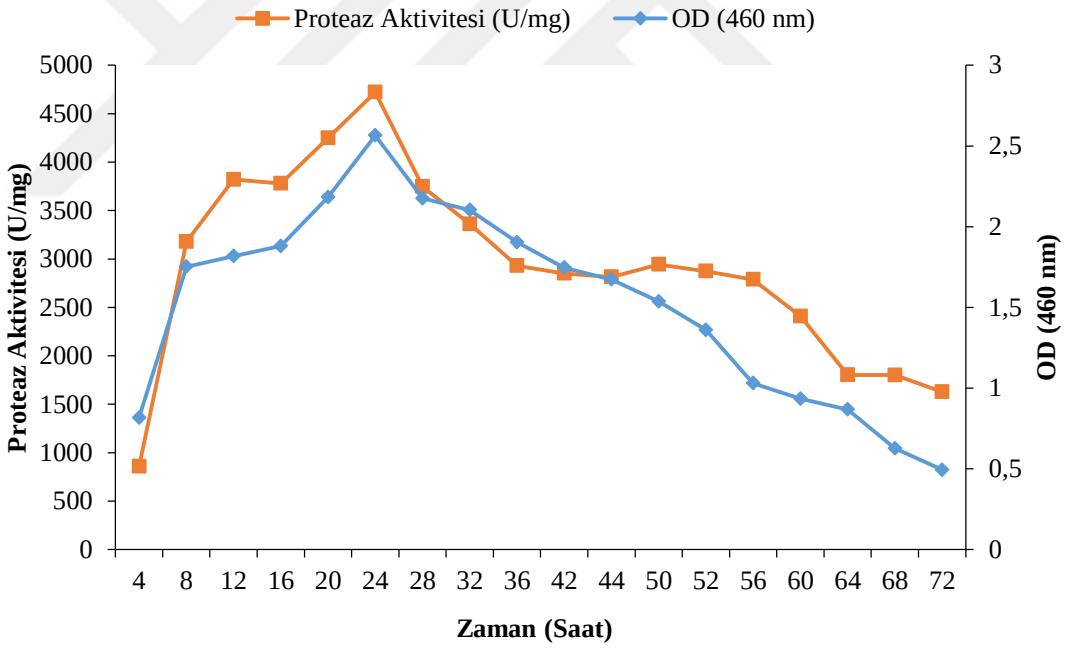


Şekil 4.9. *B. subtilis* A8'in Kazein testi

4.2. *B. subtilis* A8'in Üretim Ortamının ve *B. subtilis* A8'den Elde Edilen Proteazın Optimizasyonu

4.2.1. İnkübasyon Sürelerinin *B. subtilis* A8 Üremesine ve Proteaz Üretimine Etkisi

Farklı inkübasyon sürelerinin *B. subtilis* A8'in üremesi üzerine etkisini belirlemek için 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68, 72 saatlerinde alınan süpernanatta hem bakteri üretimi ölçülüp hem de proteazın aktivitesi ve proteinin nicelik analizi yapılıp spesifik aktivite (U/mg) bulundu. Yapılan ölçümlerde bakterinin 4.saatten itibaren başlayan enzim üretiminin 24. saatte en yüksek değere (4720.415 U/mg) ulaştığı ve sonrasında ise giderek bir azalma olduğu Şekil 4.10'da gösterilmiştir.

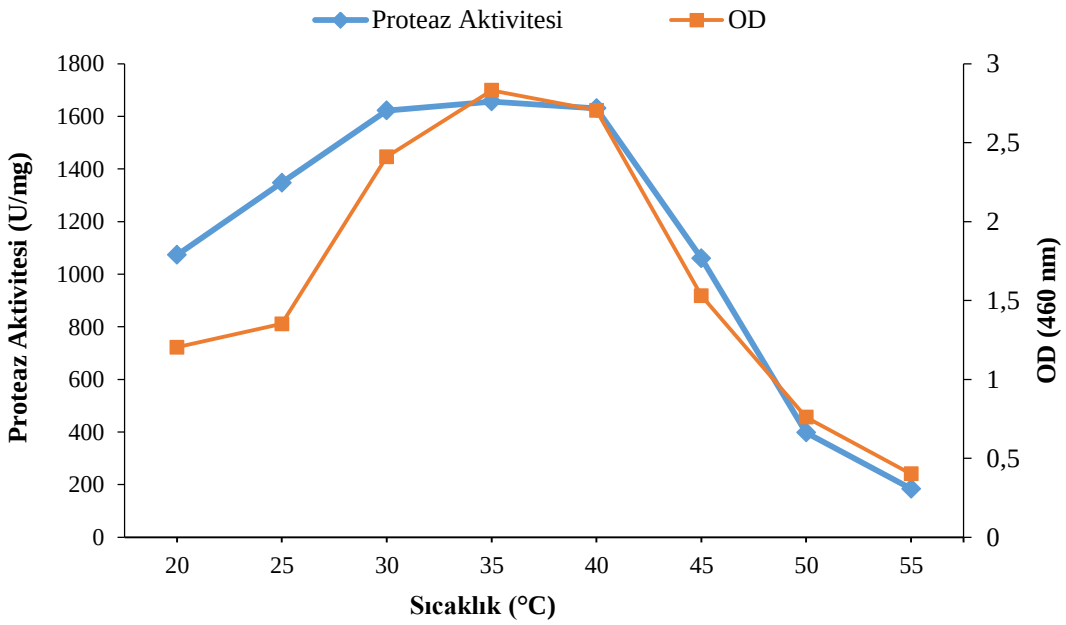


Şekil 4.10. İnkübasyon Sürelerinin *B. subtilis* A8 Üremesi ve Proteaz Üretimi Üzerine Etkisi

4.2.2. Sıcaklığın *B. subtilis* A8 Üremesine ve Proteaz Üretimine Etkisi

Farklı sıcaklıkların *B. subtilis* A8'in üremesi üzerindeki etkisini belirlemek için 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55°C'lerde 120 rpm'de çalkalamalı olarak üretildi. Yapılan ölçüm sonrası bakterinin optimum üreme sıcaklığının 37°C olduğu ve 30°C'den itibaren enzim aktivitesinde artış gözlenirken, 40°C'den sonra düşüş

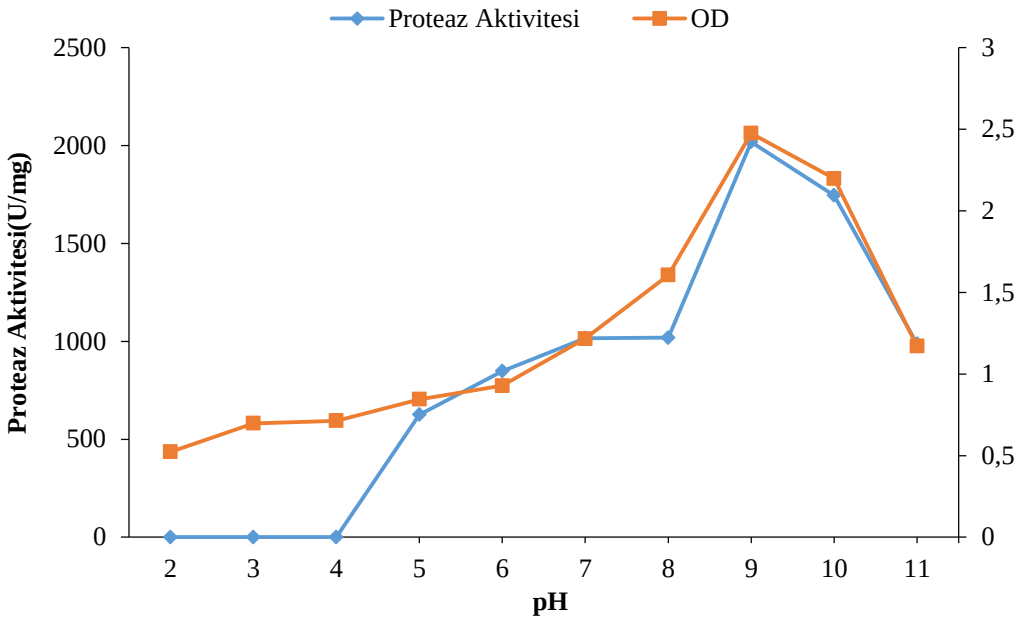
kaydedildi. *B. subtilis* A8'in en yüksek proteaz aktivitesinin 35°C ile 40°C sıcaklıkları arasında olduğu belirlenerek proteaz için optimum sıcaklık 37°C (1656.286 U/mg) olarak tespit edildi (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Sıcaklığın *B. subtilis* A8'in Gelişimi Üzerine ve Proteaz Üretimi Üzerine Etkisi

4.2.3. pH'ın *B. subtilis* A8 Üremesine ve Proteaz Üretimine Etkisi

B. subtilis A8'in üremesine pH'nın etkisini bulmak için; 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 pH'larında NB hazırlanarak optimal üreme zamanı olan 24 saat ve optimum sıcaklığı olan 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Şekil 4.12.'de bakterinin optimal üreme pH'sının ve proteaz enziminin optimal pH'sı 9.0 olduğu belirlendi.

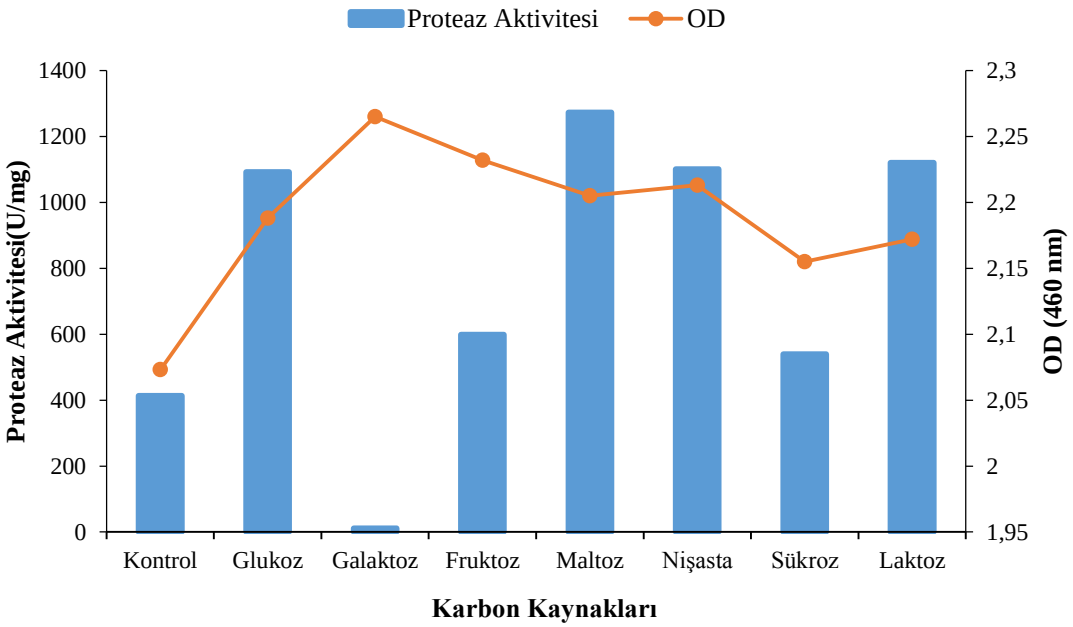


Şekil 4.12. pH'nın *B. subtilis* A8'in Üremesi ve Proteaz Üretimi Üzerine Etkisi

4.2.4. Karbon ve Azot Kaynaklarının Proteaz Üretimine Etkisi

NB besi ortamlarında %1 konsantrasyonunda karbon kaynakları olarak kullanılan glukoz, fruktoz, galaktoz, laktoz, maltoz, çözünebilir nişasta ve sükroz eklenerek farklı karbon kaynaklarının proteaz üretimine etkisine bakıldı ve proteinin nicelik analizi ile spesifik aktivite (U/mg) hesaplandı.

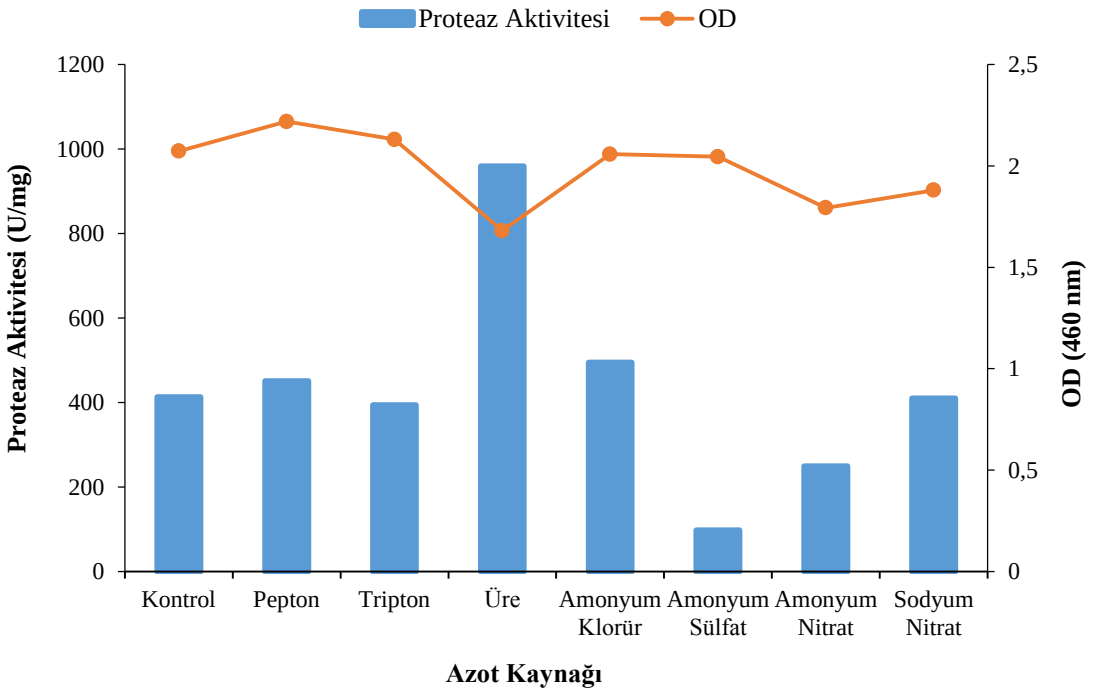
Yapılan araştırmada kontrolle (413.256 U/mg) birlikte kullanılan karbon kaynaklarına bakılarak fruktoz ve sükrozun kontrole paralel değerde olduğu tespit edildi. Nişasta (1101.113 U/mg), glukoz (1092.499 U/mg,) maltoz (1272.512 U/mg), laktoz (1119.889 U/mg) ilavesiyle proteaz üretiminde yaklaşık üç kat artış gözlenirken, galaktoz (11.073 U/mg) ilavesiyle de güçlü bir enzim üretimi inhibisyonu belirlendi (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Farklı Karbon Kaynaklarının Proteaz Üretimine Etkisi

Çeşitli azot kaynakları ile kontrol (413.256 U/mg) karşılaştırıldığında, üre (959.668 U/mg) ile yaklaşık 2.5 katlık bir enzim aktivitesine ulaşılırken pepton (451.102 U/mg) ve amonyum klorür (494.631 U/mg) ile kismi artış gözlendi. Şekil 4.14'te görüldüğü gibi kontrol ile diğer azot kaynakları karşılaştırıldığında amonyum sülfat (97.494 U/mg) ile en düşük proteaz aktivitesi elde edildi.

Kontrolle birlikte azot kaynaklarına bakıldığında tüm azot kaynaklarında bakteri üremesinin kontrole paralel olduğu gözlenirken, üre etkisiyle üremenin düştüğü görüldü.



Şekil 4.14. Farklı Azot Kaynaklarının Proteaz Üretimine Etkisi

4.3. Proteaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması

B. subtilis A8 proteazının optimum koşulları belirlenerek sonra aşama olan kısmi saflaştırmaya geçildi. Bakteri optimal şartlarda üretildikten sonra kültür soğutmalı santrifüjde 10000 rpm'de 15 dk santrifüjlenerek süpernatantlar toplandı. Enzimin kısmi saflaştırmasında amonyumsülfat çöktürmesi ve diyaliz olmak üzere iki aşama uygulandı.

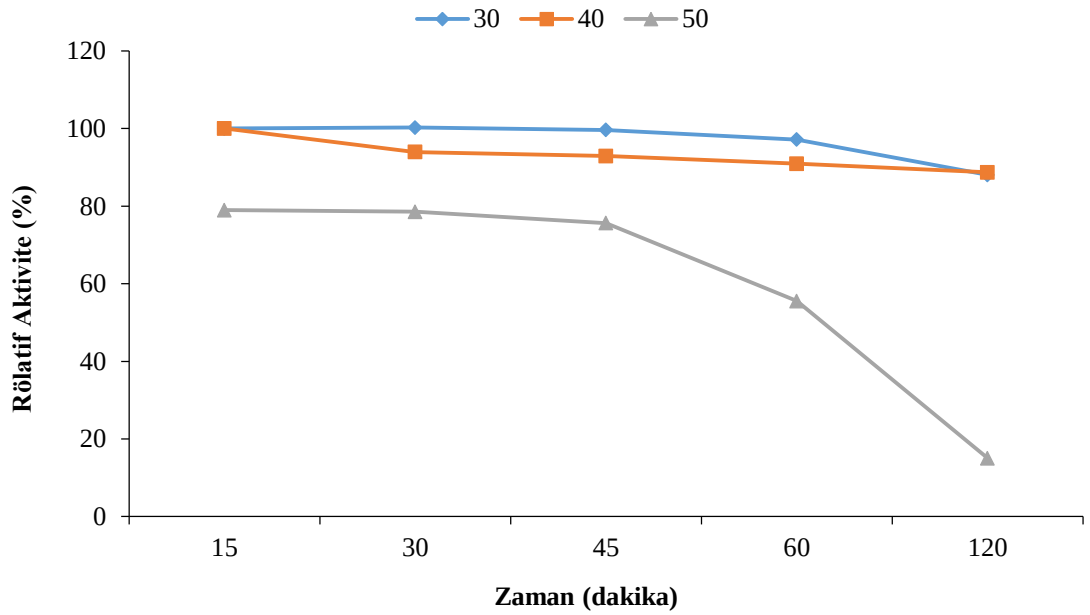
4.3.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz

Magnetik karıştırıcı üzerinde bulunan steril beher içinde toplanan süpernatanta %40-80'lik olacak şekilde azar azar amonyum sülfat [$(NH_4)_2SO_4$] ilave edilerek çözünmesi beklendi. Çözünme işlemi gerçekleşince çözelti santrifüjde soğutmalı olarak 10000 rpm'de 15 dk santrifüjlendi.

Oluşan pelet 0.1 M pH 7.0 Tris-HCl tampon çözeltisinde çözüldükten sonra diyaliz hortumu içinde tüm gece diyalize bırakıldı. Diyaliz işleminden sonra protein tayini ve enzim aktivite tayinleri yapıldı.

4.4. Kısmi Saflaştırılan Proteazın Sıcaklık Stabilitesinin Saptanması

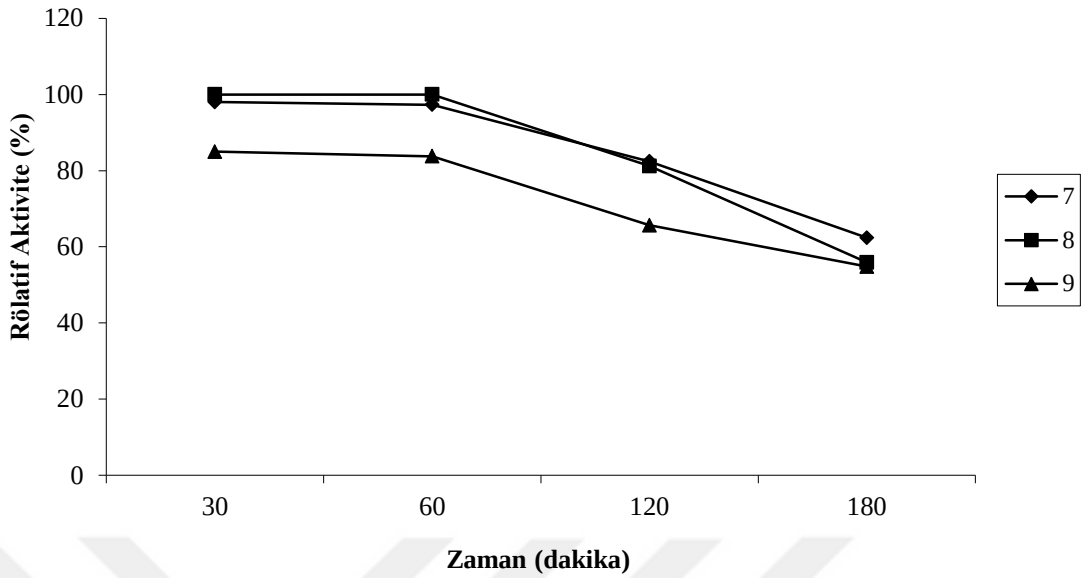
Kısmi saflaştırılması yapılan proteazın sıcaklık stabilitesini (termal stabilite) belirlemek için 30°C, 40°C ve 50°C sıcaklıklarda yalnızca proteaz ile 15, 30, 45, 60, 90 ve 120 dk boyunca süren ön inkübasyonlar gerçekleştirilerek bu işlemlerin sonrasında proteaz aktivitesine bakıldı. Şekil 4.15'teki gibi enzimin 30°C ve 40°C'de 120 dk sonuna kadar %100 stabil kalırken, 50°C'de ise 45 dk süreyle stabilitesini koruduğu görüldü (Şekil 4.15.).



Şekil 4.15. Kısmi Saflaştırılan Proteazın Sıcaklık Stabilitesi

4.5. Kısmi Saflaştırılan Proteazın pH Stabilitesinin Saptanması

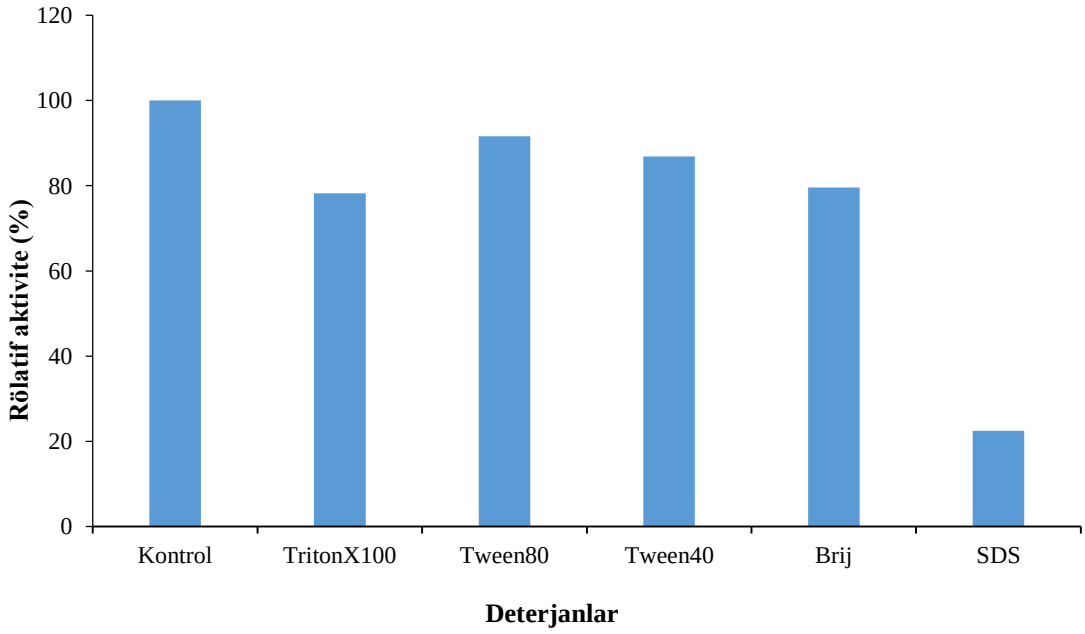
Kısmi olarak saflaştırılmış proteazın pH stabilitesini belirlemek için amacıyla pH 7.0, 8.0 ve 9.0 de yapılan çalışmada Şekil 4.16.'da görüldüğü gibi proteaz aktivitesinin 60 dk boyunca tamamının korunduğu, 120 dakikadan sonra %80, 180 dk sonunda da %70'ini koruduğu gözlendi (Şekil 4.16.).



Şekil 4.16. Kısmi Saflaştırılan Proteazın pH Stabilitesi

4.6. Bazı Deterjanların Kısmi Saflaştırılan Proteaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Kısmi saflaştırılması yapılan proteaz aktivitesine deterjanların etkilerini belirlemek amacıyla %0.5'lik oranda SDS, Tween-40, Tween-80, Brij ve TritonX-100 kullanılarak geri kalan proteaz miktarları kontrolle kıyaslanıp rölatif aktiviteleri; SDS %22, TritonX–100 %78, Brij %80, Tween–40 %88 ve Tween–80 %95 olarak belirlendi (Şekil 4.17.).



Şekil 4.17. Deterjanların Kısmi Saflaştırılan Proteaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

4.7. Kısmi Saflaştırılan Proteaz Aktivitesi Üzerine Bazı İnhibitörlerin Etkisi

Kısmi saflaştırılmış olan proteaz aktivitesinde EDTA (1-10 mM), PMSF (1-10 mM), DTT (1-10 mM), β-mercaptoethanol (1-10 mM) etkisi araştırıldı. PMSF, etanol içinde; öteki kimyasal maddeler ise 0.1 M pH 7 Tris-HCl tampon çözeltisinde çözünerek proteaz ile 30 dk işlem gördükten sonra substrat bırakılarak proteaz aktivite analizi yapıldı. EDTA'dan etkilenmeyen PMSF ile %93 oranında inhibe olan enzimin alkalin serin proteaz ailesine ait olduğu düşünüldü.

Çizelge 4.2. İnhibitörlerin Proteaz Üzerindeki Etkisi

İnhibitörler	**Rölatif (%)**			
	1 mM	**2mM**	**4mM**	**10mM**
PMSF	80	40	10	8
DTT	96	83	73	41
β-mercaptoethanol	86	81	67	61
EDTA	92	80	74	67

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda, Doç.Dr. Sema AGÜLOĞLU-FİNCAN tarafından Diyarbakır Ergani Makam Dağı'ndan izole edilen bakteriyi tanımlamaya yönelik gram boyama, nişasta, katalaz, üreaz, hareket, hemoliz gibi çeşitli biyokimyasal testler ve 16S rRNA analizi (Ref-Gen (METUTechnocity/Ankara) yapıldı. Bu testlere göre bakteri, *Bacillus subtilis* A8 olarak tanımlandı.

Das ve Prasad (2010), izole ettikleri mikroorganizmayı çeşitli biyokimyasal testlere tabi tutarak *Bacillus subtilis* olarak tanımlamışlar ve endüstriyel öneme sahip ekstrasellüler proteaz üreticisi olduğunu göstermişlerdir.

Ravishankar ve ark. (2012), *Bacillus subtilis* AKRS3'ten izolasyonunu gerçekleştirerek mikrobiyolojik, biyokimyasal ve 16S rRNA filogenetik analizi ile bakteriyi tanımladıktan sonra, alkalin proteaz üretimi için optimizasyon çalışması (karbon, azot, inkübasyon süresi, sıcaklık, pH ve sodyum klorür konsantrasyonu) yapmışlardır.

İzolasyonu yapılan *Bacillus subtilis* A8'in katı besi ortamındaki kazein hidrolaz testi ile yüksek proteaz aktivitesine ulaşılmıştır.

Ravishankar ve ark. (2012), *Bacillus subtilis* AKRS3'te proteaz varlığını kazein hidroliz metoduyla rapor etmişlerdir.

Hashem ve ark. (2015), "*Bacillus sphaericus* SI-1'den proteaz izolasyonu, saflaştırılması ve karakterizasyonu" konulu çalışmalarında, enzim aktivitesini azokazein sindirim metodu ile test ettiklerini belirtmişlerdir.

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

Si ve ark. (2018), *Bacillus subtilis* FBL-1'den üretilen ekstraselüler proteaz aktivitesi için en uygun substratların kazein (%100) ve soya unu (%71.6) olduğunu belirtmişlerdir.

Bacillus subtilis A8'in üremesi üzerine inkübasyon süresi, sıcaklık ve pH etkisini belirlemek amacı ile sırasıyla 4-72 saatleri, 20-55°C'lerde ve pH 2.0-11.0

aralıklarında ölçümler yapıldı. Optimal değerlerin sırasıyla 24. saat, pH 9.0 ve 37°C sıcaklık olduğu tespit edildi.

Bhaskar ve ark. (2007), *Bacillus proteolyticus* CFR3001'in üremesi için optimum koşulların 96. saat, 37°C, ve pH 9.0 olduğunu belirtmişlerdir.

Das ve Prasad (2010), bu *Bacillus subtilis* üretimini 48 saatte, 37°C ve pH 8.0'de gerçekleştirmişlerdir.

Çalışmamızda bakterinin 4-72 saatlerinde zamana bağlı enzim aktivitesi tayini yapılarak en iyi değer 24. saatte elde edilmiştir. Bakteri üretimi ile enzim üretimi arasında paralellik gözlemlenmiştir. Ekstraselüler proteaz üretim süresinin 24 saat gibi kısa sürede olması ekonomik açıdan avantajlı olmaktadır.

Pant ve ark. (2004), *Bacillus subtilis*'ten en yüksek termostabil proteaz üretiminin 36 saatte; Bhaskar ve ark. (2007), *Bacillus proteolyticus* CFR3001'den optimal alkali proteaz üretiminin 96 saatte; Joshi ve ark. (2007), *Bacillus cereus* MTCC 6840'a ait alkalin proetaz optimum üretiminin 24 saatte; Das ve Prasad (2010), *Bacillus subtilis'*den optimum enzim üretiminin 48 saatte; Shine ve ark. (2016), çöl topraklarından izole ettikleri *Bacillus cereus* RS3'ten maksimum alkalin proteaz üretimini 24 saatte olduğunu belirtmişlerdir.

Çalışmamızda proteazın optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla 20-55°C ve 2.0-11.0 aralıkları test edilmiştir. Enzimin optimum sıcaklık değeri 37°C, optimum pH değerinin ise 9.0 olduğu tespit edilmiştir. Enzim, 37°C'de aktivite göstermesi özelliği ile çamaşırları düşük sıcaklıkta yıkayan makinelerde kullanılan deterjanların bileşiminde kullanılabilir. Serin proteazların (E.C. 3.4.21) alt tiplerinden biri olan "alkalin proteazlar" yüksek pH'larda kararlı oldukları için öncelikle deterjan endüstrisi olmak üzere deri, gıda, ipek ve kâğıt gibi endüstrilerde büyük ölçüde kullanılmaktadır.

Bhaskar ve ark. (2007), *Bacillus proteolyticus* CFR3001'den alkali proteaz üretimi için optimum sıcaklık ve pH değerlerini sırasıyla 37°C ve pH 9.0; Joshi ve ark. (2007), *Bacillus cereus* MTCC 6840'a ait ekstraselüler alkalin proteazın optimum koşullarını 25°C, pH 9.0 olarak belirlemişlerdir.

Ravishankar ve ark. (2012), *Bacillus subtilis* AKRS3 alkalin proteazın üretimini 37°C ve pH 9.0'da; Imtiaz ve ark. (2013), *Bacillus subtilis*'in alkalin proteaz üretimini

48 saat 37°C ve pH 9.5'te gerçekleştirmişlerdir.

Al-Abdalall ve Al-Khaldi (2016), alkalofilik *Bacillus subtilis'*ten alkalin proteaz üretimini zirai ve hayvansal atıklar kullanarak 37°C ve pH 8.0 de üretmişlerdir.

Asha ve Palaniswamy (2018) ise topraktan izole ettikleri *Bacillus cereus* FT 1 alkalin proteazının maksimum üretimini 35°C'de, pH 9.5'de gerçekleştirmişlerdir.

Hadjidj ve ark. (2018), *Bacillus licheniformis* suşu K7A'dan "SAPHM" adını verdikleri yeni bir ekstrasellüler alkalin proteazın, pH 10.0'da ve 70°C sıcaklıkta optimal olarak aktif olduğunu belirtmişlerdir.

Si ve ark. (2018), *Bacillus subtilis* FBL-1 ekstraselüler proteazının 45°C ve pH 9.0'da yüksek aktivite değerini gösterdiğini bildirmişlerdir.

Rekik ve ark. (2018), açık deniz petrol sahasından izole edilmiş *Bacillus safensis* RH12'den yeni bir deterjan uyumlu serin alkalin proteaz olan "SAPRH" için optimum değerlerin pH 9.0 ve 60°C olduğunu ifade etmişlerdir.

Çalışmamızda farklı karbon kaynaklarının enzim üretimi üzerine olan etkisini belirlemek amacıyla NB besi ortamlarına %1 konsantrasyonunda glukoz, fruktoz, galaktoz, laktoz, maltoz, çözünebilir nişasta ve sükroz ayrı ayrı eklenerek proteaz aktivitesine bakılmıştır. En yüksek aktiviteye maltoz, nişasta, laktoz ve glukoz ilavesiyle ulaşılırken en düşük aktivite de galaktoz ile elde edilmiştir. Glukoz, maltoz, nişasta ve laktozun yaklaşık üç kat artışa neden olduğu gözlemlenmiştir. Enzim üretiminin glukoz, maltoz, nişasta ve laktozda artması *B. subtilis* A8*'*in bu karbon kaynaklarını kullanıp enzim üretimini arttırdığı şeklinde yorumlanabilir.

El-Safey ve Abdul-Raouf (2004), *Bacillus subtilis*'den proteaz üretimi için karbon kaynağı olarak laktozu, Nascimento ve ark. (2004), ise termofilik *Bacillus sp.* SMIA-2 proteazı için nişaşta olarak belirlemişlerdir.

Padmapriya ve Williams (2012) ise *Bacillus subtilis*'ten proteaz üretimi için en iyi karbon kaynağının nişasta olduğunu ifade etmişlerdir.

Vanitha ve ark.(2014) da *Bacillus subtilis* 168 alkalin proteaz için maltoz ilavesiyle elde ettiklerini ifade etmişlerdir.

Asha ve Palaniswamy (2018), *Bacillus cereus* FT 1 tarafından üretilen alkalin proteaz için en iyi karbon kaynağının %2 laktoz olduğunu tespit etmişlerdir.

Farklı azot kaynaklarının enzim üretimine etkisini saptamak amacıyla; azot kaynakları NB besi ortamlarına %1 konsantrasyonunda ayrı ayrı eklenerek proteaz aktivite tayinine bakılmıştır. Azot kaynakları içinde en yüksek aktiviteye üre, en düşük aktiviteye de amonyum sülfat ilavesiyle ulaşılmıştır. Pepton ve sodyum nitrat ise kontrole göre kısmen enzim aktivitesinde artışa neden olmuştur. Enzim üretiminin ürede artması *B. subtilis* A8'in bu azot kaynağını kullanıp enzim üretimini arttırdığı şeklinde yorumlanabilir.

Nascimento ve ark. (2004), *Bacillus sp*. SMIA-2'de amonyum nitratın proteaz üretimini arttırdığını; Joshi ve ark. (2007), maya özütü ve peptonun *Bacillus cereus* MTCC 6840 proteaz üretimini arttırdığını belirtmişlerdir.

Pant ve ark. (2015) ise *Bacillus subtilis* proteaz üretimi için peptonun en iyi azot kaynağı olarak tespit etmişlerdir.

Shine ve ark. (2016), *Bacillus cereus* RS3'ten alkalin proteaz üretimi için en iyi azot kaynağının maya ekstraktı olduğunu belirtirken, Asha ve Palaniswamy (2018), *Bacillus cereus* FT 1 tarafından üretilen alkalin proteaz için en iyi azot kaynağının %3.5 kazein olduğunu rapor etmişlerdir.

Çalışmamızda *Bacillus subtilis* A8'e ait proteazı enzimi amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz ile kısmi saflaştırılmıştır.

Kumar ve ark. (2011), *Bacillus altitudinis* GVC11'den serin alkalin proteazın aseton çöktürmesi ve DEAE-selüloz anyon değişim kromatografisi ile saflaştırmışlardır. Bu çalışma ile endüstride özellikle deterjan formülasyonlarında proteaz ve amilazın birlikte kulanılabilirliğine değinmişlerdir.

Padmapriya ve Williams (2012), *Bacillus subtilis*'ten nötral proteazı, amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz ile kısmen saflaştırarak, proteolitik aktiviteyi, kazein zimografisi ile de tespit etmişlerdir. Enzimin, deri işleme endüstrisinde keçi ve koyun derisinden tüyleri çıkarmak için etkili bir şekilde kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Vanitha ve ark.(2014), *B. subtilis* 168'den alkalin proteazın amonyum sülfat ve diyaliz aşamaları ile kısmi saflaştırmışlardır. Saf enzimin, tekstil, deri ve gıda

endüstrisinde kullanılabilir olduğunu ifade etmişlerdir.

Çalışmamızda kısmen saflaştırılmış proteazın zamana bağlı sıcaklık stabilitesini belirlemek için 30°C, 40°C, ve 50°C'de sadece enzim kullanılmasıyla 15-120 dk arasında inkübe edilip sonrasında proteaz aktivite tayini yapılmıştır. 30 ve 40°C'de 120 dk sonuna kadar enzimin stabilitesini koruduğu ve aktivitenin büyük oranda korunduğu gözlemlenirken 50°C' de ise 45 dk sonuna kadar enzim aktivitesinin korunduğu tespit edilmiştir. Yüksek sıcaklıkta enzimlerin kararlı olması biyolojik açıdan avantajdır.

Si ve ark. (2018), *Bacillus subtilis* proteazının 45°C maksimum aktivite gösterdiğini; aktivitenin 30-50°C sıcaklık aralığında sabit kaldığını ifade etmişlerdir.

Shaikh ve ark. (2018), *Bacillus* sp. APP-07 alkali proteazının optimum sıcaklığının 55°C olduğunu ve daha yüksek sıcaklık aralığında stabil kaldığını belirtmişlerdir.

Çalışmamızda kısmen saflaştırılmış proteazın zamana bağlı pH stabilitesini belirlemek için değişik pH değerlerinde ön inkübasyon öncesi enzim ve substrat karışımı optimal sıcaklıkta test edildi. Ön inkübasyon sonrası kalan enzim aktivitesi ile orijinal aktivite karşılaştırıldı ve bu şekilde kalan rölatif enzim aktivitesi hesaplandı.

Almas ve ark. (2009), tabakhane atığından izole ettikleri *Bacillus strain* SAL1 alkalin proteazının pH 7.0-10.0 arasında stabil kaldığını ve 50°C'de 1 saat stabilitesini koruyabildiğini belirtmişlerdir.

Kapilan (2016), *Bacillus subtilis* BS166'dan amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz ile kısmi saflaştırdığı proteazın, pH 9.0'da en yüksek aktiviteyi verdiğini belirtmiştir.

Si ve ark. (2018), *Bacillus subtilis* FBL-1'den üretilen ekstraselüler saf proteazın pH 7.0- 9.0 aralığında sabit kaldığını tespit etmişlerdir.

Shaikh ve ark. (2018), *Bacillus sp.* APP-07'den saflaştırdıkları deterjan uyumlu alkali proteazın optimum pH 10.5 olduğunu; daha yüksek pH aralığında stabilitesini belirtmişlerdir.

Rekik ve ark. (2018), açık deniz petrol sahasından izole edilmiş *Bacillus safensis* RH12'den elde ettikleri deterjan uyumlu serin alkalin proteaz olan SAPRH'ın aktivitesinin %85'ini 50°C'de ve %75'ini pH 11.0' de koruyarak geniş bir sıcaklık ve pH

aralığında son derece kararlı olduğunu ifade etmişlerdir.

Çalışmamızda kısmi saflaştırılan enzimde SDS, Tween-40, Tween-80, Brij ve TritonX-100 gibi deterjanların etkisi incelenmiştir. Kontrolle karşılaştırıldığında enzim aktivitesinin kullanılan deterjanlardan SDS ile proteaz aktivitesi %80 oranında inhibe edilirken diğer deterjanların enzim aktivitesi üzerine önemli bir etki yapmadığı görülmüştür. SDS eklenmesiyle enzim aktivitesinin inhibe edildiği gözlemlendi. Bu durum deterjanlara karşı kararlılığı ifade eder.

Haddar ve ark. (2010), *Bacillus mojavensis* A21 tarafından üretilen proteazın 30°C'den 50°C'ye kadar Tween 80, Triton X-100 ve SDS gibi deterjanlara karşı iyi bir stabilite gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca *Bacillus mojavensis* A21 proteazının tüy parçalanmasında önemli proteolitik aktivite gösterdiğini ve kan lekelerini etkili bir şekilde yok ettiğini ifade etmişlerdir.

Nadeem ve ark. (2013), *B. licheniformis* UV-9'dan saflaştırdıkları alkali proteazın Tween-20, Tween- 45, Tween-65 ve Triton X-45 gibi yüzey aktif maddelere karşı aşırı kararlılık gösterdiğini tespit etmişler, bu özelliğiyle proteaz enziminin potansiyel çamaşır deterjanı enzimi olabileceğini belirtmişlerdir.

Harer ve ark. (2015), *Bacillus thuringinsis*-SH-II-1A termostabil serin alkalin proteazının deterjan ile birlikte kullanılması sonucu kan lekelerinin pamuklu kumaştan uzaklaştırıldığını ve yıkama performansının iyileştirildiğini gözlemleyerek, deterjan ve deri endüstrilerinde ticari uygulamada kullanılabileceğini ifade etmişlerdir.

Kamran ve ark. (2015), Termofilik *Bacillus* sp. serin alkalin proteazının Tween-80 ve diğer ticari deterjanlarda (SDS, Triton X-100) kararlı olduğunu belirtmişlerdir.

Hadjidj ve ark. (2018), SAPHM'nin deterjanlara karşı mükemmel stabilite gösterdiğini ve kan lekelerini etkili bir şekilde temizleyebileceğini belirtmişlerdir.

Kısmi saflaştırılan proteaz aktivitesine inhibitör etkisini belirlemek için EDTA, PMSF, DTT ve β-mercaptoethanol etkisi araştırıldı. Enzim, EDTA ile aktivite kaybetmemiştir. Literatürlerde PMSF'nin aktif merkezinde serin aminoasidini bulunduran serin proteaz ailesinin güçlü bir inhibitörü olduğu açıkça ifade edilmektedir. Çalıştığımız enzimin PMSF tarafından %93 oranında inhibe edilmesi bize bu enzimin alkalin serin proteaz olduğunu düşündürmüştür.

Ahmetoğlu (2011), *B.cereus* KG5'ten kısmi olarak saflaştırdığı proteaz üzerine EDTA, SDS ve PMSF'nin güçlü bir inhibisyon etkisi yaptığını tespit etmiştir.

Shankar ve ark. (2011), PMSF ile aktivitesi tamamen kaybolan enzim serin proteaz olduğunu ifade etmişlerdir.

Hashem ve ark. (2015), proteazın; PMSF, DTT ve 2-mercaptoethanol ile inhibe edildiğini ve bu nedenle, bir serin proteaz olabileceğini söylemişlerdir.

Yılmaz ve ark.(2016), alkalin proteazın PMSF tarafından tamamen inhibe edildiğini açıklarken, Rekik ve ark. (2018) da SAPRH'ın PMSF ve DFP tarafından güçlü bir inhibisyona maruz kalmasının enzimin serin proteaz olduğunu belirttiğini ifade etmişlerdir.

Harer ve ark. (2018), PMSF ile %100 ve diizopropil fluorofosfat (DFP) ile %92 oranında görülen enzim inhibisyonu nedeniyle, enzimin bir serin proteazı olduğunu ifade etmişlerdir.

Lakshmi ve ark. (2018), alkalin serin proteazın, PMSF ve TLCK (Tosyl-L-lysyl-chlorometan ketone) tarafından tamamen inhibe edildiğini ve bunun enzimin tripsin tipi bir serin proteaz olduğu anlamına geldiğini bildirmişlerdir.

Hadjidj ve ark. (2018), *Bacillus licheniformis* suşu K7A' dan SAPHM denen yeni bir ekstrasellüler alkalin proteazın, PMSF ve diiyodopropil florofosfatlar (DFP) tarafından tamamen inhibe edilmesinin onun serin proteaz ailesine ait olduğunu ifade etmişlerdir.

Sonuç olarak optimum şartlarını belirleyerek kısmi saflaştırma yaptığımız alkalin serin proteazın yüksek toleransının ve stabilitesinin deterjan, deri işleme endüstrisinde ve diğer endüstriyel işlemlerde kullanılabilir özellikte olduğunu düşündürmektedir.

6. KAYNAKLAR

Adams, M.W. 1983. Enzymes and proteins from organisms that grow near above 100 degrees. ***C. Annu Rev. Microbiol,*** 47: 627-658.

Agüloğlu-Fincan, S., Okumuş, V. 2007. The Obtainment of Alkaline Serine Protease from *Bacillus sp*. Isolated from Solid through the Solid State Fermentation Technique by Using Rind of the *Citrullus lanatus* L. (watermelon) and *Cucumis melo* L. (melon) ***D.Ü.Ziya Gökalp Eğitim Fakültesi Dergisi,*** 9:104-114.

Agüloğlu-Fincan, S., Enez, B. 2014. Production Purification and Characterization of Thermostable α-Amylase from Thermophilic *Geobacillus stearothermophilus*. ***Starch/Stärke,*** 66: 182–189.

Agüloğlu-Fincan, S., Enez, B., Özdemir, S., Matpan, F. 2014. Purification and characterization of thermostable α-amylase from thermophilic *Anoxybacillus flavithermus.* ***Carbohydrate Polymers,*** 102: 144–150.

Ahmetoğlu, N. 2011. *Bacillus cereus* KG5'in Proteaz Enzimi Üzerine Çalışmalar. Yüksek Lisans tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır. 87.

Al-Abdalall, A., H., Al-Khaldi, E., M. 2016. Production of alkaline proteases by alkalophilic *Bacillus subtilis* during recycling animal and plant wastes. ***African Journal of Biotechnology,*** 15 (47): 2698-2702.

Almas, S., Hameed, A., Shelly, D., Mohan, P. 2009. Purification and Characterization of a Novel Protease from *Bacillus Strain* SAL1. ***African Journal of Biotechnology,*** 8 (15): 36033609.

Alpan Gheorghiu, L. 2008. Bazı Ekstrem Termofil Anaerobik Bakterilerin Alkali Proteazlarının Özelliklerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Ankara, 65.

Asha, B., Palaniswam, M. 2018. Optimization of alkaline protease production by *Bacillus cereus* FT 1 isolated from soil. ***Journal of Applied Pharmaceutical Science,*** 8 (02): 119-127.

Banik, R. M. and Prakash, M. 2006. Laundry detergent compatibility of the alkaline protease from *Bacillus cereus*. ***Microbiological Research,*** 159: 135-140.

Bayraç, A. T., Kalemtaş, G., Baloğlu, M. C., Kavas, M. 2011. Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar. ODTÜ Bilim ve Toplum Kitapları Dizisi, Türkiye, 90.

Bhaskar N., Sudeepa, E. S., Rashmi, H. N., Tamil, S. A. 2007. Partial purification and

characterization of *Bacillus proteolyticus* CFR3001 isolated from fish processing waste and its antibacterial activities. ***Bioresource Technology,*** 98: 2758-2764.

Boyce, A., Walsh, G. 2007. Production, purification and application-relevant characterisation of an endo-1,2 (4)-β-glucanase from Rhizomucor miegei. ***Applied Microbiology and Biotechnology,*** 76: 835 841.

Bugg, T., 1996. An Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry. Blackwell Science, 657-689.

Bundela, V., Mandal, S. K. 2013. Purification and characterization of an extracellular alkaline protease produced from an isolated *Bacillus subtilis.* ***Department of Biochemical Engineering and Food Technology,*** 4 (2): 112118.

Çelik, N. 2006. *Bacillus clausii* GMBAE 42'den Saflaştırılan Alkalen Proteazın Termal İnaktivasyon Kinetiğinin Belirlenmesi ve Cu^{+2} İyonları İle Termostabilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kocaeli, 105.

Das, G., Prasad M. P. 2010. Isolation, purification & mass production of protease enzyme from bacillus subtilis. ***International Research Journals of microbiology,*** 1 (2): 026-031.

Dash, C., Kulkarni, A., Dunn B., Rao, M., 2003. Aspartic Peptidase Inhibitors: Implications in Drug Development. ***Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology,*** 38 (2): 89–119.

Deng, A., Wu, J., Zhang, Y., Zhang, G., Wen, T. 2010. Purification and Characterization of a Surfactant-Stable High-Alkaline Protease From Bacillus sp. B001. ***Bioresource Technology,*** 101: 7100–7106.

Deshpande, V. V., Rao, M., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. ***Microbiology and Molecular Biology Reviews,*** 62 (3): 597-635.

Divakar, K., Priya, J.D.A., Gautam, P., 2010. Purification and characterization of thermostable organic solvent-stable protease from Aeromonas veronii PG01. ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,*** 66, 311–318.

Doddapaneni, K.K., Tatineni, R., Vellanki, R.N., Rachcha, S., Anabrolu, N., Narakuti V., Mangamoori L.N. 2007. Purification and Characterization of A Solvent And DetergentStable Novel Protease from Bacillus cereus. ***Microbiological Research,*** 164: 383-390.

Dubey, V.K., Pande, M., Singh, M.P., Jagannadham, M.V., 2007. Papain like proteases: application of their inhibitörs. ***African Journal of Biotechnology,*** 6 (9): 1077- 1086.

El-Safey, E. M., Abdul-Raouf, U. M. 2004. Production, purıfication and charactrızation of protease enzyme from *Bacillus subtilis*. ***International Conferences For Development And The Environment In The Arab World,*** 14: 23-25.

Erçetin, Ş.Ş.1999. Biyoteknoloji İle Değişen Dünya Düzeni ve Eğitimi-1. Uygulama Eğitim Yönetimi, 18:169-180.

Fari, M.G., Kralovansky, U.P. 2006. The founding father of biotechnology: Karoly (Karl) Ereky. ***International Journal of Horticultural Science,*** 12 (1): 9-12.

Genckal, H., Tari, C., 2006. Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus* sp. isolated from natural habitats. ***Enzyme and Microbial Technology,*** 39: 703-710.

Ghafoor, A., Hasnain, S. 2010. Purification and Characterization of an Extracellular Protease from *Bacillus subtilis* EAG-2 Strain Isolated from Ornamental Plant Nursey. ***Polish Journal of Microbiology,*** 59 (2), 107-112.

Gisha, G.P. 2014. Serine protease. S3 MSc Biotechnology. Erisim: [https://www.slideshare.net/puliyoor/serine-protease]. Erisim Tarihi: 7.04.2014.

Gupta, R., Gıgras, P., Mohapatra, H., Goswamı, V.K., Chauhan, B. 2003. Microbial α-amylases: a biotechnological perspective. ***Process Biochemistry,*** 1-18.

Haddar, A., Sellami-Kamoun, A., Fakhfakh-Zouari, N., Hmidet, N., Nasri, M. 2010. Characterization of Detergent Stable and Feather Degrading Serine Proteases from *Bacillus mojavensis* A21. ***Biochemical Engineering Journal,*** 51: 53–63.

Hadjidj, R., Badis, A., Mechri, S., Eddouaouda, K., Khelouia, L.,Annane, R., Hattab, M.E., Jaouadi, B. 2018. Purification, biochemical, and molecular characterization of novel protease from *Bacillus licheniformis* strain K7A. ***International Journal of Biological Macromolecules,*** 114: 1033–1048.

Harer, S. L., Bhatia, M. S., Bhatia, N. M. 2018. Isolation, purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus thuringinsis*-SH-II-1A. ***African Journal of Biotechnology,*** 17 (7): 178-188.

Hashem, A., Yesmin, S., Pramanik, M. K., Islam, M. S., Rahim, K. A., Salimullah, M., Rahman, M. 2015. Isolation, Purification and Characterization of an Extracellular Protease from a Locally Isolated *Bacillus sphaericus* SI-1. ***Bioresearch Communications,*** 1 (2): 87-92.

Hmidet, N., El-Hadj A.N., Haddar, A. 2009. Alkaline proteases and thermostable a-amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: characterization and potential application as detergent additive. ***Biochem Eng J.***, 47: 71–79.

Imtiaz, S., Mukhtar, H., Haq, I. 2013. Production of alkaline protease by *Bacillus subtilis* using solid state fermentation. ***African Journal of Microbiology Research,*** 7(16): 1558-1568.

Imtiaz, S., Mukhtar, H., Ikram-ul-Haq. 2013. Production of alkaline protease by *Bacillus subtilis* using solid state fermentation. ***African Journal of Microbiology Research,*** 7(16): 1558-1568.

John, F.K. 1987. ***Enzyme Technology (H.J.Rehm ve G.Reed editör), Biotechnology, New York***. 7: 37-62.

Joshi, G. K., Kumar, S., Sharma, V. 2007. Production of Moderately Halotolerant, SDS Stable Alkaline Protease from *Bacillus cereus* MTCC 6840 İsolated From Lake Nainital, Uttaranchal State, India. ***Brazilian Journal of Microbiology,*** 38: 4.

Kamran, A., Rehman, H.U., Qader, S. A. U.,Baloch, A.H., Kamal, M. 2015. Purification and characterization of thiol dependent, oxidation-stable serine alkaline protease from thermophilic *Bacillus* sp. ***Journal of Genetic Engineering and Biotechnology,*** 13: 59–64.

Kandasamy, N., Punitha, V., Amsamani, S., Rao, J.R., Chandrasekaran, B., Thanikaivelan, P., 2011. Eco-benign enzymatic dehairing of goatskins utilizing a protease froma Pseudomonas fluorescens species isolated from fish visceral waste. ***Journal of Cleaner Production,*** 25: 27-33.

Kapilan, R. 2016. Characterisation of purified protease from *Bacillus subtilis* BS166. ***Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka,*** 44 (3).

Kazan, D., Denizci, A., Öner, M., Erarslan, A. 2005. Purification and characterization of a serine alkaline protease from *Bacillus clausii* GMBAE 4. ***The Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology,*** 32: 335344.

Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2009. Biyokimya. Aktif yayınevi, 89-137, Erzurum Yayını-Ankara.

Kıran, E. Ö., Çömlekçioğlu,U., Dostbil, N. 2006. Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Endüstrideki Kullanım Alanları. ***Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen ve Mühendislik Dergisi,*** 9 (1): 12-18.

Kumar, V. E., Srijana, M., Kiran Kumar, K., Harikrishna, N., Reddy, G. 2011. A Novel Serine Alkaline Protease from *Bacillus altitudinis* GVC11 and İts Application as a Dehairing agent. ***Bioprocess and Biosystems Engineering,*** 34: 403–409.

Lagzian, M., Asoodeh, A. 2012. An extremely thermotolerant, alkaliphilic subtilisin-like protease from hyperthermophilic *Bacillus* sp. MLA64. ***Int J Biol Macromol.,*** 51: 960–967.

Lakshmi, B.K.M., Kumar, D. M., Hemalatha, K.P.J. 2018. Purification and characterization of alkaline protease with novel properties from *Bacillus cereus* strain S8. ***Journal of Genetic Engineering and Biotechnology,*** 16 (2): 295-304.

Langmaier, F., Mladek, M., Kolomaznik, K., Sukop, S., 2002. Isolation of elastin and collagen polypeptides from long cattle tendons as raw material for the cosmetic industry. ***Czech Republic.,*** P:1-9.

Leighton, T.J., Doi, R,H., Warren, R.A.J., Kelln, R.A. 1973. The Relationship of Serine Protease Activity to RNA Polymerase Modification and Sporulation in *Bacillus subtilis.* ***Journal of Molecular Biology,***76: 103-22.

Li, Q., L. Yi, P. Marek, B. L. Iverson. 2013. Commercial proteases: Present and future. ***FEBS Lett,*** 587: 1155–1163.

Lowry, O.H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. 1977. Protein measurement with the Folin phenol reagent. ***Journal Biology Chemical,*** 193: 265.

Mahajan, R.T., Badgujar, S.M., 2010. Biological aspects of proteolytic enzymes: A Review. ***Journal of Pharmacy Research,*** 3 (9): 2048-2068.

Maury J., Asadollahi, M.A., Moller K., Clark, A., Nielsen, J., 2005. Microbial isoprenoid production: an example of green chemistry through metabolic engineering. ***Adv Biochem Eng Biotechnol, 1***00: 19-51.

Mehrato, S., Pandey, P. K., Gaur, R., Darmwal, N. S. 1999. The production of alkaline protease by a *Bacillus* species isolate. ***Bioresour. Technol.,*** 67: 201-203.

Müderriszade,A., Ensari, N.Y., Agüloğlu, S., Otludil, B. 2001. Purification and Characterization of Alkaline Proteinase from Alkalophilic *Bacillus sp*. Applied ***Biochemistry and Microbiology,*** 37: 574-577.

Nadeem, M., Qazi, J. I., Syed, Q., Gulsher, M. 2013. Purification and characterization of an alkaline protease from *Bacillus licheniformis* UV-9 for detergent formulations. ***Songklanakarin J. Sci. Technol.,*** 35 (2): 187-195.

Nascimento, W.C.A., Martins, M.L.L. 2004. Production and Propertıes of an Extracellular Protease from Thermophılıc *Bacillus* sp. ***Brazilian Journal of Microbiology***, 35: 91-96.

Ortakaya, V., Agüloğlu-Fincan, S., Enez, B. 2017. α-Amylase from *Bacillus simplex*-Production, Characterization and Partial Purification. ***Fresenius Environmental Bulletin,*** 26: 4446-4455.

Önal, S., 2010. Enzimler, Bölüm 8. Moleküler Biyoloji, Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M., Tanyolaç, B. Ankara, 249-296.

Özdemir, S., Agüloğlu-Fincan, S., Karakaya, A., Enez B. 2018. A Novel Raw Starch Hydrolyzing Thermostable α-Amylase Produced by Newly Isolated *Bacillus mojavensis* SO-10: Purification, Characterization and Usage in Starch Industries. ***Braz. Arch. Biol. Technol,*** 61: 8160399.

Padmapriya, M., Williams B. C. 2012. Purification and characterization of neutral protease enzyme from *Bacillus subtilis.* ***Journal of Microbiology and Biotechnology Research,*** 2 (4): 612-618.

Pant, G., Prakash, A., Pavani, J.V.P., Bera, S., Deviram, G.V.N.S., Kumar, A., Panchpuri, M., Prasuna, R. G. 2015. Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis.* ***Journal of Taibah University for Science,*** 9: 50–55.

Patel, R. K, Dodia, M.S, Joshi, R. H., Singh, S. P. 2005. Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp.: Production and optimization. ***Process Biochemistry,*** 3569-3575.

Rao, M. B., Tanksale, M., Ghatge, M. S., Deshpande, V. 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. ***Microbiology and Molecular Biology reviews,*** 62 (3): 597-635.

Ravishankar, K., Kumar, M. A., Saravanan, K. 2012. Isolation of alkaline protease from *Bacillus subtilis* AKRS3. ***African Journal of Biotechnology,*** 11 (69): 13415-13427.

Reddy, L., Wee, Y., Ryu, H. 2008. Purification and characterization of an organic solvent and detergent-tolerant novel protease produced by *Bacillus* sp. RKY3. ***Journal of Chemical Technology and Biotechnology,*** 83: 15261533.

Rekik, H., Jaouadi, N. Z., Gargouri, F., Bejar, W., Frikha, F., Jmal, N., Bejar, S., Jaouadi, B. 2018. Production, purification and biochemical characterization of a novel detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus safensis* strain RH12. ***International Journal of Biological Macromolecules,*** 121: 1227–1239.

Rezzukoğlu, İ., Agüloğlu-Fincan, S., Enez, B. 2018. Production and characterization of α-amylase from lactic acid bacteria isolated with whey. ***Biological Diversity and Conservation (Biodicon)***, 11(2): 115-122.

Selen, V. 2006. *Bacillus amyloliquefaciens* ile α-amilaz üretiminin katı substrat fermantasyonu ile incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.16.

Sevinc, N., Demirkan, E. 2011. Production of Protease by *Bacillus* sp. N-40 Isolated from Soil and Its Enzymatic Properties. ***J. Biol. Envıron. Scı.,*** 5 (14): 95-103.

Sevinç, N. 2010. Türkiye Topraklarından izole Edilen Bacillus Suşlarından Proteaz Üretimi, Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa, 116.

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. ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,*** 67: 85–91.

Shaikh, I.K., Dixit, P.P., Shaikh, T.M. 2018. Purification and characterization of alkaline soda-bleach stable protease from *Bacillus* sp. APP-07 isolated from Laundromat soil. ***Journal of Genetic Engineering and Biotechnology,*** 16(2): 273-279.

Shankar, S., Laxman, R. S. 2014. Biophysicochemical Characterization of an Alkaline Protease from *Beauveria* sp. MTCC 5184 with Multiple Applications. ***Appl Biochem Biotechnol,*** 175: 589–602.

Shine, K., Kanimozhi, K., Panneerselvam, A., Muthukumar, C.,Thajuddin, N. 2016. Production and optimization of alkaline protease by *Bacillus cereus* RS3 isolated from desert soil. ***International Journal of Advanced Research in Biological Sciences,*** 3 (7): 193-202.

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.

Sinha, R, Khare, S. K. 2013. Characterization of detergent compatible protease of a halophilic *Bacillus* sp. EMB9: Differential role of metal ions in stability and activity. ***Bioresour Technol.,***145: 357–361.

Vanitha, N., Rajan S., Murugesan, A. G. 2014. Optimization and Production of Alkaline Protease enzyme from *Bacillus subtilis* 168 isolated from food industry waste. ***International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences,*** 3 (6): 36-44.

Wolfgang, A. 2007. Enzyme in industry: Productions and applications. Thirdh Completely Revised Edition. ***Wiley –VCH Pres.,*** 489.

Woodley, J. M. 2000. Advances in Enzyme Technology-UK Contributions. (Th.scheperi editör). ***Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology***, 94.

Yılmaz, B., Baltaci, M.O., Sisecioglu, M., Adiguzel, A. 2016. Thermotolerant alkaline protease enzyme from Bacillus licheniformis A10: purification, characterization, effects of surfactants

and organic solvents. ***Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry***, 31 (6): 1241–1247.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı: Duygu ÇELİK ALGÜL

Doğum Yeri: DİYARBAKIR

Doğum Tarihi: 30.06.1987

Medeni Hali: Evli

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):

Lise: Ziya Gökalp Lisesi / Diyarbakır, 2004

Lisans: Dicle Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji / DİYARBAKIR, 2012

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:

Kocaköy Çok Programlı Anadolu Lisesi (2014-2018), Diyarbakır

15 Temmuz Şehitleri Anadolu Lisesi (2019 -), Diyarbakır

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ İNTİHAL FORMU

ÖĞRENCİ BİLGİLERİ	
ADI VE SOYADI	Duygu ÇELİK ALGÜL
ÖĞRENCİ NO	15801010
EĞİTİM – ÖĞRETİM YILI	2018-2019
YARIYIL	☐ Güz ☒ Bahar
ANABİLİM DALI	Biyoloji
PROGRAM	Yüksek Lisans
TEZ KONUSU	Topraktan İzole Edilen *Bacillus subtilis* A8'den Proteaz Üretimi ve Karakterizasyonu
İNTİHAL RAPORU BİLGİLERİ	
RAPOR TÜRÜ	Tez Savunma Sınavı Sonrası
SAYFA SAYISI	65
BENZERLİK ORANI	%23
RAPORLAMA TARİHİ	29/07/ 2019

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın kapak sayfası, giriş, ana bölümler, sonuç ve tartışma kısımlarından oluşan toplam 65 sayfalık kısmına ilişkin, 29/07/2019 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan intihal raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 23 'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

☐ Kabul/Onay sayfaları hariç,
☐ Kaynakça hariç
☐ Alıntılar hariç/dâhil
☐ Diğer

Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Programlarda Tez Çalışması İntihal Raporu Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edilmesi durumunda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Duygu ÇELİK ALGÜL
29.07.2019

Tez Danışmanı **Doç. Dr. Sema FİNCAN** **29.07.2019**	**Anabilim Dalı Başkan V.** **Doç. Dr. M. Zahir DÜZ** **29.07.2019**

Formdaki bilgiler bilgisayar ortamında doldurulmalıdır. El yazısı ile doldurulan formlar geçersiz sayılmaktadır.