

**T.C.**  
**GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**  
**MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ALKALEN PROTEAZ ÜRETİCİSİ YEREL**  
***Bacillus* SOYLARININ İZOLASYONU,**  
**NİTELENDİRİLMESİ ve ENZİM ÜRETİMİNİN**  
**OPTİMİZASYONU**

**Mutlu BATTAL**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GEBZE**  
**2004**

T.C.  
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ  
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ALKALAEN PROTEAZ ÜRETİCİSİ YEREL  
*Bacillus* SOYLARININ İZOLASYONU,  
NİTELENDİRİLMESİ ve ENZİM ÜRETİMİNİN  
OPTİMİZASYONU

Mutlu BATTAL  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Füsun GÜMÜŞEL

GEBZE  
2004

.....'ın tez çalışması, G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..... tarih ve ..... sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından ..... Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE :  
(Tez Danışmanı)

ÜYE :

ÜYE :

ONAY

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..... tarih ve ..... sayılı kararı.

## ÖZET

Proteazlar, proteinlerin hidrolizini katalize eden hidrolitik enzimlerdir. Serin proteazların (E.C. 3.4.21) bir alt tipi olan “alkalen proteazlar” yüksek pH değerlerinde ve yüksek sıcaklıklarda kararlı olmalarından dolayı başta deterjan endüstrisi olmak üzere deri, gıda, ipek ve kağıt endüstrilerinde yaygın şekilde kullanılmaktadır. Alkalen proteazların, bakteri, küf ve mantar gibi çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilmesine karşın, endüstriyel uygulamalar için kullanılan alkalen proteazların eldesinde *Bacillus* türleri tercih edilmektedir. Son zamanlarda endüstriyel uygulamalar için elverişli özelliklere sahip yeni alkalen proteazları üreten *Bacillus* soylarının izolasyonuna yönelik çalışmaların sayısı artmaktadır. GYTE, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Enzim Moleküler Genetiği Grubu ve Kızılay Pendik Tıp Merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarı’nın olanakları ve işbirliği ile yürütülen bu tez çalışmasında yerel kaynaklardan alkalen proteaz üreticisi *Bacillus* türlerinin izolasyonu ve nitelendirilmesi amaçlanmıştır. Yerel kaynaklardan izole edilen *Bacillus* türlerinden süttozu içeren seçici besi yerinde kazein hidrolizi sonucu koloni çevresinde oluşan şeffaf bölgenin çapına göre seçilen 28 alkalen proteaz üreticisi izolatın benzeştikleri tür(ler) klasik mikrobiyolojik yöntemler kullanılarak önerilmiştir. 28 izolat içinden sıvı kültürde alkalen proteaz üretkenliği ile öne çıkan dokuz tanesinde optimal enzim üretimi için uygun koşullar belirlenmiş, enzim üretimi hücre büyümesine paralel olarak irdelenmiştir. Ayrıca bu dokuz izolat için ön tiplendirme çalışmalarında verilen tür ad(lar)ının doğrulanması amacıyla API 50 CHB/E ve VITEK *Bacillus* kitleri kullanılarak tanımlama çalışmaları yapılmıştır. Son aşamada, klasik tanımlama yöntemlerinden ve otomatik tanı sistemlerinden alınan sonuçlar birlikte değerlendirilmiş ve olası tür isimleri belirlenmiştir. Yapılan tiplendirme çalışmaları sonucunda tür ismi verilemeyen soylar için 16S rDNA dizi analizi çalışmaları başlatılmıştır.

Tez çalışması kapsamında ayrıca sıvı besi yerinde enzim üretkenliği ile öne çıkan soylardan L13 tarafından üretilen alkalen proteaz enziminin ön nitelendirilmesi yapılmış; optimal sıcaklığının 50-55 °C olduğu ve pH 5,5-12 arasında kararlı olan bu enzimin maksimum aktivitesini pH 11,5’te gösterdiği belirlenmiştir.

## SUMMARY

Proteases are hydrolytic enzymes which catalyzes the hydrolysis of the proteins. Alkaline proteases, sub-group of serine proteases (E.C. 3.4.21), which are stable under alkaline pH and high temperature are widely used in detergent, leather, food, silk and paper industries. Although alkaline proteases are produced by a wide range of microorganisms such as bacteria, fungi and molds, *Bacillus* species are the main preferred sources for these enzymes. Nowadays, the number of researches targeting the isolation of novel alkaline protease producing *Bacillus* species has been accelerated. In this thesis work, performed with the collaboration of Enzyme Molecular Genetics Group, Department of Biology, Gebze Institute of Technology and Bacteriology Laboratory, Pendik Medical Centre, Kızılay, the isolation and the identification of *Bacillus* species according to the morphological and biochemical properties and selection of alkaline protease producing strains among these isolates had been aimed. Among the locally isolated *Bacillus* species, 28 isolates were selected according to the radius of the clear zones around the colonies due to the hydrolysis of the casein in the skim-milk containing selective medium and then, the closest species names of these 28 *Bacillus* isolates were proposed according to the morphological and biochemical properties by performing classical microbiological techniques. For the nine strains chosen as the best enzyme producers among 28 isolates in liquid, growth conditions for optimal enzyme production were determined and, also, enzyme productivity parallel to cell growth was analysed. Then, these nine isolates were re-identified by API CHB/E and VITEK *Bacillus* kits in order to confirm the species names proposed at the pre-identification step. Finally, the species names of these nine isolates were given by comparing the results obtained from the three methods. For the isolates, which were not identified by these three methods, 16S rDNA sequence analysis studies have been started.

In addition, the pre-characterization of the alkaline protease produced by strain L13 was done; and the optimal temperature, the optimal pH and pH stability range were found to be 50-55 °C, 11.5 and 5.5-12, respectively.

## TEŞEKKÜR

Öncelikle bu tez çalışmasını kurgulayıp her aşamasında yönlendirici olduğu kadar, anlayışı ve çalışmalarım sırasında gösterdiği güvenle yanımda olan danışmanım Prof. Dr. Füsün GÜMÜŞEL'e, laboratuvar çalışmalarım sırasındaki her türlü desteği, emeği ve sonsuz sabrı için Yrd. Doç. Dr. Saliha İŞSEVER ÖZTÜRK'e, bu tez projesinin bakteriyel tanımlama çalışmalarını yönlendiren Kızılay Pendik Tıp Merkezi Bakteriyoloji Laboratuvarı Şefi Uzman Mikrobiyolog Seza ARTUNKAL'a ve tüm yardımları için laboratuvar çalışanları Biyolog Nihan NUHOĞLU, Melike BEKAROĞLU, Saime ŞAHİN ve Makbule BIÇAK'a, tez çalışmalarımızı birlikte yürüttüğümüz evre boyunca desteğini aldığım arkadaşlarım Merve TUZLAKOĞLU ve Hüseyin BALCI'nın yanı sıra Yosun MATER' e, API ve VITEK sistemleri ile yapılan tiplendirme çalışmalarına katkısı nedeniyle Biyolog Mehmet BAYSAL' a teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER DİZİNİ

|                                                                                            |             |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| ÖZET                                                                                       | Sayfa<br>iv |
| SUMMARY                                                                                    | v           |
| TEŞEKKÜR                                                                                   | vi          |
| İÇİNDEKİLER DİZİNİ                                                                         | vii         |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ                                                             | x           |
| ŞEKİLLER DİZİNİ                                                                            | xi          |
| TABLolar DİZİNİ                                                                            | xii         |
| 1. GİRİŞ                                                                                   | 1           |
| 1.1. Proteaz Kaynakları                                                                    | 2           |
| 1.1.1. Bitkisel Kaynaklı Proteazlar                                                        | 2           |
| 1.1.2. Hayvansal Kaynaklı Proteazlar                                                       | 3           |
| 1.1.3. Mikrobiyal Proteazlar                                                               | 3           |
| 1.2. Proteazların Sınıflandırılması                                                        | 6           |
| 1.2.1. Ekzopeptidazlar                                                                     | 6           |
| 1.2.2. Endopeptidazlar                                                                     | 7           |
| 1.2.2.1. Serin Proteazlar                                                                  | 7           |
| 1.2.2.2. Aspartik Proteazlar                                                               | 9           |
| 1.2.2.3. Sistein Proteazlar                                                                | 9           |
| 1.2.2.4. Metalloproteazlar                                                                 | 9           |
| 1.3. Bakteriyel Proteazlar                                                                 | 10          |
| 1.4. Alkalen Proteazların Uygulama Alanları                                                | 10          |
| 1.4.1. Gıda Endüstrisi                                                                     | 10          |
| 1.4.2. Deri Sanayi                                                                         | 11          |
| 1.4.3. Atık Yönetimi                                                                       | 11          |
| 1.4.4. İpek Endüstrisi                                                                     | 12          |
| 1.4.5. Deterjan Endüstrisi                                                                 | 14          |
| 1.5. Yeni Proteazların Bulunması                                                           | 14          |
| 1.6. Alkalofilik Organizmaların İzolasyonu ve Alkalen Proteaz Üreticisi Soyların Seçilmesi | 16          |
| 1.7. Bacillus Cinsi                                                                        | 18          |
| 1.7.1. Hücre Morfolojisi                                                                   | 18          |
| 1.7.2. Koloni Özellikleri                                                                  | 18          |

|                                                                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.7.3. Bacillus Türlerinin İzolasyonu                                                                                                      | 19 |
| 1.8. Bacillus Soylarının Tiplendirilmesi                                                                                                   | 19 |
| 1.9. Tezin Amacı                                                                                                                           | 22 |
| 2. GEREÇ VE YÖNTEMLER                                                                                                                      | 23 |
| 2.1. Gereçler                                                                                                                              | 23 |
| 2.1.1. Sarf Malzemeleri                                                                                                                    | 23 |
| 2.1.2. Kullanılan Cihazlar                                                                                                                 | 25 |
| 2.1.3. Besi Yerleri                                                                                                                        | 26 |
| 2.2. Yöntemler                                                                                                                             | 28 |
| 2.2.1. Örneklerin Toplanması                                                                                                               | 28 |
| 2.2.2. Primer İzolasyon                                                                                                                    | 29 |
| 2.2.2.1. Su Örnekleri                                                                                                                      | 29 |
| 2.2.2.2. Toprak Örnekleri                                                                                                                  | 29 |
| 2.2.3. Alkalen Proteaz Üreticisi Yerel Bacillus Soylarının Seçilmesi                                                                       | 30 |
| 2.2.4. Alkalen Proteaz Üreticisi Yerel Bacillus Soylarının Ön Tiplendirilmesi                                                              | 30 |
| 2.2.5. API ve VITEK Sistemleri ile Tiplendirme Çalışmaları                                                                                 | 34 |
| 2.2.6. - 20 °C ve - 80 °C Hücre Stoklarının Hazırlanması                                                                                   | 34 |
| 2.2.7. Saflaştırılan Soyların Hücre Dışı Alkalen Proteaz Aktivitelerinin Sıvı<br>Kültürlerde Çalışılması ve Enzim Üretiminin Optimizasyonu | 35 |
| 2.2.8. Hücre Yoğunluğunun Ölçülmesi                                                                                                        | 35 |
| 2.2.9. Üst Sıvıda Alkalen Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi                                                                               | 36 |
| 2.2.9.1. Alkalen Proteaz Aktivite Testi                                                                                                    | 36 |
| 2.2.9.2. Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması                                                                                                | 36 |
| 2.2.9.3. Enzim Aktivitesinin Hesaplanması                                                                                                  | 37 |
| 2.2.10. Enzim Ön Nitelendirme Çalışmaları                                                                                                  | 37 |
| 2.2.11. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrophorezi (SDS-PAGE) ve Zimogram                                                                        | 39 |
| 2.2.11.1. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrophorezi                                                                                             | 39 |
| 2.2.11.2. Jelatin Zimogram Analizi                                                                                                         | 40 |
| 2.2.12. Moleküler Tiplendirme için Ön Hazırlıklar                                                                                          | 41 |
| 2.2.12.1. 16S rDNA Dizi Analizi için Genomik DNA İzolasyonu                                                                                | 41 |
| 2.2.12.2. 16S rDNA Genlerinin PCR ile Çoğaltımı                                                                                            | 44 |
| 3. BULGULAR                                                                                                                                | 47 |

|                                                                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1. Alkalen Proteaz Üreticisi Bacillus Soylarının Seçilmesi ve Ön Tiplendirmesi                                                         | 47 |
| 3.2. Ön Tiplendirmeleri Yapılan Bacillus Soylarının Sıvı Besi Yerinde Hücre Dışı Enzim Üretkenliğinin Değerlendirilmesi ve Optimizasyonu | 49 |
| 3.3. API ve VITEK Sistemleriyle Tiplendirme Sonuçları                                                                                    | 56 |
| 3.4. P21 Soyu 16S rDNA'sının PCR ile Çoğaltımı                                                                                           | 58 |
| 3.5. Enzim Ön Nitelendirme Çalışmaları                                                                                                   | 58 |
| 3.6. SDS-Poliakrilamit Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ve Zimogram Sonuçları                                                                | 60 |
| 4. TARTIŞMA VE SONUÇ                                                                                                                     | 62 |
| KAYNAKLAR                                                                                                                                | 68 |
| ÖZGEÇMİŞ                                                                                                                                 | 74 |

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

|                              |                                 |
|------------------------------|---------------------------------|
| <i>B.</i>                    | <i>Bacillus</i>                 |
| $\text{Na}_2\text{CO}_3$     | Sodyum Karbonat                 |
| $\text{NaNO}_3$              | Sodyum Nitrat                   |
| KCl                          | Potasyum Klorür                 |
| $\text{FeSO}_4$              | Demir Sülfat                    |
| $\text{K}_2\text{HPO}_4$     | Potasyum Hidrojen Fosfat        |
| $\text{CuCl}_2$              | Bakır Klorür                    |
| $\text{MnSO}_4$              | Mangan Sülfat                   |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | Amonyum Sülfat                  |
| $\text{CaCl}_2$              | Kalsiyum Klorür                 |
| $\mu\text{l}$                | Mikrolitre                      |
| $\mu\text{m}$                | Mikrometre                      |
| $^{\circ}\text{C}$           | Derece Santigrat                |
| ml                           | Mililitre                       |
| U                            | Ünite                           |
| LB                           | Luria Broth                     |
| M                            | Molar                           |
| mM                           | Milimolar                       |
| EDTA                         | Etilen Diamin Tetra Asetik Asit |
| SDS                          | Sodyum Dodesil Sülfat           |
| CTAB                         | Cetyltrimethylammoniumbromide   |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

| <u>Şekil</u>                                                                                                                   | <u>Sayfa</u> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 1.1. Endüstriyel Enzim Satışlarının Pazar Payları                                                                              | 2            |
| 3.1. Alkalen Proteaz üretici soyların % 6 süttozu içeren NB seçici besi yerinde (SM) oluşturdukları şeffaf bölgelerin görünümü | 47           |
| 3.2. L1 soyunun hücre büyümesi ve enzim aktivitesi grafiği                                                                     | 50           |
| 3.3. L10 soyunun hücre büyümesi ve enzim aktivitesi grafiği                                                                    | 50           |
| 3.4. L13 soyunun hücre büyümesi ve enzim aktivitesi grafiği                                                                    | 51           |
| 3.5. L16 soyunun hücre büyümesi ve enzim aktivitesi grafiği                                                                    | 52           |
| 3.6. P17 soyunun hücre büyümesi ve enzim aktivitesi grafiği                                                                    | 53           |
| 3.7. P19 soyunun hücre büyümesi ve enzim aktivitesi grafiği                                                                    | 54           |
| 3.8. P20 soyunun hücre büyümesi ve enzim aktivitesi grafiği                                                                    | 54           |
| 3.9. P21 soyunun hücre büyümesi ve enzim aktivitesi grafiği                                                                    | 55           |
| 3.10. P22 soyunun hücre büyümesi ve enzim aktivitesi grafiği                                                                   | 56           |
| 3.11. P21 soyundan elde edilen genomik DNA kalıbından PCR eliyle çoğaltılan 16S rDNA fragmanının % 1 agaroz jeldeki görünümü   | 58           |
| 3.12. Sıcaklığın L13 alkalen proteaz enzim aktivitesi ve kararlılığı üzerinde etkisi                                           | 59           |
| 3.13. pH'nın L13 alkalen proteaz enziminin aktivitesi ve kararlılığı üzerinde etkisi                                           | 60           |
| 3.14. L13 soyu kültür üst sıvısının jelatin zimogram ve SDS-PAGE analizi                                                       | 61           |

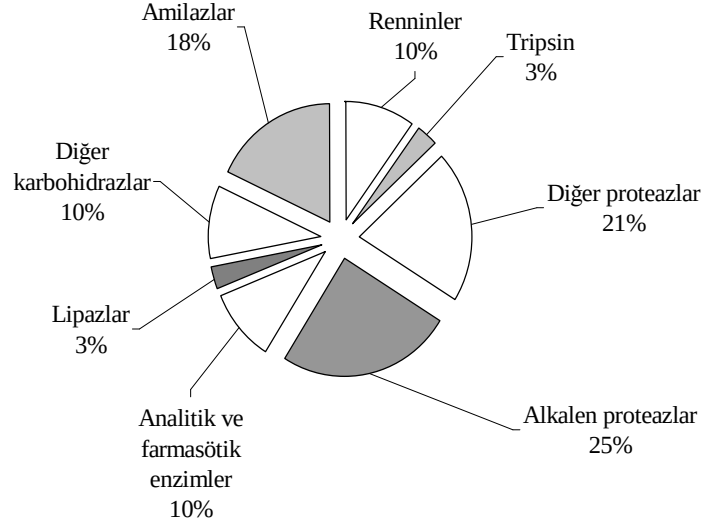
## TABLOLAR DİZİNİ

| <u>Tablo</u>                                                                                                                                         | <u>Sayfa</u> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 1.1. Endüstriyel proteazların genel özellikleri                                                                                                      | 5            |
| 1.2. Ticari Bakteriyel Alkalen Proteazlar, Kaynakları, Uygulama Alanları ve Endüstriyel Üreticileri                                                  | 13           |
| 1.3. Alkalen Proteaz Üreticisi bazı <i>Bacillus</i> Türleri                                                                                          | 17           |
| 1.4. Klasik Yaklaşımda Prokaryotik Taksonomi için Kullanılan Kriterler                                                                               | 20           |
| 2.1. Toprak ve Su Örneklerinin Yeri ve Özellikleri                                                                                                   | 28           |
| 2.2. Kalibrasyon eğrisi için artan L-tirozin dilüsyonlarının hazırlanması                                                                            | 37           |
| 3.1. SM besi yerinde seçilen ve temel mikrobiyolojik yöntemlerle tanımlanan “Alkalen Proteaz” üreticisi <i>Bacillus</i> soylarının özellikleri       | 48           |
| 3.2. Alkalen Proteaz Üreticisi Olarak Seçilen <i>Bacillus</i> Soylarının Farklı Tiplendirme Çalışmalarının Bulgularına Dayanarak Önerilen Tür Adları | 57           |

# 1. GİRİŞ

Peptit bağlarını kıran hidrolazlar genellikle proteaz, peptidaz, proteinaz ya da proteolitik enzim olarak adlandırılır. Proteazlar, istisnasız bütün canlı formlarında bulunmaktadır. Papaya bitkisinden papain, ananas bitkisinden bromalein bitkisel kaynaklı proteazlara; kimotripsin, tripsin, rennin ve pepsin insan ve hayvan kaynaklı proteazlara örnek olarak gösterilebilir. Bakteriyel, fungal ve viral kaynaklı proteazlar, endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamalardaki önemlerinden dolayı fazlaca çalışılmıştır. *Bacillus* türlerinden elde edilen alkalen proteazların deterjan endüstrisinde kullanımı ve *Aspergillus* sp.'den elde edilen asidik proteazın gıda endüstrisinde peynir üretimi için kullanımı, bu uygulamalara örnek olarak gösterilebilir. Mikrobiyal proteazların ticari uygulamaları büyük ölçekte üretimin daha kolay olması nedeniyle bitki ve hayvan kökenli enzimlere görece çok daha fazladır.

Fizyolojik önemlerinin (enzim öncüllerinin aktivasyonu, kan pıhtılaşması, kan pıhtılarının parçalanması, salgılanan proteinlerin işlenmesi ve hücre dışına geçişi, patojenik faktörler) yanı sıra proteazlar başta deterjan olmak üzere deri, gıda, tekstil gibi çeşitli endüstriyel alanlarda da büyük öneme sahiptirler. Proteazların gıda ve deterjan endüstrisinde kullanılması uzun yıllara dayanmaktadır. Deri endüstrisinde kılların uzaklaştırılması için toksik kimyasallar yerine proteazların kullanılması ise daha yeni bir uygulama alanı olarak görülebilir (Anwar and Saleemuddin, 1998; Gupta et. al., 2002). Proteazlar endüstriyel enzimlerin üç büyük grubundan birini oluşturmaktadır ve dünya enzim pazarındaki payları yaklaşık % 60'tır. Alkalen proteazların endüstriyel enzim pazarındaki yeri Şekil 1.1'de gösterilmektedir (Rao et. al., 1998; Kumar and Takagi, 1999). Proteazlardan endüstriyel uygulamalarda özellikle deterjan katkısı olarak yararlanılması, 1913'te Roehm tarafından pankreatik özütlerin kullanılması ile başlamıştır. 60'lı yıllarda bakterilerden enzim üretiminin başlamasıyla birlikte proteazların endüstriyel uygulamalardaki etkinliği, hem teknik hem de ekonomik avantajlarından dolayı artmıştır. Başlangıçta kullanılan ilk enzimler *B. amyloliquefaciens* ve *B. licheniformis*'ten izole edilmiştir (Rao et. al., 1998; Maurer, 2004).



**Şekil 1.1.** Endüstriyel Enzim Satışlarının Pazar Payları

## 1.1. Proteaz Kaynakları

### 1.1.1. Bitkisel Kaynaklı Proteazlar

Bitkilerin proteaz kaynağı olarak kullanılması, yetiştirme için elverişli alanların bulunması ve iklim koşullarının uygunluğu gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Ayrıca, bitkilerden enzim eldesi uzun zaman gerektiren bir süreçtir. Papain, bromelain, keratinazlar ve ficin başlıca bitkisel kaynaklı proteazlardır (Godfrey, 1986; Rao et. al., 1998).

Gıda endüstrisinde, uzun süredir kullanılmakta olan papain, *Carica papaya*'nın meyvelerinden izole edilmekte ve hidrolizatlarının acı tat oluşturmamaları nedeniyle, gıda endüstrisinde, özellikle balık, et ve bitkisel protein hidrolizatlarının hazırlanmasında yoğun şekilde kullanılmaktadır. Papaya bitkisi, daha çok Orta ve Batı Afrika'da yetiştirilmekle birlikte, son zamanlarda Hindistan'da da yetiştirilmeye başlanmıştır. Enzimin performansı bitki kaynağı, iklim koşulları ve şaflştırma yöntemlerine bağlıdır. pH 5-9 arasına aktif olup, 80 °C'a kadar kararlıdır.

Bir sistein proteazı olan bromelain, ananas bitkisinin suyundan ve köklerinden hazırlanır. pH 5–8 arasında optimal aktivite gösterir.

Keratinazlar saç ve kıl atıklarını hidroliz ederler ve bazı tropikal bitkiler tarafından üretilirler. Saç ve yünün hidrolizi ile lizin gibi esansiyel aminoasitlerin üretiminde ve kıl atıklarının evsel atık şebekelerinde neden olduğu tıkanmaların ortadan kaldırılmasında kullanılırlar (Godfrey, 1986).

### **1.1.2. Hayvansal Kaynaklı Proteazlar**

Hayvansal kaynaklı proteazlar arasında en çok bilinenleri; pankreatik tripsin, kimotripsin, pepsin ve rennin’lerdir.

Tripsin, hayvan pankreasından özütlenen tipik bir serin proteazdır. Moleküler ağırlığı 23 kDa olan tripsin, fenilmetilsulfonilflorit (PMSF) ve tosil-L-lizin klorometil keton (TPCK) tarafından inhibe olur. Birçok natif ve denatüre proteinleri hızlı ve yoğun şekilde denatüre etmesi nedeniyle gıda sektörü tarafından tercih edilmemesine karşın dericilikte, bakteriyel besi yeri hazırlanmasında ve bazı medikal uygulamalarda kullanılmaktadır.

Diğer bir pankreatik serin proteaz olan kimotripsin, başta tanı ve analitik uygulamalar olmak üzere sütün allerjenik etkilerinin ortadan kaldırılmasında kullanılmaktadır. Optimal pH’sı 8–9 arasında ve optimal sıcaklığı 60 °C’tır.

Pepsin ve rennin, domuz ya da sığırların mide çeperlerinden izole edilen aspartik proteazlardır. Pepsin, hayvansal proteazlar arasında en asidik olarak bilinenidir. Pepsinin optimal pH aralığı 1–4 iken, renninlerinki pH 3-6 arasındadır. Renninler, süt çöktürücü, pepsin ise tat artırıcı olarak, peynicilikte kullanılmaktadır (Godfrey, 1986; Rao et. al., 1998).

### **1.1.3. Mikrobiyal Proteazlar**

Bitkisel ve hayvansal kaynaklı proteazların günümüzdeki talebi karşılayamaması, mikrobiyal kaynaklı proteazlara olan ilginin artmasına neden olmuştur. Biyoteknolojik uygulamalar için istenilen özelliklere sahip olan mikrobiyal proteazlar, bitkisel ve hayvansal proteazlara göre daha fazla tercih edilmektedir.

Nötral ve alkali proteaz gibi ticari açıdan önem taşıyan proteazların çoğu *Bacillus* cinsine ait organizmalar tarafından üretilmektedir. Bakteriyel nötral proteazların, pH aralığı dar (pH 5–8) olup termotoleransları da düşüktür. Ancak reaksiyon hızlarının düşük olması ve daha az acı tat oluşturmaları nedeniyle gıda endüstrisinde tercih edilirler. Bir tür nötral proteaz olan ‘nutrase’ doğal bitki proteaz inhibitörlerine karşı duyarlı olmadığı için içki endüstrisinde kullanılmaktadır. Bazı nötral proteaz türleri metalloproteaz grubu içinde yer alır ve aktivite için divalent katyonlara ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  gibi) gereksinim duyarlar. Serin proteaz sınıfında olan bir diğer grup proteazın aktivite için divalent katyon gereksinimi bulunmamaktadır.

Bakteriyel alkali proteazlar, yüksek alkali pH’da aktif olup geniş bir substrat çeşitliliğine sahiptir. Optimal sıcaklık değerleri 60 °C civarındadır. Alkali proteazların bu özellikleri, deterjan endüstrisinde tercih edilmelerinde etkindir.

Proteaz enzimleri fungal ve viral organizmalar tarafından da üretilmektedir. Gıda endüstrisinde kullanılan fungal kaynaklı proteazlar, bakteriyel kaynaklı proteazlara görece daha düşük termotolerans değerlerine ve dar bir substrat çeşitliliğine sahiptir. Fungal kaynaklı proteazlar özellikle peynir üretiminde tat artırıcı olarak kullanılmaktadır. Viral kaynaklı proteazlardan ise farmasötik alanında HIV (Human Immunodeficiency Virus)’e karşı proteaz inhibitörlerinin tasarlanması için yararlanılmaktadır.

Geniş biyokimyasal çeşitlilik ve genetik manipülasyonlara olan yatkınlıkları, hızlı büyüme ve büyüme için gereksinilen alanın küçük olması gibi özelliklerinden dolayı mikroorganizmalar çok sayıda enzimin elde edilmesinde temel kaynağı oluşturmaktadır (Rao et. al., 1998). Bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal proteazların kullanım alanları ve genel özellikleri Tablo 1.1.’de görülmektedir.

**Tablo 1.1. Endüstriyel proteazların genel özellikleri**

|                              | Enzim                         | Tipi                        | pH Aralığı | Genel Özgüllüğü    | Uygulama Alanları                                    |
|------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|------------|--------------------|------------------------------------------------------|
| <b>Hayvansal</b>             | Rennin                        | Aspartik                    | 3-6        | Glu-Ala, Leu- Val  | Süt çöktürücü                                        |
|                              | Kimotripsin                   | Serin                       | 8-9        | Phe, Tyr, Trp-COOH | Analitik, dealerjenik                                |
|                              | Pepsin                        | Aspartik                    | 1-4        | Leu-Val, Phe-Tyr   | Peynir, genel hidroliz                               |
|                              | Tripsin                       | Serin                       | 7-9        | Lys-Ala, Arg-Gly   | Genel hidroliz, dericilik, klinik                    |
| <b>Bakteriyel Nötral</b>     | <i>B.subtilis</i>             | Metallo                     | 6-8        | Geniş              | Genel hidroliz, biracılık, peynir, jelatin hidrolizi |
|                              |                               | Serin                       | 6-10       | Geniş              |                                                      |
|                              | <i>B. licheniformis</i>       | Serin                       | 6-10       | Geniş              |                                                      |
| <b>Bakteriyel Alkalen</b>    | <i>B. thermoproteolyticus</i> | Metallo                     | 7-9        | Ileu-Phe, Leu-Val  | Genel hidroliz, sıcaklık kararlılığı                 |
|                              | <i>Bacillus</i> spp.          | Serin                       | 7-12       | Geniş              | Deri, deterjan                                       |
| <b>Fungal Asidik-Nötral</b>  | <i>A. niger</i>               | Aspartik                    | 2-5        | Pepsin gibi        | Peynircilik                                          |
|                              | <i>Endothia parasitica</i>    | Aspartik                    | 3-6        | Rennin gibi        | Süt çöktürücü                                        |
|                              | <i>Mucor</i> sp.              | Aspartik 3-6                | 3-6        | Rennin gibi        | Süt çöktürücü                                        |
|                              | <i>Penicillium</i> spp.       | Karışık                     | 2-5        | Geniş              | Genel hidroliz                                       |
|                              |                               | Karboksi                    |            | Gly-Phe            | Peynircilik                                          |
|                              | <i>Rhizopus</i> spp.          | Aspartik                    | 3-5        | Pepsin gibi        | Genel hidroliz                                       |
|                              | <i>Trametes sanguinea</i>     | Aspartik                    | 2-4        | Çok geniş          | Genel hidroliz                                       |
| <b>Fungal Nötral-Alkalen</b> | <i>Aspergillus oryzae</i>     | Aspartik                    | 4-8        | Çok geniş          | Genel hidroliz                                       |
|                              |                               | Metallo                     |            | Leu-Tyr            | Acı tat giderici                                     |
|                              |                               | Karboksi                    |            | Phe-Tyr            |                                                      |
|                              |                               | Serin                       |            |                    |                                                      |
|                              | <i>Streptomyces griseus</i>   | Karışık (amino ve karboksi) | 7-9        | Çok geniş          | Araştırma, analitik                                  |
| <b>Bitkisel</b>              | Ficin                         | Sistein                     | 5-8        | Phe-Tyr            | Gıda hariç genel hidroliz                            |
|                              | Papain                        | Sistein                     | 5-9        | Çok geniş          | Genel hidroliz, tat arttırıcı                        |
|                              | Bromelain                     | Sistein                     | 5-8        | Lys-Arg, Tyr-Phe   | Genel hidroliz                                       |

## 1.2. Proteazların Sınıflandırılması

Proteazlar Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Sınıflandırma Komitesi tarafından 3. grubun (hidrolazlar) 4. alt grubuna (peptit hidrolazlar) yerleştirilmiştir. Ancak proteazlar çok geniş etki ve mekanizma çeşitliliğine sahip oldukları için enzimlerin genel isimlendirme sistemine tam olarak oturtulamamaktadır. Bu nedenle proteazlar, (1) katalizlediği reaksiyonun tipi, (2) katalitik bölgesinin yapısı ve (3) yapısal benzerleriyle evrimsel ilişkisi gözetilerek sınıflandırılır (Rao et. al., 1998).

Proteazlar temel olarak kataliz edilen reaksiyonun tipine göre ekzopeptidazlar ve endopeptidazlar olarak iki ana gruba ayrılır. Ekzopeptidazlar, substratın amino ya da karboksil ucuna yakın peptit bağlarını hidroliz ederken, endopeptidazlar polipeptit zincirinin orta kısmında bulunan peptit bağlarını hidroliz eder. Aktif bölgede bulunan gruplara göre proteazlar; serin proteazlar, aspartik proteazlar, sistein proteazlar ve metallo-proteazlar olmak üzere 4 alt gruba ayrılır. Bazı proteaz tipleri (ATP-bağımlı proteazlar gibi) standart isimlendirme sistemine tam olarak uymayabilirler (Rao et. al, 1998).

### 1.2.1. Ekzopeptidazlar

Ekzopeptidazlar, polipeptit zincirinin amino ya da karboksil ucuna yakın peptit bağlarını hidroliz ederler. Amino ucuna yakın peptit bağlarını hidroliz edenlere amino ekzopeptidazlar, karboksil ucuna yakın peptit bağlarını hidroliz edenlere karboksipeptidazlar adı verilir. Aminopeptidazlar, polipeptit zincirinin boş amino ucuna etki ederek her kataliz döngüsünde bir aminoasit, dipeptit veya tripeptit koparırlar ve bakterilerden mantarlara kadar çeşitli mikroorganizma türlerinde bulunurlar. Aminopeptidazların genelde hücre içi enzimleri olmalarına karşın, *A. oryzae* tarafından hücre dışına salgılandıkları rapor edilmiştir. Karboksipeptidazlar, polipeptit zincirinin karboksil ucuna etki eder ve tek aminoasit ya da dipeptit salarlar. Karboksipeptidazlar aktif bölgede bulunan aminoasit rezidülerine göre üç ana gruba ayrılabilir. Bunlar; serin karboksipeptidazlar, metallo karboksipeptidazlar ve sistein karboksipeptidazlardır (Rao et al., 1998).

## 1.2.2. Endopeptidazlar

Endopeptidazlar, polipeptit zincirinin amino ve karboksil uçları yerine iç bölgelerinde bulunan peptit bağlarını hidroliz ederler. Substratta serbest amino ya da karboksil ucunun bulunması; enzim aktivitesi üzerinde olumsuz etki yapar. Endopeptidazlar katalitik bölgelerinin yapısına göre 4 alt gruba ayrılırlar: (1) serin proteazlar, (2) aspartik proteazlar, (3) sistein proteazlar, (4) metallo proteazlar (Rao et al., 1998).

### 1.2.2.1. Serin Proteazlar

Serin proteazlar (E.C. 3.4.21) alkali pH değerlerinde gösterdikleri aktivite ve kararlılıkları sayesinde büyük ilgi çekmektedir ve bu özellikleriyle değişik endüstriyel süreçlerde uygulama alanları bulmaktadırlar (Rao el. al., 1998). Aktif bölgelerinde nükleofilik bir serin rezidüsü yanında katalitik triadı oluşturan esansiyel aspartat ve histidin rezidüleri bulundurmalarıyla ayırt edilirler. Viruslarda mantarlar ve diğer ökaryotlarda da bulunan serin proteazlar *Bacillus* cinsi bakteriler tarafından çok yaygın olarak üretilmektedir. Serin proteazların tanınmasında ayırt ettirici en önemli özellik; 3,4-dikloroizokumarin (3,4-DCI), L-3-karboksitrans 2,3- epoksipropil-lösilamido (4-guanidin) butan (E.64), diisopropilflorofosfat (DFP), fenilmetilsülfonilflorit (PMSF) ve tosil-L-lizin klorometil keton (TLCK) ile tersinmez inhibisyona uğramalarıdır. Bazı serin proteazlar aktif bölgelerinin yakınında bulunan sistein rezidüsünden dolayı p-kloromerküribenzoat (PCMB) gibi tiol ajanları ile de inhibe olurlar. Serin proteazlar nötral ve alkali pH değerlerinde (optimum pH, 7–11) aktiftirler ve çok geniş substrat çeşitliliğine sahiptirler. Moleküler ağırlıkları 18 ile 35 kDa arasında değişir. Genel olarak izoelektrik noktaları, pI 4 ile 6 arasında değişir. Yüksek alkali pH değerlerinde aktif olan serin alkalen proteazlar, serin proteazların en geniş alt grubunu oluşturmaktadır (Rao et. al., 1998; Gupta el. al., 2002; Maurer, 2004).

### Serin Alkalen Proteazlar

Serin alkalen proteazlar çeşitli bakteri, küf, maya ve mantarlar tarafından üretilir. Bunlar DFP ve patates proteaz inhibitörleri tarafından inhibe edilirken, tosil-L-

fenilalanin klorometil keton (TPCK) veya tosil-L-lizin klorometil keton (TLCK) tarafından inhibe edilmezler. Karboksil tarafında tirozin, fenilalanin veya lösin olan peptit bağlarını hidroliz ederler. Optimal pH değerleri 10 ve izoelektrik noktaları ise 9 civarındadır. Moleküler ağırlıkları 15 ile 30 kDa arasında değişir. Alkalen serin proteazlar *Arthrobacter*, *Streptomyces* ve *Flavobacterium* türleri gibi bakteriler tarafından da üretilmekle birlikte, *Bacillus* türleri tarafından üretilen ‘subtilisinler’ en iyi bilinenleridir. Alkalen proteazlar *Conidiobolus*, *Aspergillus* ve *Neurospora* türleri gibi filamentöz mantarlar ve *S. cerevisiae* tarafından da üretilmektedir (Rao et. al., 1998; Gupta el. al., 2002).

### Subtilisinler

Serin proteazların ikinci en büyük ailesini oluşturan *Bacillus* kaynaklı “subtilisinler” katalitik mekanizmaları ile serin proteaz olarak tanımlanırlar ve üç boyutlu yapıları ile, kimotripsin ve tripsin gibi diğer serin proteazlardan kolaylıkla ayırt edilirler. Geniş substrat çeşitliliği, yüksek pH ve sıcaklık kararlılıklarından dolayı, deterjan formülasyonlarında halen yalnızca *Bacillus* kaynaklı subtilisinler kullanılmaktadır. Moleküler ağırlıklarının 18 kDa ile 90 kDa arasında değişmesine karşın deterjan formülasyonlarında kullanılan bütün subtilisinler yaklaşık 27 kDa dolaylarındadır (Maurer, 2004). Bunlardan en iyi bilinenleri ‘subtilisin Carlsberg’ ve ‘subtilisin Novo’ veya “Bacterial Protease Nagase” (BPN)’dir. *Bacillus licheniformis* tarafından üretilen subtilisin Carlsberg, 1947 yılında Carlsberg Laboratuvarı’nda Linderstrom, Lang ve Ottesen tarafından bulunmuştur. Subtilisin Novo (veya BPN), *Bacillus amyloliquefaciens*’ten izole edilmiştir. Subtilisin Carlsberg deterjanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır ve yıllık üretimi 500 ton civarındadır. Subtilisin BPN’nin ticari önemi daha düşüktür. Her iki subtilisinin moleküler ağırlığı 27,5 kDa olup, aralarında sadece 58 aminoasitlik bir fark vardır. Bu iki enzimin optimal sıcaklığı 60 °C’tır ve optimal pH değerleri 10’dur (Rao et al., 1998; Gupta el. al., 2002).

#### **1.2.2.2. Aspartik Proteazlar**

Aspartik proteazlar katalitik aktivite için aspartat rezidüsüne gereksinim duyan endopeptidazlardır. Çoğu aspartik proteaz en yüksek aktiviteyi düşük pH değerlerinde (pH 3–4) gösterir ve izoelektrik noktaları 3 ile 4,5 arasında değişir. Moleküler ağırlıkları 30 ile 45 kDa arasındadır. Aspartik proteazlar üç aile içinde gruplandırılırlar (pepsin, retropepsin, pararetrovirüs enzimleri) ve pepstatin tarafından inhibe edilirler. Ayrıca, diazoasetil-DL-norlösün metil ester (DAN) ve 1,2- epoksi-3- (p-nitrofenoksi) propan gibi diazoketon bileşiklerine duyarlıdırlar (Rao et al., 1998).

#### **1.2.2.3. Sistein Proteazlar**

Sistein (ya da tiol) proteazları prokaryot ve ökaryotlarda üretilir. Papain en iyi bilinen sistein proteazdır. Optimum pH değerleri genelde nötral pH dolaylarındadır. P-kloromerküribenzoat (PCMB) gibi sülfidril ajanlarına duyarlıdırlar, ancak DFP ve metal bağlayan ajanlardan etkilenmezler (Rao et al., 1998).

#### **1.2.2.4. Metalloproteazlar**

Metalloproteazlar proteazların katalitik mekanizması en çok farklılık gösteren grubudur. Aktivite için divalent katyonlara gereksinim duymaları ile karakterize edilirler. Yüksek organizmalardan kollegenazlar, yılan zehirlerinden ‘hemarragic’ toksinler, bakterilerden termolizinler gibi çeşitli enzimler bu grup içinde yer alır. Metalloproteazların yaklaşık 30 ailesi bilinmektedir. Bunlardan 17’si endopeptidaz, 12’si ekzopeptidaz ve bir tanesi hem endopeptidaz, hem de ekzopeptidazdır. Metalloproteazlar 4 gruba ayrılır: (1) nötral, (2) alkalen, (3) myxobacter I, (4) myxobacter II. Nötral metalloproteazların hidrofobik aminoasitlere karşı özgülük göstermesine karşın, alkalen metalloproteazlar daha geniş substrat çeşitliliğine sahiptir. Myxobacter proteaz I’in küçük aminoasitlere özgün olmasına karşın myxobacter proteaz II lizin rezidülerine karşı spesifiktir. Bütün metalloproteaz tipleri metal bağlayan ajanlara karşı duyarlıdırlar ve sülfidril ajanları ve DFP tarafından inhibe edilmezler (Rao et al., 1998).

Özet olarak, proteazlar substrat üzerinde etkileşim gösterdikleri bölgeye göre öncelikle endo ve ekzopeptidaz olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar. Daha ileri aşamada katalitik mekanizmalarına bağlı olarak serin-, sistein-, aspartik-, ve metalloproteazlar olarak sınıflandırılırlar. Optimal aktivite gösterdikleri pH değerine göre de asidik, nötral veya alkalen proteazlar olarak adlandırılırlar (Rao et al., 1998).

### **1.3. Bakteriyel Proteazlar**

Proteazlar doğadaki bütün canlı formları için esansiyel bir bileşen olmakla birlikte, ticari proteaz ihtiyacının üçte ikisi mikroorganizmalar kullanılarak üretilmektedir. (Kumar ve Takagi, 1999). Mikrobiyal proteazlar, asidik, nötral veya alkali pH'larda aktif olup olmadıklarına ve enzimin aktif bölgesindeki grupların niteliğine göre çeşitli gruplar altında sınıflandırılırlar [örneğin; metallo- (EC.3.4.24), aspartik- (EC.3.4.25), sistein-veya sülfidril- (EC.3.4.22) veya serin-tipi (EC.3.4.21)]. Alkalen proteazlar, (EC.3.4.21) nötral pH ile alkali pH aralığında aktif olan proteazlar olarak tanımlanır. Bunlar, bir serin merkezine (serin proteaz) ya da metallo-tipi merkeze (metalloproteaz) sahiptir ve alkalen serin proteazlar, ticari olarak kullanılan enzimler arasında en önemli grubu oluşturmaktadır (Gupta et al., 2002).

### **1.4. Alkalen Proteazların Uygulama Alanları**

Alkalen proteazlar dünya enzim pazarında en büyük paya sahiptir. Bakteriyel kaynaklı alkalen proteazlar, gıda ve deterjan endüstrisi başta olmak üzere birçok endüstriyel uygulamalarda yer almaktadır ve alkalen proteaz tabanlı ürünler dünya çapında, çeşitli şirketler tarafından başarıyla üretilmektedir (Rao et al., 1998; Gupta et al., 2002; Kumar et al., 1999; Horikoshi, 1996). Ticari olarak üretilen alkalen proteazların üreticileri, uygulama alanları ve kaynakları Tablo 1.2'de özetlenmiştir (Gupta et al., 2002).

#### **1.4.1. Gıda Endüstrisi**

Mikrobiyal alkalen proteazlar gıda endüstrisinde geleneksel olarak yüksek besin değerine sahip protein hidrolizatlarının hazırlanmasında kullanılmaktadır. Protein hidrolizatları, kan basıncının düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir. Ayrıca bebek

maması bileşimleri, özgül terapötik diyet ürünlerinin hazırlanması ile meyve suyu ve yumuşak içeceklerin kalitesinin artırılması gibi amaçlar için de kullanılmaktadır. Proteazların temel işlevi protein hidrolizidir ve yüksek besin değerine sahip protein hidrolizatlarının hazırlanmasında kullanılırlar. Alkalen proteazlardan, çeşitli doğal protein substratların hidrolizatlarının yapılması için yararlanılır. Ayrıca alkalen proteazların keratinolitik aktivitesi, keratin bulunduran materyallerden veya tüy atıklarından protein içerikli hammadde üretmek üzere kullanılır (Gessesse et. al., 2002; Gupta et. al., 1998; Kumar and Takagi, 1999)

### **1.4.2. Deri Sanayi**

Deri imalatında geleneksel olarak kullanılan yöntemler, çevre kirliliğine ve güvenlik sorunlarına neden olan hidrojen sülfür ve diğer kimyasalların kullanımı eliyle gerçekleştirilmektedir. Çevresel nedenlerden dolayı derinin enzimatik yaklaşımla işlenmesi tercih edilebilir. Ayrıca, bu enzimatik işlem; kolay kontrol edilebilmesi, hızı, atık miktarı ve maliyetinin düşük olması gibi nedenlerden dolayı avantajlıdır. Elastolitik ve keratinolitik aktiviteye sahip alkalen proteazlar deri işleyen endüstrilerde kullanılabilir. Alkalen proteazlardan ham deri işlenmesinin bütün basamaklarında yararlanılabilir. Enzimatik uygulama, istenmeyen pigmentleri yok etmekte, deri alanını artırmakta ve sonuç olarak deri yüzeyinin daha temiz olmasını sağlamaktadır. Tabaklama işlemi geleneksel olarak pankreatik proteazların kullanıldığı enzimatik süreçlerle gerçekleştirilmektedir. Ancak son zamanlarda, uygulamanın gerçekleştirildiği alkali koşullar; kıl köklerinin şişmesine, proteazın kıl folikülüne saldırmasına ve kılın deriden daha hızlı uzaklaştırılmasına izin verdiğinden, mikrobiyal alkalen proteazların deri tabaklanmasında kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır (Gupta et. al., 2002; Horikoshi, 1999).

### **1.4.3. Atık Yönetimi**

Proteazlar, protein içerikli atıkların giderilmesinde de kullanılabilir. Protein içerikli atıklar, proteolitik enzim aktivitesi kullanılarak çözünür hale getirilmekte ve dolayısıyla su sistemlerinin biyolojik oksijen gereksinimi düşürülmektedir. Son zamanlarda çeşitli gıda endüstrisi ve ev atıklarının yönetiminde alkalen proteaz

kullanılması, atık işlenmesinde yeni bir çıkış açmıştır. Tavuk çiftliklerinden çıkan tüy atıkları yüksek miktarda protein içermektedir ve bu atıklar gıda ve yem üretimi için önemli bir protein kaynağı olarak kabul edilmektedir. Kümes hayvanı atıklarının ve atık şebekelerinde tıkanmaya sebep olan kıl birikintilerinin ortadan kaldırılmasında keratinolitik proteazlar kullanılmaktadır (Rao et. al., 1998; Gessesse et. al., 2002).

Bunlara ek olarak, alkalin proteazlardan röntgen ya da fotoğraf filmlerinde kullanılan gümüşün geri kazanılmasında da yararlanılmaktadır (Nakiboğlu et.al., 2000). Bu atık filmlerin jelatin katmanının % 1,5-2'sini oluşturan gümüş, değişik amaçlar için kullanılabilir. Filmlerde bulunan gümüş, geleneksel olarak filmlerin yakılması ile geri kazanılmakta ve bu durum çevre kirliliğine neden olmaktadır. Ayrıca filmin yapılmasında kullanılan polyester yakılma işleminden dolayı geri kazanılamamaktadır. Jelatin katmanına bağlı olan gümüş, günümüzde katmanın proteolitik hidrolizi ile geri kazanılabilmektedir. Jelatinin enzimatik hidrolizi; gümüşün geri kazanılmasının yanında polyester film tabanının da tekrar kullanımına olanak sağlamaktadır. *B. subtilis* alkalin proteazı, jelatin katmanını 50–60 °C'ta 30 dakikada parçalamakta ve gümüşün geri kazanılmasını sağlamaktadır (Rao et. al., 1998).

#### **1.4.4. İpek Endüstrisi**

Alkalin proteazların kullanıldığı diğer bir uygulama alanı da ipek endüstrisidir. Ham ipeğin ağırlıkça % 35'ini oluşturan serisin, ipek liflerinin yüzeyini kaplamakta ve ipeğin kaba görünmesine neden olmaktadır. İpek liflerindeki serisin, geleneksel olarak nişasta kullanımı ile ortadan kaldırılmaktadır. Ancak bu, maliyet açısından pahalı bir yöntemdir. Bu yönteme alternatif olarak *Bacillus* kaynaklı alkalin proteazlar kullanılmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır (Gupta et. al., 2002).

**Tablo 1.2.** Ticari Bakteriyel Alkalen Proteazlar, Kaynakları, Uygulama Alanları ve Endüstriyel Üreticileri.

| Üretici                         | Ürün ismi                     | Mikrobiyal kaynak                                                   | Uygulama alanı                                       |
|---------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| Novo Nordisk, Danimarka         | Alcalase                      | <i>B. licheniformis</i>                                             | Deterjan, ipek                                       |
|                                 | Savinase                      | <i>Bacillus</i> sp.                                                 | Deterjan, tekstil                                    |
|                                 | Esparase                      | <i>B. lentus</i>                                                    | Deterjan, gıda, ipek                                 |
|                                 | Biofeed pro                   | <i>B. licheniformis</i>                                             | Yem                                                  |
|                                 | Durazym                       | <i>Bacillus</i> sp.                                                 | Deterjan                                             |
|                                 | Novozyme 471MP                | Belirtilmiyor                                                       | Fotografik jelatin hydr.                             |
|                                 | Novozyme 243                  | <i>B. licheniformis</i>                                             |                                                      |
|                                 | Nue                           | <i>Bacillus</i> sp.                                                 | Deri                                                 |
| Genencor International, A.B.D.  | Purafact                      | <i>B. lentus</i>                                                    | Deterjan                                             |
|                                 | Primatan                      | Bakteriyel kaynaklı                                                 | Deri                                                 |
| Gist-Brocades, Hollanda         | Subtilisin                    | <i>B. alcalophilus</i>                                              | Deterjan                                             |
|                                 | Maxacal                       | <i>Bacillus</i> sp.                                                 | Deterjan                                             |
|                                 | Maxatase                      | <i>Bacillus</i> sp.                                                 | Deterjan                                             |
| Solvay Enzymes, Almanya         | Opticlean                     | <i>B. alcalophilus</i>                                              | Deterjan                                             |
|                                 | Optimase                      | <i>B. licheniformis</i>                                             | Deterjan                                             |
|                                 | Maxapem                       | <i>Bacillus</i> sp.'nin protein mühendisliği ile üretilmiş varyantı | Deterjan                                             |
|                                 | HT-proteolytic                | <i>B. subtilis</i>                                                  | Alkol, içki, ekmek, yem, gıda, deri, fotografik atık |
|                                 | Protease                      | <i>B. licheniformis</i>                                             | Gıda, atık                                           |
| Amano Pharmaceuticals, Japonya  | Proleather                    | <i>Bacillus</i> sp.                                                 | Gıda                                                 |
|                                 | Collagenase                   | <i>Clostridium</i> sp.                                              | Teknik                                               |
|                                 | Amano protease S              | <i>Bacillus</i> sp.                                                 | Gıda                                                 |
| Enzyme Development, A.B.D.      | Enzeco alkaline protease      | <i>B. licheniformis</i>                                             | Teknik                                               |
|                                 | Enzeco alkaline protease-L FG | <i>B. licheniformis</i>                                             | Gıda                                                 |
|                                 | Enzeco high alkaline protease | <i>Bacillus</i> sp.                                                 | Endüstriyel                                          |
| Nagase Biochemicals, Japonya    | Biopraxe concantrate          | <i>B. subtilis</i>                                                  | Kozmetik, farmasötik                                 |
|                                 | Ps. Protease                  | <i>P. aeruginoso</i>                                                | Araştırma                                            |
|                                 | Ps. Elastase                  | <i>P. aeruginoso</i>                                                | Araştırma                                            |
|                                 | Cryst. Protease               | <i>B. subtilis</i> (K2)                                             | Araştırma                                            |
|                                 | Cryst. Protease               | <i>B. subtilis</i> (bioteus)                                        | Araştırma                                            |
|                                 | Biopraxe                      | <i>B. subtilis</i>                                                  | Deterjan, temizlik                                   |
|                                 | Biopraxe SP-10                | <i>B. subtilis</i>                                                  | Gıda                                                 |
| Godo Shusei, Japonya            | Godo Bap                      | <i>B. licheniformis</i>                                             | Deterjan, gıda                                       |
| Rohm, Almanya                   | Corolase 7089                 | <i>B. subtilis</i>                                                  | Gıda                                                 |
| Wuxi Synder Bioproducts, Çin    | Wuxi                          | <i>Bacillus</i> sp.                                                 | Deterjan                                             |
| Advance Biochemicals, Hindistan | Protosol                      | <i>Bacillus</i> sp.                                                 | Deterjan                                             |

### 1.4.5. Deterjan Endüstrisi

Enzimler deterjan endüstrisinde, lekelerin çıkartılması için ve geleneksel deterjan teknolojisi ile elde edilemeyen sonuçlar sağlamak üzere uzun süredir deterjan katkısı olarak kullanılmaktadır. Deterjan proteazlarının kullanımı gittikçe yaygınlaşmış ve en büyük kullanım alanını, ev tipi deterjan bileşimleri oluşturmuştur. Deterjan üreticilerinin enzim teknolojisine bağımlılığının artmasının nedenleri arasında, tüketici açısından daha avantajlı olmasının yanı sıra, temizleme performansındaki ve performans/maliyet oranındaki artış sayılabilir. Günümüz pazarının eğilimleri ve tüketicinin talepleri; iyileştirilmiş performans/verim oranına, artırılmış aktiviteye sahip ve diğer deterjan katkılarıyla uyumlu enzimlerin geliştirilmesine gereksinim yaratmaktadır. Tüketici isteklerine daha iyi cevap verebilen ürünlerin geliştirilmesi için, daha yüksek aktivite değerlerine sahip enzimlerin üretilmesine yönelik çalışmalar sürdürülmektedir. Alkalen proteazlar başta çamaşır deterjanları olmak üzere bulaşık deterjanları ile birlikte endüstriyel deterjanların bileşiminde de kullanılmaktadır (Ito et. al., 1998; van den Burg, 2003; Rao et. al., 1998; Kumar et. al., 1999, Kirk et. al., 2002).

Deterjan içeriklerinde enzimlerin kullanılması 1914 yılına kadar uzanmaktadır. Bu tarihte, Rohm ve Haas adında iki Alman bilim adamı ‘Burnus’ ticari ismiyle çıkardıkları deterjanlarına katkı olarak sodyum bikarbonatla birlikte pankreatik proteaz eklemiştir. Bakteriyel enzim içeren ilk deterjan, 1956 yılında Bio-40 tescili ile pazara sürülmüştür. 1963 yılında alkalen proteaz, “alcalase” enzimi deterjan tozu içine katılmış ve Novo Nordisk (Danimarka) tarafından Biotex tescilli ismi ile pazara sürülmüştür. 1970’lerde proteaz üretiminde çalışan işçilerde görülen alerjik reaksiyonlar, bu enzimin üretimine sekte vurmuştur. Neyseki bu problem toz içermeyen kapsüllenmiş ürünlerin geliştirilmesi ile çözülmüştür. Bugün, proteaz üretiminin % 89’u deterjanlar için yapılmaktadır ve pazarın tamamı, çeşitli *Bacillus* türlerinden elde edilen subtilisin ve/veya alkalen proteazlar tarafından tutulmaktadır (van der Laan, 1991; Maurer, 2004).

### 1.5. Yeni Proteazların Bulunması

Endüstriyel enzimler arasında önemli bir yere sahip olan proteazların ve son yıllarda özellikle alkalen proteazların (subtilisinler ya da alkalen serin proteazlar) sahip oldukları özellikler (yüksek pH’daki aktivitesi, termal kararlılık, geniş substrat çeşitliliği

gibi) bu enzimlerin deterjan, gıda, deri ve ipek gibi endüstriyel süreçlerde kullanımlarını büyük ölçüde arttırmıştır (Maurer, 2004). Günümüzde, fungal kaynaklı enzim üretiminde artış görülmesine karşın, ticari olarak kullanılan alkalen proteaz enzimlerinin büyük bir kısmı *Bacillus* soylarından elde edilmektedir. Bugüne kadar tanımlanan 3000'den fazla enzimin büyük bir kısmı mezofilik organizmalardan elde edilmişlerdir. Bu yüzden bilinen enzimlerin çoğu dar pH, sıcaklık ve iyonik güç aralığında çalışmakta ve günümüz endüstrisinde istenilen niteliklerin tümünü taşımamaktadırlar (Rahman et. al., 1994; Haki and Rakshit, 1998; Ito et. al., 1998; Maurer, 2004). Bu nedenle son zamanlarda bir çok araştırmacı istenilen özellikleri taşıyan enzimleri elde etmek üzere ekstrem koşullara (yüksek sıcaklık, alkalen, asidik, veya tuzlu ortamlar) uyum sağlamış mikroorganizmaları izole etmeye ve tanımlamaya yönelmişlerdir. Ayrıca ticari olarak kullanılan proteazların patent altına alınmış olması da, yeni proteazların araştırılmasını tetiklemektedir (Maurer, 2004). Yukarıda ortamlardan izole edilen mikroorganizmalar sayesinde bazik pH'larda ve yüksek sıcaklıklarda çalışabilen enzimlerin elde edilmesi kolaylaşacaktır. Günümüz itibariyle, alkalen proteaz üreticisi olarak alkalofilik *Bacillus* türleri tercih edilmektedir. Bunun yanında asidofilik veya termofilik *Bacillus* türlerinin de alkalen proteaz üreticisi olabildiği bilinmektedir. Sonuç olarak, ekstremofiller (farklı ve zor koşullara uyum sağlamış organizmalar) önemli enzim kaynakları olarak dikkate alınmakta ve bunlardan elde edilen enzimlerin yeni endüstriyel uygulamalarda kullanılmasına yönelik çalışmalar öne çıkmaktadır (Anwar and Seleemuddin, 1998; Mannachini and Fortina, 1998; Horikoshi, 1995, 1996, 1999; Hough and Danson, 1999, Kumar and Takagi, 1999; Demirjian et. al., 2001; Gupta et. al., 2002; van den Burg, 2003).

Alkalofilik mikroorganizmalar doğaya yayılmış durumdadır ve alkalen olmayan ortamlarda da bulunabilirler. Doğal alkalen ortamlardan olan sodalı toprak, göller ve çöller alkalofilik türlerin birçoğuna ev sahipliği yapmaktadır. Bu tür organizmaların bulunduğu diğer ortamlar arasında seyreltik alkali su kaynakları, çöl toprağı, bozunan protein bulunduran topraklar (ya da orman toprağı) sayılabilir. Tekstil, gıda, patates işleme birimleri, kağıt üretim birimleri, kireç üretim merkezleri, deterjan ve deri işleme birimleri gibi endüstriyel süreçlerden çıkan atıkların yanı sıra insan kaynaklı uygulamalardan ortaya çıkan ve ilgili mikroorganizmlar için elverişli olan ortamlar

arasında sayılabilir (Kumar and Takagi, 1999).

### 1.6. Alkalofilik Organizmaların İzolasyonu ve Alkalen Proteaz Üreticisi Soyların Seçilmesi

İnsan ve hayvan dışkılarından ilk zorunlu alkalofilik mikroorganizmanın izolasyonu, 1934'te Vedder tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu mikroorganizmalar Vedder tarafından tanımlanmış ve *Bacillus alcalophilus* olarak isimlendirilmiştir. Vedder ayrıca bu *Bacillus* soyunun yüksek alkali pH düzeylerini tolere etmekten çok, yüksek alkali koşullara gereksinim duyduğunu kanıtlamıştır. Bugün, bu alkalofilik *Bacillus* soyları büyük bir endüstriyel öneme sahip olup; deterjan endüstrisi için proteazlar, kağıt hamuru endüstrisinde kullanmak üzere ksilenazlar ve nişastadan siklodekstrin üretimi için siklodekstrin glukotransferazların elde edilmesinde kullanılmaktadırlar. Bu tür endüstriyel uygulamalar doğal ve insan-kaynaklı alkali ortamlardan üretken *Bacillus* soylarının izolasyonu çalışmalarını hızlandırmıştır. İnsan kaynaklı atıkların birçoğu alkali koşullara neden olduğundan, normal bahçe toprağı bu tür izolasyonlar için kullanılabilir. Ayrıca, bu tür organizmalar alkalen olmayan, nötral veya asidik ortamlardan da izole edilebilmektedir (Kumar and Takagi, 1999). Doğal ortamlarda, alkali koşulları sağlayan ana kaynak sodyum karbonattır. Dolayısıyla izolasyon ortamına  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 'ün eklenmesi alkalofilik türlerin büyümesine olanak sağlamaktadır.

Endüstriyel fermantasyon sürecinin ilk adımı, istenilen ürünü ticari miktarlarda üretebilen soyların elde edilmesidir. İstenilen özelliklere sahip olan soylar çok geniş sayıdaki diğer soylar arasından seçilmektedir. Geleneksel olarak, alkalofilik mikroorganizmalar yüksek alkali koşullarda katı besi yerinden izole edilir ve izolasyonun ardından istenilen özelliklerin (amilolitik, proteolitik, lipolitik v.b. aktivite) varlığını belirlemek üzere bakteriler özgün substratlar (nişasta, skim-milk ya da kazein, tributirin ya da yağ v.b.) içeren katı besi yerlerine ekilirler. Daha sonraki aşamada, her koloninin çevresinde oluşturduğu halenin çapı ile istenilen ürünü üretebilme yetkinliği arasında ilişki kurulur (Kumar and Takagi, 1999). Örneğin, skim-milk ya da kazein içeren katı besi yerine ekilen ve proteolitik aktiviteye sahip olan bir soy, kazein hidrolizi sonucu koloni çevresinde oluşan şeffaf bölgenin varlığı ile belirlenir (Lawler and

Smith,1999; Mehrotra, 1999; Singh et. al., 2001; Kanekar et. al., 2002; Tuzlakoğlu ve ark., 2003).

Alkalofilik mikroorganizmaların izolasyonu için önerilen değişik besi yerleri arasında en çok kullanılanı Horiskoshi tarafından tanımlanmıştır. Bunun yanı sıra NB, glukoz-maya özütü-asparajin (GYA), pepton-maya özütü-glukoz (PPYG) gibi besi yerleri de kullanılmaktadır (Kumar and Takagi,1999).

Endüstriyel uygulamalar için kullanılan alkalofilik mikroorganizmalar arasında *Bacillus* cinsinin baskın olduğu görülmektedir (Ito et. al., 1998; Horikoshi, 1996; Maurer, 2004). Alkalen proteaz üreticisi bazı *Bacillus* türleri Tablo 1.3'te (Kumar and Takagi, 1999) sıralanmıştır.

**Tablo 1.3.** Alkalen Proteaz Üreticisi Bazı *Bacillus* Türleri.

---

|                                                                        |
|------------------------------------------------------------------------|
| <i>Bacillus alcalophilus</i> ATCC 21522 ( <i>Bacillus</i> sp. No. 221) |
| <i>B. alcalophilus</i>                                                 |
| <i>B. alcalophilus</i> subsp. <i>halodurans</i> KP1239                 |
| <i>B. amyloliquefaciens</i>                                            |
| <i>B. circulans</i>                                                    |
| <i>B. coagulans</i> PB-77                                              |
| <i>B. firmus</i>                                                       |
| <i>B. intermedius</i>                                                  |
| <i>B. lentus</i>                                                       |
| <i>B. licheniformis</i>                                                |
| <i>B. proteolyticus</i>                                                |
| <i>B. pumilus</i>                                                      |
| <i>B. sphaericus</i>                                                   |
| <i>B. subtilis</i>                                                     |
| <i>B. subtilis</i> var. <i>amylosacchariticus</i>                      |
| <i>B. thuringiensis</i>                                                |
| <i>Bacillus</i> sp. Ya-B,                                              |
| <i>Bacillus</i> sp. NKS-21                                             |
| <i>Bacillus</i> sp. B21-2                                              |
| <i>Bacillus</i> sp. Y                                                  |
| <i>Bacillus</i> sp. CW-1121                                            |
| <i>Bacillus</i> sp. KSM-K16                                            |
| <i>Bacillus</i> sp. MK5-6                                              |

---

## 1.7. *Bacillus* Cinsi

*Bacillus* cinsindeki türler endospor oluşturabilen, gram pozitif, çubuk şekilli aerobik ya da fakültatif anaerobik bakteriler olarak bilinmektedir. Bu cinsin en belirgin özelliği ana hücre (vegetatif form) içinde endospor oluşturabilmesidir. *Bacillus* türleri yaşlı kültürlerde Gram negatif boyanabilirler.

### 1.7.1. Hücre Morfolojisi

*Bacillus* cinsindeki hücreler tek ya da çeşitli uzunluklardaki zincir şeklinde bulunabilir. Çubuk şeklindeki hücrelerin uçları yuvarlak ya da köşelidir. Boyutları  $0,5 \times 1,2 \mu\text{m}$  kadar küçük olabileceği gibi,  $2,5 \times 10 \mu\text{m}$  kadar büyük de olabilir. Hücreler parasporal parçalar ya da protein kristalleri taşıyabilir. Endospor formu ve endospor taşıyan ana hücrenin (sporangium) şekli *Bacillus* türlerinin karakteristik özelliğidir. Endosporlar genelde silindirik ya da elipsoidal, veya oval ya da yuvarlak şekilde olduğu halde, bazı türlerde böbrek ya da muz şekilli endospor oluşumu gözlenebilir. Endospor, sporangium içinde santral, parasantral, subterminal, terminal ya da lateral konumda konuşlanabilir. Sporangium, endospor oluşumu sırasında şeklini koruyabilir ya da şişebilir. Gordon ve ark. (1973) endosporun konumu ve sporangium şişkinliğine göre *Bacillus* türlerini üç grupta toplamışlardır. Grup 1, sporangiumu şişirmeyen elipsoidal endospor oluşturur. Grup 2, sporangiumu şişiren elipsoidal endospor oluşturur. Grup 3 ise sporangiumu şişiren küresel endosporlar oluşturur. Endosporun şekli, sporangium içindeki konumu ve sporangium şişkinliği taksonomik açıdan önem taşıyan değişkenlerdendir (Sneath, 1986).

### 1.7.2. Koloni Özellikleri

*Bacillus* soylarının koloni morfolojisi büyük oranda çevresel faktörlerden etkilenmektedir. Bu etkenler besi yeri içeriği, inkübasyon sıcaklığı ve nem olabileceği gibi, kültürün besi yerindeki gelişiminin büyüme ortamında oluşturduğu değişiklikler de olabilir. Aynı tür içerisinde farklı koşullarda farklı koloni morfolojisi izlenebilir (Sneath, 1986).

*Bacillus* türleri içerisinde en özgün koloni morfolojisi *B. mycoides*'te görülür. Bu türde, 48 saat içerisinde bütün petri kabını kaplayan rizoid büyüme izlenir. Rizoid

büyüme genelde sola dönerek gelişir. Birkaç soyda sağa dönen rizoid büyüme görülmüştür. Bazı soylarda rizoid büyüme yönünün ortamın pH'sına göre değiştiği saptanmıştır (Sneath, 1986).

### 1.7.3. *Bacillus* Türlerinin İzolasyonu

Endospor oluşturabilen aerobik *Bacillus* türleri hemen hemen bütün doğal habitatlardan ve diğer kaynaklardan izole edilebilir (Saeki et. al, 2000). Karbon ve nitrojen döngüsünde büyük rol üstlendikleri toprak ve bitki artıklarında genelde bol miktarda bulunurlar. Bu organizmalar, tatlı su, kirlenmiş deniz suyu, denizdibi çökeltileri, gıda, süt, farmasötik ürünler gibi diğer habitatlara toprak, yağmur suyu, tozlar veya enfekte olmuş bitki materyali ile geçebilir. *Bacillus* türü bakterilerin izolasyon yöntemleri, temel olarak *Bacillus* endosporlarının sıcaklığa dayanıklı olmasını temel alır. 70 °C'ta 10 dakika ya da daha uzun süreli bekletme neredeyse, bilinen tüm vejetatif bakteri formlarını öldürdüğü halde, endospor oluşturmeyen ekstrem termofilik bakterileri ve *Bacillus* türlerinin endosporlarını öldürmemektedir.

Desikasyon işlemi de *Bacillus* endosporlarını öne çıkarmak için kullanılabilen bir yöntemdir. Çünkü diğer bütün vejetatif bakteri formlarının tersine, *Bacillus* cinsi tarafından üretilen endosporlar kurumaya dayanıklıdır.

Ayrıca *Bacillus* türlerinin sporları bilinen dezenfektanlara karşı çoğu vejetatif bakteri hücrelerinden daha dirençlidir. *Bacillus* türlerinin izolasyonu için elverişli bir dezenfektan olan etanol kullanılır. *Bacillus* endosporları % 50 etil alkole 1 saat dayandıkları halde, vejetatif *Bacillus* hücrelerinin ve diğer bakteri türlerinin öldüğü bilinmektedir (Sneath, 1986).

### 1.8. *Bacillus* Soylarının Tiplendirilmesi

Uygun pastörizasyon adımıyla sonra, *Bacillus* türü mikroorganizmaları spor oluşturabilen diğer gram pozitif ve çubuk şeklindeki cinslerden (*Sporolactobacillus* ve *Clostridium* gibi) ayırmanın en iyi yolu katalaz testinin yapılmasıdır. *Bacillus* cinsinin katalaz pozitif olmasına karşın, *Sporolactobacillus* ve *Clostridium* cinsleri katalaz negatiftir. Ayrıca *Bacillus* cinsindeki çoğu tür aerobik olduğu halde, *Sporolactobacillus* türleri fakültatif anaerobik veya mikroaerofilik, *Clostridium* türleri ise zorunlu

anaeroblardır. Dolayısıyla spor oluşturabilen çubuk şeklindeki gram pozitif bir soy, aerobik ve katalaz pozitif bir bakteri ise *Bacillus* cinsi içine yerleştirilebilir (Sneath, 1986).

Mikroorganizmaların sınıflandırılmasında üç ana yöntem uygulanmaktadır. Bunlar klasik yaklaşım, nümerik taksonomi ve moleküler yaklaşımlardır. Klasik yaklaşımda, prokaryotlar öncelikle yapısal ve morfolojik özelliklerine göre, arkasından da biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerine göre cins ve tür düzeyinde sınıflandırılır. Klasik yaklaşımda kullanılan yapısal ve morfolojik özellikler ile biyokimyasal ve fizyolojik özellikler Tablo 1.4'te belirtilmiştir. Dolayısıyla aynı hücre şekline ve yapısına sahip organizmalar aynı grup içine yerleştirilir. Klasik yaklaşımda taksonomi için kullanılan diğer fiziksel özellikler; kamçı varlığı ve tipi, boyama özellikleri ve kapsül türü hücre dışı kılıfları içermektedir. Sınıflandırma için kullanılan ikincil özellikler ise beslenme veya atmosferik büyüme gereksinimleri ile hücresel metabolizmanın yan ürünleri olabilir.

**Tablo 1.4.** Klasik Yaklaşımda Prokaryotik Taksonomi için Kullanılan Kriterler.

| Kategori                         | Kriterler                                                                                                                                                                                                                                               |
|----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Yapısal / morfolojik</b>      | Şekil<br>Büyükklük, dizilim<br>Kapsül<br>Kamçı<br>Endospor<br>Gram boyama v.b.                                                                                                                                                                          |
| <b>Biyokimyasal / fizyolojik</b> | Karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılan karbonhidratlar<br>Optimum büyüme sıcaklığı ve pH'sı<br>Büyüme için sıcaklık ve pH aralığı<br>Aerobik, anaerobik, fakültatif anaerobik<br>Fermentasyon ve solunumun son ürünleri<br>Antibiyotik direnci v.b. |

Klasik yaklaşım birçok taksonomist tarafından yaygın şekilde kullanılmakla birlikte önemli bir dezavantaja sahiptir. Taksonomistin birçok organizma için en önemli özelliğin hangisi olduğuna karar vermesi gerekmektedir. Bu ikilem Michael Adanson (1727–1806) tarafından geliştirilen ve nümerik ya da “Adansonian” taksonomi olarak adlandırılan bir yaklaşımla çözülmüştür. Nümerik taksonomide bir organizmanın bütün

gözlenebilen özellikleri eşit ağılığa sahiptir ve dolayısıyla organizmalar arasındaki benzerliklerin belirlenmesinde eşit şekilde dikkate alınır (Lim, 1998)

Mikroorganizmalardaki genetik analizler için modern tekniklerin gelişmesi mikrobiyal klasifikasyon için daha iyi yöntemlerin ortaya çıkışına neden olmuştur. Tiplendirme için moleküler yaklaşımlar organizmalar arasında nükleik asit karşılaştırmasına dayanır. Bu karşılaştırmalar farklı organizmalar arasında RNA ya da DNA dizilerinin belirlenmesini veya farklı organizmlardan nükleik asitlerin hibridizasyonunu kapsar.

Moleküler tiplendirmede kullanılan yöntemler arasında, özellikle prokaryotların sınıflandırılması için en güvenilir olanı ribozomal RNA dizi analizidir. Ribozomal RNA'lar organizmalar arasında evrimel farklılaşmaların çalışılması için en önemli bileşendir. Bu moleküllerin tüm canlılardaki işlevsel kalımlılıkları, rRNA'ları, milyarlarca yıllık evrimsel değişimin ölçülmesi için ideal moleküler koronetreler haline getirmektedir. rRNA işlevini kaybetmeden büyük yapısal değişiklikleri tolere edemeyen küçük bir molekül olduğu için, gen dizisi uzun filojetik yollar boyunca çok az değişmiş ya da hiç değişmemiştir. Sonuç olarak, rRNA molekülleri arasındaki küçük farklılıklar organizmalar arasındaki evrimsel uzaklığın belirlenmesinde kullanılabilir. Prokaryotlardaki üç rRNA molekülü (5S, 16S ve 23S) arasında tiplendirme aracı olarak en sık kullanılanı 16S rRNA'dır. 5S rRNA'nın küçük boyutu (125 nükleotit) bu molekülden elde edilecek bilgiyi sınırlamaktadır. Öte yandan, 23S rRNA'nın büyüklüğü (2900 nükleotit) bu molekülün deneysel analizini 16S rRNA'dan (1500 nükleotit) daha zor hale getirmektedir (Lim, 1998; Ducte et. al., 1998; Hill et. al., 2000; Sacchi et. al., 2002)

Ribozomal rRNA'nın dizilenmesi oldukça basittir. 16S rRNA'nın korunmuş bölgelerine özgü "forward" ve "reverse" primerler kullanılarak 16S rRNA'yı kodlayan rDNA dizisi genomik DNA'dan PCR aracılığı ile kolayca amplifiye edilebilir. Amplifiye edilen 16S rDNA fragmanı dizi analizi çalışmalarında kullanılabilir (Weisburg et. al., 1991; Lim, 1998; Stackebradt and Lang, 1998; Tanner et. al., 1995; Mora et. al., 1998; Blanc et. al., 1999; Ntougias and Russell, 2000).

### 1.9. Tezin Amacı

Endüstriyel enzim pazarında çok ayrıcalıklı bir yeri olan alkalen proteazların patentlerle korunmakta olması ve halen kullanılanlarla birlikte yeni geliştirilen endüstriyel uygulamaların farklı özellikler taşıyan yeni enzimlere olan gereksinimi arttırması; dünyada ve ülkemizde bir çok araştırmacıyı bu konu üzerinde çalışmaya yöneltmiştir.

Bu tez çalışması kapsamında, alkalen proteaz üreticisi yerel *Bacillus* soylarının taranarak seçilmesi ve tanımlanmasının yanı sıra, enzim üretiminin optimizasyonu hedeflenmiştir.

## 2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

### 2.1. Gereçler

#### 2.1.1. Sarf Malzemeleri

|                                      |         |               |
|--------------------------------------|---------|---------------|
| Agar                                 | BD      | 214010        |
| Agaroz                               | SIGMA   | A 6013        |
| Akrilamid                            | SIGMA   | A 8099        |
| Amonyum per Sülfat                   | Bio Rad | 161-0700      |
| Amonyum sülfat                       | MERCK   | 101216        |
| Asetik Asit                          | RIEDEL  | 27225         |
| Azokazein                            | SIGMA   | A2765         |
| Brillant Blue R                      | SIGMA   | B 7920        |
| Bromofenol Blue                      | SIGMA   | B 6131        |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O | SIGMA   | C 3306        |
| CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O | SIGMA   | C 6641        |
| Diyaliz Membranı                     | ROTH    | 0653.1        |
| Etidyum Bromid                       | SIGMA   | E 7637        |
| Fenol                                | MERCK   | 100200        |
| FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | SIGMA   | F 7002        |
| Folin's Reagent                      | SIGMA   | F 9252        |
| Fuksin Sulu Boyası                   | GBL     | 2424          |
| Gliserol                             | RIEDEL  | 15524         |
| Gliserol                             | Riedel  | 15524         |
| Glisin                               | SIGMA   | G 7126        |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>       | SIGMA   | B 7660        |
| İmmersiyon Yağı                      | MERCK   | 1.046.990.100 |
| Izoamil alkol                        | MERCK   | 100978        |
| Izopropanol                          | Riedel  | 24137         |
| Jelatin                              | SIGMA   | G 6144        |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>      | MERCK   | 1.051.011.000 |
| Kaba Filtre                          |         |               |
| KCI                                  | RIEDEL  | 12636         |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | RIEDEL  | 4243          |
| Kloroform                            | MERCK   | 102431        |
| Kristal Moru Boyası                  | GBL     | 2434          |

|                                                     |               |           |
|-----------------------------------------------------|---------------|-----------|
| L-Tirozin                                           | SIGMA         | L 8566    |
| Lugol Çözeltisi                                     | GBL           | 2435      |
| Maya Özü                                            | MERCK         | 103.753   |
| MgCl <sub>2</sub>                                   | MERCK         | 105.832   |
| MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O                 | SIGMA         | M 7634    |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>                     | MERCK         | 106.392   |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O | SIGMA         | M 1003    |
| NaCl                                                | MERCK         | 106.400   |
| NaNO <sub>3</sub>                                   | SIGMA         | S 8170    |
| NaOH                                                | MERCK         | 106.462   |
| Nutrient Broth                                      | DIFCO         | 234000    |
| Nutrient Broth                                      | DIFCO         | 234000    |
| Peptone                                             | BD            | 211693    |
| Proteinaz K                                         | ROCHE         | 1 373 196 |
| Protein Standardı                                   | SIGMA         | SDS-6H    |
| SDS(Sodyum Lauryl sulphate)                         | SIGMA         | L 5750    |
| Skim milk                                           | DIFCO         | 232100    |
| Sodyum Asetat                                       | MERCK         | 6268      |
| Sodyum hidroksit                                    | MERCK         | 106462    |
| Sodyum karbonat                                     | MERCK         | 106392    |
| Sodyum klorid                                       | Riedel        | 13423     |
| TEMED                                               | SIGMA         | T7024     |
| Trikloro Asetik Asit                                | RIEDEL        | 27242     |
| Tris Baz                                            | SIGMA         | T 1503    |
| Tris-HCL                                            | MERCK         | 108986    |
| Triton X-100                                        | SIGMA         | T 9284    |
| Tryptic Soy Broth                                   | BD            | 211825    |
| Tween 80                                            | SIGMA         | P 8074    |
| β-Merkaptoetanol                                    | SIGMA         | M-6250    |
| λ DNA                                               | MBI-FERMENTAS |           |

### 2.1.2. Kullanılan Cihazlar

| Cihaz İsmi                       | Üretici Firma      | Modeli                |
|----------------------------------|--------------------|-----------------------|
| +4 °C Soğutucu                   | ARISTON NOFROST    |                       |
| -20 °C Dondurucu                 | ARISTON NOFROST    |                       |
| -80 °C Dondurucu                 | HERAEUS INSTRUMENT |                       |
| Agaroz Gel Elektroforezi Sistemi | BIOMETRA           | AgaGel Mini           |
| Buz Makinesi                     | BAR LINE           | BF 85                 |
| Etüv                             | EDMUNT BÜHLER      | TH 15                 |
| Güç Kaynağı                      | BIOLAB             | Elite 300 Plus        |
| Hassas Terazî                    | SARTORIUS          | BL 210S               |
| İnkübatör                        | CERTOMAT           | BS-T                  |
| Jel Görüntüleme Monitörü         | SONY               | PVM-95E               |
| Jel Görüntüleme Sistemi          | VILBER LOURMAT     | TFX-20M               |
| Jel Görüntüleme Yazıcısı         | SONY               | UP-890 CE             |
| Liyofilizatör                    | JOUAN              | RC-10.10              |
| Liyofilizatör Soğutucu Motoru    | JOUAN              | RCT 90                |
| Liyofilizatör Vakum Motoru       | ALCATEL            | Pascal 2005 C1        |
| Manyetik Karıştırıcı             | HEIDOLPH           | MR3001                |
| Masa Üstü Santrifüj              | HERAEUS            | Sepatech, Biofuge 15R |
| Masa Üstü Santrifüj              | HERAEUS            | Labofuge 400R         |
| Mikrodalga Fırın                 | BEKO               | 1550                  |
| Mikroskop                        | NIKON              | Alphaphot 2-YS 2      |
| Orbital Karıştırıcı              | BIOMETRA           | WT 12                 |
| Otoklav                          | HIRAYAMA           | HICLAVE HVE-50        |
| Otoklav                          | VARIOKLAV          | Dampfsterilizator 300 |
| Otomatik Pipet (1000 ml)         | GILSON             | P1000                 |
| Otomatik Pipet (20 ml)           | GILSON             | P20                   |
| Otomatik Pipet (200 ml)          | GILSON             | P200                  |
| pH Metre                         | INOLAB             | pH LEVEL 1            |
| Protein Elektroforezi Sistemi    | BIO RAD            | Mini Protean II       |
| Spektrofotometre                 | BIORAD             | Smartspec 3000        |
| Steril Kabin                     | HERAEUS            | Herasafe-HS 12        |
| Sterilizatör                     | BINDER             | ED115                 |
| Su Banyosu                       | JULABO             | SW 21                 |
| Su Banyosu                       | JULABO             | MP 13                 |
| Terazi                           | SARTORIUS          | BL 3100               |
| U.V Transillüminatör             | VILBER LOURMAT     | V026347               |
| Vorteks                          | IKA                | MS 2-Minishaker       |

### 2.1.3. Besi Yerleri

**Nutrient Broth:** % 0,3 Beef extract, % 0.5 Pepton, distile suda iyice çözüldükten sonra 121 °C'ta 40 dakika otoklavlanır.

**Nutrient Agar:** % 0,3 Beef extract, % 0.5 Pepton, % 1,5 Agar, distile suda iyice çözüldükten sonra 121 °C'ta 40 dakika otoklavlanır.

**L-Agar:** % 1 Tripton, % 0,5 Yeast extract, % 0,5 NaCl, % 1,5 Agar, distile suda iyice çözüldükten sonra 121 °C'ta 40 dakika otoklavlanır.

**Minimal Besi Yeri:** % 1 Glukoz, % 0,4 NaNO<sub>3</sub>, % 0,001 CaCl<sub>2</sub>, % 0,05 MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O, % 0,1 KCl, % 0.001 FeSO<sub>4</sub>, % 0,05 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, % 0.05 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Distile su içerisinde çözülerek 1000 ml'ye tamamlanır. 121 °C'ta 20 dakika otoklav edilir. Minimal besi yeri için eser element solüsyonu ; % 0,026 B, % 0,05 Cu, % 0,05 Mn, % 0,006 Mo, distile su içinde çözülerek otoklav edildikten sonra (121°C, 20 dakika) son hacim % 0,005 olacak şekilde minimal besi yerine ilave edilir. (Llarch et al., 1997).

**Minimal Agar Besi Yeri:** % 1 Glukoz, % 0,4 NaNO<sub>3</sub>, % 0,001 CaCl<sub>2</sub>, % 0,05 MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O, % 0,1 KCl, % 0.001 FeSO<sub>4</sub>, % 0,05 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, % 0.05 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, % 1,5 agar. Distile su içerisinde çözülerek 1000 ml'ye tamamlanır. 121 °C'ta 20 dakika otoklav edilir. Minimal agar besi yeri için eser element solüsyonu ; % 0,026 B, % 0,05 Cu, % 0,05 Mn, % 0,006 Mo, distile su içinde çözülerek otoklav edildikten sonra (121°C, 20 dakika) son konsantrasyonu % 0,005 olacak şekilde minimal agar besi yerine ilave edilir. (Llarch et al., 1997).

**Triptik Soy Broth:** % 3 Tryptic soy broth, % 0,7 NaCl, % 0,036 Tris

Distile su içerisinde çözülerek 1000 ml'ye tamamlanır. 121 °C'ta 40 dakika otoklav edilerek steril edilir (Sneath, 1986).

**Triptik Soy Agar:** % 3 Tryptik soy broth, % 0,7 NaCl, % 0,036 Tris, % 1,5 agar. Distile su içerisinde çözülerek 1000 ml'ye tamamlanır. 121 °C'ta 40 dakika otoklav edilerek steril edilir (Sneath, 1986).

**LB Broth Besi Yeri:** % 1 Nutrient broth, % 0,5 Yeast extract, % 0,8 NaCl, % 0,052 Tris. Distile su içerisinde çözülerek 1litreye tamamlanır. Otoklavda 121 °C'ta 40 dakika sterilize edilir.

**LB Agar Besi Yeri:** % 1 Nutrient broth, % 0,5 Yeast extract, % 0,8 NaCl, % 1,5 agar.  
Distile su içerisinde çözülür ve.

**Horikoshi -I Besi Yeri:** % 1glukoz, % 0.5 peptone, % 0.5 Maya özütü, % 0.1 potasyum dihidrojen monofosfat, % 0.02 magnezyumsülfat pentahidrat, % 1 sodyum karbonat.  
Distile su içerisinde çözülür ve 121 °C'ta 40 dakika sterilize edilir

## 2.2. Yöntemler

### 2.2.1. Örneklerin Toplanması

Toprak ve su örnekleri Afyon, Bursa, Balıkesir yörelerindeki sıcak su kaynakları ve Yalova yöresindeki bir mantar çiftliği ile Edremit yöresindeki bir zeytinyağı işletmesinden alınmıştır. Su örnekleri önceden steril edilmiş kapaklı şişelere, toprak örnekleri ise temiz plastik kaşık kullanılarak kilitli torbalara alınmıştır. Örnekler toplanırken, örnek kaynağının sıcaklığı ve pH'sı gibi değişkenler kaydedilmiştir. Örneklerin alındığı kaynakların yerleri ve özellikleri çizelge 2.2.1.'de gösterilmiştir.

**Tablo 2.1.** Toprak ve Su Örneklerinin Yeri ve Özellikleri

| Örnek Kodu    | Alındığı yer                 | Örnek Tipi        | Sıcaklık (°C) | pH    |
|---------------|------------------------------|-------------------|---------------|-------|
| <b>T1</b>     | Yalova Mantar Çiftliği       | Sarılmış Kompost  |               |       |
| <b>T2</b>     | Afyon Heybeli Kaplıcası      | Toprak            | 48            | 9     |
| <b>T7</b>     | Afyon Gecek Kaplıcası        | Toprak            | 15            | 8     |
| <b>T8</b>     | Afyon Gecek Kaplıcası        | Toprak            | 26            |       |
| <b>T10</b>    | Afyon Gecek Kaplıcası        | Toprak            | 48            | 8     |
| <b>T11</b>    | Afyon Ömer Kaplıcası         | Toprak            | 55            |       |
| <b>T12</b>    | Bursa Kara Mustafa Kaplıcası | Tortu             |               |       |
| <b>T13</b>    | Afyon Ömer Kaplıcası         | Toprak            | 15(Ortam)     |       |
| <b>T14</b>    | Afyon Ömer Kaplıcası         | Toprak            | 80            |       |
| <b>T16</b>    | Gönen Dağ Ilıcası            | Toprak            | 40            |       |
| <b>T17</b>    | Yalova Mantar Çiftliği       | Torf              |               |       |
| <b>S1</b>     | Manyas Serpin Kaplıcası      | Su                | 53            | 7     |
| <b>S2</b>     | Gönen Dağ Ilıcası-1          | Su                | 43            | 7     |
| <b>S3</b>     | Gönen Dağ Ilıcası-2          | Su                | 43            | 8     |
| <b>S5</b>     | Gönen Dağ Ilıcası-Acı su     | Su                |               | 5     |
| <b>S6</b>     | Gönen Yıldız Otel- G10       | Su                | 75            | 7     |
| <b>S7</b>     | Gönen Yıldız Otel-G7         | Su                | 58            | 7     |
| <b>S9</b>     | Bursa Askeri Hastanesi       | Su                | 45.2          | 7     |
| <b>S10</b>    | Bursa Yeni Kaplıca           | Su                | 81            | 8     |
| <b>S12</b>    | Bursa Karamustafa Kaplıcası  | Su                | 63            | 7     |
| <b>A1</b>     | Afyon Heybeli Kaplıcası      | Su                | 58            | 8     |
| <b>A2</b>     | Afyon Gazlıgöl Kaplıcası     | Su                | 65            | 7,5-8 |
| <b>A3</b>     | Afyon Gazlıgöl Kaplıcası     | Su                | 69            | 8     |
| <b>A4</b>     | Afyon Gazlıgöl Kaplıcası     | Su                | 29            |       |
| <b>A5</b>     | Afyon Oruçoğlu Kaplıcası     | Su                |               |       |
| <b>A9</b>     | Afyon Gecek Kaplıcası        | Su                | 96            | 9     |
| <b>A12</b>    | Afyon Ömer Kaplıcası         | Su                | 104           |       |
| <b>A15</b>    | Afyon İkbāl Kaplıcası        | Su                | 43            | 7     |
| <b>A16</b>    | Afyon Çay Ilıcası            | Su                | 38            | 7     |
| <b>KARA</b>   | Edremit Zeytin İşletmesi     | Karasu            |               |       |
| <b>PİRİNA</b> | Edremit Zeytin İşletmesi     | Pirina            |               |       |
| <b>TERE</b>   | Tereyağı                     | Bozulmuş tereyağı |               |       |

## 2.2.2. Primer İzolasyon

### 2.2.2.1. Su Örnekleri

Primer izolasyon için 1 ml su örneği steril cam pipet kullanılarak 5 ml Nutrient Broth (NB) içine eklenmiş ve elle karıştırılmıştır. Her bir örnek için pastörize (P) ve non-pastörize (NP) olmak üzere ikişer tüp hazırlanmıştır. Pastörize edilecek örnek (P) tüpleri, endospor oluşturabilen *Bacillus* soylarını öne çıkarmak üzere, 80 °C su banyosunda 15 dakika inkübe edilmiş, NP tüplerine böyle bir işlem uygulanmamıştır. Daha sonra tüpler, 30 °C'ta 170 rpm'de çalkalanarak inkübasyona bırakılmıştır. Üreme gözlenen örneklerden 100'er µl alınarak iki adet pH 7 ve iki adet pH 10 Nutrient Agar (NA) içeren katı besi yerlerine cam baget ile yayılarak ekilmiş, paralel petri kapları 30 ve 55 °C'ta inkübasyona bırakılmıştır. Üreme gözlenen petri kaplarındaki kolonilerden, birbirinden farklı koloni morfolojisi gösterenler; saflaştırıldıktan sonra geldikleri katı besi yerinin pH'sına uygun şekilde hazırlanan ve NB içeren eğik jelozlara aktarılarak +4 °C'ta saklanmıştır.

Su örneklerinden NB ile yapılan primer izolasyondan elde edilen izolatların sayısı az bulunduğu için NB yerine, minimal besi yeri (MN), Horikoshi-I besi yeri (AL) (Horikoshi 1995, Horikoshi 1996) ve Tryptik Soy Broth (TSB) kullanılarak, pastörizasyon yapılmaksızın ikinci bir primer izolasyon yapılmıştır. 5 ml sıvı besi yerine 1 ml su örneği eklenerek MN besi yerine ekilenler 30, 45 ve 70 °C'ta, AL besi yerine ekilenler 30 ve 45 °C'ta, TSB besi yerine ekilenler 30 ve 70 °C'ta inkübe edilmiştir. Üreme gözlenen tüplerden 100'er µl, örneğin geldiği sıvı besi yerinin agar katılarak hazırlanan katı formunu içeren petri kaplarına cam baget kullanılarak yayılmış ve geldikleri sıcaklıklarda (agar eridiği için 70 °C'tan gelenler 55 °C'ta) inkübe edilmiştir. Farklı koloni morfolojisine sahip tek kolonilerden yapılan Gram boyama ve mikroskopik incelemenin ardından Gram pozitif oldukları görülen koloniler saflaştırılmış ve aynı katı besi yerini içeren eğik jelozlara aktarılarak, +4 °C'ta saklanmıştır.

### 2.2.2.2. Toprak Örnekleri

Toprak örneklerinden primer izolasyon için, pastörizasyon işleminin sıcaklık ve etanol çözeltisi uygulamalarından hangisi ile gerçekleştirilmesinin uygun olacağını belirlemek üzere T1 ve T2 örnekleriyle bir ön çalışma yapılmıştır. Sıcaklık ile

pastörizasyon işlemi için 4 g toprak örneği 20 ml steril saf su içine eklenerek 80 °C su banyosunda 20 dakika inkübe edilmiştir. Etanol ile pastörizasyon işlemi için 4 g toprak örneği 20 ml % 50 etanol çözeltisi içine eklenerek, 1 saat boyunca 150 rpm'de çalkalanmıştır. Pastörizasyon işlemlerinin ardından, etanol ve sıcaklıkla pastörize edilen örneklerin  $10^{-1}$  ve  $10^{-3}$  dilüsyonlarından 100'er µl, ikiye adet pH 7 ve pH 10 L-Agar içeren katı besi yerlerine yayılarak, bir seti 30 °C'ta ve diğer seti 55 °C'ta inkübe edilmiştir. Katı besi yerlerinde üreyen kolonilerin sayısı ve Gram boyama sonrası yapılan mikroskopik inceleme sonucunda; diğer toprak örneklerinden yapılacak primer izolasyon için pastörizasyonu işleminin sıcaklık eliyle yapılmasına karar verilmiştir. Üreme gözlenen petrilere farklı koloni morfolojisine sahip izolatlardan, mikroskopik inceleme ile Gram pozitif olduklarına karar verilenler saflaştırılmış ve eğik jelozlara aktararak +4 °C'ta saklanmıştır.

### **2.2.3. Alkalen Proteaz Üreticisi Yerel *Bacillus* Soylarının Seçilmesi**

Eğik jelozlarda +4 °C'ta saklanan izolatlar, arkasında 1'den 200'e kadar numaralandırılmış gril olan petrilere, steril edilmiş kürdanlar aracılığı ile ekilmiştir. Gece boyu 30 °C'ta inkübasyonun ardından petrilere büyüyen her bir soy, % 6 süt tozu içeren pH 7 ve pH 10 Nutrient Agar alkalen proteaz seçici besi yerlerine (SM) petri başına dokuz koloni düşecek şekilde ve yine steril kürdan kullanılarak ekilmiştir. 30 °C'ta 24. ve 48. saatlerin sonunda, kolonilerin çevresinde, süt tozundaki kazeinin hidrolizi sonucu oluşan şeffaf bölgenin çapı değerlendirilerek, izolatların enzim üretkenlikleri belirlenmiştir. SM seçici besi yerinde verdikleri şeffaf bölgenin çapının büyüklüğü ile öne çıkan izolatlar arasından, koloni çapı ile şeffaf bölge çapının oranı ile primer izolasyonun yapıldığı sıcaklık ve pH değişkenleri göz önünde bulundurularak seçilen soylar, tür düzeyinde ön tiplendirme çalışmalarına alınmıştır.

### **2.2.4. Alkalen Proteaz Üreticisi Yerel *Bacillus* Soylarının Ön Tiplendirilmesi**

Tür düzeyinde ön tiplendirmeye alınan soylar tekrar saflaştırılmış, bu amaçla NA petrilere öze ile en az iki kere tek koloni düşürülecek şekilde pasajlanmış ve mikroskopik incelemenin ardından saf olduğuna karar verilen ve Gram pozitif, spor oluşturan soylar ön tiplendirme çalışmalarına alınmıştır. Saflaştırılan soylarda koloni

morfolojisi, Gram boyama, hareket, endosporun şekli, yeri ve şişkinliği gibi morfolojik özellikleri gözetilerek incelenmiş ve TSI (Tri-sugar Iron) reaksiyonu, VP (Voges-Proskauer) reaksiyonu, kanlı agarda hemoliz, katalaz üretimi, nitrat indirgenmesi, jelatin, nişasta ve kazein hidrolizi, indol yapımı (triptofan hidrolizi), üreaz enzimi varlığı, sitratı tek karbon kaynağı olarak kullanabilme, anaerob koşullarda üreyebilme, 10 U penisiline direnç, 30 ve 55 °C'ta üreyebilme, % 7 NaCl içeren NB'de üreyebilme gibi biyokimyasal özellikleri ile birlikte değerlendirilerek, benzeştiği tür(ler) belirlenmiştir.

### **İzole Edilen Bacillus Soylarının Manuel Tiplendirmesinde Kullanılan Testler**

#### ***1. Gram Testi***

Gram boyamada lam üzerine fikse edilmiş hücrelere öncelikle kristal moru boyası uygulanır. Daha sonra lugol çözelti damlatılır. Bir sonraki adımda boya etanol ya da aseton gibi bir çözücü ile yıkanır ve hücreler sulu fuksin ile boyanır. Gram pozitif bakterilerin etanol uygulaması adımı kristal morunu bırakmayıp, mikroskop altında mor renkte gözükmelerine karşın, Gram negatif bakteriler etanol adımı kristal morunu kaybederek sulu fuksinin rengi olan kırmızı-pembe renkte gözüktür. Gram pozitif bakterilerin etanol ile renksizleştirme adımı kristal morunu bırakmamaları; hücre duvarlarının Gram negatiflere göre daha kalın peptidoglikan tabakasına sahip olmalarıyla açıklanmaktadır. Gram negatiflerin hücre duvarlarındaki peptidoglikan tabakası daha ince olduğu için renksizleştirme adımı kristal morunu bırakır ve zıt boya ile (sulu fuksin) boyanarak kırmızı rengi alır (Lim, 1998).

#### ***2. Koloni Morfolojisi***

Saf kültürden Nutrient Agar petrilere aktarılıp 24–72 saat 35 °C'ta inkübe edilen kültürlerin koloni rengi, büyüklüğü, kıvamı, görünüşü ve büyüme zamanı gibi özellikleri kaydedilir.

#### ***3. Endospor Şekli, Yeri ve Şişkinliği***

Gram boyama analizi sırasında endospor yeri, şişkinliği ve şekli kaydedilir. Çok az ya da hiç endospor oluşturmeyen soylar sporulasyon besisi yerine inoküle edilerek spor oluşumu sağlanır.

#### ***4. Hareket Testi***

Bakterilerin tiplendirmesinde önemli bir özellik olan hareketin belirlenmesi için SIM (sülfür indole motility) ya da MIO (motility indole ornithine) yarı-katı besiyerine tel öze

ile aşılama yapılır. Üreme sadece inokülasyon çizgisinde kalmışsa bakteri hareketsiz, büyüme ekim çizgisinin dışına taşmışsa bakteri hareketli demektir.

### **5. TSI (Three Sugar Iron) Testi**

TSI testi ile bakterinin minimal besiyerinde bulunan spesifik karbohidrat (glukoz, laktoz, sükroz) kullanımı, gaz üretimi ve hidrojen sülfür üretimi bilgileri edinilir. Tel öze ile bakteri önce eğik besi yeri yüzeyine, daha sonra da tel öze besiyerine batırılarak aşılama yapılır. Besiyerinin altı sarı, eğik kısmı kırmızı olduğunda sadece glukoz fermente edilmektedir. Her ikisi sarı olduğunda glukozla birlikte laktoz ve/veya sükroz fermente ediliyor, demektir. Hem alt hem de üst kırmızı kaldığında, bu üç karbonhidratın fermente edilmediği anlaşılır. Hidrojen sülfür oluşumunda besiyerinin dibinde siyah bir çökelti oluşumu görülür.

### **6. V-P (Vogues-Proskauer) Testi**

Glukoz fermantasyonu sırasında oluşan piruvik asitin bir ürünü olan asetilmetilkarbinolün (aktoin) saptanması için yapılır. MR/VP (Methyl Red/Vogues-Proskauer) besiyerine aşılaman saf kültürler 35 °C'ta 24 saat inkübe edildikten sonra besiyerine 0,6 ml  $\alpha$ -naftol ve 0,2 ml % 40'luk potasyum hidroksit çözeltisi eklenerek 15 dakika beklenir. Kırmızı renk oluşumu VP pozitif sonucunu gösterir.

### **7. Kanlı Agarda Hemoliz**

Saf kültürden alınan örnek öze ile kanlı agar üzerine aşılanarak 35 °C'ta 24-48 saat inkübe edilir. Koloni çevresindeki hemolizin tipine göre sonuç belirlenir. Bazı bakteriler ürettikleri enzimlerle kırmızı kan hücrelerini parçalayarak koloni çevresinde tamamen renksiz bir alan oluşturur ( $\beta$ -hemoliz), bazıları ise koloni çevresinde kısmi bir parçalama ile sarımsı bir renk oluşturur ( $\alpha$ - hemoliz). Diğer bazı bakteriler ise kırmızı kan hücrelerini parçalayamazlar ( $\gamma$ - hemoliz).

### **8. Katalaz Üretimi**

Bazı bakteriler kendileri için toksik olan hidrojen peroksiti su ve oksijene parçalayan katalaz enzimini üretirler. Bunu belirlemek için katı besi yerinde büyütülmüş koloniler üzerine birkaç damla % 3'lük hidrojen peroksit çözeltisi damlatılır. Köpüklenmenin oluşması katalaz pozitif sonucu gösterir.

### **9. Nitrat İndirgenmesi**

Denitrifikasyon yapan bir bakteri nitrat redükdaz enzimi ile nitrata nitrite ve/veya

nitriti nitrojene indirgeyebilir. 24-48 saat boyunca potasyum nitrat ( $\text{KNO}_3$ ) içeren besiyerinde büyütülen kültürün üstüne sülfanilik asit ve  $\alpha$ - naftalamine eklenir. Kırmızı renk oluşması nitritin varlığını ve bakterinin nitratı nitrite indirgeyebildiğini gösterir. Hiçbir rengin oluşmaması durumunda bakterinin nitratı mı indirgeyemediğini yoksa nitriti nitrojene mi indirgediğini belirlemek üzere besiyerine az miktarda toz çinko eklenir. Eğer renk kırmızıya dönüşüyorsa ortamda hala nitrat var demektir ve sonuç negatiftir. Eğer renk kırmızıya dönüşmüyorsa nitrit nitrojene kadar indirgenmiş demektir ve sonuç pozitifdir.

#### **10. Nişasta Hidrolizi**

Saf kültürden alınan örnekler % 1 nişasta içeren katı besi yerinde 35 °C'ta 24-48 saat inkübe edilir. Daha sonra lügol çözeltisi bir sprey yardımıyla agarın üzerine püskürtülür. Nişasta hidrolizi kolonilerin çevresinde oluşan sarımsı renkteki bölgelerin varlığı ile anlaşılır.

#### **11. Kazein Hidrolizi**

Saf kültürden alınan örnekler % 6 süttezu içeren Nutrient Agar katı besi yerlerine nokta inokülasyonu ile ekilir. 30 °C'ta 24-48 saat inkübasyonun ardından kolonilerin çevresindeki açık zon oluşumu kazein hidrolizini gösterir.

#### **12. Triptofan Hidrolizi (İndol Yapımı)**

Bu test, triptofan aminoasitinin triptofanaz enzimi ile indol, piruvat ve amonyağa parçalandığını gösterir. Triptofan besi yerinde 35 °C'ta 24-48 saat inkübe edilen kültür üzerine Kovac's çözeltisi damlatılır. Tüpün üst kısmında kırmızı bir hale oluşumu pozitif sonucu gösterir.

#### **13. Üreaz Sentezi**

Bakterilerin üreyi, üreaz enzimi ile parçalayıp parçalamadığını öğrenmek için yapılır. Saf kültürden alınan örnek öze ile üre besiyerine inoküle edilerek 35 °C'ta inkübe edilir. Besiyeri renginin kırmızıya dönmesi pozitif sonucu gösterir.

#### **14. Sitrata Tek Karbon Kaynağı Olarak Kullanabilme**

Bakterinin tek karbon kaynağı olarak sitratı kullanıp kullanamadığını görmek için yapılır. Saf kültürden alınan örnek öze ile Simmons sitrat agar katı besiyerine inoküle edilerek 35 °C'ta 24-48 saat inkübe edilir. Besiyeri renginin yeşilden maviye dönmesi pozitif sonucu gösterir.

### **15. Anaerob Koşullarda Üreyebilme**

Saf kültürden alınan örnek öze ile Nutrient Agar katı besiyerine inoküle edilir ve “Anaerob Poşet Sistemi” içine yerleştirilerek 35 °C’ta 72 saat inkübe edilir. Üreme gözlenmesi bakterinin anaerob olduğunu gösterir.

### **16. Jelatin Hidrolizi**

Jelatin içeren besi yerine saf kültürden alınan örnekler tel öze ile inoküle edilerek 35 °C’ta 24–52 saat inkübe edilir. Daha sonra tüpler buzdolabında 15–30 dakika bekletildikten sonra jelatin katılaşmış ise sonuç negatif, katılaşmamış ise sonuç pozitif olarak kaydedilir.

### **17. 10 U penisiline direnç**

Saf kültürden alınan örnek Nutrient Agar katı besi yerine yayılır ve inokülasyon bölgesinin ortasına bir penisilin diski yerleştirilerek 35 °C’ta 24–48 saat inkübe edilir. Disk çevresinde inhibisyon bölgesinin varlığı bakterinin penisiline dirençli olmadığını gösterir.

### **18. 35 °C ve 50 °C’ta Üreyebilme**

Saf kültürden alınan örnekler Nutrient Agar katı besiyerlerine inoküle edilir ve 5 gün boyunca belirtilen sıcaklıklarda inkübe edilir. Petrilerde üreme olup olmadığı kaydedilir (Sneath, 1986).

### **19. % 7 NaCl içeren Nutrient Broth’da Üreme**

Saf kültürden alınan örnekler % 7 NaCl içeren besi yerlerine inoküle edilerek 35 °C’ta 7–12 gün inkübe edilir ve üreme olup olmadığı izlenir.

## **2.2.5. API ve VITEK Sistemleri ile Tiplendirme Çalışmaları**

Sıvı kültür çalışmalarına alınan soyların manüel tiplendirme çalışmaları sonucunda verilen tür isimlerinin irdelenmesi amacıyla Biomerieux şirketi tarafından *Bacillus* türlerini tanımlamak için üretilen “API 50 CHB/ E” ve “VITEK Bac” kitleri kullanılmıştır.

## **2.2.6. - 20 °C ve - 80 °C Hücre Stoklarının Hazırlanması**

Saflaştırılan soyları koruma altına almak üzere -20 ve -80 °C stokları hazırlanmıştır. Stok hazırlanması için soylar +4 °C’ta saklandıkları eğik jelozlardan öze ile 2 ml LB içine ekilmiş ve 37 °C’ta 170 rpm’de çalkalanarak inkübe edilmiştir. Üreme görülen

örneklerden -20 °C stokları için 325 µl hücre kültürü ve -80 °C stokları için 625 µl hücre kültürü alınarak steril % 80 gliserol çözeltisi ile 1000 µl'ye tamamlanmış ve iyice karıştırıldıktan sonra belirtilen sıcaklıklardaki derin donduruculara kaldırılmıştır.

### **2.2.7. Saflaştırılan Soyların Hücre Dışı Alkalen Proteaz Aktivitelerinin Sıvı Kültürlerde Çalışılması ve Enzim Üretiminin Optimizasyonu**

Saflaştırılıp ön tiplendirilmesi yapılan soyların enzimatik aktivitelerinde kayıp olup olmadığını kontrol etmek üzere +4 °C'ta saklanan eğik jeloz stoklarından pH 7 ve pH 10 SM seçici besi yerine nokta ekimleri; iğne öze ile yapılmıştır. Seçici besi yerinde görülen şeffaf bölge çapları ve koloni çapları kaydedilmiştir. SM seçici besi yerinde verdikleri şeffaf bölge çapına göre enzim üretkenliği yönünden öne çıkan saflaştırılmış soylar 10 ml'lik vida kapaklı tüplerde bulunan sıvı besi yerlerinde büyütülmüştür. Hücre dışı enzim aktivitesini belirlemek üzere çalışmaya alınan soylar, -20 °C stoklarından final kültür hacminin % 1'i kadar kültür eklenerek aşılınmış ve 37 °C'ta 170 rpm'de çalkalanarak inkübe edilmiştir. Soyların sıvı kültürdeki alkalen proteaz üretkenliği, % 4 jelatin içeren NB besi yerinde (Kanekar et. al., 2002; Lawler et. al., 1999) incelenmiş, 24. ve 48. saatlerindeki hücre yoğunluğu ( $A_{600}$ ) ve hücre kültürü üst sıvısındaki alkalen proteaz aktivitesi ( $A_{660}$ ) değerleri ölçülerek değerlendirilmiştir.

Küçük hacim sıvı kültür çalışmalarındaki enzim üretkenliği ile öne çıkan soylar (P17, P19, P20, P21, P22, L1, L10, L13, L16) daha büyük hacimli sıvı kültürlerle alınmıştır. Büyük hacimde yine % 4 jelatin içeren NB sıvı besi yeri kullanılmıştır. Önkültürler, -20 °C stoklarının 20 µl'si ile aşılınan 2 ml LB besi yerinde gece boyu 37 °C'ta 170 rpm'de çalkalanarak büyütülmüştür. Ana kültür, final besi yeri hacminin, % 1'i oranında ön kültür ile aşılınmış ve aynı koşullarda inkübe edilmiştir. İnkübasyon, kültür hacminin 5 katı büyüklüğündeki flasklarda gerçekleştirilmiştir. Kültür başlangıcından itibaren 56. saate değin 4 saatte bir, 56. saat ile 168. saat arasında 24 saatte bir ve sadece L1 soyu için 192. ve 216. saatlerde birer örnek alınarak hücre yoğunluğu ( $A_{600}$ ) ve alkalen proteaz aktivitesi ( $A_{660}$ ) değerleri ölçülmüştür.

### **2.2.8. Hücre Yoğunluğunun Ölçülmesi**

Hücre yoğunluğunun ölçülmesi için kültür sıvısından steril koşullarda yeterli miktarda örnek alınmış ve gerektiğinde uygun besi yeri ile yeterli oranda seyreltme

yapıldıktan sonra  $A_{600}$  değerleri spektrofotometrede ölçülmüştür.

### 2.2.9. Üst Sıvıda Alkalen Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Enzim aktivitesinin ölçülmesi için, steril koşullarda alınan 1200  $\mu$ l kültür örneği eppendorf tüplerine alınarak 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra, üst sıvının 500  $\mu$ l'si aktivite testi çalışmalarında kullanılmış ve geriye kalan üst sıvı +4 °C'ta saklanmıştır.

#### 2.2.9.1. Alkalen Proteaz Aktivite Testi

Glisin Tamponu: 50 mM Glisin, 50 mM NaCl, 50 mM NaOH, pH 10,5

TCA Solüsyonu: 0,11 M TCA, 0,22 M Sodyum Asetat, 0,33 M Asetik Asit

Substrat Solüsyonu: Glisin tamponu içinde çözünmüş % 6 Hamerstein Azokazein

- 500  $\mu$ l üst sıvı temiz cam tüplere alınarak üstüne 2,5 ml substrat eklenir ve vorteks kullanılarak iyice karıştırılır.
- 30 °C su banyosunda 20 dakika inkübe edilir.
- 2,5 ml TCA çözeltisi eklenir ve vorteksle iyice karıştırıldıktan sonra 30 °C su banyosunda 30 dakika inkübe edilir.
- Kaba filtre kağıdı kullanılarak temiz cam tüplere süzülür.
- Filtratın 500  $\mu$ l'si başka bir temiz cam tüpe aktarılır ve 2,5 ml 0.5 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  eklenerek vorteksle iyice karıştırılır.
- 500  $\mu$ l 1:2 seyreltilmiş Folin's çözeltisi eklenir ve vorteksle hafifçe karıştırılır.
- Oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildikten sonra spektrofotometrede  $A_{660}$  değeri ölçülür.

#### 2.2.9.2. Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması

- Glisin-NaOH, pH 10,5 içinde çözünmüş L-tirozin, kalibrasyon eğrisinin hazırlanmasında standart olarak kullanılır.
- 50  $\mu$ g/ml L-tirozin çözeltisi hazırlanır ve Tablo 2.2.'ye göre iki set halinde artan L-tirozin dilüsyonları hazırlanır.

**Tablo 2.2.** Kalibrasyon eğrisi için artan L-tirozin dilüsyonlarının hazırlanması.

| Tüp No                 | Kör  | 1   | 2   | 3   | 4   | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   |      |
|------------------------|------|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|
| 50 µg/ml L-tirozin     | (µl) | -   | 50  | 100 | 150 | 200  | 250  | 300  | 350  | 400  | 450  | 500  |
| Glisin tamponu         | (µl) | 500 | 450 | 400 | 350 | 300  | 250  | 200  | 150  | 100  | 50   | -    |
| Final L-trozin miktarı | (µg) | 0   | 2,5 | 5,0 | 7,5 | 10,0 | 12,5 | 15,0 | 17,5 | 20,0 | 22,5 | 25,0 |

- 2,5 ml 0.5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> eklenir ve iyice vorteksle karıştırılır.
- 500 µl 1:2 seyreltilmiş Folin's Reagent eklenerek hafifçe vorteksle karıştırılır.
- Oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildikten sonra spektrofotometrede A<sub>660</sub> değeri ölçülür.
- Her iki setin A<sub>660</sub> değerlerinin ortalaması alınarak final L-tirozin miktarlarına karşı gelen ortalama A<sub>660</sub> değerleri ile hazırlanan grafikten elde edilen eğim enzim aktivitesinin hesaplanmasında kullanılır.

### 2.2.9.3. Enzim Aktivitesinin Hesaplanması

1 dakika'da 1 µmol Tirozin oluşturan enzim miktarı 1 Ünite enzim olarak tanımlanır.

Reaksiyon Hacmi = 3 ml

Enzim hacmi = 0,5 ml

Reaksiyon süresi = 20 dakika

MA<sub>Tirozin</sub> = 181,2 g/ mol

$$\text{Aktivite} = \frac{\frac{A_{660}}{\text{Eğim}} \times \frac{1000}{MA_{Tirozin}} \times \text{Reaksiyon Hacmi (ml)}}{\text{Enzim Hacmi (ml)} \times \text{Reaksiyon Süresi (dakika)}}$$

### 2.2.10. Enzim Ön Nitelendirme Çalışmaları

Yapılan çalışmalar sonucunda enzim üretkenliği bakımından öne çıktığı belirlenen soylardan L13 tarafından üretilen alkale proteaz enzimi ön nitelendirme çalışmalarına alınmıştır. L13 soyu 100 ml % 1 jelatin içeren NB besiyerine, -20 °C stoklarından

inoküle edilerek gece boyu büyütülen ön kültürden aşılınmış ve kültürün 64. saatinde 10000 rpm’de 20 dakika santrifüj edilerek, üst sıvısı toplanmıştır.

### ***Kültür Üst sıvısının Konsantre Edilmesi***

Kültür üst sıvısının 50 ml’si amonyum sülfat çöktürmesi yapılarak konsantre edilmiştir. 32,9 g amonyum sülfat (final konsantrasyonu % 90) +4 °C’taki kültür üst sıvısına yavaş yavaş eklenerek 2 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Daha sonra çözelti 10000 rpm’de 20 dakika santrifüj edilmiş, üst sıvı başka bir kaba aktarılmıştır. Çökelti 2250 µl 50 mM pH 7,5 potasyum fosfat tamponu ile çözülmüş ve diyaliz membranına aktararak, +4 °C’ta aynı tampona karşı gece boyu diyaliz edilmiştir. Diyaliz sonrası hacmi ölçülen enzim, nitelendirme çalışmalarında kullanılmak üzere +4 °C’ta saklanmıştır.

### ***Optimal Sıcaklık ve Sıcaklık Kararlılığının Belirlenmesi***

Kültür üst sıvısından % 90 amonyum sülfat çöktürmesi ile konsantre edilen enzim örneği, optimal sıcaklık ve sıcaklık kararlılığı çalışmalarında kullanılmıştır. Diyaliz tüpünden alınan enzim çözeltisi 50 mM pH 7,5 potasyum fosfat tamponu ile 1:5 oranında seyreltilerek, ön nitelendirme çalışmalarına alınmıştır. Elde edilen enzim çözeltisi için aktivite testi modifiye edilerek uygulanmıştır. Kim et. al.. (2003)’te belirtildiği üzere 20 µl enzim solüsyonu 125 µl glisin tamponu (pH 10,5) içinde çözülmüş % 6 azokazein çözeltisi içine eklenmiş ve istenilen sıcaklıkta 20 dakika inkübe edildikten sonra reaksiyonu durdurmak üzere 125 µl TCA solüsyonu eklenmiş ve 30 °C’ta 30 dakika daha inkübe edilmiştir. Tüpler 13000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek üst sıvının 200 µl’si temiz tüplere aktarılmış ve üzerine 1000 µl 0.5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ve 200 µl 1 :2 seyreltilmiş Folin’s Reagent eklenerek, oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrası A<sub>660</sub> değerleri spektrofotometrede ölçülerek kaydedilmiştir. Sıcaklık kararlılığı ve optimal sıcaklık testlerinde örnekler ikiye set halinde çalışılmıştır.

Optimal sıcaklık ve sıcaklık kararlılığı çalışmalarında ikiye set enzim örneğinde 25–75 °C arasındaki enzim aktivite değerleri incelenmiştir. Optimal sıcaklık değerinin belirlenmesi için enzim solüsyonu üzerine azokazein çözeltisi eklenmiş, istenilen sıcaklıkta inkübe edildikten sonra, 30 °C’taki aktivite değerine göreceli aktivite değerleri

belirlenmiştir. Sıcaklık kararlılığı için tüp içine konulan enzim örneği istenilen sıcaklıkta 10 dakika inkübe edildikten sonra azokazein çözeltisi eklenerek standart koşullarda 30 °C'ta kalan enzim aktivitesi belirlenmiştir.

### ***Optimal pH ve pH Kararlılığının Belirlenmesi***

Optimal pH ve pH kararlılığı çalışmalarında pH 5,5–12,0 aralığındaki enzim aktivitesi değerleri ölçülmüştür. pH 5.5- 9.0 aralığı için 100 mM potasyum fosfat tamponu, pH 9.5- 12.0 arası için 100 mM glisin tamponu kullanılmıştır. Optimal pH çalışması için iki set halinde hazırlanan tüplere 20 µl enzim çözeltisi konularak üzerine belirtilen değişik pH'lardaki tamponlar içinde çözünmüş % 6'luk azokazein çözeltisi eklenmiş ve standart koşullarda relatif aktivite değerleri belirlenmiştir. pH kararlılığı çalışmalarında enzim çözeltisi istenilen pH'daki tampon ile 1 :5 oranında seyreltilerek +4 °C'ta gece boyu inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından geri kalan aktivite değerleri standart koşullarda belirlenmiştir.

## **2.2.11. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroföresi (SDS-PAGE) ve Zimogram**

Bir karışım içindeki proteinlerin moleküler ağırlıkları temelinde ayrılmasına olanak sağlayan SDS-PAGE, zimogram çalışması yapılacağından, modifiye edilerek uygulanmıştır.

### ***2.2.11.1. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroföresi***

Derişim jeli ve ayırma jeli hazırlandıktan sonra 25 µl kültür üst sıvısına ve konsantre edilmiş enzim çözeltisi üzerine 10 µl örnek tampon eklenerek oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. Moleküler ağırlık belirteçleri için 10 µl protein belirteç çözeltisine 15 µl örnek tamponu eklenerek oda sıcaklığında on dakika bekletilmiştir. Örnekler jele yüklendip derişim jeline 100 V'ta, ayırma jeline geçtikten sonra 200 V'ta yürütüldükten sonra jel boyama çözeltisinde hafifçe çalkanarak boyanmıştır. Ardından, jel boya arıtma çözeltisi içine alınmıştır.

**SDS-PAGE için jellerin hazırlanması**

| <u>Derişim Jeli (Üst Jel)</u>              | <u>Ayırma Jeli (Alt Jel) % 12 Akrilamid</u> |
|--------------------------------------------|---------------------------------------------|
| 1050 µl dH <sub>2</sub> O                  | 750 µl dH <sub>2</sub> O                    |
| 1500 µl 0,25M Tris HCl, pH 6.8 + % 0.2 SDS | 3750 µl 0,75M Tris HCl, pH 8.8 + % 0.2 SDS  |
| 390 µl Akrilamid:Bisakrilamid (30:1)       | 3 ml Akrilamid:Bisakrilamid (30:1)          |
| 60 µl %10 APS                              | 90 µl %10 APS                               |
| 3 µl TEMED                                 | 6 µl TEMED                                  |

**2.2.11.2. Jelatin Zimogram Analizi**

Proteolitik aktivitenin hangi protein bandından kaynaklandığını poliakrilamid jeli üzerinde görebilmek amacıyla zimogram analizi yapılmıştır.

- Ayırma jeline (% 12 akrilamid) konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde jelatin eklenmiştir.
- 20'şer µl üst sıvı ve konsantre enzim çözeltisi 15 µl yükleme tamponu ile karıştırılarak oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiştir.
- Örnekler kuyulara yüklenip, derişim jeline 80 V'ta ve boya jelden çıkana kadar da ayırma jeline 120 V'ta +4 °C'ta yürütülmüştür.
- Daha sonra jel, renatürasyon tamponunda oda sıcaklığında 30 dakika süreyle hafifçe çalkalanarak yıkanmıştır.
- Ardından görüntüleme tamponunda oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir.
- Daha sonra boyama çözeltisi ile boyanan jel arıtma çözeltisi içine alınmıştır.
- Enzimatik aktivitenin olduğu bölgelerde jelatin hidrolizi nedeniyle boyanmayan şeffaf renkli bölgeler incelenmiştir.

### **Kullanılan Çözeltiler**

Örnek Tamponu: 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8; % 20 Gliserol; % 0,04 SDS; % 0,005 Bromofenol Mavisi

Renatürasyon Tamponu: % 2,5 Triton X-100

Geliştirme Tamponu: 50 mM Tris-HCl (pH 8,7), 0,2 M NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, % 0,02 Tween 80.

SDS-PAGE Boyama Çözeltisi: % 0,1 Coomassie Brilliant R250, % 10 asetik asit, % 40 etanol

SDS-PAGE Arıtma Çözeltisi: % 5 asetik asit, %50 etanol

### **2.2.12. Moleküler Tiplendirme için Ön Hazırlıklar**

Manuel tiplendirme ile API ve VITEK sistemleri kullanılarak gerçekleştirilen tiplendirme çalışmaları sonucunda her üç yöntemin üzerinde uzlaşmaya varamadığı P21 soyu ile birlikte enzim üretkenlikleri öne çıkan L10, L13 ve P19 soylarının tür isimlerini netleştirmek amacıyla bu soylar için 16S rDNA dizi analizi için hazırlıklara başlanılmıştır. Bu amaçla, PCR ile 16S rDNA dizisinin amplifikasyonu için kalıp oluşturmak üzere, bu dört soydan genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Üzerinde uzlaşılan bir tür adı önerilemeyen P21 soyuna, 16S rDNA dizi analizi için öncelik tanınmış ve bu soydan izole edilen genomik DNA kalıp olarak kullanılarak 16S rDNA geni, PCR aracılığı ile çoğaltılmıştır.

#### **2.2.12.1. 16S rDNA Dizi Analizi için Genomik DNA İzolasyonu**

Genomik DNA izolasyonu yapılacak soylar (L10, L13, P19, P21) -20 °C stoklarından 50 ml LB içine inoküle edilmiş ve gece boyu inkübasyonun ardında kültür steril ependorf tüplerine dağıtılarak her bir tüpe aşağıdaki işlemler uygulanmıştır.

- Tüpler 7000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir
- Üst sıvı atılır ve tüpler buza alınır
- 567 µl TE (pH 7,5) eklenir pelet çözünene kadar elle iyice karıştırılır.
- 30 µl % 10 luk SDS ve 3 µl Proteinaz K eklenir ve iyice karıştırılır.
- Su banyosunda 37 °C'ta 1 saat inkübe edilir

- 100 µl 5 M NaCl eklenir ve iyice karıştırılır.
- 80 µl CTAB (% 10 cetyltrimethylammoniumbromide (CTAB)+ 0,2 M NaCl) çözeltisi eklenir ve iyice karıştırılır
- 65 °C'ta 10 dakika inkübe edilir.
- 750 µl Kloroform/ izoamil alkol (24:1) eklendikten sonra, ters düz ederek nazikce karıştırılır.
- 13000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilir ve üst faz steril bir ependorf tüpüne alınır.
- 700 µl fenol/ kloroform/ izoamil alkol (25:24:1) eklenir ve ters düz ederek yavaşça karıştırılır.
- 13000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilir ve üst faz steril bir ependorf tüpüne aktarılır.
- 340 µl soğuk izopropanol eklenerek karıştırılır ve 13000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilir.
- Üst sıvı atılır ve pellet 100 µl % 75'lik soğuk etanol çözeltisi ile yıkanır.
- 13000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilir ve üst sıvı atılır.
- Peletler kuruyuncaya kadar (~20 dakika) liyofilize edilir.
- Tüp dibindeki pelet 30 µl dH<sub>2</sub>O ile çözülür ve bütün tüplerdeki DNA çözeltileri tek bir tüpte toplanır. DNA çözeltisinin konsantrasyonunu ve saflığını belirlemek için uygun oranda dH<sub>2</sub>O ile seyreltilen DNA çözeltisinin; 220, 230, 240, 250, 255, 260, 270, 280, 290, 300, 320 nm dalga boyunda absorbansları ölçülür. Konsantrasyonun hesaplanması için "C(µg/ml)=A<sub>260</sub> x 50 x seyreltme oranı" formülü kullanılır. DNA çözeltileri -20 °C'ta saklanır.

### **Genomik DNA İzolasyonunda Kullanılan Tampon ve Çözeltiler**

#### TE (Tris/EDTA) Solusyonu pH 7,5

10 mM Tris-HCl pH 7,5

0,1 mM EDTA, 121 °C'ta 40 dakika otoklav edilerek steril edilir.

#### % 10 SDS Solusyonu (100 ml)

10 gr SDS, distile su içerisinde çözülerek 100 ml'ye tamamlanır. 121 °C'ta 40 dakika otoklav edilerek steril edilir.

### Proteinaz K Solusyonu

DNA izolasyonunda 20 µg/ml oranında Proteinaz K içeren solusyon, kullanılmıştır.

### 5 M NaCl Solusyonu (100 ml)

29,2 gr NaCl distile su içerisinde çözülerek 100 ml'ye tamamlanır. 121 °C'ta 40 dakika otoklav edilerek steril edilir.

### % 10 CTAB (cetyltrimethylammoniumbromide)+0,2 M NaCl (100 ml)

1,17 gr NaCl 80 ml distile su içerisinde çözülür. 10 gr CTAB yavaşça eklenir ve karıştırılarak çözülür. Ya da 65 °C'ta su banyosunda ısıtılarak çözülür. Tamamen çözüldükten sonra distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. 121 °C'ta 40 dakika otoklav edilerek steril edilir.

### Kloroform/İzoamil Alkol Solusyonu (24:1) (250 ml)

240 ml Kloroform, 10 ml İzoamil alkol, karıştırılarak 250 ml Kloroform/ İzoamil alkol solusyonu hazırlanır.

### **Doyurulmuş Fenol Solusyonu**

0,25 gr 8-Hidroksikinolin (final konsantrasyonu % 0,1 olacak şekilde), 250 ml Fenol, 250 ml 1 M Tris-HCl pH 8 karıştırılır. Alüminyum folyo ile sarılır ve oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda düşük hızda 10 dakika karıştırılır. Üst faz atılır ve aynı işleme pH 8 oluncaya kadar devam edilir. 0,5 ml β Merkaptotanol (% 0,2) ilave edilir. Fenolün hava ile etkileşmesini engellemek amacıyla üst fazın bir kısmı bırakılır. Kalan kısmı ise atılır. Koyu renkli şişe içerisinde ya da alüminyum folyoya sarılı normal cam şişe içerisinde 4 °C'ta 2-3 ay saklanabilir.

### Fenol/Kloroform/İzoamil Alkol Solusyonu (25:24:1) (500 ml)

250 ml Doyurulmuş Fenol, 250 ml Kloroform/İzoamil Alkol (24:1) karıştırılarak 500 ml Fenol/Kloroform/İzoamil alkol solusyonu hazırlanır. Karışım 0,1 M Tris-HCl altında koyu renkli şişe içerisinde 4 °C'ta saklanır.

### % 75'lik Etil Alkol Solusyonu (100 ml)

75 ml Etil alkol alınıp distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak % 75'lik etil alkol solusyonu hazırlanır.

### **2.2.12.2. 16S rDNA Genlerinin PCR ile Çoğaltımı**

16S rRNA geni, kendi 5' ve 3' uçlarına özgü ileri ve ters primerler kullanılarak P21 soyundan elde edilen genomik DNA üzerinden PCR aracılığıyla çoğaltılmıştır.

### **Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)**

İlk kez 1985'de bilim dünyasına sunulduğundan bu yana polimeraz zincir reaksiyonu (PCR); moleküler biyolojide yeni bir çıkış açmıştır. Cetus Şirketi (A.B.D.)'de çalışan Henry A. Erlich, Kary Mullis ve Randall K. Saiki tarafından geliştirilmiştir. PCR yöntemi, basitçe çoğaltılması istenilen DNA parçasının; hedef DNA dizisinin 3' ve 5' ucuna özgü iki sentetik primer, dNTPler ve bir DNA polimeraz ile kalıp DNA üzerinden uygun koşullarda çoğaltılması ilkesine dayanır. Bu buluşundan dolayı K.Mullis, 1993 yılı Nobel Kimya Ödülü'ne hak kazanmıştır (Karp,1996; Lim, 1998; Primrose, 2001).

PCR, temel olarak denatürasyon, bağlanma (annealing) ve uzama adı verilen üç adımda gerçekleşmektedir.

- (1) Denatürasyon: Bu adımda reaksiyonun gerçekleştiği ortamın sıcaklığı 92–94 °C'a yükseltilerek kalıp DNA ipliklerinin, denatüre olması sağlanmaktadır. Bu sayede primerlerin kalıp DNA'ya bağlanmasına olanak sağlanır.
- (2) Tutunma (Annealing): Bu adımda ortamın sıcaklığı 45–55 °C'a kadar düşürülerek her iki primerin kalıba rahatlıkla bağlanmalarına olanak verilir.
- (3) Uzama (Extension): Bu adımda sıcaklık 72 °C'a kadar çıkarılır ve polimerazın primerlerin uçlarına dNTP'leri ekleyerek yeni iplikleri oluşturmaya olanak sağlanır.

Bu üç adıma bir PCR döngüsü adı verilir. Her bir döngüde hedef DNA'nın miktarı ikiye katlanarak artar ve yaklaşık 22 döngü sonra başlangıçtaki DNA miktarının  $10^6$  katından fazlası rahatlıkla üretilebilir.

DNA kalıbı (genelde genomik DNA), çoğaltılacak bölgeyi 3' ve 5' ucundan çevreleyen ileri ve geri primerler, dNTPler (dATP, dCTP, dTTP ve dGTP), yüksek sıcaklığa dayanıklı bir polimeraz (genellikle Taq DNA polimeraz) ve uygun pH ve  $Mg^{2+}$

konsantrasyonunu sağlayan bir tampon PCR uygulamasının temel bileşenleridir.

Primerler tasarlanırken aşağıdaki kriterlere dikkat etmek gerekmektedir.

(i) primerler sadece tasarlandığı bölgeye özgün olmalı

(ii) primerin 3' ucunda G yada C nükleotidi bulunmalı

(iii) G/C içeriğı % 45-55 arasında olmalı

(iv) uzunluğı 17-30 nükleotid arasında olmalı

(v) her ikisinin  $T_m$  değerleri birbirlerine olabildiğince yakın ve 45–55 °C arasında olmalıdır.

Kısa oligonükleotidlerin  $T_m$  değerleri hesaplanırken  $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$  formülünden yararlanılabilir.

DNA polimeraz aktivite için  $Mg^{2+}$  iyonuna ihtiyaç duymaktadır. Bunun için kalıp DNA çözeltisinin EDTA gibi kelatlayıcı ajanlar içermemesine dikkat edilmelidir. DNA polimerazın optimum şekilde çalışabilmesi için  $Mg^{2+}$  konsantrasyonun optimize edilmesi gereklidir. Bunun için 10, 20, 30, 40 ve 50 mM  $MgCl_2$  içeren içeren PCR tamponları kullanılarak en verimli amplifikasyonun gerçekleştiğı optimum  $MgCl_2$  konsantrasyonu belirlenmelidir.

### **Protokol**

İleri primer: 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3',  $T_m = 58$  °C

Ters primer: 5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3',  $T_m = 54$  °C

Reaksiyon koşulları aşağıdaki şekilde düzenlenmiştir.

|                   | Hacim (μl) | Final miktar |
|-------------------|------------|--------------|
| Genomik DNA       | 2          | 100 ng       |
| İleri primer      | 2          | 6,25 μmol    |
| Geri primer       | 2          | 6,25 μmol    |
| dNTP              | 4          | 0,2 mM       |
| 10 × PCR tamponu  | 2,5        | 1 ×          |
| Taq polimeraz     | 1          | 0,9 U        |
| dH <sub>2</sub> O |            |              |
| Toplam Hacim      |            | 25 μl        |

Biometra T3 Thermocycler termal döngü cihazı kullanılarak gerçekleştirilen PCR döngüleri 94 °C'ta 4 dakika süren ve *Taq* DNA polimerazın eklenmesinden önce gerçekleştirilen denatürasyon adımı ile başlayıp, 94°C'ta 1 dakika denatürasyon, 49 °C'ta 1 dakika tutunma ve 72 °C'ta 2 dakika uzama basamaklarının 35 kez tekrarından sonra, 72 °C'ta 10 dakika tamamlama reaksiyonu ile sonlandırılmıştır. PCR optimizasyonu için 15, 20, 30, 40 ve 50 mM MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonları ve tutunma sıcaklığı için de 49 ve 51 °C denenmiştir. Elde edilen PCR ürünleri % 1,0'lik agaroz jelde kontrol edilmiştir.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Alkalen Proteaz Üreticisi *Bacillus* Soylarının Seçilmesi ve Ön Tiplendirmesi

Toprak ve su örneklerinden (Tablo 2.1) izole edilen *Bacillus* soyları arasından, 10 % 6 süttozu içeren NB seçici besi yerinde (pH 7 ve pH 10) verdikleri şeffaf bölgelerin çapı (Şekil 3.1), alındıkları kaynağın özellikleri, primer izolasyonun yapıldığı sıcaklık ve pH gibi değişkenler göz önünde bulundurularak seçilen soyların ön tiplendirmeleri; yöntemler bölümünde adı geçen temel mikrobiyolojik testler kullanılarak belirlenen morfolojik ve biyokimyasal özellikleri gözetilerek, ilgili kaynaklar ışığında (Sneath, 1986; Bailey and Scott, 1994; Turnball and Kramer, 1995) yapılmıştır.



**Şekil 3.1.** Alkalen Proteaz üretici soyların % 6 süttozu içeren NB seçici besi yerinde (SM) oluşturdıkları şeffaf bölgelerin görünümü.

Seçici besi yerinde enzim üretkenliği bakımından öne çıkan soylar arasından seçilip tanımlanan soyların izole edildiği kaynakların özellikleri, primer izolasyon süreçleri, seçici besi yerinde verdikleri şeffaf bölge çapı ve benzeştikleri tür(ler) Tablo 3.1.'de gösterilmektedir. Saflaştırılıp ön tiplendirmeleri yapılan 28 *Bacillus* soyu içinden ikisinin (P8, P9) benzeştiği birden fazla tür bulunmuştur. Bu soylar için önerilen tür isimleri tablo 3.1'de öncelikli isimler öne gelecek şekilde belirtilmektedir. Sekiz soy için (P6, P7, P9, P10, P11, P12, P15, P17) mevcut testlerin sonucuna göre morfolojik ve biyokimyasal özellikleri ile benzeştikleri bir tür adı bulunamadığından, her hangi bir tür ismi belirtilmemiş bu soylar soru işareti (?) ile gösterilmiştir.

**Tablo 3.1.** SM besi yerinde seçilen ve temel mikrobiyolojik yöntemlerle tanımlanan “Alkalen Proteaz” üreticisi *Bacillus* soylarının özellikleri

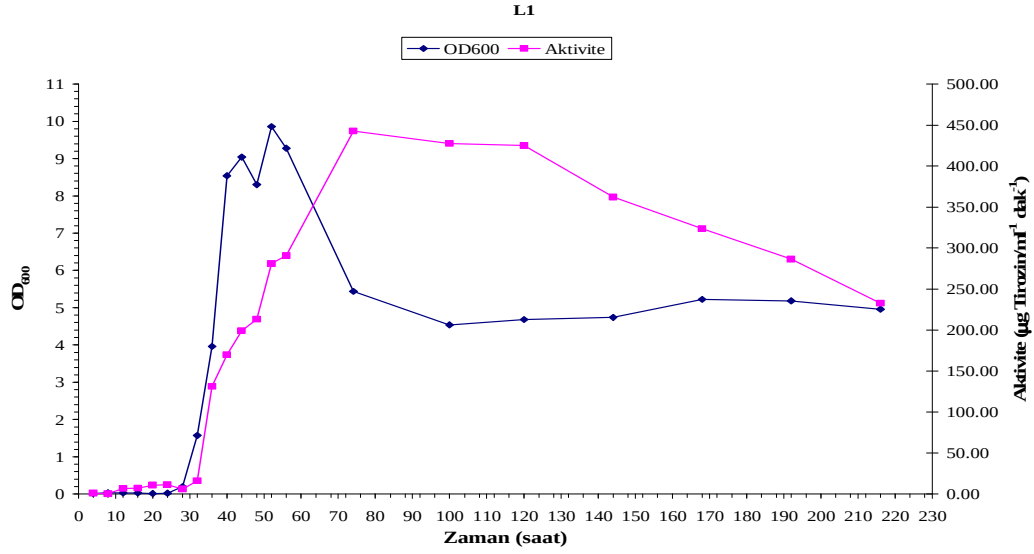
| Örnek Adı | Örnek Kaynağının Yeri ve Özellikleri |         |     |               | Primer İzolasyon        |    |               |      | Seçici Besi yerindeki Şeffaf Bölge Çapı (mm) |                                           | Tür Adı |
|-----------|--------------------------------------|---------|-----|---------------|-------------------------|----|---------------|------|----------------------------------------------|-------------------------------------------|---------|
|           | Alındığı Yer                         | Tipi    | pH  | Sıcaklık (°C) | Pastörizasyon Besisyeri | pH | Sıcaklık (°C) | pH 7 | pH 10                                        |                                           |         |
| P1        | Gönen Dağ Ilıcası-1                  | Su      | 7   | 43            | - NB                    | 10 | 30            | 20   | 14                                           | <i>B. subtilis</i>                        |         |
| P2        | Gönen Dağ Ilıcası-1                  | Su      | 7   | 43            | + NB                    | 10 | 30            | 16   | 12                                           | <i>B. subtilis</i>                        |         |
| P3        | Gönen Dağ Ilıcası-1                  | Su      | 7   | 43            | + NB                    | 10 | 30            | 13   | 12                                           | <i>B. subtilis</i>                        |         |
| P4        | Gönen Dağ Ilıcası-2                  | Su      | 7.5 | 43            | + NB                    | 7  | 55            | 1    | 16                                           | <i>B. licheniformis</i>                   |         |
| P5        | Gönen Dağ Ilıcası-2                  | Su      | 7.5 | 43            | + NB                    | 10 | 30            | 15   | 15                                           | <i>B. firmus</i>                          |         |
| P6        | Edremit- Z.yağı İşletmesi            | Pirina  | -   | -             | + NA                    | 7  | 55            | 0    | 13                                           | ?                                         |         |
| P7        | Edremit- Z.yağı İşletmesi            | Pirina  | -   | -             | + NA                    | 7  | 55            | 0    | 15                                           | ?                                         |         |
| P8        | Afyon Gazlıgöl Kaplıcası             | Su      | -   | 29            | - NB                    | 10 | 30            | 20   | 18                                           | ?/ <i>B. circulans</i> / <i>B. firmus</i> |         |
| P9        | Afyon Gazlıgöl Kaplıcası             | Su      | -   | 29            | - NB                    | 7  | 30            | 17   | 15                                           | ?/ <i>B. circulans</i>                    |         |
| P10       | Afyon Gazlıgöl Kaplıcası             | Su      | -   | 29            | - NB                    | 10 | 30            | 20   | 15                                           | <i>B. cereus</i>                          |         |
| P11       | Afyon Gazlıgöl Kaplıcası             | Su      | -   | 29            | - NB                    | 10 | 30            | 21   | 15                                           | ?                                         |         |
| P12       | Afyon Gecek Kaplıcası                | Toprak  | 8   | 48            | + LA                    | 7  | 30            | 15   | 0                                            | ?                                         |         |
| P13       | Bozulmuş tereyağı                    |         | -   | -             | - NA                    | 10 | 30            | 0    | 14                                           | <i>B. pumilus</i>                         |         |
| P14       | Afyon Gecek Kaplıcası                | Toprak  | 8   | 48            | + LA                    | 10 | 55            | 15   | yok                                          | <i>B. coagulans</i>                       |         |
| P15       | Afyon Ömer Kaplıcası                 | Toprak  | -   | 55            | + LA                    | 7  | 55            | 12   | yok                                          | ?                                         |         |
| P16       | Afyon Ömer Kaplıcası                 | Toprak  | -   | 80            | + LA                    | 10 | 30            | 11   | yok                                          | <i>B. licheniformis</i>                   |         |
| P17       | Afyon Heybeli Kaplıcası              | Su      | 8   | 58            | - AL                    | 10 | 30            | 17   | 8                                            | ?                                         |         |
| P18       | Afyon Çay Kaplıcası                  | Su      | 7   | 38            | - TSB                   | 7  | 45            | 24   | 8                                            | <i>B. firmus</i>                          |         |
| P19       | Gönen Yıldız Otel-G7                 | Su      | 7.2 | 58            | - MN                    | 7  | 45            | 12   | 0                                            | <i>B. licheniformis</i>                   |         |
| P20       | Bursa Yeni Kaplıca                   | Su      | 7.8 | 81            | - TSB                   | 7  | 30            | 11   | 0                                            | <i>B. subtilis</i>                        |         |
| P21       | Afyon Ömer Kaplıcası                 | Toprak  | -   | 80            | + LA                    | 10 | 55            | 0    | 5                                            | <i>B. licheniformis</i>                   |         |
| P22       | Gönen Dağ Ilıcası                    | Toprak  | -   | 35            | + LA                    | 10 | 30            | 9    | 4                                            | <i>B. megaterium</i>                      |         |
| P23       | Yalova Mantar Çiftliği               | Kompost | 7.5 | -             | + LA                    | 10 | 55            | 0    | 5                                            | <i>B. licheniformis</i>                   |         |
| P24       | Afyon Heybeli Kaplıcası              | Toprak  | 9   | 48            | + LA                    | 10 | 55            | 4    | 4                                            | <i>B. licheniformis</i>                   |         |
| L1        | Gönen Dağ Ilıcası-1                  | Su      | 7   | 43            | + NB                    | 10 | 30            | 6    | 5                                            | <i>B. subtilis</i> / <i>B. firmus</i>     |         |
| L10       | Afyon Gazlıgöl Kaplıcası             | Su      | -   | 29            | - NB                    | 7  | 30            | 18   | 20                                           | ?/ <i>B. subtilis</i>                     |         |
| L13       | Afyon Gecek Kaplıcası                | Toprak  | -   | 26            | + LA                    | 7  | 30            | 3    | 8                                            | <i>B. subtilis</i>                        |         |
| L16       | Edremit- Z.yağı İşletmesi            | Pirina  | -   | -             | - NA                    | 10 | 30            | 14   | 10                                           | <i>B. subtilis</i>                        |         |

### 3.2. Ön Tiplendirmeleri Yapılan *Bacillus* Soylarının Sıvı Besi Yerinde Hücre Dışı Enzim Üretkenliğinin Değerlendirilmesi ve Optimizasyonu

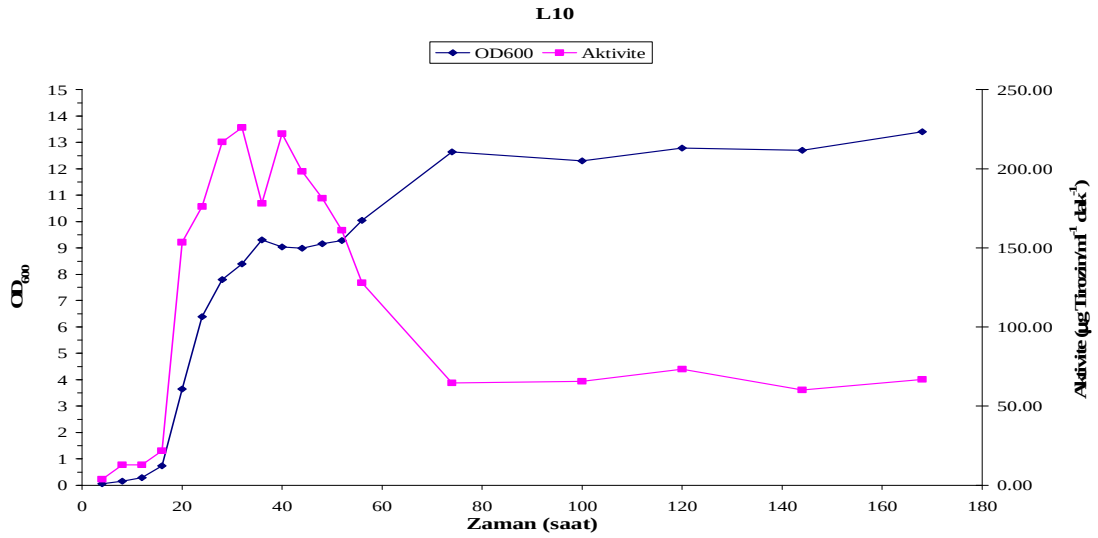
Alkalen proteaz seçici besi yerinde hücre dışı enzim üretkenliklerine göre seçilip saflaştırıldıktan sonra ön tiplendirmeleri yapılan 28 izolat, % 4 jelatin içeren NB sıvı besi yerinde (Kaneke *et. al.*) büyütülerek aktivite testlerine alınmıştır. Küçük hacim sıvı besi yerinde enzim üretkenliği yönünden öne çıkan L1, L10, L13, L16, P17, P19, P20, P21, P22 soyları için öncelikle optimal enzim üretimine olanak veren besi yeri bileşimi, havalandırma oranı, büyüme sıcaklığı ve kültürün çalkalama hızı gibi değişkenler optimize edilmiştir. Bu amaçla LB, NB, % 1 ve % 4 jelatin içeren NB besi yerleri farklı pH'larda hazırlanarak denenmiştir. Aşılama oranının yanı sıra, ana kültürün; -20 °C stokları ile doğrudan veya bir gece büyütülmüş ön kültürler eliyle aşılandığı koşullardaki üretkenlik test edilmiştir. Buna göre, -20 °C stoklarından aşılanarak gece boyu büyütülmüş ön kültürlerden % 1 inokulum oranıyla, % 4 jelatin içeren pH 7 NB sıvı besi yerinde 37 °C'ta, 170 rpm'de ve kültür/flask hacminin 1/5 olduğu koşullarda büyütülen bütün soyların etkin şekilde alkalen proteaz ürettikleri gözlenmiştir. Dokuz soy için daha büyük ölçekli kültür çalışmasında elde edilen veriler

le oluşturulan ve inkübasyon süresine karşılık, enzim aktivitesi ve hücre büyümesinin yer aldığı grafikler Şekil 3.2- 3.10'da görülmektedir. Tüm soylarda enzimatik aktivite genel olarak büyümeye paralel bir seyir izlemekte, en yüksek enzimatik aktivite, logaritmik fazın sonlarına doğru ya da durağan fazın başlarında ortaya çıkmaktadır.

Enzimatik aktivite L1 soyunda logaritmik fazın sonlarına değin hücre büyümesi ile paralellik göstermiş, en yüksek enzimatik aktivite (450 U/ml) kültürün 72. saatinde, durağan fazın başlarında ortaya çıkmış ve yaklaşık 120. saate kadar bu düzeylerde devam ettikten sonra, 216. saatte yaklaşık 230 U/ml düzeylerine inmiştir. L1 soyunun zamana karşı enzim aktivitesi- hücre büyümesi grafiği Şekil 3.2'de gösterilmektedir.

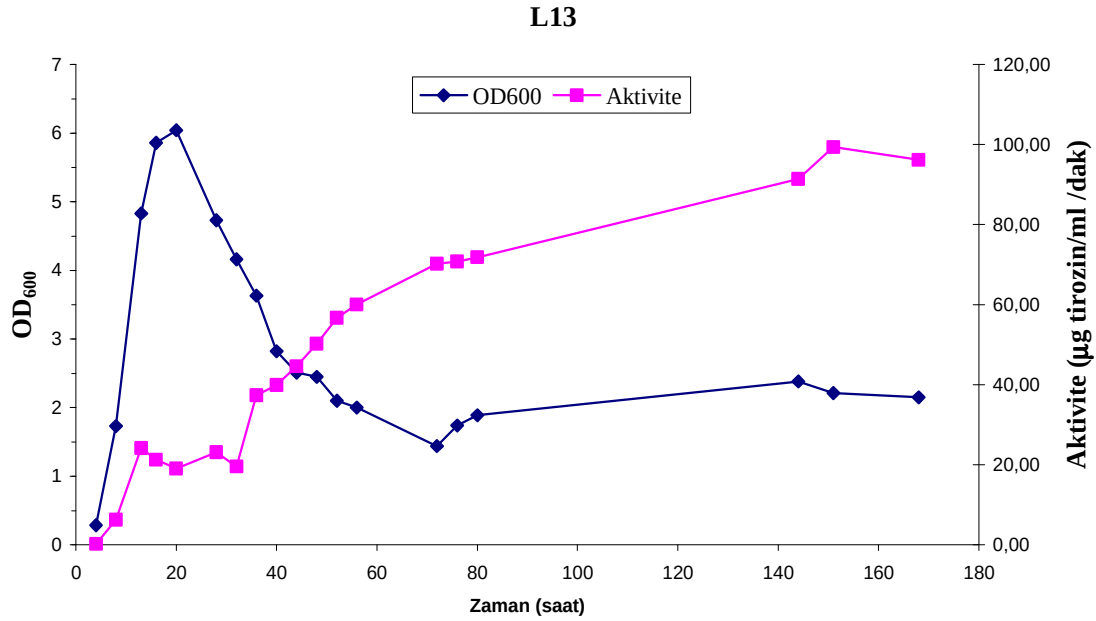


**Şekil 3.2.** L1 soyunun hücre büyümesi ve enzim aktivitesi grafiği



**Şekil 3.3.** L10 soyunun hücre büyümesi ve enzim aktivitesi grafiği

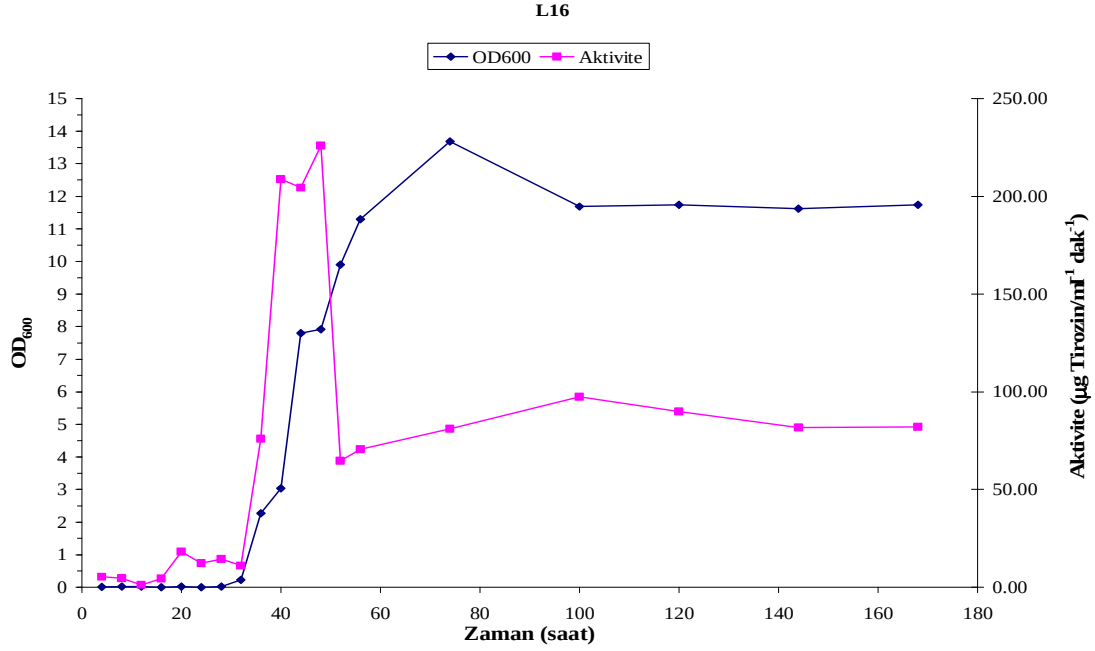
L10 soyunda enzimatik aktivite logaritmik fazın ortalarında en yüksek düzeyine (~250 U/ml) ulaşmış, bu noktadan itibaren hücre büyümesinin artmasına karşın enzimatik aktivite azalmaya başlamış ve durağan fazın başından itibaren yaklaşık 60 U/ml düzeylerinde kalmıştır. L10 soyunun zamana karşı enzim aktivitesi-hücre büyümesi grafiği Şekil 3.3'te gösterilmektedir.



**Şekil 3.4.** L13 soyunun hücre büyümesi ve enzim aktivitesi grafiği

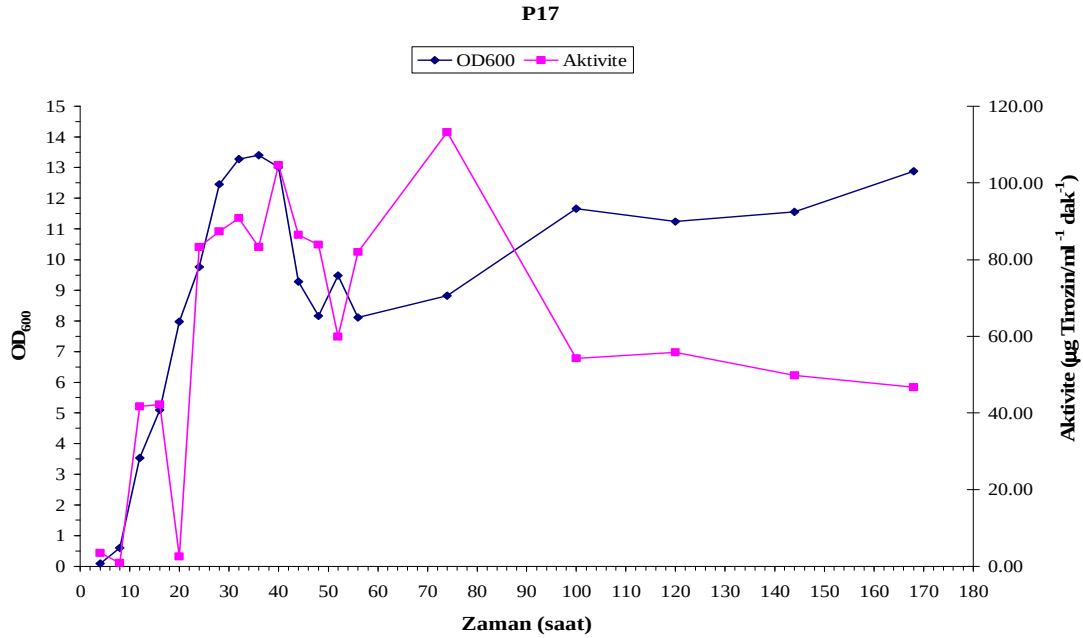
L13 soyunda enzim aktivitesi duragan fazın başlarından itibaren yükselmeye başlayarak kültürün 170. saatlerine kadar düzenli bir artış göstermiş ve 100 U/ml düzeylerine kadar ulaşmıştır. L13 soyunun zamana karşı enzim aktivitesi-hücre büyümesi grafiği Şekil 3.4'te gösterilmektedir.

Enzimatik aktivite L16 soyunda, L10 soyunda olduğu üzere, logaritmik fazın ortalarında en yüksek düzeye (~240 U/ml) ulaşmış ve logaritmik fazın sonlarına doğru yaklaşık 75 U/ml dolaylarına düşerek, kadar bu düzeylerde seyretmiştir. L16 soyunun zamana karşı enzim aktivitesi-hücre büyümesi grafiği Şekil 3.5'te gösterilmektedir.



**Şekil 3.5.** L16 soyunun hücre büyümesi ve enzim aktivitesi grafiği

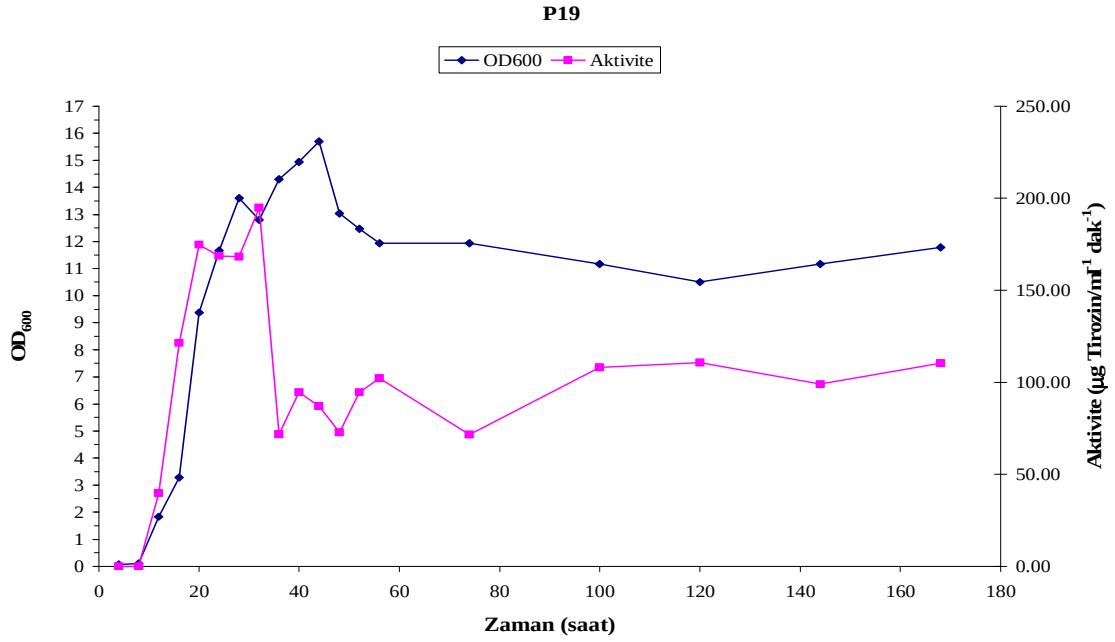
P17 soyu enzimatik aktivite-hücre büyümesi yönünden ilginç bir profil sergilemiştir. Enzimatik aktivite durağan fazın başlangıcına kadar hücre büyümesiyle paralel kalarak 100 U/ml düzeylerinde ulaşmış, daha sonra % 40'luk ani bir hücre yoğunluğu düşüşüyle enzimatik aktivite de 65 U/ml'ye gerilemiştir. Bu düşüşü takiben hücre büyümesinin yeniden artmasıyla enzimatik aktivite en yüksek düzeyine (110 U/ml) ulaşmıştır. Hücre büyümesinde sonraki saatlerde görülen hafif artışa karşın enzimatik aktivite 40 U/ml dolaylarında kalmıştır. P17 soyunun zamana karşı enzim aktivitesi-hücre büyümesi grafiği Şekil 3.6'da gösterilmektedir.



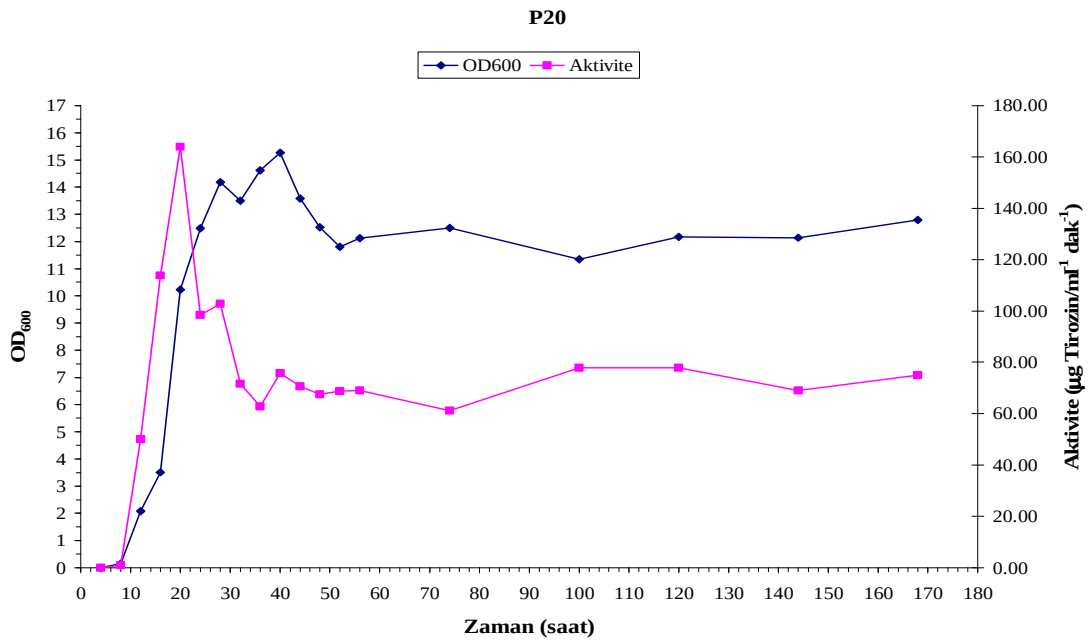
**Şekil 3.6.** P17 soyunun hücre büyümesi ve enzim aktivitesi grafiği

P19 soyunda enzimatik aktivite L10 ve L16 soylarında olduğu üzere logaritmik fazın sonlarına yakın bir zamana kadar hücre büyümesiyle paralel bir şekilde artarak en yüksek noktasına ulaşmış (~190 U/ml) ve durağan faza geçişten hemen önce yaklaşık 100 U/ml düzeylerine gerileyerek yaklaşık aynı değerlerde kalmıştır. P19 soyunun zamana karşı enzim aktivitesi-hücre büyümesi grafiği Şekil 3.7’de gösterilmektedir.

P20 soyunda da L10, L16 ve P19 soylarına benzer bir hücre büyümesi-enzimatik aktivite profili gözlenmiştir. En yüksek aktivite değerine (160 U/ml) logaritmik fazın sonunda ulaşmış ve durağan faza geçmeden 70–80 U/ml düzeylerine gerileyerek kültür sonuna kadar benzer değerlerde seyretmiştir. P20 soyunun zamana karşı enzim aktivitesi-hücre büyümesi grafiği Şekil 3.8’de gösterilmektedir



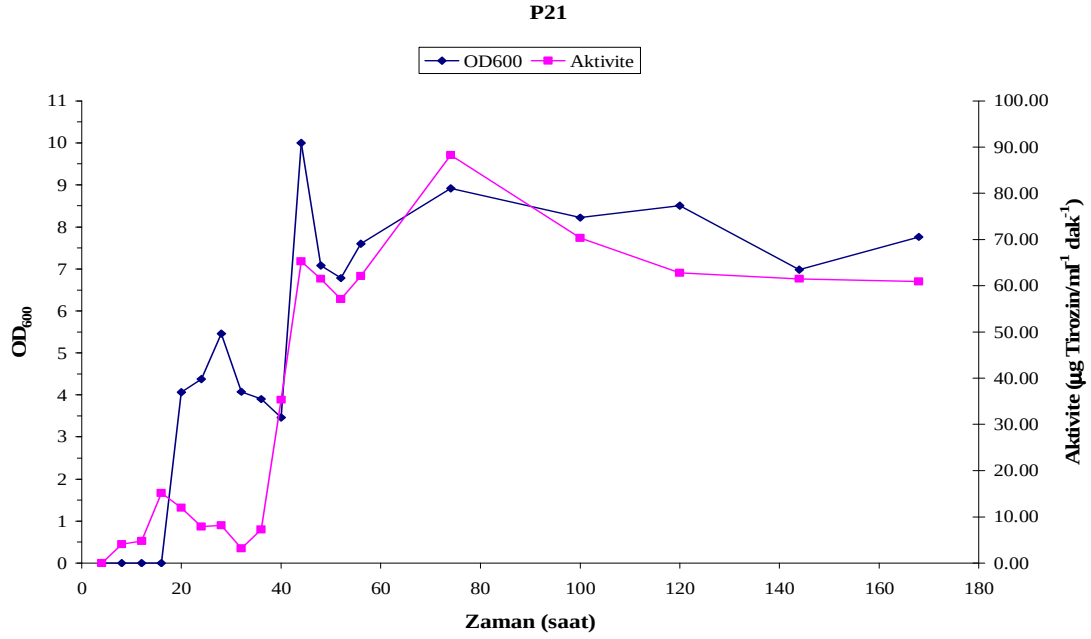
**Şekil 3.7.** P19 soyunun hücre büyümesi ve enzim aktivitesi grafiği



**Şekil 3.8.** P20 soyunun hücre büyümesi ve enzim aktivitesi grafiği

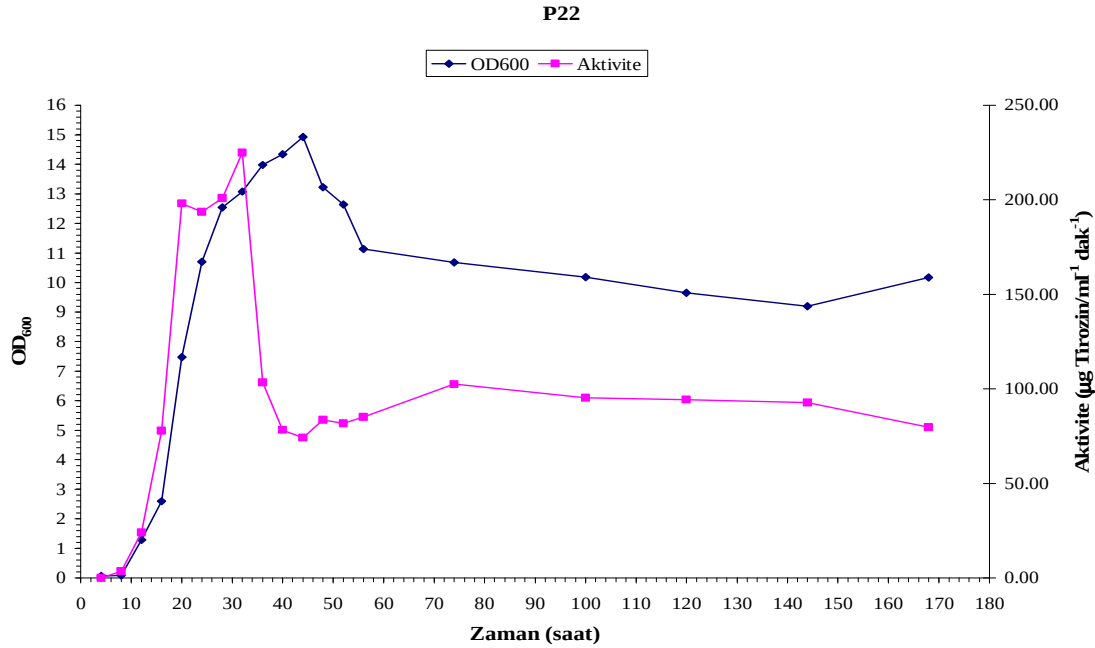
P21 soyunda enzimatik aktivite hemen hemen tümüyle hücre büyümesine paralel olarak seyretmiştir. Durağan fazın başlarında en yüksek enzimatik aktivite değerine (~85

U/ml) ulaşılmış ve kùltür sonuna kadar yaklaşık % 25'lik bir düşüş ile 60 U/ml dolaylarında devam etmiştir. P21 soyunun zamana karşı enzim aktivitesi-hücre büyümesi grafiğı Şekil 3.9'da gösterilmektedir



**Şekil 3.9.** P21 soyunun hücre büyümesi ve enzim aktivitesi grafiğı

P22 soyu çoğı soyda gözleendiğı gibi hücre büyümesine paralel şekilde artarak logaritmik fazın sonlarına doğıru en yüksek aktivite değıerlerine (~220 U/ml) ulaşmış ve durağan faza geçmeden önce yaklaşık 90 U/ml dolaylarına gerileyerek, kùltür sonuna kadar yaklaşık olarak bu değıeri korumuştur. P22 soyunun zamana karşı enzim aktivitesi-hücre büyümesi grafiğı Şekil 3.10'da gösterilmektedir



**Şekil 3.10.** P22 soyunun hücre büyümesi ve enzim aktivitesi grafiği

### 3.3. API ve VITEK Sistemleriyle Tiplendirme Sonuçları

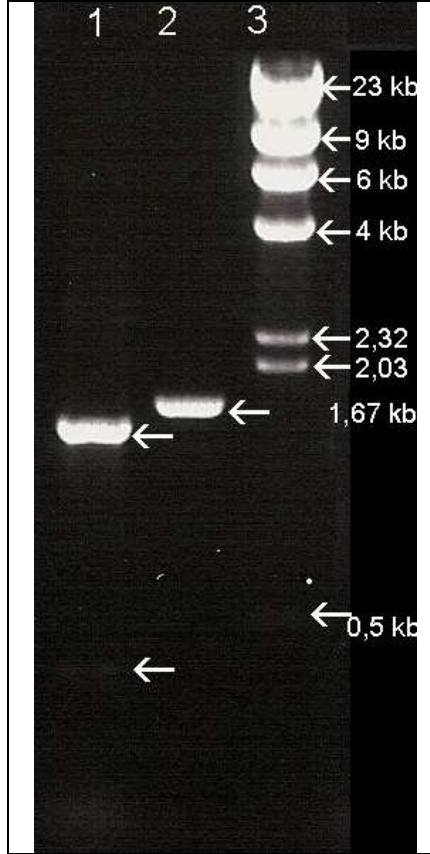
Sıvı kültür besi yerinde enzim üretkenliği yönünden öne çıkan sekiz soy, manüel yöntemlerle yapılan ön tiplendirme çalışmalarında verilen tür adlarının doğrulanması için VITEK Bac kiti ve API 50 CHB/ E kitleriyle tiplendirme işlemlerine alınmış, buna paralel olarak manuel tiplendirme çalışmaları sırasında yapılan bazı testlerin tekrarlanmasına karar verilmiştir. L1 soyu için nişasta hidrolizi, L10 soyu için mikroskopik inceleme, L13 soyu için nişasta hidrolizi, P17 soyu için V-P testi, mikroskopik inceleme, kazeinli agarda koloni rengi, sitrat kullanımı, ve nitrat indirgenmesi, P19 soyu için anaerobik koşullarda büyüebilme, P21 soyu için mikroskopik inceleme, kanlı agarda hemoliz, TSI, V-P, nişasta hidrolizi, ve P22 soyu için kazeinli agarda koloni rengi, anaerobik koşullarda büyüebilme, jelatin hidrolizi testleri tekrarlanmıştır. Her üç yöntemle elde edilen sonuçlara ve tekrarlanan testlere dayanarak önerilen tür isimleri Tablo 3.2’de gösterilmektedir.

**Tablo 3.2.** Alkalen Proteaz Üreticisi Olarak Seçilen *Bacillus* Soylarının Farklı Tiplendirme Çalışmalarının Bulgularına Dayanarak Önerilen Tür Adları

| Örnek Adı | Örnek Kaynağının Yeri ve Özellikleri |        |    |                | OLASI TÜR ADI                 |                                        |                             | ÖNERİLEN TÜR ADI                         |
|-----------|--------------------------------------|--------|----|----------------|-------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------|------------------------------------------|
|           | Alındığı Yer                         | Tipi   | pH | Sıcaklık ( °C) | Manuel                        | API                                    | VITEK                       |                                          |
| L1        | Gönen Dağ Ilıcası-1                  | Su     | 7  | 43             | <i>B. subtilis/ B. firmus</i> | <i>B.pumilus</i>                       | <i>B.pumilus</i>            | <i>B. pumilus</i>                        |
| L10       | Afyon Gazlıgöl Kaplıcası             | Su     |    | 29             | ?/ <i>B. subtilis</i>         | <i>B.stearothermophilus</i>            | <i>B. amyloliquefaciens</i> | <i>B. subtilis/ B. amyloliquefaciens</i> |
| L13       | Afyon Gecek Kaplıcası                | Toprak |    | 26             | <i>B. subtilis</i>            | <i>B. pumilus</i>                      | <i>B. subtilis</i>          | <i>B. subtilis/ B. pumilus</i>           |
| L16       | Edremit Zeytin İşletmesi             | Pirina |    |                | <i>B. subtilis</i>            | <i>B. amyloliquefaciens</i>            | <i>B. subtilis</i>          | <i>B. subtilis/ B.amyloliquefaciens</i>  |
| P17       | Afyon Heybeli Kaplıcası              | Su     | 8  | 58             | ?                             | <i>B.cereus</i>                        | <i>B.cereus group</i>       | <i>B. cereus grubu</i>                   |
| P19       | Gönen Yıldız Otel-G7                 | Su     | 7  | 58             | <i>B. licheniformis</i>       | <i>B.subtilis/B. amyloliquefaciens</i> | <i>B.subtilis</i>           | <i>B. subtilis</i>                       |
| P20       | Bursa Yeni Kaplıcası                 | Su     | 8  | 81             | <i>B. subtilis</i>            | <i>B.amyloliquefaciens/B.subtilis</i>  | <i>B. subtilis</i>          | <i>B. subtilis/ B. amyloliquefaciens</i> |
| P21       | Afyon Ömer Kaplıcası                 | Toprak |    | 80             | <i>B. licheniformis</i>       | <i>B.licheniformis</i>                 | Tanımlanamadı               | Tanımlanamadı                            |
| P22       | Gönen Dağ Ilıcası                    | Toprak |    | 35             | <i>B. megaterium</i>          | <i>B.coagulans</i>                     | <i>B. cereus</i>            | <i>B. megaterium</i>                     |

### 3.4. P21 Soyu 16S rDNA'sının PCR ile oğaltımı

Vitek sistemi ile yapılan tiplendirme çalışmasında P21 soyu için “tanımlanamadı” sonucunun elde edilmesinin ardından, bu soy için 16S rDNA dizi analizi çalışmalarının ilk ayağı olan 16S rDNA çoğaltımı çalışmalarına başlanmıştır. PCR koşulları optimize edilirken 15, 20, 30, 40 mM MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonları, 49 ve 51 °C tutunma sıcaklıkları denenmiştir. PCR rnlerinin agaroz jel elektroforezi analizi sonucunda 51 °C’ta ve 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonunda ~1500 bp büyüklüğünde güçlü bir bant olduğu grlmştir (şekil 3.11).



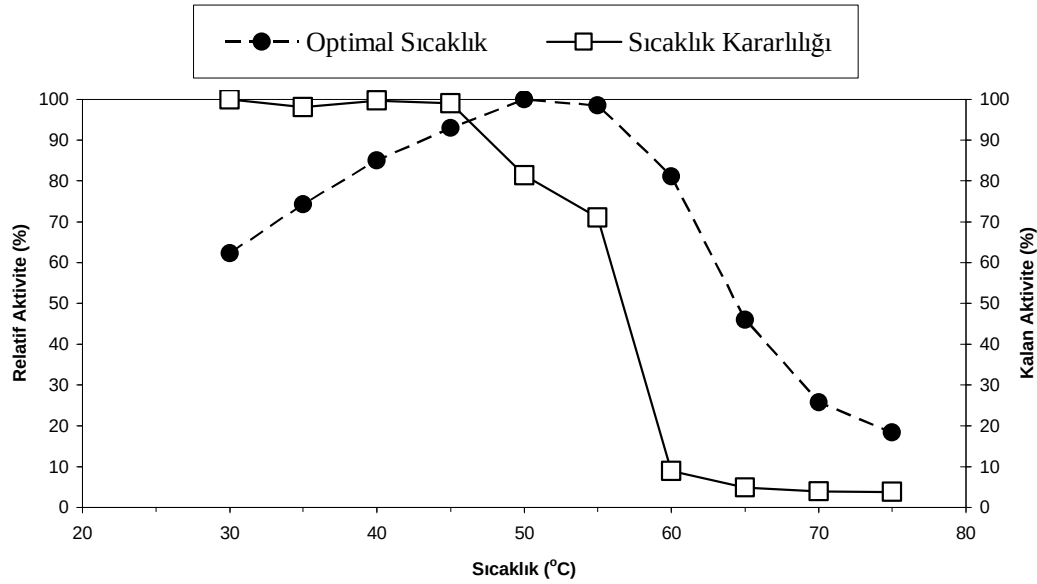
**şekil 3.11.** P21 soyundan elde edilen genomik DNA kalıbından PCR eliyle çoğaltılan 16S rDNA fragmanının % 1 agaroz jeldeki görünümü; Kuyu 1. 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> varlığında tutunmanın 51 °C’ta gerçekleştiği PCR rn 16S rDNA, Kuyu 2. Penisilin asilaz geni ̢-alt biriminin sentezinden sorumlu gen parçası (1,67 kb- belirteç olarak kullanılmıştır.), Kuyu 3. Moleküler belirteç(λ-DNA<sup>HindIII</sup>: 23; 9; 6; 4; 2,32; 2,03; 0,56; 0,13 kb)

### 3.5. Enzim n Nitelendirme alışmaları

L13 soyunun, kültür st sıvısının % 90 amonyum sülfat çöktürmesi ile konsantre edilerek hazırlanan enzim örnekleri ile yapılan enzim nitelendirme çalışmaları sonucunda enzimin optimal sıcaklığı 50–55 °C olarak bulunmuştur. Enzim aktivitesi

45, 50, 55 ve 60 °C'ta sırasıyla % 37, 50, 61, 58 ve 31 oranında artarken, 65, 70 ve 75 °C'ta ise enzimatik aktive sırasıyla yaklaşık % 30, 60 ve 70 oranında düşüş göstermektedir.

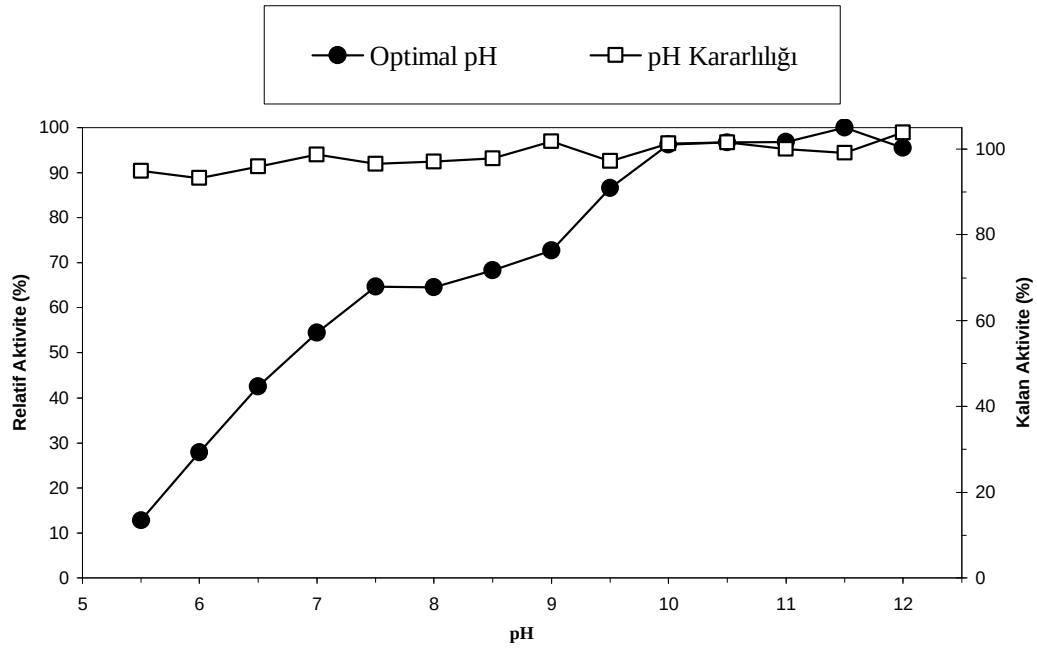
Sıcaklık kararlılığı, enzim örnekleri farklı sıcaklıklarda 10 dakika inkübe edildikten sonra belirlenmiştir. 30- 45 °C arasındaki sıcaklıklarda kararlı görünen enzimin 50 ve 55 °C'ta, başlangıçtaki aktivitesinin sırasıyla % 81'ini ve % 71'ini koruduğu görülmüştür. Aktivite 60- 75 °C arasında hemen hemen bütünüyle kaybedilmektedir. Enzimin optimal sıcaklık ve sıcaklık kararlılığı grafiği şekil 3.12'de gösterilmektedir.



**Şekil 3.12.** Sıcaklığın L13 alkalen proteaz enziminin aktivitesi ve kararlılığı üzerindeki etkisi

Optimal pH'yı belirlemek üzere yapılan çalışma sonucunda, enzim aktivitesinin pH>10.0 değerlerinde daha yüksek olduğu ve en yüksek değere pH 11.5'ta ulaştığı görülmüştür. pH 7.0 ile 9.5 arasındaki aktivite, optimal pH'daki değer % 56'sı ile 90'ı arasında seyretmektedir. pH 7.0'nin altında ise aktivite % 40'ların altına düşmektedir.

Enzim geniş bir pH aralığında (pH 6.5- 12.0), aktivitesininin % 95'inden fazlasını koruyarak, kararlı kalmaktadır. pH 5.5 ve 6.0'da aktivitenin % 90'ından fazlası korunmaktadır. pH'nın enzim kararlılığı ve enzim aktivitesi üzerindeki etkisi Şekil 3.13.'de gösterilmektedir.

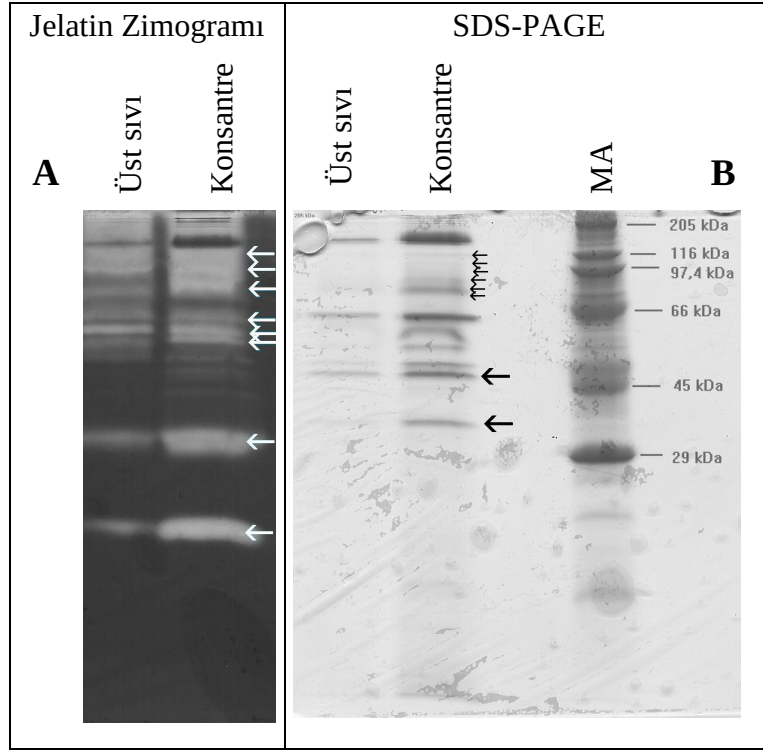


**Şekil 3.13.** pH'nın L13 alkalin proteaz enziminin aktivitesi ve enzim kararlılığı üzerindeki etkisi

Bu bulgulara göre L13 soyu tarafından üretilen hücre dışı alkalin proteaz enziminin optimal sıcaklığı 50–55 °C ve optimal pH'sı 11,5'tur. Enzim 30–45 °C aralığında 10 dakika süreyle karardır. Buna karşın gece boyu belirtilen pH'lardaki tamponlarda inkübe edilen enzim pH 5,5–12,0 aralığında hemen bütünüyle kararlı görünmektedir.

### 3.6. SDS-Poliakrilamit Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) ve Zimogram Sonuçları

Yapılan jelatin zimogram analizinde proteolitik aktiviteye işaret eden sekiz bant görülmüştür (bu nitelikteki bantlar zimogram üzerinde ok ile belirtilmiştir). SDS-poliakrilamit jelindeki bant profili ile zimogram üzerinde proteaz adaylarına ait olduğu düşünülen bantlar karşılaştırılmış ve moleküler ağırlıkları tahmin edilmeye çalışılmıştır. Buna göre, jelatin içeren SDS-poliakrilamit jelde tüm bantlardan ayrı ve konumlandıkları bölgede çok net görülen renksiz bölgeler oluşturan iki bantın moleküler ağırlıkları yaklaşık 35 ve 50 kDa olarak ön görülmüştür. Geriye kalan altı bant 66-116 kDa arasında bulunmaktadır. SDS-PAGE ve zimogram sonuçları Şekil 3.14'de verilmiş olup, jelatin hidrolizi görülen bölgeler oklarla belirtilmiştir.



**Şekil 3.14. (A)** Jelatin zimogram analizi **(B)** kültür üst sıvısı ve konsantre enzim çözeltisinin SDS-PAGE profili (moleküler ağırlık belirteçleri sırasıyla; karbonik anhidraz: 29, ovalbumin: 45, Bovin Serum Albumin: 66, Fosforilaz b: 97.4,  $\beta$ -galaktosidaz: 116, miyozin: 205 kDa)

## 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Serin proteazların (E.C. 3.4.21) bir alt tipi olan alkalen proteazlar başta deterjan endüstrisi (Ito et. al., 1998; Horikoshi, 1999; Kirk et. al., 2002; Maurer, 2004) olmak üzere, çeşitli sektörlerde; dericilikte kılların uzaklaştırılmasında, gıda endüstrisinde süt ürünlerinin üretimi, bebek maması formülasyonlarının iyileştirilmesi ve bu besinlerin tatlarının arttırılmasında, kağıt endüstrisinde ve röntgen filmlerinde biyofilm tabakasının uzaklaştırılması ile gümüşün geri kazanılmasında yaygın şekilde kullanılmaktadır (Singh et. al., 1999; Nakiboglu et. al., 2000). Ayrıca alkalen proteazlar son zamanlarda yem endüstrisinde yüksek protein içerikli atıklardan protein içerikli hammaddelerin eldesinde, kentsel ve endüstriyel atıkların yönetiminde de uygulama alanları bulmaya başlamışlardır.

Alkalen proteazların nötrofilik *Bacillus* türleri tarafından da üretilmesine karşın, ticari alkalen proteaz enzimlerinin en önemli kaynağı alkalofilik *Bacillus* soylarıdır (Horikoshi, 1996; Rao et. al., 1998; Horikoshi, 1999; Kumar and Takagi, 1999). Bu çalışmada alkalen proteaz üreticisi yerel *Bacillus* türlerinin izolasyonu, nitelendirilmesi ve enzim üretiminin optimizasyonu amaçlanmıştır.

Tablo 2.2.1’de belirtilen kaynaklardan toplanan örneklerden izole edilen *Bacillus* soylarının alkalen proteaz üretkenlikleri % 6 süt tozu içeren NA seçici besi yerinde belirlenmiştir (Kanekar et. al., 2002). Koloni çevresinde, seçici besi yerinin içerdiği süttozundaki kazeinin hidrolizi sonucu oluşan şeffaf bölgelerin çapına, soyun izole edildiği kaynağın ve primer izolasyon süreçlerinin özelliklerine göre alkalen proteaz üretenkenliği yönünden öne çıkan soyların, öncelikle temel mikrobiyolojik yöntemler kullanılarak belirlenen morfolojik ve biyokimyasal özellikleri değerlendirilmiş ve benzeştikleri tür isimleri önerilmiştir.

Bu soylar içinden sıvı besi yerinde enzim üretkenliği bakımından öne çıkanların, manuel tiplendirme çalışmaları sonucu verilen tür isimlerinin doğrulanması amacıyla, *Bacillus* türlerinin tiplendirilmesi için Biomerieux firması tarafından geliştirilen API 50 CHB/ E kiti ve tam otomatik bir tanımlama sistemi olan VITEK’in *Bacillus* kitleri kullanılmıştır. Manuel tiplendirme çalışmalarında yapılan bazı testler tekrarlanarak alkalen proteaz üreticisi soyların tür isimleri önerilmiştir.

Manuel tiplendirme ve API ile VITEK tanı kitleri ile yapılan tiplendirme çalışmalarının verdiği sonuçlar çoğu soyda birbiriyle örtüşmemektedir. Sekiz soydan

ikisi dışında üç tiplendirme yönteminin uzlaştığı bir sonuç alınamamıştır. Tanı kitleri morfolojik ve mikroskobik analizden yoksun oldukları için bazı türlerin tanınmasında belirleyici olan morfolojik özelliklerin belirlenmesinde yetersiz kalmaktadır. Örneğin P22 soyunun manuel tiplendirme çalışmalarında *B. megaterium* olarak adlandırılmasına karşın, API ve VITEK sistemleri aynı soyu sırasıyla *B. coagulans* ve *B. cereus* olarak adlandırmıştır. Tekrarlanan testlerde P22 soyunun anaerobik koşullarda üreyemediği, jelatin hidrolizi yaptığı, hücre çapının 0.9 µm' den büyük olduğu ve nişasta içeren katı besi yerinde sarı pigmentli koloni morfolojisi gösterdiği görülmüştür. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'de nişasta içeren katı besi yerinde sarı renkli koloni oluşturma özelliğinin sadece *B. megaterium*'a özgü olduğu belirtilmektedir. Bu özellikten yola çıkılarak P22 *B. megaterium* olarak kaydedilmiştir.

L1 soyunun manuel tiplendirme çalışmaları sonucu *B. subtilis* / *B. firmus* olduğu öngörülmüştür. Ancak otomatik tanımlama kitlerine göre *B. pumilus* olduğu öngörülmüştür. Tekrarlanan nişasta hidrolizi test sonucunun negatif bulunmasının ardından bu soyun *B. pumilus* olarak adlandırılmasına karar verilmiştir.

L10 soyu için manuel test sonuçları ?/ *B. subtilis*; API sistemi, *B. stearothermophilus*, VITEK ise *B. amyloliquefaciens* ismini öngörmüştür. Bu soyun 50 °C'ta üreyebilme yeteneğinin olmaması, API kitinden alınan sonucun göz ardı edilmesine ve diğer yöntemlerin uzlaştığı *B. subtilis* / *B. amyloliquefaciens* isimlerinin öne çıkmasına neden olmuştur.

L13 soyu için manuel tiplendirme ve VITEK ile *B. subtilis* ismi, API ile *B. pumilus* ismi önerilmiştir. Yapılan nişasta hidrolizi testi sonucunda bu soy için öncelikli olarak *B. subtilis* tür ismi, ikinci olarak da *B. pumilus* tür ismi kaydedilmiştir.

Manuel testler sonucunda P17 soyunun benzeştiği bir *Bacillus* türü belirlenememiş, API ve VITEK sistemleri ise bu soy için sırasıyla *B. cereus* ve *B. cereus* grubu tanısı koymuştur. API ve VITEK sonuçlarının irdelenmesi için mikroskopi, V-P, kazeinli agarda koloni rengi, tek karbon kaynağı olarak sitrat kullanımı ve nitrat indirgenmesi testleri tekrar edilmiş ve bu soyun *B. cereus* olarak adlandırılmasına karar verilmiştir.

P19 soyunun, manuel tiplendirme çalışmalarında *B. licheniformis*, API ve VITEK ile *B. subtilis* olduğu öngörülmüştür. Bu soy için tekrarlanan anaerobik koşullarda üreyebilme testinin sonucu negatif bulunmuş ve *B. licheniformis*' in

anaerobik koşullarda üreyebilme yeteneği olduğundan, bu soyun *B. subtilis* olarak adlandırılmasına karar verilmiştir.

P21 soyu manuel tiplendirme ve API alışmaları sonucu *B. licheniformis* olarak adlandırılırken, VITEK sisteminde bu soy için bir tür ismi belirlenememiştir. Mikroskobi, kanlı agarda hemoliz, V-P reaksiyonu ve nişasta hidrolizi testlerinin sonuçları *B. licheniformis* ile uyuşmadığı için VITEK sisteminin “tanımlanamamıştır” şeklinde ifade edilen bildirimi kabul edilmiştir.

Her üç yöntemin *B. subtilis* olarak tanımladığı iki soy L16 ve P20 için *B. subtilis* kesin tür adı olarak kabul edilmiştir.

Tanı kitlerinin, zaman ve insan gücü açısından daha avantajlı görünmelerine karşın morfolojik ve mikroskobik analizden yoksun olmaları, ayrıca klasik yöntemlere göre daha pahalı olmaları, bu yöntemlerin tek yaklaşım olarak uygulanabilirliğini sınırlandırmaktadır. Ayrıca *Bacillus* cinsindeki türlerin fizyolojik özelliklerinin çeşitliliği ve bazı türler arasında belirgin bir ayırıcı özelliğin bulunmaması; araştırıcıları moleküler tiplendirme yöntemlerine yönlendirmektedir. Moleküler tiplendirme yöntemleri içinde en sık kullanılanı 16S rDNA dizi analizidir. Seçilen soyların tür adlarının daha net belirlenmesi için ileriki aşamalarda moleküler tiplendirme çalışmaları yapılacaktır. Bu nitelikli çalışmalara bir başlangıç oluşturmak üzere, P21 soyunun genomik DNA’sı bu tez çalışması kapsamında izole edilmiş, düzenlenen 16S rDNA primerlerinin kullanıldığı PCR alışması eliyle ilgili DNA parçası üretilmiştir. Beklenen büyüklükte elde edilen bu fragmanın DNA dizi analizi, ilgili deneysel sistemin gereçleri tamamlandığında gerçekleştirilecektir.

*Bacillus* türlerinde proteaz sentezi genellikle, konstitütif veya kısmen uyarılarak gerçekleşmekte ve logaritmik fazdan durağan faza geçiş evresinde görev alan sayısız kompleks mekanizma tarafından denetlenmektedir (Kumar and Takagi, 1999; Gupta et. al., 2002). *Bacillus* türlerinde proteaz sentezinin logaritmik faz ile başlayıp fazın sonuna kadar arttığı ve en yüksek düzeye durağan fazın başlarında ulaştığı bilinmektedir (Kumar and Takagi, 1999; Mehrotra et. al., 1999). Bu sonuç L1, P17 ve P21 soylarının sergilediği enzimatik aktivite-hücre büyümesi profili ile uyum göstermektedir. Ancak farklı olarak enzim üretiminin logaritmik fazda gerçekleşmediği veya çok düşük düzeyde kaldığı, tersine *B. subtilis* ATCC 14416 ve *B. sphaericus* BSE 18’de gözleendiği üzere logaritmik fazın ortalarıyla sonları arasındaki

bir noktada başlayıp en yüksek düzeye ulaşarak, durağan faza girmeden önce otodeaktivasyon mekanizmaları ile düştüğünün bildirildiği raporlar da bulunmaktadır (Kumar and Takagi, 1999). Bu söylem L10, L16, P19, P20 ve P22 soylarında izlenen profil ile örtüşmektedir. P22 (*B. megaterium*) dışındaki soyların *B. subtilis* olarak adlandırılması, bu nitelikteki enzim aktivitesi-hücre büyümesi profili ile uyumlu görünmektedir.

Tez çalışması kapsamında izole edilen soyların enzim üretkenlikleri, büyük ölçek üretim için elverişli görünmektedir. Ancak soylar tarafından üretilen enzimlerin endüstriyel süreçler için uygunluğunun belirlenmesi amacıyla saflaştırma ve enzim kinetiği çalışmalarının yapılması gerekmektedir.

Enzim üretkenliği bakımından öne çıkan soylardan L13 tarafından üretilen alkalin proteaz enzimi ön nitelendirme çalışmalarına alınmıştır. Kültürün 64. saatinde toplanan kültür üst sıvısı amonyum sülfat çöktürmesi ile konsantre edilmiş ve nitelendirme çalışmalarında kullanılmıştır. Belirtilen çöktürme sonucunda elde edilen enzim çözeltisinin, nitelendirme çalışmalarının sonucunu etkileyebilecek safsızlıkları içermesi olasıdır. Yapılan zimogram analizinde bu düşüncüyü destekleyen bulgular elde edilmiştir. Zimogram analizinde proteolitik aktiviteye sahip sekiz bant belirlenmiştir. Bunların arasında yaklaşık 35 ve 50 kDa büyüklüğünde olan iki bantın iki ayrı proteaz olması güçlü bir olasılıktır. Buna karşın 66–116 kDa arasında görülen aktivite bantlarının farklı proteazları temsil etmesinden çok, jelatin zimogram analizinin artefaktları, ya da proteaz öncülleri oldukları düşünülmüştür. Literatürde, jelatin zimogram analizinde, poliakrilamid içinde bulunan jelatinin proteinlerin yürüme hızını % 15-20 oranında düşürdüğü; elektroforetik hızdaki yavaşlamaya ek olarak, proteazların jelatine olan afinitelerinden dolayı arka planda hidrolitik izlerin oluşumuna ve/veya proteaz sayısının olduğundan fazla tahmin edilmesine neden olduğu bildirilmiştir (Michaud, 1998; Pagano, 1999). Dolayısıyla zimogram üzerinde görülen bantların moleküler ağırlıkları PAGE üzerindeki protein standartlarına göreceli olarak önerilmiştir. Öte yandan bazı *Bacillus* türlerinin durağan fazın başlarında birden fazla proteaz ürettiği (Schmidt et. al., 1995; Kumar and Takagi, 1999) göz önünde bulundurulursa nitelendirme çalışmasında elde edilen verilerin yalnızca bir enzimden kaynaklanmadığı da düşünülebilir. Çalışmanın “ön nitelendirme” olarak adlandırılmasının nedeni de budur. Yine de elde edilen veriler L13 soyunun daha ileri çalışmalar için elverişli olduğuna işaret etmektedir.

Yapılan nitelendirme çalışmaları bu soy tarafından üretilen proteazın pH 10–12 aralığında yüksek aktivite gösterdiğine ve optimal pH değerinin 11,5 olduğuna işaret etmektedir. Enzim ayrıca pH 5.5 ile 12 gibi geniş bir pH aralığında kararlı görünmektedir. Bu veriler enzimin deterjan endüstrisi gibi sektörlerde kullanılabilirliğine işaret etmektedir. Rapor edilen alkalen proteazların yalnızca küçük bir bölümünün optimal pH değerleri 10.5’ten yüksektir (Gessesse and Gashe, 1997; Kumar et. al, 1999; Johnveshly and Naik, 2001; Gessesse et. al., 2002; Ferrero et. al., 1996; Kobayashi et. al., 1996; Joo et. al., 2003). Rapor edilen en yüksek optimal pH değerleri; pH 12.3 ile *Bacillus* sp. KSM-K16’ya (Kobayashi et. al., 1996) ve pH 12 ile *B. licheniformis* MIR 29’a (Ferrero et. al., 1996) aittir. Çoğu yayında rapor edilen optimal pH değerleri ise pH 8,5 ile pH 10.5 arasındadır (Durham et. al., 1987; Rahman et. al., 1994; Mannachini et. al., 1998; Banerjee et. al., 1999; Singh et. al., 1999; Towatana et. al., 1999; Saeki et. al., 2000; Okamoto et. al., 2001; Singh et. al., 2001; Gessesse et. al., 2002; Joo et. al., 2002; Adinarayara et. al., 2003; Beg et. al., 2003; Huang et. al., 2003; Moreira et. al., 2003)

Yerel *Bacillus* L13 soyu tarafından üretilen enzimin optimal sıcaklığı 50- 55 °C’tır. 45 °C’a kadar kararlı görünen enzim, 50 ve 55 °C’ta başlangıç aktivitesinin % 50’den fazlasını korumaktadır. Ancak daha yüksek sıcaklıklarda kalan aktivite % 30’ların altına düşmektedir. Literatürde termofilik *Bacillus* türlerinden elde edilen enzimler için 65 °C’ın üzerine çıkan optimal sıcaklık değerleri de rapor edilmekle birlikte (Rahman et. al., 1994; Mannachini et. al., 1998; Saeki et. al., 2000; Johnveshly and Naik, 2001; Joo et. al., 2003) alkalen proteazlar için optimal sıcaklık değerleri 50-60 °C (Durham et. al. , 1987; Gessesse and Gashe, 1997; Ferrero et. al., 1996; Ito et. al., 1998; Banerjee et. al., 1999; Singh et. al., 1999; Okamoto et al., 2001; Towatana et. al., 1999; Johnveshly and Naik, 2001; Singh et. al., 2001; Hawumba et. al., 2002; Gessesse et. al., 2002; Joo et. al., 2002; Adinarayana et. al., 2003; Beg et. al., 2003; Huang et. al., 2003; Moreira et. al., 2003) arasındadır.

L13 soyu tarafından üretilen proteazın sahip olduğu nitelikler özellikle de pH kararlılığı ve optimal pH değeri enzimin, çok çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanılabileceğine işaret etmektedir. Ancak daha kesin sonuçların alınabilmesi için enzimin saflaştırılması, tez kapsamında gerçekleştirilen ön nitelendirme çalışmalarının tekrarlanması ve enzim kinetiklerinin çalışılması gerekmektedir. L13 genomik

DNA'sından hareketle ve PCR aracılığı ile üretilen 16S rDNA'nın dizi analizi sonuçları, kesin tür adının konulmasına katkıda bulunacaktır.

Bu çalışma sonucunda elde edilen soylar yerel bakteriyel çeşitliliğinin belirlenmesine katkıda bulunacaktır. Ayrıca alkalen proteaz üreticisi bu soylar, ilgili enzim genlerinin farklı ekspresyon sistemlerinde klonlanması gibi ileri moleküler biyolojik çalışmalar için gereksinilen gen kaynaklarını oluşturacaklardır.

# KAYNAKLAR

1. Adinarayana, K., Ellaiah, P., Prasad, D.S., Purification and Partial Characterization of Thermostable Serine Alkaline Protease from a Newly Isolated *Bacillus subtilis* PE-11, AAPS Pharmaceutical Science Technology, 2003, 4 (4), Article 56.
2. Anwar, A. and Saleemuddin, M., Alkaline Proteases: A Review, Bioresource Technology 64 (1998) 175-183.
3. Banerjee, U.C., Sani,R.K., Azmi, W., Soni, R., Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive, Process Biochemistry 35 (1999) 213-219.
4. Beg, Q.K., Gupta, R., Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavenis*, Enzyme and Microbial Technology, 32: 294-304, 2003.
5. Blanc, M., Marilley, L., Beffa, T., Aragno, M., Thermophilic bacterial communities in hot compost as revealed by most probable number counts and molecular (16S rDNA) methods, FEMS Microbiology Ecology, 28, 141-149, 1999.
6. Demirjian, D.C., Moris-Varas, F., Cassidy, C.S., Enzymes from extremophiles, Current Opinion in Chemical Biology, 2001, 5:144-151.
7. Duarte, G.F., Rosado A. S., Seldin, L., Wolters, A.C.K., van Elsan, J.D., Extraction of ribosomal RNA and genomik DNA from soil for studying the diversity of the indigenous bacterial community, Journal of Microbiological Methods 32: 21-29, 1998.
8. Durham, D.R., Stewart, D.B., Stellwag, E.J., Novel alkaline and heat-stable serine proteases from alkalophilic *Bacillus* sp. Strain GX 6638, Journal of Bacteriology, 169: 2762-2768, 1987.
9. Ferrero, M.A., Castro, G.R., Abate, C.M., Baigori, M.D., Sineriz, F., Thermostable alkaline proteases of *Bacillus licheniformis* MIR 29: isolation, production and characterization, Applied Microbial Biotechnology (1996) 45: 327-332.
10. Gessesse, A., and Berhanu, A.G., Production of alkaline protease by an alkaliphilic bacteria isolated from an alkaline soda lake, Biotechnology Letters, Vol. 19, No. 5,

11. Gessesse, A., Hatti-Kaul, R., Gashe B.A., Mattiasson, B., Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather, *Enzyme and Microbial Technology*, 6520 (2002) 1-6.
12. Gupta, R., Beg, Q.K., Lorenz, P., Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications, *Applied Microbial Biotechnology*, (2002) 59:15-22
13. Haki, G.D., Rakshit, S.K., Developments in industrially important thermostable enzymes: a review, *Bioresource Technology*, 89 (2003) 17-34.
14. Hawumba, J. F., Theron, J., Brozel, V.S., Thermophilic Protease producing *Geobacillus* from Buranga Hot Springs in Western Uganda, *Current Microbiology*, Vol. 45, 144-150, 2002.
15. Hill, G.T., Mitkowski, N.A., Aldrich-Wolfe, L., Emele, L.R., Jurkonie, D.D., Ficke, A., Ramirez, S.R., Lynch, S.T., Nelson, E.B., Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities, *Applied Soil Ecology*, 15: 25-36, 2000.
16. Horikoshi, K., Alkaliphiles- from an industrial point of view, *FEMS Microbiology Reviews*, 18 (1996) 259-270.
17. Horikoshi, K., Alkaliphiles: Some Applications of Their Products for Biotechnology, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1999, p.735-750
18. Horikoshi, K., Discovering novel bacteria, with an eye to biotechnological applications, *Current Opinion in Biotechnology*, 1995, 6: 292-297
19. Hough, D.W. and Danson, M.J., Extremozymes, *Current Opinion in Chemical Biology* 1999, 3: 39-46
20. Huang, Q., Peng, Y., Li, X., Wang, H., Zhang, Y., Purification and Characterization of an Extracellular Alkaline Serine Protease with Dehairing Function from *Bacillus pumilus*, *Current Microbiology*, Vol. 46, 2003, 169-173.
21. Ito, S., Kobayashi, T., Ara, K., Ozaki, K., Kawai, S., Hatada, Y., Alkaline detergent enzymes from alkaliphiles: enzymatic properties, genetics, and structures, *Extremophiles* (1998) 2:185-190.

22. Johnvesly, B., Naik, G.R., Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium, *Process Biochemistry* 37 (2001) 139-144.
23. Joo, H.-S., Kumar, C.G., Park, G.-C., Paik, S.R., Chang, C.-S., Oxidant and SDS-stable alkaline protease from *Bacillus clausii* I-52: production and some properties, *Journal of Applied Microbiology*, 2003, 95, 267-272.
24. Joo, H.-S., Kumar, C.G., Park, G.-C., Kim, K.T., Paik, S.R., Chang, C.-S., Optimization of the production of an extracellular alkaline protease form *Bacillus horikoshii*, *Process Biochemistry*, 38, 2002, 155-159
25. Joo, H.-S., Kumar, C.G., Park, G.-C., Paik, S.R., Chang, C.-S., Bleach-resistant alkaline protease produced by a *Bacillus* sp. Isolated from the Korean polychaete, *Periserrula leucophryna*, *Process Biochemistry*, 2004, Article in Press.
26. Kanekar, P.P., Nilegaonkar, S.S., Sarnaik, S.S., Kelkar, A.S., Optimization of protease activity of alkaliphilic bacteria isolated from an alkaline lake in India, *Bioresource Technology*, 85: 87-93, 2002.
27. Kim, H.-K., Ha, Y.-R., Yu, H.-S., Kong, H.-H., Chung, D.-I., Purification and characterization of a 33 kDa serine protease from *Acanthamoeba lugdunensis* KA/E2 isolated from a Korean keratitis patient, *The Korean Journal of Parasitology*, Vol. 41, No. 4, 189-196, 2003.
28. Kirk, O., Borchert, T.V., Fuglsang, C. C., Industrial enzyme applications, *Current Opinion in Biotechnology* (2002) 13: 345-351
29. Kumar, C.G., Takagi, H., Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint, *Biotechnology Advances* 17 (1999) 561-594
30. Kumar, C.G., Tiwari, M.P., Jany, K.D., Novel alkaline serine proteases from alkalophilic *Bacillus* spp.: purification and some properties, *Process Biochemistry* 34 (1999) 441-449.
31. Lawler, D., Smith, S., Enzyme-producing strain of *Bacillus subtilis*, United States Patent 6,140,106, 1999
32. Lim, D., Ch 2. Cell Morphology and Microscopy, p.17–41, *Microbiology*, 2. Edition, WCB/ McGraw-Hill, Boston, USA, 1998.

33. Llarch, A., Logan, N.A., Prieton, M.J., Guinea, J. Isolation and characterization of thermophilic *Bacillus* spp. from geothermal environments on deception island, South Shetland Archipelago. *Microbial Ecology* 1997;34:58-65.
34. Mannachini, P.L., and Fortina, M.G., Production in seawater of thermostable alkaline protease by a halotolerant strain of *B. licheniformis*, *Biotechnology Letters*, Vol. 20, No. 6., 565-568,1998.
35. Maurer, K-H., Detergent Proteases, *Current Opinion in Biotechnology*, 2004, 15: 1-5.
36. Mehrotra, S., Pandey, P.K., Gaur, R., Darmwal, N.S., The production of alkaline protease by a *Bacillus* species isolate, *Bioresource Technology*, 67, (1999) 201-203.
37. Michaud, D., Gel electrophoresis of proteolytic enzymes, *Analytica Chimica Acta* 372, 173-185, 1998.
38. Mora, D., Fortina, M.G., Nicastro, G., Parini, C., Manachini, P.L., Genotypic Characterization of thermophilic bacilli: a Study on new soil isolates and several reference strains, *Resources Microbiology*, 149, 711-719,1998.
39. Nakiboglu, N., Toscali, D., Yasa, I., Silver Recovery from Waste Photographic Films by an Enzymatic Method, *Turkish Journal of Chemistry*, 25 (2001), 349-353.
40. Ntougias, S and Russell, N., *Bacillus* sp. WW3-SN6, a novel facultatively alkaliphilic bacterium isolated from the washwaters of edible olives, *Extremophiles*, 4: 201-208, 2000.
41. Okamoto, M., Yonejima, Y., Tsujimoto, Y., Suzuki, Y., Watanabe, K., A thermostable collagenolytic protease with a very large molecular mass produced by thermophilic *Bacillus* sp. Strain MO-1, *Applied Microbiological Biotechnology*, 2001, 57: 103-108.
42. Pagano, M., Application of electrophoresis and related methods, such as western blotting and zymography to the study of some proteins and enzymes, *Analytica Chimica Acta* 383,119-125, 1999.
43. Primrose, S., Twyman, R., Old, B., Ch2. Basic Techniques, p.8-25, *Principles of Gene Manipulation*, 6th. Ed., Blackwell Science Publishing, London, 2001.

44. Rao M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V., Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1998, p. 597-635.
45. Sacchi, C.T., Whitney, A.M., Mayer, L. W., Morey, R., Steigerwalt, A., Boras, A., Weyant, R.S., Popovic, T., Sequencing of 16S rRNA Gene: A Rapid Tool for Identification of *Bacillus anthracis*, Emerging Infectious Diseases, Vol. 8, No.10, 2002.
46. Saeki K., Okuda, M., Hatada, Y., Kobayashi, T., Ito, S., Takami, H., Horikoshi, H., Novel oxidatively stable subtilisin-like serine protease from Alkaliphilic *Bacillus* spp.: Enzymatic Properties, Sequence and Evolutive Relationships, Biochemical and Biophysical Research Communications, 279,313-319, 2000.
47. Schmidt, B.F., Woodhouse, L., Adanus, R.M., Ward, T., Mainzer, S.E., Lad, P.J., Alkaliphilic *Bacillus* sp. Strain LG12 has a Series of Serine protease genes, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 61, No. 12, 4490-4493,1995.
48. Singh, J., Batra, N., Sobti, R.C., Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1, Process Biochemistry 36 (2001) 781-785.
49. Singh, J., Vohra, R.M., Sahoo, D.K., Alkaline protease from a new obligate alkalophilic isolate of *Bacillus sphaericus*, Biotechnology Letters, 21:921-924, 1999.
50. Singh, J., Vohra, R.M., Sahoo, D.K., Purification and characterization of two extracellular alkaline proteases from a newly obligate alkalophilic *Bacillus sphaericus*, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2001, 26, 387-393.
51. Sneath, P.H.A., Section 13. Endospore-forming Gram-positive Rods and Cocci, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Baltimore, Williams&Wilkins, 1104-1339
52. Stackebrandt, E. And Lang, E., Molecular Detection and Identification of Prokaryotes, OECD Workshop-Molecular Methods for Safe Drinking Water, Interlaken, 1998.
53. Tanner, M.A., Coleman, J., Everett, C.L., Robles, S.J., Dilworth, M.R., Yang,

M.M., Youvan, D., Multispectral Bacterial Identification, Biotechnology et alia, 6: 1-9, 1995.

54. Towatana, N., H., Painupong, A., Sutinanalart, P., Purification and Characterization of an Extracellular Protease from Alkaliphilic and Thermophilic *Bacillus* sp. PS719, Journal of Bioscience and Bioengineering, 1999, Vol. 87, No. 5, 581-587.
55. Tuzlakoglu, M., Balcı, H., Battal, M., Gökmen, F., Öztürk, İ.S., Artunkal, S., ve Gümüşel, F., Yerel kaynaklardan endüstriyel enzim üreticisi bakteri soylarının seçilmesi ve tanımlanmasına yönelik çalışmalar, XIII.Biyoteknoloji Kongresi, Çanakkale, 2003.
56. van den Burg, B., Extremophiles as a source form novel enzymes, Current Opinion in Microbiology, 6: 213-218, 2003.
57. van der Laan, R., Gerritse, G., Mulleners, L.J.S.M., van der Hook, R.A.C., Quax, W.J., Cloning, characterization and multiple chromosomal integration of a *Bacillus* Alkaline Protease, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 57, No. 4, 901-909, 1991.

# ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında İstanbul’da doğdu. Boğaziçi Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’den 2001 yılında mezun oldu. Aynı yıl Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Ana Bilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı. Halen GYTE’de yüksek lisans eğitimine devam etmekle birlikte araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.

|                                                                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. GİRİŞ                                                                                                                                | 1  |
| 1.1. Proteaz Kaynakları                                                                                                                 | 2  |
| 1.1.1. Bitkisel Kaynaklı Proteazlar                                                                                                     | 2  |
| 1.1.2. Hayvansal Kaynaklı Proteazlar                                                                                                    | 3  |
| 1.1.3. Mikrobiyal Proteazlar                                                                                                            | 3  |
| 1.2. Proteazların Sınıflandırılması                                                                                                     | 6  |
| 1.2.1. Ekzopeptidazlar                                                                                                                  | 6  |
| 1.2.2. Endopeptidazlar                                                                                                                  | 7  |
| 1.2.2.1. Serin Proteazlar                                                                                                               | 7  |
| 1.2.2.2. Aspartik Proteazlar                                                                                                            | 9  |
| 1.2.2.3. Sistein Proteazlar                                                                                                             | 9  |
| 1.2.2.4. Metalloproteazlar                                                                                                              | 9  |
| 1.3. Bakteriyel Proteazlar                                                                                                              | 10 |
| 1.4. Alkalen Proteazların Uygulama Alanları                                                                                             | 10 |
| 1.4.1. Gıda Endüstrisi                                                                                                                  | 10 |
| 1.4.2. Deri Sanayi                                                                                                                      | 11 |
| 1.4.3. Atık Yönetimi                                                                                                                    | 11 |
| 1.4.4. İpek Endüstrisi                                                                                                                  | 12 |
| 1.4.5. Deterjan Endüstrisi                                                                                                              | 14 |
| 1.5. Yeni Proteazların Bulunması                                                                                                        | 14 |
| 1.6. Alkalofilik Organizmaların İzolasyonu ve Alkalen Proteaz Üreticisi Soyların Seçilmesi                                              | 16 |
| 1.7. <i>Bacillus</i> Cinsi                                                                                                              | 18 |
| 1.7.1. Hücre Morfolojisi                                                                                                                | 18 |
| 1.7.2. Koloni Özellikleri                                                                                                               | 18 |
| 1.7.3. <i>Bacillus</i> Türlerinin İzolasyonu                                                                                            | 19 |
| 1.8. <i>Bacillus</i> Soylarının Tiplendirilmesi                                                                                         | 19 |
| 1.9. Tezin Amacı                                                                                                                        | 22 |
| 2. GEREÇ VE YÖNTEMLER                                                                                                                   | 23 |
| 2.1. Gereçler                                                                                                                           | 23 |
| 2.1.1. Sarf Malzemeleri                                                                                                                 | 23 |
| 2.1.2. Kullanılan Cihazlar                                                                                                              | 25 |
| 2.1.3. Besi Yerleri                                                                                                                     | 26 |
| 2.2. Yöntemler                                                                                                                          | 28 |
| 2.2.1. Örneklerin Toplanması                                                                                                            | 28 |
| 2.2.2. Primer İzolasyon                                                                                                                 | 29 |
| 2.2.2.1. Su Örnekleri                                                                                                                   | 29 |
| 2.2.2.2. Toprak Örnekleri                                                                                                               | 29 |
| 2.2.3. Alkalen Proteaz Üreticisi Yerel <i>Bacillus</i> Soylarının Seçilmesi                                                             | 30 |
| 2.2.4. Alkalen Proteaz Üreticisi Yerel <i>Bacillus</i> Soylarının Ön Tiplendirilmesi                                                    | 30 |
| 2.2.5. API ve VITEK Sistemleri ile Tiplendirme Çalışmaları                                                                              | 34 |
| 2.2.6. - 20 °C ve - 80 °C Hücre Stoklarının Hazırlanması                                                                                | 34 |
| 2.2.7. Saflaştırılan Soyların Hücre Dışı Alkalen Proteaz Aktivitelerinin Sıvı Kültürlerde Çalışılması ve Enzim Üretiminin Optimizasyonu | 35 |
| 2.2.8. Hücre Yoğunluğunun Ölçülmesi                                                                                                     | 35 |
| 2.2.9. Üst Sıvıda Alkalen Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi                                                                            | 36 |
| 2.2.9.1. Alkalen Proteaz Aktivite Testi                                                                                                 | 36 |

|                                                                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.2.9.2. Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması                                                                                                     | 36 |
| 2.2.9.3. Enzim Aktivitesinin Hesaplanması                                                                                                       | 37 |
| 2.2.10. Enzim Ön Nitelendirme Çalışmaları                                                                                                       | 37 |
| 2.2.11. SDS-Poliakrilamit Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ve Zimogram                                                                              | 39 |
| 2.2.11.1. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi                                                                                                   | 39 |
| 2.2.11.2. Jelatin Zimogram Analizi                                                                                                              | 40 |
| 2.2.12. Moleküler Tiplendirme için Ön Hazırlıklar                                                                                               | 41 |
| 2.2.12.1. 16S rDNA Dizi Analizi için Genomik DNA İzolasyonu                                                                                     | 41 |
| 2.2.12.2. 16S rDNA Genlerinin PCR ile Çoğaltımı                                                                                                 | 44 |
| 3. BULGULAR                                                                                                                                     | 47 |
| 3.1. Alkalen Proteaz Üreticisi <i>Bacillus</i> Soylarının Seçilmesi ve Ön Tiplendirmesi                                                         | 47 |
| 3.2. Ön Tiplendirmeleri Yapılan <i>Bacillus</i> Soylarının Sıvı Besi Yerinde Hücre Dışı Enzim Üretkenliğinin Değerlendirilmesi ve Optimizasyonu | 49 |
| 3.3. API ve VITEK Sistemleriyle Tiplendirme Sonuçları                                                                                           | 56 |
| 3.4. P21 Soyu 16S rDNA'sının PCR ile Çoğaltımı                                                                                                  | 58 |
| 3.5. Enzim Ön Nitelendirme Çalışmaları                                                                                                          | 58 |
| 3.6. SDS-Poliakrilamit Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ve Zimogram Sonuçları                                                                       | 60 |
| 4. TARTIŞMA VE SONUÇ                                                                                                                            | 62 |
| KAYNAKLAR                                                                                                                                       | 68 |
| ÖZGEÇMİŞ                                                                                                                                        | 74 |