

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Bacillus* sp. EBTA6 İLE PROTEAZ ÜRETİMİNİN
OPTİMİZASYONU VE ENZİMİN ENDÜSTRİYEL
KULLANIM OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Selin DEMİR

Enstitü Anabilim Dalı : GIDA MÜHENDİSLİĞİ

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Ayşe AVCI

Kasım 2020

BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

Selin DEMİR

TEŞEKKÜR

Severek seçtiğim bölümü bana daha da sevdiren, hanımefendi kişiliğiyle her zaman örnek olan, tez sürecimin tüm aşamalarında benden değerli zamanımı esirgemeyen, tez konusu seçiminden başlayarak plan ve program çerçevesinde laboratuvar çalışmalarımın dizaynında bana yol gösteren, hatalarımı farkederek eksikliklerimi tamamlamamı sağlayan, en yeni fikirlerini, engin bilgi birikimini ve tecrübelerini fedakarca paylaşarak yönlendiren, tez yazım aşamasında da beni yalnız bırakmayarak benimle irtibat halinde olan, aynı ortamlarda öğrencisi olmaktan büyük onur ve şeref duyduğum, hem lisans hem de yüksek lisans yaparken danışmanım olan çok değerli hocam Doç. Dr. Ayşe AVCI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarında uygulamalardaki yardımları ile bana katkıda bulunarak, ihtiyaç duyduğumda yardımlarını esirgemeyen, öğretmekten büyük keyif alan sayın Arş. Gör. Fikriye Alev AKÇAY hocama; manevi olarak destek aldığım, akademik hayatımda ilerlemem için beni teşvik eden sayın Doç. Dr. Hüseyin PEHLİVAN ve Prof. Dr. Serap COŞANSU AKDEMİR hocalarıma teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan, yüksek lisans eğitimimde de benden maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, her zaman arkamda duran, biricik ailem; babam Habip DEMİR, annem Sevgi DEMİR, dayım Fatih Mehmet BULDUKER, ablam Selvi DEMİR BEYAZKILIÇ ve en büyük neşe kaynağım yeğenim Nil BEYAZKILIÇ'a şükranlarımı sunarım.

Ayrıca bu çalışmanın maddi olarak desteklenmesine imkan veren Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyon Başkanlığına (Proje No: 2020-7-24-34) teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
TABLolar LİSTESİ	xi
ÖZET	xiii
SUMMARY	xiv
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2.	
LİTERATÜR ÖZETİ	4
2.1. Enzimler	4
2.2. Proteazlar	5
2.2.1. Proteazların sınıflandırılması	6
2.2.2. Proteaz enziminin kullanım alanları	9
2.3. Mikrobiyal Kaynaklı Proteazlar	12
2.3.1. <i>Bacillus</i> cinsi bakteriler ile proteaz üretimi	15
2.4. Yanıt Yüzey Yöntemi	17
2.4.1. Merkezi kompozit dizaynı	18
BÖLÜM 3.	
MATERYAL VE YÖNTEM	19
3.1. Materyal	19
3.1.1. Mikroorganizmalar	19

3.1.2. Kullanılan cihazlar	20
3.1.3. Besiyerleri	20
3.1.4. Kimyasallar ve çözeltiler	21
3.2. Yöntem	23
3.3. Tarama Çalışması	23
3.4. Proteaz Enzimi Üretimi	23
3.4.1. İnokulum hazırlama ve inokülasyon	23
3.4.2. “Design Expert” programı kullanılarak yanıt yüzey yöntemi ile fermantasyon parametrelerinin optimizasyonu	24
3.4.3. İstatistiksel analiz	26
3.4.4. Konfirmasyon (doğrulama) deneyi	26
3.5. Proteaz Aktivitesi Tayini	27
3.5.1. Tirozin standart grafiğinin hazırlanması	27
3.6. Mikroorganizma Gelişiminin Ölçümü	29
3.7. Enzim Özellikleri	30
3.7.1. Proteaz enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi ...	30
3.7.2. Proteaz enziminin sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi ...	30
3.7.3. Proteaz enziminin optimum pH’sının belirlenmesi	31
3.7.4. Proteaz enziminin pH stabilitesinin belirlenmesi	31
3.7.5. Proteolitik enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının, amino asit inhibitörlerinin ve yüzey aktif maddelerin etkisinin belirlenmesi	32
3.7.6. Proteaz enziminin Michaelis Menten kinetik sabitlerinin belirlenmesi	33
3.8. Uygulama Alanları	34
3.8.1. Süt pıhtılaştırma aktivitesinin belirlenmesi	34
3.8.2. Leke çıkarma çalışmaları	35

BÖLÜM 4.

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Tarama Çalışması Bulguları	37
---------------------------------------	----

4.1.1. Proteaz üreten suşların taraması ve proteaz aktivitesi ...	37
4.2. “Design Expert” Programı Kullanılarak Yanıt Yüzey Yöntemi (RSM) ile Fermantasyon Parametrelerinin Optimizasyonu ...	40
4.2.1. Bağımsız değişkenlerin enzim aktivitesi üzerine etkilerinin modellenmesi	41
4.2.2. Bağımsız değişkenlerin mikroorganizma gelişmesi üzerine etkilerinin modellenmesi	49
4.2.3. Optimizasyon ve konfirmasyon (doğrulama) deneyi	53
4.2.3.1. Proteaz üretimi için modelin konfirmasyonu	54
4.2.3.2. Mikroorganizma gelişmesi için modelin konfirmasyonu	55
4.3. <i>Bacillus</i> izolatı EBTA6 Suşundan Elde Edilen Proteaz Enziminin Birtakım Özelliklerinin İncelenmesi	56
4.3.1. Proteaz enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi	56
4.3.2. Proteaz enziminin sıcaklık stabilitesi	58
4.3.3. Proteaz enzim aktivitesine pH'nın etkisi	61
4.3.4. Proteaz enziminin pH stabilitesi	63
4.3.5. Proteolitik enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının, amino asit inhibitörlerinin ve yüzey aktif maddelerin etkisinin belirlenmesi	65
4.3.5.1. Farklı metal iyonlarının proteaz aktivitesi üzerindeki etkisi.....	65
4.3.5.2. İnhibitörlerin proteaz aktivitesi üzerindeki etkisi	68
4.3.5.3. Yüzey aktif maddelerin proteaz aktivitesi üzerindeki etkisi	70
4.3.6. Proteaz enziminin Michaelis Menten kinetik sabitleri ...	72
4.4. Uygulama Alanları	74
4.4.1. Süt pıhtılaştırma aktivitesi	74
4.4.2. Leke çıkarma çalışmaları	77

BÖLÜM 5.	
SONUÇLAR VE ÖNERİLER	81
KAYNAKLAR	84
ÖZGEÇMİŞ	101

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

a	: Ağırlık
CaCl ₂	: Kalsiyum klorür
CCD	: Merkezi kompozit dizaynı
cm	: Santimetre
CuSO ₄ .5H ₂ O	: Bakır (II) sülfat penta hidrat
°C	: Santigrat derece
dk	: Dakika
EC	: Enzim komisyonu
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
g	: Gram
GRAS	: Genel olarak güvenli kabul edilir
h	: Hacim
HCl	: Hidroklorik asit
KCl	: Potasyum klorür
K _m , V _{max}	: Michaels Menten kinetik sabitleri
L	: Litre
M	: Molar
MCA	: Süt pıhtılaştırma aktivitesi
mg	: Miligram
MgSO ₄ .7H ₂ O	: Magnezyum sülfat hepta hidrat
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre

N	: Normalite
NA	: Nutrient agar
NaOH	: Sodyum hidroksit
NB	: Nutrient broth
nm	: Nanometre
pH	: Pondus hidrojeni
PMSF	: Fenil metil sülfonil florür
rpm	: Bir dakikadaki devir sayısı
RSM	: Yanıt yüzey yöntemi
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SMA	: Yağsız süt tozu
SnCl ₂	: Kalay (II) klorür
sp.	: Alt tür
TCA	: Tri kloro asetik asit
TD1	: Ticari deterjan 1
TD2	: Ticari deterjan 2
Tris	: Trihidroksimetil aminometan
U	: Ünite
UHT	: Uzun ömürlü
UV-VIS	: Mor ötesi – görünür bölge
YE	: Maya özütü
ZnSO ₄ .7H ₂ O	: Çinko sülfat hepta hidrat

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Enzimlerin sınıflandırılması ve EC kodları	5
Şekil 2.2.	Proteazların sınıflandırılması ve EC kodları	6
Şekil 2.3.	<i>Bacillus</i> sp.'nin hücre yapısı	15
Şekil 3.1.	<i>Bacillus</i> sp. EBTA6 izolatı; a) Gliserol içeren eppendorf tüplerinde muhafazası, b) NA besiyerinde gelişimi, c) NB besiyerinde gelişimi	23
Şekil 3.2.	Tirozin Standart Eğrisi	29
Şekil 3.3.	Modifiye besiyerinde proteaz üretimine tabi tutulan <i>Bacillus</i> sp. EBTA6 izolatının gelişmesi; a) 0. saat kör okuma, b) 24. saat sonu, c) 48. saat sonu	29
Şekil 3.4.	Leke giderimi deneyi; a) Boyanmamış parçalar b) Kan Lekesi ile boyanmış parçalar, c) Ketçap Lekesi ile boyanmış parçalar	36
Şekil 4.1.	24 saat sonunda yağsız süt tozu içeren besiyerinde geliştirilen <i>Bacillus</i> izolatlarının kazein hidrolizi ile oluşturdukları şeffaf zonlar	37
Şekil 4.2.	48 saat sonunda yağsız süt tozu içeren besiyerinde geliştirilen <i>Bacillus</i> izolatlarının kazein hidrolizi ile oluşturdukları şeffaf zonlar	38
Şekil 4.3.	<i>Bacillus</i> sp. EBTA6 tarafından proteaz üretimi için tahmin edilene karşı gerçek yanıt grafiği	43
Şekil 4.4.	<i>Bacillus</i> sp. EBTA6 tarafından proteaz üretimi üzerine farklı değişkenlerin etkisini gösteren 3D etkileşimli yanıt yüzey grafikleri; a) İnkübasyon sıcaklığı (°C) ve başlangıç pH'sı, b) İnkübasyon sıcaklığı (°C) ve maya özütü konsantrasyonu (g/L), c) Maya özütü konsantrasyonu (g/L) ve başlangıç pH'sı	45

Şekil 4.5.	<i>Bacillus</i> sp. EBTA6 tarafından proteaz üretimi için validasyon deneyinin kontur grafikleri; a) İnkübasyon sıcaklığı (°C) ve başlangıç pH'sı, b) İnkübasyon sıcaklığı (°C) ve maya özütü konsantrasyonu (g/L), c) Maya özütü konsantrasyonu (g/L) ve başlangıç pH'sı	46
Şekil 4.6.	<i>Bacillus</i> sp. EBTA6 tarafından mikroorganizma gelişmesi için tahmin edilene karşı gerçek yanıt grafiği	50
Şekil 4.7.	<i>Bacillus</i> sp. EBTA6 tarafından mikroorganizma gelişmesi üzerine farklı değişkenlerin etkisini gösteren 3D etkileşimli yanıt yüzey grafikleri; a) İnkübasyon sıcaklığı (°C) ve başlangıç pH'sı, b) İnkübasyon sıcaklığı (°C) ve maya özütü konsantrasyonu (g/L)	51
Şekil 4.8.	<i>Bacillus</i> sp. EBTA6 tarafından mikroorganizma gelişmesi için validasyon deneyinin kontur grafikleri; a) İnkübasyon sıcaklığı (°C) ve başlangıç pH'sı, b) İnkübasyon sıcaklığı (°C) ve maya özütü konsantrasyonu (g/L)	52
Şekil 4.9.	<i>Bacillus</i> sp. EBTA6'dan elde edilen proteaz enziminin sıcaklık profili	57
Şekil 4.10.	<i>Bacillus</i> sp. EBTA6'dan elde edilen proteaz enziminin 50°C'deki sıcaklık kararlılığı	59
Şekil 4.11.	<i>Bacillus</i> sp. EBTA6'dan elde edilen proteaz enziminin 60°C'deki sıcaklık kararlılığı	59
Şekil 4.12.	<i>Bacillus</i> sp. EBTA6'dan elde edilen proteaz enziminin pH profili .	62
Şekil 4.13.	<i>Bacillus</i> sp. EBTA6'dan elde edilen proteaz enziminin pH kararlılığı	64
Şekil 4.14.	<i>Bacillus</i> sp. EBTA6'dan elde edilen proteaz enziminin değişen kazein substratı konsantrasyonları ile elde edilmiş Lineweaver-Burk grafiği	72
Şekil 4.15.	<i>Bacillus</i> sp. EBTA 6'dan elde edilen proteazın çeşitli CaCl ₂ (20-30-40-50-100 mM) konsantrasyonlarında süt pıhtılaştırması	75
Şekil 4.16.	Çeşitli CaCl ₂ konsantrasyonlarının (20-30-40-50-100 mM), <i>Bacillus</i> sp. EBTA6 izolatından elde edilen 0,2 mL proteaz enziminin MCA'sına etkisi	76

- Şekil 4.17. *Bacillus* sp. EBTA 6'nın ürettiği alkali proteazın, patiska kumaşındaki kan lekesi üzerine uygulanarak, deterjanlar ve kontrol 1-2'ye karşı yıkama performansının incelenmesi 78
- Şekil 4.18. *Bacillus* sp. EBTA 6'nın ürettiği alkali proteazın, patiska kumaşındaki ketçap lekesi üzerine uygulanarak, deterjanlar ve kontrol 1-2'ye karşı yıkama performansının incelenmesi 79

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1.	Endüstriyel açıdan önemli proteaz üreten mikroorganizmaların bazıları ile ilgili çalışmalar ve uygulanabilir alanları	11
Tablo 2.2.	<i>Bacillus</i> izolatları ile yapılan çeşitli çalışmalar ile alkalın proteazın özellikleri	16
Tablo 3.1.	Çalışmada kullanılan farklı kaynaklardan elde edilmiş izolatlar	19
Tablo 3.2.	Kullanılan Araç-Gereçler ile Markaları ve Modelleri	20
Tablo 3.3.	<i>Bacillus</i> sp. EBTA6 tarafından proteaz üretimi için deney aralığı ve kodlanmış proses değişkenleri	24
Tablo 3.4.	<i>Bacillus</i> sp. EBTA6 izolatının merkezi kompozit dizaynı (CCD) ile proteaz üretimi ve mikroorganizma gelişmesi için deneysel tasarımı	25
Tablo 3.5.	Tirozin standart grafiğinin belirli konsantrasyonlarda hazırlanması ve 280 nm absorbansta okunması	28
Tablo 3.6.	Proteaz enziminin optimum pH ve pH stabilitesinin belirlenmesi için kullanılan tampon çözeltiler	31
Tablo 3.7.	Michaelis-Menten kinetiğinin belirlenmesi için hazırlanan kazein çözeltileri	33
Tablo 3.8.	Leke çıkarma çalışmalarında uygulanan deney dizaynı	36
Tablo 4.1.	SMA besiyerinde 33°C’de 24 ve 48 saat inkübe edilen <i>Bacillus</i> sp. suşlarının gelişimleri ve zon çapları	39
Tablo 4.2.	<i>Bacillus</i> sp. EBTA6 izolatının yanıt yüzey yöntemi için kullanılan merkezi kompozit dizaynı faktörleri ve 48 saat sonunda proteaz üretimi ile mikroorganizma gelişmesi için yanıtları	41
Tablo 4.3.	<i>Bacillus</i> sp. EBTA6 izolatının proteaz üretiminde enzim aktivitesi için merkezi kompozit dizaynı ile istatistiksel analizi	42
Tablo 4.4.	<i>Bacillus</i> sp. EBTA6 izolatının mikroorganizma gelişmesi için merkezi kompozit dizaynı ile istatistiksel analizi	49

Tablo 4.5.	Merkezi kompozit dizaynı ile <i>Bacillus</i> sp. EBTA6 tarafından proteaz üretimi ve mikroorganizma gelişmesi için 26 adet optimizasyon sonucu	54
Tablo 4.6.	<i>Bacillus</i> sp. EBTA6 izolatu ile proteaz üretimi için doğrulama testi .	55
Tablo 4.7.	<i>Bacillus</i> sp. EBTA6 izolatu ile mikroorganizma gelişmesi için doğrulama testi	56
Tablo 4.8.	<i>Bacillus</i> sp. EBTA6'dan elde edilen proteaz enzimi üzerine metal iyonlarının etkisi	66
Tablo 4.9.	<i>Bacillus</i> sp. EBTA6'dan elde edilen proteaz enzimi üzerine amino asit inhibitörlerinin etkisi	68
Tablo 4.10.	<i>Bacillus</i> sp. EBTA6'dan elde edilen proteaz enzimi üzerine yüzey aktif maddelerinin etkisi	70

ÖZET

Anahtar kelimeler: *Bacillus*, Proteaz, Enzim üretimi, Yanıt yüzey yöntemi

Bu çalışmada, çeşitli toprak ve gıda örneklerinden izole edilmiş olan 32 adet *Bacillus* izolatının proteaz üretimi araştırılmış ve en iyi üretici izolatlardan biri olan *Bacillus* sp. EBTA6 seçilerek proteaz üretiminin optimizasyonu yapılmış ve enzimin özellikleri ile bazı endüstriyel uygulama olanakları belirlenmiştir. Enzim üretiminin optimizasyonu, yanıt yüzey yöntemi (RSM) tabanlı merkezi kompozit dizaynı (CCD) ile yapılmıştır. Bu amaçla, üç önemli bağımsız değişken (pH, sıcaklık, maya özütü konsantrasyonu) ve bağımlı yanıt değişkenleri (enzim aktivitesi, mikroorganizma gelişmesi) belirlenmiştir. Optimizasyon sonucunda; bağımsız değişkenlerin hepsinin enzim üretimi için; maya özütü konsantrasyonu ve sıcaklığın ise mikroorganizma gelişmesi için anlamlı faktörler olduğu belirlenmiştir. Optimum üretim 30°C, pH 9, 15 g/L maya özütü konsantrasyonunda olmuş ve bu koşullarda, proteaz aktivitesi 3207,01 U/mL olarak belirlenmiştir. CCD ile ortam bileşenlerinin ve kültür koşullarının optimizasyonunun ardından *Bacillus* sp. EBTA6 tarafından proteaz üretiminde 2,6 kat artış gözlemlenmiştir. Enzimin optimum sıcaklık ve pH'sının sırasıyla 50-60°C ve 8 olduğu tespit edilmiştir. Enzimin pH 7-10 gibi geniş bir pH aralığında kararlı (% 82-93) olduğu gözlenmiştir. Enzim, 50°C'de bağıl aktivitesinin %55'ini 150 dakika süreyle koruyabilmiştir. Metal iyonlarından; K⁺, Cu²⁺, Sn²⁺ ve Zn²⁺'nin çok düşük oranda inhibe edici, Ca²⁺ ve Mg²⁺'nin ise aktiviteyi artırıcı etkisi olmuştur. EDTA, PMSF ve SDS enzim aktivitesini düşürmüş, Tween 20 ve Tween 80 ise etkilememiştir. Ham enzimin K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 2,762 mg/mL ve 3125 U/mL olarak belirlenmiştir. CaCl₂ varlığında enzim önemli oranda süt pıhtılaşma aktivitesi göstermiştir. Yıkama performansı analizinde kan ve ketçap gibi çeşitli lekeleri etkili bir şekilde 50°C'de çıkarabildiği gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmalar *Bacillus* sp. EBTA6'nın ürettiği proteazın serin alkalın özellikte ve endüstriyel kullanım potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir.

OPTIMIZATION OF PROTEASE PRODUCTION BY *Bacillus* sp. EBTA6 AND INVESTIGATION OF INDUSTRIAL APPLICATION POTENTIALS OF THE ENZYME

SUMMARY

Keywords: *Bacillus*, Protease, Enzyme production, Response surface method

In this study, 32 *Bacillus* isolates, that were previously isolated from soil and food samples, were screened for protease production and one of the best producers, *Bacillus* sp. EBTA6, was selected for the optimization of protease production and the determination of the properties of the enzyme as well as the industrial applications. Central Composite Design (CCD) of Response Surface Methodology was used for the optimization. For that purpose, three important independent variables (pH, temperature and yeast extract) and two dependent variables (protease activity and growth) have been determined. The results showed that all of the independent factors have significant effect on the enzyme activity and yeast extract concentration and temperature had significant effect on the growth. Optimum conditions for protease production were determined as 30°C, pH 9, and 15 g/L yeast extract concentration with the activity of 3207,01 U/mL. A 2,6 times increment in the activity have been achieved after the optimization. The optimum pH and temperature of the enzyme was determined as 8 and 50-60°C, respectively. The enzyme was stable at a broad pH range between 7 and 10 (82-93 %). It retained 55% of its activity at 50°C in 150 min. Amongst the metal ions, K⁺, Cu²⁺, Sn²⁺ and Zn²⁺ slightly inhibited the activity while Ca²⁺ and Mg²⁺ increased it. EDTA, PMSF and SDS have decreased the the activity, on the other hand Tween 20 and Tween 80 did not effect it. K_m and V_{max} values of the enzyme were deterimed as 2,762 mg/mL and 3125 U/mL, respectiely. It possessed considerably high milk clotting activity in the presence of CaCl₂. Washing performance of the enzyme which were tested on blood and ketchup stains showed that it was quite effective at 50°C. The studies have revealed that the protease from *Bacillus* sp. EBTA6 was serin alkaline and had industrial potential.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Enzimler canlı sistemler tarafından sentezlenen son derece verimli biyolojik makromoleküllerdir. Çok çeşitli analitik, bilimsel, endüstriyel uygulamaları nedeniyle araştırmacıların ilgisini çekmektedir. Mikrobiyal enzimler, ekonomik üretimleri, uygun kullanımları, reaksiyon ortamından kolay geri kazanımları, substrat özgüllüğü, yüksek katalitik aktivite ve orta düzeyde çevre koşullarında çalışabilme kabiliyetleri ile endüstriyel ve biyoteknolojik süreçlerde tekrar tekrar kullanılabilirlikleri dahil olmak üzere inorganik katalizörlere göre avantajlar sunar (Nadeem ve ark., 2008; Bashir ve ark., 2018). Endüstriyel enzimlere yönelik küresel talebin 2014 yılında 4,2 milyar dolar; 2020 yılında ise 5,9 milyar dolar olduğu bilinmektedir. 2020'den 2026'ya kadar yıllık bileşik büyüme oranının da yaklaşık 6,2 milyar dolara ulaşması beklenmektedir (Adetunji, 2017; URL-1, 2020).

Proteaz, proteinleri peptit ve aminoasitlere hidrolizini katalizleyen enzimlerdir (Hindhmathi ve ark., 2011). Tüm canlı organizmalarda bulunarak; hücrenin gelişerek farklılaşmasını sağlar (Bhunia ve Dey, 2012). Proteazlar; tüm endüstriyel enzim pazarının %70'inden azını oluşturan en büyük ve önemli hidrolitik enzimlerden biri olarak kabul edilmektedir (Annamalai ve ark., 2014a). Proteazlar ilk başta süt endüstrisinde peynir üretimi için süt pıhtılaştırma ajanları (peynir mayası) olarak kullanılmaya başlanmıştır (Gaur ve ark., 2015). Endüstriyel biyoteknolojide proteaz, derilerin tüylerinin alınması ve sıyırılmasında, et yumuşatılmasında, peynir aromasının geliştirilmesinde, unlu mamullerin üretiminde, unun işlenmesinde, hamur yapısının iyileştirilmesinde, kurabiyelerde aroma ve renk verilmesinde, hayvan yemlerinin sindirilebilirliğinin iyileştirilmesinde, balık pres suyunun viskozitesinin azaltılmasında, balık yağlarının geri kazanılmasında, kumaşlarda ipek zambının giderilmesinde ve proteinli leke çıkarılmasında, gümüş geri kazanımı ve atık

yönetiminde kullanılır (Maase ve Van Tilburg, 1983; Outtrup ve ark., 1995; Wolff ve ark., 1996; Ihns ve ark., 1999; Adinarayana ve Ellaiah, 2002).

En önemli endüstriyel enzimlerden biri olan proteazlar; bakteriler, mayalar ve küfler gibi çeşitli mikroorganizmalardan ayrıca bitkilerde ve çeşitli hayvan dokularından elde edilebilirler (Asker ve ark., 2013). Bununla birlikte, bitki ve hayvansal kaynaklı proteazlar, artan endüstriyel talepleri karşılayamadığı için mikrobiyal proteazlara olan ilginin artmasına neden olmuştur (Kumar ve ark., 2005). *Bacillus* türleri; fermantasyon döngüsünün kısa zamanda olmasına yol açan yüksek ve hızlı gelişme oranları, hücre dışı ortama proteinleri salma kapasiteleri, arzu edilen özelliklerde yeni enzimler üretmek için genetik değişim kolaylığı, *Bacillus subtilis* ve *Bacillus licheniformis* gibi türler için gıda ve ilaç uygulaması GRAS (genel olarak güvenli kabul edilir) durumu dahil olmak üzere çeşitli sebeplerle ilgi çekici endüstriyel araçlardır (Schallmey ve ark., 2004). *Bacillus subtilis* grubu, dünya çapında ticari alkalın proteaz üretiminin başlıca kaynağıdır.

Fermantasyon parametrelerinin optimize edilmesi ile; iyileştirilmiş ve maliyeti uygun olan proteaz üretimi, endüstriyel uygulamalar için araştırmacıların en temel hedefidir (Li ve ark., 2006). Çünkü bu parametreler, enzim salgılanması için mikroorganizmaların gelişmesini teşvik edici bir anahtar görevi görür (Bhunja ve Dey, 2012). Fermantasyon teknolojisinde, mikrobiyal metabolitin üretkenliğindeki gelişmeler; genelinde besinsel ve fiziksel parametrelerdeki değişiklikler ve mutasyon seçiminin sonucu olarak suş iyileştirmeleri yoluyla elde edilir (Greasham, 1983). Yanıt yüzey yöntemi (RSM), ortam bileşenleri ve biyomoleküllerin üretimi için gerekli diğer kritik değişkenlerin optimizasyonunda uygulanan, iyi bilinen bir yöntemdir (Ya-Hong ve ark., 2004). RSM'nin temel avantajı, karmaşık süreçleri optimize etmek için etkili bir istatistiksel teknik olduğundan birden fazla parametreyi ve bunların etkileşimlerini değerlendirmek için gerekli deneysel denemelerin sayısını azaltmasıdır. Bu sebeple, bir sürecin optimize edilmesi için gereken diğer yaklaşımlara göre daha az zahmet vererek, zaman kazandırır (Giovanni, 1983).

Bu çalışmada, *Bacillus* kaynaklı hücre-dışı proteaz enzimin üretimi ve enzimin özelliklerinin belirlenerek endüstriyel kullanım potansiyellerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun için; (i) Sakarya Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Gıda Biyoteknolojisi Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan *Bacillus* izolatları ile tarama çalışması yapılarak en iyi proteaz üreticisi suş belirlenmiştir; ii) Seçilen izolatın (*Bacillus* sp. EBTA6) proteaz üretimini arttırmak için merkezi kompozit dizaynı (CCD) kullanılarak; pH, inkübasyon sıcaklığı ve maya özütü gibi biyoproses parametreleri yanıt yüzey yöntemi (RSM) ile optimize edilmiştir; iii) Üretilen proteazın; pH, sıcaklık gereksinimleri, çeşitli metal iyonları, proteaz inhibitörleri ve surfaktanlara karşı dayanıklılıkları ile kinetik özellikleri belirlenmiştir; iv) Leke çıkarma potansiyeli ve süt pıhtılaştırma aktivitesi ile enzimin endüstriyel uygulamalar için potansiyeli de incelenmiştir.

BÖLÜM 2. LİTERATÜR ÖZETİ

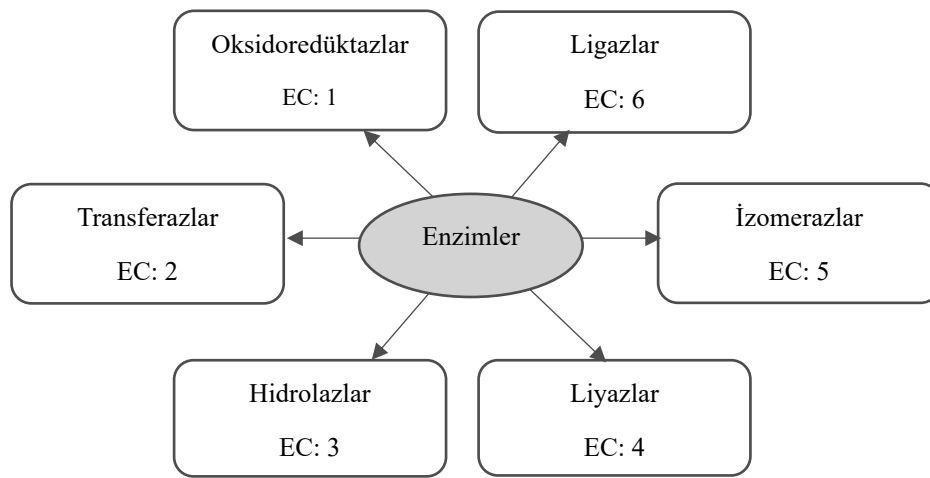
2.1. Enzimler

Enzimlerin 4000 kadar biyokimyasal reaksiyonu katalizlediği bilinmektedir (Bairoch, 2000). Substratları ile geçiş durumu kompleksleri oluşturarak reaksiyonları hızlandırır, bu da reaksiyonun aktivasyon enerjisini azaltır (Bharathiraja ve ark., 2017; Singh ve ark., 2016). Enzimler, normal şekilde gerçekleşen herhangi bir kimyasal reaksiyonun hızını, 100 milyon ile 10 milyar kat arasında bir hızda artırır (Gurung ve ark., 2013). Enzimlerin genel olarak tanımlanırken “yeşil kimyasallar” denilmesinin sebebi; çevre dostu bir yapıda olmaları ve endüstride ev eşyalarına kadar geniş bir alanda kullanılmalarıdır (Lakshmi ve Hemalatha, 2015). Antik çağlardan günümüze kadar, peynir, ekşi hamur, bira, şarap, sirke gibi birçok farklı gıda ürünlerinin, deri ve keten gibi ürünlerin üretiminde kullanılmıştır (Kirk ve ark., 2002). Endüstriyel üretimde enzimler; biyokataliz, aktif farmasötik bileşenler, dökme kimyasallar, tarımsal kimyasal farmasötik ara ürünler ve gıda bileşenleri için gerekli bir araç olarak gelişmiştir (Schoemaker ve ark., 2003).

Tüm enzimler (birtakım reaksiyonları katalizleyen, yapısında ribonükleik asit bulunan ribozimler dışında) protein yapısındadır. Substrat ise enzimlerin etkisi ile parçalanan maddelerdir (Demirci, 2014). Enzimin substrat ile birbirlerine tam uyan geometrik yapıları “anahtar-kilit” modeli olarak tanımlanmıştır. Bu model enzimin spesifikliğini açıklar. Enzimlerin çoğu etkiledikleri substrattan daha büyük olduğundan, enzimlerin sadece küçük bir bölümü katalize doğrudan katılır. Aktif bölge, katalitik kalıntı bulunan bölgede substratın bağlanmasından sonra reaksiyonu gerçekleştirir. Ek olarak enzimlerin içerdiği bölgeler arasında kataliz için gereken kofaktörlerin bulunduğu kısımlarda vardır. Enzimlerden birçoğunun, ısıtma ya da kimyasal denatürasyonla üç boyutlu yapısı değişerek bozulabilir, inaktive olabilir. Burada enzime göre,

denatürasyon işlemi geri dönüşümlü ya da geri dönüşümsüz olabilir (Gurung ve ark., 2013).

Gerçekleşen reaksiyon çeşitlerine göre, 6 ana grupta enzimler sınıflandırılmıştır (Şekil 2.1.). Her enzimin bir numarası olmakla birlikte; her numara da 4 rakamdan oluşarak, enzim tarafından katalizlenen tepkimeyi tanımlar. Bu numara sırasıyla (1-4); numara sınıfı, numara alt sınıfı, numara grubu ve kendine özgü sıra numarasıdır (Nelson ve Cox, 2005). Tüm enzimlere bir EC numarası verilir (Okafor, 2007)



Şekil 2.1. Enzimlerin sınıflandırılması ve EC kodları

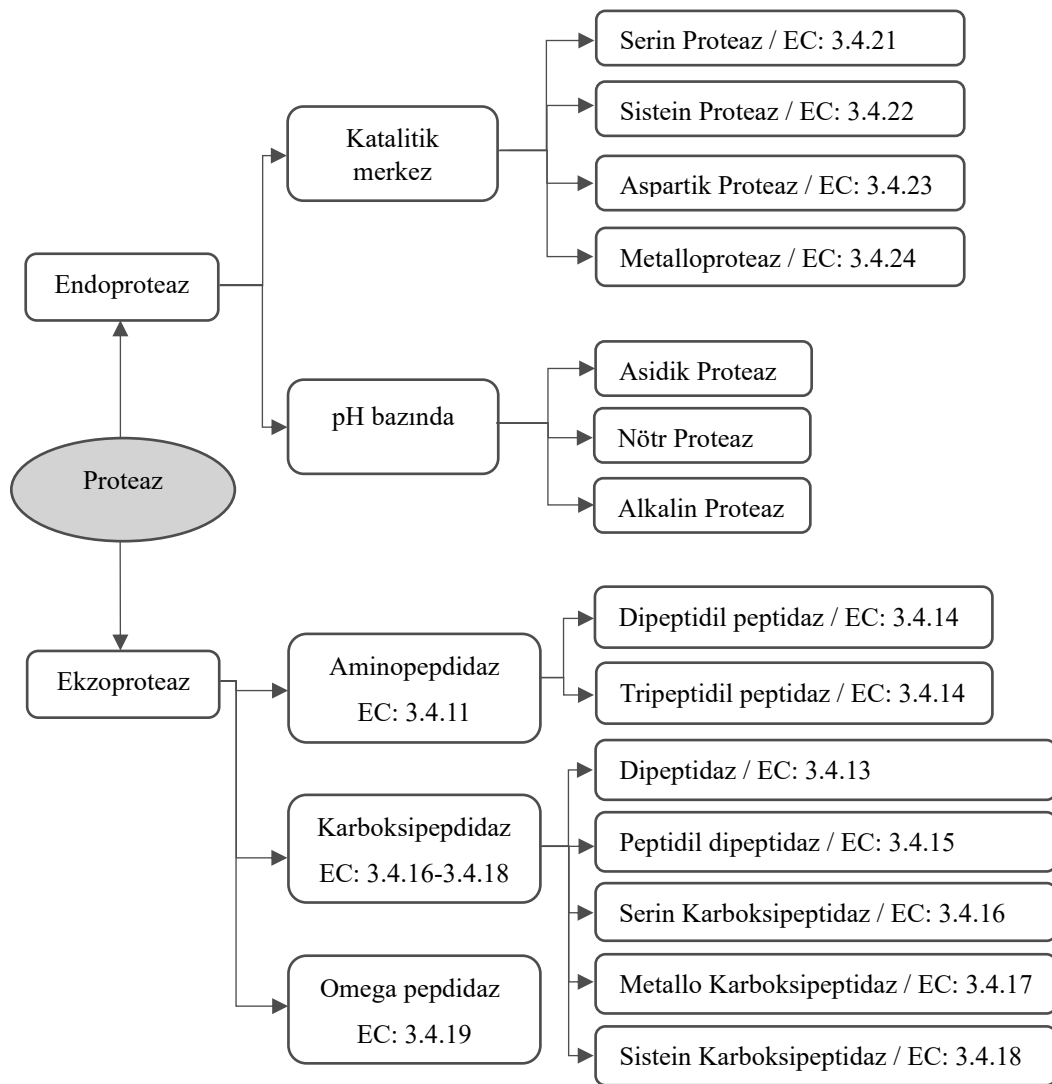
Günümüzde endüstriyel işlemlerde kullanılan enzimlerin çoğu hidrolitiktir ve türlü doğal maddelerde parçalanma için kullanılmaktadır (Kirk ve ark., 2002).

2.2. Proteazlar

Bir polipeptit zincirinde amino asit kalıntıları arasında yer alan peptit bağlarını (-CO-NH) kopararak proteinlerin parçalanmasını katalize eden, küçük peptitlere ve amino asitlere indirgeyen oldukça büyük ve karmaşık enzim grubu proteazlardır (Shankar ve ark., 2011; Ibrahim ve ark., 2015). Proteolitik enzimlere, proteinazlar da denilmektedir. Doğası gereği her yerde bulunurlar (Poldermans, 1990). Tüm canlı organizmalarda bulunmasının önemi; canlılardaki metabolik ve düzenleyici faaliyetleri gerçekleştirirken anlaşılmaktadır (Wandersman, 1989).

2.2.1. Proteazların sınıflandırılması

Proteazlar enzim sınıfından hidrolazlar (EC 3.4.) kategorisindedir (Keskin, 1987). Su molekülü vasıtası ile peptit bağlarını parçalayarak katalizler. Aktif bölgenin kimyasal yapısı, katalize ettikleri reaksiyon yapısı ve bileşimine göre sınıflandırılır. Esas olarak substrat üzerindeki katalitik bölgeye göre yani, eylemin gerçekleştiği yere göre; endoproteazlar ve ekzoproteazlar olmak üzere 2 ana grupta sınıflandırılırlar (Adetunji, 2017; Hamza, 2017). Proteazların sınıflandırma sistemi ve EC kodları Şekil 2.2.'de özetlenmiştir.



Şekil 2.2. Proteazların sınıflandırılması ve EC kodları (Özden, 2014; Hamza, 2017)

Ekzoproteazlar, polipeptit zincirinin sonunda etki gösterirken, endoproteazlar polipeptit zincirinin iç bölgesinde etki gösterir. Ekzoproteazlar sırasıyla polipeptit substratının serbest N-terminalinde ve polipeptit zincirinin serbest C-terminalinde hareket eden; aminopeptidazlar, karboksipeptidazlar ve omega peptidazlar olarak sınıflandırılır (Hamza, 2017);

- Aminopeptidazlar: Polipeptit zincirinde, serbest N-terminali üzerinde hareket eder. Yalnız bir amino asit kalıntısı, dipeptit yada tripeptitin ayrılmasını sağlar. Bakteri ve küf gibi birçok mikroorganizmada bulunur. Bu türlerden elde edildikleri zaman; substrat özgüllükleri, organizma ile hidroliz sonunda ürün profiline göre farklılıklar gösterir (Rao ve ark., 1998).
- Karboksipeptidazlar: Polipeptit zincirinde C-terminali üzerinde etki göstererek, tek amino asit yada dipeptidi ayırır (Rao ve ark., 1998). Aktif bölgelerindeki amino asit kalıntısı yapılarına göre; serin karboksipeptidaz, sistein karboksipeptidaz, metalokarboksipeptidaz, peptidil dipeptidaz ve dipeptidaz olmak üzere beş alt gruba ayrılabilir (Duran ve ark., 2007).
- Omega peptidazlar: Bu gruptaki enzimlerin yapısı; substrat için serbest N- veya C-terminaline ihtiyaç duymamaktadır. Yüklü terminal gruplara ihtiyaçları olmamalarına karşın, sıkça terminale yakındırlar. Bu da endopeptidazların tam tersidir (Polaina ve MacCabe, 2007).

Aynı şekilde, endoproteazlar da, karakteristik aktif bölgede bulunan, yan zincir özgüllüklerine ve mevcut fonksiyonel gruplarına göre sınıflandırılabilirler (Hamza, 2017);

- Serin proteazlar: Aktif bölgelerinde bir serin grubu (-OH) olan ve üç kritik amino asidin (histidin, aspartat ve serin) varlığı ile karakterize edilen proteazlardır (Davies ve ark., 1998; Di Cera, 2009; Hamza, 2017). Genellikle di izopropil floro fosfatlar (DFP), fenil metil sülfonil florür (PMSF) ve tosil-L-lizin klorometil keton tarafından geri döndürülemez ve güçlü bir şekilde inhibe

edilirler. Bu proteazlar, 7-11 arasında değişiklik gösteren optimum pH ile nötr ve alkali pH'da aktiftir. Geniş substrat özgülüklerine ve 18-35 kDa aralığında düşük moleküler ağırlığa sahiptirler (Rao ve ark., 1998; Ellaiah ve ark., 2002).

- Sistein proteazlar: Tiyol proteaz olarak da bilinen bu proteazın aktivitesi, aktif bölgelerinde tam bir -SH grubunun varlığına bağlıdır (Hamza, 2017). Tiyol proteazlar, aktivitesi sistein ve histidinden oluşan katalitik bir ikili ile etkilenen 20 civarında aileden oluşur. İyodoasetik asit, iyodoasetamid, pCMB gibi ağır metaller dahil olmak üzere sülfidril reaktifine de duyarlıdır. Fakat DFP ve metal şelatlama ajanlarından etkilenmezler. Ayrıca ditiotreitol ve etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) indirgeyici (şelat) ajanlarının varlığında da aktiftirler (Rao ve ark., 1998).
- Metaloproteazlar: Bu proteazın aktivitesi, daha az sıkı bağlanmış iki değerlikli kationların varlığına bağlıdır (Hamza, 2017). Metaloproteazlar pH 5-9 aralığında optimumdur ve EDTA gibi şelatlama maddelerine oldukça duyarlıdır. EDTA tarafından inhibe olan pek çok enzim; kalsiyum, çinko ve kobalt gibi çeşitli iyonlar ile aktive edilir. Bakteri ve mantar ile üretilen metaloproteazlardan birçoğu, her bir enzim molekülü için bir atom çinko içerir. Protein yapısının stabilitesi kalsiyum iyonları ile artırılır (Ellaiah ve ark., 2002).
- Aspartik proteazlar: Yaygın olarak asit proteaz olarak da bilinir. Asit proteazlar, aktif bölgelerinde bir veya daha fazla yan zincir karboksil grubu içerir (Rao ve ark., 1998; Nduka, 2007). Çoğunlukla mantarlarda, bazı protozoalarda ya da bakterilerde bulunurlar. Genel olarak iki sınıfa ayrılırlar: *Aspergillus*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Rhizopus*'dan pepsin benzeri sentezlenen enzimler ve *Mucor sp.* *Endothia*'dan rennin benzeri sentezlenen enzimler. 1,2-epoksi-3-(p-nitrofenoksi) propan, diazoasetil-DL-norlösin metil ester, diazoketon ve pepstatin gibi inhibitörler, ortamda bakır iyonları olması durumunda aspartik proteaz aktivitesini düşürürler (Singh ve ark. 2016).

Diğer endoproteazlar ise, belirli bir pH aralığında maksimum aktivitelere göre sınıflandırılırlar;

- Asidik proteazlar: Bu gruptaki proteazlar 2-6 pH aralığında aktiftir.
- Nötr proteazlar: Zayıf alkali, nötr ve zayıf asidik pH'larda aktif olan proteazlardır (Hamza, 2017).
- Alkali proteazlar: Bu gruptaki proteazlar ise, alkalın pH aralığında (8-12) aktiftir (Rao ve Narasu, 2007). Yaygın olarak deterjan katkı maddeleri olarak kullanılır. Bu nedenle ticari ve fizyolojik açıdan oldukça önemli bir enzim grubudur. Alkali proteazlar, proteinlerin hidrolize edilmesinde belirli katalitik görevler üstlenirler (Kumari ve ark., 2009). Günümüzde endüstriyel üretimlerde çeşitli kaynaklarda alkali proteazlar bulunmaktadır. Ancak çoğunluğu mikrobiyal kökenli enzimler ile elde edilmiş proteazlardır. Alkali proteazlar, nötrofilik ve alkalifilik mikroorganizmalar yoluyla üretilir. Doğada alkalofilik mikroorganizmalar yaygın olarak dağılmıştır (Pathak ve Deshmukh, 2012).

2.2.2. Proteaz enziminin kullanım alanları

Deterjan formülasyonlarında enzimlerin kullanımı gelişmiş ülkelerde yaygındır ve tüm deterjanların yarısından fazlası enzim içerir. Bu enzimlerin çoğu farklı bakteri türlerinden üretilir. Bu bağlamda *Bacillus* sp. deterjan endüstrilerinde çok faydalı ve derin bir uygulamaya sahiptir (Rupali, 2015). Toplam proteaz satışlarının büyük bir yüzdesi (%89) deterjan endüstrisinde kullanılmaktadır. Proteaz çamaşır deterjanlarında, çimen, yiyecek, kan gibi protein kaynaklı lekelerin proteoliz ile çıkarılmasını sağlar (Rao ve ark., 1998; Gupta ve ark., 2002). Deterjan katkı maddesi olarak seçilen enzimin; yüzey aktif maddeler, ağartma maddeleri ve aktivatörleri, dolgu maddeleri, kumaş yumuşatıcıları ve diğer çeşitli tipik deterjan bileşenleri formülasyonunda kullanılan yardımcı maddeler varlığında kararlılığını koruyarak, aktif olması gereklidir (Ishikawa ve ark., 1993). Ek olarak gıda işleme endüstrisinde

proteazlar, temizlik için tercih edilen gelişmiş deterjanlar ile birlikte kullanılır (Ihns ve ark., 1999).

Proteazlar gıda endüstrisinde, soya hidrolizatlarının hazırlanması, peynir yapımı, et yumuşatma gibi çeşitli amaçlarda kullanılır. Proteazlar katalitik işlevi ile; bebek mamaları, klinik besin takviyeleri ve tatlandırıcı ajanlar gibi sağlık ve diyetetik ürünlerin bileşenleri olarak kullanılan besin değeri yüksek protein hidrolizatının hazırlanmasında rol oynar (Gupta ve ark, 2002; Ward, 2011). Ayrıca proteazlar, başta sığır eti olmak üzere, çeşitli etlerin kas lifi proteinleri ve yanındaki bağ dokusu proteinlerini hidrolize ettiklerinden etin yumuşatılmasında oldukça önemlidir (Kumar ve Takagi, 1999). Fırıncılık endüstrisinde buğday gluteninin, endo ve ekzoproteazlar ile modifiye edilmesi için kullanılır (Rao ve ark., 1998). Proteazların ana uygulama alanlarından bir diğeri ise süt endüstrisinde, süt kazeinlerini pıhtılaştırıcı proteolitik enzimlerin yardımıyla pıhtılaşma sağlamasıdır. Rennin enzimi bu endüstride kullanılan ana enzim olmakla birlikte, aynı zamanda peynir olgunlaşması sırasında tat ve yapının dengeli bir şekilde gelişmesini sağlar (D'ambrosio ve ark., 2003; Sousa ve Malcata, 2002; Kumar ve ark., 2005).

Proteazlar, kontakt lenslerin temizlenmesi için, enzim kaynaklı temizleyiciler olarak biyofarmasötik ürünlerde oldukça yararlıdır. FDA tarafından; kontakt lenslerin temizlenmesinde kullanılması üzerine, birçok enzim temizleyicisi onaylanmıştır. Bu enzim kaynaklı temizleyiciler papain, pankreatin ve subtilisin gibi aktif enzimler içerir (Anwar ve Saleemuddin, 2000). Sağlık sektöründe de proteolitik enzimler seçici bir debridman sağlayarak, nekrotik materyalin verimli bir şekilde temizlenmesi ile cilt ülserlerinin iyileşme sürecini sağlar (Sjodahl ve ark., 2002). Proteazlar tekstil endüstrisinde ise, parlaklık ve yumuşaklık sağlamak ve serisinin (ipekböceği tarafından koza üretimi sırasında üretilen bir lif) sert ve donuk olan zamk tabakasını işlenmemiş ipek elyafından ayırmak için de kullanılır. Proteaz, istenilen benzersiz yüzeyleri, yün ile ipek liflerinin yüzeyini değiştirerek sağlar (Ishikawa ve ark., 1993). Fotoğraf endüstrisinde ise; atık X-ışını filmlerinin üzerindeki jelantinde dağılmış olan siyah-metalik gümüşün; geri kazanılmasında büyük bir rol oynar (Masui ve ark., 1999;

Shankar ve ark., 2010). Proteaz üreten mikroorganizmaların, uygulanabilir alanları üzerine yapılan çeşitli araştırmalar “Tablo 2.1.” de verilmiştir.

Tablo 2.1. Endüstriyel açıdan önemli proteaz üreten mikroorganizmaların bazıları ile ilgili çalışmalar ve uygulanabilir alanları

Proteaz Üreten Mikroorganizma Türleri ve Suşları	Kullanım Nedeni	Kaynak
<i>Aspergillus flavo furcatis</i>	Süt pıhtılaştırılması	Alecrim ve ark., 2014
<i>Bacillus alveayuensis</i> CAS 5	Leke çıkarılması	Annamalai ve ark., 2014b
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SP1	Süt pıhtılaştırılması	Guleria ve ark., 2016
<i>Bacillus circulans</i>	Leke çıkarılması	Rao ve ark., 2009
<i>Bacillus flexus</i> B4	Gümüşün geri kazanımı	Jani ve ark., 2016
<i>Bacillus laterosporus</i> AK1	Leke çıkarılması	Arulmani ve ark., 2006
<i>Bacillus licheniformis</i> KBDL	Gümüşün geri kazanımı	Pathak ve Deshmukh, 2012
<i>Bacillus licheniformis</i> RP1	Leke çıkarılması	Sellami-Kamoun ve ark., 2008
<i>Bacillus megaterium</i>	Deride tüy giderilmesi	Asker ve ark., 2013
<i>Bacillus proteolyticus</i> CFR3001	Patojenik bakteri hücrelerinin parçalanması	Bhaskar ve ark., 2007
<i>Bacillus</i> sp. B21-2	Gümüşün geri kazanımı	Masui ve ark., 1999
<i>Bacillus subtilis</i>	Deride tüy giderilmesi	Prabhavathy ve ark., 2013
<i>Bacillus subtilis</i>	Leke çıkarılması	El-Hassayeb ve Abdel Aziz, 2016
<i>Bacillus subtilis natto</i>	Süt pıhtılaştırılması	Shieh ve ark., 2009
<i>Bacillus subtilis</i> PE-11	Leke çıkarılması	Adinarayana ve ark., 2003
<i>Bacillus subtilis</i> PF1	Leke çıkarılması	Bhange ve ark., 2016
<i>Bacillus subtilis</i> AKAL7	X-ışını filminden gümüş ekstraksiyonu, deride tüy giderimi	Hakim ve ark., 2018
<i>Mucor circinelloides</i>	Süt pıhtılaştırılması	Sathya ve ark., 2009
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> BC1	Tabakhane tuzlu atık su arıtımında uygulaması	Sivaprakasam ve ark., 2011
<i>Pseudomonas auroginosa</i> PD100	Leke çıkarılması	Najafi, 2005
<i>Rhizomucor miehei</i>	Kaşar peyniri üretimi	Yaşar, 2007
<i>Cryphonectria parasitica</i>	Leke çıkarılması	Vishalakshi ve ark., 2009
<i>Streptomyces gulbargensis</i>	Leke çıkarılması	Vishalakshi ve ark., 2009
<i>Termomukor indicae-seudaticae</i> N31	Süt pıhtılaştırılması	Merheb-Dini ve ark., 2010
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Şarap kalitesinin artırılması	Schlender ve ark., 2017

2.3. Mikrobiyal Kaynaklı Proteazlar

Proteazlar tüm organizmaların doğal yapısında bulunarak; gen içeriğinin % 1-5'ini oluştururlar. Bitki, hayvan veya mikrobiyal kaynaklardan elde edilebilirler. Doğası gereği mikrobiyal proteazlar, genellikle hücre dışıdır. Üretici mikroorganizmalar tarafından direk olarak fermantasyon ortamına salgılanır. Böylece bitki ve hayvan proteazları ile karşılaştırıldığında;

- Oldukça geniş biyokimyasal çeşitliliği,
- Enzimin proses sonrası hızlı işlenebilmesi,
- Kısa sürede büyük miktarlarda kültürlenerek hızlı gelişebilmesi,
- Üretim maliyetlerinin düşürülmesiyle biraz daha ucuz olması,
- Birçok uygulamada istenilen modifiye özellikleri içeren enzimler ve suşlar oluşturmak için kolayca genetik olarak değiştirilebilmeleri,
- Sınırlı alan içinde gelişebilmeleri,
- İstenen ürünü sürekli olarak tedarik edebilmeleri

gibi çeşitli avantajları sebebiyle oldukça fazla tercih edilirler (Gupta ve ark, 2002; Shankar ve ark., 2011; Josephine ve ark., 2012; Singh ve Bajaj, 2016; Sharma ve ark., 2019).

Farklı kaynaklardan elde edilen proteazların arasında, mikrobiyal proteazlar en büyük ticari enzim grubunu temsil eder (Lakshmi ve Hemalatha, 2015). Mikroorganizmalar; proteinlerdeki peptit bağlarını hidrolize etmek için proteazları salgılayarak, proteinlerin kurucu monomerlerine ayrılmasını sağlar (Jani ve ark., 2016). Mikrobiyal proteazlar ayrıca; kolajen, elastin, proteoglikan ve in-vivo konakçı savunması gibi çeşitli görevlerde yer alan proteinlerin degradasyonu için elzemdir. Bu proteazların patogenezdaki rollerini kavrayabilmek için, tanımlanması ve karakterizasyonu ön koşuldur (Vadlamani ve Parcha, 2011). Hücre içi ve hücre dışı mikrobiyal proteazlar detaylı olarak ele alındığında; hücre içi proteazlar; farklılaşma ve sporülasyon, hormonların ve enzimleri olgunlaşması gibi birçok metabolik süreçte rol oynarken; hücre dışı proteazlar, hücre bulunmayan ortamlarda proteinleri hidroliz ederek hücrenin oluşan hidrolitik ürünleri kullanmasını sağlar. Bu proteazlar endüstride

birçok işlemde protein hidrolizi için ticari olarak değerlendirilir (Kumar ve Takagi, 1999).

Proteazlar, küfler, mayalar ve bakteriler gibi farklı mikroorganizmalar tarafından üretilir (Oskouie ve ark., 2008; Schlender ve ark., 2017; Ao ve ark., 2018). Ancak ticari proteazların çoğunluğu bakteriyel kökenlidir (Gupta ve ark., 2002). Bakterilerden proteaz üretiminde ana dezavantaj, enzim ile hücrelerin ayrılması için maliyetli işlem gerekliliğidir (Nehra ve ark., 2002). Avantajları ise; ortamdaki fiziksel ve kimyasal değişikliklere karşı stabilite göstermeleri ve yüksek verimlilikleridir (Verma ve Baiswar, 2013; Lakshmi ve ark., 2014). Bakterilerden üretilen proteaz; suş tipi, ortamın bileşimi, geliştirme yöntemi, hücre büyümesi, besin gereksinimleri, metal iyonları, inkübasyon süresi, pH, sıcaklık ve termostabilite gibi çeşitli faktörlere bağlıdır (Mukesh Kumar ve ark., 2012).

Küf proteazları ile yapılan çalışmalar *Aspergillus*, *Conidiobolus*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Rhizopus* gibi cinslere ait türlerle kısıtlıdır (Kumar ve Takagi, 1999; Charles ve ark., 2008). Enzim üreticileri olarak küfler, GRAS (genellikle güvenli olarak kabul edilir) suşları oldukları için birçok avantaja sahiptir (Sandhya ve ark., 2005). Hajji ve arkadaşları (2007; 2008) çalışmalarında *Aspergillus clavatus* ES1'den elde ettikleri alkalın proteazın hücre dışı ağartma işlemine dayanıklı olduğunu tanımlanmıştır (Hajji ve ark., 2007; 2008). Küflerden elde edilen proteaz üretiminde ana avantaj, ilerleyen işlem parametreleri sırasında basit filtrasyonla miselyumun ayrılarak hücre çıkarımının kolay olmasıdır (Nehra ve ark., 2002). Günümüzde, mikroorganizmalardan endüstriyel olarak elde edilen enzimlerin; biyoteknolojik kaynak olarak potansiyel kullanım alanı artmıştır. Bu da farklı mikroorganizmaların hücre dışı enzimatik aktivitelerinin araştırılmasına olan ilgiyi uyandırmıştır (Goud ve ark., 2009). Küfler bakterilere kıyasla zayıf ısı toleransı ve düşük bir reaksiyon hızına sahiptir. Fungal proteazlar, pH 4 ile 11 gibi geniş bir aralıkta aktif olduğundan, substrat özgüllüğü de geniştir. Örnek olarak bir küf çeşidi olan *Aspergillus oryzae*; asit, nötr ve alkali olmak üzere üç çeşit proteaz üretir (Kumar ve Takagi, 1999). Asit proteazları üreten mantarlar; peynir üretiminde; alkalın proteazları

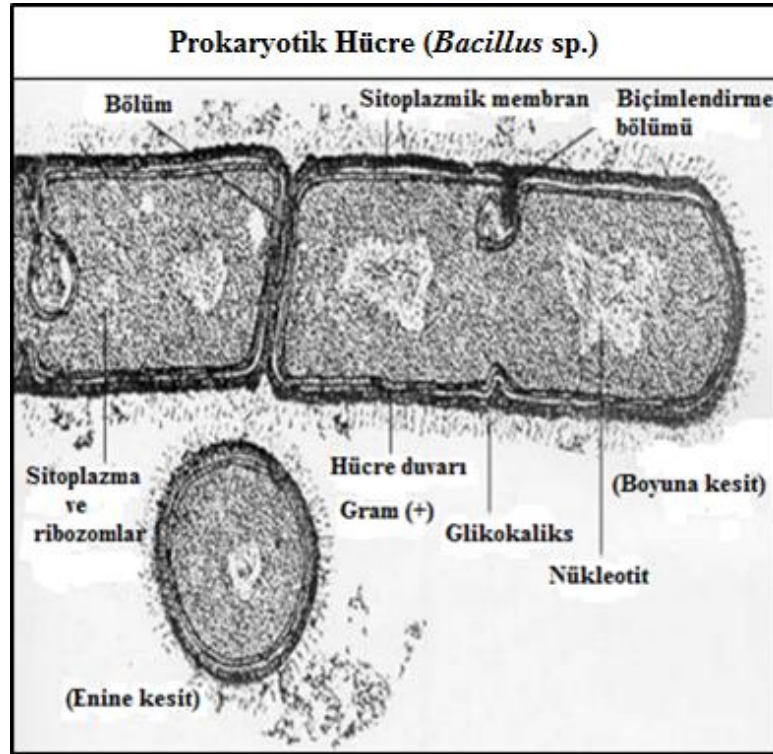
üreten küfler ise, gıdada bulunan proteinleri modifiye ederken kullanılır (Rao ve ark., 1998).

Günümüzde mayalardan üretilen proteazlar düşük pH değerlerinde bile faaliyet gösterdiğinden endüstriyel uygulamaları araştırmacıların ilgisini çekmektedir (Schlander ve ark., 2017). Asit proteazları üreten mayalar; üzüm şirasına başlangıç kültürleri olarak doğrudan eklenebildikleri için, şarapta istenmeyen proteinlerin uzaklaştırıldığı bentonit işlemine destek olarak kullanılarak, protein bulanıklığının önlenmesi açısından biyoteknolojik ilgi çekmektedir. (Theron ve Divol, 2014; Chasseriaud ve ark., 2015, Schlander ve ark., 2017). Ayrıca şarabın aroma profilini etkilemesi gibi bir dizi rolü de yerine getirebilir (Reid ve ark., 2012). Klasik şarap mayası olan *Saccharomyces cerevisiae*'nin aksine, *Saccharomyces* olmayan mayalar, proteazlar dahil olmak üzere hücre dışı enzimlerin önemli kaynaklarıdır (Claus, 2009; Molnárova ve ark., 2014). *Saccharomyces* dışındaki çeşitli mayaların hücre dışı proteaz ürettiği araştırmalar sonucunda bilinmesine rağmen; virülans faktörleri sebebiyle araştırmalar *Candida* türleri üzerindedir. *Kloeckera*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Wickerhamomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces* ve *Metschnikowia* gibi maya cinsleri, üzüm bileşikleri ile etkileşime giren hidrolitik ekzoenzimler (esterazlar, lipazlar, glikozidazlar, glukanaazlar, pektinazlar ve proteazlar) üretir (Schlander ve ark., 2017).

Virüsler; tümörlü hücreler ve AIDS gibi çeşitli korkutucu hastalıklarda, virüs proteinlerini işlemedeki işlevsel rolleri nedeniyle, günümüzde yapılan çalışmalarda oldukça önem kazanmıştır. Birçok virüste sistein, serin, aspartik peptidazları bulunurken, metalopeptidaz yoktur (Rawlings ve Barrett, 1993). Detaylı incelemeler; AIDS'in hızlıca yayılan yıkıcı etkisi ile savaşabilecek güçte inhibitörler oluşturmak için virüs proteazlarını farmasötik bir ajan haline getirmiştir (Rao ve ark., 1998). Bu hastalıkların biyokimyasal incelemesinde, tedavisinde ve izlenmesinde enzimlerin rolü büyüktür (Gurung ve ark., 2013).

2.3.1. *Bacillus* cinsi bakteriler ile proteaz üretimi

Gram (+), çubuk şekilli, düz, spor oluşturan, *Bacillus* cinsi bakteriler; hareketli veya hareketsiz, farklı boyutlarda, aerob ya da fakültatif anaerob olabilir. Endosporları yüksek sıcaklıklara dayanıklıdır. Genel olarak mezofilik bir yapıdadır ancak termofil ve psikrotrof türleri de bulunmaktadır. Bu cinste yalnızca *B. anthracis*, *B. cereus* olmak üzere iki patojen vardır. Öteki suşlarından çoğu patojen değildir ancak fırsatçı patojendir. Hücre dışı enzim üreten türleri ile proteinleri hidroliz ederler (Erkmen, 2010(ed)). Toprakta bolca bulunurak; tarım arazisi veya bahçe toprağındaki mikrobiyal yüke katkıda bulunurlar (Razzaq ve ark., 2019). Prokaryotik hücrelerden oluşan *Bacillus* sp.'nin Şekil 2.3.'de tipik hücreleri gösterilmektedir (Okafor, 2007).



Şekil 2.3. *Bacillus* sp.'nin hücre yapısı (Okafor, 2007)

Günümüzde, ticari olarak kullanılan alkalın proteazların büyük bir bölümü; fazla miktarda alkalın proteaz salgılayabilmeleri, önemli proteolitik aktivite, yüksek pH ve sıcaklık stabilitesine sahip olmaları nedeniyle en baskın kaynak olan *Bacillus* cinsi alkalın proteaz üreticileri tarafından karşılanır (Gupta ve ark., 2002; Josephine ve ark., 2012; Mala ve Srividya, 2010). *Bacillus* sp. bakteriler arasında hücre dışı proteazların

spesifik üreticisidir (Spinosa ve ark., 2000; Godfrey ve Reichelt, 1985). Çeşitli egzotik ortamlardan izole edilen *Bacillus* cinsi araştırılarak alkalın proteaz üretmek amacıyla kullanılmıştır. Çalışmalarda en çok kullanılan *Bacillus* türleri; *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* ve *B. pumilis* olmakla birlikte; *B. infantis*, *B. clausii*, *B. cereus*, *B. sphaericus*, *B. sterothermophilus*, *B. mojavensis*, *B. megaterium*, *B. brevis*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. intermedius*, *B. thermoruber*, *B. cohnii*, *B. fastidiosus*, *B. pseudofirmus*, *B. pantotheneticus*, *B. aquimaris*, *B. proteolyticus*, *B. laterosporus*, *B. amovivorus*, *B. flexus*, *B. horikoshii* türlerinin de kayıtlara göre proteaz üreticileri olduğu bilinmektedir (Chmara ve ark., 1982; Gupta ve ark., 2002; Aruna ve ark., 2014). Bu bakteri grubu proteaz dışında da çeşitli hücre dışı enzimi salgılar (Brown ve Young, 1970; Horikoshi ve ark., 1975). Tablo 2.2.'de *Bacillus* izolatları ile yapılan çeşitli çalışmalar verilmiştir.

Tablo 2.2. *Bacillus* izolatları ile yapılan çeşitli çalışmalar ile alkalın proteazın özellikleri

<i>Bacillus</i> sp.	Proteaz Üretim Koşulları	Enzim Özellikleri	Kaynak
<i>Bacillus brevis</i> MWB-01	37°C 48 saat inkübasyon	Serin Metaloproteaz Optimum pH 8 Optimum sıcaklık 40°C	Olajuyigbe ve Falade, 2014
<i>Bacillus licheniformis</i> RP1	37°C 24 saat inkübasyon	Optimum pH 10-11 Optimum sıcaklık 65-70°C	Sellami-Kamoun ve ark., 2008
<i>Bacillus patagoniensis</i> PAT 05 ^T	25°C 96 saat inkübasyon	Maksimum pH 9-12 Optimum sıcaklık 60°C	Olivera ve ark., 2006
<i>Bacillus</i> sp. BT MASC3	37°C 60 saat inkübasyon	Optimum pH 9 Optimum sıcaklığı 50°C	Kandasamy ve ark., 2016
<i>Bacillus circulans</i> BM15	28 (±2)°C 36 saat inkübasyon	Optimum pH 7 Optimum sıcaklığı 40°C	Venugopal ve Saramma, 2007
<i>Bacillus</i> sp. B001	30°C 96 saat inkübasyon	Optimum pH 10 Optimum sıcaklığı 60°C	Deng ve ark., 2010
<i>Bacillus circulans</i> M34	37°C 24 saat inkübasyon	Serin Proteaz Optimum pH 11 Optimum sıcaklığı 50°C	Sarı, 2011
<i>Bacillus cereus</i>	35°C 48 saat inkübasyon	Serin Proteaz Optimum pH 8 Optimum sıcaklığı 60°C	Shah ve ark., 2010
<i>Bacillus clausii</i> GMBAE 42	37°C 72 saat inkübasyon	Serin Proteaz Optimum pH 11,3 Optimum sıcaklığı 60°C	Kazan ve ark., 2005
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> PFB-01	37°C 48 saat inkübasyon	Optimum pH 9 Optimum sıcaklığı 60°C	Olajuyigbe ve Ogunyewo, 2013

Alkalifilik ve termofilik *Bacillus* ile üretilen alkali proteazlar; pH, yüksek sıcaklık, kimyasal, denatüre edici ajanların varlığında ve susuz ortamlarda dayanıklılığını koruyabilir (Prabhavathy ve ark., 2013). *B. subtilis*'den elde edilen proteazlar, tripsin ve kimotripsine göre oldukça geniş bir özgüllüğe sahiptir. Kültür ortamında bir veya daha fazla hidrolitik enzimi salgılayabilmelerinin yanında endüstriyel açıdan istenilen birçok özellik bulundurlar. Endüstride çok fazla uygulanmasının sebebi; basit ve uygun maliyetli kültür ortamında kolayca gelişmesi ve patojenite eksikliği olarak açıklanabilir (Daniel ve ark., 1984).

2.4. Yanıt Yüzey Yöntemi

Her bakteri suşunun maksimum düzeyde enzim üretebilmesi için kendine ait optimum fizikokimyasal koşullara ihtiyacı vardır. Bu maksimum verimi elde etmek için başta ortam formülasyonu olmak üzere fermantasyon koşulları optimize edilmelidir. Yanıt yüzey yöntemi (RSM), endüstriyel olarak önemli biyomoleküllerin ve ikincil metabolitlerin üretimi için bir yanıtın çeşitli değişkenlerden etkilendiği, problemlerin modellenmesi ve analizi için yaygın olarak kabul gören istatistiksel bir yaklaşımdır. Önemli faktörleri, çalışma etkileşimlerini ve en uygun koşulları belirlemeye, değişkenlerin optimum düzeyini hesaplamaya ve sabit sayıda deneyde maksimum üretimi sağlamaya yardımcı olur (Mohana ve ark., 2005; Zhu ve ark., 2012). Yanıt yüzey yöntemi; optimum prosesler geliştirmek için uygun bir yöntem olarak oluşturulmuştur. Ayrıca proses parametrelerinin verimli taranması ile birçok prosesin üretim maliyetini en aza indirmiştir (Vohra ve Satyanarayana, 2002).

RSM, birkaç optimizasyon aşaması ile üç temel adımda gerçekleştirilebilir: Parametrelerin taranması için deneylerin tasarımı, en dik yükselme ile düşüş yolu, ikinci dereceden regresyon modeli. Standart regresyon analizi yöntemi kullanılarak yerleştirilir ve optimize edilir (Gupte ve Kulkarni, 2003; Singh ve ark., 2017). Bu yöntem ile proses parametrelerinin bağımsız değişkenler olarak kullanılmasıyla; optimum ve civarındaki bir bölge içerisinde gerçek yanıt fonksiyonunun doğru yaklaşımı için modellerin oluşturulmasına izin verir (Puri ve ark., 2002; Queiroga ve ark., 2012).

Yanıt yüzey yöntemi; biyotıp, gıda ve tarım gibi çeşitli alanlarda endüstriyel süreçlerin optimizasyonu için oldukça kullanışlıdır ve sektörde uygulanmaktadır (Wang ve ark., 2017). Merkezi kompozit dizaynı (CCD), Box-Behnken dizaynı (BBD), Plackett-Burman dizaynı (PBD) ve Doehlert dizaynı gibi deneysel tasarımlar; doğrusal fonksiyonlarla tanımlanamayan deneysel verilere bir yanıt fonksiyonunu yaklaştırmak veya bir süreci optimize etmek için RSM’de yaygın olarak kullanılmaktadır (Li ve ark., 2007; Adetunji, 2017).

2.4.1. Merkezi kompozit dizaynı

Merkezi kompozit dizaynı; yanıt değişkeni ile ikinci dereceden (kuadratik) bir model oluşturmak için üç faktörlü deney kullanmadan yanıt yüzey mekanizmasında en yaygın olarak kullanılan deneysel tasarımdır (Singh ve ark., 2016; Seangtumnor ve ark., 2018). Bu dizayn (CCD) Box ve Wilson tarafından ortaya konulmuştur (Box ve Wilson, 1951). Merkezi kompozit dizaynı aynı zamanda birden fazla faktör içeren deneylerin daha az sayıda deney ile optimize edilmesi imkanı da sunar. Optimizasyon kademeleri;

- İstatistiksel olarak dizayn edilen deneylerin uygulanması,
- Sonuçların varyans analizleri ve katsayıların tahmin edilmesi,
- Optimal koşulların belirlenmesi ve arkasından bir doğrulama analizi.

Merkezi kompozit dizaynı özellikle biyoproses mühendisliğinde fazla sayıda uygulanmıştır (Box ve Wilson, 1951; Kim ve ark., 2008; Guo ve ark., 2010; Yan ve ark., 2011). Badoei-Dalfard ve Karami (2013); *Bacillus* sp. JER02 ile merkezi kompozit dizaynı kullanarak (CCD) proteaz aktivitesinde 2,5 kat artış elde etmişlerdir. Vijayaraghavan ve Prakash Vincent (2015); bir deniz bakterisi olan *Shewanella* sp. IND20’den merkezi kompozit dizaynı (CCD) ile fibrinolitik enzim üretimi için optimize edilmiş ortamın; optimize edilmemiş ortama göre 2,5 kat daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Niyonzima ve More (2014); *Trichoderma estonicum*’dan Plackett-Burman dizaynı ve ardından merkezi kompozit dizaynı kullanarak (CCD), optimize edilmemiş ortama göre 6,5 kat artışla deterjan uyumlu bir proteaz üretmişlerdir.

BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Mikroorganizmalar

Proteaz üretiminde kullanılmak üzere seçilen *Bacillus* cinsine ait 32 adet suş, Sakarya Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Gıda Biyoteknolojisi Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunmakta olup, daha önceki çalışmalarda Türkiye'nin çeşitli illerinden toplanan toprak ve gıda numunelerinden izole edilmiştir. Mikroorganizmaların muhafazası -45°C'de %50 (h/h) gliserol içeren nutrient broth içerisinde yapılmıştır. Söz konusu izolatlara ve elde edildikleri kaynaklar Tablo 3.1.'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan farklı kaynaklardan elde edilmiş izolatlara

İzolatlara	İzole Edildiği Kaynaklar
AKS 1,2	Toprak, Seydişehir/Konya
BAST 2	Turşu, Sakarya
BAT 3	Toprak, Akyazı/Sakarya
BMZE 4	Zeytin, Sakarya
EBTA 4, 5, 6, 7	Tarhana, İstanbul
GİT 2	Toprak, İstanbul
HTA 1, 2	Tarhana, Düzce
MDB 1	Toprak, Maden Deresi/Sakarya
MDC 2	Toprak, Maden Deresi/Sakarya
MDG 3	Toprak, Maden Deresi/Sakarya
MDH 3	Toprak, Maden Deresi/Sakarya
MDİ 4	Toprak, Maden Deresi/Sakarya
MDP 4	Toprak, Maden Deresi/Sakarya
SBT 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12	Toprak, Sakarya
ZBP 4	Toprak, Geyve/Sakarya
ZBP 10	Toprak, Geyve/Sakarya
ZGT 5, 9	Toprak, Geyve/Sakarya

3.1.2. Kullanılan cihazlar

Bu çalışmada kullanılan cihazlar ve markaları Tablo 3.2.'de verilmiştir.

Tablo 3.2. Kullanılan Araç-Gereçler ile Markaları ve Modelleri

Araç-Gereçler	Marka-Model
-86°C dondurucu	NUVE DF 590
Hassas terazi	RADWAG - AS 220.R2
Çalkalamalı su banyosu	DAIHAN, WiseBath WSB-30
Çalkalamalı su banyosu	JSR
Vorteks	VELP Scientifica ZX3
Vorteks	LABTECK
Soğutmalı santrifüj	Hettich Zentrifugen, Universal 320 R
Santrifüj	Hettich Zentrifugen, EBA 21
Isıtıcı manyetik karıştırıcı	M TOPS, MS300HS
UV-VIS Spektrofotometre ve Quartz küvet	Shimadzu UV – mini 1240, Isolab
Otoklav	Hirayama
Otoklav	DAIHAN, WiseClave WAC-80
pH metre	Mettler-Toledo Seven Compact S210
Otomatik pipet serisi	Hamilton
Mini-çalkalamalı inkübatör	Benchmark Incu-Shaker
Soğutmalı-çalkalamalı inkübatör	İldam, İL-Çİ 55
Etüv	Elektro-mag, M 5040
Damıtık su cihazı	NÜVE-ND 8
Kar-buz makinesi	Scotsman-AF80
Dijital gıda termometresi	Weather Forecast

3.1.3. Besiyerleri

Skim Milk Agar (SMA): Mikroorganizmaların hücre dışı alkali proteaz üretimlerinin belirlenmesi için tarama çalışmalarında kullanılmıştır. Bir Erlenmeyer içerisine dehidre formdaki %1 yağsız süt tozu ile %1,5 agar agar tartılarak 1 L damıtık su ilave edilmiş ve ısıtıcı manyetik karıştırıcı yardımıyla berrak bir yapı oluşuncaya kadar kaynatılarak çözündürülmesi sağlanmıştır. Çözündürüldükten sonra 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. Sterilizasyon sonunda, 45°C'de önceden ısıtılmış su banyosuna konularak, su banyosunun sıcaklık göstergesi aralığındaki değerlere inildiğinde 9 cm çaplı steril petri kaplarına dökülüp oda sıcaklığında soğumasıyla katılaşması sağlanmıştır.

Nutrient Agar (NA): Bir genel besiyeri olan NA, bakterilerin aktifleştirilmesinde kullanılmıştır. Bir Erlenmeyer içerisinde dehidre formdaki %0,8 NB ile %1,5 agar agar tartılarak 1 L damıtık su ilave edilmiş ve ısıtıcılı manyetik karıştırıcı yardımıyla berrak bir yapı oluşuncaya kadar kaynatılmış, daha sonra 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. Sterilizasyon sonunda, 45°C'de önceden ısıtılmış su banyosunda soğutulmuş 9 cm çaplı steril petri kaplarına dökülmüş ve oda sıcaklığında soğuyup katılaşması sağlanmıştır.

Nutrient Broth (NB): Bir genel besiyeri olan NB; mikroorganizmaların sıvı ortama adapte olup geliştirmesinde kullanılmıştır. Bir Erlenmeyer içerisinde dehidre formdaki %0,8 NB tartılarak 1 L damıtık su ilave edilmiş manyetik karıştırıcı yardımıyla çözündürülmüştür. Tamamen çözündürüldükten sonra 100 mL'lik erlenlerin her birinde 30'ar mL olacak şekilde dağıtılarak 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

Modifiye Besiyeri: Hücre dışı alkali proteaz üretiminde kullanılmıştır. Bir Erlenmeyer içerisinde %1 Glukoz (Merck, Almanya), %1 Maya Özü, %0,1 K₂HPO₄, %0,1 NaCl, %0,01 MgSO₄ tartılıp 1 L damıtık su ilave edilerek manyetik karıştırıcı yardımıyla çözündürülmüştür. pH değeri 7-7,5 arasında olacak şekilde 2 N HCl veya 2 N NaOH ile ayarlandıktan sonra 100 mL'lik erlenmelere, her birinde 30'ar mL olacak şekilde dağıtılmış ve 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

3.1.4. Kimyasallar ve çözeltiler

Kazein Çözeltisi (%1): Proteaz aktivitesinin belirlenmesinde, substrat olarak kazein kullanılmıştır. Erlen içerisinde dehidre formdaki 1 g kazein tartılarak üzerine 100 mL 100 mM Tris-HCl pH 8 tampon çözeltisi ilave edilmiştir. 80°C'ye önceden ayarlanmış olan çalkalamalı su banyosunda 80 rpm çalkalama hızında 10 dk bekletilmiş, böylelikle kazeinin çözünmesi sağlanmıştır.

Trikloroasetik Asit (%10; TCA): Proteaz enzim aktivitesi tayininde reaksiyonu durdurmak ve proteinleri çöktürmek amacıyla kullanılmıştır. 10 g TCA (Merck, Almanya) 100 mL damıtık suda çözündürülmüştür.

Trizma Base - Hidroklorik Asit Tampon Çözeltisi (Tris-HCl; 100 mM; pH 7, 8, 9): Enzim aktivitesi tayininde ve enzimin optimum pH'sının belirlenmesinde kullanılmıştır. 12,11 g Trizma Base (Sigma-Aldrich, ABD) tartılarak bir miktar damıtık su ile manyetik karıştırıcıda çözündürülmüştür. Daha sonra istenilen pH'ya 2 N HCl eklenerek pH metre ile ayarlama yapılmıştır. Balon jøjeye aktarılarak 1 L çizgisine kadar damıtık su ile tamamlanmıştır.

Sodyum Hidroksit Çözeltisi (NaOH; 2 N): pH ayarlanmasında kullanılmıştır. Bir beher içerisine 8 g NaOH (Merck, Almanya) tartılarak damıtık su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Hidroklorik Asit Çözeltisi (HCl; 2 N): pH ayarlanmasında kullanılmıştır. Molekül ağırlığı 36,5 g/mol, yoğunluğu 1,18 g/cm³, ağırlıkça %37 olan HCl'den (Sigma-Algrich, Almanya) 16,7 mL alınarak damıtık su ile balon jøjede 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Sitrat Tampon Çözeltisi (100 mM; pH 4, 5 ve 6): Enzimin optimum pH'sının belirlenmesinde kullanılmıştır. Molekül ağırlığı 294,1 g/mol olan Sodyum Sitrat Dihidrat'tan 1,205 g; molekül ağırlığı 192,1 g/mol olan Sitrik Asit'ten 0,174 g tartılarak damıtık su ile 50 mL'ye tamamlanmıştır.

Karbonat-Bikarbonat Tampon Çözeltisi (100 mM; pH 10): Enzimin optimum pH'sının belirlenmesinde kullanılmıştır. Molekül ağırlığı 105,99 g/mol olan Sodyum Karbonat'tan 0,4637 g; molekül ağırlığı 84,01 g/mol olan Sodyum Bikarbonat'tan 0,0525 g tartılarak damıtık su ile 50 mL'ye tamamlanmıştır.

3.2. Yöntem

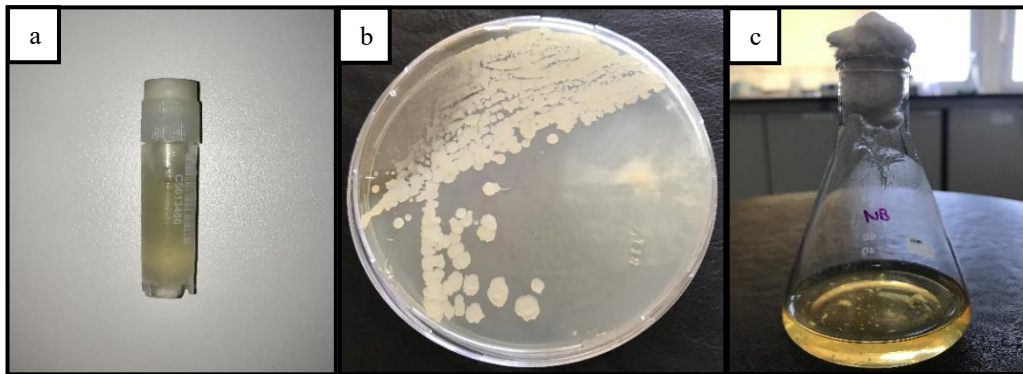
3.3. Tarama Çalışması

Türkiye'nin çeşitli illerinden toplanan toprak-gıda numunelerinden önceki çalışmalarda izole edilerek, bu çalışmada kullanılmak üzere seçilmiş 32 adet izolatın her birinden, bir öze dolusu alınarak SMA besiyerine ekim yapılmıştır. Ekim yapılan SMA besiyerleri önceden 33°C'ye ayarlanmış inkübatöre konularak *Bacillus* suşlarının 24. ve 48. saat sonunda kazein hidrolizi ile şeffaf zon oluşturup oluşturmadıkları gözlemlenerek kontrol edilmiştir (Sümengen ve ark., 2016).

3.4. Proteaz Enzimi Üretimi

3.4.1. İnokulum hazırlama ve inokülasyon

Test mikroorganizması olarak seçilen *Bacillus* sp. EBTA6 suşunun aktive edilmesi amacıyla ilk olarak Nutrient Agar besiyerinde çizme yöntemiyle tek koloni oluşturacak şekilde ekim yapılarak inkübatörde 33°C'de 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.1.a., Şekil 3.1.b.). İnkübasyon sonunda üreyen suş daha sonra 30 mL'lik Nutrient Broth sıvı besiyerine ekim yapılarak çalkalamalı inkübatörde 33°C ve 120 rpm'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.1.c.). Elde edilen sıvı kültür enzim üretiminde inokulum olarak kullanılmıştır. Çalışmada, tüm deneylerde inokulum miktarı %5 (h/h) olarak alınmıştır.



Şekil 3.1. *Bacillus* sp. EBTA6 izolatı; a) Gliserol içeren eppendorf tüplerinde muhafazası, b) NA besiyerinde gelişimi, c) NB besiyerinde gelişimi

3.4.2. “Design Expert” programı kullanılarak yanıt yüzey yöntemi ile fermantasyon parametrelerinin optimizasyonu

Yanıt yüzey yöntemi (RSM), çok değişkenli bir sürecin optimum tasarım koşullarını belirlemede yarar sağlayan istatistiksel bir metodolojidir. Değişkenler arasındaki etkileşimler daha az deney ile daha kısa sürede araştırıldığından, “bir seferde tek değişken” yönteminden daha faydalıdır (Izmirlioglu ve Demirci, 2016). Ayrıca RSM, değişkenler arasındaki etkileşim hakkında istatistiksel veriler sağlar ve aynı anda birden fazla yanıt verir (Bezerra ve ark., 2008). Bu nedenle, karmaşık bir sürecin optimizasyonu için güçlü bir istatistiksel tekniktir (Zhong ve Wang, 2010).

Bu çalışmada, proteaz üretiminde pH, sıcaklık, maya özütü konsantrasyonu gibi farklı bağımsız kritik değişkenler arasında ön bulgulara dayanarak, fermantasyon sürecindeki önemli bileşenlerin eş zamanlı, sistematik, verimli varyasyonları gözlemlenmiştir. Matematiksel bir korelasyon modeli geliştirerek proteaz üretimini ve mikroorganizma gelişmesini optimize etmek için ekonomik bir strateji olarak merkezi kompozit dizaynı (CCD) kullanılmıştır. RSM’de veri oluşturmak ve CCD’nin deneysel tasarımını analiz etmek için Design-Expert sürüm 7.0.0 yazılımı (Stat-Ease Inc., Minneapolis, Amerika Birleşik Devletleri) seçilmiştir. Merkezi kompozit dizaynında gerçek ve kodlu faktörler açısından kullanılan üç bağımsız değişkenin deney aralığı ve düzeyleri Tablo 3.3.’de gösterilmiştir.

Tablo 3.3. *Bacillus* sp. EBTA6 tarafından proteaz üretimi için deney aralığı ve kodlanmış proses değişkenleri

Faktör	İsim	Birim	Tür	Minimum (-1)	Maksimum (+1)	Merkez Nokta	Standart Sapma
A	Sıcaklık	(°C)	Sayısal	30	40	35	4,132
B	pH		Sayısal	5	9	7	1,653
C	Maya Özütü	(g/L)	Sayısal	5	15	10	4,132

Üç önemli parametre, yani ortamın sıcaklığı (A), başlangıç pH’ı (B), maya özütü konsantrasyonu (C) bağımsız değişkenler olarak seçilirken proteaz enzim aktivitesi (U/mL) ile mikroorganizma gelişmesi (600 nm) bağımlı yanıt değişkenleri olarak seçilmiştir. Merkezi kompozit dizaynına göre faktörler (bağımsız değişkenler); optimal seviyeleri belirlenirken, beş kodlu düzeyde [-1,682 (- α), -1, 0, +1, +1,682

($+\alpha$)] değerlendirilmiştir. Buna göre program deney tasarım matrisine göre 20 deneysel çalışma önermiştir (Tablo 3.4.). Merkez noktada 6 analiz yapılmıştır. Proteaz üretimi, 30 mL'lik çalışma hacmine sahip 100 mL Erlenmeyerler içerisinde gerçekleştirilmiştir. Proteaz üretimi için kullanılan bazal ortam (g/L), Glukoz, 10; K_2HPO_4 , 1; NaCl, 1 ve $MgSO_4$, 0,1 olarak belirlenmiştir.

Tablo 3.4. *Bacillus* sp. EBTA6 izolatının merkezi kompozit dizaynı (CCD) ile proteaz üretimi ve mikroorganizma gelişmesi için deneysel tasarımı

Çalışma Sayısı	Faktör 1	Faktör 2	Faktör 3
	Sıcaklık (°C)	pH	Maya Özüdü (g/L)
1	26,59 (-1,682)	7,00 (0)	10,00 (0)
2	30,00 (-1)	9,00 (+1)	15,00 (+1)
3	30,00 (-1)	5,00 (-1)	15,00 (+1)
4	30,00 (-1)	9,00 (+1)	5,00 (-1)
5	30,00 (-1)	5,00 (-1)	5,00 (-1)
6	35,00 (0)	10,36 (+1,682)	10,00 (0)
7	35,00 (0)	7,00 (0)	18,41 (+1,682)
8	35,00 (0)	3,64 (-1,682)	10,00 (0)
9	35,00 (0)	7,00 (0)	10,00 (0)
10	35,00 (0)	7,00 (0)	10,00 (0)
11	35,00 (0)	7,00 (0)	10,00 (0)
12	35,00 (0)	7,00 (0)	1,59 (-1,682)
13	35,00 (0)	7,00 (0)	10,00 (0)
14	35,00 (0)	7,00 (0)	10,00 (0)
15	35,00 (0)	7,00 (0)	10,00 (0)
16	40,00 (+1)	9,00 (+1)	15,00 (+1)
17	40,00 (+1)	5,00 (-1)	5,00 (-1)
18	40,00 (+1)	9,00 (+1)	5,00 (-1)
19	40,00 (+1)	5,00 (-1)	15,00 (+1)
20	43,41 (+1,682)	7,00 (0)	10,00 (0)

Besiyeri pH'ları 2 N HCl veya 2 N NaOH ile deneysel tasarımda verilen değerlere ayarlanıp 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir. Besiyerinin %5'i (h/h) olacak şekilde NB besiyerinde aktifleştirilen kültür ile aşılanmıştır. Daha sonra, çalkalamalı inkübatörde 120 rpm çalkalama hızında ve RSM programına göre belirlenen sıcaklıklarda 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 24 ve 48. saatlerinde alınan örneklerde mikroorganizma gelişmesi ve proteaz aktivitesi belirlenmiştir (Suberu ve ark., 2019).

3.4.3. İstatistiksel analiz

Yazılım tarafından önerilen 20 deneysel çalışmanın uygulanmasıyla, RSM'den elde edilen veriler ANOVA'ya tabi tutularak bağımlı değişkenlerin (mikroorganizma gelişmesi ve proteaz aktivitesi) cevabını tahmin etmek için ikinci dereceden polinom model denklemi oluşturulmuştur. Bu çalışmadaki tüm deneyler için üç tekrar yapılmıştır; ortalamaları ve standart sapmaları oluşturulmuştur. Uygun polinom denklemi, değişkenlerin her birinin tepki ve deney seviyeleri arasındaki ilişkiyi göstermek için üç boyutlu (3D) yüzey grafikleri ve 2D Kontur grafikleri ifade edilmiştir. Grafikleri çizmek için istatistiksel yazılım (Design-Expert 7.0.0 Stat-Ease Inc.) kullanılmıştır Optimizasyon çalışmasında ANOVA analizi ile P değerinin " $<0,05$ " olması; model terimlerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu gösterir (Vijayaraghavan ve Prakash Vincent, 2015; Hussain ve ark., 2017).

3.4.4. Konfirmasyon (doğrulama) deneyi

Yanıt yüzey yönteminde; azaltılarak modifiye edilen kübik modelin geçerliliğini kontrol etmek için, optimize edilmiş farklı parametrelerin kombinasyonunun yazılım tarafından tahmini öngörülen maksimum gelişme ve maksimum proteaz aktivitesi deneysel olarak test edilmiştir. Konfirmasyon için istenilen formülasyonda hazırlanan besiyerleri 121°C'de 15 dakika steril edilerek, soğumaya bırakılmış ve besiyerinin %5'i olacak şekilde (h/h) NB besiyerindeki aktif kültür ile aşılacaktır. Mikroorganizma, 120 rpm çalkalama hızında ve konfirmasyon için programın istediği sıcaklıkta 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda alınan örneklerde mikroorganizma gelişmesi ve proteaz aktivitesi belirlenmiştir. Maksimum mikroorganizma gelişmesi ve maksimum proteaz aktivitesi için program tarafından tahmin edilen değerler, deneysel olarak gerçekte bulunan değerlerle karşılaştırılmıştır (Suberu ve ark., 2019).

3.5. Proteaz Aktivitesi Tayini

Gelişme ortamından 48. saatte alınan örnekler 10000 rpm'de, 4°C'de 5 dk santrifüjlenmiştir (Hettich Zentrifugen, EBA 21). Elde edilen hücresiz süpernatant (ham enzim) proteaz aktivitesi tayininde kullanılmıştır.

Proteaz aktivitesi tayininde substrat olarak kazein kullanılmıştır. Deney tüpü içerisinde; 1 mL kazein çözeltisi [100 mM pH 8 Tris-HCl tamponu içerisine %0,1 oranında kazein] ile 0,2 mL enzim örneği vortekslenerek karıştırıldıktan sonra çalkalamalı su banyosunda 60°C'de 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası reaksiyonu durdurmak ve ortamdaki proteinleri çöktürmek amacıyla, tüpler buz dolu bir kaba alınıp üzerine hızlı olacak şekilde 2 mL %10 (ağ/h) TCA çözeltisi ilave edilip vortekslenmiştir. Daha sonra karışım, soğutmalı santrifüjde 4°C'de 9000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüjleme sonrası süpernatanttan 1 mL alınıp üzerine 4 mL damıtık su eklenerek 5 kat seyrelme işlemi yapılmış ve 280 nm dalga boyunda köre karşı UV-VIS spektrofotometrede absorbansı okunarak ölçüm gerçekleştirilmiştir. Kör deneme reaksiyon karışımı olarak enzim örneği yerine aynı miktarda damıtık su (0,2 mL) kullanılmış, üzerine 1 mL kazein çözeltisi eklenerek diğer örneklerle yapılan tüm işlemler sırasıyla uygulanmıştır. Diğer örnekler ile kör deneme arasındaki absorbans farkı hesaplanmıştır. Bu çözeltilerdeki tirozin miktarına atfedilen absorbans değeridir (Olajuyigbe ve Falade, 2014). Bağlı proteaz aktivitesi, enzimatik analizde saptanan maksimum proteaz aktivitesine göre tespit edilen aktivitenin yüzdesi olarak tanımlanmıştır (Mishra, 2016).

3.5.1. Tirozin standart grafiğinin hazırlanması

Proteaz enzimi aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan tirozin standart grafiğinin oluşturulması için 50 mL 1 mM pH 8 Tris-HCl tampon çözeltisi ile 9,06 mg tirozin çözüldürülerek stok çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltilerden belli hacimlerde alınarak 1 mM pH 8 Tris-HCl tampon çözeltisi ile seyreltilip farklı konsantrasyonlarda tirozin çözeltileri (100, 200, 400, 600, 800, 1000 µM) oluşturulmuştur (Tablo 3.5.). UV-VIS Spektrofotometre kullanılarak kvartz küvet ile 280 nm dalga boyunda

absorbans okunmuştur (Kumar ve Borah, 2012). Tirozin konsantrasyonuna bağlı elde edilen absorbans değerlerine göre grafik çizilmiştir (Şekil 3.2.). Çizilen Tirozin standart grafiğindeki eğim ile “Denklem 3.1” kullanılarak enzim aktivitesi hesaplanmıştır.

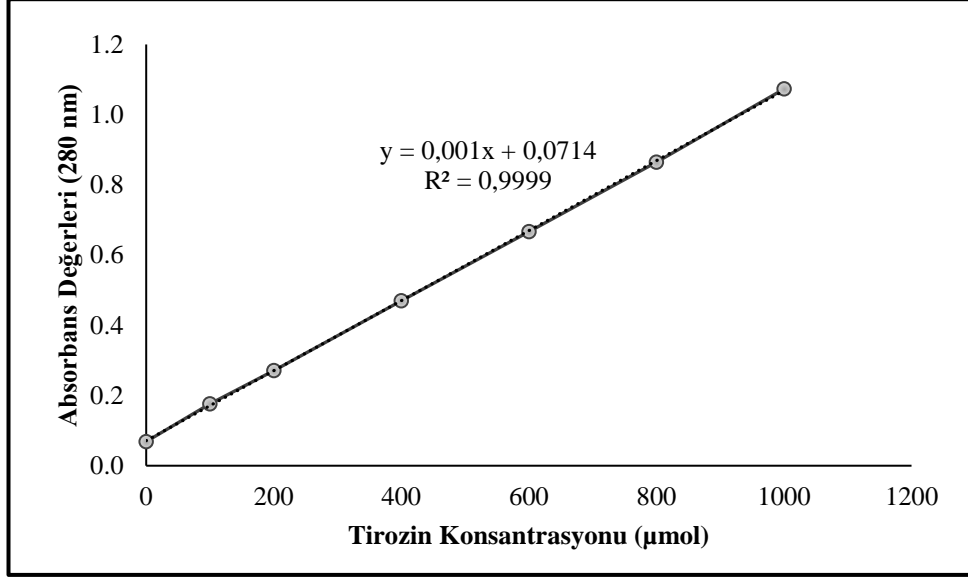
$$\text{Enzim Aktivitesi} \frac{U}{\text{mL.dk}} = \frac{A \times B}{C \times D} \times \text{SF} \quad (3.1)$$

- A : Standart eğriden bulunan değer (μmol)
 B : Toplam hacim (mL)
 C : Enzim miktarı (mL)
 D : İnkübasyon süresi (dk)
 SF : Seyreltme faktörü

Bir ünite (U) proteaz aktivitesi, analiz koşulları altında (60°C , pH 8) %1 kazeinden 1 dakika içinde mililitre başına 1 μmol tirozini serbest bırakan enzim miktarı olarak tanımlanır (Olajuyigbe ve Falade, 2014). Analizler 3 paralel olarak yapılmıştır.

Tablo 3.5. Tirozin standart grafiğinin belirli konsantrasyonlarda hazırlanması ve 280 nm absorbansda okunması

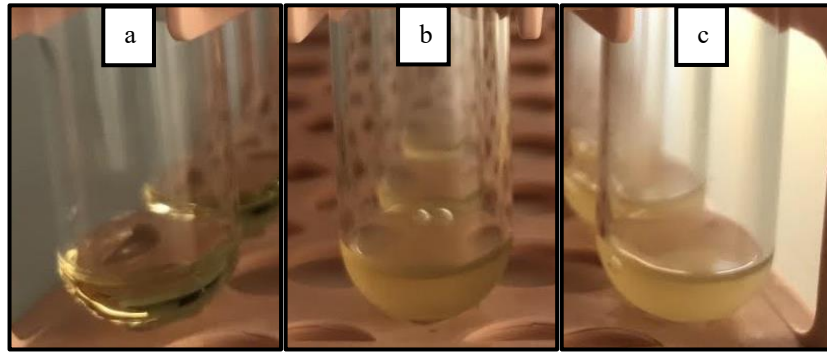
Konsantrasyon (μmol)	Absorbans (280 nm)			
	A	B	C	Ortalama
0	0,069	0,070	0,067	0,069
100	0,174	0,175	0,180	0,176
200	0,270	0,270	0,273	0,271
400	0,469	0,464	0,476	0,470
600	0,666	0,664	0,670	0,667
800	0,863	0,862	0,869	0,865
1000	1,076	1,072	1,071	1,073



Şekil 3.2. Tirozin Standart Eğrisi

3.6. Mikroorganizma Gelişiminin Ölçümü

Mikroorganizma gelişmesinin ölçülmesi için gelişmenin 48. saati sonunda 0,5 mL örnek alınmıştır. Alınan örneklerin üzerlerine 9,5 mL damıtık su konularak 20 kat seyreltme işlemi yapılmıştır. Vortekslendikten sonra küvet ile UV-VIS Spektrofotometre’de 600 nm dalga boyunda optik yoğunluğu ölçülmüştür. Ekim yapılmamış taze besiyeri kör deneme olarak kullanılmıştır. Kör denemeye de aynı oranda seyreltme işlemi uygulanmıştır. Örnek ile kör deneme arasındaki absorbans farkları hesaplanmış ve mikroorganizma gelişmesi belirlenmiştir (Şekil 3.3.) (Al-Askar ve ark., 2015).



Şekil 3.3. Modifiye besiyerinde proteaz üretimine tabi tutulan *Bacillus* sp. EBTA6 izolatının gelişmesi; a) 0. saat kör okuma, b) 24. saat sonu, c) 48. saat sonu

3.7. Enzim Özellikleri

Bacillus sp. EBTA6 izolatu, Bölüm 3.4.4.' de konfirmasyon için belirlenen optimum sıcaklık, pH, maya özütü ortamında çalkalamalı inkübatörde (120 rpm), 48 saat geliştirilerek elde edilen süpernatant enzimin özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

3.7.1. Proteaz enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi

Sıcaklığın ham enzimin proteolitik aktivitesi üzerindeki etkisi, Bölüm 3.5.'de verilen standart enzim aktivitesi deneyinde 15 dakikalık inkübasyon aşaması sırasında reaksiyon karışımının çeşitli sıcaklıklarda (Oda Sıcaklığı, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C ve 90°C) inkübasyona bırakılması ile belirlenmiştir. Her sıcaklık için 15 dakikalık inkübasyon aşaması sırasında kör deneme de yapılmıştır. 15 dakikalık inkübasyon sonrası standart enzim aktivitesi deneyine devam edilerek, deneyin son aşaması olan 280 nm dalga boyunda UV-VIS spektrofotometrede absorbansları okunarak aynı sıcaklığa sahip örnekler ile kör denemeleri arasındaki absorbans farkı hesaplanmıştır. Maksimum proteaz aktivitesi gösteren sıcaklık değeri 100 olarak, diğer sıcaklık değerleri de bu değere göre konumlandırılarak bağıl proteaz aktivitesi grafiği oluşturulmuştur (Özden, 2014; El-Hassayeb ve Abdel Aziz, 2016).

3.7.2. Proteaz enziminin sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi

Enzim, bir pH tamponu (100 mM Tris-HCl pH 8) kullanılarak %50 oranında seyreltilmiştir. Reaksiyon karışımı önceden 60°C'ye ayarlı çalkalamalı su banyosunda 180 dakika inkübasyona bırakılarak 0-10-20-30-60-90-120-150-180. dk sonlarında örnek alınmıştır. Süre sonunda içerisinde 0,4 mL reaksiyon karışımı olan tüm tüplerin üzerine 1 mL kazein çözeltisi ilave edilerek vortekslenip 60°C, 15 dk çalkalamalı su banyosunda inkübasyona bırakılarak standart enzim aktivitesi deneyi gerçekleştirilmiştir. Diğer örnekler ile kör deneme arasındaki absorbans farkı hesaplanmıştır. Maksimum proteaz aktivitesi gösteren süredeki değer 100 olarak, diğer süreler ise bu değere göre konumlandırılarak bağıl proteaz aktivitesi grafiği

oluşturulmuştur (Reddy ve ark., 2008; Olajuyigbe ve Falade, 2014). Aynı deneme dizaynı 50°C için de gerçekleştirilmiştir. Ancak örnek alma süreleri 0-10-20-30-60-90-120-150. dk olarak değiştirilmiştir.

3.7.3. Proteaz enziminin optimum pH'sının belirlenmesi

Enzimin optimum pH'sını belirlemek için konik santrifüj tüplerindeki 0,2 mL enzim çözeltisi üzerine, çeşitli pH değerlerindeki tampon çözeltilerle (4, 5, 6, 7, 8, 9 ve 10) hazırlanan (Tablo 3.6.) 1 mL %1 (a/h) kazein çözeltileri ilave edilerek vortekslenip 60°C 15 dk çalkalamalı su banyosunda inkübasyona bırakılmış ve standart enzim aktivitesi deneyi gerçekleştirilmiştir. Enzim örnekleri ile kör denemeleri arasındaki absorbans farkları hesaplanmıştır. Maksimum proteaz aktivitesi gösteren pH değeri 100 olarak, diğer pH değerleri ise bu değere göre konumlandırılarak bağıl proteaz aktivitesi grafiği oluşturulmuştur (Sellami-Kamoun ve ark., 2008; Özden, 2014; El-Hassayeb ve Abdel Aziz, 2016).

Tablo 3.6. Proteaz enziminin optimum pH ve pH stabilitesinin belirlenmesi için kullanılan tampon çözeltiler

pH	Tampon Çözelti
4-5-6	100 mM Sitrat
7-8-9	100 mM Trizma Base - Hidroklorik asit
10	100 mM Karbonat-Bikarbonat

3.7.4. Proteaz enziminin pH stabilitesinin belirlenmesi

Bacillus sp. EBTA 6 izolatından elde edilen 0,2 mL ham proteaz enzimi üzerine Tablo 3.6.'da verilen çeşitli pH değerlerinde hazırlanan tampon çözeltiler (4, 5, 6, 7, 8, 9 ve 10) sıra ile ayrı ayrı 0,2 mL ilave edilerek enzim %50 oranında seyreltilmiştir. Her bir tüp içerisindeki 0,4 mL reaksiyon karışımı vortekslenerek oda sıcaklığında 1 saat süreyle bekletilmiştir. Süre sonunda enzim aktivitesi belirlenmiştir. Enzim örnekleri ile kör denemeleri arasındaki absorbans farkları hesaplanmıştır. Maksimum proteaz aktivitesi gösteren pH değeri 100 olarak, diğer pH değerleri ise bu değere göre konumlandırılarak bağıl proteaz aktivitesi grafiği oluşturulmuştur (Sellami-Kamoun ve ark., 2008).

3.7.5. Proteolitik enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının, amino asit inhibitörlerinin ve yüzey aktif maddelerin etkisinin belirlenmesi

Metal iyonlarının ve aminoasit inhibitörlerinin enzim aktivitesi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla, K^+ , Mg^{+2} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Sn^{2+} , Zn^{2+} iyonları ile PMSF, EDTA inhibitörleri kullanılmıştır. Bu metal ve inhibitörlerin sırasıyla 1 ve 5 mM konsantrasyonlardaki çözeltileri (sadece PMSF 2,5 ve 5 mM konsantrasyonda kullanılmıştır) pH 8 Tris-HCl tampon çözeltisiyle hazırlanmıştır. Daha sonra 0,2 mL metal iyonları ve aminoasit inhibitör çözeltileriyle ile 0,2 mL enzim çözeltisi karıştırılarak oda sıcaklığında 60 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda enzim aktivitesi belirlenmiştir.

Anyonik ve iyonik olmayan yüzey aktif maddelerin enzim aktivitesi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla, SDS, Tween 20, Tween 80 kullanılmıştır. Bu iyonik ve iyonik olmayan yüzey aktif maddelerin % 1'lik konsantrasyonlarındaki çözeltileri pH 8 Tris-HCl tampon çözeltisiyle hazırlanmıştır. Daha sonra 0,2 mL yüzey aktif madde çözeltileri ile 0,2 mL enzim çözeltisi karıştırılarak oda sıcaklığında 60 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda enzim aktivitesi belirlenmiştir.

Kör deneme için 0,2 mL damıtık su ile 0,2 mL 100 mM pH 8 Tris-HCl tampon çözeltisi vortekslenerek, oda sıcaklığında 60 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda enzim aktivitesi belirlenmiştir. Kör deneme için 3 paralel yapılarak ortalaması alınmıştır.

Kıyaslama yapılması amacıyla "Kontrol" denemesi yapılmıştır. Bunun için 0,2 mL enzim örneği ile 0,2 mL 100 mM pH 8 Tris-HCl tampon çözeltisi vortekslenerek, oda sıcaklığında 60 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda enzim aktivitesi belirlenmiştir. Kontrol denemesi 3 paralel yapılarak ortalaması alınmıştır. Enzim örnekleri ile kör denemeleri arasındaki absorbans farkları hesaplanmıştır. Kontrol denemesinin enzim aktivitesi 100 kabul edilerek; metal iyonları, proteaz inhibitörleri ve yüzey aktif maddelerin inkübasyon sonrası elde edilen enzim aktivitesi değerleri kalan aktivite yüzdesi olarak tanımlanarak kıyaslama yapılmıştır (Sarı, 2011; Annamalai ve ark., 2014a; Görmez ve Gülmüş, 2018).

3.7.6. Proteaz enziminin Michaelis Menten kinetik sabitlerinin belirlenmesi

Bacillus sp. EBTA6 izolatından elde edilen proteaz enziminin, substrat olarak kazein kullanılarak kinetik sabitlerinin belirlenebilmesi için 0,05-20 mg/mL arasında değişen farklı kazein konsantrasyonlarına sahip 10 çözelti hazırlanmıştır (Tablo 3.7.). 100 mM Tris-HCl tamponu (pH 8) içerisine 20 mg/mL olacak şekilde kazein ilave edilerek 80°C'ye önceden ayarlanmış olan çalkalamalı su banyosunda 80 rpm çalkalama hızında 10 dk bekletilmiştir. Böylelikle stok çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan bu stok çözülden Tablo 3.7.'de gösterildiği hacimlerde alınıp üzerine 1 mL'ye tamamlanacak şekilde 100 mM Tris-HCl tamponu (pH 8) ilave edilerek farklı kazein konsantrasyonları oluşturulmuştur. Hazırlanan 10 farklı substrat konsantrasyonunun her biri ile standart enzim aktivitesi deneyi gerçekleştirilmiştir. Enzim örnekleri ile kör denemeleri arasındaki absorbans farkları hesaplanmıştır. Başlangıçtaki substrat konsantrasyonları (1/S), başlangıçtaki reaksiyon hızları (1/V) olarak belirlenerek Lineweaver-Burk grafiği oluşturulmuştur. X eksenini kesim noktasında K_m , Y eksenini kesim noktasında V_m değerleri bulunmuştur (Özcan ve ark., 2007; Rao ve ark., 2009; Polatoğlu, 2016; Hussain ve ark., 2017).

Tablo 3.7. Michaelis-Menten kinetiğinin belirlenmesi için hazırlanan kazein çözeltileri

Test Örneği	Kazein Konsantrasyonları (mg/mL)	Stok Kazein Çözeltisinden Alınan Hacimler (mL)	100 mM pH 8 Tris-HCl Tamponu (mL)
1	20	1	0
2	16	0,8	0,2
3	12	0,6	0,4
4	10	0,5	0,5
5	8	0,4	0,6
6	6	0,3	0,7
7	4	0,2	0,8
8	2	0,1	0,9
9	1	0,05	0,95
10	0,05	0,025	0,975

3.8. Uygulama Alanları

Çalışmada *Bacillus* sp. EBTA6 izolatu, belirlenen optimum sıcaklık, pH, maya özütü ortamında geliştirildikten sonra 9000 rpm’de santrifüjlenerek elde edilen ham enzimin leke çıkarma kapasitesi ve süt pıhtılaştırma aktivitesi hesaplanmıştır.

3.8.1. Süt pıhtılaştırma aktivitesinin belirlenmesi

Süt pıhtılaştırma aktivitesi, Merheb-Dini ve arkadaşlarının (2010) yönteminin modifiye edilmesiyle belirlenmiştir. Çalışmada yağsız uzun ömürlü (UHT) süt kullanılmıştır. 2 mL yağsız süt bir test tüpüne alınarak üzerine 1 M CaCl₂ stok çözeltisinden farklı oranlarda son konsantrasyonu 20-30-40-50-100 mM olacak şekilde ilave edilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda CaCl₂, süt pıhtılaştırma aktivitesi üzerindeki etkisini belirlemek için eklenmiştir (Corrons ve ark., 2012). Böylece substrat vorteksenerek hazırlanmış, çalkalamalı su banyosunda 37°C’ye gelene kadar ön inkübe edilmiştir. 37°C’ye geldiği dijital gıda termometresi (Weather Forecast) ile kontrol edilen tüplere 0,2 mL enzim örneği ilave edilmiştir. Hızlıca vortekslendikten sonra yeniden 37°C’deki çalkalamalı banyosunda inkübasyona bırakılarak, kronometre başlatılmıştır. Test tüpü manuel olarak döndürülerek pıhtı oluşumu gözlemlenmiştir. İlk kesikli parçacıkların oluşarak farkedilebilir olduğu zaman ölçülerek kaydedilmiştir. Her deney için numunenin pıhtılaştırma süresi iki kez ölçülerek ortalama numune pıhtılaştırma süresi olarak rapor edilmiştir. Bir süt pıhtılaştırma ünitesi (U), 10 mL substratı 40 dakikada pıhtılaştıran 1 mL özütte bulunan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Sathya ve ark., 2009). Süt pıhtılaştırma aktivitesi aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır (Denklem 3.2) (Alecrim ve ark., 2014).

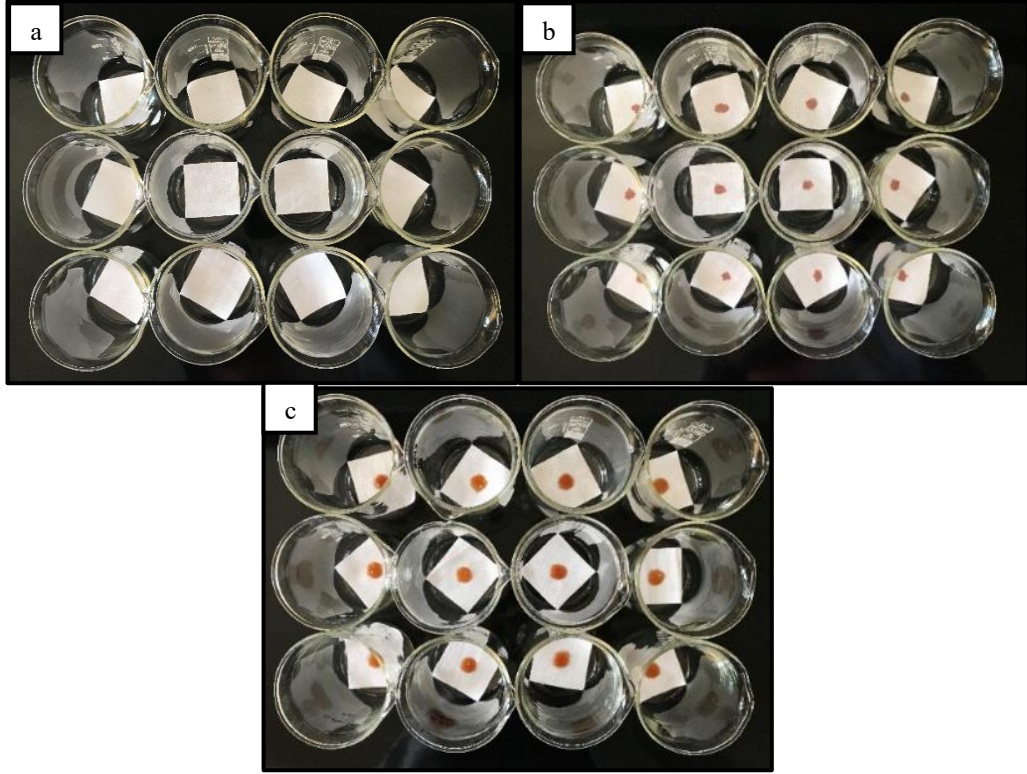
$$MCA (U/mL) = \frac{2400 \times \text{Sütün hacmi (S)}}{\text{Enzim Hacmi (E)} \times \text{Pıhtılaştırma Oluşumunun Süresi (T)}} \quad (3.2)$$

Burada 2400, süt pıhtılaştırma aktivitesinin dakika cinsinden toplam süresidir. S, süt hacmi (mL); E, enzim hacmi (mL) ve T, pıhtılaştırma oluşumunun süresi (saniye) ‘dir.

3.8.2. Leke çıkarma çalışmaları

Leke çıkarılmasında bir deterjan katkı maddesi olarak proteaz kullanılmaktadır. Bu çalışmada EBTA6 izolatından elde edilen proteazın leke çıkarma etkinliğini gözlemlenmek amacıyla; ketçap ve yerel bir marketten alınarak polisitiren köpük içerisinde doğranmış tavuk ciğerinden edinilen kan leke olarak kullanılmıştır.

Patiska (sık ve düz dokunmuş pamuklu bez) cinsi beyaz kumaş 4 cm x 4 cm olacak şekilde parçalara ayrılmıştır. Kumaşlara kan örneğinden 10 µL, ketçap örneğinden ise pastör pipetiyle bir damla damlatılmıştır (Şekil 3.4.). Lekelenmiş kumaş parçaları 95°C’de 5 dakika boyunca etüvde (Elektro-mag, M 5040) kurutulmuştur. Daha sonra beherler 6’şar olarak 3 gruba ayrılarak, üzerlerine Tablo 3.8.’de verilen grup isimleri yazılmış ve o gruplara ait belirlenen formülasyonlarda üzerleri tamamlanarak önceden 50°C’ye ayarlanmış olan çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. (C grubuna ilave edilmesi gereken 1 mL deterjan olarak “Ticari deterjan 1 ve Ticari deterjan 2” seçilerek 5 mg/mL olacak şekilde musluk suyunda çözündürülmüş, 2 farklı deney olarak aynı lekede çalışılmıştır.) Her bir beher yine Tablo 3.8.’de verilen belirli süre sonlarında çalkalamalı inkübatörden çıkarılarak, içerisindeki kumaş parçaları musluk suyunda hafif bir şekilde durulanmış ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kuruduktan sonra görsel olarak incelenmiştir. Leke ile işlenmemiş kumaş parçaları “Kontrol 2” olarak kabul edilmiştir (Annamalai ve ark., 2014b).



Şekil 3.4. Leke giderimi deneyi; a) Boyanmamış parçalar b) Kan Lekesi ile boyanmış parçalar, c) Ketçap Lekesi ile boyanmış parçalar

Tablo 3.8. Leke çıkarma çalışmalarında uygulanan deney dizaynı

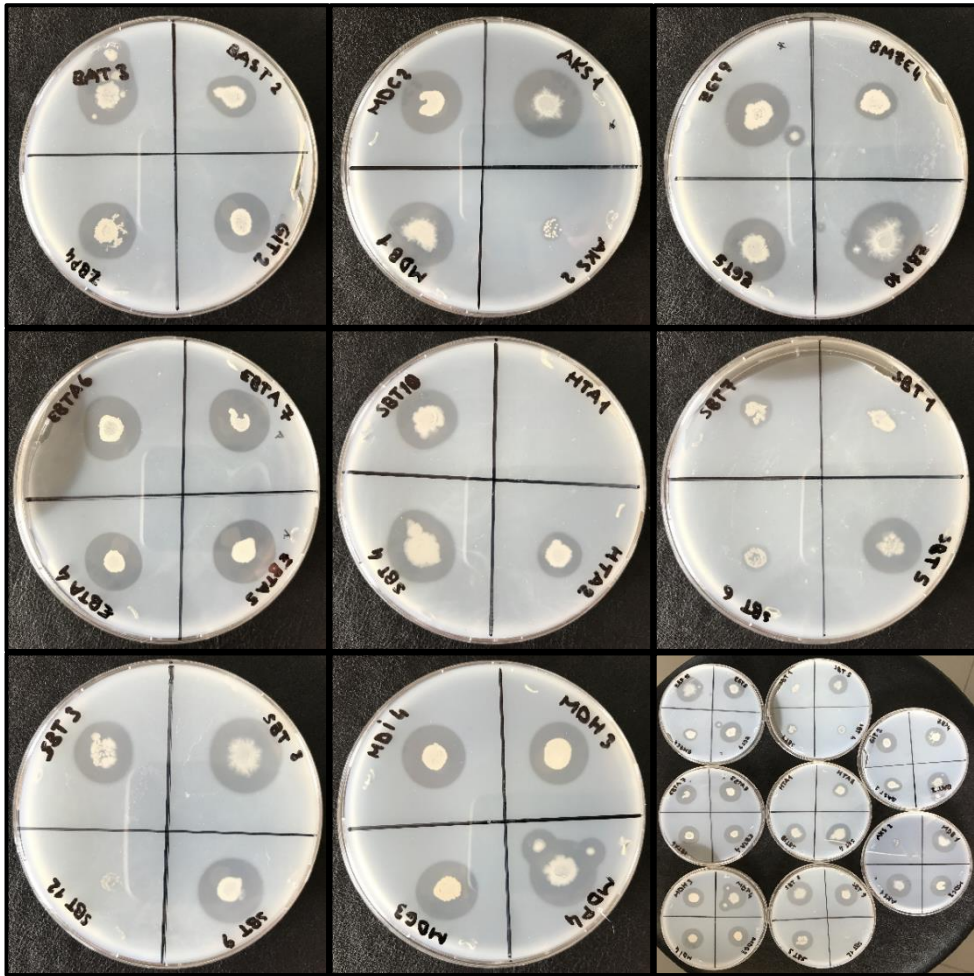
Seri Numarası	A grubu	B grubu	C grubu
	Leke + 100 mL Damıtık Su (Kontrol 1)	Leke + 100 mL Damıtık Su + Enzim (2 mL)	Leke + 100 mL Damıtık Su + 1 mL Deterjan (5 mg / mL)
1	5.dk	5.dk	5.dk
2	10.dk	10.dk	10.dk
3	15.dk	15.dk	15.dk
4	20.dk	20.dk	20.dk
5	25.dk	25.dk	25.dk
6	30.dk	30.dk	30.dk

BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

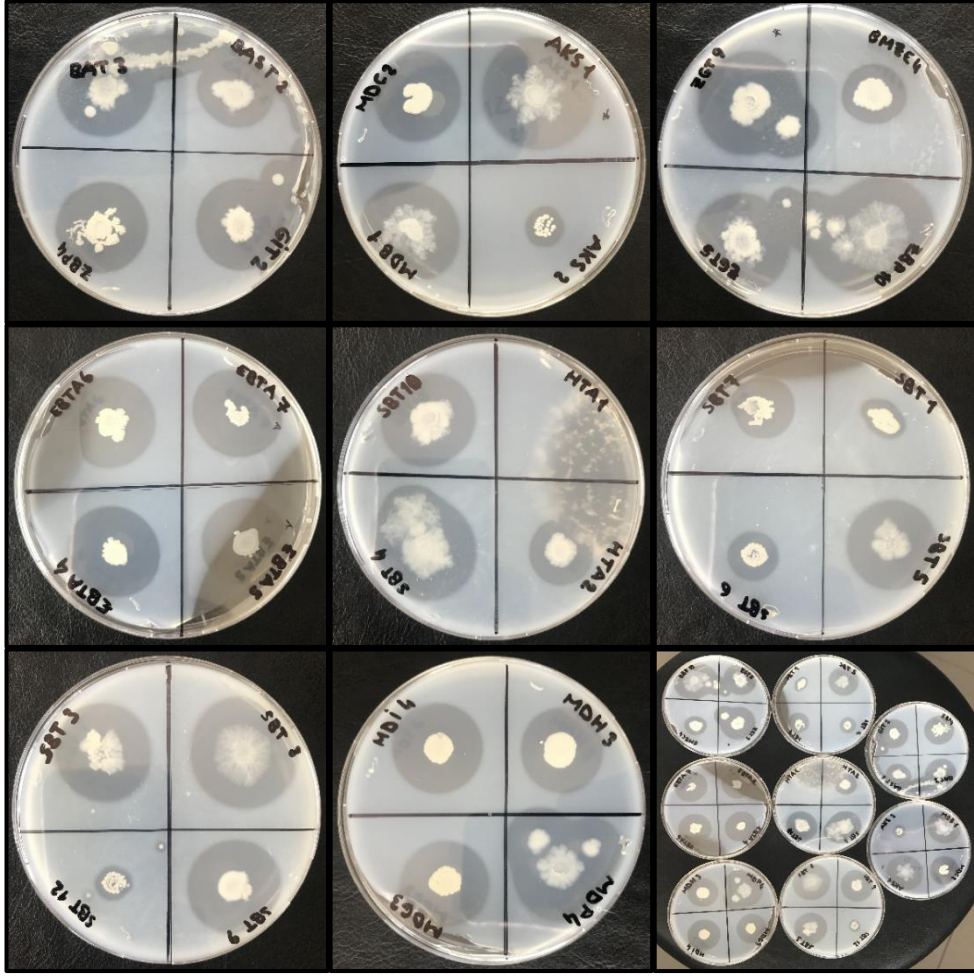
4.1. Tarama Çalışması Bulguları

4.1.1. Proteaz üreten suşların taraması ve proteaz aktivitesi

Şekil 4.1. yağsız süt tozu içeren besiyeri üzerindeki 32 adet *Bacillus* sp. izolatlarının 24. saatini, Şekil 4.2. ise 48. saatini göstermektedir.



Şekil 4.1. 24 saat sonunda yağsız süt tozu içeren besiyerinde geliştirilen *Bacillus* izolatlarının kazein hidrolizi ile oluşturdukları şeffaf zonlar



Şekil 4.2. 48 saat sonunda yağsız süt tozu içeren besiyerinde geliştirilen *Bacillus* izolatlarının kazein hidrolizi ile oluşturdukları şeffaf zonlar

Etraflarında net bir şeffaf zon bölgesi gösteren bakteri izolatları proteolitik aktif bakteri olarak tanımlanmıştır (Moharam ve ark., 2019).

32 adet *Bacillus* sp. izolatlarından her birinin 24.-48. saat inkübasyonları sonunda cetvel yardımıyla şeffaf zon oluşturan bölgenin çapı ve büyüme bölgesindeki koloninin çapı ölçülmüştür (Mishra, 2016). Şeffaf zon oluşturan bölgenin çapından büyüme bölgesindeki koloninin çapı çıkartılarak kazein hidroliz bölgesinin büyüklüğü belirlenmiştir (Tablo 4.1.).

Tablo 4.1. SMA besiyerinde 33°C'de 24 ve 48 saat inkübe edilen *Bacillus* sp. suşlarının gelişimleri ve zon çapları

<i>Bacillus</i> sp. suşu	24 saat Sonu		48 saat Sonu	
	Zon çapı (mm)	Bakteri gelişimi	Zon çapı (mm)	Bakteri gelişimi
KS1	9	(+)	14	(+)
AKS2	(-)	(+)	4	(+)
BAST2	4	(+)	9	(+)
BAT3	7	(+)	16	(+)
BMZE4	3	(+)	6	(+)
EBTA4	9	(+)	17	(+)
EBTA5	9	(+)	15	(+)
EBTA6	8	(+)	16	(+)
EBTA7	9	(+)	17	(+)
GİT2	8	(+)	15	(+)
HTA1	(-)	(-)	(-)	(+)
HTA2	4	(+)	9	(+)
MDB1	7	(+)	13	(+)
MDC2	8	(+)	15	(+)
MDG3	8	(+)	16	(+)
MDH3	7	(+)	13	(+)
MDİ4	9	(+)	17	(+)
MDP4	8	(+)	16	(+)
SBT1	(-)	(+)	3	(+)
SBT3	7	(+)	15	(+)
SBT4	5	(+)	9	(+)
SBT5	7	(+)	15	(+)
SBT6	2	(+)	6	(+)
SBT7	2	(+)	8	(+)
SBT8	9	(+)	15	(+)
SBT9	9	(+)	17	(+)
SBT10	6	(+)	11	(+)
SBT12	(-)	(+)	4	(+)
ZBP4	6	(+)	14	(+)
ZBP10	8	(+)	14	(+)
ZGT5	8	(+)	15	(+)
ZGT9	8	(+)	17	(+)

24. saatin sonunda zon oluşturmeyen izolatlar; AKS2, HTA1, SBT1, SBT12 olarak belirlenmiştir (<1 mm). Diğer izolatların ise <10 mm çap oluşturduğu gözlemlenmiştir.

24. saat sonunda edinilen sonuçlara göre kolonilerin çevresinde en büyük şeffaf zon oluşturan suşlar; AKS1, EBTA4, EBTA5, EBTA6, EBTA7, GİT2, MDC2, MDG3, MDİ4, MDP4, SBT8, SBT9, ZBP10, ZGT5, ZGT9 olarak belirlenmiştir.

48. saatin sonunda zon oluşturmeyen izolat; HTA1 olarak belirlenmiştir. Diğer izolatların ise <18 mm çap oluşturduğu gözlemlenmiştir. 24. saat sonunda edinilen sonuçlara göre kolonilerin çevresinde en büyük şeffaf zon oluşturan suşlar; BAT3, EBTA4, EBTA6, EBTA7, MDG3, MDİ4, MDP4, SBT9, ZGT9 olarak belirlenmiştir.

Çalışılan 32 izolat arasında, 24. ve 48. saat sonunda edinilen sonuçlara göre; en yüksek kazein hidroliz bölgesi göstererek proteaz aktivitesinin güçlü olduğu gözlemlenen izolatlardan biri olan EBTA6, 48 saatlik inkübasyon sonunda kullanılmak üzere ilerideki optimizasyon çalışmaları için seçilmiştir. EBTA izolatu daha önce yapılan bir çalışmada, ev yapımı bir tarhana örneğinden izole edilmiş ve çeşitli morfolojik ve biyokimyasal özellikleri ile 16S rDNA dizi analizine göre *Bacillus* cinsine ait bir bakteri olarak belirlenmiştir (Akçay ve Avcı, 2020).

4.2. “Design Expert” Programı Kullanılarak Yanıt Yüzey Yöntemi (RSM) ile Fermantasyon Parametrelerinin Optimizasyonu

Endüstride mikrobiyal proteaz üretimi fermantatif işleme gerçekleştirilir. Enzimin hızlı üretilmesi, optimize edilmiş ortam bileşimleri ve değiştirilmiş kültür koşulları ile elde edilebilir. Bu sebeple, fermantasyon koşullarının optimizasyonu, uygun maliyetli bir fermantasyon sürecinin geliştirilmesinde en önemli adımdır (Lotfy ve ark., 2007). Mikroorganizmalar, gelişme ve enzim üretimi için belirli fermantasyon parametrelerine sahip olduklarından, maksimum proteaz üretimi için biyoproses koşullarının iyileştirilmesi ihtiyacı zorunludur (Bhunja ve Dey, 2012).

Yanıt yüzey yöntemi, ortam parametrelerinin tek seferde geleneksel bir faktör yaklaşımına göre, nispeten daha kısa sürede ve daha az çabayla optimize edilmesine yardımcı olduğundan endüstriyel enzim üretimini iyileştirmek için mükemmel bir yaklaşımdır. *Bacillus* sp. EBTA6 tarafından proteaz üretimini ve gelişmeyi maksimuma çıkarmak için optimum koşulları bulmak amacıyla RSM kullanılarak merkezi kompozit dizaynı (CCD) ile üç parametre (A: sıcaklık, B: pH, C: maya özütü konsantrasyonu) dikkate alınmıştır. Bu izolat ile daha önce yapılan, besiyeri bileşiminin proteaz üretimine etkisinin Plackett-Burman dizaynı ile araştırıldığı bir çalışmada, maya özütünün proteaz üretiminde en etkili bileşen olduğu belirlenmiştir (Akçay ve Avcı, 2020). Bu nedenle maya özütü önemli bir değişken olarak RSM’de kullanılmıştır. Seçilen üç değişkenin farklı kombinasyonları ile yapılan toplam 20 deneysel çalışmada 48 saatlik inkübasyondan sonra proteaz üretimi ve mikroorganizma gelişmesi yanıtları Tablo 4.2.’de verilmiştir. Deneyler yapıldıktan

sonra elde edilen yanıtlar yazılım (Design Expert 7.0 sürümü) ile analiz edilmiştir. Her yanıt, üç paralel bağımsız çalışmanın ortalamasıdır. 24. saatteki mikroorganizma gelişmesi ve enzim üretimi için örnekler alınıp analizleri yapılmış, ancak 48. saate göre düşük olduğundan çalışmada kullanılmamıştır.

Tablo 4.2. *Bacillus* sp. EBTA6 izolatının yanıt yüzey yöntemi için kullanılan merkezi kompozit dizaynı faktörleri ve 48 saat sonunda proteaz üretimi ile mikroorganizma gelişmesi için yanıtları

Çalışma Sayısı	Faktör A	Faktör B	Faktör C	Yanıt 1	Yanıt 2
	Sıcaklık (°C)	pH	Maya Özütü (g/L)	Gelişme (600 nm)	Enzim Üretimi (U/mL)
1	26,59	7	10	2,570	1809
2	30	9	15	6,120	3158
3	30	5	15	5,960	2771
4	30	9	5	2,110	662
5	30	5	5	1,760	763
6	35	10,36	10	3,410	2809
7	35	7	18,41	5,480	2307
8	35	3,64	10	4,430	1582
9	35	7	10	3,680	2134
10	35	7	10	4,040	2153
11	35	7	10	3,760	2097
12	35	7	1,59	0,840	89
13	35	7	10	3,740	1966
14	35	7	10	3,620	1891
15	35	7	10	4,320	2163
16	40	9	15	4,320	1499
17	40	5	5	1,480	473
18	40	9	5	1,750	897
19	40	5	15	3,300	1907
20	43,41	7	10	1,610	1158

4.2.1. Bağımsız değişkenlerin enzim aktivitesi üzerine etkilerinin modellenmesi

Enzim aktivitesi 89 U/mL (Çalışma 12) ile 3158 U/mL (Çalışma 2) arasında değişmiştir (Tablo 4.2.). Üç parametrenin interaktif etkileri; değişkenlerin regresyon katsayısı, F değerleri, P değerleri olarak Tablo 4.3.'de gösterildiği gibi sonuçların varyans analizi (ANOVA) ile belirlenmiştir.

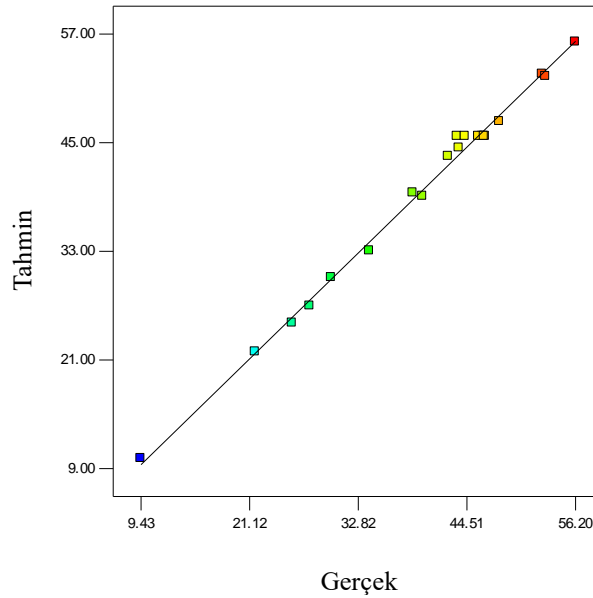
Tablo 4.3. *Bacillus* sp. EBTA6 izolatının proteaz üretiminde enzim aktivitesi için merkezi kompozit dizaynı ile istatistiksel analizi

Yanıt Yüzey Azaltılarak Modifiye Edilmiş Kübik Model için ANOVA						
Varyans Tablosu Analizi (Kısmi Kareler Toplamı – Tip III)						
Kaynak	Karelerin		Ortalama	F	p-değeri	
	Toplamı	df	Kareler	Değeri	Prob > F	
Model	2609,57	10	260,96	168,49	< 0,0001	<u>Önemli</u>
A-Sıcaklık	131,59	1	131,59	84,96	< 0,0001	
B-pH	87,46	1	87,46	56,47	< 0,0001	
C-Maya Özütü	1671,69	1	1671,69	1079,32	< 0,0001	
AB	0,31	1	0,31	0,20	0,6651	
AC	76,79	1	76,79	49,58	< 0,0001	
BC	7,44	1	7,44	4,81	0,0561	
A ²	100,36	1	100,36	64,79	< 0,0001	
C ²	524,26	1	524,26	338,49	< 0,0001	
ABC	43,31	1	43,31	27,96	0,0005	
A ² B	36,51	1	36,51	23,57	0,0009	
Kalıntı	13,94	9	1,55			
Uyum Eksikliği	6,15	4	1,54	0,99	0,4907	<u>Önemli değil</u>
Saf Hata	7,79	5	1,56			
Toplam	2623,51	19				

Optimizasyon çalışmasının ANOVA analizine göre 0,0500'den düşük "Prob>F" değerleri ($P < 0,05$) model terimlerinin anlamlı (önemli) olduğunu gösterdiği için; A, B, C, AC, A², C², ABC, A²B anlamlı model terimleri olarak belirlenmiştir. Sonuçlar ayrıca inkübasyon sıcaklığı (A), pH (B) ve maya özütü konsantrasyonunun (C) proteaz aktivitesinde enzim verimini etkileyen ana faktörler olduğunu göstermiştir. Bunun tersine AC, A², C², ABC ve A²B'nin etkileşen terimleri küçük faktörlerden oluştuğu gözlemlenmiştir. F değeri (168,49), modelin anlamlı olduğunu gösterirken; 0,1000'den büyük değerler model terimlerinin anlamlı olmadığını göstermiştir. Uyum eksikliği için F değeri 0,99 bulunarak, uyumsuzluğun saf hataya göre anlamlı olmadığı belirlenmiştir. Anlamlı olmayan uyum eksikliği, modelin iyi bir uyumu olduğunu göstermiştir. Çünkü bu, model denkleminde değişkenlerin değerlerinin herhangi bir etkileşiminde proteaz üretimini tahmin etmek için uygun olduğunu gösterir (Xiao ve ark., 2015). Modelin R-kare değeri 0,9947 olarak belirlenmiştir. 1'e yakın bir R-kare değeri, gözlemlenen ve tahmin edilen değerler arasında güçlü bir korelasyon olduğu ve modelin daha iyi güvenilirliğe sahip olduğu anlamına gelir (Kandasamy ve ark., 2016). 0,9584 olarak öngörülen R-kare değerinin, 0,9888 olarak gerçek R-kare değeri

ile makul bir uyum içinde olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Yeterli hassasiyet, sinyalin gürültüye oranını ölçer. Bir modelin uygun olması için 4'ün üzerinde bir oran arzu edilir (Xiao ve ark., 2015). Bu çalışmadan elde edilen 49,84 oranı, sinyalin kabul edilebilir olduğunu ve modelin tasarım alanında gezinmek için kullanılabileceğini gösterir.

Bir varyasyon katsayısı (C.V.), %10'dan az olduğunda oluşturulan modelin tekrar edilebilirliği anlamına gelir (Wang ve ark., 2017). Bu çalışmadan kaydedilen nispeten daha düşük bir C.V. % değeri (% 3,13) proteaz optimizasyonu için oluşturulan modelin doğruluğunu ve tutarlılığını gösterir. Şekil 4.3. modelin proteaz üretiminin optimizasyonu için uygun olduğu ve noktaların eşit dağılımı, tahmin edilen ile gözlemlenen yanıtlar arasında iyi bir ilişki olduğu anlamına gelir.



Şekil 4.3. *Bacillus* sp. EBTA6 tarafından proteaz üretimi için tahmin edilene karşı gerçek yanıt grafiği

Regresyon denklem katsayıları hesaplanarak veriler ikinci dereceden bir polinom denklemine yerleştirilmiştir. Proteaz aktivitesi regresyonunun *Bacillus* sp. EBTA6 ile yanıtı; A'nın sıcaklık, B'nin pH, C'nin maya özütü konsantrasyonu olduğu "Denklem 4.1" 'e göre ifade edilebilir;

Gerçek Faktörler Açısından Nihai Denklem:

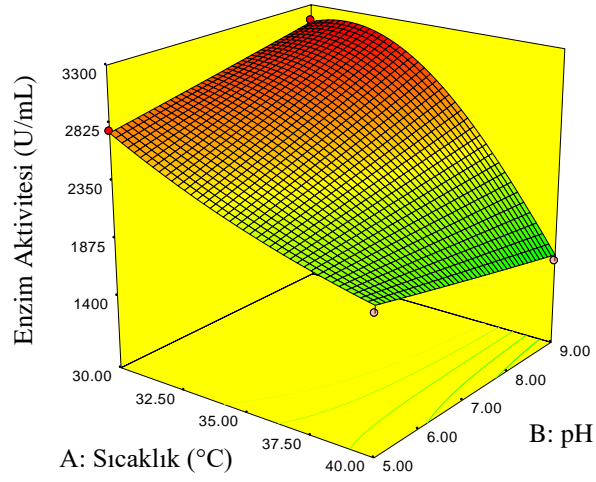
(4.1)

$$\sqrt{\text{Enzim Aktivitesi}}$$

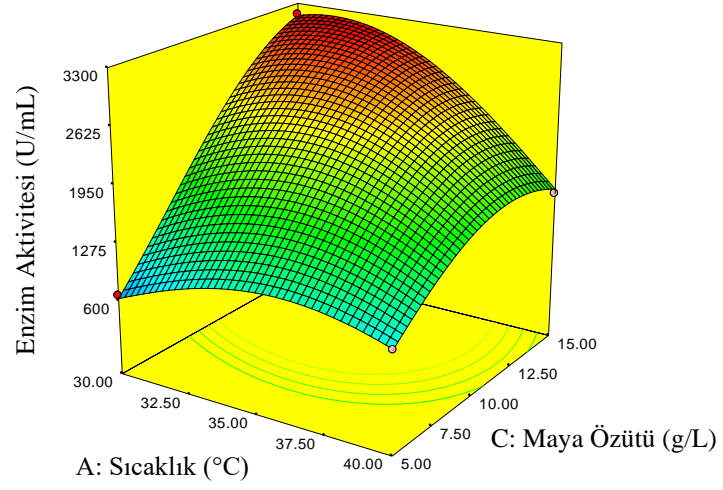
$$= [+516.84332(-27.95517 \times \text{Sıcaklık})(-95.37256 \\ \times \text{pH})(+0.62562 \times \text{Maya Özüdü})(+5.13228 \times \text{Sıcaklık} \\ \times \text{pH})(+0.20182 \times \text{Sıcaklık} \times \text{Maya Özüdü})(+1.53227 \times \text{pH} \\ \times \text{Maya Özüdü})(+0.35969 \times \text{Sıcaklık}^2)(-0.24007 \\ \times \text{Maya Özüdü}^2)(-0.046535 \times \text{Sıcaklık} \times \text{pH} \\ \times \text{Maya Özüdü})(-0.066389 \times \text{Sıcaklık}^2 \times \text{pH})]$$

Model, proteaz üretimi üzerindeki değişken etkinin analizi için elde edilen sonuçlara dayanarak yanıt yüzeyleri oluşturmak için kullanılmıştır. “Denklem 4.1” kullanılarak merkezi kompozit dizaynı (CCD) sonuçlarına uyan model yanıt yüzey grafikleri, Şekil 4.4. ve Şekil 4.5.’de gösterilmektedir. Proteaz üretiminin değerlendirildiği üç boyutlu grafikler, değişimin daha iyi gözlemlenmesi için bir değişkenin değeri maksimum seviyede sabit tutularak bir seferde iki değişkene karşı çizilmiştir. Diğer bir deyişle Şekil 4.4. ve Şekil 4.5.’de; a’da maya özütü, b’de pH, c’de ise sıcaklık maksimum seviyede tutularak grafikler oluşturulmuştur.

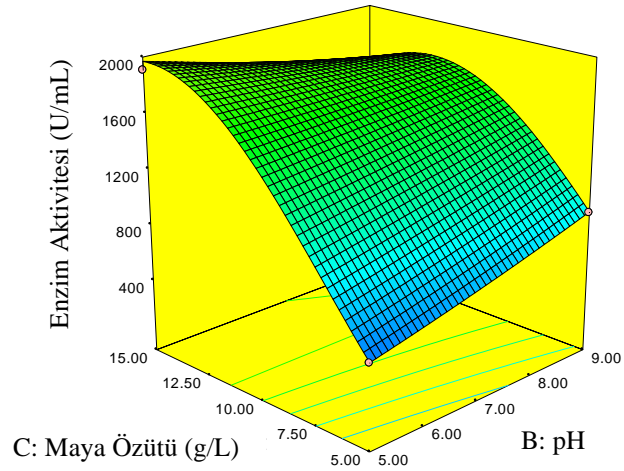
a



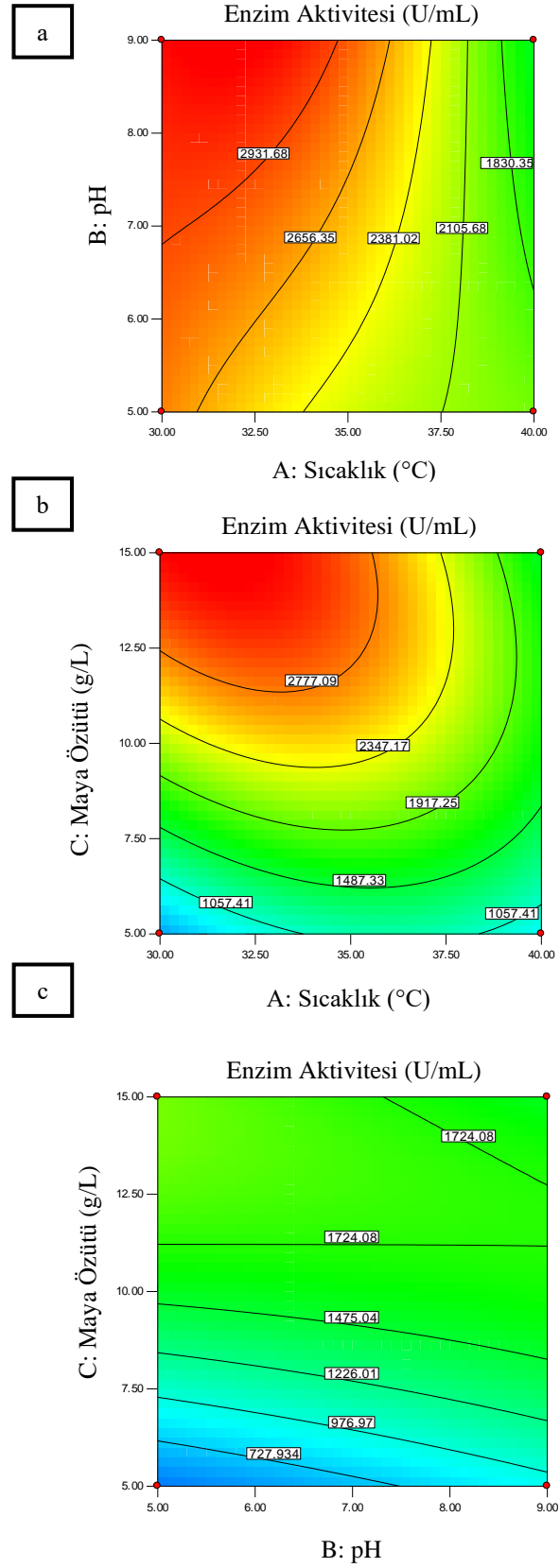
b



c



Şekil 4.4. *Bacillus* sp. EBTA6 tarafından proteaz üretimi üzerine farklı değişkenlerin etkisini gösteren 3D etkileşimli yanıt yüzey grafikleri; a) İnkübasyon sıcaklığı (°C) ve başlangıç pH'sı, b) İnkübasyon sıcaklığı (°C) ve maya özütü konsantrasyonu (g/L), c) Maya özütü konsantrasyonu (g/L) ve başlangıç pH'sı



Şekil 4.5. *Bacillus* sp. EBTA6 tarafından proteaz üretimi için validasyon deneyinin kontur grafikleri; a) İnkübasyon sıcaklığı (°C) ve başlangıç pH'sı, b) İnkübasyon sıcaklığı (°C) ve maya özütü konsantrasyonu (g/L), c) Maya özütü konsantrasyonu (g/L) ve başlangıç pH'sı

Şekil 4.4.'de verilen yanıt yüzeyi 3D grafikleri merkezi kompozit dizaynının (CCD) sonuçlarına uyan model yanıtı (proteaz aktivitesi U/mL) tanımlanmıştır. Grafiklerden, (a) sıcaklık ve pH, (b) sıcaklık ve maya özütü, (c) maya özütü ve pH arasındaki etkileşim açıkça gösterilmiştir. Sonuçlar, başlangıç pH'sının 8'den 9'a yükselmesi ve sıcaklığın 32,5'dan 30,0'a düşmesiyle, proteaz aktivitesinin maksimum olarak 3207,01 U/mL artışına neden olduğunu göstermiştir (Şekil 4.4.a.). Maya özütü konsantrasyonunun 12,5'dan 15,0 g/L'ye yükselmesi ve sıcaklığın 32,5'dan 30,0 °C'ye düşmesiyle, proteaz aktivitesinin maksimum olarak 3207,01 U/mL artışına neden olduğunu göstermiştir (Şekil 4.4.b.). Maya özütü konsantrasyonunun 12,5'dan 15,0 g/L'ye yükselmesi ve pH'nın 8'den 9'a yükselmesiyle, proteaz aktivitesinin maksimum olarak 3146,99 U/mL artışına neden olduğunu göstermiştir (Şekil 4.4.c.). Hesaplamaya göre, proteaz aktivitesi için optimum koşullar, maksimum proteaz aktivitesi (3207,01 U/mL) için 30°C sıcaklık, pH 9 ve 15 g/L maya özütü konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. Bunun, optimize edilmemiş ortama göre (1246,76 U/mL); 2,6 kat daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Optimize edilmemiş ortamdaki enzim aktivitesi; NB besiyerinden 48 saat sonra %5 (h/h) alınan inokulum hacminin, modifiye besiyerine aktarılarak; 33°C sıcaklıkta çalkalamalı inkübatörde (120 rpm), 48 saat geliştirilmesiyle elde edilen süpernatantın kullanılması ile belirlenmiştir. Üretilen proteaz enziminin en iyi aktivite gösterdiği pH 9 olduğundan, alkali *Bacillus* olduğu sonucuna varılmıştır. Sonuçlar, sıcaklığın proteaz enzim üretimi üzerinde önemli bir etkisi olduğunu göstermiştir. İnkübasyon sıcaklığı, hücre dışı proteazın mikroorganizmalar tarafından sentezini ve salgılanmasını düzenler (Ray ve ark., 1992). Şekil 4.5.'de verilen eliptik kontur grafiğinden, karşılıklı etkileşimin faktörler arasında öne çıktığı açıkça gösterilmektedir.

Devi ve arkadaşları (2008), *Aspergillus niger* ile yaptıkları optimizasyon çalışmalarında en yüksek proteaz üretiminin (89,1 U/mL), 45°C mezofilik sıcaklıkta gerçekleştiğini gözlemlemişlerdir. Diğer önemli bir faktör olan, ortamın başlangıç pH'sını ise optimum proteaz üretimi (80,6 U/mL) için 8,5 pH olarak tespit etmişlerdir. Adetunji ve Olaniran (2020), *Bacillus aryabhatai* Ab15-ES ile yaptıkları optimizasyon çalışmalarında en yüksek proteaz üretiminin (248.19 U/mL); 40°C, pH 7,8 ve %2,5 (h/h) inokulum hacminde elde edilebileceğini ortaya koymuştur. Benzer

bir çalışmada Patel ve arkadaşları (2005), haloalkalifilik *Bacillus* sp. Ve1 ile yaptıkları optimizasyon çalışmalarında NaCl ve pH'nın etkisini belirlemişlerdir. Ve1'in proteaz üretiminin; en iyi pH 9 (185 U/mL)'da olduğunu tespit etmişlerdir. Badoei-Dalfard ve Karami (2013), *Bacillus* sp. JER02 ile yaptıkları çalışmalarında, proteaz aktivitesi için elde edilen optimize edilmiş koşulu; 54°C sıcaklık, pH 8, 8 mM NaCl ve 4 mM MgSO₄ olarak belirlemişlerdir. Vijayaraghavan ve arkadaşları (2012), *Bacillus subtilis* sp. VV ile yaptıkları optimizasyon çalışmalarında, en yüksek proteaz üretiminin pH 10 ve 30-40°C arasındaki sıcaklıklarda gerçekleştiğini belirlemişlerdir. Bashir ve arkadaşları (2018), *Bacillus licheniformis* ile yaptıkları çalışmalarında, inokulum miktarını 48 saatlik inkübasyon süresinden sonra, 40°C sıcaklıkta ve pH 7,5'da optimum proteaz aktivitesi verdiğini gözlemlemişlerdir.

Chauhan ve Gupta (2004), *Bacillus* sp. RGR-14 ile yaptıkları optimizasyon çalışmalarında, maya özütü (20 U/mL dk), üre (29 U/mL dk), tripton (46 U/mL dk) ve benzeri yaygın ucuz azot kaynaklarının varlığında düşük alkali proteaz üretimi gözlemlemişlerdir. Haddar ve arkadaşları (2010), *Bacillus mojavensis* A21 ile yaptıkları optimizasyon çalışmalarında; maya özütü, kazein, soya pepton ve kazein-pepton (sırasıyla 404, 392, 384 ve 375 U/mL) ile karşılaştırıldığında Sardinella peptonu (475 U/mL) ile daha yüksek proteaz üretim seviyeleri elde etmişlerdir. Puri ve arkadaşları (2002), *Bacillus* sp. TSG437 ile çeşitli azot kaynaklarının proteaz üretimine etkisini incelemişlerdir. İncelenen azot kaynakları arasında aktiviteyi; kazein ile 481 U/mL ve maya özütü ile 449 U/mL olarak tespit etmişlerdir. Azot kaynakları, deterjanla uyumlu proteaz üretimini belirli bir seviyeye kadar uyarır, sonrasında ise represyon görülür. Ogrydziak (1993); pepton, tripton ve maya özütü gibi karmaşık organik azot kaynaklarının, amino asitler ve kısa peptidler açısından zengin oldukları için daha yüksek konsantrasyonlarda kullanıldıklarında enzim represyonu gösterebileceğini bildirmiştir (Ogrydziak, 1993).

4.2.2. Bağımsız değişkenlerin mikroorganizma gelişmesi üzerine etkilerinin modellenmesi

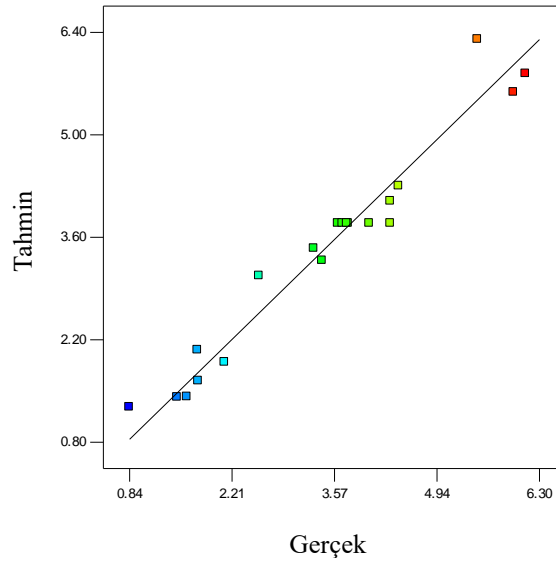
Mikroorganizma gelişmesi UV-VIS spektrofotometrede 600 nm absorbans değerinde 0,840 (Çalışma 12) ile 6,120 (Çalışma 2) arasında değişmiştir (Tablo 4.2.). Üç parametrenin interaktif etkileri; değişkenlerin regresyon katsayısı, F değerleri, P değerleri olarak Tablo 4.4.'de gösterildiği gibi sonuçların varyans analizi (ANOVA) ile belirlenmiştir.

Tablo 4.4. *Bacillus* sp. EBTA6 izolatının mikroorganizma gelişmesi için merkezi kompozit dizaynı ile istatistiksel analizi

Yanıt Yüzey Azaltılarak Modifiye Edilmiş Kübik Model için ANOVA						
Varyans Tablosu Analizi (Kısmi Kareler Toplamı – Tip III)						
Kaynak	Karelerin		Ortalama	F	p-değeri	
	Toplamı	df	Kareler	Değeri	Prob > F	
Model	40,99	7	5,86	34,43	< 0,0001	<u>Önemli</u>
A-Sıcaklık	3,30	1	3,30	19,41	0,0009	
B-pH	0,52	1	0,52	3,06	0,1058	
C-Maya Özütü	30,48	1	30,48	179,24	< 0,0001	
AB	0,076	1	0,076	0,45	0,5163	
AC	1,82	1	1,82	10,73	0,0066	
A ²	4,38	1	4,38	25,74	0,0003	
A ² B	0,92	1	0,92	5,44	0,0379	
Kalıntı	2,04	12	0,17			
Uyum Eksikliği	1,68	7	0,24	3,35	0,1008	<u>Önemli değil</u>
Saf Hata	0,36	5	0,072			
Toplam	43,03	19				

Optimizasyon çalışmasının ANOVA analizine göre 0,0500'den düşük "Prob>F" değerleri (P <0,05) model terimlerinin anlamlı (önemli) olduğunu gösterdiği için; A, C, AC, A², A²B anlamlı model terimleri olarak belirlenmiştir. Diğer bir deyişle, maya özütü konsantrasyonunun, ve inkübasyon sıcaklık seviyesinin mikroorganizma gelişmesi için anlamlı faktörler olduğu anlaşılmıştır. F değeri (34,43), modelin anlamlı olduğunu gösterirken; 0,1000'den büyük değerler model terimlerinin anlamlı olmadığını göstermiştir. Uyum eksikliği için F değeri 3,35 bulunarak, uyumsuzluğun saf hataya göre anlamlı olmadığı belirlenmiştir. Anlamlı olmayan uyum eksikliği, modelin iyi bir uyumu olduğunu göstermiştir. Modelin R-kare değeri 0,9526 olarak

belirlenmiştir. 0,8478 olarak öngörülen R-kare değerinin, 0,9249 olarak gerçek R-kare değeri ile makul bir uyum içinde olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca, sinyal/gürültü oranını ölçen yeterli hassasiyet 19,27 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre, modelin tasarım alanında gezinmek için kullanılabileceği sonucuna ulaşılmıştır. “C.V.% değeri” %12,08 olarak belirlenmiştir. Şekil 4.6. modelin mikroorganizma gelişmesinin optimizasyonu için uygunluğunu göstermektedir.



Şekil 4.6. *Bacillus* sp. EBTA6 tarafından mikroorganizma gelişmesi için tahmin edilene karşı gerçek yanıt grafiği

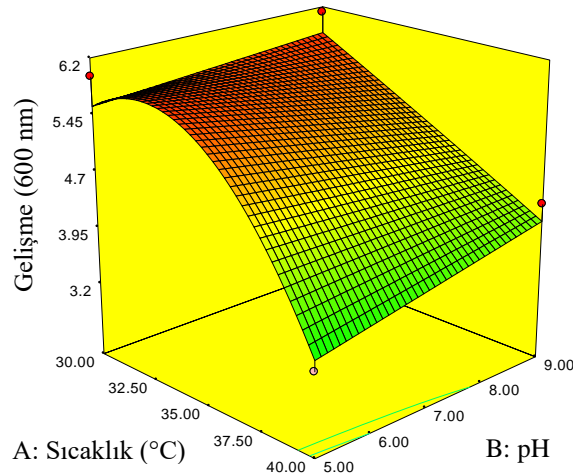
Regresyon denklem katsayıları hesaplanarak veriler ikinci dereceden bir polinom denklemine yerleştirilmiştir. Mikroorganizma gelişmesi regresyonunun *Bacillus* sp. EBTA6 ile yanıtı; A'nın sıcaklık, B'nin pH, C'nin maya özütü konsantrasyonu olduğu “Denklem 4.2” ‘ye göre ifade edilebilir:

Gerçek Faktörler Açısından Nihai Denklem: (4.2)

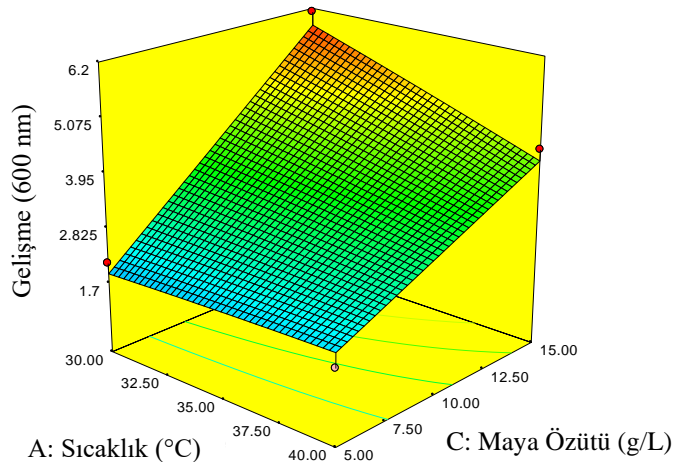
$$\begin{aligned}
 \text{Gelişme} = & [-116,35199(+6,73063 \times \text{Sıcaklık})(+12,44920 \times \text{pH})(+0,96730 \\
 & \times \text{Maya Özütü})(-0,72980 \times \text{Sıcaklık} \times \text{pH})(-0,019100 \\
 & \times \text{Sıcaklık} \times \text{Maya Özütü})(-0,095803 \times \text{Sıcaklık}^2)(+0,010565 \\
 & \times \text{Sıcaklık}^2 \times \text{pH})]
 \end{aligned}$$

Model, mikroorganizma gelişmesi üzerindeki değişken etkinin analizi için elde edilen sonuçlara dayanarak yanıt yüzeyleri oluşturmak için kullanılmıştır. “Denklemler 4.2” kullanılarak elde edilen yanıt yüzey grafikleri, Şekil 4.7. ve Şekil 4.8.’de gösterilmektedir. Mikroorganizma gelişmesinin değerlendirildiği üç boyutlu grafikler, bir değişkenin değeri maksimum seviyede sabit tutularak bir seferde iki değişkene karşı çizilmiştir. Diğer bir deyişle Şekil 4.7. ve Şekil 4.8.’de; a’da maya özütü, b’de pH maksimum seviyede tutularak grafikler oluşturulmuştur.

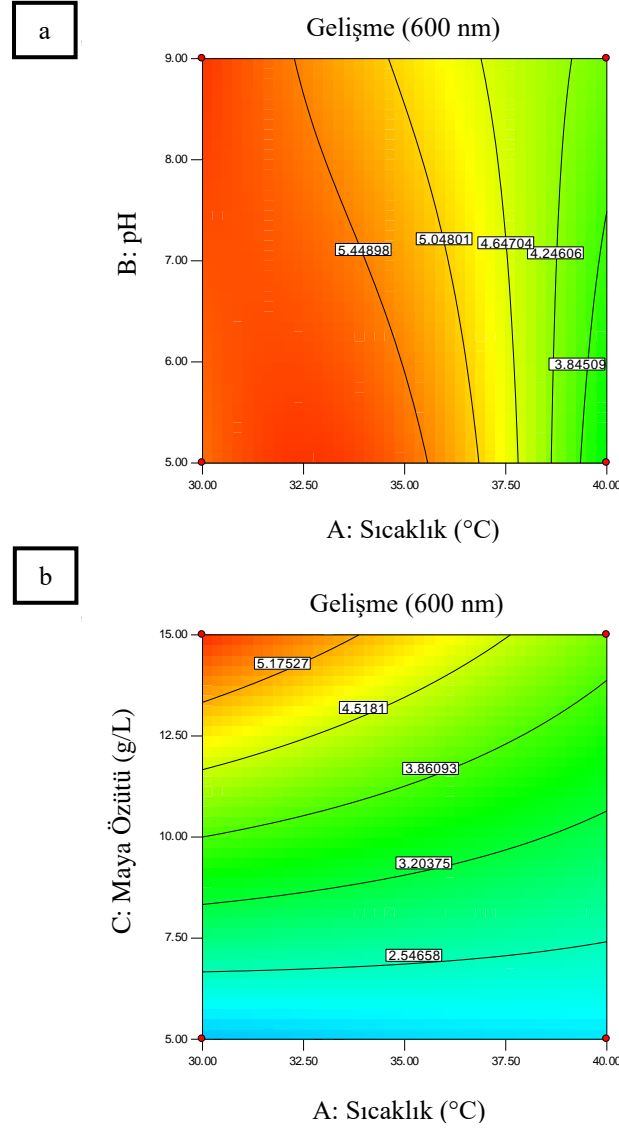
a



b



Şekil 4.7. *Bacillus* sp. EBTA6 tarafından mikroorganizma gelişmesi üzerine farklı değişkenlerin etkisini gösteren 3D etkileşimli yanıt yüzey grafikleri; a) İnkübasyon sıcaklığı (°C) ve başlangıç pH’sı, b) İnkübasyon sıcaklığı (°C) ve maya özütü konsantrasyonu (g/L)



Şekil 4.8. *Bacillus* sp. EBTA6 tarafından mikroorganizma gelişmesi için validasyon deneyinin kontur grafikleri; a) İnkübasyon sıcaklığı (°C) ve başlangıç pH'sı, b) İnkübasyon sıcaklığı (°C) ve maya özütü konsantrasyonu (g/L)

Sonuçlar, başlangıç pH'sının 8'den 9'a yükselmesi ve sıcaklığın 32,5°C'den 30°C'ye düşmesiyle, mikroorganizma gelişmesinin maksimum olarak 5,8 artışına neden olduğunu göstermiştir (Şekil 4.7.a.). Sıvı besiyerindeki bakteri gelişiminin, besiyerinin pH'sının değiştirilmesinden etkilendiği görülmüştür. Maya özütü konsantrasyonunun 12,5 g/L'den 15 g/L'ye yükselmesi ve sıcaklığın 32,5°C'den 30°C'ye düşmesiyle, mikroorganizma gelişmesinin maksimum olarak 5,8 artışına neden olduğunu göstermiştir (Şekil 4.7.b.).

Devi ve arkadaşları (2008), *Aspergillus niger* ile yaptıkları optimizasyon çalışmalarında mikroorganizma gelişmesi ve proteaz üretiminin 50°C sıcaklıkta ve pH 9’da durduğunu gözlemlemiştir. Çevresel sıcaklığın hem mikroorganizma gelişmesini etkilediği hem de proteaz üretim seviyeleri üzerinde de belirgin bir etki sergilediği ortaya çıkmıştır. Bir başka çalışmada Vijayaraghavan ve arkadaşları (2012), *Bacillus subtilis* sp. VV ile yaptıkları optimizasyonda, en iyi mikroorganizma gelişmesinin optimum pH 8 ile pH 7-9 aralığında gerçekleştiğini belirlemiştir. Bu bulgu izolatın alkalifilik yapıda olduğunu göstermiştir. Alkalifilik ve haloalkalifilik organizmalar arasında gelişme ve proteaz üretimi için 9 ile 10 arasında optimum pH aralığı yaygındır. Ibrahim ve arkadaşları (2015), hiper tuzlu soda göllerinden izole edilen *Bacillus* sp. NPST-AK15 ile enzim üretimi ve mikroorganizma gelişmesi için optimizasyon çalışmaları yapmışlardır. Halotolerant alkalifilik izolat NPST-AK15 ‘ün, hem enzim üretimi hem de hücre gelişmesi için optimum koşullarını, 40°C sıcaklıkta ve pH 11’de tespit etmişlerdir. Çalışmalarında organik azot destekli enzim üretiminin, maya özütü kullanılarak maksimum verim göstermiş olduğunu belirlemiştir. Hem gelişme hem de alkalın proteaz üretimi, maya özütü konsantrasyonunun artırılmasıyla arttığını ve %2’lik konsantrasyonlarda maksimum enzim verimi gösterdiğini gözlemlemiştir. Proteaz üretimi gelişmeye bağımlıdır; çünkü enzim salgısındaki bir artış hücre büyümesine karşılık gelir (Adetunji ve Olaniran, 2020).

4.2.3. Optimizasyon ve konfirmasyon (doğrulama) deneyi

Bacillus sp. EBTA6 suşunun proteaz üretiminde ve mikroorganizma gelişmesinde modelin geçerliliğini test ederek doğrulamak için, “Design Expert” programı tarafından önerilen 26 deneysel optimum koşul üretilmiştir. Bunlardan başlangıç pH’sı 9, maya özütü 15 g/L ve sıcaklık 30,11°C olan “4 numaralı çalışma” konfirmasyon için seçilerek; çalışma deneysel olarak gerçekleştirilmiştir (Tablo 4.5.).

Tablo 4.5. Merkezi kompozit dizaynı ile *Bacillus* sp. EBTA6 tarafından proteaz üretimi ve mikroorganizma gelişmesi için 26 adet optimizasyon sonucu

Numara	Sıcaklık (°C)	pH	Maya Özütü (g/L)	Enzim Üretimi (U/mL)	Gelişme (600 nm)	İstenilebilirlik
1	30	9	15	3146,965	5,832416	0,980816
2	30	8,98	15	3144,79	5,831023	0,980589
3	30	8,96	15	3143,357	5,830096	0,980438
4	<u>30,11</u>	<u>9</u>	<u>15</u>	<u>3155,32</u>	<u>5,814533</u>	<u>0,980158</u> Seçili
5	30	8,82	15	3129,277	5,821077	0,978967
6	30	8,76	15	3123,347	5,817277	0,978345
7	30,39	9	15	3173,946	5,767629	0,97724
8	30	9	14,91	3139,533	5,796305	0,974986
9	30	8,33	15	3080,374	5,789607	0,973818
10	30,41	8,35	15	3097,694	5,746562	0,972075
11	30,82	8,65	15	3147,125	5,697446	0,971906
12	30	8,08	15	3055,519	5,773525	0,971181
13	30	7,86	15	3034,681	5,759992	0,968958
14	31,13	9	15	3203,315	5,643359	0,968955
15	30	7,78	15	3026,661	5,75476	0,968099
16	30	7,22	15	2972,012	5,718993	0,962208
17	30,28	7,21	15	2967,264	5,718078	0,961834
18	30	7,12	15	2962,626	5,71281	0,961188
19	30	6,69	15	2920,773	5,685162	0,956617
20	32,34	9	15	3187,605	5,436552	0,954844
21	32,81	8,98	15	3157,962	5,357957	0,949257
22	31,32	5,85	15	2736,626	5,75047	0,9483
23	30,36	5,76	15	2803,57	5,673378	0,947951
24	30,61	5,35	15	2732,962	5,69707	0,944592
25	31,41	5,2	15	2634,74	5,787429	0,943352
26	34,6	5	15	2314,238	5,663683	0,910789

Nümerik (sayısal) optimizasyon yapılmıştır.

4.2.3.1. Proteaz üretimi için modelin doğrulaması

Teorik Veri; seçilen faktör değerlerinin Design Expert programında enzim aktivitesi için belirlenen “Denklemler 4.1” e uygun şekilde yerleştirilerek bulunmuştur.

$$\sqrt{\text{Enzim Aktivitesi}}$$

$$= [+516.84332(-27.95517 \times \text{Sıcaklık})(-95.37256 \\ \times \text{pH})(+0.62562 \times \text{Maya Özütü})(+5.13228 \times \text{Sıcaklık} \\ \times \text{pH})(+0.20182 \times \text{Sıcaklık} \times \text{Maya Özütü})(+1.53227 \times \text{pH} \\ \times \text{Maya Özütü})(+0.35969 \times \text{Sıcaklık}^2)(-0.24007 \\ \times \text{Maya Özütü}^2)(-0.046535 \times \text{Sıcaklık} \times \text{pH} \\ \times \text{Maya Özütü})(-0.066389 \times \text{Sıcaklık}^2 \times \text{pH})]$$

$$\text{Enzim Aktivitesi} = 3155,32 \text{ U/mL}$$

Tablo 4.6.'da; analiz edilen deneysel veriler ve deneysel verilerin teorik formül ile uygulanması sonucunda belirlenen değerler kıyaslanmıştır. *Bacillus* sp. EBTA6 suşu için Tablo 4.6.'da teorik olarak belirlenen 3155 U/mL; farklı zamanlarda 2 kez dizayn edilerek gerçekleştirilen 3095 U/mL olan deneysel veri 1'e kıyasla 60 U/mL, 3031 U/mL olan deneysel veri 2'ye kıyasla 124 U/mL daha düşük bir proteaz aktivitesi üretmiştir. Elde edilen deneysel değer, modelden tahmin edilen değerle iyi bir uyum içinde olduğu ve tahmin edilen ile gerçek değerler arasında nispeten küçük hatalar olduğu belirtilmelidir. Dolayısıyla, üretilen modelin, %10'dan az hata olduğu için proteaz aktivitesinin etkinliğini tahmin edecek yeterli doğruluğa sahip olduğu sonucuna varılabilir.

Tablo 4.6. *Bacillus* sp. EBTA6 izolatu ile proteaz üretimi için; doğrulama testi

	Sıcaklık (°C)	pH	Maya Özütü (g/L)	Enzim Aktivitesi (U/mL)
Deneyisel Veri 1	30,11 °C	9,00	15,00	3095
Deneyisel Veri 2	30,11 °C	9,00	15,00	3031
CCD'dan Teorik Veri	30,11 °C	9,00	15,00	3155

4.2.3.2. Mikroorganizma gelişmesi için modelin konfirmasyonu

Teorik Veri; seçilen faktör değerlerinin Design Expert programında mikroorganizma gelişmesi için belirlenen "Denklem 4.2" 'ye uygun şekilde yerleştirilerek bulunmuştur.

$$Gelişme = [-116,35199(+6,73063 \times Sıcaklık)(+12,44920 \times pH)(+0,96730 \times Maya \text{ Özüdü})(-0,72980 \times Sıcaklık \times pH)(-0,019100 \times Sıcaklık \times Maya \text{ Özüdü})(-0,095803 \times Sıcaklık^2)(+0,010565 \times Sıcaklık^2 \times pH)]$$

$$Gelişme = 5,8$$

Tablo 4.7.'de; analiz edilen deneysel veriler ve deneysel verilerin teorik formül ile uygulanması sonucunda belirlenen değerler kıyaslanmıştır. *Bacillus* sp. EBTA6 suşu için UV spektrumunda 600 nm absorbans değerinde Tablo 4.7.'de teorik olarak belirlenen 5,8; farklı zamanlarda 2 kez dizayn edilerek gerçekleştirilen 5,6 olan deneysel veri 1'e kıyasla 0,2 daha yüksek; 5,9 olan deneysel veri 2'ye kıyasla 0,1 daha düşük bir mikroorganizma gelişmesi göstermiştir. Teorik ve deneysel değerler arasında RSM'nin geçerliliğini gösteren yüksek derecede benzerlik olduğu ortaya çıkmıştır. Dolayısıyla, üretilen modelin, %10'dan az hata olduğu için mikroorganizma gelişmesi etkinliğini tahmin edecek yeterli doğruluğa sahip olduğu sonucuna varılabilir.

Tablo 4.7. *Bacillus* sp. EBTA6 izolatu ile mikroorganizma gelişmesi için doğrulama testi

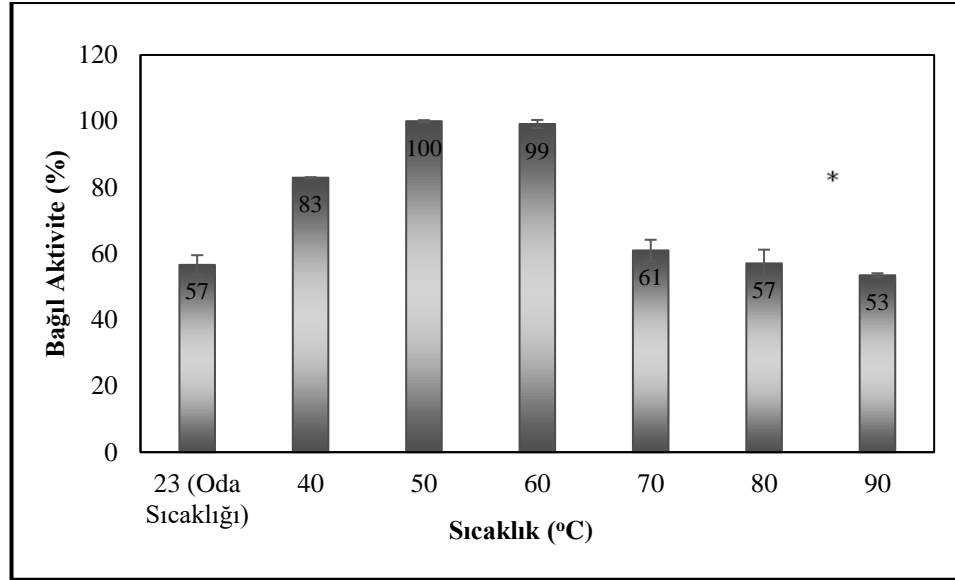
	Sıcaklık (°C)	pH	Maya Özüdü (g/L)	Gelişme (600 nm)
Deneysel Veri 1	30,11 °C	9,00	15,00	5,6
Deneysel Veri 2	30,11 °C	9,00	15,00	5,9
CCD'dan Teorik Veri	30,11°C	9,00	15,00	5,8

4.3. *Bacillus* izolatu EBTA6 Suşundan Elde Edilen Proteaz Enziminin Birtakım Özelliklerinin İncelenmesi

4.3.1. Proteaz enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi

Bacillus sp. EBTA6 suşunun ürettiği proteaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için oda sıcaklığı (23°C) ile 90°C sıcaklık aralıklarında Bölüm 3.7.1.'de verilen yöntemle göre çalışılmış ve bulgular Şekil 4.9.'da gösterilmiştir. Enzim oda sıcaklığı (23°C) ile 90°C sıcaklık aralığında aktif olmasına rağmen, enzim aktivitesi

için optimum sıcaklığın 50°C’de olduğu ve bunu en yakın 60°C’nin takip ettiği belirlenmiştir. Enzim aktivitesi için optimum sıcaklığın 50°C ve 60°C’de olmasına rağmen, 60°C’nin üzerindeki sıcaklıklarda aktivite hızla azalmıştır.



Şekil 4.9. *Bacillus* sp. EBTA6’dan elde edilen proteaz enziminin sıcaklık profili *: Her bir değer, üç bağımsız deneyin ortalamasını temsil eder ve hata çubukları standart sapmayı gösterir.

Çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da pek çok *Bacillus* türünün, bu çalışma ile uyumlu olarak, 60°C’de optimum aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Hammami ve arkadaşları (2017); *Bacillus invictae*’den elde ettikleri ham proteaz ile yaptıkları çalışmalarında, enzimin optimum sıcaklığını 60°C olarak belirlemişlerdir. Olajuyigbe ve Ajele (2005); üç *Bacillus* türünden (*Bacillus macerans* IKBM-11, *Bacillus licheniformis* IKBL-17 ve *Bacillus subtilis* IKBS-10) elde ettikleri ham proteazlar ile yaptıkları çalışmalarında, tüm enzimlerin optimum sıcaklığının 60°C olduğunu tespit etmişlerdir. Yine Olajuyigbe ve Ajele (2008); yaptıkları başka bir çalışmada *Bacillus licheniformis* LBBL-11’den elde ettikleri ham proteazın optimum sıcaklığını 60°C olarak belirlemişlerdir. Görmez ve Gülmüş (2018); *Bacillus pumilus* NK14’den elde ettikleri ham proteaz ile yaptıkları çalışmalarında optimum sıcaklığın 60°C olduğunu bildirmişlerdir. Benzer bir çalışmada ise Nascimento ve Martins (2004); *Bacillus* sp. SMIA-2’den elde ettikleri ham proteazın aktivitesi için optimum sıcaklığı 60°C olarak bulmuşlardır. Reddy ve arkadaşları (2008), *Bacillus* sp. RKY3’den saflaştırdıkları proteazın aktivitesi için optimum sıcaklığı 60°C

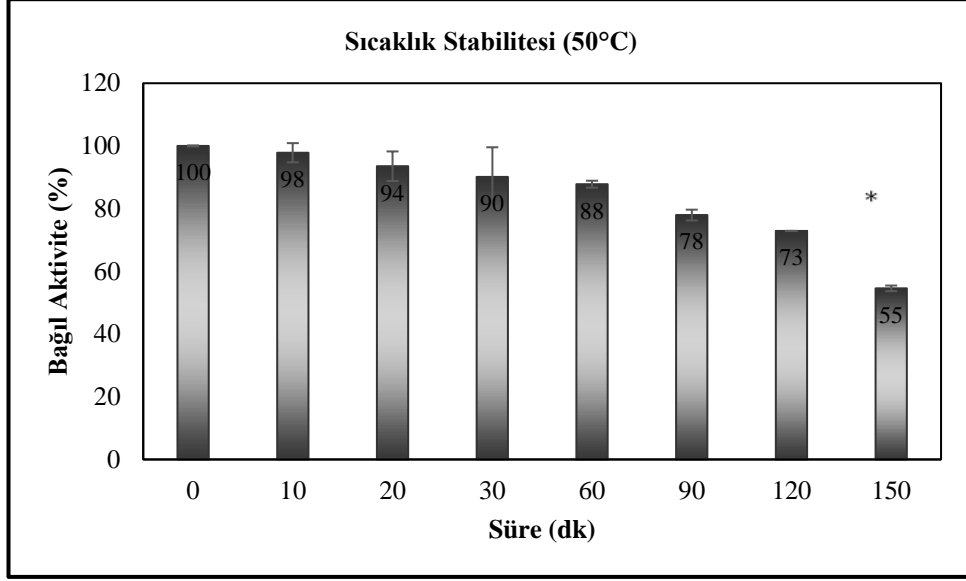
belirlemişlerdir. Rekik ve arkadaşları (2018) ise; *Bacillus safensis* RH12'den saflaştırdıkları serin alkalın proteazın aktivitesi için biyokimyasal karakterizasyon yaparak, optimum sıcaklığın 60°C olduğunu yayınlamışlardır.

Diğer taraftan yine bu çalışma ile uyumlu olarak birçok araştırmacı da *Bacillus* türünün optimum sıcaklığını 50°C olarak belirlemiştir. Özden (2014) çalışmasında; *Bacillus subtilis* RSKK-11014'den saflaştırdığı proteazın maksimum aktivitesini 50°C, optimum sıcaklığını ise 50°C olarak tespit etmiştir. Kandasamy ve arkadaşları (2016) ise; *Bacillus* sp. BT MASC3'den saflaştırdıkları proteazın aktivitesi için optimum sıcaklığı 50°C olarak belirlemişlerdir. Benzer şekilde Nazari ve Mehrabi (2019); *Bacillus* sp. DEM07'den saflaştırdıkları proteazın aktivitesi için optimum sıcaklığı 50°C olarak bildirmişlerdir. Marathe ve arkadaşları (2018) *Bacillus subtilis*'ten kısmi saflaştırılmış proteaz ile çalışmışlardır. Alkali proteaz enzimini immobilize etmeden optimum sıcaklığı 55°C'de, immobilize ettikten sonra ise sıcaklık toleransında 5 derece artış ile 60°C olarak belirlemişlerdir.

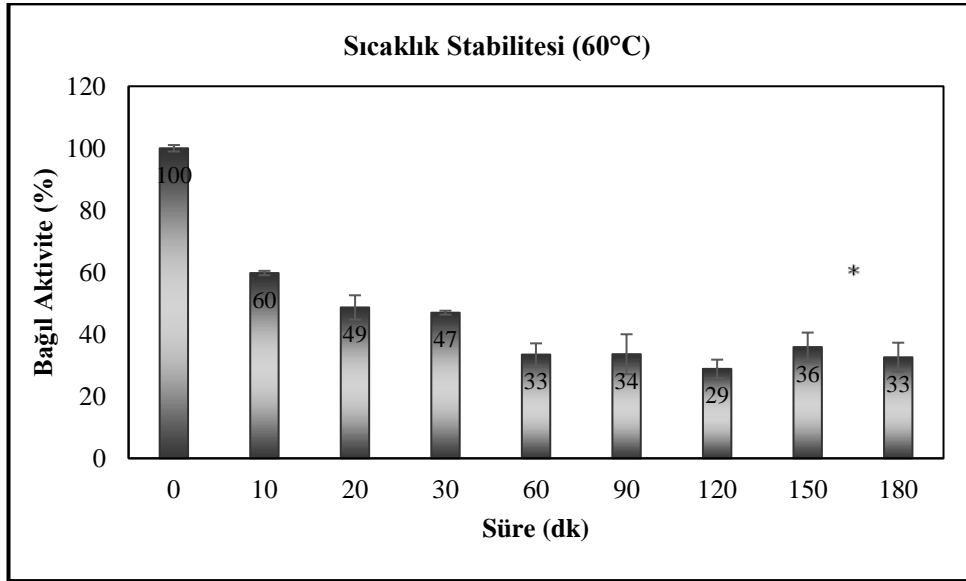
Aynı *Bacillus* türleri arasındaki özelliklerde gözlemlenen farklılığın suşla ilgili olabileceği ve izolasyon kaynağının mikrobiyal türlerin işlevini belirlemede oynadığı kritik role atfedilebileceği düşünülmüştür. Bu tezde çalışılan *Bacillus* sp. EBTA6 suşunun ürettiği proteaz enziminin optimum aktivitesini belirleyen sıcaklık literatürde belirtilen çalışmalardaki değerlerle uyumludur.

4.3.2. Proteaz enziminin sıcaklık stabilitesi

Bacillus sp. EBTA6 suşunun ürettiği proteaz enziminin sıcaklık kararlılığı 50°C için Şekil 4.10.'da, 60°C için Şekil 4.11.'de gösterilmiştir. Optimum sıcaklık olan 50°C'nin, enzimin gerçek aktivitesinin %55'ini 150 dakika süreyle koruyabildiği ve 0. dakikadan 150. dakikanın sonuna kadar kademeli olarak azalarak iyi bir stabilite gösterdiği belirlenmiştir. Ancak enzimin; 60°C'de 0. dakikadan sonra kararlılığında büyük oranda azalma olduğu ve 180 dakikalık inkübasyondan sonra gerçek aktivitesinin yalnızca %33'ünü koruyabildiği gözlemlenmiştir.



Şekil 4.10. *Bacillus* sp. EBTA6'dan elde edilen proteaz enziminin 50°C'deki sıcaklık kararlılığı *: Her bir değer, üç bağımsız deneyin ortalamasını temsil eder ve hata çubukları standart sapmayı gösterir.



Şekil 4.11. *Bacillus* sp. EBTA6'dan elde edilen proteaz enziminin 60°C'deki sıcaklık kararlılığı *: Her bir değer, üç bağımsız deneyin ortalamasını temsil eder ve hata çubukları standart sapmayı gösterir.

Bacillus sp. EBTA6 izolatının ürettiği proteaz enziminin yapılan çalışmalar doğrultusunda 50°C'de kararlılığını koruduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bu da enzimin hafif ısıtma koşulları altında ticari uygulamalarda alternatif kaynak olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

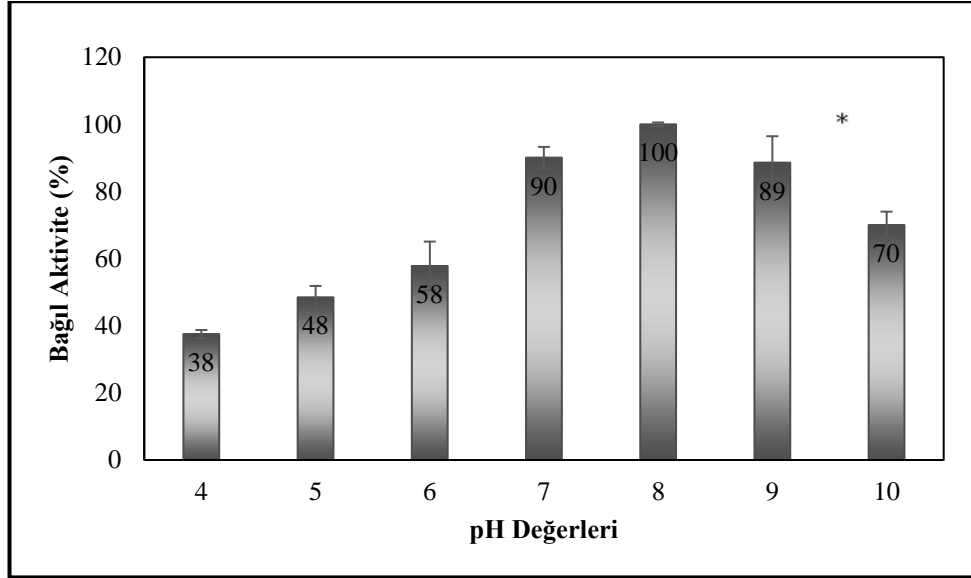
Hammami ve arkadaşları (2017); *Bacillus invictae*'den elde ettikleri ham proteaz ile yaptıkları çalışmalarında termal stabilite için; 50°C'de 60-120 ve 180 dakikalık inkübasyondan sonra bağıl aktivitesinin sırasıyla %94, %92 ve %89'unu koruduğunu tespit etmişlerdir. 60°C'de ise 30 dakikalık inkübasyon sonrasında aktivitesinin hızla yarıya düştüğünü, 60. dakikanın sonunda ise yaklaşık %20 civarına düştüğünü belirlemişlerdir. Sellami-Kamoun ve arkadaşları (2008) yaptıkları çalışmalarında *Bacillus licheniformis* RP1'den elde ettikleri ham proteazı saflaştırarak 50°C, 55°C ve 60°C sıcaklıklarında 1 saat boyunca inkübasyona bırakmışlar, enzimin 50°C ve 55°C'de stabil olduğunu belirlemişlerdir. 60 dakikalık inkübasyondan sonra 50°C'de başlangıç aktivitesinin %87,3'ünden, 55°C'de ise başlangıç aktivitesinin %81,4'ünden fazlasını koruduğunu ancak 60°C'de 60 dakikalık inkübasyondan sonra yalnızca %45 aktivitesini koruduğunu belirlemişlerdir. Reddy ve arkadaşları (2008) yaptıkları çalışmada *Bacillus* sp. RKY3'den elde ettikleri proteazı saflaştırarak 30°C ile 90°C arasında çeşitli sıcaklık derecelerinde 30 dakika ön inkübasyon ile çalışmışlardır. 60°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda enzimin hızla aktivitesini yitirdiğini, 70 dakikalık bir yarı ömürle 50°C'de iyi bir stabilite gösterdiğini belirlemişlerdir. Literatürde verilen bu çalışmalar ile *Bacillus* sp. EBTA6 izolatının ürettiği proteaz enziminin 50°C ve 60°C'deki kararlılıklarının benzerlik göstererek, uyumlu olduğu görülmüştür.

Yusoff ve Ibrahim (2012); 16s rRNA gen dizilimi ile tanımladıkları *Bacillus subtilis* 50a ve *Bacillus licheniformis* 50b'den ham proteazlar elde etmişlerdir. Stabilite çalışmalarında; *Bacillus subtilis* 50a'dan gelen proteazın 50°C'de 30 dk boyunca stabil olduğunu (%100 bağıl aktiviteyi sürdürdüğünü), 60°C'de ise 30 dakika süreyle ısı işleminden sonra aktivitesinin %89'unu koruduğunu belirlemiştir. *Bacillus licheniformis* 50b de ise; proteaz aktivitesi, sırasıyla 50 ve 60°C'de 30 dakikalık ısı işleminden sonra aktivitesinin %96'sını ve %72'sini koruduğu bildirilmiştir. Olajuyigbe ve Ajele (2008) yaptıkları çalışmalarında *Bacillus licheniformis* LBBL-11'den elde ettikleri ham proteazın, 60°C'de 60 dakika inkübasyon sonunda %95 oranında stabil olduğunu belirlemişlerdir. Olajuyigbe ve Falade (2014), yaptıkları çalışmada *Bacillus brevis* MWB-01'den elde ettikleri proteazı saflaştırarak 30°C ile 95°C arasında çeşitli sıcaklık derecelerinde çalışmışlardır. 30 dakikalık inkübasyon süresinde 60°C'de %63'lük bağıl aktivite belirlemişlerdir. Selvam ve arkadaşları (2016); *Bacillus cereus*

ZK2'den elde ettikleri proteazı saflaştırarak 30°C ile 70°C arasında çeşitli sıcaklık derecelerinde çalışmışlardır. Tüm örneklerde 1 saat süreyle ön inkübasyondan sonra halen %60'a kadar aktivite belirlemişlerdir. Nazari ve Mehrabi (2019) yaptıkları çalışmada *Bacillus* sp. DEM07'den elde ettikleri proteazı saflaştırmışlardır. 30°C ile 60°C arasında çeşitli sıcaklık derecelerinde çalışarak, bağıl aktiviteyi 30 dakikalık aralıklarla 120 dakika boyunca test etmişlerdir. Çalışmaya göre enzimin 37°C ile 50°C arasında 120 dakikalık inkübasyondan sonra bile stabil olduğu ortaya çıkmıştır. 60°C'de ise 120 dakikalık inkübasyon sonunda %65 bağıl aktivite gözlemlemişlerdir. Literatürde verilen bu çalışmaların ise üretilen proteazın 60°C'deki kararlılıklarını, *Bacillus* sp. EBTA6 izolatının ürettiği proteaz enziminden daha iyi korudukları görülmüştür.

4.3.3. Proteaz enzim aktivitesine pH'nın etkisi

Bacillus sp. EBTA6 suşunun ürettiği proteaz enziminin optimum pH'sını bulmak için, Bölüm 3.7.3.'de verilen yönteme göre pH 4-10 aralığında çalışılmış ve bulgular Şekil 4.12.'de gösterilmiştir. Proteazın kazeinin hidrolizi için optimum pH'sı 8 olarak belirlenmiştir. Enzim aktivitesinin, nötr ve alkali bölgede (pH 7-10) asidik bölgeye (pH 4-6) göre oldukça yüksek olduğu görülmüştür. pH 4, 5 ve 6'da proteaz aktivitesi önemli ölçüde (sırasıyla %38, 48, 58) azalmıştır. Bu da EBTA6 suşunda alkalın proteaz üretimine yol açan metabolik reaksiyonlarda pH'nın önemini göstermiştir. Buradan yola çıkıldığında *Bacillus* sp. EBTA6 suşunun ürettiği proteaz enziminin alkali proteaz özelliklerini gösterdiği anlaşılmıştır.



Şekil 4.12. *Bacillus* sp. EBTA6'dan elde edilen proteaz enziminin pH profili *: Her bir değer, üç bağımsız deneyin ortalamasını temsil eder ve hata çubukları standart sapmayı gösterir.

Çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da pek çok *Bacillus* türünün, bu çalışma ile uyumlu olarak, pH 8'de optimum aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Olajuyigbe ve Ajele (2008) yaptıkları çalışmalarında *Bacillus licheniformis* LBBL-11'den elde ettikleri ham proteazın incelenen 5-11 arasındaki tüm pH aralıklarında aktif olduğunu tespit etmişlerdir. En yüksek proteaz aktivitesini (% 100) pH 8'de, en düşüğü ise pH 5'de maksimum enzim aktivitesinin yaklaşık %69'u olarak gözlemlemişlerdir. Olajuyigbe ve Ajele (2005) yaptıkları başka bir çalışmada üç *Bacillus* türünden (*Bacillus macerans* IKBM-11, *Bacillus licheniformis* IKBL-17 ve *Bacillus subtilis* IKBS-10) elde ettikleri ham proteazları pH 5-11 arasında incelemişlerdir. Tüm proteazların maksimum proteaz aktivitesinin pH 8'de olduğunu belirlemişlerdir. Benzer bir çalışmada Nascimento ve Martins (2004); *Bacillus* sp. SMIA-2'den elde ettikleri ham proteazı pH 5,5-9 arasındaki tüm pH'larda incelemişler ve optimum pH'yı 8 olarak tespit etmişlerdir. Enzimin pH 6,5'da maksimum enzim aktivitesinin sadece %29'unu elde ettiği ve pH 7 ve 7,5'da sırasıyla %53 ve %59'a yükseldiğini bildirmişlerdir.

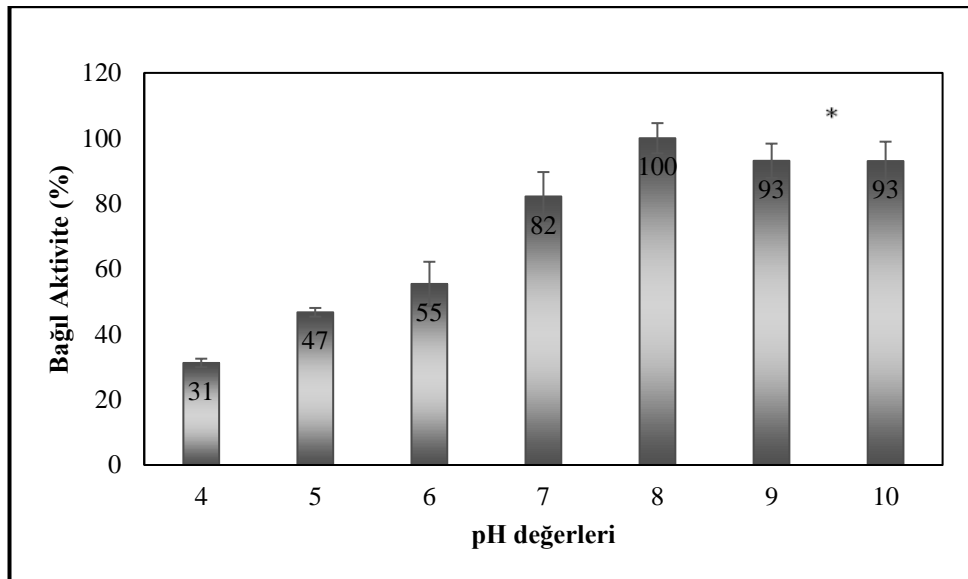
Diğer taraftan; Rao ve Narasu (2007) ise çalışmalarında *Bacillus firmus* 7728'den ham elde ettikleri proteazın; 4-12 arasındaki tüm pH aralıklarında aktif olmasına rağmen, maksimum proteolitik aktivitenin pH 9'da gerçekleştiğini gözlemlemişlerdir. Benzer

şekilde Kandasamy ve arkadaşları (2016) yaptıkları çalışmalarında; *Bacillus* sp. BT MASC'dan elde ettikleri proteazı saflaştırarak pH 6-11 arasındaki tüm pH'larda incelemişler ve optimum pH'yı, 9 olarak tespit etmişlerdir. Maksimum enzim aktivitesinin yaklaşık %80'ini pH 8'de; %90'ını ise pH 10'da gözlemlemişlerdir. Venugopal ve Saramma (2007) ise yaptıkları çalışmalarında; *Bacillus circulans* BM15'den elde ettikleri proteazı saflaştırarak pH 7-12 arasındaki tüm pH'larda incelemişler ve pH 7'de optimum aktivite gösterdiğini (%100), 7 ile 10 pH aralığında ise aktif olduğunu (%100-80-80-80) belirlemişlerdir.

Literatür çalışmaları incelendiğinde, alkalın proteazların optimum pH aralığının genellikle pH 7 ile 10 arasında olduğu görülebilir. Bu bulgular; *Bacillus* sp. EBTA6 suşunun ürettiği proteaz enziminin optimum pH'sı ile uyumludur. İncelenen *Bacillus* sp. EBTA6 suşundan elde edilen proteazın pH 7-10 arasında aktif olması, özellikle geniş bir pH üzerinde proteaz aktivitesi gerektiren ultrafiltrasyon membran temizlemesi ve deterjanlarda kullanım gibi uygulamalar için önemlidir. Yüksek alkalinite, deterjan formülasyonunda kullanılan proteazlar için arzu edilen bir özelliktir (Dias ve ark., 2008; Olajuyigbe ve Kolawole, 2011).

4.3.4. Proteaz enziminin pH stabilitesi

Bacillus sp. EBTA6 suşunun ürettiği proteaz enziminin pH stabilitesi 4-10 pH aralığında çalışılmış, bulgular Şekil 4.13.'de gösterilmiştir. Enzimin pH 8'de kararlılığının %100'ünü, pH 7'de %82'sini ve pH 9-10'da %93'ünü koruduğu tespit edilmiştir. Ayrıca pH 7-10'da (% 82-93) dikkate değer bir stabiliteye ve yüksek bir pH toleransına sahip olduğu düşünülmüştür. Bu bulgular da, *Bacillus* sp. EBTA6 izolatından elde edilen proteazın alkalın özellikte olduğunu desteklemektedir.



Şekil 4.13. *Bacillus* sp. EBTA6'dan elde edilen proteaz enziminin pH kararlılığı *: Her bir değer, üç bağımsız deneyin ortalamasını temsil eder ve hata çubukları standart sapmayı gösterir.

Olajuyigbe ve Ajele (2008) yaptıkları çalışmalarında *Bacillus licheniformis* LBBL-11'den elde ettikleri ham proteazın incelenen 5-11 arasındaki pH değerlerinde stabil olduğunu ancak bağıl aktivitesinin pH 5 ve 6'da sırasıyla yaklaşık % 30 ve %18'lik bir azalma gösterdiğini belirlemiştir. Bir başka çalışmada Haddar ve arkadaşları (2010), *Bacillus mojavensis* A21'den elde ettikleri ham proteazı pH 4-13 aralığında incelemişler ve bağıl aktivitesinin %100'ünün pH 6 ile 11 arasında oldukça stabil olduğunu belirlemişlerdir. pH 5'de ise enzimin, başlangıç aktivitesinin yaklaşık %70'ini koruduğunu bildirmişlerdir. Manni ve arkadaşları (2009) ise; yaptıkları çalışmalarında *Bacillus cereus* SV1'dan elde ettikleri ham proteazın pH kararlılığını; pH 6-12 arasında incelemişlerdir. Enzimin 6,0-9,5 pH aralığında oldukça stabil kalarak başlangıç aktivitesinin % 80'den fazlasını koruduğunu, ancak pH 10'da aktivitesinin yaklaşık %71,8'ini koruduğunu gözlemlemişlerdir. Sinha ve Khare (2013) yaptıkları çalışmalarında *Bacillus* sp. EMB9'dan saflaştırdıkları proteazın pH kararlılığını; pH 5-12 arasında incelemişler ve bu aralıklarda kararlılığını koruduğunu belirlemişlerdir. Annamalai ve arkadaşları (2014a) yaptıkları çalışmalarında *Bacillus firmus* CAS 7'dan saflaştırdıkları proteazın pH kararlılığını; pH 4-12 arasında incelemişlerdir. Saflaştırdıkları proteazın bağıl aktivitesinin pH 9-10'da %100, pH 7-11'de %85 ve pH 12'de %39'unu koruduğunu belirlemişlerdir. Başka bir çalışmada Farhadian ve arkadaşları (2015); *Bacillus subtilis* DR8806'dan saflaştırdıkları proteazın pH

kararlılığını; pH 3-12 arasında incelemiştir. Saflaştırdıkları enzimin, pH 8-12 aralığında oldukça stabil olduğunu tespit etmişlerdir. Başlangıç aktivitesinin pH 9'da %37'sini ve pH 10'da %50'sini kaybettiği bildirmiştir. Elela ve arkadaşları (2011) ise; yaptıkları çalışmalarında *Bacillus cereus*'dan saflaştırdıkları proteazın pH kararlılığını pH 6-12 arasında incelemiştir. Enzimin, geniş bir pH aralığında (8 ile 11) stabil olduğunu ve maksimum kararlılığın pH 10'da olduğunu belirlemiştir. pH 8 ve 12'de ise aktivitesinin %50'den fazlasını kaybettiğini tespit etmişlerdir. Nassar ve arkadaşları (2015) yaptıkları çalışmalarında Mısır'da Nil Deltası topraklarından izole ettikleri *Bacillus amyloliquefaciens* 35s suşu tarafından üretilen proteazları saflaştırarak, pH 6-12 arasında kararlılığını incelemiştir. Bulgulardan proteazların pH 6-12 aralığında çoğunlukla stabil olduğunu, 7 ile 10 arasındaki pH aralığında en yüksek bağıl aktivitenin % 89,1'e ulaştığını ve pH 9'da inkübe edilen numunede gözlemlendiğini tespit etmişlerdir.

Genel olarak pH stabilitesi, endüstriyel proteazlar için en önemli faktörlerden biridir. *Bacillus* sp. EBTA6 suşunun, literatürdeki benzer çalışmalarla kıyaslandığında yüksek oranda ve geniş pH aralığında stabilitesini koruduğu için ticari uygulamalarda tercih edilebileceği düşünülmüştür.

4.3.5. Proteolitik enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının, amino asit inhibitörlerinin ve yüzey aktif maddelerin etkisinin belirlenmesi

4.3.5.1. Farklı metal iyonlarının proteaz aktivitesi üzerindeki etkisi

K^+ , Mg^{+2} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Sn^{2+} , Zn^{2+} gibi bazı metal iyonlarının 1 mM ve 5 mM konsantrasyonlarının *Bacillus* sp. EBTA6 izolatının ürettiği proteaz aktivitesi üzerindeki etkileri Tablo 4.8.'de özetlenmiştir. Enzim aktivitesi üzerinde test edilen 1 mM ve 5 mM konsantrasyonlardaki metal iyonlarından; K^+ , Cu^{2+} , Sn^{2+} ve Zn^{2+} 'nin inhibe edici, Ca^{2+} ve Mg^{2+} 'nin uyarıcı bir etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Ca^{2+} iyonu; aktiviteyi hem 1 mM konsantrasyonda (%7) hem de 5 mM konsantrasyonda (%10) arttırmıştır. Mg^{2+} iyonu ise aktiviteyi 1 mM konsantrasyonda etkilememiştir. Ancak 5 mM konsantrasyonda (%5) arttırmıştır.

Tablo 4.8. *Bacillus* sp. EBTA6'dan elde edilen proteaz enzimi üzerine metal iyonlarının etkisi

Metal İyonları	Bağıl Aktivite (%)	
	1 mM	5 mM
Mg ²⁺ (MgSO ₄ .7H ₂ O)	100 ± 2	105 ± 0
Cu ²⁺ (CuSO ₄ .5H ₂ O)	98 ± 1	80 ± 2
Ca ²⁺ (CaCl ₂)	107 ± 1	110 ± 0
K ⁺ (KCl)	92 ± 0	96 ± 0
Zn ²⁺ (ZnSO ₄ .7H ₂ O)	95 ± 0	84 ± 2
Sn ²⁺ (SnCl ₂)	96 ± 6	91 ± 1
Kontrol	100 ± 1	100 ± 3

Çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda pek çok *Bacillus* türüne metal iyonlarının etkisinin; bu çalışmadaki *Bacillus* sp. EBTA6 ile benzerlik gösterdiği görülmüştür. Görmez ve Gülmüş (2018) *Bacillus pumilus* NK14'den elde ettikleri ham proteaz ile yaptıkları çalışmalarında; 5 mM konsantrasyonda Ca²⁺ ve Mg²⁺ 'nin aktiviteyi sırasıyla %10-12 oranında arttırdığı; Cu²⁺, Zn²⁺ 'nin sırasıyla %86-78'e düşürdüğünü tespit etmişlerdir. Ben Salem ve arkadaşlarının (2016) *Bacillus licheniformis* RBS5'den elde ettikleri ham proteaz ile yaptıkları çalışmalarında; 5 mM konsantrasyonda Ca²⁺ ve Mg²⁺ 'nin aktiviteyi zayıf bir uyarıcı etkiyle arttırdığını (%20-6); Zn²⁺ 'nin ise güçlü bir şekilde inhibe ettiğini (%67) belirlemişlerdir. Shah ve arkadaşları (2010) *Bacillus cereus*'dan elde ettikleri proteazı saflaştırarak yaptıkları çalışmada 5 mM konsantrasyonda Ca²⁺ ve Mg²⁺ dahil olmak üzere çeşitli iyonların proteaz aktivitesi üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Bağıl aktivitenin Mg²⁺ ve Ca²⁺ varlığında arttığını gözlemlemişlerdir. Bunun sebebini ise Ca²⁺ ve Mg²⁺ 'nin periyodik cetvelde s bloğunda bulunmasına bağlamaktadırlar. Genel olarak, s-blok metalleri, iyonik bağ yoluyla ligandlara zayıf bir şekilde bağlanır. Bağlanma esas olarak iyonik olduğundan, metal iyonları kolayca yer değiştirir. Bununla birlikte, d-blok metalleri, kararlı kompleksler vermek için tercihen kovalent bağlar yoluyla ligandlara bağlanır ve bu nedenle enzim geri döndürülemez bir şekilde bağlanarak zayıf aktiviteye yol açar (Shah ve ark., 2010).

Çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan diğer çalışmalarda ise bazı *Bacillus* türlerine metal iyonlarının etkisinin, bu çalışmadaki *Bacillus* sp. EBTA6'ya göre farklılıklar gösterdiği görülmüştür. Sarı ve arkadaşları (2015) *Bacillus circulans* M34'den elde ettikleri proteazı saflaştırarak yaptıkları çalışmada; 2-5-10 mM konsantrasyondaki K⁺,

Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺ ve Sn²⁺ gibi çeşitli metal iyonlarının alkalın proteaz aktivitesi üzerine etkisini incelenmişlerdir. Zn²⁺ ve Cu²⁺ iyonlarının 2-5-10 mM konsantrasyonda aktiviteyi arttırdığı belirlenirken, Sn²⁺ ve Mg²⁺ de enzim aktivitesini inhibe ettiğini, K⁺ ve Ca²⁺ iyonlarının enzim aktivitesi üzerinde önemli bir etkisi olmadığını belirlemişlerdir. Giri ve arkadaşları (2011) *Bacillus subtilis* VSG-4'den elde ettikleri proteazı saflaştırarak yaptıkları çalışmada; 5 mM konsantrasyondaki K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺ gibi çeşitli metal iyonlarının alkalın proteaz aktivitesi üzerine etkisini incelenmişlerdir. Ca²⁺ ve Mg²⁺ iyonlarının aktiviteyi arttırdığını, d-blok metallerinden Zn²⁺ ve Cu²⁺ iyonlarının enzim aktivitesini inhibe ettiğini, K⁺ iyonunun ise enzim üzerinde hiçbir etkiye sahip olmadığını tespit etmişlerdir. Nascimento ve Martins (2004) *Bacillus* sp. SMIA-2'den elde ettikleri ham proteaz ile yaptıkları çalışmada; K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺ iyonları dahil olmak üzere çeşitli metal iyonlarının proteaz aktivitesi üzerindeki etkisini 1 mM konsantrasyonda incelemişlerdir. Proteaz aktivitesine; Mg²⁺ iyonunun güçlü (%61); K⁺, Cu²⁺ ve Zn²⁺ iyonlarının daha güçlü (%5-12-18) bir inhibitör etki gösterdiğini belirlemişlerdir. Ca²⁺ iyonu varlığında ise artış (%31) görülmüştür. Benzer bir çalışmada De Oliveira ve arkadaşları (2017) *Bacillus* sp. CL33A'dan elde ettikleri ham proteazın; bağıl aktiviteyi 1 mM Ca²⁺ varlığında %8 oranında arttırdığını, 5 mM Ca²⁺ varlığında ise %96,41'e düşürdüğünü; 1-5 mM Mg²⁺ varlığında ise sırasıyla %9-17 arttırdığını gözlemlemişlerdir. 1-5 mM Cu²⁺ varlığında %82,47-52,29 ve 1-5 mM Zn²⁺ varlığında ise %94,82-25,14'e inhibe olduğunu belirlemişlerdir. Wang ve arkadaşları (2011) *Bacillus subtilis* TKU007'den elde ettikleri proteazı saflaştırarak yaptıkları çalışmada; Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺ gibi iyonlar dahil olmak üzere çeşitli metal iyonlarının proteaz aktivitesi üzerindeki etkisini 5 mM konsantrasyonda incelemişlerdir. Bağıl aktivitenin 5 mM konsantrasyonda Mg²⁺ ve Cu²⁺ varlığında önemli ölçüde arttığını, Ca²⁺ ve özellikle Zn²⁺ varlığında düştüğünü bildirmişlerdir.

Literatürdeki çalışmalar ile karşılaştırıldığında *Bacillus* sp. EBTA6 suşundan elde edilen proteaz enziminin; 1 ve 5 mM konsantrasyondaki çeşitli metal iyonlarının etkisine bağlı olarak bağıl aktiviteyi büyük ölçüde etkilemediği ve stabilitesini koruduğu sonucuna ulaşılmıştır. Kullanılan metal iyonlarının yüksek

konsantrasyonları ile çalışmanın devam ettirilmesinin izolat hakkında daha derin bilgi verebileceği düşünülmektedir.

4.3.5.2. İnhibitörlerin proteaz aktivitesi üzerindeki etkisi

İnhibisyon çalışmaları, öncelikle bir enzimin doğasına, kofaktör gereksinimlerine ve aktif merkezin doğasına ilişkin bir fikir verir. Farklı inhibitörlerin proteazın enzim aktivitesi üzerindeki etkisi incelenerek, Tablo 4.9.'da gösterilmiştir. Metaloenzim inhibitörü EDTA, her iki (1 ve 5 mM) konsantrasyonda da proteaz aktivitesini %43-48 oranında inhibe etmiştir. Bu da alkalın proteazın metal bağlanma bölgesi ihtiva ettiğini düşündürmüştür. Bununla birlikte proteaz aktivitesi, serin proteaz inhibitörü olan PMSF tarafından 1 ve 2,5 mM konsantrasyonda %14-37 oranında inhibe edilmiştir. Bu bağlamda PMSF'ün; proteazın aktif bölgesindeki temel serin kalıntısını sülfonat ederek, enzim aktivitesinin kaybına yol açtığı belirlenmiştir (Li ve ark., 2009; Lombardi ve ark., 2013). Sonuçlar, bu enzimin serin proteaz ihtiva ettiğini düşündürmüştür.

Tablo 4.9. *Bacillus* sp. EBTA6'dan elde edilen proteaz enzimi üzerine amino asit inhibitörlerinin etkisi

İnhibitörler	Bağıl Aktivite (%)	
	1 mM	2,5 mM
PMSF	86 ± 2	63 ± 4
Kontrol	100 ± 1	100 ± 3
	1 mM	5 mM
EDTA	57 ± 4	52 ± 1
Kontrol	100 ± 1	100 ± 3

Agrebi ve arkadaşları (2009), *Bacillus subtilis* A26'dan elde ettikleri ham proteaz ile yaptıkları çalışmada enzimin 5 mM metaloproteaz inhibitörü EDTA varlığında %55,9 oranında inhibe olduğunu gözlemleyerek, enzim aktivitesindeki iki değerlikli metal iyonlarının önemini göstermişlerdir. Bach ve arkadaşları (2011), *Aeromonas hydrophila* K12, *Chryseobacterium indologenes* A22 ve *Serratia marcescens* P3'den elde ettikleri ham proteazlarla yaptıkları çalışmalarında; 5 mM EDTA varlığında aktivitelerinin sırasıyla %14-24-46'ya inhibe edilerek metalloproteazlar olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Hassan ve arkadaşları (2013) *Bacillus amyloliquefaciens*

MA20 ve *Bacillus subtilis* MA21'den elde ettikleri ham proteazlar ile yaptıkları çalışmada; 1-5 mM EDTA varlığında enzimlerin sırasıyla %97-35 ve %96-13 aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir. Bu yüzden EDTA tarafından enzimlerin kısmi inhibe olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Hadj-Ali ve arkadaşları (2007) *Bacillus licheniformis* NH1'den elde ettikleri ham proteazlarla yaptıkları çalışmalarında 5 mM EDTA varlığında aktivitenin %70 oranında inhibe olarak metalloproteaz olduğu sonucuna ulaşmışlardır. De Oliveira ve arkadaşları (2017) *Bacillus* sp. CL33A'dan elde ettikleri ham proteaz ile yaptıkları çalışmada enzimin 1 mM konsantrasyondaki PMSF'de %75,93; 1-5 mM konsantrasyonlardaki EDTA'de ise %65,52-64,76 aktiviteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Bu inhibisyon enzimin serin ve metalloproteaz içerdiğini göstermiştir. Sarı ve arkadaşları (2015) *Bacillus circulans* M34'den elde ettikleri proteazı saflaştırarak yaptıkları çalışmada enzimin 5 mM metalloproteaz inhibitörü EDTA varlığında aktivitesinin %73'e düştüğünü bildirmişler ve metal bağlama bölgesine sahip olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Annamalai ve arkadaşları (2014a) *Bacillus firmus* CAS 7'den saflaştırarak elde ettikleri proteaz ile yaptıkları çalışmada; 1 ve 5 mM konsantrasyonlardaki PMSF'de sırasıyla %92 ve 85 aktiviteye sahip olduğunu gözlemleyerek önemli bir inhibisyon etkisi gözlemlememişlerdir. Farhadian ve arkadaşları (2015) yaptıkları çalışmalarında *Bacillus subtilis* DR8806'dan saflaştırdıkları proteazın; 5-10 mM konsantrasyonlardaki PMSF'de sırasıyla %61-0 aktivite gözlemleyerek, enzimin serin proteaz olduğunu tespit etmişlerdir.

Literatürdeki çalışmalar; *Bacillus* sp. EBTA6 izolatından elde edilen proteaz enziminin metalloproteaz ve serin proteaz içerdiğini göstermiştir. EDTA bir şelatördür ve şelat ajanı varlığında enzimin stabilitesi, deterjan katkı maddeleri olarak kullanım için avantajlı görünmektedir. Çünkü deterjanlar, su yumuşatıcı görevi gören ve aynı zamanda lekenin çıkarılmasına yardımcı olan yüksek yüzdelerde şelat ajanı içerir. Bu ajanlar özellikle metal iyonlarını şelatlayarak onları deterjan solüsyonunda bulunmaz hale getirir, böylece deterjan enzimlerinin aktivitesi önemli ölçüde azalır (Giri ve ark., 2011). *Bacillus* sp. EBTA6 izolatı EDTA tarafından tamamen inhibe olmamıştır. Bu yüzden deterjan katkı maddesi olarak iyi bir uyum sağlayacağı öngörülmüştür.

4.3.5.3. Yüzey aktif maddelerin proteaz aktivitesi üzerindeki etkisi

Bacillus sp. EBTA6 suşundan elde edilen proteaz enzimi aktivitesinin Tablo 4.10.'da verilen bulgulara göre; konsantrasyonları %1 (h/h) olan Tween 20 ve Tween 80 (iyonik olmayan yüzey aktif madde) varlığında çok düşük bir miktarda arttığı (sırasıyla %3-%2), %1 (a/h) SDS (anyonik yüzey aktif madde) varlığında ise bağıl aktivitesini %61'e inhibe ettiği belirlenmiştir.

Tablo 4.10. *Bacillus* sp. EBTA6'dan elde edilen proteaz enzimi üzerine yüzey aktif maddelerinin etkisi

Yüzey Aktif Maddeler (%1)	Bağıl Aktivite (%100)
Tween 20	103 ± 1
Tween 80	102 ± 2
SDS	61 ± 2
Kontrol	100 ± 2

Çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda pek çok *Bacillus* türüne yüzey aktif maddelerin etkisinin, bu çalışmadaki *Bacillus* sp. EBTA6 ile oldukça benzerlik gösterdiği görülmüştür. De Oliveira ve arkadaşları (2017) *Bacillus* sp. CL33A'dan elde ettikleri ham proteaz ile yaptıkları çalışmalarında; 25°C, 20 dakika ön inkübasyonla enzimin %1 (h/h) Tween 20 varlığında aktivitesinin %11 arttığını tespit etmişlerdir. Benzer şekilde Olivera ve arkadaşları (2006); *Bacillus patagoniensis* PAT 05^T'den elde ettikleri proteazı saflaştırarak yaptıkları çalışmada %1 (a/h) konsantrasyonda kullanılan SDS'in bağıl aktiviteyi %27 inhibe ettiğini, %1 (h/h) konsantrasyonda kullanılan Tween 20'nin ise neredeyse etkisiz denilecek miktarda arttırdığını bildirmişlerdir. Sarı ve arkadaşları (2015) ise *Bacillus circulans* M34'den elde ettikleri proteazı saflaştırarak yaptıkları çalışmada %1 (h/h, a/h) konsantrasyondaki Tween 80 ve SDS çözeltilerini kullanarak proteaz aktivitesi üzerine yüzey aktif maddelerinin etkisini incelemişlerdir. Tween 80 varlığında aktivitenin biraz arttığını (%6), SDS varlığında ise belirgin bir şekilde %81 oranında bir düşüş ile inhibe edildiğini belirlemişlerdir.

Çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan diğer çalışmalarda ise bazı *Bacillus* türlerine yüzey aktif maddelerin etkisinin, bu çalışmadaki *Bacillus* sp. EBTA6'ya göre farklılıklar gösterdiği görülmüştür. Hadj-Ali ve arkadaşları (2007) *Bacillus*

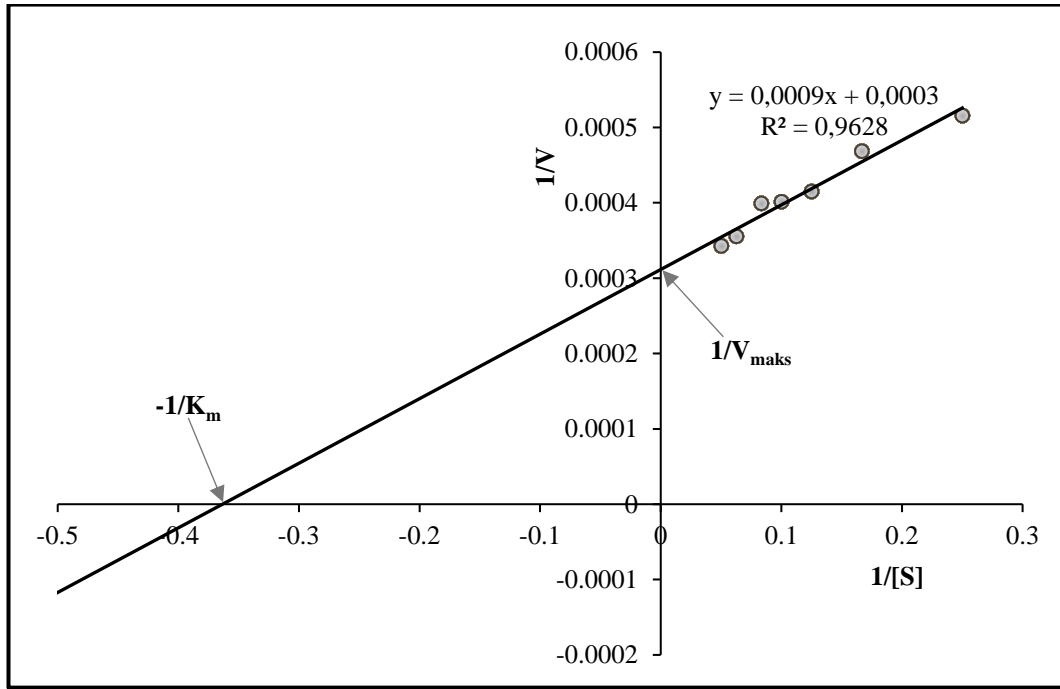
licheniformis NH1'den elde ettikleri ham proteaz ile yaptıkları çalışmalarında %1 (h/h) Tween 20 varlığında enzimin aktivitesinin %98,5 gibi çok düşük bir oranda azalarak stabil kaldığını belirlemişlerdir. Haddar ve arkadaşları (2010), *Bacillus mojavensis* A21'den elde ettikleri ham proteaz ile yaptıkları çalışmalarında; enzimin %1 (h/h) Tween 80 varlığında 60 dakika inkübasyon sonunda, aktivitesinin 30°C de %100, 40°C'de ise %99 olarak stabil kaldığını belirlemişlerdir. %1 (a/h) SDS varlığında 1 saat inkübasyon sonunda ise 30°C de %98, 40°C'de ise %40 olarak tespit etmişlerdir. Manni ve arkadaşları (2009); *Bacillus cereus* SV1'dan elde ettikleri ham proteaz ile yaptıkları çalışmalarında; enzimin 40°C'de 60 dakika ön inkübasyonla %1 (h/h) Tween 20 ve Tween 80 varlığında aktivitesini sırasıyla %123-100 belirleyerek stabil olduğu çıkarımında bulunmuşlardır. %1 SDS (a/h) varlığında ise %35,2 bularak yüksek bir inhibisyon görüldüğünü tespit etmişlerdir. Annamalai ve arkadaşları (2014a) *Bacillus firmus* CAS 7'den saflaştırarak elde ettikleri proteaz ile yaptıkları çalışmada, %1 konsantrasyondaki Tween 80 ve SDS çözeltilerini kullanarak proteaz aktivitesi üzerine yüzey aktif maddelerinin etkisini incelemişlerdir. Enzimin %1 (h/h) Tween 80 varlığında bağıl aktivitesinin % 88'ini, %1 SDS (a/h) varlığında ise %78'ini koruduğunu belirlemişlerdir.

Alkali proteazlar, deterjan katkı maddeleri olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Üstün bir proteazın dikkate değer bir özelliği, genellikle deterjan bileşenleri olarak kullanılan oksitleyici maddelere, yüzey aktif maddelere ve ağartıcılara karşı stabiledir (Farhadian ve ark., 2015). Bu tür uygulamalar için değerli olan enzim özellikleri, yüksek sıcaklıklarda ve yüzey aktif madde varlığında stabiliteye ek olarak, aşırı alkali pH ve yüksek şelatör konsantrasyonlarında yüksek bir aktivitedir. SDS'a karşı stabilite önemlidir. Çünkü SDS'a stabil enzimler piyasada yetersizdir (Haddar ve ark., 2009). *Bacillus* sp. EBTA6 suşundan elde edilen proteazın, ağartıcı bazlı deterjan formülasyonlarında kullanılan farklı yüzey aktif maddeler ve şelatörler varlığında stabil ve aktif olduğu tespit edilmiştir. Bu stabilite, enzimin deterjanlarda kullanılmasına izin verecektir.

4.3.6. Proteaz enziminin Michaelis Menten kinetik sabitleri

Substrat konsantrasyonunun proteaz aktivitesi üzerindeki etkisi Bölüm 3.7.6.'da belirtilen şekilde, 0,05-20 mg/mL arasında değişen kazein konsantrasyonları kullanılarak incelenmiştir. Elde edilen sonuçlardan Michaelis Menten denkleminde (Denklem 4.3) elde edilen Lineweaver-Burk grafiği yardımıyla K_m ve V_{maks} değerleri (Denklem 4.4, Denklem 4.5) hesaplanmıştır. $1/S$ ve $1/V$ arasında oluşturulan Lineweaver-Burk grafiği Şekil 4.14.'de gösterilmiştir.

$$V_0 = \frac{V_{maks}[S]}{K_m + [S]} \quad (4.3)$$



Şekil 4.14. *Bacillus* sp. EBTA6'dan elde edilen proteaz enziminin değişen kazein substratı konsantrasyonları ile elde edilmiş Lineweaver-Burk grafiği

Kinetik çalışmalar, substrat olarak değişen kazein konsantrasyonları kullanıldığında, *Bacillus* sp. EBTA6 suşundan elde edilen proteaz için K_m ve V_{maks} değerlerinin sırasıyla 2,762 mg/mL ve 3125 U/mL olduğunu göstermiştir.

$$\frac{1}{V_{maks}} = 0,000320 \quad V_{maks} = 3125 \text{ (U/ml)} \quad (4.4)$$

$$\frac{1}{K_m} = 0,3620 \quad K_m = 2,762 \text{ (mg/ml)} \quad (4.5)$$

V_0 , reaksiyon hızı; V_{maks} , elde edilecek en yüksek reaksiyon hızı; S , substrat konsantrasyonu; K_m ise reaksiyon hızının V_{maks} 'ın yarısı olduğu substrat konsantrasyonu olarak tanımlanır. Düşük K_m 'ye sahip bir enzim, substratı için daha büyük bir afiniteye sahiptir. Bir enzimin farklı substratlardaki K_m ve V_{maks} değerleri farklıdır. Aynı zamanda farklı kaynaklardan elde edilen enzimlerin de aynı substrattan elde edilen K_m ve V_{maks} değerleri de farklılık gösterir. Diğer bir deyişle, enzim-substrat ilişkisi spesifiktir ve her enzim ile substratı için belirlenmesi önemlidir (Iqbal ve ark., 2018).

Görmez ve Gülmüş (2018) *Bacillus pumilus* NK14'den elde ettikleri ham proteaz ile yaptıkları çalışmalarında K_m ve V_{max} değerlerini sırasıyla 0,673 mg/mL ve 99 EU/mL (bir ünite) olarak tespit etmişlerdir. Patel ve arkadaşları (2006) *Bacillus* sp. Ve1'den elde ettikleri proteazı saflaştırarak yaptıkları çalışmalarında; proteazın K_m ve V_{max} değerlerini sırasıyla 0,153 g/100 mL ve 454 U/mL olarak belirlemişlerdir. Kazan ve arkadaşları (2005) *Bacillus clausii* GMBAE 42'den elde ettikleri proteazı saflaştırarak yaptıkları çalışmada; proteazın K_m ve V_{max} değerlerini sırasıyla 1,8 mg/mL ve 11,50 $\mu\text{mol/mL}$ dk olarak tespit etmişlerdir. Ahmed ve arkadaşları (2011); *Bacillus subtilis*'den elde ettikleri proteazı saflaştırarak yaptıkları çalışmada; substrat olarak kazeini kullanarak, K_m ve V_{max} değerlerini sırasıyla 58 μM ve 148 U/mL olarak belirlemişlerdir. Iqbal ve arkadaşları (2018) *Bacillus subtilis*'den elde ettikleri proteazı saflaştırarak yaptıkları çalışmalarında; substrat olarak kazeini kullanarak, K_m ve V_{max} değerlerini 0,02969 μM ve 56,73 U/mL olarak bildirmişlerdir. Shrinivas ve Naik (2011) *Bacillus halodurans* JB 99'dan elde ettikleri proteazı saflaştırarak yaptıkları çalışmada; substrat olarak kazeini kullanarak, K_m ve V_{max} değerlerini 3.3 ± 0.4 mg/mL ve $15,6 \pm 0,9$ $\mu\text{mol/mg}$ dk olarak tespit etmişlerdir. Sarı (2011), *Bacillus circulans* M34'den elde ettiği proteazı saflaştırarak yaptığı çalışmasında; proteazın K_m ve V_{max} değerlerini sırasıyla 0,96 mg/mL ve 9,548 $\mu\text{mol/mL}$ dk olarak belirlemiştir. *Bacillus* sp. EBTA6 suşundan elde edilen proteaz için K_m değeri, literatürdeki verilerle karşılaştırıldığında; ortalama bir düzeyde substrata ilgi gösterdiği görülmüştür. Proteazların endüstride büyük ölçekte kullanılması sebebiyle; enzimatik reaktörlerin

dizaynını iyileştirmek ve geliştirmek için, kullanılacak enzimin kinetik karakterizasyonunun bilinmesi gereklidir (Sugumaran ve ark., 2012).

4.4. Uygulama Alanları

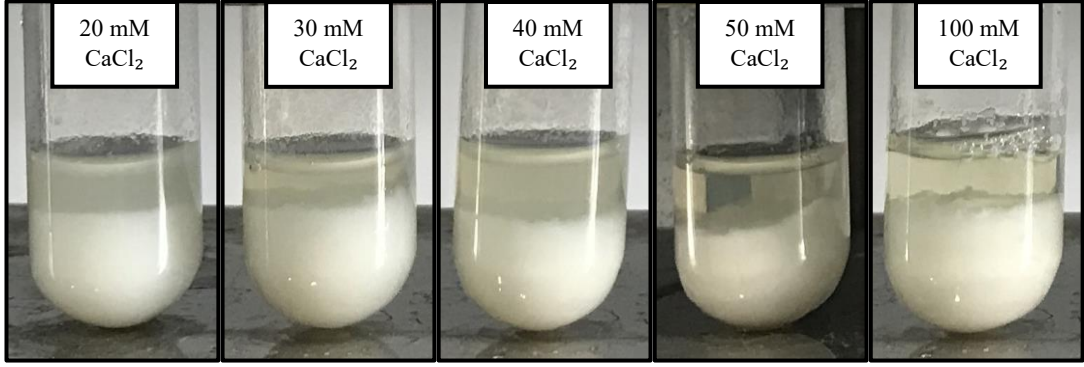
4.4.1. Süt pıhtılaştırma aktivitesi

Bacillus sp. EBTA6 suşundan elde edilen proteaz enzimi, Bölüm 3.8.1.'de belirtilen yöntemle göre süt pıhtılaştırma aktivitesi açısından üç sınıfa ayrılarak değerlendirilmiştir.

Bu sınıflar;

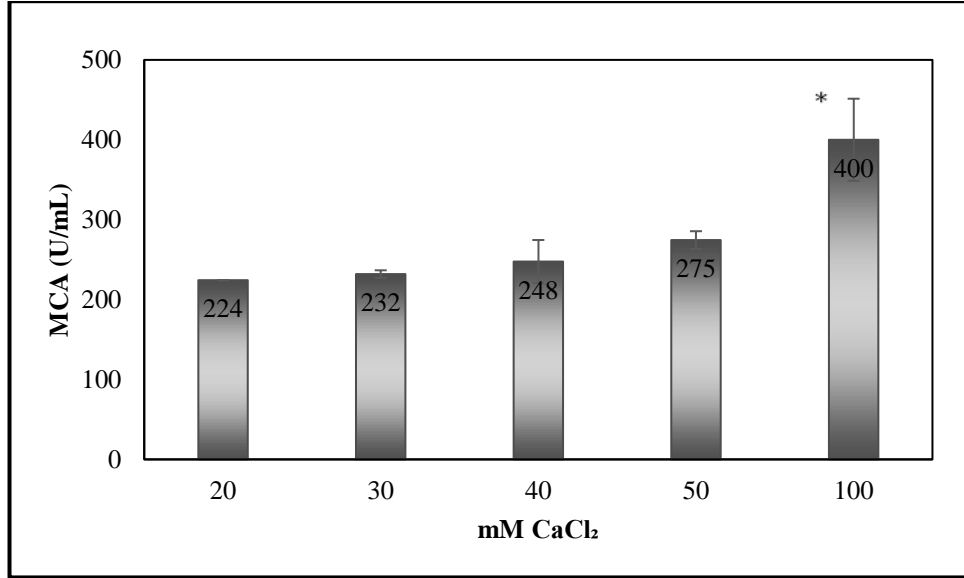
- Güçlü süt pıhtılaştırması (Test tüpünde bol peynir altı suyu ayrılması),
- Zayıf süt pıhtılaştırması (Peynir altı suyunun net bir şekilde ayrılamaması),
- Pıhtılaştırma oluşmaması (Pıhtı ve peynir altı suyu olmaması) (Alecrim ve ark., 2014).

Mikrobiyal peynir mayası benzeri süt pıhtılaştırma enzimleri, süt pıhtılaştırmasını katalize eden aspartik proteinazlardır. Kalsiyum, süt pıhtılaştırması sırasında pıhtı oluşumunda önemli bir madde olarak tanımlanmıştır. Bu da ancak konsantrasyonu yeterince yüksek olduğunda gerçekleşmektedir (Anema ve ark., 2005). Kalsiyum, izoelektrik koşullar yaratarak ve kazein miselleri arasında bir köprü görevi görerek pıhtılaştırmaya yardımcı olur (Merheb-Dini ve ark., 2010). Kalsiyumun; kazein misellerinin negatif kalıntılarının (fosfoerin ve karboksilik gruplar); Ca^{2+} ve kalsiyum-fosfat kompleksleri tarafından nötralize edilmesinin neden olduğu, süt pıhtılaştırmasının ikinci adımında (enzimatik olmayan), kazein toplanmasında önemli bir işleve sahip olduğu bilinmektedir (Pires ve ark., 1999). Böylece konsantrasyonundaki bir artış pıhtılaştırma hızında artışa sebep olur (Arima ve ark., 1970; Kumar ve ark., 2005; El-Bendary ve ark., 2007). Kalsiyumun süt pıhtılaştırması üzerindeki etkisini test etmek için, süt örnekleri ile farklı $CaCl_2$ konsantrasyonlarında (20-100 mM) çalışılmıştır.



Şekil 4.15. *Bacillus* sp. EBTA 6'dan elde edilen proteazın çeşitli CaCl_2 (20-30-40-50-100 mM) konsantrasyonlarında süt pıhtılaştırması

Şekil 4.15.'de çeşitli CaCl_2 konsantrasyonlarının (20-30-40-50-100 mM) ilave edilmesiyle her bir tüpte güçlü kesikli parçacıkların oluştuğu ve süt pıhtılaşmasının gerçekleştiği gözlemlenmiştir. İlk kesikli parçacığın oluştuğu süre kaydedilerek, "Denklem 3.2" 'de verilen formül yardımıyla süt pıhtılaştırma aktivitesi belirlenmiş ve Şekil 4.16.'da gösterilmiştir. CaCl_2 'ün (20-30-40-50-100 mM) 37°C 'de ve pH 6-7 civarında *Bacillus* sp. EBTA6 izolatından elde edilen 0,2 mL proteaz enziminin süt pıhtılaştırma aktivitesine (MCA) etkisinin; 20 mM'da 224 U/mL, 30 mM'da 232 U/mL, 40 mM'da 248 U/mL, 50 mM'da 275 U/mL ve 100 mM'da 400 U/mL olduğu belirlenmiştir. CaCl_2 'ün 20 mM'dan 100 mM'a doğru gidildikçe pıhtılaştırma aktivitesinin arttığı, pıhtıların daha güçlü ve peynir altı suyunun daha şeffaf olduğu gözlemlenmiştir. Elde edilen süt pıhtıları, 40 dakikalık bir süre boyunca stabil bir kıvam göstermiştir. Sızıntıların ise berrak ve hafif sarı renkte olduğu görülmüştür.



Şekil 4.16. Çeşitli CaCl₂ konsantrasyonlarının (20-30-40-50-100 mM), *Bacillus* sp. EBTA6'dan elde edilen 0,2 mL proteaz enziminin MCA'sına etkisi *: Her bir değer, iki bağımsız deneyin ortalamasını temsil eder ve hata çubukları standart sapmayı gösterir.

Dash ve arkadaşları (2015), *Lagenaria siceraria*'nın tohum çekirdeklerinden elde ettikleri; albumin (Lalb), globulin (Lglo), prolamin (Lpro), glutelin (Lglu) ile süt pıhtılaştırma aktivitesini belirlemişlerdir. 0,01 M CaCl₂ konsantrasyonunda, benzer şekilde yaptıkları çalışmada 0,2 mL (albumin, globulin, prolamin, glutelin) ekleyerek, L (alb)'ini $26,2 \pm 4,7$ U/mL, L (glo)'ini $24 \pm 3,9$ U/mL, L (pro)'ini $35,9 \pm 6,2$ U/mL ve L (glu)'ini $26,8 \pm 2,5$ U/mL olarak tespit etmişlerdir. Pıhtılaşmanın tohum proteinlerinin enzimatik aktivitesine dayalı olarak gerçekleştiği çıkarımına ulaşmışlardır. Bitki özütünden izole edilmiş *L. siceraria* proteininin süt pıhtılaştırma aktivitesinin, bir bakteri olan *Bacillus* sp. EBTA6 izolatından elde edilen proteaz enziminin süt pıhtılaştırma aktivitesinden daha güçlü olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

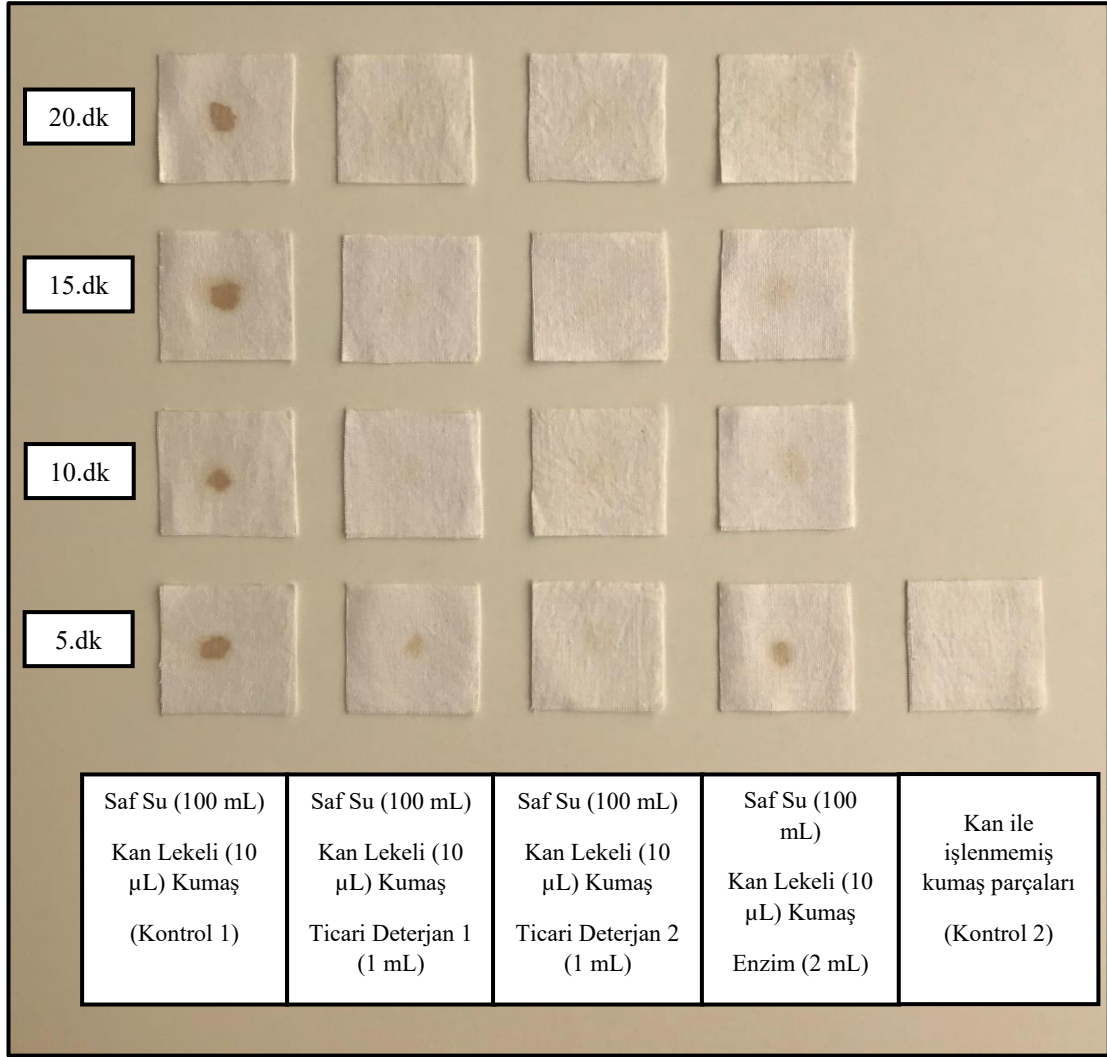
Bacillus sp. EBTA6 suşundan elde edilen proteaz enziminin; 0,2 mL kullanılarak 100 mM CaCl₂ konsantrasyonunda, en yüksek süt pıhtılaştırma aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. Merheb-Dini ve arkadaşları (2010) termofilik bir mantar olan *Thermomucor indicae-seudaticae*'den elde ettikleri proteaz ile yaptıkları çalışmalarında süt pıhtılaştırma aktivitesinin en yüksek 0,04 M CaCl₂'de oluştuğunu tespit etmişlerdir. Nájera ve arkadaşları (2003), CaCl₂ ve rennet konsantrasyonlarının sütün pıhtılaştırma özelliklerine etkilerini inceledikleri çalışmalarında; CaCl₂ eklenmesinin peynir mayasının pıhtılaştırma süresini azalttığını, ancak yüksek CaCl₂

konsantrasyonlarında (0,3 mol/L) pıhtılaşma süresini arttırılabildiğini tespit etmişlerdir. Türkiye’de üretilen yerli bir gıda ürünü olan tarhanadan izole edilen *Bacillus* sp. EBTA6 suşundan elde edilen proteaz enziminin, iyi bir süt pıhtılaştırıcı olarak kazeinolitik aktivite sergilediği ve peynir altı suyu proteinlerini hidrolize edebildiği için peynir üretiminde endüstriyel ölçekte olası bir uygulama adayı olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

4.4.2. Leke çıkarma çalışmaları

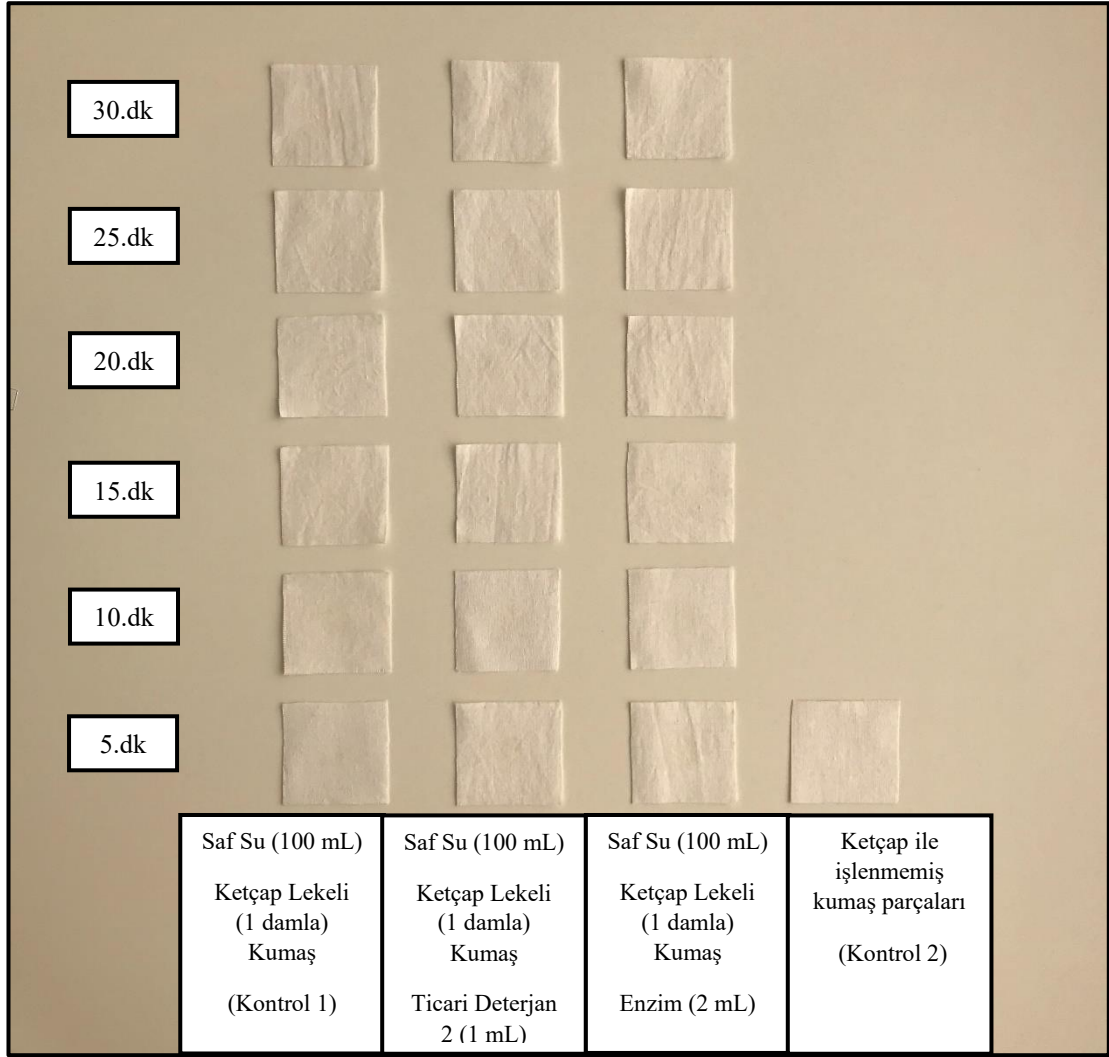
Bölüm 3.8.2.’de belirtilen yönteme göre leke ile işlenmiş kumaş parçaları 50°C’de her 5 dakikada bir 30 dakikalık bir süre boyunca izlenmiştir.

Mezbaha hayvanları kan plazmasının, %7 oranında protein içerdiği bilinmektedir (Gökalp ve Yanar, 1986). Proteazın kan lekesinin çıkarılmasındaki etkinliği Şekil 4.17.’de gösterilmiştir. Kan lekeleri ile yapılan çalışmada, tek başına enzim kullanılarak 20. dakikanın sonunda inkübasyondan alınan kumaşta en etkili sonuç alınmış ve lekenin büyük oranda çıktığı gözlemlenmiştir. Tek başına kullanılan enzim, TD1 ve TD2, kontrol 1-2 göz önüne alınarak kıyaslandığında, her birinin 20. dakikanın sonunda benzer şekilde temizleme etkisine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Tek başına kullanılan TD2’nin 5. dakikadan itibaren, tek başına kullanılan TD1 ve enzime göre lekeleri tüm sürelerde daha belirgin bir şekilde çıkardığı ancak 20. dakikada tek başına kullanılan TD1 ve enzimle olan çalışmalarla benzer şekilde çok hafif bir lekenin kaldığı gözlemlenmiştir. Kan lekesinin çıkarılması durumunda, enzimin deterjan olmadığı halde oldukça etkili olduğu görülmüştür.



Şekil 4.17. *Bacillus* sp. EBTA 6'nın ürettiği alkali proteazın, patiska kumaşındaki kan lekeli üzerine uygulanarak, deterjanlar ve kontrol 1-2 'ye karşı yıkama performansının incelenmesi

Yerli bir firmadan satın alınan ketçabın etiket bilgilerine göre %1 (a/a) protein içerdiği bilinmektedir. Yapılan çalışmada ketçap lekesinin "Kontrol 1" 'e göre incelendiğinde, tek başına kullanılan deterjanda (TD2) ve enzimde 25. dakikaya kadar çok hafif bir şekilde kaldığı, ancak 30. dakikalarında tamamen çıktığı görülmüştür. Ketçap lekeli, "Kontrol 1" 'de dahil olmak üzere hafif bir leke verdiği için "Şekil 4.18." 'de çok fazla belli olmamaktadır.



Şekil 4.18. *Bacillus* sp. EBTA 6'nın ürettiği alkali proteazın, patiska kumaşındaki ketçap lekesi üzerine uygulanarak, deterjanlar ve kontrol 1-2 'ye karşı yıkama performansının incelenmesi

Çalışmada kullanılan alkali proteazın, etüvde kurutma ile gerçekten inatçı hale getirilmiş lekeleri neredeyse çıkarabildiği gözlemlenmiştir. Proteinli lekeler, kurutma ve zamanla eskime ile çoğu düşük maliyetli ve yüksek hacimli deterjanların etkisine sağlam bir şekilde direnç gösterir (Saxena ve ark., 1999). Bu inatçı lekeler, yalnızca proteinlerdeki peptit bağlarına hidrolitik olarak saldıran proteazlar ile birleştirilen deterjan formülasyonları tarafından kolayca çıkarılabilir (Nassar ve ark., 2015).

Bacillus sp. EBTA 6'dan elde edilen alkali proteazın; TD1, TD2 gibi farklı ticari deterjanlar ile karşılaştırıldığında güçlü bir leke çıkarıcı olduğu görülmüştür. İyi bir deterjan proteazının performansı, proteinli leke bozulması, büyük çözünmeyen

proteinleri hidrolize etme yeteneği ve diğer deterjan bileşenleriyle uyumluluk gibi birçok parametre ile tanımlanır (Hadjidj ve ark., 2018). Karakterizasyon çalışmalarında, *Bacillus* sp. EBTA 6'dan elde edilen alkali proteazın, alkali koşullarda ve ayrıca oda sıcaklığında bile yıkamayı kolaylaştıracak geniş bir sıcaklık aralığında aktif olması nedeniyle umut vadeden bir deterjan katkı maddesi olduğu açıktır.

Vishalakshi ve arkadaşları (2009) *Streptomyces gulbargensis*'den elde ettikleri ham proteazın 40°C'de 25 dakika yıkama performansını inceledikleri çalışmalarında; yalnızca enzim kullanarak 25. dakikanın sonunda kan lekelerinin neredeyse çıktığını belirlemişlerdir. Görmez ve Gülmüş (2018) *Bacillus pumilus* NK14'den elde ettikleri ham proteaz ile yaptıkları yıkama performansı çalışmalarında kan ve çimen lekesi üzerinde çalışmışlardır. Ve enzim tek başına kullanıldığında lekenin azaldığını gözle görülür bir şekilde tespit etmişlerdir. Annamalai ve arkadaşları (2014b), *Bacillus alveayuensis* CAS 5'den saflaştırdıkları proteazın 50°C'de 30 dakika yıkama performansını inceledikleri çalışmalarında kan lekesinin; tek başına enzim kullanılarak 30 dakikanın sonunda iyi çıkmadığını, tek başına deterjan kullanılarak biraz daha iyi çıktığını ancak enzim ve deterjan birlikte kullanıldığında oldukça iyi çıktığını bildirmişlerdir. Thomas ve arkadaşları (2020), *Bacillus* sp. TSA5'den kısmi saflaştırdıkları proteazın 80°C'de, 30 dakika yıkama performansını inceledikleri çalışmalarında, leke olarak sebze suyu kullanmışlardır. Tek başına kullanılan deterjanın ve enzimin lekeyi benzer şekilde neredeyse tamamen çıkardığını, enzimin temizleme etkisine sahip olduğunu gözlemlemişlerdir.

BÖLÜM 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, Sakarya Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Gıda Biyoteknolojisi Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan, önceki çalışmalarda Türkiye'nin çeşitli illerinden toplanan toprak-gıda numunelerinden izole edilen 32 adet suş; yağsız süt agarında proteolitik aktivite açısından taranmış ve en yüksek proteaz üreticilerinden biri olan *Bacillus* sp. EBTA6 optimizasyon ve karakterizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere seçilmiştir.

Bacillus sp. EBTA 6 tarafından proteaz üretimi için inkübasyon süreci, derin kültür fermantasyonunda incelenmiştir. Maksimum enzim üretimi ve mikroorganizma gelişmesi 48 saatlik inkübasyondan sonra elde edilmiştir. Hücre gelişmesiyle birlikte proteaz üretimi artmıştır. *Bacillus* sp. EBTA6 suşu ile maksimum proteaz üretimi ve mikroorganizma gelişmesi elde etmek için, maya özütü konsantrasyonu, inkübasyon sıcaklığı ve pH olmak üzere üç temel belirleyici (bağımsız değişken) yanıt yüzey yöntemi (RSM) ile merkezi kompozit dizaynı (CCD) kullanılarak optimizasyon gerçekleştirilmiştir. Proteaz üretimi (3207,01 U/mL) ve mikroorganizma gelişmesi için (600 nm'de 5,8) optimum koşullar, 30°C sıcaklık, pH 9 ve 15 g/L maya özütü konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. Üretilen proteaz enziminin en iyi aktivite gösterdiği pH 9 olduğundan, alkali *Bacillus* olduğu sonucuna varılmıştır. *Bacillus* sp. EBTA6 suşunun proteaz üretiminde ve mikroorganizma gelişmesinde modelin geçerliliğini test ederek doğrulamak için, başlangıç pH'ı 9, maya özütü 15 g/L ve sıcaklık 30,11°C olan rastgele bir üretim kombinasyonu seçilerek çalışma deneysel olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen deneysel değerler, model ile tahmin edilen değerlerle iyi bir uyum içinde olduğu ve %10'dan az hata olduğundan modelin proteaz üretimi ve mikroorganizma gelişmesi için etkinliği tahmin edecek yeterli doğruluğa sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Yapılan çalışmalar proses koşullarının

optimizasyonu ile proteaz üretiminin başlangıçta optimize edilmeden olan üretimine göre (1246,76 U/mL); yaklaşık olarak 2,6 kat arttığını göstermiştir.

Enzim aktivitesi için optimum sıcaklığın 50°C’de olduğu ve bunu en yakın 60°C’nin takip ettiği belirlenmiştir. Enzimin yapılan çalışmalar doğrultusunda 50°C gibi düşük bir sıcaklıkta kararlılığını koruduğu sonucuna ulaşılmıştır. Ticari uygulamalar için kullanılması durumunda hafif ısıtma koşulları altında kullanılması uygun bulunmuştur. Proteazın optimum pH’sı 8 olarak belirlenmiştir. Ayrıca pH 7-10’da (%82-93) dikkate değer bir stabiliteye ve yüksek bir pH toleransına sahip olduğu düşünülmüştür. Buradan yola çıkıldığında *Bacillus* sp. EBTA6 suşunun ürettiği proteaz enziminin net bir şekilde alkali proteaz özelliklerini gösterdiği kabul edilmiştir. *Bacillus* sp. EBTA6 suşundan elde edilen proteazın pH 7-10 arası aktif olması ve geniş pH aralığında stabilitesini koruması; ticari olarak istenilen proteaz gerektiren ultrafiltrasyon membran temizlemede, deterjanlarda kullanım için iyi bir verim alınacağını göstermiştir.

Enzimin, substrat olarak artan kazein konsantrasyonları ile kinetik çalışması incelenmiştir. K_m ve V_{max} değerlerinin sırasıyla 2,762 mg/mL ve 3125 U/mL olduğu belirlenmiştir. Enzim aktivitesi üzerinde test edilen 1 mM ve 5 mM konsantrasyonlardaki metal iyonlarından; K^+ , Cu^{2+} , Sn^{2+} ve Zn^{2+} ’nin inhibe edici, Ca^{2+} ve Mg^{2+} ’nin uyarıcı bir etkiye sahip olduğu ancak bağlı aktiviteyi büyük ölçüde etkilemediği, stabilitesini koruduğu sonucuna ulaşılmıştır. İzolat hakkında daha derin bilgi edinmek için çalışmada kullanılan metal iyonlarının yüksek konsantrasyonları ile çalışmanın devam ettirilmesinin faydalı olacağı düşünülmüştür. *Bacillus* sp. EBTA6 suşundan elde edilen proteaz enziminin 1 ve 2,5 mM konsantrasyonlardaki serin proteaz inhibitörü olan PMSF ile aktivite kaybına uğradığı (%14-37) gözlemlenmiş ve kısmi inhibe olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bu yüzden serin proteaz ihtiva ettiği düşünülmüştür. Enzimin 1-5 mM konsantrasyonlardaki metaloenzim inhibitörü EDTA ile aktivitesinin %43-48 oranında inhibe olduğu ve metal bağlama bölgesi ihtiva ettiği düşünülmüştür. Bu amino asit inhibitörlerinin farklı konsantrasyonlarıyla çalışmanın devam ettirilmesinin izolatın sınıfı hakkında daha net bir bilgi vereceği öngörülmüştür. Enzim EDTA tarafından tamamen inhibe olmadığından, 5 mM konsantrasyonda %48

aktivite kaybına uğrayarak stabil kalabildiğinden; su yumuşatıcı görevi gören birçok şelat ajanı içeren deterjanlarla birlikte kullanılmasının endüstriyel açıdan avantajlı olabileceği düşünülmüştür. Enzimin bağıl aktivitesinin; konsantrasyonu %1 olan yüzey aktif maddelerden Tween 20 ve Tween 80 varlığında çok düşük bir miktarda arttığı (%103-102); SDS varlığında ise %61'e inhibe ettiği belirlenmiştir. *Bacillus* sp. EBTA6 suşundan elde edilen proteaz yüzey aktif maddelere karşı stabil kalabildiğinden ve tamamen inhibe olmadığından; endüstride deterjan katkı maddesi olarak iyi bir alternatiftir.

Bacillus sp. EBTA6 suşundan elde edilen proteaz enziminin, süt pıhtılaştırma aktivitesini belirlemek amacıyla süt örnekleri ile farklı CaCl_2 konsantrasyonlarında (20-30-40-50-100 mM) çalışılmıştır. Tüm CaCl_2 konsantrasyonlarında pıhtılaşma görülmüştür. 100 mM CaCl_2 konsantrasyonunda, en yüksek ve en güçlü süt pıhtılaşma aktivitesi belirlenmiştir. Enzimin, yeni diyet ürünlerinin tasarlanmasında ve potansiyel olarak biyoaktif peptitlerin elde edilmesinde kullanılacak süt proteini hidrolizatlarının üretimi için kullanılabilmesi düşünülmüştür.

Proteazların deterjanlarda kullanılması, dünyadaki kirlilik yükünü dolaylı olarak azaltan deterjanların hacmini de azaltabilir. Çalışmada kullanılan alkali proteazın, etüvde kurutularak inatçı hale getirilen ketçap lekesini tamamen; kan lekesini ise neredeyse çıkarabildiği gözlemlenmiştir. Ayrıca enzimin TD1 ve TD2 gibi farklı ticari deterjanlarla karşılaştırıldığında iyi bir performans sergilediği görülmüştür. Bu enzimin kan lekesinin çıkarılmasında uygulanması, enzimi deterjan endüstrilerinde potansiyel olarak işe yarar hale getirecektir. *Bacillus* sp. EBTA6 suşundan elde edilen alkali proteaz enzimi; özellikleri ile birlikte ele alındığında, deterjan endüstrisi için başarılı bir aday olabileceği öngörülmektedir.

Sonuçlar, *Bacillus* sp. EBTA6 izolatının endüstriyel faydasını ortaya koymaktadır. Enzimi daha farklı ticari uygulamalarda kullanmak üzere saflaştırmak ve karakterize etmek için çalışmanın ilerletilebileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Adetunji, A. I., Olaniran, A.O. 2020. Statistical modelling and optimization of protease production by an autochthonous *Bacillus aryabhatai* Ab15-ES: A response surface methodology approach. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 24:101528. doi:10.1016/j.bcab.2020.101528
- Adetunji, A.I. 2017. Treatment of lipid-rich wastewater using free and immobilized bioemulsifier and hydrolytic enzymes from indigenous bacterial isolates. University of KwaZulu-Natal, Westville, pp 60-78.
- Adinarayana, K., Ellaiah, P. 2002. Response surface optimization of the critical medium components for the production of alkaline protease by a newly isolated *Bacillus* sp. *J. Pharmacy Pharmaceut. Sci.*, 5: 272-278.
- Adinarayana, K., Ellaiah, P., Prasad, D. S. 2003. Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* PE-11. *AAPS PharmSciTech*, 4(4), 440–448. doi:10.1208/pt040456
- Agrebi, R., Haddar, A., Hajji, M., Frikha, F., Manni, L., Jellouli, K., Nasri, M. 2009. Fibrinolytic enzymes from a newly isolated marine bacterium *Bacillus subtilis* A26: characterization and statistical media optimization. *Canadian Journal of Microbiology*, 55(9), 1049–1061. doi:10.1139/w09-057
- Ahmed, I., Zia, M.A., Iqbal, H.M.N. 2011. Purification and kinetic parameters characterization of an alkaline protease produced from *Bacillus subtilis* through submerged fermentation technique. *World Applied Sciences Journal* 12: 751-757.
- Akçay, F.A., Avcı, A. 2020. Screening and Selection of Media Components for Protease Production by *Bacillus* sp. EBTA6 Using Plackett–Burman Design. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 8(6): 1250-1255.
- Al-Askar, A.A., Rashad, Y.M., Hafez, E.E., Abdulkhair, W.M., Baka, Z.A., Ghoneem, K.M. 2015. Characterization of alkaline protease produced by *Streptomyces griseorubens* E44G and its possibility for controlling Rhizoctonia root rot disease of corn. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 29(3): 457-462.
- Alecrim, M.M., Palheta, R.A., Teixeira, M.F.S., Oliveira, de.A.I.M. 2014. Milk-clotting enzymes produced by *Aspergillus flavus* strains on Amazonian fruit waste. *International Journal of Food Science and Technology*, 50(1), 151–157. doi:10.1111/ijfs.12677

- Anema, S.G., Lee, S.K., Klostermeyer, H. 2005. Effect of pH at heat treatment on the hydrolysis of κ -casein and the gelation of skim milk by chymosin. *LWT – Food Science and Technology*, 40, 99–106.
- Annamalai, N., Rajeswari, M. V., Sahu, S. K., Balasubramanian, T. 2014a. Purification and characterization of solvent stable, alkaline protease from *Bacillus firmus* CAS 7 by microbial conversion of marine wastes and molecular mechanism underlying solvent stability. *Process Biochemistry*, 49(6), 1012–1019. doi:10.1016/j.procbio.2014.03.007
- Annamalai, N., Rajeswari, M.V., Balasubramanian, T. 2014b. Extraction, purification and application of thermostable and halostable alkaline protease from *Bacillus alveayuensis* CAS 5 using marine wastes. *Food and Bioproducts Processing*, 92(4), 335–342. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.08.009>.
- Anwar, A., Saleemuddin, M. 2000. Alkaline protease from *Spilosoma obliqua*: potential applications in bio-formulations. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 31(2), 85. doi:10.1042/ba19990078
- Ao, X.L., Yu, X., Wu, D.T., Li, C., Zhang, T., Liu, S.L., Chen, S.J., He, L., Zhou, K., Zou, L.K. 2018. Purification and characterization of neutral protease from *Aspergillus oryzae* Y1 isolated from naturally fermented broad beans. *Amb. Express* 8(1):96. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0611-6>.
- Arima, K., Yu, J., Iwasaki, S. 1970. Milk clotting enzyme from *Mucor pusillus* var. lindt. *Methods in Enzymology*, 19, 446–459
- Arulmani, M., Aparanjini, K., Vasanthi, K., Arumugam, P., Arivuchelvi, M., Kalaichelvan, P.T. 2006. Purification and partial characterization of serine protease from thermostable alkalophilic *Bacillus laterosporus*-AK1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(4), 475–481. doi:10.1007/s11274-006-9249-
- Aruna, K., Shah, J., Birmole, R. 2014. Production and partial characterization of alkaline protease from *Bacillus tequilensis* strains csgab0139 isolated from spoiled cottage cheese, *Int. J. Appl. Biol. Pharmaceut. Technol.* 5 (3) 201–221.
- Asker, M.M.S., Mahmoud, M.G., El Shebwy, K., Abd el Aziz, M.S. 2013. Purification and characterization of two thermostable protease fractions from *Bacillus megaterium*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 11(2), 103–109. doi:10.1016/j.jgeb.2013.08.001
- Bach, E., Daroit, D.J., Corrêa, A.P.F., Brandelli, A. 2011. Production and properties of keratinolytic proteases from three novel Gram-negative feather-degrading bacteria isolated from Brazilian soils. *Biodegradation*, 22(6), 1191–1201. doi:10.1007/s10532-011-9474-0
- Badoei-Dalfard, A., Karami, Z. 2013. Screening and isolation of an organic solvent tolerant-protease from *Bacillus* sp. JER02: Activity optimization by response surface methodology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 89, 15–23.
- Bairoch, A. 2000. The Enzyme database in 2000. *Nucleic Acids Research*, vol. 28, no. 1, pp. 304–305.

- Bashir, F., Asgher, M., Hussain, F., Randhawa, M. A. 2018. Development and characterization of cross-linked enzyme aggregates of thermotolerant alkaline protease from *Bacillus licheniformis*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 113, 944–951.
- Ben Salem, R., Abbassi, M.S., Cayol, J.L., Bourouis, A., Mahrouki, S., Fardeau, M.L., Belhadj, O. 2016. Thermophilic *Bacillus licheniformis* RBS 5 isolated from hot tunisian spring coproducing alkaline and thermostable alpha-amylase and protease enzymes, *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* 5, 557–562
- Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S., Escalera, L.A. 2008. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965–977. doi:10.1016/j.talanta.2008.05.019
- Bhange, K., Chaturvedi, V., Bhatt, R. 2016. Simultaneous production of detergent stable keratinolytic protease, amylase and biosurfactant by *Bacillus subtilis* PF1 using agro industrial waste. *Biotechnology Reports*, 10, 94–104.
- Bharathiraja, S., Suriya, J., Krishnan, M., Manivasagan, P., Kim, S.K. 2017. Production of enzymes from agricultural wastes and their potential industrial applications. in: *Advances in food and nutrition research*, Vol. 80, Elsevier, pp. 125-148.
- Bhaskar, N., Sudeepa, E., Rashmi, H., Tamilselvi, A. 2007. Partial purification and characterization of protease of *Bacillus proteolyticus* CFR3001 isolated from fish processing waste and its antibacterial activities. *Bioresource Technology*, 98(14), 2758.
- Bhunia, B., Dey, A. 2012. Statistical Approach for Optimization of Physiochemical Requirements on Alkaline Protease Production from *Bacillus licheniformis* NCIM 2042. *Enzyme Research*, 1–13. doi:10.1155/2012/905804
- Box, G.E.P., Wilson, K.B. 1951. On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 13(1), 1-45.
- Brown, W.C., Young, F.E. 1970. Dynamic interactions between cell wall polymers, extracellular proteases and autolytic enzymes, *Biochem Biophys. Res. Commun.* 38, 564–568.
- Charles, P., Devanathan, V., Anbu, P., Ponnuswamy, M.N., Kalaichelvan, P.T., Hur, B. 2008. Purification, characterization and crystallization of an extracellular alkaline protease from *Aspergillus nidulans* HA-10. *J Basic Microbiol*; 48: 347–52.
- Chasseriaud, L., Miot-Sertier, C., Coulon, J., Iturmendi, N., Moine, V., Albertin, W., Bely, M.A. 2015. new method for monitoring the extracellular proteolytic activity of wine yeasts during alcoholic fermentation of grape must. *J. Microbiol. Methods*, 119, 176–179.

- Chauhan, B., Gupta, R. 2004. Application of statistical experimental design for optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. RGR-14. *Process Biochemistry*, 39(12), 2115–2122. doi:10.1016/j.procbio.2003.11.002
- Chmara, H., Milewski, S., Dzieduszycka, M., Smulkowski, M., Sawlewicz, P., Borowski, E. 1982. Epoxy peptides—a novel group of metabolic inhibitors in prokaryotic and eukaryotic organisms, *Drugs Exp. Clin. Res.* 8, 11–12
- Claus, H. 2009. Exoenzymes of wine microorganisms. In *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and Wine*; König, H., Uden, G., Fröhlich, J., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, pp. 259–271
- Corrons, M. A., Bertucci, J. I., Liggieri, C. S., López, L. M. I., Bruno, M. A. 2012. Milk clotting activity and production of bioactive peptides from whey using *Maclura pomifera* proteases. *LWT - Food Science and Technology*, 47(1), 103–109
- D’ambrosio, A., Rossano, R., Ungaro, N., Riccio, P. 2003. Proteolytic and milk clotting activities in extracts obtained from the crustaceans *Munida*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 22, 145–150.
- Daniel, C.S., Kopec, L.K., Yasbein, R.E., Young, E.F. 1984. Characterization of *Bacillus subtilis* DSM 704 AND its production of 1-Deoxynojirimycin. *Appl. Environ. Microbiol.* 281: 280-284.
- Dash P, Maharana L, Ghosh G. 2015. Proteolytic and milk clotting activity of fractionated protein of *Lagenaria siceraria*. *J Appl Pharm Sci*; 5: 086-091.
- Davies, B.J., Pickard, B.S., Steel, M., Morris, R.G., Lathe, R. 1998. Serine proteases in rodent hippocampus. *J. Biol. Chem.* 273, 23004–23011.
- De Oliveira, C. T., Rieger, T. J., Daroit, D. J. 2017. Catalytic properties and thermal stability of a crude protease from the keratinolytic *Bacillus* sp. CL33A. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 10, 270–277. doi:10.1016/j.bcab.2017.04.004
- Demirci, M. 2014. *Gıda Kimyası*. 7. Baskı. Hat Baskı Sanatları San. ve Tic. Ltd. Şti, Topkapı/İstanbul, s:182,183.
- Deng, A., Wu, J., Zhang, Y., Zhang, G., Wen, T. 2010. Purification and characterization of a surfactant-stable high-alkaline protease from *Bacillus* sp. B001. *Bioresource Technology*, 101(18), 7100–7106. doi:10.1016/j.biortech.2010.03.130
- Devi, M.K., Banu, A.R., Gnanaprabha, G.R., Pradeep, B.V., Palaniswamy, M. 2008. Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents, *Indian J. Sci. Technol.* 1(7) 1–6.
- Di Cera, E. 2009. Serine proteases. *IUBMB Life* 61, 510–515
- Dias, D.R., Vilela, D.M., Silvestre, M.P.C., Schwan, R.F. 2008. Alkaline protease from *Bacillus* sp. isolated from coffee bean grown on cheese whey. *World J Microb Biotechnol* 24:2027–2034

- Duran, K., Bozacı, E., Karahan, A.H. 2007. Protein Esaslı Mamüllerin Enzimatik Ön Terbiyesi. Ege Üniversitesi Tekstil Mühendisliği Bölümü, Tekstil ve Konfeksiyon, 1-8.
- El-Bendary, M.A., Moharam, M. E., Ali, T.H. 2007. Purification and Characterization of milk clotting enzymes produced by *Bacillus sphaericus*. Journal of Applied Sciences Research, 8, 695–699.
- Elela, G.M.A., Ibrahim, H. A. H., Hassan, S.W., HananAbd-Elnaby, H.A., El-Toukhy, N.M.K. 2011. Alkaline protease production by alkaliphilic marine bacteria isolated from Marsa-Matrouh (Egypt) with special emphasis on *Bacillus cereus* purified protease. African Journal of Biotechnology 10(22): 4631-4642.
- El-Hassayeb, H.E.A., Abdel Aziz, S.M.Z. 2016. Screening, Production and Industrial Application of Protease Enzyme from Marine Bacteria. Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci, 1(4), 33-41.
- Ellaiah, P., Srinivasulu, B., Adinarayana, K. 2002. A review on microbial alkaline proteases. J Sci Ind Res 61: 690-704.
- Erkmen, O. 2010(ed). “Gıda Mikrobiyolojisi.” 4. Baskı, Efil Yayınevi, Ankara. pp. 14-15.
- Farhadian, S., Asoodeh, A., Lagzian, M. 2015. Purification, biochemical characterization and structural modeling of a potential htrA-like serine protease from *Bacillus subtilis* DR8806. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 115, 51-58. doi:10.1016/j.molcatb.2015.02.001
- Gaur, R., Tiwari, S., Singh, S. 2015. Production and characterization of thermotolerant-organic solvent resistant acidic protease by *Pseudomonas aeruginosa* RGSS-09 isolated from dairy sludge. Asian J. Biochem. 10:52–66.
- Giovanni, M. 1983. Response surface methodology and product optimization. Food Technology, 3741, 45.
- Giri, S.S., Sukumaran, V., Sen, S.S., Oviya, M., Banu, B.N., Jena, P.K. 2011. Purification and partial characterization of a detergent and oxidizing agent stable alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* VSG-4 of tropical soil. The Journal of Microbiology, 49(3), 455–461. doi:10.1007/s12275-011-0427-4
- Godfrey, TA., Reichelt, J. 1985. Industrial enzymology: The application of enzymes in industry. The Nature Press. London.
- Goud, M.J.P., Suryam, A., Lakshmi pathi, V., Singara Charya, M.A. 2009. Extracellular hydrolytic enzyme profiles of certain South Indian basidiomycetes. Afr J Biotechnol. 8:354–60.
- Gökalp, H.Y., Yanar, M. 1986. Kan ve ürünlerinin insan gıdası olarak işlenmesi. Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarım Ürünleri Bölümü, Erzurum.
- Görmez, A., Gülmüş E. 2018. *Bacillus pumilus* NK14 İzolatının Proteaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi ve Enzimin Leke Çıkarıcı Etkisinin Tespiti 2(2), 07-12.

- Greasham, R.L. 1983. Biotechnology. In: Rehm, H.J., Read, G., Puhler, A., Stagler, P. (Eds.), Bioprocessing. VCH Publishers, New York, USA, pp. 128–139
- Guleria, S., Walia, A., Chauhan, A., Shirkot, C.K. 2016. Purification and characterization of detergent stable alkaline protease from *Bacillus amyloliquefaciens* SP1 isolated from apple rhizosphere. J. Basic Microbiol. 56, 138–152.
- Guo, Y., Xu, J., Zhang, Y., Xu, H., Yuan, Z., Li, D. 2010. Medium optimization for ethanol production with *Clostridium autoethanogenum* with carbon monoxide as sole carbon source. Bioresour Technology. 101:8784–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.072>.
- Gupta, R., Beg, Q.K., Khan, S., Chauhan, B. 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. Appl Microbiol Biotechnol. 59(1):15–32
- Gupte, M., Kulkarni, P. 2003. A study of antifungal antibiotic production by *Thermomonospora* sp. MTCC 3340 using full factorial design. J Chem Technol Biotechnol 78: 605-610
- Gurung, N., Ray, S., Bose, S., Rai, V. 2013. A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond. BioMed Research International, 2013, 1–18.
- Haddar, A., Agrebi, R., Bougatef, A., Hmide, N., Sellami-Kamoun, A., Nasri, M. 2009. Two detergent stable alkaline serine-proteases from *Bacillus mojavensis* A21: purification, characterization and potential application as a laundry detergent. Bioresour. Technol. 100, 3366-3373.
- Haddar, A., Fakhfakh-Zouari, N., Hmidet, N., Frikha, F., Nasri, M., Kamoun, A. S. 2010. Low-cost fermentation medium for alkaline protease production by *Bacillus mojavensis* A21 using hulled grain of wheat and sardinella peptone. Journal of Bioscience and Bioengineering, 110(3), 288–294.
- Hadj-Ali, N.E., Agrebi, R., Ghorbel-Frikha, B., Sellami-Kamoun, A., Kanoun, S., Nasri, M. 2007. Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus licheniformis* NH1. Enzyme and Microbial Technology, 40(4), 515–523. doi:10.1016/j.enzmictec.2006.05.007
- Hadjidj, R., Badis, A., Mechri, S., Eddouaouda, K., Khelouia, L., Annane, R., El Hattab, M., Jaouadi, B. 2018. Purification, biochemical, and molecular characterization of novel protease from *Bacillus licheniformis* strain K7A. International Journal of Biological Macromolecules, 114, 1033–1048. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.03.167
- Hajji, M., Kanoun, S., Nasri, M., Gharsallah, N. 2007. Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by a new isolated *Aspergillus clavatus* ES1. Process Biochem. 42, 791–797.

- Hajji, M., Rebai, A., Gharsallah, N., Nasri, M. 2008. Optimization of alkaline protease production by *Aspergillus clavatus* ES1 in *Mirabilis jalapa* tuber powder using statistical experimental design. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79, 915–923.
- Hakim, A., Bhuiyan, F.R., Iqbal, A., Emon, T.H., Ahmed, J., Azad, A.K. 2018. Production and partial characterization of dehairing alkaline protease from *Bacillus subtilis* AKAL7 and *Exiguobacterium indicum* AKAL11 by using organic municipal solid wastes. *Heliyon*, 4(6), e00646.
- Hammami, A., Hamdi, M., Abdelhedi, O., Jridi, M., Nasri, M., Bayouhd, A. 2017. Surfactant- and oxidant-stable alkaline proteases from *Bacillus invictae* : Characterization and potential applications in chitin extraction and as a detergent additive. *International Journal of Biological Macromolecules*, 96, 272–281. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.12.035
- Hamza, T.A. 2017. Bacterial Protease Enzyme: Safe and Good Alternative for Industrial and Commercial Use. *International Journal of Chemical and Biomolecular Science* 3 (1), 1-10.
- Hassan, M.A., Haroun, B.M., Amara, A.A., Serour, E.A. 2013. Production and Characterization of Keratinolytic Protease from New Wool-Degrading *Bacillus* Species Isolated from Egyptian Ecosystem. *BioMed Research International*, 1-14. doi:10.1155/2013/175012
- Hindhumathi, M., Vijayalakshmi, S., Thankamani, V. 2011. Optimization and cultural characterization of alkalophilic protease producing *Bacillus* sp. GPA4. *Research in Biotechnology*; 2 (4): 13- 19.
- Horikoshi, K., Tobe, S., Takami, T., Hirose, Y., Mitsugi, K. 1975. Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms. Part. I. Alkaline protease produced by *Bacillus*, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 39, 1749–1755.
- Hussain, F., Kamal, S., Rehman, S., Azeem, M., Bibi, I., Ahmed, T., Iqbal, H.M.N. 2017. Alkaline Protease Production Using Response Surface Methodology, Characterization and Industrial Exploitation of Alkaline Protease of *Bacillus subtilis* sp. *Catalysis Letters*, 147(5), 1204–1213.
- Ibrahim, A.S.S., Al-Salamah, A.A., Elbadawi, Y.B., El-Tayeb, M.A., Ibrahim, S.S.S. 2015. Production of extracellular alkaline protease by new halotolerant alkaliphilic *Bacillus* sp. NPST-AK15 isolated from hyper saline soda lakes. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18(3), 236–243.
- Ihns, D.A., Schmidt, W., Richter, F.R. 1999. Proteolytic enzyme cleaner. U.S. Patent 5,861,366.
- Iqbal, M., Asgher, M., Bashir, F. 2018. Purification and Kinetic Characterization of Alkaline Protease for UV-90 Mutant of *Bacillus Subtilis*. *J. Biochem Analyt Stud* 3(1): dx.doi.org/10.16966/2576-5833.112
- Ishikawa, H., Ishimi, K., Sugiura, M., Sowa, A., Fujiwara, N. J. 1993. Kinetics and mechanism of enzymatic hydrolysis of gelatin layers of X-ray film and release of silver particles. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, vol. 76, no. 4, p. 300-305.

- Izmirlioglu, G., Demirci, A. 2016. Improved simultaneous saccharification and fermentation of bioethanol from industrial potato waste with co-cultures of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* by medium optimization. *Fuel*, 185, 684–691. doi:10.1016/j.fuel.2016.08.035
- Jani, S.A., Parekh, Y.M., Parmar, T.N., Dalwadi, T.J., Patel, H.B., Parmar, S.K. 2016. Screening and characterization of alkaline protease producing *Bacillus* strain B-4 *Bacillus flexus* and study of its potential for alkaline protease production. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*, 5:767-787.
- Josephine, F.S., Ramya, V.S., Neelam, D., Ganapa, S.B., Siddalingeshwara, K.G., Venugopal, N., Vishwanatha T. 2012. Isolation production and characterization of protease from *Bacillus* sp. isolated from soil sample. *J Microbiol Biotech Res*. 2(1): 163-168.
- Kandasamy, S., Muthusamy, G., Balakrishnan, S., Duraisamy, S., Thangasamy, S., Seralathan, K.K., Chinnappan, S. 2016. Optimization of protease production from surface-modified coffee pulp waste and corncobs using *Bacillus* sp. by SSF. *3 Biotech*, 6, 167. doi.org/10.1007/s13205-016-0481-z
- Kazan, D., Denizci, A.A., Öner, M.N.K., Erarslan, A. 2005. Purification and characterization of a serine alkaline protease from *Bacillus clausii* GMBAE 42. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32(8), 335–344. doi:10.1007/s10295-005-0260-z
- Keskin, H., 1987. “Besin Kimyası”, Güryay Matbaacılık Tic. Ltd. Sti, İstanbul, 49- 51.
- Kim, J.K., Oh, B.R., Shin, H.J., Eom, C.Y., Kim, S.W. 2008. Statistical optimization of enzymatic saccharification and ethanol fermentation using food waste. *Process Biochemistry*. 43:1308–12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.07.007>.
- Kirk, O., Borchert, T.V., Fuglsang, C.C. 2002. Industrial enzyme applications. *Curr Opin Biotechnol*; 13:345–351.
- Kumar, C.G., Takagi, H. 1999. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances*, 17:561-594.
- Kumar, S., Sharma, N.S., Saharan, M.R., Singh, R. 2005. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: Purification and characterization. *Process Biochemistry*, 40, 1701–1705.
- Kumar, T, Borah D. 2012. Process optimization, partial purification and characterization of protease enzyme from *Bacillus altitudinis* (MCCB0014). *Academic Sciences*. 4:3.
- Kumari, D., Sharma, N., Pandove, G., Achal, G. 2009. Alkaline protease production by immobilized cells of *Bacillus pumilis* MTCC 2296 in various matrices. *Life Science Journal*, 6:8-10.
- Lakshmi, B.K.M., Hemalatha, K.P.J. 2015. Response surface optimization of medium composition for alkaline protease production by *Bacillus cereus* strain S8. *Int J Pure App Biosci* 3: 216-223.

- Lakshmi, B.K.M., Ratnasri, P.V., Ambika Devi, K., Hemalatha, KP.J. 2014. Screening, Optimization Of production and partial characterization of alkaline protease from haloalkaliphilic *Bacillus* sp. International Journal of Research in Engineering and Technology, (3): Issue: 02
- Li, Y., Lin, J., Meng, D.J. 2006. Effect of pH, cultivation time and substrate concentrations on the endoxylanase production by *A. awamori* ZH-26 under submerged fermentation using central composite rotary design. Food Technol Biotechnol 44: 473-477.
- Li, Y., Liu, Z., Cui, F., Liu, Z., Zhao, H. 2007. Application of Plackett-Burman design and Doehlert design to evaluate nutritional requirements for xylanase production by *Alternaria mali* ND-16. Appl Microbiol Biotechnol 77: 285-291
- Li, Z., H-Kittikun, A., Youravong, W. 2009. Purification of protease from pretreated tuna spleen extract by ultrafiltration: an altered operational mode involving critical flux condition and diafiltration. Separation and Purification Technology; 66: 368–374.
- Lombardi, J., Woitovich Valetti N., Picó, G., Boeris, V. 2013. Obtainment of a highly concentrated pancreatic serine proteases extract from bovine pancreas by precipitation with polyacrylate. Separation and Purification Technology; 116: 170–174.
- Lotfy, W.A., Ghanem, K.M., El-Helow, E.R. 2007. Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate: II. Optimization of process parameters through statistical experimental designs, Bioresource Technology, vol. 98, no. 18, pp. 3470– 3477.
- Maase, F.W.J.L., Van Tilburg, R. 1983. The benefit of detergent enzymes under changing washing conditions. J. Am. Oil Chem. Soc., 60: 1672-1675.
- Mala, M., Srividya, S. 2010. Partial purification and properties of a laundry detergent compatible alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* species Y. Indian Journal of Microbiology. 50, 309–317.
- Manni, L., Jellouli, K., Ghorbel-Bellaaj, O., Agrebi, R., Haddar, A., Sellami-Kamoun, A., Nasri, M. 2009. An Oxidant- and Solvent-Stable Protease Produced by *Bacillus cereus* SV1: Application in the Deproteinization of Shrimp Wastes and as a Laundry Detergent Additive. Applied Biochemistry and Biotechnology, 160(8), 2308–2321. doi:10.1007/s12010-009-8703-z
- Marathe, S.K., Vashistht, M. A., Prashanth, A., Parveen, N., Chakraborty, S., Nair, S.S. 2018. Isolation, partial purification, biochemical characterization and detergent compatibility of alkaline protease produced by *Bacillus subtilis*, *Alcaligenes faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* obtained from sea water samples. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 16(1), 39–46. doi:10.1016/j.jgeb.2017.10.001

- Masui, A., Fujiwara, N., Takagi, M. Imanaka, T. 1999. Feasibility study for decomposition of gelatin layers on X-ray films by thermostable alkaline protease from alkaliphilic *Bacillus* sp. *Biotechnological Techniques*, 13:813-815.
- Merheb-Dini, C., Gomes, E., Boscolo, M., da Silva, R. 2010. Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. *Food Chemistry*, 120(1), 87–93.
- Mishra, V.K. 2016. Optimization of thermotolerant alkaline protease production from *Brevibacillus brevis* strain BT2 using surface response methodology. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 7, 87-94.
- Mohana, S., Shah, A., Divecha, J., Madamwar, D. 2005. Xylanase Production by *Burkholderia* sp. DMAX Strain Under Solid State Fermentation Using Distillery Spent Wash. *Bioresource Technol.* 99, 7553–7564.
- Moharam, M.E., El-Bendary, M.A., El-Beih, F., Hassnin, S.M., Abo Elsoud, M.M., Azzam, M.I., Elgamal, N.N. 2019. Optimization of fibrinolytic enzyme production by newly isolated *Bacillus subtilis* Egy using central composite design. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 17,43-50. doi:10.1016/j.bcab.2018.11.003
- Molnárova, J., Vadkertiová, R., Stratilová, E. 2014. Extracellular enzymatic activities and physiological profiles of yeasts colonizing fruit trees. *J. Basic Microbiol.* 51, S74–S84.
- Mukesh Kumar, D.J., Venkatachalam, P., Govindarajan, N., Balakumaran, M.D., Kalaichelvan, P.T. 2012. Production and purification of alkaline protease from *Bacillus* sp. MPTK 712 isolated from dairy sludge. *Global Veterinaria*, 8(5): 433–439
- Nadeem, M., Qazi, J., Syed, Q., Baig, S. 2008. Optimization of Process Parameters for Alkaline Protease Production by *Bacillus licheniformis* N-2 and Kinetics Studies in Batch Fermentation. *Turkish Journal of Biology*, 32 (4) , 243-251.
- Najafi, M.F. 2005. Potential application of protease isolated from *Pseudomonas aeruginosa* PD100. *Electronic Journal of Biotechnology*, 8:197-203.
- Nájera, A.I., de Renobales, M., Barron, L.J.R. 2003. Effects of pH, temperature, CaCl₂ and enzyme concentrations on the rennet-clotting properties of milk: a multifactorial study. *Food Chemistry*, 80(3), 345–352. doi:10.1016/s0308-8146(02)00270-4
- Nascimento, W.C.A.do, Martins, M.L.L. 2004. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35(1-2), 91–96. doi:10.1590/s1517-83822004000100015
- Nassar, F.R., Abdelhafez, A.A., El-Tayeb, T.S., Abu-Hussein, S.H. 2015. Purification, Characterization and Applications of Proteases Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* 35s Isolated from Soil of the Nile Delta of Egypt. *British Microbiology Research Journal*, Vol. 6(5), pp. 286-302.

- Nazari, L., Mehrabi, M. 2019. Purification and characterization of an extracellular thermotolerant alkaliphilic serine protease secreted from newly isolated *Bacillus* sp. DEM07 from a hot spring in Dehloran, Iran. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 18:101053. doi:10.1016/j.bcab.2019.101053
- Nduka, O. 2007. *Modern industrial microbiology and biotechnology: biocatalysts: immobilized enzymes and immobilized cells*. Published by Science Publishers, South Carolina, USA, 398-416.
- Nehra, K.S., Dhillon, S., Chaudhary, K., Singh, R. 2002. Production of alkaline protease by *Aspergillus* species under submerged and solid state fermentation. *Ind.J. Microbiol.* 42, 43-47.
- Nelson, D.L., Cox, M.M. 2005. "Principles of Biochemistry", Fourth edition, W. H. Freeman and Company, New York, 192.
- Niyonzima, F.N., More, S. 2014. Detergent-Compatible Proteases: Microbial Production, Properties, and Stain Removal Analysis. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 45(3), 233–258. doi:10.1080/10826068.2014.907183
- Ogrydziak, D.M. 1993. Yeast Extracellular Proteases. *Crit. Rev. Biotechnol.* 13, 1–55.
- Okafor, N. 2007. *Modern industrial microbiology and biotechnology*. SRS Press, Boca Raton, p: 4-5, 398-399.
- Olajuyigbe, F.M., Falade, A.M. 2014. Purification and partial characterization of serine alkaline metalloprotease from *Bacillus brevis* MWB-01. *Bioresources and Bioprocessing*, 1:8. doi:10.1186/s40643-
- Olajuyigbe, F.M., Ajele, J.O. 2005. Production dynamics of extracellular protease from *Bacillus* species. *Afr. J. Biotechnol.* 4 (8), 776.
- Olajuyigbe, F.M., Ajele, J.O. 2008. Some properties of extracellular protease from *Bacillus licheniformis* lbbl-11 isolated from "iru", a traditionally fermented African locust bean condiment. *Global J Biotechno Biochem.* 3(1):42–46.
- Olajuyigbe, F.M., Kolawole, A.O. 2011. Purification and partial characterization of a thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* LHSB-05 isolated from hot spring. *Afr J Biotechnol* 10:11703–11710
- Olajuyigbe, F.M., Ogunyewo, A.O. 2013. Enhanced Production and Physicochemical Properties of a Commercially Viable Alkaline Protease from *Bacillus amyloliquefaciens* PFB-01. *Current Biotechnology*, 2(1), 73–80. doi:10.2174/2211550111302010012
- Olivera, N., Sequeiros, C., Siñeriz, F., Breccia, J. D. 2006. Characterization of alkaline proteases from a novel alkali-tolerant bacterium *Bacillus patagoniensis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(7), 737–743.
- Oskouie, S.F.G., Tabandeh, F., Yakhchali, B., Eftekhari, F. 2008. Response surface optimization of medium composition for alkaline protease production by *Bacillus clausii*. *Biochem. Eng. J.* 39, 37–42. doi.org/10.1016/j.bej.2007.08.016.

- Outtrup, H., Dambmann, C., Christiansen, M., Aaslyng, D.A. 1995. Alkaline protease *Bacillus* sp. JP 395, method of making and detergent compositions. U.S. Patent No. 5466594, November 14. www.google.com/patents/US5466594
- Özcan, Ö., Gültepe, M., İpçioğlu, O.M., Bolat, B., Kayadibi, H. 2007. Prolidazın Mutlak Aktivitesini Değerlendirmede Fotometrik Enzim Aktivitesi Ölçüm Metodunun Optimizasyonu. Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem] 2007; 32 (1) ; 12–16.
- Özden, S. 2014. *Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'den proteaz enziminin saflaştırılması, aktivitesinin tayini ve karakterizasyonu. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- Patel, R., Dodia, M., Singh, S.P. 2005. Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp.: Production and optimization. Process Biochemistry, 40(11), 3569–3575. doi:10.1016/j.procbio.2005.03.049
- Patel, R.K., Dodia, M.S., Joshi, R.H., Singh, S.P. 2006. Purification and characterization of alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp. Proc Biochem 41: 2002-2009.
- Pathak, A.P., Deshmukh, K.B. 2012. Alkaline protease production, extraction and characterization from alkaliphilic *Bacillus licheniformis* KBDL4: A Lonar Soda Lake isolate. Indian Journal of Experimental Biology, 50:569-576.
- Pires, M.S., Orellana, G.A., Gatti, C.A. 1999. Rennet coagulation of casein micelles and heated casein micelles: Action of Ca²⁺ and pH. Food Hydrocolloids, 13, 235–238.
- Polaina, J., MacCabe, A.P. 2007. Industrial Enzymes Structure, Function and Applications. Springer, 161-243, Spain.
- Polatoğlu, İ. 2016. Tirozinaz Enzim Aktivitesi Üzerine Reaksiyon Parametre Etkilerinin UV Spektrofotometre ile Yerinde Analiz Edilmesi. CBÜ Fen Bil. Dergi. Cilt 12, Sayı 2, 319-325 s.
- Poldermans, B. 1990. Proteolytic Enzymes. In: Proteolytic Enzymes in Industry: Production and Applications, W. Gerhartz (Ed.), VCH Publishers, Weinheim, Germany, pp. 108–123.
- Prabhavathy, G., Rajasekara, M., Pandian, S., Senthilkumar, B. 2013. Identification of industrially important Alkaline protease producing *Bacillus subtilis* by 16s rRNA sequence analysis and its applications. Journal of Research in Pharma and Biomedical Science, 1:332-338.
- Puri, S., Beg, Q.K., Gupta, R. 2002. Optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. by response surface methodology. Current Microbiology 44:286-290. doi:10.1007/s00284-001-0006-8
- Queiroga, A.C., Pintado, M.E., Malcata, F.X. 2012. Use of response surface methodology to optimize protease synthesis by a novel strain of *Bacillus* sp. isolated from Portuguese sheep wool. Journal of Applied Microbiology. 113(1):36-43

- Rao, K., Narasu, L.M. 2007. Alkaline protease from *Bacillus firmus* 7728. African Journal of Biotechnology, 6:2493-2496.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiology and Molecular Biology Research, 62(3):597-635.
- Rao, S., Sathish, T., Ravichandra, P., Prakasham, R. 2009. Characterization of thermo- and detergent stable serine protease from isolated *Bacillus circulans* and evaluation of eco-friendly applications. Process Biochemistry, 44, 262–268.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J. 1993. Evolutionary families of peptidases. Biochem. J. 290:205–218.
- Ray, M.K., Devi, K.U., Kumar, G.S., Shivaji, S. 1992. Extracellular protease from the antarctic yeast *Candida humicola*, J. Appl. Environ. Microbiol. 58 (6) 1918–1923
- Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A., Ashraf, M. 2019. Microbial Proteases Applications. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 7. doi:10.3389/fbioe.2019.00110
- Reddy, L., Wee, Y.J., Ryu, H.W. 2008. Purification and characterization of an organic solvent and detergent-tolerant novel protease produced by *Bacillus* sp. RKY3. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 83(11), 1526–1533.
- Reid, V.J., Theron, L.W., du Toit, M., Divol, B. 2012. Identification and partial characterization of extracellular aspartic protease genes from *Metschnikowia pulcherrima* IWBT Y1123 and *Candida apicola* IWBT Y1384. Appl. Environ. Microbiol., 78(19), 6838-6849.
- Rekik, H., Jaouadi, N.Z., Gargouri, F., Bejar, W., Frikha, F., Jmal, N., Bejar, S., Jaouadi, B. 2018. Purification and biochemical characterization of a novel detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus safensis* strain RH12. Int. J. Biol. Macromol. 121, 1227-1239.
- Rupali, D. 2015. Screening and isolation of protease producing bacteria from soil collected from different areas of Burhanpur Region (MP) India. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 4(8):597-606.
- Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G., Pandey, A. 2005. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. Process Biochem. 40, 2689– 2694.
- Sarı, E. 2011. *Bacillus Circulans* M34'ten Proteaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- Sarı, E., Loğoğlu, E., Öktemer, A. 2015. Purification and characterization of organic solvent stable serine alkaline protease from newly isolated *Bacillus circulans* M34. Biomedical Chromatography, 29(9), 1356–1363. doi:10.1002/bmc.3431

- Sathya, R., Pradeep, B. V., Angayarkanni, J., Palaniswamy, M. 2009. Production of milk clotting protease by a local isolate of *Mucor circinelloides* under SSF using agro-industrial wastes. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14(6), 788–794.
- Saxena, R.K., Davidson, W.S., Gupta, R. 1999. Microbial enzymes for detergent application. In: *Advances in microbial biotechnology*, Eds. Tewari JP, Lakhanpal TN, Singh J, Gupta R, Chamola BP. New Delhi, A.P.H. Publishing Corporation, 77–91.
- Schallmeyer, M., Singh, A., Ward, O.P. 2004. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology*, 50(1), 1–17. doi:10.1139/w03-076
- Schlander, M., Distler, U., Tenzer, S., Thines, E., Claus, H. 2017. Purification and properties of yeast proteases secreted by *Wickerhamomyces anomalus* 227 and *Metschnikovia pulcherrima* 446 during growth in a white grape juice. *Fermentation*. 3(1),2. <https://doi.org/10.3390/fermentation3010002>.
- Schoemaker, H.E., Mink, D., Wubbolts, M.G. 2003. Dispelling the myths - Biocatalysis in industrial synthesis. *Science*; 299:1694–1697.
- Seangtumnor, N., Kantachote, D., Nookongbut, P., Sukhoom, A. 2018. The potential of selected purple nonsulfur bacteria with ability to produce proteolytic enzymes and antivibrio compounds for using in shrimp cultivation, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 14, (138-144).
- Sellami-Kamoun, A., Haddar, A., Ali, N.E.H., Ghorbel-Frikha, B., Kanoun, S., Nasri, M. 2008. Stability of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* RP1 in commercial solid laundry detergent formulations. *Microbiological Research*, 163(3), 299.
- Selvam, K., Selvankumar, T., Rajiniganth, R., Srinivasan, P., Sudhakar, C., Senthilkumar, B., Govarthanam, M. 2016. Enhanced production of amylase from *Bacillus* sp. using groundnut shell and cassava waste as a substrate under process optimization: Waste to wealth approach. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 7, 250-256. doi:10.1016/j.bcab.2016.06.013
- Shah, K., Mody, K., Keshri, J., Jha, B. 2010. Purification and characterization of a solvent, detergent and oxidizing agent tolerant protease from *Bacillus cereus* isolated from the Gulf of Khambhat. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 67(1-2), 85–91. doi:10.1016/j.molcatb.2010.07.010
- Shankar, S., More, S.V. Seeta, L.R. 2010. Recovery of silver from waste x-ray film by alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*. *Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology*, 6:60-69.
- Shankar, S., Rao, M., Laxman, R.S. 2011. Purification and characterization of an alkaline protease by a new strain of *Beauveria* sp. *Proc Biochem* 46: 579-585

- Sharma, M., Gat, Y., Arya, S., Kumar, V., Panghal, A., Kumar, A. 2019. A Review on Microbial Alkaline Protease: An Essential Tool for Various Industrial Approaches. *Industrial Biotechnology*, 15(2), 69–78. doi:10.1089/ind.2018.0032
- Shieh, C.J., Phan Thi, L.A., Shih, I.L. 2009. Milk-clotting enzymes produced by culture of *Bacillus subtilis* natto. *Biochemical Engineering Journal*, 43(1):85–91.
- Shrinivas, D., Naik, G.R. 2011. Characterization of alkaline thermostable keratinolytic protease from thermoalkalophilic *Bacillus halodurans* JB 99 exhibiting dehairing activity. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 65(1).
- Singh, R., Mittal, A., Kumar, M., Mehta, P.K. 2016. Microbial proteases in commercial applications. *J Pharm Chem Biol Sci* 4: 365-374
- Singh, S., Bajaj, B.K. 2016. Bioprocess optimization for production of thermoalkali-stable protease from *Bacillus subtilis* K-1 under solid-state fermentation. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 46(7), 717–724. doi:10.1080/10826068.2015.1135455
- Singh, V., Haque, S., Niwas, R., Srivastava, A., Pasupuleti, M., Tripathi, C.K.M. 2017. Strategies for fermentation medium optimization: an in-depth review. *Front Microbiol* 7: 2087
- Sinha, R., Khare, S.K. 2013. Characterization of detergent compatible protease of a halophilic *Bacillus* sp. EMB9: Differential role of metal ions in stability and activity. *Bioresource Technology*, 145, 357–361. doi:10.1016/j.biortech.2012.11.024
- Sivaprakasam, S., Dhandapani, B., Mahadevan, S. 2011. Optimization studies on production of a salt-tolerant protease from *Pseudomonas aeruginosa* strain BC1 and its application on tannery saline wastewater treatment. *Brazilian Journal Microbiology*, (42): 1506-1515.
- Sjodahl, J., Emmer, A., Vincent, J., Roeraade, J. 2002. Protein expression and purification. 26, 153–161.
- Sousa, M.J., Malcata, F.X. 2002. Advances in the role of a plant coagulant (*Cynara cardunculus*) in vitro and during ripening of cheeses from several milk species. *Lait* 82: 151-170.
- Spinosa, M.R., Braccinia, T., Ricca, E., De Felice, M., Morellic, L., Pozzia, G. 2000. On the fate of ingested *Bacillus* spores. *Res. Microbiol.* 151: 361-368
- Suberu, Y., Akandea, I., Samuela, T., Lawal, A., Olaniran, A. 2019. Optimization of protease production in indigenous *Bacillus* species isolated from soil samples in Lagos, Nigeria using response surface methodology. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 18: 101011.

- Sugumaran, K.R., Ponnusami, V., Gowdhaman, D., Gunasekar, V., Srivastava, S.N. 2012. Thermo stable alkaline protease production from *Bacillus thuringiensis* MTCC 1953: optimisation and kinetic studies. *International Journal of ChemTech Research*, vol. 4, no. 1, pp. 198–202.
- Sümengen, M., Dinçer, S., Ünal, M.Ü. 2016. *Bacillus Subtilis* Kullanılarak Atık Ekmeklerden Alkali Proteaz ve Biyosüpfektan Üretimi, Ç.Ü. Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, Cilt:34-6
- Theron, L.W., Divol, B. 2014. Microbial aspartic proteases: Current and potential applications in industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 8853–8863.
- Thomas, N.N., Archana, V., Shibina, S., Edwin, B.T. 2020. Isolation and characterization of a protease from *Bacillus* sps. *Materials Today: Proceedings*. (Basım Aşamasında) doi:10.1016/j.matpr.2020.05.435.
- URL-1, www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/industrial-enzymes-market-237327836.html?gclid=Cj0KCQjwzbv7BRDIARIsAM-A6-3IFQOsUz6WwrsMFIDTEm9u9f-9Uw_gKlR4K8nzsxJVY40wgV8FQaQaAuD1EALw_wcB, Erişim Tarihi: 26.09.2020.
- Vadlamani, S., Parcha, S.R. 2011. Studies on industrially important alkaline protease production from locally isolated superior microbial strain from soil microorganisms. *International Journal of Biotechnological Applications*, 3:102-105.
- Venugopal, M., Saramma, A. 2007. An alkaline protease from *Bacillus circulans* BM15, newly isolated from a mangrove station: characterization and application in laundry detergent formulations. *Indian J. Microbiol.* 47 (4), 298e303.
- Verma, T., Baiswar, V. 2013. Isolation and characterization of extracellular thermoalkaline protease producing *Bacillus cereus* isolated from treated tannery effluent. *The International Journal of Engineering and Science*, (2): 23-29
- Vijayaraghavan, P., Prakash Vincent, S.G. 2015. A low cost fermentation medium for potential fibrinolytic enzyme production by a newly isolated marine bacterium, *Shewanella* sp. IND20. *Biotechnology Reports*, 30;7:135-142.
- Vijayaraghavan, P., Vijayan, A., Arun, A., Jenisha, J.K., Vincent, S.G.P. 2012. Cow dung: a potential biomass substrate for the production of detergent-stable dehairing protease by alkaliphilic *Bacillus subtilis* strain VV. *SpringerPlus* 1(1), 76. doi.org/10.1186/2193-1801-1-76.
- Vishalakshi, N., Lingappa, K., Amena, S., Prabhakar, M., Dayanand, A. 2009. Production of alkaline protease from *Streptomyces gulbargensis* and its application in removal of stains. *Indian J Biotechnol.* 8: 280-285.
- Vohra, A., Satyanarayana, T. 2002. Statistical optimization of medium components by response surface methodology to enhance phytase production by *Pichia anomala*, *Process Biochemistry.* 37(9), 999–1004.

- Wandersman, C. 1989. Secretion, processing and activation of bacterial extracellular proteases. *Mol. Microbiol.* 3: 1825-1831
- Wang, S.L., Wu, Y.Y., Liang, T.W. 2011. Purification and biochemical characterization of a nattokinase by conversion of shrimp shell with *Bacillus subtilis* TKU007. *New Biotechnology*, 28(2), 196–202. doi:10.1016/j.nbt.2010.09.003
- Wang, Y., Wang, Q., Wang, Y., Han, H., Hou, Y., Shi, Y. 2017. Statistical optimization for the production of recombinant cold-adapted superoxide dismutase in *E. coli* using response surface methodology. *Bioengineered* 8, 693–699. <https://doi.org/10.1080/21655979.2017.1303589>
- Ward, O.P. 2011. Proteases. In: Moo-Young M (Ed.), *Comprehensive Biotechnology*, 2nd edr ed, Waterloo, Canada, pp. 571-582
- Wolff, A.M., Showell, M.S., Venegas, M.G., Barnett, B.L., Wertz, W.C. 1996. Laundry Performance of Subtilisin Proteases. In: *Subtilisin Enzymes: Practical Protein Engineering*, Bott, R. and C. Betzel (Eds.). Plenum Press, New York, pp: 113-120.
- Xiao, Y.Z., Wu, D.K., Zhao, S.Y., Lin, W.M., Gao, X.Y. 2015. Statistical optimization of alkaline protease production from *Penicillium citrinum* YL-1 under solid-state fermentation. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 45, 447–462. <https://doi.org/10.1080/10826068.2014.923450>.
- Ya-Hong, X., Jian-Zhong, L., Hai-Yan, S., Liang-Nian, J. 2004. Enhanced production of extracellular ribonuclease from *Aspergillus niger* by optimization of culture conditions using response surface methodology. *Biochem. Eng. J.* 21, 27–32.
- Yan, S., Li, J., Chen, X., Wu, J., Wang, P., Ye, J. 2011. Enzymatical hydrolysis of food waste and ethanol production from the hydrolysate. *Renewable Energy*, 36(4):1259–1265. <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2010.08.020>.
- Yaşar, K., 2007. Farklı Pıhtılaştırıcı Enzim Kullanımının ve Olgunlaşma Süresinin Kaşar Peynirinin Özellikleri Üzerine Etkisi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 41-42s.
- Yusoff, N., Ibrahim, N.A. 2012. Thermostable alkaline serine protease from thermophilic *Bacillus* species. *International Research Journal of Biological Sciences*, 2 (2). pp. 29-33. ISSN 2278-3202
- Zhong, K., Wang, Q. 2010. Optimization of ultrasonic extraction of polysaccharides from dried longan pulp using response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 80(1), 19–25. doi:10.1016/j.carbpol.2009.10.066
- Zhu, Z., Zhang, G., Luo, Y., Ran, W., Shen, Q. 2012. Production of Lipopeptides by *Bacillus amyloliquefaciens* XZ-173 in Solid State Fermentation Using Soybean Flour and Rice Straw as the Substrate. *Bioresource Technology*. 112, 254–260.

ÖZGEÇMİŞ

Selin DEMİR 25.05.1994 yılında Kaman/Kırşehir’de doğdu. İlk ve orta öğrenimini Bakırköy İlköğretim Okulu, liseyi ise Yahya Kemal Beyatlı Anadolu Lisesi’nde, İstanbul’da tamamladı. 2013 yılında Manisa Celal Bayar Üniversitesi’nde Gıda Mühendisliği bölümünü kazandı. 2014 yılında Sakarya Üniversitesi Gıda Mühendisliği bölümüne yatay geçiş yaptı ve 06.06.2017 yılında mezun oldu. 4.sınıfın 2. döneminde Sakarya Üniversitesi Eğitim Bilimleri Fakültesi’nde Gıda Teknolojisi alanında Pedagojik Formasyon eğitime başlayarak 17.01.2018 yılında eğitim sertifikasını aldı. 18.07.2018 yılında Sakarya Üniversitesi Gıda Mühendisliği bölümünde yüksek lisans yapmaya başladı.