



***Exiguobacterium alkaliphilum* VLP1 TARAFINDAN  
ÜRETİLEN ALKALİ PROTEAZ ENZİMİNİN  
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE  
BİYOTEKNOLOJİK UYGULAMALARI**

**Asiye HEMŞİNLİ**

**Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Sümeyra GÜRKÖK  
Yüksek Lisans Tezi  
Biyoloji Anabilim Dalı  
2022**

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

***Exiguobacterium alkaliphilum* VLP1 TARAFINDAN ÜRETİLEN ALKALİ PROTEAZ  
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE  
BİYOTEKNOLOJİK UYGULAMALARI**

(Purification, Characterization and Biotechnological Applications of Alkali Protease Enzyme  
Produced by *Exiguobacterium alkaliphilum* VLP1)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Asiye HEMŞİNLİ

Danışman: Sümeyra GÜRKÖK

Erzurum  
Aralık, 2022

## KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Asiye HEMŞİNLİ tarafından hazırlanan “*Exiguobacterium alkaliphilum* VLP1 Tarafından Üretilen Alkali Proteaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulamaları” başlıklı çalışması 20 / 12 / 2022 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Biyoloji Ana Bilim Dalı, Genel Biyoloji Bilim Dalında Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Arzu GÖRMEZ  
*Dokuz Eylül Üniversitesi* Aslı ıslak imzalıdır

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Sümeyra GÜRKÖK  
*Atatürk Üniversitesi* Aslı ıslak imzalıdır

Jüri Üyesi: Doç. Dr. Murat ÖZDAL  
*Atatürk Üniversitesi* Aslı ıslak imzalıdır

Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../....  
tarih ve ..... sayılı kararı.

Aslı ıslak imzalıdır

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

**Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN**  
**Enstitü Müdürü**

## ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi olarak *Dr. Öğretim Üyesi Sümeyra Gürkök* danışmanlığında sunulan “*Exiguobacterium alkaliphilum* VLP1 Tarafından Üretilen Alkali Proteaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulamaları” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	0	30
Kuramsal Temeller	6	30
Materyal ve Yöntem	12	35
Araştırma Bulguları ve Tartışma	5	20
Sonuç ve Öneriler	4	20
Tezin Geneli	10	25

*Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'ten büyük olmaması gerekir.*

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Asiye HEMŞİNLİ	Dr. Öğretim Üyesi Sümeyra GÜRKÖK
20.12.2022	20.12.2022
İmza: Aslı ıslak imzalıdır	İmza: Aslı ıslak imzalıdır

\* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../.... Tarih ve ..... sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../.... tarih ve ..... sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitiminin ve tezimin her aşamasında fikirlerini, yardımını, tecrübelerini ve desteğini benden esirgemeyen değerli danışman hocam Dr. Öğretim Üyesi Sümeyra GÜRKÖK'e teşekkürlerimi sunarım. Laboratuvar çalışmalarımnda desteğinden yararlandığım sayın hocam Doç. Dr. Murat ÖZDAL'a teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, beni bugünlere getiren, hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini eksik etmeyen annem Nurgül Hemşinli, babam Zeki Hemşinli ve kardeşlerime teşekkürü bir borç bilirim.

Deneysel çalışmalarımın yürütülmesinde gerekli ekipman ve laboratuvar imkanlarını sunan Atatürk Üniversitesi Biyoloji Bölümü'ne teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, bu tez çalışmasını destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne (Proje No: FYL-2021-9280) teşekkürlerimi sunarım.

Asiye HEMŞİNLİ

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

#### ***Exiguobacterium alkaliphilum* VLP1 TARAFINDAN ÜRETİLEN ALKALİ PROTEAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BİYOTEKNOLOJİK UYGULAMALARI**

Asiye HEMŞİNLİ

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Sümeyra GÜRKÖK

**Amaç:** Bu tez çalışmasında, Van Gölü'nden alkali proteaz üretme potansiyeli yüksek olan bir bakterinin izolasyonu ve tanınması, bu izolattan alkali proteaz enziminin saflaştırılarak karakterize edilmesi, deterjan endüstrisinde ve tavuk tüylerinin parçalanmasında kullanım potansiyelinin araştırılması amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Van Gölü alkalifilik izolatları arasından en yüksek proteolitik aktiviteye sahip bakteri seçilmiş, klasik ve moleküler yöntemlerle tanınmıştır. Proteaz üretimi için optimum koşullar belirlenmiştir. Proteaz enzimi amonyum sülfatla çöktürme, ultrafiltrasyon ve iyon değişim kromatografisi ile saflaştırıldıktan sonra karakterize edilmiştir. Enzimin kumaşlardan kan lekelerini çıkarma ve proteolitik izolattan tavuk tüylerini parçalama potansiyeli araştırılmıştır.

**Bulgular:** Van Gölü izolatları arasından en yüksek proteolitik aktivite *Exiguobacterium alkaliphilum* VLP1 (GenBank Acc No: ON853834.1) ile elde edilmiştir. En yüksek proteaz üretimi 30 °C, pH 9,0, laktoz ve maya özütü varlığında, 2 günlük inkübasyon süresinde elde edilmiştir. Proteaz 45 kat, %6,4 verimle ve 1169 U/mg protein spesifik aktivite ile saflaştırılmış, moleküler ağırlığı 69 kDa,  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla 0,4 mM ve 2000 U/mg protein olarak bulunmuştur. Aktivite için optimum sıcaklık 40 °C ve pH 9,0 olarak belirlenmiş ve bu koşullarda enzimin kararlılığını uzun süre koruduğu gözlemlenmiştir. Enzimin çeşitli metal iyonları, reaktifler, çözücüler ve deterjanlar varlığında kararlı olduğu tespit edilmiştir. Alkali proteazın kumaş parçalarından kan lekelerini çıkarmada ve *E. alkaliphilum* VLP1'in tavuk tüylerini parçalamada etkin olduğu tespit edilmiştir.

**Sonuç:** Bu tez kapsamında, ilk kez *E. alkaliphilum* bakterisinden proteaz enzimi saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Alkali proteazın deterjan endüstrisinde ve tavuk tüyü parçalamada kullanılma potansiyeline sahip olduğu kanısına varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *Exiguobacterium alkaliphilum*, Alkali Proteaz, Protein Saflaştırma, Enzim Karakterizasyonu, Deterjan, Tavuk Tüyü Parçalama.

Aralık 2022, 99 sayfa

## ABSTRACT

### MASTER THESIS

#### PURIFICATION, CHARACTERIZATION AND BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS OF ALKALI PROTEASE ENZYME PRODUCED by *Exiguobacterium alkaliphilum* VLP1

Asiye HEMŞİNLİ

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Sümeyra GÜRKÖK

**Purpose:** In this thesis, isolation and identification of a bacterium with a high potential to produce alkaline protease from Lake Van, purification and characterization of the alkaline protease enzyme from this isolate, and investigation of its potential for use in the detergent industry and in the decomposition of chicken feathers were aimed.

**Method:** Among the alkaliphilic isolates of Lake Van, bacterium with the highest proteolytic activity was selected and identified by classical and molecular methods. Optimum conditions for protease production were determined. The protease enzyme was characterized after purification by precipitation with ammonium sulfate, ultrafiltration, and ion exchange chromatography. The potentials of the enzyme to remove bloodstains from fabrics and the proteolytic isolate to break down chicken feathers were investigated.

**Results:** Among the Van Lake isolates, the highest proteolytic activity was obtained with *Exiguobacterium alkaliphilum* VLP1 (GenBank Acc No: ON853834.1). The highest protease production was obtained at 30 °C, pH 9.0, 2 days incubation period in the presence of lactose and yeast extract. The protease was purified 45 fold, with 6.4% yield and 1169 U/mg protein specific activity, with a molecular weight of 69 kDa,  $K_m$  and  $V_{max}$  values of 0.4 mM and 2000 U/mg protein, respectively. The optimum temperature for the activity was determined as 40 °C and pH as 9.0 and it was observed that the enzyme remained stable under these conditions for a long time. The enzyme stability in the presence of various metal ions, reagents, solvents and detergents was determined. It has been found that alkaline protease is effective in removing blood stains from fabric pieces and *E. alkaliphilum* VLP1 in breaking down chicken feathers.

**Conclusion:** In this thesis, protease enzyme was purified and characterized for the first time from *E. alkaliphilum* bacteria. It has been concluded that alkaline protease has the potential to be used in the detergent industry and for decomposition of chicken feathers.

**Keywords:** *Exiguobacterium alkaliphilum*, Alkaline Protease, Protein Purification, Enzyme Characterization, Detergent, Chicken Feather Shredder.

December 2022, 99 pages

## İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xii
GİRİŞ.....	1
KURAMSAL TEMELLER.....	3
Enzimler .....	3
Proteazların Genel Özellikleri.....	4
Proteazların Sınıflandırılması.....	4
Etki alanlarına bağlı olarak proteazlar .....	5
Aktivite gösterdikleri pH aralığına bağlı olarak proteazlar.....	6
Proteaz Reaksiyon Mekanizması .....	7
Serin proteazların katalitik etki mekanizması .....	7
Sistein proteazların katalitik etki mekanizması.....	8
Aspartik proteazların katalitik etki mekanizması.....	8
Metalloproteazların katalitik etki mekanizması .....	8
Proteazların Kaynakları.....	9
Bitkisel proteaz üreticileri .....	9
Hayvansal proteaz üreticileri.....	9
Mikrobiyal proteaz üreticileri .....	9
Proteazların Endüstrideki Uygulama Alanları .....	11
Gıda endüstrisi .....	11
Deterjan endüstrisi .....	12
Deri endüstrisi .....	12
Gümüş geri kazanımı .....	13
Atık işleme endüstrisi.....	13
İlaç endüstrisi .....	14
Tekstil endüstrisi .....	14

Bakım ürünleri .....	14
Van Gölü .....	15
<i>Exiguobacterium alkaliphilum</i> .....	15
Proteaz Enzimiyle Daha Önce Yapılan Çalışmalar .....	16
MATERYAL VE YÖNTEM .....	18
Materyal .....	18
Mikroorganizmalar .....	18
Kullanılan cihazlar .....	18
Kullanılan kimyasallar .....	18
Kullanılan çözeltilerin ve tamponların hazırlanışları .....	19
Kullanılan besiyerleri .....	20
Yöntem .....	21
Bakterilerin izolasyonu ve saklanması .....	21
Kalitatif proteaz aktivite tayini .....	22
Kantitatif proteaz aktivite tayini .....	22
Tirozin standart grafiğinin hazırlanması .....	22
Bakterilerin tanılanması .....	23
En yüksek proteaz üreten bakteri izolatının çoğaltılması ve proteaz üretim koşullarının optimizasyonu .....	24
Enzimin saflaştırılması .....	26
Protein miktar tayini .....	27
Proteinlerin SDS-PAGE analizi .....	27
Saflaştırılmış proteaz enziminin karakterize edilmesi .....	29
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA .....	33
Bakterilerin İzolasyonu .....	33
Bakteri İzolatlarının Proteaz Aktivitelerinin Belirlenmesi .....	33
Bakteri İzolatlarının Kantitatif Proteaz Aktivite Tayini .....	33
Bakteri İzolatların Tanınması .....	34
İzolatların klasik yöntemlerle tanılanması .....	34
Moleküler yöntemlerle tanılama .....	36
<i>E. alkaliphilum</i> VLP1'in Proteaz Üretim Koşullarının ve Ortamının Optimizasyonu ...	36
İnkübasyon süresinin <i>E. alkaliphilum</i> VLP1'in proteaz üretimine ve gelişimine etkisi ..	37
İnkübasyon sıcaklığının <i>E. alkaliphilum</i> VLP1'in proteaz üretimine etkisi .....	37
Başlangıç pH'sının <i>E. alkaliphilum</i> VLP1'in proteaz üretimi ve gelişimi üzerine etkisi .....	38

Azot kaynaklarının <i>E. alkaliphilum</i> VLP1'in proteaz üretimi ve gelişimi üzerine etkisi .....	39
Karbon kaynaklarının <i>E. alkaliphilum</i> VLP1'in proteaz üretimi ve gelişimi üzerine etkisi .....	40
NaCl konsantrasyonunun <i>E. alkaliphilum</i> VLP1'in proteaz üretimi ve gelişimi üzerine etkisi .....	41
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> konsantrasyonunun proteaz üretimine ve mikrobiyal gelişim üzerine etkisi ....	42
Enzim Saflaştırma .....	43
Amonyum sülfat çöktürmesi ile kısmı saflaştırma.....	43
İyon değişim kromatografisi ile saflaştırma.....	43
SDS-PAGE analizleri ve proteaz enziminin moleküler kütesinin hesaplanması.....	44
Saflaştırılmış Proteaz Enziminin Karakterizasyonu.....	44
Proteaz enzim reaksiyonuna ait $K_m$ ve $V_{max}$ kinetik sabitlerinin saptanması .....	44
Enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi .....	45
<i>E. alkaliphilum</i> VLP1 proteaz enziminin sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi .....	46
Enzimin Optimum pH'sının Belirlenmesi .....	46
Enzimin pH stabilitesinin belirlenmesi .....	47
Metal iyonlarının proteaz enzimi üzerine etkisinin belirlenmesi .....	47
Reaktiflerin proteaz enzimi üzerine etkisinin belirlenmesi.....	48
Çeşitli organik çözücülerin proteaz enzimi üzerine etkisinin belirlenmesi .....	49
Ticari deterjanların proteaz enzimi üzerine etkisinin belirlenmesi .....	50
Ticari deterjanların proteaz enzim stabilitesi üzerine etkisinin belirlenmesi.....	50
Enzimin Biyoteknolojik Uygulamaları .....	51
Proteaz enziminin deterjan etkisinin araştırılması .....	51
Proteaz enziminin tavuk tüyü parçalama potansiyelinin araştırılması.....	52
Tartışma.....	54
SONUÇLAR.....	62
KAYNAKÇA .....	63
EKLER .....	74
EK 1. Tirozin Standart Grafiği.....	75
EK 2. Van Gölü Bakteri İzolatlarının 16S rRNA Sekans Dizileri.....	74
EK 3. BSA Standart Grafiği.....	75
EK 4. SDS-PAGE Analizleri .....	82
ÖZGEÇMİŞ.....	84

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> <i>E. alkaliphilum</i> Bilimsel Sınıflandırılması .....	16
<b>Tablo 2.</b> Ayırıcı Jel (%12,5) Hazırlanışı .....	28
<b>Tablo 3.</b> Yığma Jel (%7,5) Hazırlanışı .....	28
<b>Tablo 4.</b> Yıkama Solüsyonu Kompozisyonu .....	31
<b>Tablo 5.</b> Van Gölü İzolatlarının Özellikleri.....	36
<b>Tablo 6.</b> <i>E. alkaliphilum</i> VLP1'den Proteaz Enziminin Saflaştırma Basamakları.....	43



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Proteaz aktivite mekanizması.....	4
Şekil 2. Van Gölü bakteri izolatlarının SMA üzerinde 30 °C’de 2 günlük inkübasyon sonucu oluşturdukları şeffaf proteolitik zonlar .....	33
Şekil 3. Bakteri izolatlarının 3 günlük proteaz aktivite grafiği .....	34
Şekil 4. <i>E. alkaliphilum</i> VLP1 ’ in proteaz üretim ortamında 30 °C’de zamana karşı proteaz aktivite ve mikrobiyal gelişim grafiği. ....	37
Şekil 5. Sıcaklığın proteaz üretimi ve mikrobiyal gelişim üzerine etkisi.....	38
Şekil 6. pH’nın <i>E. alkaliphilum</i> VLP1’in proteaz üretimi ve mikrobiyal gelişimi üzerine etkisi .....	38
Şekil 7. Azot kaynaklarının <i>E. alkaliphilum</i> VLP1’in proteaz üretimi ve mikrobiyal gelişimi üzerine etkisi .....	39
Şekil 8. Maya özütü konsantrasyonlarının <i>E. alkaliphilum</i> VLP1’in proteaz üretimi ve gelişimi üzerine etkisi .....	40
Şekil 9. Karbon kaynaklarının <i>E. alkaliphilum</i> VLP1’in proteaz üretimi ve mikrobiyal gelişimi üzerine etkisi. ....	40
Şekil 10. Laktoz konsantrasyonlarının <i>E. alkaliphilum</i> VLP1’in proteaz üretimi ve gelişimi üzerine etkisi .....	41
Şekil 11. NaCl konsantrasyonlarının <i>E. alkaliphilum</i> VLP1’in proteaz üretimi ve gelişimi üzerine etkisi .....	42
Şekil 12. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> konsantrasyonlarının <i>E. alkaliphilum</i> VLP1’in proteaz üretimi ve gelişimi üzerine etkisi .....	42
Şekil 13. Örneklerin SDS-PAGE analizi. M: Precision Plus Protein Unstained Standart (250-10kD); 1) Kültür süpernatantı; 2 ve 4) 40% amonyum sülfat çöktürmesi; 3 ve 5) iyon değişim kromatografisi .....	44
Şekil 14. Proteaz enziminin Michaelis-Menten grafiği.....	45
Şekil 15. Proteaz enziminin Lineweaver Burk grafiği .....	45
Şekil 16. Sıcaklığın <i>E. alkaliphilum</i> VLP1 proteaz enzim aktivitesine etkisi.....	46
Şekil 17. Sıcaklığın <i>E. alkaliphilum</i> VLP1 proteaz enzim stabilitesine etkisi .....	46
Şekil 18. pH’nın <i>E. alkaliphilum</i> VLP1 proteaz enzim aktivitesine etkisi .....	47
Şekil 19. pH’nın <i>E. alkaliphilum</i> VLP1 proteaz enzim stabilitesine etkisi.....	47
Şekil 20. Proteaz enzimi üzerine potansiyel bileşiklerin etkisi.....	48
Şekil 21. Proteaz enzimi üzerine çeşitli reaktiflerin etkisi .....	49
Şekil 22. Proteaz enzimi üzerine organik çözücülerin etkisi.....	49

<b>Şekil 23.</b> Proteaz enzimi üzerine çeşitli deterjanların etkisi.....	50
<b>Şekil 24.</b> Çeşitli deterjanların proteaz enzim stabilitesi üzerine etkisi.....	51
<b>Şekil 25.</b> <i>E. alkaliphilum</i> VLP1'in farklı yıkama solüsyonlarında kan lekesini çıkarma performansı .....	51
<b>Şekil 26.</b> <i>E. Alkaliphilum</i> VLP1'in TTM içerisinde tavuk tüyü parçalama potansiyeli.....	52
<b>Şekil 27.</b> <i>E. Alkaliphilum</i> VLP1 tarafından parçalanmış tavuk tüyünün mikroskop altındaki görüntüsü .....	53



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

%	: Yüzde
=	: Eşittir
$\mu\text{L}$	: Mikrolitre
g	: Gram
L	: Litre
M	: Molar
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
$\mu\text{L}$	: Mikrolitre
nm	: Nanometre
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat Derece
U	: Unit-Enzim Birimi
U/mg	: Unit/miligram-Spesifik Aktivite Birimi
g/L	: Gram/Litre
mg/mL	: Miligram/Mililitre
kDa	: Kilodalton

### Kısaltmalar

APS	: Amonyum Persülfat
BSA	: Sığır Serum Albümin
$\text{CaCl}_2$	: Kalsiyum Klorid
$\text{dH}_2\text{O}$	: Deiyonize Su
DFP	: Diizopropil Florofosfat
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
HCl	: Hidroklorik Asit
KCl	: Potasyum Klorid
kDa	: Kilodalton
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	: Di Potasyum Fosfat
$\text{MgCl}_2$	: Magnezyum Klorid
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	: Magnezyum Sülfat Yedi Sulu
NaCl	: Sodyum Klorid
NaOH	: Sodyum Hidroksit
PEG	: Polietilen Glikol

PMSF	: Fenilmetilsülfonil Florür
pH	: Power of Hydrogen (Hidrojenin Gücü)
rpm	: Revolutions Per Minute (Dakikadaki Devir Sayısı)
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SF	: Seyreltme Faktörü
TCA	: Trikloroasetik Asit
TEMED	: Tetrametiletildiamin



## GİRİŞ

Enzimler canlı hücreler tarafından üretilen ve canlı metabolizmasında neredeyse tüm biyolojik süreci katalize eden, yaşam için gerekli olan biyokatalizörlerdir (Hinnemann and Norskov, 2006).

Proteazlar, diğer adlarıyla peptidazlar veya proteinazlar, protein moleküllerindeki peptid bağlarının hidrolizini katalizleyerek uzun protein zincirlerinin daha küçük polipeptid veya amino asitlere parçalanmasını sağlayan enzim alt sınıfıdır (Motyan et al., 2013).

Proteazlar hücre içerisinde gelişim, proteinlerin hidrolizi, iltihap oluşumu, hormonların salgılanması, kanın pıhtılaşması, salgı proteinlerinin ve peptitlerin zarlar boyunca taşınımı gibi pek çok fizyolojik işlemde oldukça önemli görevler yürütmektedirler (Rao et al., 1998). Bu görevlerinden dolayı da biyoteknoloji ve endüstri sektöründe önemli kullanım alanlarına sahiptirler (Barzkar, 2020).

Dünya genelinde proteazlar enzim pazarının en çok talep gören enzimleridir ve bunları amilaz, glukanaz, selüloz gibi karbohidrazlar, fitazlar ve lipazlar takip etmektedir (Kumar et al., 2014). Proteazlar, çok eski zamanlardan günümüze, gıda, deterjan ve ilaç endüstrilerinde yaygın kullanımları nedeniyle en baskın enzim olmaya devam etmektedir (Sharma et al., 2019; Gagaoua et al., 2021).

Proteazlar hayvan, bitki, fungus, bakteri ve arkea gibi tüm yaşam formlarında ve hatta virüslerde dahi bulunmaktadır (Bah et al., 2016; Morazzani et al., 2019; Gagaoua et al., 2021). Bu kaynaklar arasından mikrobiyal proteazlar zorlu koşullarda aktivite gösterebilmeleri, kısa sürede, düşük maliyetle, yüksek verimde ve kolay elde edilebilir olmaları nedeniyle en çok araştırılan ve endüstriyel değere sahip enzimlerdir (Sharma et al., 2019). Bu yüzden, farklı mikrobiyal kaynaklardan, farklı özelliklere sahip proteaz enzimlerinin keşfedilmesi, üretilmesi ve kullanılması ilgi çekmekte ve yeni kaynakların arayışı enzime olan talebe paralel olarak artarak devam etmektedir (Sarkar and Suthindhiran 2020).

Tüm bu bilgiler doğrultusunda, bu çalışmada, yeni bir alkali proteaz üreticisinin keşfi için ilk olarak Van Gölü'nün alkali ortam koşullarına uyum sağlamış bakterilerin izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen isolatlar arasından en iyi proteaz üreticileri seçildi, klasik ve moleküler yöntemlerle tanılamaları yapıldı.

İsolatlar arasından en yüksek proteaz aktivitesine sahip bakteri izolatının proteaz üretimini artırmak amacıyla üretim koşullarının optimizasyonu gerçekleştirildi. Optimum

sıcaklık, pH, inkübasyon süresi, en iyi karbon ve azot kaynakları belirlendi. Daha sonra bu izolattan elde edilen ekstraselüler proteaz enzimin amonyum sülfatla çöktürme, ultrafiltrasyon ve iyon değişim kromatografisi yöntemleri ile saflaştırılması gerçekleştirildi. Enzim karakterizasyonunda moleküler ağırlığı,  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri, optimum sıcaklık ve pH değerleri, çeşitli iyonlar, reaktifler ve çözücüler varlığında kararlılığı tespit edilerek biyoteknolojik uygulama alanları için uygunluğu araştırıldı.

Alkali proteaz enzimlerinin en önemli biyoteknolojik uygulama alanlarından biri olan deterjan sektöründe kullanılabilirliği ve leke çıkarma potansiyeli araştırıldı. Bunun için enzimin deterjanlar varlığında kararlılığı tespit edildi ve pamuklu kumaş parçalarından kan lekesini çıkarmadaki etkinliği tespit edildi.

Düşük maliyetli hammadde veya atık maddelerin kullanımı ve çevre kirliliğinin azaltılmasına katkı, sürdürülebilirlik ve biyoteknolojik çalışmalar açısından oldukça önemlidir. Bu tez çalışmasında son olarak, hem kümes hayvancılığında kaynaklanan tavuk tüylerinin neden olduğu çevre kirliliğini azaltmak hem de yüksek protein içeriklerinden dolayı tavuk tüylerinin çeşitli proseslerde hammadde olarak kullanılarak ekonomiye geri kazandırılması amacıyla proteolitik bakterinin tavuk tüylerini parçalama potansiyeli araştırıldı.

## KURAMSAL TEMELLER

### Enzimler

Enzimler tüm fizyolojik kimyasal reaksiyonlarda yer alan, ağırlıklı olarak protein yapısında bulunan ve substratları ürünlere dönüştüren biyolojik katalizörlerdir. Enzimler, reaksiyonun aktivasyon enerjisini düşürerek tepkimenin daha kısa sürede gerçekleşmesini sağlar. Enzimlerin aktive olması için vitaminlere, metallere veya diğer kofaktörlere ihtiyacı vardır. Enzimler, büyük ölçekte üretilen ve genellikle ortam sıcaklıklarında ve nötre yakın pH'da aktif olan çok çeşitli kimyasal maddelerde çalışabilir. Bu özellikler, enzimleri son yüzyılda bilim insanlarının ve mühendislerin odak noktası haline getirerek endüstriyel katalizörler olarak kullanılmalarını sağlamıştır (Roskoski, 2015).

Enzimler; biyolojik makromoleküllerin sentezi ya da katabolik reaksiyonları, nöronlar aracılığıyla uyarınların iletimi, DNA'nın onarımı ve sentezi, apoptosis, hemostaz reaksiyonu, proteinlerin parçalanması ve membranlar arasında transferi gibi birçok hücrenel süreçte görev almaktadır (Whitford, 2005).

Enzimler gıda, ilaç, deterjan, tekstil ve bakım ürünleri dahil olmak üzere birçok endüstri alanında kullanılmaktadır. Enzimler ucuz olmaları, in vitro koşullarda aktif özellikte olmaları, kullanım alanlarının geniş olması ve toksik olmamaları nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır (Wiseman, 1987).

Enzimler katalizledikleri tepkimelere göre Enzim Komisyonu tarafından altı gruba ayrılmaktadır (Boyce and Tipton, 2001).

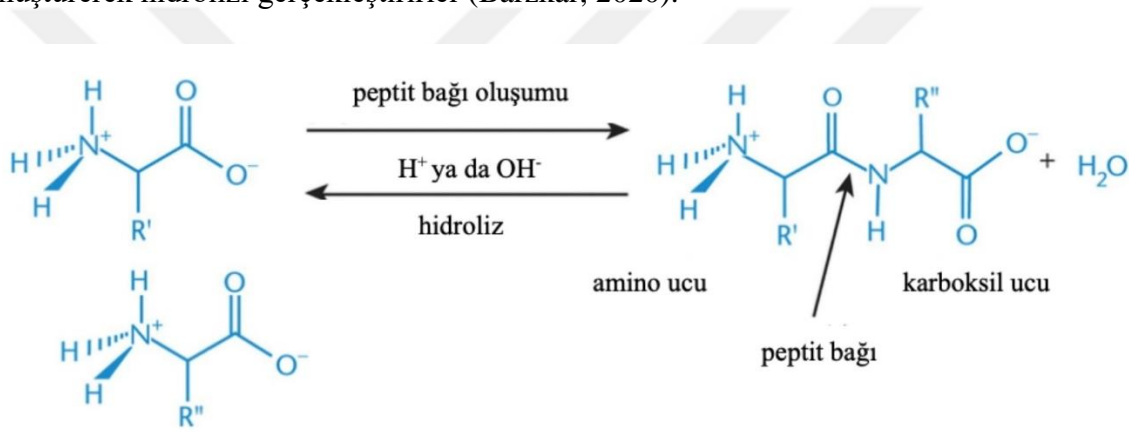
1. Oksido-redüktazlar: Elektron transferi yapan yani yükseltgenme/indirgenme tepkimelerini katalize eden enzimlerdir. Redoks tepkimelerini kataliz eden tüm enzimler bu sınıfa aittir.
2. Transferazlar: Gruplar arası transfer yapan reaksiyonları katalizler. Hidrojen dışındaki atom veya atom grubunun bir molekülden diğerine aktarılmasını sağlayan enzim grubudur.
3. Hidrolazlar: Kompleks yapıdaki moleküllerin bağlarını su ile parçalarlar.
4. Liyazlar: Hidrolitik olmayan yolla çift bağ oluşumunu katalizler. C-O ve C-N kimyasal bağları yıkan tüm enzimler bu gruba dahildir.
5. İzomerazlar: Molekül içi gruplar arası transfer yapan enzimlerdir. Molekül içindeki geometrik ya da yapısal izomerleşmeyi katalizleyen enzim grubudur.

6. Ligazlar: Dehidrasyon reaksiyonlarını katalizlerken ATP yıkımı meydana getiren enzimlerdir.

### Proteazların Genel Özellikleri

Proteazlar (proteinazlar veya peptidazlar), protein moleküllerini peptidlere ve amino asitlere parçalayan hidroliz reaksiyonlarını katalize eden enzimlerdir (Sharma et al., 2017). Proteazlar, endüstriyel enzimlerin en büyük grubudur ve küresel pazarda büyük bir paya sahiptir (Mehtani et al., 2013).

Enzim Komisyonuna (EC) göre, proteazlar hidrolazların 3. grubuna ve peptit bağlarının hidrolizi olan 4. alt gruba aittir. Amino asitler arasındaki bağları hidroliz reaksiyon mekanizmasına göre ayırırlar. Kimyasal bir bağa su ekleyerek veya başka bir grubu suya dönüştürerek hidrolizi gerçekleştirirler (Barzkar, 2020).



Şekil 1. Proteaz aktivite mekanizması (Tekin, 2020)

Diğer enzimler gibi proteazlar da protein yapısına sahiptir ve belirli bir pH ve sıcaklık aralığında etkin bir şekilde çalışırlar (Fersht, 1998; Kaur et al., 2001).

Proteazlar çok geniş bir sınıfı temsil etmelerine rağmen, katalize ettikleri reaksiyon tipine, katalitik bölgelerin kimyasal ilişkilerine ve yapılarına göre farklı şekilde sınıflandırılırlar (Singh, 2016; Gurumallesh, 2019).

### Proteazların Sınıflandırılması

Proteazlar, enzimin substrat üzerinde etki ettiği bölgeye bağlı olarak iki gruba ayrılır: Ekzopeptidaz ve endopeptidazlar (Mahler and Cordes, 1966). Proteazlar katalitik mekanizmalarına göre serin proteazlar, sistein proteazlar, aspartik proteazlar ve metalloproteazlar olmak üzere dört gruba ayrılırken; aktif oldukları pH aralığına göre asidik proteazlar, nötr proteazlar ve alkalın proteazlar olmak üzere üç gruba ayrılır (Singh et al., 2000).

## **Etki alanlarına bağlı olarak proteazlar**

### **Ekzopeptidazlar**

Ekzopeptidazlar, bir peptidin serbest amino grubundan (N) ya da serbest karboksil grubundan (C) bir ya da birkaç amino asidi hidroliz ederler (Sawant and Nagendran, 2014; Sani et al., 2017). Ekzopeptidazlar, aminopeptidazlar, karboksipeptidazlar ve omega peptidaz olmak üzere üçe ayrılır.

### **Aminopeptidazlar**

Doğada oldukça yaygın bulunan aminopeptidazlar, ekzopeptidazların ana alt sınıfından biridir. Proteinlerin veya peptitlerin amino ucundaki peptit bağlarına etki ederek amino asitlerin ayrılmasını katalize eden enzimlerdir. Çoğu, her seferde tek bir amino asidi uzaklaştırırken, aminopeptidazların küçük bir kısmı, tek seferde iki veya üç amino asit kalıntısını uzaklaştırır (Bradshaw, 2013). Dipeptidil peptidazlar peptid zincirinin serbest amino ucundan bir dipeptidin koparılmasını sağlarken tripeptidil peptidazlar ise peptid zincirinin serbest amino ucundan bir tripeptidin koparılmasını sağlamakla görevlidirler (Polaina and MacCabe, 2007).

### **Karboksipeptidazlar**

Karboksipeptidazlar, amino asit zincirinin karboksil terminaline etki ederek, bir amino asidi veya bir dipeptidi serbest bırakır. Karboksipeptidazlar, enzimlerin aktif bölgesinde bulunan amino asit rezidülerinin çeşidine bağlı olarak serin karboksipeptidazlar, metalokarboksipeptidazlar ve sistein karboksipeptidazlar olmak üzere gruplara ayrılır (Motyan et al., 2013).

### **Endopeptidazlar**

Endopeptidazlar, substratın uzak bir yerinde peptit bağlarını parçalar (Sawant and Nagendran, 2014; Siroya et al., 2020). Aktif bölgede bulunan belirli bir fonksiyonel grubun varlığından etkilenen endopeptitler serin, aspartik, sistein ve metalloproteazlar olarak sınıflandırılır.

### **Serin proteazlar**

Bilinen proteolitik enzimlerin üçte birini serin proteazlar oluşturmaktadır. Alkalin pH civarında yüksek aktivite gösterdiklerinden endüstriyel alan uygulamalarında tercih edilirler. Alkali serin proteazlar, farklı bakteri, küf ve mayalar tarafından üretilir. Bu enzimler, hidrolize olan zincirin karboksil tarafında tirozin, fenilalanin veya lösin içeren peptit bağlarını kırarlar (Vojcic et al., 2015). Serin proteazları diizopropil florofosfat (DFP) ve fenilmetilsülfonil florür

(PMSF) enzimi inhibe etmektedir (Rao et al., 1998). Serin proteazlar genellikle peptit bağının koparılmasını zincirin orta kısmında gerçekleştiği endopeptidazlardır. İsimleri, nükleofilik olan ve enzimin aktif bölgesinde bulunan serin (Ser) kalıntısından gelmektedir (Raghunath et al., 2010)

### **Aspartik proteazlar**

Aktif bölgelerinde aspartik asit bulunduran proteazlardır. Çoğunun maksimum aktivitesi 3,0 – 4,5 gibi düşük pH aralığında gerçekleşmektedir (Rao et al., 1998). Omurgalılarda, bitkilerde, mantarlarda, protozoonlarda, prokaryotlarda ve retrovirüslerde bulunurlar. Aspartik proteazlar pepstatin ile baskılanabilmektedirler (Singh et al., 2016).

### **Sistein proteazlar**

Tiyol proteazları olarak da bilinirler. Maksimum pH'ları nötral veya zayıf alkalidir (Sriket, 2014). Sistein proteazlar isimlerini aktif bölgelerinde bulunan sisteinden alırlar. Sistein, merkezde bulunan histidin ve aspartik asit ile katalitik üçlü bir yapı oluşturur. Yan zincir özgülüklerine bağlı olarak arjinin, glutamik asit, papain rezidülerinin ayrılması ile tripsin ve diğerleri olmak üzere dört sınıfa ayrılırlar. Papain en iyi bilinen sistein proteazıdır (Nadeem et al., 2013).

### **Metalloproteazlar**

Metalloproteazlar kofaktörü metal iyonu olan proteaz enzimleridir. Metalloproteazların aktivitesi, ortamdaki divalent katyonlara bağlıdır ve ortama şelatlayıcı ajanlar eklenerek inhibe edilebilirler (Rao et al., 1998). Metalloproteazlar çoğunlukla çinko içeren endopeptidazlardır. Kobalt ve kalsiyum da proteazlarda bulunabilen metal iyonlardır. Çinko enzimatik aktivite ve kalsiyumun protein yapısının stabilitesi için gereklidir. Bu enzimler, 5 ila 9 arasında değişen optimum pH'ya sahiptir. EDTA gibi metal şelatlayıcı maddeler tarafından inhibe edilirken, sistein inhibitörlerinden etkilenmemektedirler (Ellaiah et al., 2002).

### **Aktivite gösterdikleri pH aralığına bağlı olarak proteazlar**

#### **Asidik proteazlar**

Asidik proteazların aktif ve stabil oldukları pH aralığı yaklaşık 3,8 ile 5,6 iken optimumları pH 3-4 aralığındadır. Asidik proteazlar daha çok fungal kaynaklardan elde edilirler (Singh et al., 2016).

## **Alkali proteazlar**

Günümüzde endüstriyel enzimlerin çoğunluğunu oluşturan proteazlar içerisinde en yüksek pazar payına alkalın proteazlar grubu sahiptir (Genckal and Tari, 2005). Bakteriyel proteazlardan, özellikle *Bacillus* cinsine ait olan alkali proteazlar, deterjan endüstrisinde en yaygın kullanılan proteazlardır. Bu enzimler, tirozin, fenilalanin, lösin, aspartat, histidin ve serin içeren bağları parçalayabilirler. Alkalın proteazlar, geniş alkali pH (9-12) aralığında yüksek aktivite ile karakterize edilirler. Alkali proteazlar için optimum pH 9-11 aralığındadır. İzoelektrik noktaları oldukça yüksek olup, pH 6–12 değerleri arasında stabil kalabilmektedirler. Sıcaklığa karşı toleransları yüksektir (Güngör, 2011).

## **Nötral proteazlar**

Nötraz olarak da bilinen nötral proteazlar pH 5-8 değerleri arasında aktiviteye, hidrofobik amino asitler için yüksek afiniteye ve düşük termal toleransa sahiptir. Bu, reaksiyonun gerçekleştirilmesi için özel koşulların hazırlanması ve hidrolizatların üretilmesi açısından avantajlıdır (Rao et al., 1998).

## **Proteaz Reaksiyon Mekanizması**

Peptidazlar temelde peptid bağlarının hidrolizini katalizler; fakat bunu çeşitlerine göre farklı yollarla gerçekleştirmektedirler. Peptid zincirinin konumu, hidrolize olan yakınındaki amino asit rezidüsü ve substratın bilinmeyen karakteristik niteliklerinden dolayı peptidazlar özgül davranmaktadırlar (Sevinç, 2010; Sarı, 2011).

Proteaz enzimlerinin dört ana grubu, tetrahedral ara ürünleri stabilize etmek için iki katalitik mekanizma kullanır. Aktif merkezin nükleofilliği serin ve sistein proteazlarda amino asitlerden kaynaklanır (kovalent kataliz). Su molekülü tarafından metallo ve aspartik proteazlarda nükleofillik sağlanır (kovalent olmayan kataliz). Kovalent katalizde histidin baz gibi; kovalent olmayan katalizde Aspartat, Glutamat rezidüleri, çinko (metalloproteazlarda), asit ve baz gibi fonksiyon gösterir (Turk, 2006).

## **Serin proteazların katalitik etki mekanizması**

Tüm proteazların neredeyse üçte biri, aktif bölgedeki nükleofilik Serin kalıntısından dolayı serin proteazlar olarak sınıflandırılabilir. Bu mekanizma, başlangıçta Asp-His-Ser "katalitik üçlü"nün varlığı ile ayırt edilmiştir (Raghunath and Mahajan, 2010).

Serin proteazlar hidroliz için genellikle iki aşamalı reaksiyon gerçekleştirirler. Reaksiyon enzim ve peptidin kovalent olarak bağlanması ve bunun sonucunda amino asit ya da peptid fragmentlerinin parçalanması esasına dayanmaktadır. Asetilasyon aşaması,

aktifleştirilmiş su tarafından nükleofilik atak ile oluşan deasetilasyon işlemini takip eder ve oluşturulan kovalent enzim kompleksi daha sonra hidrolizle parçalanır (Saravanamuthu et al., 2010). Serin endopeptidazlar primer substrat tercihlerine göre üç gruba ayrılmışlardır. Bunlar; tripsin benzeri serin proteaz (pozitif yüklü rezidülerden sonra ayıran), kimotripsin benzeri serin proteaz (büyük hidrofobik rezidülerden sonra ayıran) ve elastaz benzeri serin proteazlar (küçük hidrofobik rezidülerden sonra ayıran) şeklindedir (Rao et al., 1998).

### **Sistein proteazların katalitik etki mekanizması**

Tiyol proteazlar olarak da adlandırılan bu grubun aktif merkezinde nükleofilik bir sistein bulunmaktadır. Sistein proteazların mekanizması serin proteazların etki mekanizmasına benzerdir. Katalitik reaksiyon sırasında sistein proteazların aktif merkezinde bulunan sistein amino asitinin tiyol grubu nükleofil olarak atağa geçmektedir (Hartley, 1960). Bazıları ise sisteine ek olarak aktif merkezinde histidin, glutamik asit ve aspartik asit rezidüsünü içermektedir. Kaspaz, papain, bromelain ve fisin bilinen sistein proteazlardan bazılarıdır (Sarı, 2011).

### **Aspartik proteazların katalitik etki mekanizması**

Aspartik proteazların (karboksil proteaz ya da asidik proteaz) en iyi bilinenleri pepsin ve kimozindir (Polaina and MacCabe, 2007).

Katalitik aktiviteleri için aspartik proteazların, aspartik asit kalıntılarına gereksinimleri vardır. Penicillopepsin, endothiapepsin gibi aspartik proteazlar ile proteinlerin hidrolizi için genel bir baz katalitik mekanizması önerilmektedir (Rao et al., 1998). Aspartik proteazlar aktif merkezlerinde iki aspartik asit rezidüsü bulundurmaktadır. Aktif haldeki su molekülü nükleofil olarak atağa geçince suda bulunan hidrojen iyonu aspartik asitin karboksil grubu tarafından alınır. Böylece, su molekülü orijinli hidroksil iyonu proteindeki peptid zincirini parçalar (Sarı, 2011).

### **Metalloproteazların katalitik etki mekanizması**

Katalitik aktiviteleri için iki değerlikli metal iyonuna gerek duymaktadırlar ve ortama şelatlayıcı ajanların ilavesiyle inhibe olabilmektedirler. Metalloproteazlarda aktif su molekülü nükleofil olarak hareket etmektedir. Metalloproteazlar, yüklü amino asit yan zincirlerine metal iyonları ile bağlanarak su moleküllerini kullanılabir hale getirmektedir (Cerde-Costa and Gomis-Ruth, 2014). Metal iyonu, enzimin katalitik bölgesinde bulunan 1 su molekülü ve 3 amino asit aracılığıyla çevrelenmektedir. Kısacası bu metal iyonu tetrahedral yapıyı oluşturan moleküldür. Tetrahedral yapı çeşitli amino asitler, histidin, glutamik asit, histidin, aspartik asit,

lizinin ve arjinininden oluşabilmektedir. Metalloproteaz aktivitesinde glutamik asit çok önemlidir (Reunanen and Kahari, 2013).

### **Proteazların Kaynakları**

Canlı organizmalarda proteazlar hayati bir rol oynar, bu nedenle bitki, hayvan ve mikroorganizmalar gibi farklı yaşam formları tarafından üretilirler (Castro and Sato, 2014; Novelli et al., 2016).

#### **Bitkisel proteaz üreticileri**

Bitkilerin proteaz kaynağı olarak kullanımı toprak, iklim koşulları gibi faktörlerin uygun olmasına bağlı olduğundan proteaz üretimi zaman almaktadır. Papain, bromelain ve keratinazlar gibi iyi bilinen proteazlardan bazıları bitki kaynaklarından üretilir (Sawant and Nagendran, 2014). Papain, papaya meyvesinden (*Carica papaya*) üretilir ve geniş bir pH aralığı ile sütü pıhtılaştırma ve protein parçalama özelliklerine sahiptir. Bromelain, ananas suyu, yaprağı, gövdesi ve kabuğundan elde edilen bir bitki proteazıdır. Tümör hücrelerinin büyümesini etkin bir şekilde kontrol edebilir (Chanalia et al., 2011). Bitkisel proteaz olan keratinazlar ise yün ve kılı parçalayarak, temel amino asit olan lizinin oluşumu sağlamakta ve atık su sistemlerinin tıkanmasının engellenmesinde kullanılan önemli bir proteaz olarak bilinmektedir (Rao et al., 1998).

#### **Hayvansal proteaz üreticileri**

Hayvanlardan elde edilen tripsin, kimotripsin, pepsin ve rennin, en iyi bilinen proteazlardır. Sindirim enzimi olan tripsin bağırsakta bulunur ve gıda proteini hidrolizinden sorumludur. Böcek bağırsağında bulunan tripsin enzimi proteaz inhibitörleri sayesinde inhibe edilerek haşerelerin biyokontrolünde tercih edilmektedir (Vojcic et al., 2015). Hayvan pankreatik sekresyonlarda bulunan kimotripsin de oldukça pahalı bir enzimdir ve bu nedenle yalnızca teşhis ve analitik uygulamalarda kullanılır. Memelilerin midesinde inaktif bir prekürsör (pro-renin) olarak üretilen rennet (renin, kimozin), pepsin enziminin etkisiyle aktif forma çevrilmektedir. Süt endüstrisinde, yüksek kaliteli ve dayanıklı peynir üretimi için faydalanılmaktadır (Velooralappil et al., 2013).

Endüstriyel alanda kullanılan hayvan kaynaklı enzimlerin saflaştırma işlemleri oldukça zor olup izolasyonlarında da etik sorunlarla karşılaşılmaktadır. Ayrıca hayvanlardan insanlara bulaşan hastalıkların görülme sıklığı nedeniyle de gıda endüstrisinde kullanılan hayvansal kaynaklı proteazlar yerine mikrobiyal proteazlar tercih edilmektedir (Dhillon et al., 2016).

## **Mikrobiyal proteaz üreticileri**

Mikroorganizmalar hem intraselüler hem de ekstraselüler proteaz üretmektedir. İntraselüler proteazlar, farklılaşma, protein dönüşümü, sporlanma, hormon ve proteinlerin olgunlaşması, proteinlerin uzaklaştırılması gibi hücrenel ve metabolik süreçler için hayati önem taşırken, ekstraselüler proteazlar proteinli besinlerin hidrolizinde mikroorganizmalar için oldukça önemlidir. Ekstraselüler proteazlar çeşitli endüstriyel alandaki önemli rollerinden dolayı ayrı bir yere sahiptir (Khan, 2013). Hayvan ve bitki kaynaklı proteazların sanayi sektörünün taleplerini karşılayamaması nedeniyle mikrobiyal kaynaklara yönelim gerçekleşmiştir (Fazilat, 2016). Piyasada bulunan proteazların önemli bir kısmı başta fungus ve bakteriler olmak üzere mikroorganizmalar tarafından karşılanmaktadır.

Mikrobiyal kaynaklardan elde edilen proteazlar, düşük üretim maliyeti, kolay bulunabilir, ucuz hammaddelerle üretilebilme, yüksek üretim hızı, üretim alanı gereksiniminin düşük olması, yüksek stabilite, biyokimyasal çeşitlilik ve genetik manipülasyonlarının kolay olması gibi nedenlerle biyoteknolojide ve endüstrilerde yüksek talep görmektedir (Singhal et al., 2012; Mishra et al., 2017; Banerjee et al., 2017).

## **Fungal proteaz üreticileri**

Mantarlardan izole edilen proteazlar, ekstrem koşullar altında stabil olması, geniş substrat spesifitesi ve yüksek çeşitliliğe sahip olması nedeniyle tercih edilmektedir. Mantar proteazları, gıda proteinlerinin modifikasyonunda kullanılmaktadır (Velooralappil et al., 2013). *Aspergillus clavatus ES1*, *A. flavus*, *A. fumigates*, *A. melleus*, *A. nidulans HA-10*, *A. niger*, *A. sojae*, *A. sydomi*, *A. terreus*, *A. oryzae*, *Cephalosporium*, *Fusarium*, *Rhizopus* ve *Penicillium italicum* proteaz üreten mantarlar arasındadır (Charles et al., 2008; Novelli et al., 2016; Sharma 2019). Bu mantar suşları arasında en iyi bilinen proteaz üreticileri *Aspergillus* cinsine aittir. *Myxococcus*, *Neurospora*, *Penicillium* ve *Ophiostoma* gibi mikrobiyal suşlar da proteaz üreticileri arasındadır (Sharma et al., 2015). *Cheotomuim globusum* da, alkalın proteaz üreten yeni bir türdür (Nadeem et al., 2019).

## **Bakteriyel proteaz üreticileri**

Bakteriyel proteazlar, yüksek katalitik aktiviteleri ve üretim kapasiteleri nedeniyle deri, gıda, çamaşır ve deterjan sanayi gibi farklı sektörlerde ekonomik öneme sahiptir. Bakteriyel proteazlar (alkali), 8-12 arasında pH'da ve 50-70 °C gibi bir sıcaklık değerlerinde, yüksek aktiviteleri ile bilinirler (Velooralappil et al., 2013). Proteaz üreten bazı bakterilere; *B. alkaloophilus*, *B. amyloliquefaciens* (Welker and Campbell, 1967), *B. circulans* (Jaswal et al., 2008), *B. clausii* (Urdaci et al., 2004), *B. halodurans* (Takami et al., 2000), *B. lentus*, *B.*

*licheniformis* (Khan, 2013), *B. pumilus* (Qodah et al., 2013), *B. safensis* (Rekik et al., 2019), *B. subtilis* (Romsomsa et al., 2010; Santon et al., 2018), *E. aurantiacum* ZBB13 (Zabin et al., 2021), *E. indicum* TBG-PICH-001 (Kumar et al., 2018), *Streptococcus sp.* (Van et al., 1988) ve *Thermus* Rt 41A (Wilson et al., 1994) örnek olarak verilebilir.

### **Viral proteaz üreticileri**

Virüsler serin, aspartik ve sistein peptidazlar içermektedirler (Babe and Craik, 1997). Bu enzimler intraselüler olup viral proteinler, öncü kapsitlerin olgunlaşması ve yeni virionların üretimi için gerekli katalitik aktiviteyi sağlamakla görevlidirler. Viral proteazlar, AIDS ve kansere sebep olan viral proteinlerin işlenmesindeki rolleri nedeniyle önem kazanmaktadır (Rani et al., 2012).

### **Proteazların Endüstrideki Uygulama Alanları**

Endüstriyel alanda düşük maliyetli proteaz ve diğer enzim çeşitlerinin kullanımı giderek artmaktadır (Panda et al., 2016). Endüstriyel enzim grubundan biri olan proteazlar dünya pazar payının %60'ını oluşturmaktadır (Rani et al., 2012). Özellikle gıda, deterjan, atık işleme, deri, ağır metal (gümüş) geri kazanımı, eczacılık ve peptid sentezi gibi alanlarda kullanımı oldukça yaygındır (Silva, 2017).

### **Gıda endüstrisi**

Gıda proteinlerinin hidrolizi; besin kalitesinin iyileştirilmesi, raf ömrünün uzatılması, farklı fonksiyonel özelliklerin modifikasyonu, istenmeyen etkileşimlerin önüne geçilmesi, lezzet, aroma ve renk özelliklerinin geliştirilmesi, inhibe edici faktörlerin uzaklaştırılması gibi farklı nedenlerle proteazlar kullanılmaktadır (González et al., 2011). Hayvan yemi endüstrisinde proteazlar, tek mideli hayvanlar tarafından tamamiyle sindirilemeyen bitkisel kaynaklı yemlerin içine eklenerek besinlerin kullanılabilirliğini ve sindirimini kolaylaştırmaktadır (Algül, 2019). Peynir yapımında en çok kullanılan enzim olan kimozin, kazein için yüksek özgülüğe sahip olup sütte pıhtı oluşturarak çökmesini sağlamaktadır. Fırıncılıkta proteazlar, hamurlardaki yüksek gluteni parçalayarak hamurun yumuşamasını sağlamak ve böylece yoğurma işlemini kolaylaştırmaktadır. Bazı unlu mamüllerin üretiminde kabarmayı engellemek için kullanılmaktadır. Proteazlar ekme yapımında da önemli bir yere sahiptir. Glutenin hidroliziyle açığa çıkan amino asitler maya tarafından kullanılarak ekmeğin renk, yumuşaklık ve doku bakımından kalitesi artırmaktadır (Kara et al., 2005; Buehler, 2006). Etin yumuşatılması için bitkisel (papain, bromelain, aktinidin, fisin) ve mikrobiyal (*A. oryzae* ve *B. subtilis*) proteazlar kullanılmaktadır. Mikrobiyal kaynaklardan elde edilen proteazlar, alkollü ve alkolsüz içeceklerin üretiminde kullanılmaktadır. Proteazlar protein kaynaklı

bulanıklığın giderilmesi ve berraklığın sağlanmasıyla ürün kalitesini iyileştirmek, üretimi kolaylaştırmak için içecek endüstrisinde kullanılmaktadır (Uçan and Akyıldız, 2012). Bazı bireylerde alerjik reaksiyonlara sebep olan, inek ve koyun sütünde yüksek oranda bulunan  $\beta$ -laktoglobulin proteininin, tripsin ve kimotripsin ile hidrolizi sayesinde antialerjik besinler üretilmektedir (Kondo et al., 2007).

### **Deterjan endüstrisi**

Deterjanlar, katkı maddesi olarak proteazlar, amilazlar ve lipazlar gibi çeşitli enzimler içerir. Deterjan üretiminde kullanılan ilk enzimin pankreas özütünden elde edildiği rapor edilmiştir. Sonraki yıllarda bakteriyel enzim içeren deterjanlar tanıtılmıştır (Singh et al., 2016). Subtilisinler ve *Bacillus* soyundan izole edilen proteazlar deterjan sektöründe kullanılan enzimlerin %89'unu oluşturmaktadır. Subtilisin *Bacillus*'tan elde edilir ve yüksek sıcaklıklarda kararlı yapıya sahiptir. *A. favus*, *A. niger*, *B. cereus*, *B. firmus* MTCC 7728, *Tritirachium albüm* ve *Penicillium chrysogenum*' dan üretilen proteazlar da sıklıkla çamaşır deterjanlarında kullanılmaktadır (Nadeem et al., 2019).

Enzimlerin deterjan yapısına katılabilmeleri için bazı özelliklere sahip olmaları gerekmektedir. Deterjan yapısına katılacak bir proteaz enziminin yüksek pH ve sıcaklıkta aktivitesini koruyabilmesi ve stabil kalması gerekmektedir. Ayrıca deterjanlara eklenen diğer metal iyonlarının etkisini indirgeyen ajanlarla ve oksitleyici ajanlarla temas halindeyken proteazların bunlara uyum sağlayabilmesi, aktivitesini koruyarak etkili bir leke çıkarma performansına sahip olması gerekir (Gurkok, 2019). Bir deterjan proteazından gıda, çim, vücut salgularından kaynaklı farklı lekelerin temizlenmesini sağlayacak geniş substrat yelpazesine sahip olması beklenmektedir (Tekin, 2020).

Bulaşık makinesi deterjanlarında proteazlar, amilaz ve lipazlarla birlikte kullanıldığı zaman sıcak suyla giderilemeyen nişasta ve protein bazlı lekelerin çıkarılmasında etkili olmaktadır. Bu durum, fosfat kullanımını azaltmakta ve daha düşük sıcaklıklarda yıkayarak enerji tasarrufu sağlamaktadır (Contesini et al., 2018).

### **Deri endüstrisi**

Deri endüstrisinde işlenmiş deri elde etmek için kireçleme, ıslatma, tüy ve yünün deriden uzaklaştırılması, tabaklamada, samalama, yağlardan arındırma ve temizleme gibi farklı aşamalardan geçilir. Bu aşamalarda kireç, tuz, çözücüler ve sodyum sülfür gibi oldukça toksik kimyasallar kullanılır ve bu da çevre kirliliğine yol açar (Sharma et al., 2019). Deri işleme sürecinde çeşitli kimyasallardan kaynaklanan çevre kirliliği, proteaz gibi enzimlerin deri işleme endüstrisinde kullanımıyla azaltılabilir.

Alkalın proteazlar, kollajen olmayan deri yapısını hidrolize eder. Deri işleme için gerekli olan globulin ve albümin gibi fibril yapıda bulunmayan proteinleri uzaklaştıran proteazlar derinin yumuşaklığını ve dayanıklılığını belirlemektedir (Ellaiah et al., 2002). İstenmeyen proteinlerin az maliyetle ve çevreye zarar vermeden uzaklaştırılması deri endüstrilerinde temel gerekliliktir (Khan, 2013; Wahab and Ahmed, 2017). *A. tamarii* (Kayanandan et al., 2003), *B. halodurans* JB 99 (Shrinivas and Naik, 2011), *Bacillus sp.* JB 99 (Kainoor and Naik, 2010), *B. subtilis* (Dettmer et al., 2013) ve *Streptomyces avermectinus* NRRL B-8165 (Ahmed et al., 2008)'ten üretilen enzimler, deri kalitesinin iyileştirilmesi ve çevre kirliliğinin azaltılması için iyi bir alternatif olarak önerilmiştir.

### **Gümüş geri kazanımı**

Metalik siyah gümüş içeren X-ışını film atıkları, gümüşün geri kazanımı için çok iyi bir kaynaktır. Gümüş, X-ışını filminin jelatin tabakasının yaklaşık %1,5-2'sini oluşturmaktadır. X-ışını filmlerinin yakılmasıyla geri kazanılan gümüş, çevre kirliliğine neden olmaktadır. Gümüşün geri kazanımı için alkali hidroksitlerden ve farklı mikroorganizmalardan üretilen proteolitik enzimler kullanılarak çevre kirliliğinin önüne geçilebilir (Wahab and Ahmed, 2017). Proteaz, filmin proteinden oluşan jelatin tabakasını parçalamak için kullanılır. Böylece gümüşün saf olarak çıkarılmasına yardımcı olur. *B. subtilis* ATCC 6633 (Nakiboglu et al., 2001) ve *Conidiobolus coronatus* (Shankar et al., 2010)'tan elde edilen proteaz enzimi, gümüş geri kazanımında kullanılır. *C. globusum*'dan izole edilen proteaz, kullanılmış X-ışını filmlerinin jelatin tabakasını parçalayarak gümüşü geri kazandırır ve çevre kirliliğini azaltır (Nadeem et al., 2019).

### **Atık işleme endüstrisi**

Proteazlar, protein içeren atıkların parçalanmasını sağlar. Böylece su sistemlerinin biyolojik oksijen ihtiyacının azaltılmasına fayda sağlar (Sharma et al., 2019). Proteazlar boynuz, kıl, tırnak ve saç gibi lifli proteinleri yararlı biyokütleye dönüştürebilmektedirler.

Ticari kümes hayvanı işletmelerinde, yan ürün olarak yüksek miktarda üretilen tüy atıklarının hidrolizi sayesinde açığa çıkan keratin proteini ve amino asitler hayvan yemi ve gıda maddelerinde etkin bir şekilde kullanılabilir. Mikrobiyal proteazlar, evcil kümes hayvanları ve deri gibi çeşitli endüstrilerden kaynaklı keratin içeren atıkların parçalanmasında çevre için zararlı olmayan aşamalarla hidrolizi gerçekleştirdiğinden önemli bir role sahiptir (Tapia and Simoes, 2008). *A. oryzae* NRRL-447 (Ali et al., 2011), *B. amyloliquefaciens* (Cortezi et al., 2008), *Bacillus* JB 99 (Kainoor and Naik, 2010), *B. licheniformis* RG1 (Ramnani et al., 2005), *B. licheniformis* ZJUEL31410 (Ni et al., 2011), *B. pseudofirmus* FA30-01 (Kojima

et al., 2006), *Bacillus RV. B2.90* (Vijayalakshmi et al., 2011), *Streptomyces* (Tapia and Simoes, 2008) ve *Pseudomonas sp.*, MS21 (Tork et al., 2010) tüy hidrolizi için kullanılan proteaz üreticileridir (Kainoor, 2010).

### **İlaç endüstrisi**

Mikrobiyal kaynaklardan üretilen proteazlar, cilt yaraları, kanser, kistik fibrozis, kalp problemleri, sindirim bozuklukları ve enfeksiyon gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Chanalia et al., 2011). Subtilisin veya kollajenaz, çeşitli antibiyotiklerle kombinasyon halinde yanık ve yaraları tedavi etmek için kullanılır. Litik enzim eksikliği sendromu olan hastalarda sindirim sistemi düzenleyicisi olarak *A. oryzae*'den izole edilen enzim kullanılmıştır. Çeşitli lenfositik lösemi hastalarının kan dolaşımından asparajini uzaklaştırmak için *E. coli*'den elde edilen asparajinazdan yararlanılmıştır (Kurdya and Simonenko, 1994; Rao et al., 1998; Gupta et al., 2002).

### **Tekstil endüstrisi**

Tekstil sanayinde proteazlar, ürünlerin ön işlenmesinde kullanılmaktadır. Yün ve ham ipeği işlemek, keçeleşmeyi önlemek, boyar madde verimini artırmak, ürünlere parlaklık ve beyazlık katmak için proteazlardan faydalanılmaktadır. Yün liflerine uygulanan proteaz, büzülmeyi önleyerek kullanılan klorlu reçinelere farklı bir seçenek olabilir (Contesini et al., 2018). Yün malzemeler papain, pronaz ve pepsin ile işlenerek lif esnekliği sağlanır ve doğal lekelerden arındırılarak daha beyaz bir renk elde edilir. Ham ipek liflerini kaplayan, liflere kabarık bir yapı veren ve ipeğin ağırlığının %25'ini oluşturan yapışkan bir madde olan serisin, genellikle nişasta kullanılarak liften çıkarılır. Fakat bu yöntem oldukça maliyetli bir işlemdir. Proteazlar ile serisinin uzaklaştırılması kısa sürede ve daha az maliyetle yapılarak alternatif bir yöntem olarak kullanılmaktadır (Duman, 2008).

### **Bakım ürünleri**

Kozmetik endüstrisinde proteazlar, deride bulunan keratin, elastin ve kollajeni oluşturan peptit bağlarının hidrolizini katalize eder. Diş macunlarında, istenmeyen tüylerin yok edilmesini sağlayan ürünlerde, saç bakımı ürünlerinde ve kontak lens solüsyonlarında kullanılmaktadır. Kolajenöz hidrolizat ve elastin maddeleri, sığır tendonlarının hidroliziyle elde edilerek cilt ve saç bakım ürünlerinde yararlanılmaktadır (Güngör, 2011). Bromelain, papain ve diğerleri gibi proteazlar cildin soyulmasında kullanılmıştır. Bu proteazların işlevi, hücre yenilenmesi, ölen hücrelerin epidermisten uzaklaştırılması ve benzer hücreleri yeniden oluşturmasıdır (Silva, 2017). *B. licheniformis* ZJUEL31410'dan elde edilen keratinazların kozmetik endüstrisinde kullanım potansiyeline sahip olduğu bildirilmiştir (Ni et al., 2011).

## Van Gölü

Van Gölü, dünyanın en büyük sodalı gölüdür. Ayrıca Türkiye'de bulunan en büyük göldür. Bitlis ile Van İl sınırları arasında, volkanik Nemrut Dağı'nın patlaması sonucu oluşan kraterde biriken suların oluşturduğu volkanik set gölüdür. Van Gölü'nün tatlı su ve deniz suyundan farklı bir sucul ekosistemi vardır. pH değeri 9,52 düzeyinde olan Van Gölü suyu acı, tuzlu ve sodalıdır. Bor ve sodyum karbonatın varlığı ayrıca volkanik kayaçların fazla olması tuz oranının yüksek olmasına neden olmaktadır. Tuz konsantrasyonu %0,224'tür. Sudaki tuz bileşenlerinin aralarındaki oranları; %42 NaCl, %34 NaCO<sub>3</sub>, %16 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, %3 KSO<sub>4</sub> ve %2,5 MgCO<sub>3</sub> olarak belirlenmiştir (Çiftçi et al., 2008).

### *Exiguobacterium alkaliphilum*

*E. alkaliphilum*, *Exiguobacteria* cinsine ait, Gram pozitif, hücre uzunluğu 2,5 µm, hücre genişliği 0,8 µm, hücre şekli basil olan, turuncu renkli pigment üreten, alkalifilik, hareketli bir bakteridir (Kulshreshtha et al., 2013). *Exiguobacteria* cinsi Collins ve arkadaşları (1983) tarafından alkalifilik *E. aurantiacum* türünün patates atık su çıkışından izole edilmesiyle tanımlanmıştır (Collins et al., 1983). *E. acetylicum* (Farrow et al., 1994), *E. aestuarii* (Kim et al., 2005), *E. algae* (Liu et al., 2021), *E. alkaliphilum* (Kulshreshtha et al., 2013), *E. antarcticum* (Frühling et al., 2002), *E. aquaticum* (Raichand et al., 2012), *E. arabatum* (Cong et al., 2017), *E. artemiae* (López-Cortés et al., 2006), *E. aurantiacum* (Collins et al., 1983), *E. chiriquhucha* (Gutiérrez-Preciado et al., 2017), *E. enclense* (Dastager et al., 2015), *E. flavidum* (Meng et al., 2020), *E. himgiriensis* (Sing et al., 2013), *E. homiense* (Sivaprakasam et al., 2008), *E. indicum* (Chaturvedi and Shivaji, 2006), *E. marinum* (Kim et al., 2005), *E. mexicanum* (López-Cortés et al., 2006), *E. oxidotolerans* (Yumoto et al., 2004), *E. pavilionensis* (White 2013), *E. profundum* (Crapart et al., 2007), *E. qingdaonense* (Liu et al., 2021), *E. sibiricum* (Rodrigues et al., 2006), *E. soli* (Chaturvedi et al., 2008) ve *E. undae* (Frühling et al., 2002) bu cinsin bilinen türleri arasında yer almaktadır.

*E. alkaliphilum* türü ilk kez Kulshreshtha ve arkadaşları tarafından bir içecek endüstrisi tesisinin alkali atık su tahliyeli çamurundan izole edilerek taksonomik çalışmaları gerçekleştirmiştir (Kulshreshtha et al., 2013). *Exiguobacteria*, Bacillota şubesinin düşük GC içeriğine sahip bir üyesidir. Bu cinse ait türlerin ekstrem koşullara dayanıklı oldukları bilinmektedir ve birçok türü çoğu mikroorganizma için stresli kabul edilen habitatlardan izole edilmiştir (Delegan et al., 2021). Değişken sıcaklık uçlarında hayatta kalma yetenekleri, bu cinsi önemli bir çalışma alanı haline getirir. Ayrıca, dinamik termal adaptasyona ek olarak bazı suşları halotolerant olup %13 NaCl varlığında gelişebilir, bazıları geniş bir pH değeri aralığında (5-11) büyüyebilirler, yüksek düzeyde UV radyasyonunu ve arsenik dahil ağır metal stresini

tolere edebilirler (Ordoñez et al., 2013). Optimal olmayan koşullarda gelişebilen ve araştırmalar için ilgi çekici *Exiguobacteria* cinsine ait olan *E. alkaliphilum* biyoteknolojik potansiyeli yeterince çalışılmamış bir türdür.

**Tablo 1.** *E. alkaliphilum* Bilimsel Sınıflandırılması

Alem	Bacteria
Şube	Bacillota
Sınıf	Bacilli
Takım	Caryophanales
Familya	Bacillaceae
Cins	<i>Exiguobacterium</i>
Tür	<i>E. alkaliphilum</i>

### Proteaz Enzimiyle Daha Önce Yapılan Çalışmalar

Geniş kullanım alanlarından dolayı oldukça ilgi çekici enzimler olan mikrobiyal proteazların üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonuna yönelik çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Ancak, *Exiguobacterium* cinsine ait proteazlarla ilgili oldukça sınırlı çalışma, *E. alkaliphilum* türüne ait proteazlarla ilgili ise herhangi bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. En yakın türlerden biri olan *E. aurantiacum* ZBB13 suşu, Hindistan yakınlarındaki Kuzey Canara bölgesindeki bir ormanın nemli toprağından izole edilmiştir (Zabin et al., 2021) ve bir başka yakın tür *E. indicum* TBG-PICH-001 suşu Hindistan'ın Tamil Nadu Eyaleti'ndeki Pichavaram Haliç toprak örneklerinden izole edilmiştir (Kumar et al., 2018). Bu suşlardan elde edilen proteaz enzimlerinin saflaştırılması ve kısmi karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş ancak enzimler herhangi bir uygulama alanında kullanılmamışlardır. Güney Kore'de deterjan endüstrisiyle ilişkili topraklardan elde edilen *E. profundum* türü ile gerçekleştirilen bir çalışmada ise proteaz üretim koşullarının istatistiksel optimizasyonu yapılmıştır (Anbu et al., 2013).

En iyi proteaz üreticileri arasında başta gelen *Bacillus sp.* türleriyle ise oldukça fazla çalışma gerçekleştirilmiştir. Rekik ve arkadaşları (2019) yaptıkları çalışmada Tunus açıklarındaki bir petrol sahasından izole ettikleri *B. safensis* RH12'den yüksek aktiviteye (9,000 U/mL) sahip proteaz üretimini gerçekleştirmişlerdir. Daha sonra enzimi amonyum sülfat çöktürmesi ve anyon değiştirme kromatografisi kullanarak saflaştırmışlardır. Saflaştırılan enzimin, 28 kDa moleküler ağırlığa sahip olduğunu, pH 9 ve 60 °C'de optimum aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir. Fenilmetansülfonil florür (PMSF) ve diiyodopropil florofosfat (DFP) tarafından güçlü bir şekilde inhibe edildiği, dolayısıyla serin proteaz ailesine ait

olduğunu düşünmüşlerdir. Enzimin sıcaklık ve pH stabilitesine baktıklarında, 50 °C'de aktivitesinin %85'ini ve pH 11'de %75'ini koruduğunu tespit etmişlerdir. Son olarak enzimin yıkama performansını araştırmışlar ve 30 dakika boyunca 40 °C'de oldukça iyi leke çıkarma etkisine sahip olduğunu göstermişlerdir.

Karray ve arkadaşları (2021) yaptıkları çalışma ile *B. stearrowthermophilus*'tan üretilen yeni bir alkalın ve termofilik proteazın optimum kültür koşullarını ve karakterizasyonunu sağlamışlardır. Mikrobiyal gelişim ve proteaz üretimi için optimum kültür koşulları araştırılmış; sıcaklık 55 °C, pH 10 ve inkübasyon süresi 24 saat olarak bulunmuştur. Azot kaynağı olarak %3 maya özütünün, karbon kaynağı olarak galaktozun (7,5 g/L) kullanılması enzim aktivitesini artırmıştır. Daha sonra 59,02 (U/mg) spesifik aktivite ile saflaştırılan proteaz enziminin yaklaşık 28 kDa'lık bir moleküler ağırlığa sahip olduğu belirlenmiştir.

Lima ve arkadaşları (2021), *A. terreus* 7461'in ürettiği proteaz enzimini saflaştırarak karakterize etmişlerdir. Proteaz, kromatografik işlemlerle 2,3 kat saflaştırılmış ve moleküler ağırlığı 90 kDa olarak hesaplanmıştır.  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla  $0,65 \pm 0,03$  mg/mL ve  $3,66 \pm 0,18$   $\mu$ mol/dk olarak bulunmuştur. Maksimum sıcaklık ve pH değeri sırasıyla 50 °C ve 6,5 olarak bulunmuştur. Enzimin 50 °C sıcaklıkta 1 saate kadar stabil kalabildiği belirlenmiştir. Proteazın, Tween 80 gibi deterjanlara ve organik çözücülere karşı oldukça kararlı olduğu tespit edilmiştir. Enzim  $Ca^{2+}$  tarafından aktive edilirken  $Hg^{2+}$  ve  $Cu^{2+}$  tarafından inhibe edilmiştir. Enzim, PMSF tarafından inhibe edildiği için de serin proteaz olduğu düşünülmüştür.

El-Khonezy ve arkadaşları (2021), *A. ochraceus* BT21'den elde ettikleri proteaz enzimini, amonyum sülfat çöktürmesi ve kromatografik işlemler yaparak saflaştırmışlardır. Saflaştırmanın ardından SDS-PAGE analizi yaparak enzimin moleküler ağırlığını 59,0 kDa olarak hesaplamışlardır. Enzimi 15,13 kat, %59,7 verimle ve 111379,5 U/mg spesifik aktivite ile saflaştırmışlardır. Enzimin, sırasıyla 50 °C ve 8,0'da optimum sıcaklık ve pH değerlerine sahip olduğu belirlenmiştir. Saflaştırılan enzimin geniş bir sıcaklık (20–60 °C) ve pH (5,0–11,0) aralığında stabil kalabildiğini gözlemlemişlerdir.

Başka bir çalışmada, Wang ve arkadaşları (2022) tarafından izole edilen *Staphylococcus xylosus* A2'den üretilen proteaz enzimi saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Saflaştırılmış enzimin moleküler ağırlığı yaklaşık 21,5 kDa olarak hesaplanmıştır. Enzim aktivitesi pH 6,0'da ve 50 °C'de en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Proteaz enzim pH'sı 4,0–8,0 ve sıcaklığı 20–50 °C değerleri arasında stabilite göstermiştir. Proteaz aktivitesi,  $Ca^{2+}$  ve  $Zn^{2+}$  iyonları tarafından aktive edilerek önemli ölçüde artış göstermiştir. Proteazın  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla 2,94 mg/mL ve 19,45 U/mL.dk olarak bulunmuştur.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Materyal

#### Mikroorganizmalar

Tez kapsamında kullanılan mikroorganizmalar Van Gölü suyundan elde edilmiştir. Van Gölü'nden ilkbahar-yaz aylarında, 5 farklı lokasyondan (Lokasyon 1: 38.520198, 43.314473; Lokasyon 2: 38.519975, 43.314420; Lokasyon 3: 38.560919, 43.279049; Lokasyon 4: 38.561058, 43.277415; Lokasyon 5: 38.427937, 43.255904), 3'er tane su örneği steril falkon tüplerine alınmış, soğukta muhafaza edilerek Atatürk Üniversitesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarına getirilmiş ve 4 °C'de muhafaza edilmiştir.

#### Kullanılan cihazlar

Çalkalamalı inkübatör (Binder BD53), buzdolabı (Siemens KS 42431), derin dondurucu (Arçelik), pH metre (InoLab pH730 wtw Series), dikey elektroforez (BioRad), manyetik karıştırıcı (Daihan Scientific MSH 20A), hassas terazi (Enver), mikroskop (Olympus Europa SE & CO. KG), spektrofotometre (UV mini-1240 UV-VIS Shimadzu), su banyosu (CB2 5Q2, Grant Instruments Ltd., Barrington), santrifüj (Hereus Christ Hereus Christ UJ III) soğutmalı santrifüj (Zentrifugen D-78532), etüv (Elektro-mag), distile su cihazı (GFL 2004), vorteks (Heidolph Reax Top) ve otoklav (HMC Hirayama Hiclava HV-50L) çalışmada kullanılan cihazlardır.

#### Kullanılan kimyasallar

NaCl (Sodyum Klorür) (Merck), CH<sub>3</sub>COOH (Asetik Asit) (Merck), CCl<sub>3</sub>COOH (Trikloroasetik Asit) (Carlo Erba), CH<sub>3</sub>COONa (Sodyum Asetat) (Carlo Erba), NaOH (Sodyum Hidroksit) (Carlo Erba), C<sub>8</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>N<sub>2</sub> (Süt Kazeini) (Merck), ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (Amonyum Sülfat) (Teknik), Tris-HCl (Merck), HCl (Hidroklorik Asit) (Merck), BSA (Sigma), tirozin (Sigma), BCA (Sigma), NaCO<sub>3</sub>. H<sub>2</sub>O (Sodyum Karbonat) (Merck), NaHCO<sub>3</sub> (Sodyum Bikarbonat) (Merck), CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (Bakır Sülfat) (Merck), C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>NO (Akrilamit) (Biorad), Bis-akrilamit (Biorad), Tris (Merck), SDS (Sigma), [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>] (APS) (Sigma), TEMED (Biorad), gliserol (Merck), β-Merkaptoetanol (Merck), Bromofenol mavisi (Merck), glisin (Merck), coomassie parlak mavisi R-250 (Sigma), Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards (Biorad) ve CH<sub>3</sub>OH (Metanol) (Merck) çalışmada kullanılan kimyasallardır.

### **Kullanılan çözeltilerin ve tamponların hazırlanışları**

**Gliserol stok çözeltisi (%20):** 40 mL nutrient broth (NB) ve 10 mL gliserol ayrı ayrı sterilize edildi. Saklama tüplerine 1200 µL NB, 300 µL gliserol eklenerek çözelti kullanıma hazır hale getirildi.

**Glisin NaOH tamponu (50 mM):** 3,75 g glisin ve 0,35 g NaOH, 1 L distile su içerisinde çözülerek hazırlandı.

**Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) çözeltisi (%3):** Katalaz testi için kullanıldı. 100 mL distile su içerisine 3 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ilavesiyle hazırlandı.

**Hidroklorik asit çözeltisi (HCl, 2N):** Besiyerlerinde pH ayarlanması için hazırlandı. 17,56 mL %37'lik HCl alınıp son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

**Kazein çözeltisi (%0,6):** 0,6 g kazein 100 mL 50 mM Glisin NaOH tamponu, pH 9 içerisinde çözülerek hazırlandı.

**Potasyum hidroksit çözeltisi (KOH, %3):** Bakterilerin Gram özelliklerini belirlemek için kullanıldı. 100 mL distile su içerisine 3 g KOH ilavesiyle hazırlandı.

**Sodyum hidroksit çözeltisi (NaOH, 2N):** Besiyerlerinde pH ayarlamak için kullanıldı. 8,01 g NaOH 80 mL distile su ile çözündürüldükten sonra hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

**Sodyum karbonat çözeltisi (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,5 M):** 52,9 g sodyum karbonat 1 L distile suda çözülerek hazırlandı.

**Trikloroasetik asit çözeltisi (TCA, 0,1 M):** 16,32 g TCA 1 L distile suda çözülerek hazırlandı.

### **Lowry Protein Tayin Solüsyonları**

Solüsyon A: 2 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 100 mL 0,1 N NaOH içinde çözülerek hazırlandı.

Solüsyon B: %1 Sodyum potasyum tartrat: 0,1 g sodyum potasyum tartrat 10 mL distile suda çözülerek hazırlandı.

Solüsyon C: %0,5 CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O: 0,05 g CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 10 mL distile suda çözülerek hazırlandı.

Solüsyon D: 48 mL solüsyon A, 1 mL solüsyon B ve 1 mL solüsyon C kullanmadan hemen önce karıştırılarak hazırlandı.

Solüsyon E (Fenol Reagent): 1 kısım Folin-fenol reaktifi [2N], 1 kısım su ile kullanmadan hemen önce karıştırılarak hazırlandı.

BSA (Sığır Serum Albümin): 1 mg BSA, 1 mL suda çözülerek hazırlandı.

### **SDS-PAGE Solüsyonları**

a. Ayırıcı jel tamponu: 18,5 g tris ve 0,4 g SDS 80 mL distile suda çözüldü. HCl ile pH 7'ye ayarlandı ve son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı. Filtre edilip 4 °C'de saklandı.

b. Yığıma jel tamponu: 5,1 g tris ve 0,4 g SDS 80 mL distile suda çözüldü. HCl ile pH 6,7'ye ayarlandı, son hacim 100 mL'ye tamamlandı. Filtre edilip 4 °C'de saklandı.

c. Amonyum persülfat (25%): 1 g amonyum persülfat (APS) 4 mL distile suda çözüldü.

d. 10x yürütme tamponu: 30 g tris, 144 g glisin ve 10 g SDS 900 mL distile suda çözüldü. HCl ile pH 8,3'e ayarlandı, son hacim 1 L'ye tamamlandı. Filtre edilip 4 °C'de saklandı.

e. Örnek tamponu (4X): 2 mL 20% SDS, 1 mL 1 M tris-HCl (pH 7), 1 mL gliserol ve birkaç parça bromofenol blue karıştırıldı. Tampon oda sıcaklığında saklandı. Kullanmadan önce son konsantrasyonu 20% olacak şekilde merkaptotanol eklendi.

f. Coomassie brilliant blue boya solüsyonu (0,1–0,5 µg/track): 2,5 g Coomassie Brilliant Blue R-250 450 mL metanolde çözüldü ve üzerine 70 mL asetik asit eklendi. Son hacim suyla 1 L'ye tamamlandı. Hazırlanan boya oda sıcaklığında karanlık şişede saklandı.

g. Boya uzaklaştırma solüsyonu: 250 mL metanol ve 75 mL asetik asit karıştırıldı. Son hacmi suyla 1 L'ye tamamlandı. Hazırlanan boya oda sıcaklığında karanlık şişede saklandı.

### **Kullanılan besiyerleri**

**Nutrient broth (NB):** Bakterileri izolasyonu ve geliştirilmesinde kullanıldı. 8 g NB tartılarak hacmi distile su ile 1 L'ye tamamlandı. Manyetik karıştırıcıda çözüldükten sonra 250 mL'lik erlenlere 50'şer ml aktarıldı ve 15 dakika 121 °C'de 1,5 atmosfer basınçta steril edildi.

**Nutrient agar (NA):** Bakterilerin katı ortamda geliştirilmesi, kısa süreli korunması ve pasajlanmasında kullanıldı. 20 g NA tartılarak distile su ile 1 L hacme tamamlandı ve 15 dakika 121 °C'de 1,5 atmosfer basınçta steril edildi. Besiyeri 50 °C'ye soğutulduktan sonra steril petri kaplarına aktarıldı.

**Tribütirin agar (TBA):** Bakteri izolatlarının lipaz üretme kabiliyetlerinin olup olmadığını belirlemek için hazırlandı. Bunun için 5 g peptone, 3 g maya özütü, 10 mL gliseril tribütirat ve 15 g agar tartılarak distile su ile 1 L hacme tamamlandı. 15 dakika 121 °C'de 1,5 atmosfer basınçta steril edildi. Besiyeri 50 °C'ye soğutulduktan sonra steril petri kaplarına aktarıldı.

**Tryptic soy agar (TSA):** Bakterileri izole etmek ve geliştirmek amacıyla kullanıldı. Bunun için 40 g TSA tartılarak distile su ile 1 L hacme tamamlandı. 15 dakika 121 °C’de 1,5 atmosfer basınçta steril edildi. Besiyeri 50 °C’ye soğutulduktan sonra steril petri kaplarına aktarıldı.

**Yağsız süt tozu içeren agar (Skim milk agar - SMA):** Katı besi ortamında bakterilerin ekstraselüler proteaz üretimlerinin kontrolünde kullanıldı. Bu ortamda gelişen kolonilerin çevresinde oluşan proteolitik zon çapı ölçülerek proteaz üretimleri kalitatif olarak tespit edildi. %1 oranında yağsız süt tozu, NA içerisine eklenerek 121 °C’de 1,5 atmosfer basınçta 15 dakika sterilize edildi ve petri kaplarına dökülerek tamamen soğuması sağlandı.

**Yumuşak agar besiyeri:** Bakteri izolatlarının hareket kabiliyetlerinin olup olmadığını belirlemek için hazırlandı. Bunun için 50 mL distile su içerisine 0,5 g NA eklenerek cam deney tüplerine aktarılıp 121 °C’de 1,5 atmosfer basınçta 15 dakika sterilize edildi. Otoklavdan sonra iyice karıştırılarak homojen bir şekilde soğuması sağlandı.

**Sıvı proteaz üretim ortamı:** Bakteri izolatlarının sıvı ortamda proteaz üretimleri için kullanıldı. 5 g kazein, 2 g maya özütü, 5 g pepton, 5 g NaCl, 0,2 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,1 g CaCl<sub>2</sub> ve 1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 L saf su içinde çözüldü ve pH 9,0’a ayarlandıktan sonra 250 mL erlenlere 50 mL aktarılarak 15 dakika 121 °C’de 1,5 atmosfer basınçta steril edilerek kullanıldı.

**Nişastalı NA besiyeri:** İzolatların ortamdaki nişastayı parçalama özelliğini belirlemek için amilaz testinde kullanıldı. Bunun için 20 g NA ve 10 g çözünebilir nişasta tartılarak distile su ile hacmi 1 L’ye tamamlandı. 15 dakika 121 °C’de 1,5 atmosfer basınçta steril edildi.

**Üreli NA besiyeri:** Üreyi hidrolize eden izolatları tespit etmek için kullanıldı. Bunun için 20 g NA ve 0,012 g fenol kırmızısı tartılarak distile su ile 1 L hacme tamamlandı. 15 dakika 121 °C’de 1,5 atmosfer basınçta steril edildi. Sterilizasyondan sonra besiyeri katılaşmadan önce içerisine %20 oranında 20 mL üre steril filtreden geçirilerek eklendi ve petri kaplarına dökülerek tamamen soğuması sağlandı.

## **Yöntem**

### **Bakterilerin izolasyonu ve saklanması**

Van Gölü’nden temin edilen su örneklerinden doğrudan ve serum fizyolojik içinde çeşitli oranlarda seyreltmeler yapılarak pH 8,0-12 aralığında hazırlanan NA ve TSA besiyerlerine inokülasyonları yapıldı ve 30 °C’de inkübe edildi. Gelişen kültürlerden, tek koloni ekimleri yapılarak saf kültürler elde edildi. Saf kültürlerin gliserol stokları hazırlanıp -80 °C’de muhafaza edildi.

### **Kalitatif proteaz aktivite tayini**

Saf kültürlerin proteaz aktivitesine sahip olup olmadıkları SMA besiyerinde proteolitik zon oluşturma esasına göre değerlendirildi. SMA üzerine ekimi yapılan saf kültürler 30 °C'de inkübe edilerek 2 gün boyunca zon oluşumu takip edildi. Oluşan şeffaf zonların genişliğine göre proteaz üreticileri seçildi.

### **Kantitatif proteaz aktivite tayini**

Şeffaf proteolitik zonların genişliğine göre seçilen proteaz üreticilerinin kantitatif proteaz aktivite tayinleri spektrofotometrik olarak kazein hidroliziyle ortaya çıkan tirozinin 660 nm dalga boyundaki absorbans ölçümüyle gerçekleştirildi (Folin and Ciocalteu, 1929). Bunun için ilk olarak sıvı proteaz üretim ortamında 2 gün inkübe edilen kültürler 10000 rpm, 4 °C'de 5 dk santrifüjlenerek, hücre içeriğinden ayrılmış üst faz ham enzim olarak kullanıldı. 0,5 mL ham enzim ve 2,5 mL %0,6'lık kazein çözeltisi karıştırıldı ve 30 °C'de 10 dk inkübe edilerek hidroliz tepkimesi gerçekleştirildi. Reaksiyon 2,5 mL 0,1 M TCA çözeltisi ile durduruldu. Bu karışım 30 °C'de 10 dakika bekletildi ve daha sonra Whatman No:1 filtre kağıtlarıyla süzülerek parçalanmayan kazeinler uzaklaştırıldı. Filtrattan 0,25 mL alınarak 2,5 mL 0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ve 0,5 mL 1 N Folin-ciocalteu fenol reaktifi ile karıştırıldı ve oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi. Karışımın absorbansı spektrofotometrede 660 nm'de ölçüldü ve enzim aktivitesi hesaplamasında kullanıldı. Tüm deneyler üç tekrar halinde yapıldı.

### **Tirozin standart grafiğinin hazırlanması**

Aktivite hesaplamasında kullanılacak olan tirozin standart grafiğinin belirlenmesi için 50 mM Glisin-NaOH, pH 9,0 tamponunda 2,2 mM L-tirozin stok çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan bu stok çözeltilerden 0,055-0,55 mmol konsantrasyonlardan 500 µL alınıp, 2,5 mL 0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ve 500 µL Folin-ciocalteu fenol ile karıştırılıp, oda sıcaklığında 30 dk bekletildi. Daha sonra spektrofotometrede OD660 nm'de ölçümü yapılarak sonuçlar doğrultusunda tirozin standart grafiği çizildi. Bu grafik aktivite hesabında kullanıldı.

Tirozin standart grafiğinden faydalanarak bir ünite proteaz aktivitesi, 1 dakikada 1 µg tirozin açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlandı ve aşağıdaki denklem kullanılarak aktivite hesaplandı.

Proteaz Aktivitesi (U/mL) = [Açığa çıkan tirozin miktarı (µg) x Toplam reaksiyon hacmi (mL) / Enzim hacmi (mL) x İnkübasyon süresi (dk)] x Seyreltme faktörü

## **Bakterilerin tanınması**

### **Klasik yöntemle tanılama**

Seçilen bakterilerin klasik yöntemlerle tanınmasında morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler uygulandı.

**Koloni morfolojisi:** Bakteri türleri ve grupları için tanımlayıcı özellikte olan yöntem, Van Gölü izolatlarının NA besiyerinde oluşturdukları farklı kolonileri renk ve şekline göre ayırmak için kullanıldı.

**Hareket testi:** Hazırlanan yumuşak dik agarlı besiyerine, 24 saatlik bakteri izolatlarından iğne öze ile ekimi yapıldı. 30 °C'lik etüvde inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün besiyerinde gelişimine bakılarak bakterinin hareket özelliği değerlendirildi.

**Katalaz testi:** Bakterilerde katalaz enziminin varlığının araştırıldığı testtir. 24 saatlik bakteri izolatlarından bir öze dolusu alınarak lam üzerine aktarıldı. Lam üzerine %3 oranındaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi damlatıldı. Hava kabarcığı oluşturma esasına göre izolatlar değerlendirildi (Reiner, 2010).

**Hemoliz testi:** : Bakterilerde hemolitik aktivite varlığının araştırıldığı testtir. Kanlı agarda (%5 koyun kanı içeren) gelişen bakterilerin hemolitik enzimleriyle eritrositleri parçalaması prensibine dayanır. Kanlı agara ekilen izolatlar etüvde 30 °C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda izolatların çevresinde oluşan şeffaf zona göre değerlendirildi (Gurkok, 2022).

**KOH testi:** KOH testi Gram boyama reaksiyonunda olduğu gibi bakteri hücre duvarının kimyasındaki farklılıklara dayanır. 24 saatlik bakteri izolatlarının her birinden bir öze dolusu alınarak lam üzerine yayıldı ve %3' lük KOH çözeltisinden birkaç damla alınarak bakteri üzerine döküldü, iyice karışması sağlandı. Lam üzerinde KOH ile muamele edilmiş izolata öze daldırıldıktan sonra yukarıya doğru kaldırıldı. İzolatların öze ile lam arasında uzama (sünme) oluşumuna bakılarak Gram pozitif veya negatif olma özellikleri değerlendirildi (Moyes et al., 2009).

**Üreaz testi:** Üreyi hidrolize eden bakteri izolatlarını tespit etmek için kullanıldı. Üre agar ortamına bakteri izolatlarının ekimi yapılarak 30 °C'lik etüvde 24 saatlik inkübasyona alındı. İzolatlar üreyi parçaladıktan sonra besiyerinde oluşturdukları renk değişimine göre üreaz enzimini sentezleyebilme yetenekleri değerlendirildi (Brink, 2010).

**Lipaz testi:** İzolatların lipaz enzimi üretebilme özelliklerinin belirlenmesi için bu test yapıldı. TBA ortamına bakteri izolatlarının ekimi yapılarak 30 °C'lik etüvde 24 saatlik inkübasyona alındı. İzolatların TBA ortamında oluşturdukları koloni çevresinde şeffaf zon

oluşumuna göre lipaz enzimini sentezleyebilme yetenekleri değerlendirildi (Gurkok and Ozdal, 2021).

**Amilaz testi:** İzolatların amilaz enzimi üretebilme özelliklerinin belirlenmesi için bu test yapıldı. Nişastalı NA ortamına bakteri izolatlarının ekimi yapılarak 30 °C'lik etüvde 24 saatlik inkübasyona alındı. İnkübasyon sonrası besiyerine yavaşça lügol eklendi. Böylece besiyerinin renk değişimi sırasında izolat çevresinde oluşan şeffaf zon varlığına göre amilaz enzimini sentezleyebilme yetenekleri değerlendirildi (Pranay et al., 2019).

**Selülaz testi:** %1 karboksimetil selüloz (CMC) içeren NA ortamına bakteri izolatlarının ekimi yapılarak 30 °C'lik etüvde 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası, bakterilerin geliştiği plağa %0,1 Congo-red solüsyonu dökülerek 30 dakika boyunca boyanmaları sağlandı. Süre sonunda 1 M NaCl solüsyonu ile boya plaklardan uzaklaştırıldı. Congo-red ile CMC kırmızıya boyanacağından, kırmızı zeminde sarımsı zon oluşturan koloniler selülaz pozitif olarak belirlendi (Kılıçer and Özcan, 2015).

#### **Moleküler yöntemlerle tanılama**

İzolatların moleküler karakterizasyonları 16S rDNA sekans analizleri ile yapılmıştır. Bakteri izolatlarının hizmet alımıyla elde edilen DNA dizileri FASTA formatında National Center for Biotechnology Information (NCBI) websitesinde BLAST programı kullanılarak GenBank veritabanı ile karşılaştırılmış ve izolatların tür seviyesinde tanılamaları gerçekleştirilmiştir.

#### **En yüksek proteaz üreten bakteri izolatının çoğaltılması ve proteaz üretim koşullarının optimizasyonu**

En yüksek proteaz üreten bakteri izolatını çoğaltmak için gliserol stoğundan bir öze örnek alınarak, NA besiyerine ekildi ve 30 °C'de 1 gün inkübe edildi. İnkübasyonun ardından gelişen koloniler NB besiyerinde 30 °C sıcaklıkta 1 gün inkübasyona bırakılarak çoğaltıldı. Gelişen kültür, %1 (OD<sub>600</sub>-1) oranında proteaz üretimi için aşı kültür olarak kullanıldı.

Bu izolatın proteaz üretim koşullarının optimizasyonu için en yüksek aktivite görülen inkübasyon süresi, inkübasyon sıcaklığı, başlangıç pH'sı, farklı azot ve karbon kaynakları ile tuz konsantrasyonları araştırıldı.

#### **İnkübasyon süresinin belirlenmesi**

En yüksek proteaz ürettiği günü belirlemek için bakteri izolatı 5 gün boyunca sıvı proteaz üretim ortamında 185 rpm'de 30 °C'de inkübasyona bırakıldı ve mikrobiyal gelişimi ile proteaz üretimi takip edildi.

### **İnkübasyon sıcaklığının mikrobiyal gelişim ve proteaz üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi**

Bakteriyel gelişim ve proteaz üretiminde en uygun sıcaklığın belirlenmesi için bakteri izolatu sıvı proteaz üretim ortamında 10, 20, 30, 40 ve 50 °C sıcaklıklarda, çalkalamalı inkübatörde 185 rpm'de 2 gün inkübe edildi. Kültürlerden alınan örneklerde proteaz üretimi ve mikrobiyal gelişim belirlendi.

### **Başlangıç pH'sının mikrobiyal gelişim ve proteaz üretimine etkisinin belirlenmesi**

Proteaz üretim besiyeri hazırlanarak başlangıç pH'sı 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12'ye ayarlandı. Besiyeri 121 °C de 15 dk otoklavda steril hale getirildikten sonra bakteri inokülasyonu gerçekleştirildi. Ardından çalkalamalı inkübatörde 185 rpm'de 2 gün inkübe edildi. Kültürlerden alınan örneklerde proteaz üretimi ve mikrobiyal gelişim belirlendi.

### **Azot kaynaklarının mikrobiyal gelişim ve proteaz üretimine etkisinin belirlenmesi**

Sıvı proteaz üretim ortamındaki kazein, maya özütü ve pepton yerine %1 oranında farklı azot kaynakları (pepton, et özütü, maya özütü, yağsız süt, kazein, tripton, jelatin, NaNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl ve üre) tek başlarına besiyerine eklendi. NaOH kullanılarak pH 9'a ayarlandı. Besiyeri steril hale getirildikten sonra bakteri inokülasyonu gerçekleştirildi. Ardından çalkamalı inkübatörde 185 rpm'de 2 gün inkübe edildi. Kültürlerden alınan örneklerde proteaz üretimi ve mikrobiyal gelişim belirlendi.

### **Azot kaynağının proteaz üretimi için optimum konsantrasyonunun belirlenmesi**

Sıvı proteaz üretim ortamındaki pepton ve kazein yerine farklı konsantrasyonda (%0,5, %1, %1,5, %2 ve %2,5) en iyi azot kaynağından eklendi. NaOH kullanılarak pH 9'a ayarlandı. Besiyeri steril hale getirildikten sonra bakteri inokülasyonu gerçekleştirildi ve çalkamalı inkübatörde 185 rpm'de 2 gün inkübasyona bırakıldı. Proteaz üretimi ve mikrobiyal gelişimi takip edildi.

### **Karbon kaynaklarının mikrobiyal gelişim ve proteaz üretimine etkisinin belirlenmesi**

Sıvı proteaz üretim ortamına %1 oranında farklı karbon kaynakları (glukoz, fruktoz, sükroz, laktoz, nişasta, melas, gliserol, mannitol) tek başlarına eklendikten sonra NaOH kullanılarak pH 9'a ayarlandı. Steril hale getirilen besiyerine bakteri inokülasyonu yapılarak çalkalamalı inkübatörde 185 rpm'de 2 gün inkübe edildi. Kültürlerden alınan örneklerde proteaz üretimi ve mikrobiyal gelişim belirlendi.

## **Karbon kaynağının proteaz üretimi için optimum konsantrasyonunun belirlenmesi**

Sıvı proteaz üretim ortamına farklı konsantrasyonlarda (%0,5, %1, %1,5, %2 ve %2,5) en iyi karbon kaynağı eklendi. NaOH kullanılarak pH 9'a ayarlandı. Besiyeri steril hale getirildikten sonra bakteri inokülasyonu gerçekleştirildi ve çalkamalı inkübatörde 185 rpm'de 2 gün inkübasyona bırakıldı. Proteaz aktivitesi ve mikrobiyal gelişimi takip edildi.

## **NaCl konsantrasyonlarının mikrobiyal gelişim ve proteaz üretimine etkisi**

Sıvı proteaz üretim ortamında bulunan NaCl, farklı konsantrasyonlarda (%2, %4, %6, %8, %10 ve %12) hazırlanarak pH'sı 9'a ayarlandı. Steril hale getirilen besiyerine bakteri inokülasyonu gerçekleştirildi ve çalkalamalı inkübatörde 185 rpm'de 2 gün inkübasyona bırakıldı. Mikrobiyal gelişimi ve proteaz üretimi takip edildi.

## **Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> Konsantrasyonlarının mikrobiyal gelişim ve proteaz üretimine etkisi**

Sıvı proteaz üretim ortamından NaCl çıkarılarak yerine farklı konsantrasyonlarda (%2, %4, %6, %8, %10 ve %12) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> eklendi. pH'sı 9'a ayarlandı. Steril hale getirilen besiyerine bakteri inokülasyonu yapılarak çalkalamalı inkübatörde 185 rpm'de 2 gün inkübasyona bırakıldı. Mikrobiyal gelişimi ve proteaz üretimi takip edildi.

## **Enzimin saflaştırılması**

### **Amonyum sülfat çöktürmesi ile kısmi saflaştırma**

Bakteri izolatının sıvı proteaz üretim ortamında 2 günlük inkübasyonu sonrası fermantasyon sıvısı 4 °C'de, 10000 rpm'de, 20 dk santrifüj edildi ve hücreler uzaklaştırıldı. Elde edilen süpernatant son konsantrasyonu %20, 40, 60 ve 80 olacak şekilde amonyum sülfat ile muamele edilerek çöktürüldü. Amonyum sülfat yavaş yavaş eklenerek, 4 °C'de en az 4 saat karıştırılarak bekletildi. Aynı sıcaklıkta 10000 rpm'de 20 dk santrifüj edilerek proteinler çöktürüldü. Çöken proteinler minimum hacimdeki pH 9,0, 50 mM Glisin-NaOH tamponu ile çözüldü. Protein çözeltisinde bulunan tuzların ve diğer iyonların uzaklaştırılması ve çözeltinin yoğunlaştırılması için 6000 rpm'de ultrafiltrasyon uygulandı ve iyon değişim kromatografisi için hazır hale geldi.

### **İyon değişim kromatografisi ile saflaştırma**

Protein solüsyonu iyon değişim kromatografisi uygulamak üzere daha önce 50 mM fosfat tamponu (pH 7,0) ile dengelenmiş HiPrep Q XL 16/10 anyon değişim kolonuna yüklendi. Fraksiyonlar lineer NaCl gradient (0-1 M) ile kolondan indirildi ve fraksiyonların proteaz aktivite tayinleri yapıldı. Proteaz aktivitesi içeren fraksiyonlar birleştirilip ultrafiltrasyon ile

konsantre edilerek, protein miktar tayini, SDS-PAGE analizleri ve enzim karakterizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere -20 °C’de saklandı.

### **Protein miktar tayini**

Protein miktar tayinleri Lowry yöntemiyle, standart olarak sığır serum albümin (BSA) kullanılarak spektrofotometrik olarak yapıldı (Lowry, 1951).

### **BSA standart hazırlanması**

1. 11 tane 16 x 150 mm’lik test tüpü hazırlandı.
2. Her bir tüpe 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µL BSA solüsyonundan eklendi.
3. Üzerlerine 2 mL solüsyon D eklenir ve oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi.
4. Tüplere 0,2 mL dilüe folin-fenol solüsyonu eklenerek hemen vortekslendi ve iyice karıştırıldı.
5. Tüpler oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi.
6. Tüplerin 600 nm’deki absorbansları ölçüldü.
7. Absorbansa karşı mg protein grafiği çizilerek standart eğri hesaplandı.
8. Tüm ölçümler 3 tekrar şeklinde gerçekleştirildi.

### **Proteinlerin SDS-PAGE analizi**

Proteinlerin SDS-PAGE analizleri standart Laemmli protokolüne göre yapılmıştır (Laemmli, 1970). Elektroforez sistemi olarak Bio-Rad Mini-PROTEAN® Tetra Cell kullanılmıştır.

%12,5’lik ayırıcı jel hazırlamak için Tablo 2’de belirtilen maddelerin verilen konsantrasyonlarda karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. Tetra methyl ethylene diamine (TEMED) ve taze hazırlanan amonyum persulfat (APS) jel hazırlanmadan hemen önce karışıma eklendi. Vakit kaybetmeden hazırlanan ayırıcı jel karışımı cam levhalar arasına döküldü, üzeri suyla kaplanarak hava ile teması kesildi ve polimerleşmesi için 30 dk beklendi. 30 dk sonunda su uzaklaştırıldı ve üzerine Tablo 3’te belirtilen şekilde hazırlanan %7,5’lik yığıma jel döküldü. Kuyucukların oluşmasını sağlayacak olan taraklar yerleştirildi ve polimerleşmesi için 30 dk daha beklendi. Polimerleşme tamamlandıktan sonra taraklar uzaklaştırıldı ve oluşan kuyucuklar 1X yürütme tamponu ile yıkandı ve protein örneklerinin yüklenmesi için hazır hale getirildi.

**Tablo 2.** Ayırıcı Jel (%12,5) Hazırlanışı

Ayırıcı Jel (%12,5)	Hacim (mL)
Ayırıcı jel tamponu	1,2
%30 Akrilamid stok solüsyonu	2,1
H <sub>2</sub> O	1,7
APS (%25)	0,03
TEMED	0,003
Toplam	5

**Tablo 3.** Yığma Jel (%7,5) Hazırlanışı

Yığma Jel (%7,5)	Hacim (mL)
Yığma jel tamponu	0,6
%30 Akrilamid stok solüsyonu	0,4
H <sub>2</sub> O	1,4
APS (%25)	0,02
TEMED	0,002
Toplam	2,4

### Örnek hazırlama ve elektroforez

Örnek denatüre edici karışım  $\beta$ -mercaptoethanol ve örnek tamponu 1:4 oranında karıştırılmasıyla hazırlandı. 5  $\mu$ L örnek denatüre edici karışıma 15  $\mu$ L örnek eklendi ve 5 dk kaynatıldı. Denatüre edilen örnekler soğuduktan sonra 1 dk en yüksek devirde santrifüj edildi ve hazırlanan jeldeki kuyucuklara yüklendi. Elektroforez sabit 150 V voltaj kullanılarak 1 saat gerçekleştirildi. Örneklerin moleküler ağırlığı Precision Plus Protein Unstained Standard (250-10 kD) kullanılarak hesaplandı.

### Jellerin boyanması ve boyanın uzaklaştırılması

SDS-PAGE tamamlandıktan sonra jeller 100–150 mL Coomassie Brilliant Blue R-250 boya solüsyonu ile 1 saat boyunca hafifçe çalkalanarak oda sıcaklığında boyanmaya bırakıldı. Süre sonunda boya solüsyonu dökülerek jeller 100–150 mL boya uzaklaştırma solüsyonuna konuldu ve oda sıcaklığında çalkalanarak 1 saat inkübe edildi. Jel zemindeki boya uzaklaşıp istenen protein bantları görünür hale gelene kadar boya uzaklaştırma solüsyonu birkaç kez değiştirildi.

### **Proteaz enziminin moleküler kütlelerinin hesaplanması**

Proteaz enziminin moleküler kütlelerinin hesaplanması için SDS-PAGE’de standart (M bandı) olarak kullandığımız Precision Plus Protein Unstained Standart (250-10 kD)’tan yararlanılmıştır. SDS-PAGE bittikten sonra jelde yürüyen standarttaki protein bantlarının ve saflaştırılan proteaz enziminin nispi göç mesafeleri (Rf) aşağıdaki denklem kullanılarak belirlendi. Bu veriler kullanılarak çizilen grafikten elde edilen eğrinin denklemi kullanılarak proteaz enziminin moleküler ağırlığı hesaplandı.

$$Rf = \frac{\text{Proteinin Göç Mesafesi}}{\text{Boyanın Göç Mesafesi}}$$

### **Saflaştırılmış proteaz enziminin karakterize edilmesi**

Saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklık, pH, metal iyonları, çeşitli reaktifler, organik çözücüler ve ticari deterjanların etkisi araştırıldı. Enzimin kinetik özellikleri olan  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerleri hesaplandı. Enzimin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile tespit edildi.

### **Proteaz enzim reaksiyonuna ait $K_m$ ve $V_{max}$ kinetik sabitlerinin saptanması**

Saflaştırılan proteaz enziminin kinetik sabitlerinin belirlenmesi için %0,05-%2 konsantrasyon aralığında enzimin substratı olan kazein kullanıldı. Proteaz aktivite tayini yapıldı.

### **Enzimin optimum sıcaklığının belirlenmesi**

Saflaştırılan proteaz enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi için standart kantitatif proteaz aktivite tayini 10, 20, 30, 40, 50, 60 ve 70 °C sıcaklıklarda gerçekleştirildi. Enzim ve substrat çözeltileri reaksiyon öncesi bu sıcaklıklarda 10 dk bekletildi. İnkübasyon sonrası proteaz aktiviteleri ölçüldü.

### **Enzimin sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi**

Saflaştırılan proteaz enziminin sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi için ise enzim örnekleri 20, 30, 40, 50, 60 °C’de; 30, 60, 90 ve 120 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası proteaz aktiviteleri ölçüldü. Kontrol numunesine göre bağıl aktiviteleri hesaplandı.

### **Enzimin optimum pH’sının belirlenmesi**

Saflaştırılan proteaz enziminin optimum pH’sının belirlenmesi için pH 6,0-12,0 değerlerinde enzim aktiviteleri incelendi. Farklı pH’larda tamponlar hazırlamak için 50 mM potasyum fosfat (pH 6,0), Tris-HCl (pH 7,0-8,0), glisin-NaOH (pH 9,0-12,0) kullanıldı.

Enzimin substratı olan kazein de bu tamponlar içerisinde çözülerek hazırlandı. Standart kantitatif proteaz aktivite tayini belirtilen pH'larda gerçekleştirildi.

### **Enzimin pH stabilitesinin belirlenmesi**

Enzimin pH stabilitesinin belirlenmesi için, enzim örnekleri 50 mM potasyum fosfat (pH 6,0), Tris-HCl (pH 7,0-8,0), glisin-NaOH (pH 9,0-12,0) tampon çözeltileriyle eşit hacimde (1:1 oranında) karıştırılıp 25 °C'de, 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası standart proteaz aktivite tayini gerçekleştirildi. Kontrol numunesine göre bağıl aktiviteleri hesaplandı.

### **Metal iyonlarının proteaz enzimi üzerine etkisinin belirlenmesi**

Metal iyonlarının proteaz aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesi için CaCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, BaCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, AgNO<sub>3</sub>, CdN<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>, NiCl<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, CoCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub> ve CuSO<sub>4</sub> bileşiklerinin pH 9,0, 50 mM glisin-NaOH tamponu ile 2, 6 ve 10 mM'lık çözeltileri hazırlandı. Çözeltiler ile enzim eşit hacimde (1:1 oranında) karıştırılıp 25 °C'de, 180 rpm'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası standart kantitatif proteaz aktivite tayini gerçekleştirildi. Bağıl aktiviteler, metal iyonları olmadan aynı koşullar altında inkübasyona tabi tutulmuş kontrol enzim solüsyonu ile karşılaştırılarak hesaplandı.

### **Reaktiflerin proteaz enzimi üzerine etkisinin belirlenmesi**

Reaktiflerin proteaz aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesi için Tween 20, Tween 80, Triton X-100, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, SDS, CTAB, EDTA, PMSF, β-merkaptotanol, DTT ve DEPC'nin pH 9,0, 50 mM glisin-NaOH tamponu ile 2, 6 ve 10 mM'lık çözeltileri hazırlandı. Çözeltiler ile enzim eşit hacimde (1:1 oranında) karıştırılıp 25 °C'de, 180 rpm'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası standart kantitatif proteaz aktivite tayini gerçekleştirildi. Bağıl aktiviteler, reaktifler olmadan aynı koşullar altında inkübasyona tabi tutulmuş kontrol enzim solüsyonu ile karşılaştırılarak hesaplandı.

### **Çeşitli organik çözücülerin proteaz enzimi üzerine etkisinin belirlenmesi**

Organik çözücülerin proteaz aktivitesi üzerindeki etkisinin belirlenmesi için DMSO, aseton, gliserol, etanol ve izopropanolun pH 9,0, 50 mM glisin-NaOH tamponu ile %15'lik çözeltileri hazırlandı. Çözeltiler ile enzim eşit hacimde (1:1 oranında) karıştırılıp 25 °C'de, 180 rpm'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası standart kantitatif proteaz aktivite tayini gerçekleştirildi. Bağıl aktiviteler, organik çözücüler olmadan aynı koşullar altında inkübasyona tabi tutulmuş kontrol enzim solüsyonu ile karşılaştırılarak hesaplandı.

### **Ticari deterjanların proteaz enzimi üzerine etkisinin belirlenmesi**

Ticari deterjanların proteaz enzimi üzerine etkisini belirlenmek için 50 mM, pH 9,0 glisin-NaOH tamponu ile %1 konsantrasyonda el yıkama deterjanı, sıvı bulaşık deterjanı ve sıvı çamaşır deterjanı çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan deterjanlar ile enzim eşit hacimde (1:1 oranında) karıştırıldı ve standart proteaz aktivite tayinleri gerçekleştirildi.

### **Ticari deterjanların proteaz enzim stabilitesi üzerine etkisinin belirlenmesi**

Deterjanların proteaz kararlılığı üzerindeki etkilerini incelemek için 50 mM, pH 9,0 glisin-NaOH tamponu ile %1 oranında el yıkama deterjanı, sıvı bulaşık deterjanı ve sıvı çamaşır deterjanı çözeltileri hazırlandı. Deterjanlar ile enzim (1:1 oranında) 25 °C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra enzim aktiviteleri standart aktivite analizi ile ölçüldü. Bağlı aktiviteler, deterjanlar olmadan aynı koşullar altında inkübasyona tabi tutulmuş kontrol enzim solüsyonu ile karşılaştırılarak hesaplandı.

### **Proteaz enziminin deterjan etkisinin araştırılması**

Deterjan etkisinin araştırılması amacıyla 5x5 cm büyüklüğünde beyaz pamuklu kumaş parçaları kullanıldı. Pamuklu kumaş parçalarının yüzeyine protein açısından zengin 0,1 mL kan aktarıldı ve lekeyi sabitlemek için pamuklu kumaşlar 60 °C'deki etüvde 1 saat kurumaya bırakıldı. Kurutulmuş kumaş parçaları aşağıdaki Tablo 4'te belirtilen şekilde hazırlanan 250 mL'lik flasklarda 50 mL yıkama solüsyonları ile 30 °C'de 30 dk 180 rpm'de inkübe edildi. Ardından musluk suyu ile durulandı ve 60 °C'de 1 saat kurutulup ve fotoğrafları çekildi.

**Tablo 4.** Yıkama Solüsyonu Kompozisyonu

	Hacim (mL)			
Yıkama Solüsyonu	1	2	3	4
pH 9,0, 50 mM Glisin-NaOH	25	25	25	-
Deterjan Solüsyonu (%1)	-	-	12,5	25
Proteaz Solüsyonu (10 U/mL)	-	25	12,5	-
Distile Su	25	-	-	25

### **Proteaz enziminin tavuk tüyü parçalama potansiyelinin araştırılması**

Tavuk tüyleri (beyaz) yerel pazardan elde edilerek, üç kez damıtılmış suyla yıkayıp temizlendi ve kurutuldu. Tavuk tüyü parçalama deneyi için ilk olarak bazal medium (0,5 g/L NaCl, 0,4 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,3 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 9) hazırlandı. Daha sonra bazal mediuma %1 oranında tavuk tüyü eklenerek tavuk tüyü medium (TTM) hazırlandı (Li et al., 2020). TTM

otoklavda sterilize edildi. 50 mL TTM içeren 250 mL'lik flasklara *E. alkaliphilum* VLP1 bakterisinden %1 (OD<sub>600</sub>-1) inokülasyon yapıldı ve 7 gün inkübasyona bırakıldı.

Tüy parçalanma oranları, ağırlık kaybı yöntemi kullanılarak değerlendirildi. Tüyler bakteri tarafından bozunduktan sonra, fermantasyon sıvısı, Whatman No. 1 filtre kâğıdından süzüldü. Tüy kalıntısı iki kez damıtılmış su ile iyice yıkandı, 60 °C'de kurutuldu ardından ağırlık kaybını hesaplamak için tartıldı. Sonuçlar, ilk kuru tüy ağırlığına göre ağırlık kaybı yüzdesi olarak ifade edildi. Daha sonra parçalanmış tavuk tüyünden kesitler alınarak dijital kamera (DF71, Olympus) ile donatılmış bir mikroskop (BX51, Olympus) ile incelendi.



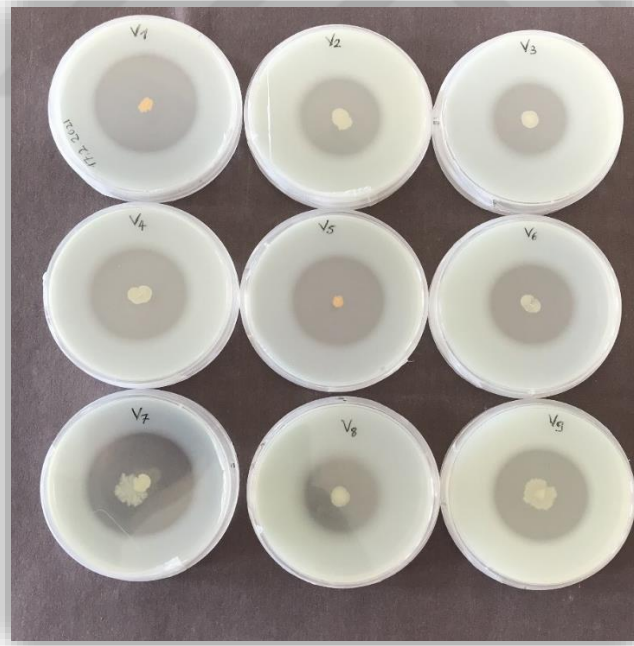
## ARAŞTIRMA BULGULARI

### Bakterilerin İzolasyonu

Van Gölü'nden temin edilen su örneklerinden yapılan izolasyonlar sonucunda 55 bakteri izole edildi ve izole edilen bakteriler kalitatif proteaz tayini için kullanıldı.

### Bakteri İzolatlarının Proteaz Aktivitelerinin Belirlenmesi

İzole edilen saf kültürlerin proteaz aktivitesine sahip olup olmadıkları SMA besiyerinde oluşturdukları şeffaf zonların çaplarına göre değerlendirildi. Petri üzerinde 30 °C'de 2 günlük inkübasyon sonucunda bakteri izolatlarının oluşturduğu şeffaf zonlar Şekil 2'de gösterilmiştir. Test edilen 55 bakteri izolatının büyük kısmında belirgin zonlar gözlemlendi. Aralarından en geniş proteolitik zon oluşturan VLP1 (21 mm), VLP2 (15 mm), VLP4 (18 mm), VLP6 (15 mm), VLP8 (13 mm), VLP9 (14 mm), VLP13 (11 mm), VLP15 (12 mm) ve VLP17 (10 mm) izolatları kantitatif proteaz aktivite tayini için seçildi.

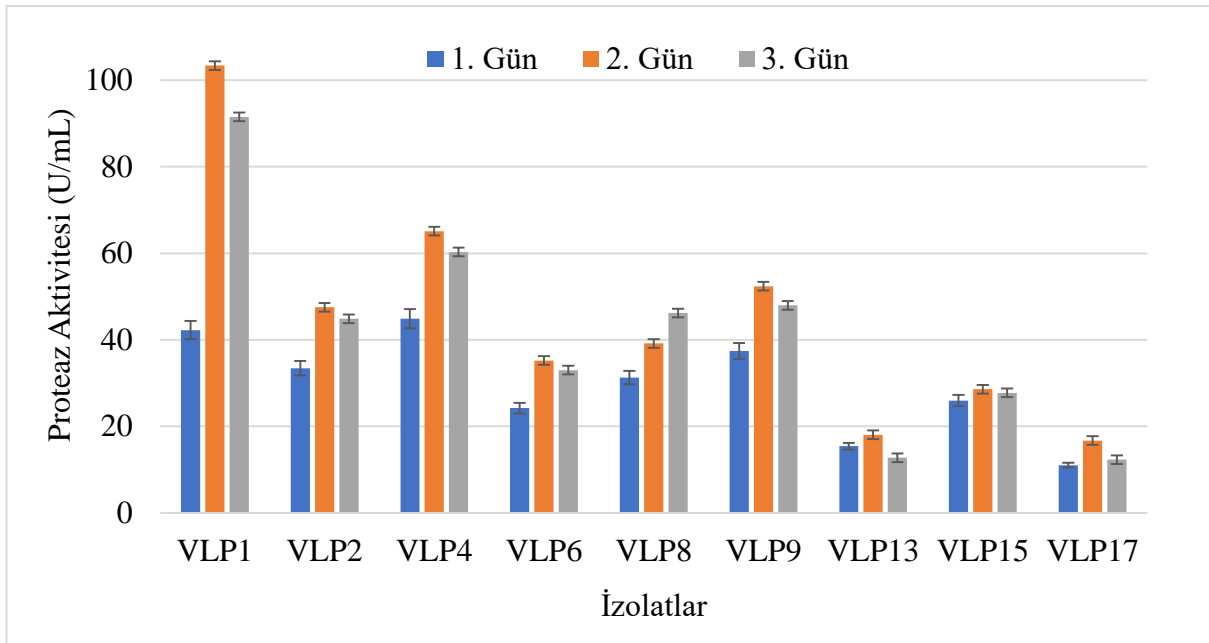


**Şekil 2.** Van Gölü bakteri izolatlarının SMA üzerinde 30 °C'de 2 günlük inkübasyon sonucu oluşturdukları şeffaf proteolitik zonlar

### Bakteri İzolatlarının Kantitatif Proteaz Aktivite Tayini

SMA üzerinde proteolitik zon oluşturan kültürlerden en geniş zona sahip olan 9 tane izolat seçilerek sıvı proteaz üretim ortamında geliştirildi. Spektrofotometrik proteaz aktivite

testine tabi tutuldu ve Ek 1’de verilen standart tirozin grafiği kullanılarak hesaplama yapıldı. Şekil 3’te görüldüğü gibi en yüksek aktivite VLP1 kodlu bakteri izolatu ile 103 U/mL olarak elde edildi.



Şekil 3. Bakteri izolatlarının 3 günlük proteaz aktivite grafiği

### Bakteri İzolatların Tanınması

Proteaz aktiviteleri karşılaştırılarak seçilen 9 bakteri izolatu (VLP1, VLP2, VLP4, VLP6, VLP8, VLP9, VLP13, VLP15 ve VLP17) klasik yöntemler ve 16S rDNA sekanslaması ile tanınmıştır.

#### Klasik yöntemlerle tanılama

Seçilen bakterilerin klasik yöntemlerle tanınmasında morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler uygulandı.

**Koloni morfolojisi:** Bakteri türleri ve grupları için tanımlayıcı özellikte olan yöntem, Van Gölü izolatlarının oluşturdukları farklı kolonileri renk ve şekline göre ayırmak için kullanıldı. Sonuçlar Tablo 5’te verildi.

**Hareket testi:** Yumuşak dik agarlı besiyerine iğne öze ile ekilen izolatlar, 30 °C’lik etüvde bir gün inkübasyona bırakıldı. Ekim yerinin etrafına doğru yayılan bulanıklık VLP1 ve VLP15 kodlu izolatların hareketli olduğunu gösterirken, besiyerinin berrak görülmesi VLP2, VLP4, VLP6, VLP8, VLP9, VLP13 ve VLP17 kodlu izolatların hareketsiz olduğunu gösterdi.

**KOH testi:** Seçilen izolatları hücre duvarı özelliklerine göre ayırmak için yapıldı. %3’lük KOH çözeltisi ile muamele edilen izolatların öze ile lam arasında uzama (sünme) oluşumuna bakılarak VLP1, VLP2, VLP4, VLP6, VLP8, VLP9, VLP15 ve VLP17 kodlu

izolatların Gram pozitif olduğu belirlendi. VLP13 kodlu izolatta lam ile öze arasında sünme olmadığı için Gram negatif olarak değerlendirildi.

**Katalaz testi:** İzolatlarda katalaz enziminin varlığını tespit etmek için gerçekleştirilen bu test sonucunda, VLP1, VLP2, VLP4, VLP6, VLP8, VLP9, VLP13 ve VLP17 kodlu izolat kültürüne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ilave edildiğinde, gaz kabarcıklarının oluşumu gözlenirken, VLP15 kodlu izolatta gaz kabarcığı oluşmamıştır.

**Üreaz testi:** Üreyi hidrolize eden bakteri izolatlarını belirlemek için yapılan bu test sonucunda, VLP2, VLP4, VLP13 ve VLP17 kodlu izolatlar üreyi parçalayarak üre agardaki indikatör madde olan fenol kırmızısının rengini pembeye çevirirken, VLP1, VLP6, VLP8, VLP9 ve VLP15 kodlu izolatlar üreyi parçalayamamış olup üre agar ortam renginin sarı olarak kaldığı gözlenmiştir.

**Hemoliz testi:** Kanlı agarda üreyen izolatlar oluşturdukları koloni çevresindeki eritrositleri parçama ve zon oluşma esasına göre değerlendirildi. VLP2, VLP4, VLP6, VLP8, VLP9, VLP13, VLP15 ve VLP17 kodlu izolatların hemolizin enzimi bulduklarını gözlenirken, VLP1 kodlu izolatın bu enzimi bulundurmadığı belirlenmiştir.

**Lipaz testi:** Lipolitik bakteriler belirlenmesi için yapılan bu test sonucunda, VLP2 ve VLP15 kodlu izolatların TBA ortamında lipaz enzimi üreterek koloni çevresinde şeffaf zon oluşturdukları gözlemlendi. VLP1, VLP4, VLP6, VLP8, VLP9, VLP13 ve VLP17 kodlu izolatları ise TBA ortamında koloni çevresinde şeffaf zon oluşturamadıkları dolayısıyla lipaz enzim üretimi özelliğinin bulunmadığı belirlendi.

**Amilaz testi:** İzolatların amilaz enzimi üretebilme özelliklerinin belirlenmesi için yapılan bu test sonucunda, Nişastalı NA ortamında gelişen bakteri izolatlarına lügol eklenerek besiyerinin renk değişimi esnasında izolat çevresinde oluşan şeffaf zon varlığına göre amilaz enzimini sentezleyebilme yetenekleri belirlendi. VLP2, VLP4, VLP13, VLP15 ve VLP17 kodlu izolatlar amilaz hidrolizi gerçekleştirerek lügol boyama esnasında çevrelerinde şeffaf zon oluşturdu. VLP1, VLP6, VLP8 ve VLP9 kodlu izolatlar ise amilaz hidrolizi gerçekleştiremedikleri için zon oluşumu olmaksızın tamamen koyu renkli olarak gözlemlendiler.

**Selülaz testi:** İzolatların selülaz enzimi üretebilme özelliklerinin belirlenmesi için yapılan bu test sonucunda, VLP15 kodlu izolat karboksimetil selülozu parçalayarak Congo-red ile kırmızıya boyanan zeminde sarımtırak zon oluşturduğu gözlemlendi. Plakta zon oluşumu olmaksızın tamamen kırmızı renkli olarak gözlenen izolatlar VLP1, VLP2, VLP4, VLP6, VLP8, VLP9, VLP13 ve VLP17 olarak belirlendi.

**Tablo 5.** Van Gölü İzolatlarının Özellikleri

İzolat Kodu	VLP1	VLP2	VLP4	VLP6	VLP8	VLP9	VLP13	VLP15	VLP17
Bakteri Suşu	<i>E. alkaliphilum</i>	<i>B. zhangzhouensis</i>	<i>B. zhangzhouensis</i>	<i>B. pumilus</i>	<i>B. australinaris</i>	<i>B. zhangzhouensis</i>	<i>Pseudomonas Chengduensis</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>Chryseomicrobium amylofyticum</i>
GenBank Numarası	ON853834.1	ON854115.1	ON854116.1	ON854117.1	ON854118.1	ON854119.1	ON854120.1	ON854121.1	ON854122.1
Koloni Rengi	Turuncu Parlak	Açık Krem Parlak	Açık Krem Parlak	Krem Mat	Krem Mat	Açık Krem Parlak	Krem Parlak	Krem Mat	Açık Sarı Parlak
Koloni Şekli	Yuvarlak	Yuvarlak	Yuvarlak	Yuvarlak	Dağınık	Yuvarlak	Yuvarlak	Dağınık	Yuvarlak
Hücre Şekli	Basil	Basil	Basil	Basil	Basil	Basil	Basil	Basil	Basil
Hareket	+	-	-	-	-	-	-	+	-
Gram	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Üreaz	-	+	+	-	-	-	+	-	+
Hemoliz	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Lipaz	-	+	-	-	-	-	-	+	-
Amilaz	-	+	+	-	-	-	+	+	+
Selülaz	-	-	-	-	-	-	-	+	-

### Moleküler yöntemlerle tanılama

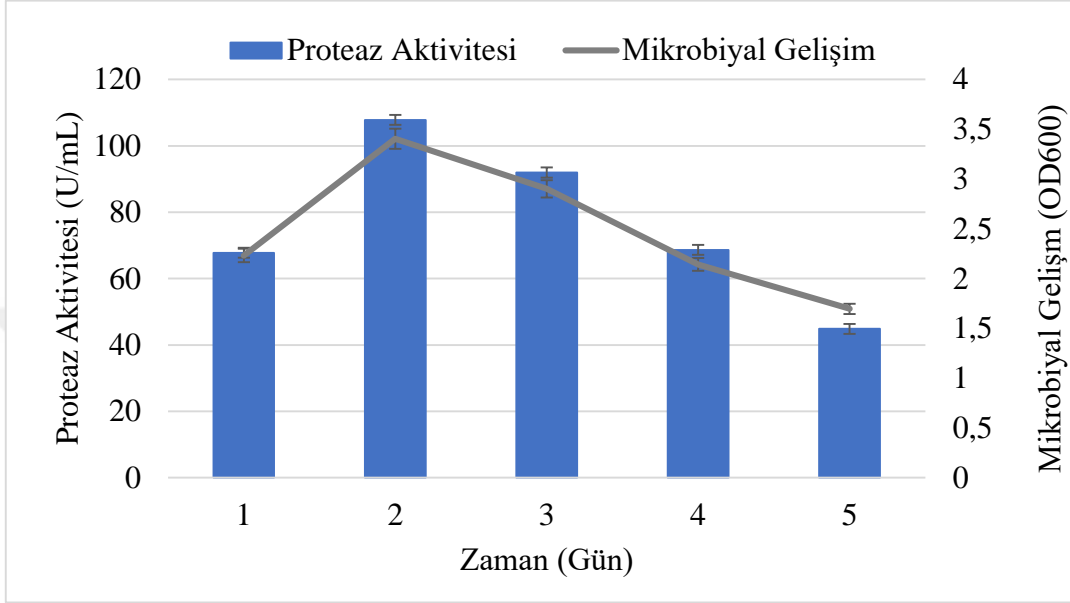
İzolatların moleküler karakterizasyonunda 16S ribozomal DNA gen bölgesi sekans analizi yönteminden yararlanıldı. İzolatlara ait sekanslar NCBI veri tabanındaki sekanslarla karşılaştırılarak bakteriler tanılandı ve GenBank erişim numaraları alındı. Tablo 5’te izolatların tanılama sonuçları ve GenBank numaraları verilmiştir. İzolatların 16S rDNA dizi verileri EK 2’de verilmiştir.

### *E. alkaliphilum* VLP1’in Proteaz Üretim Koşullarının ve Ortamının Optimizasyonu

En yüksek proteolitik aktiviteye sahip olan suşun *E. alkaliphilum* VLP1 olduğu belirlendikten sonra *E. alkaliphilum* VLP1 ile proteaz üretimi için optimum koşulların araştırılması amacıyla inkübasyon süresi, inkübasyon sıcaklığı, başlangıç pH’sı, farklı azot kaynakları, farklı karbon kaynakları ve tuz konsantrasyonları belirlendi.

### İnkübasyon süresinin *E. alkaliphilum* VLP1'in proteaz üretimine ve gelişimine etkisi

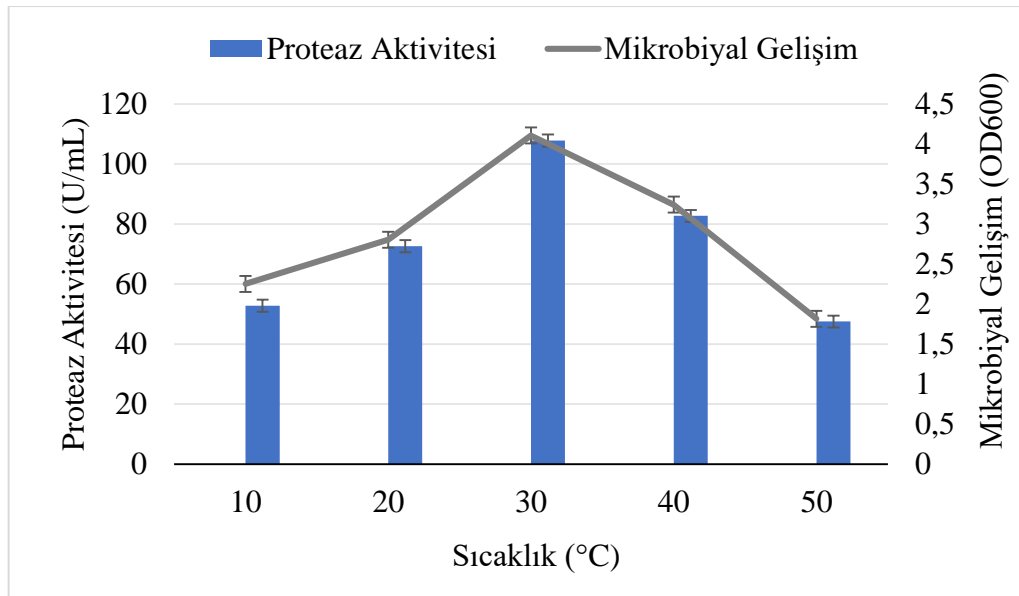
Proteaz üretim ortamındaki *E. alkaliphilum* 5 gün boyunca 30°C'de inkübasyona bırakıldı. Her gün proteaz aktivitesi ve mikrobiyal gelişimi takip edildi. Bakterinin proteaz aktivitesinin, mikrobiyal gelişim ile paralel olduğu belirlendi. Şekil 4'te görüldüğü en yüksek proteaz üretimi inkübasyonun 2. gününde 108 U/mL olarak saptandı.



Şekil 4. *E. alkaliphilum* VLP1' in proteaz üretim ortamında 30 °C'de zamana karşı proteaz aktivite ve mikrobiyal gelişim grafiği

### İnkübasyon sıcaklığının *E. alkaliphilum* VLP1'in proteaz üretimine etkisi

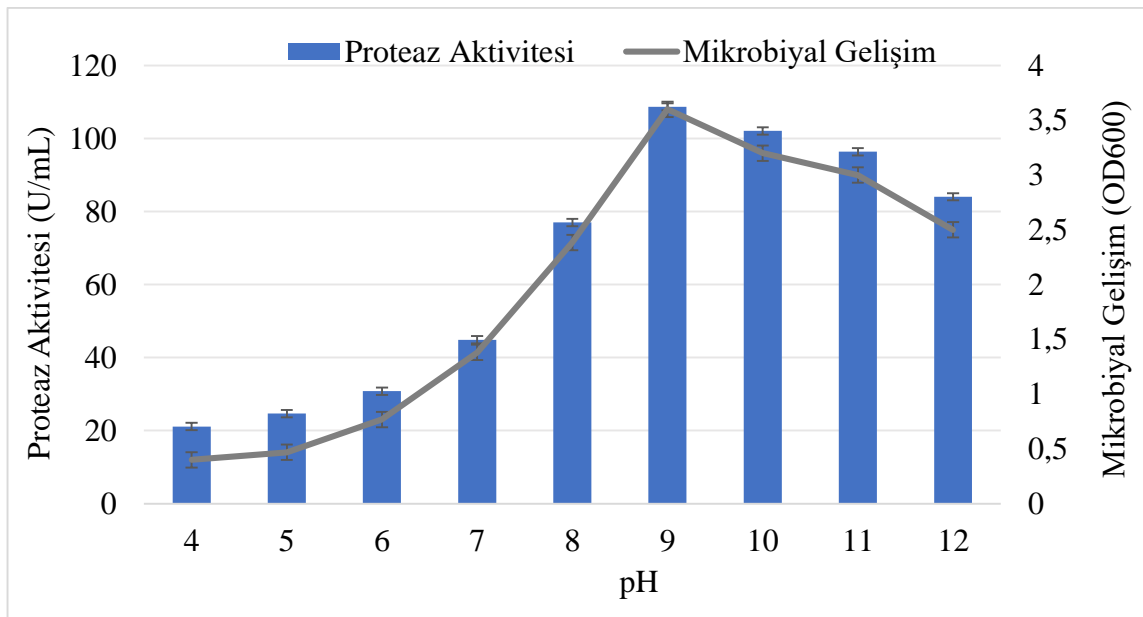
*E. alkaliphilum* VLP1 proteaz üretim ortamında 10, 20, 30, 40 ve 50 °C olmak üzere 5 farklı sıcaklıkta 2 gün boyunca 185 rpm'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından mikrobiyal gelişim ve proteaz aktivitesi incelendi. Bakterinin proteaz aktivitesinin, mikrobiyal gelişim ile paralel olduğu belirlendi. En yüksek proteaz üretimi Şekil 5'te görüldüğü gibi 30 °C'de elde edildi. Düşük (10 ve 20 °C) ve yüksek sıcaklıkların (40 ve 50 °C) proteaz üretimine olumsuz yönde etki ettiği belirlendi.



Şekil 5. Sıcaklığın proteaz üretimi ve mikrobiyal gelişim üzerine etkisi

#### Başlangıç pH'sının *E. alkaliphilum* VLP1' in proteaz üretimi ve gelişimi üzerine etkisi

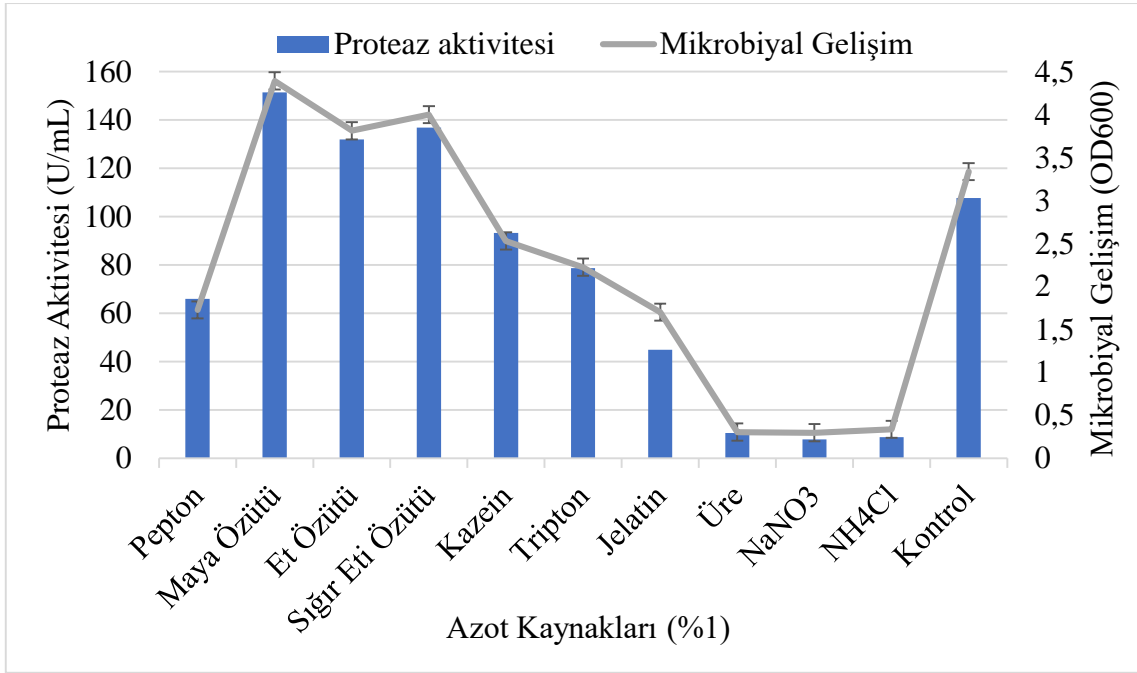
*E. alkaliphilum* VLP1 başlangıç pH'sı 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12'de hazırlanan proteaz üretim ortamında 2 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından mikrobiyal gelişim ve proteaz aktivitesi incelendi. Bakterinin proteaz aktivitesinin, mikrobiyal gelişim ile paralel olduğu belirlendi. En yüksek proteaz üretimi Şekil 6'da görüldüğü gibi pH 9'da elde edildi. Düşük pH'larda (4, 5, 6, 7, 8) bakteriyel gelişimin ve proteaz üretiminin düşük; yüksek pH'larda (10, 11, 12) ise bakteriyel gelişim ve proteaz üretiminin yüksek olduğu belirlenmiştir.



Şekil 6. pH'nın *E. alkaliphilum* VLP1'in proteaz üretimi ve mikrobiyal gelişimi üzerine etkisi

### Azot kaynaklarının *E. alkaliphilum* VLP1'in proteaz üretimi ve gelişimi üzerine etkisi

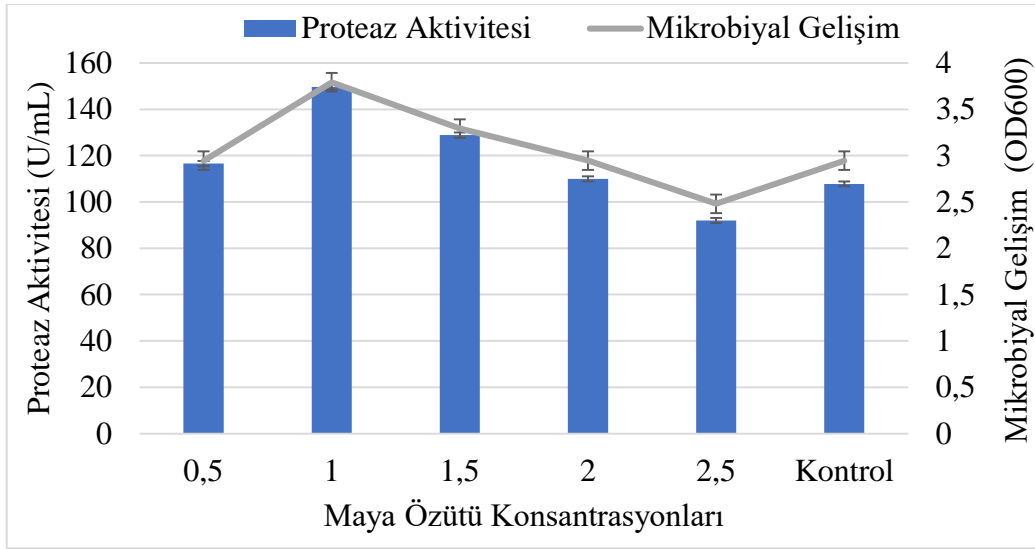
*E. alkaliphilum*'un %1'lik farklı azot kaynaklarında 2 günlük inkübasyonu sonunda spektrofotometrik ölçümler yapılarak proteaz aktivitesine ve mikrobiyal gelişimine bakıldı. Şekil 7'de bakterinin proteaz aktivitesinin, mikrobiyal gelişim ile paralel olduğu görülmektedir. Kullanılan azot kaynakları arasından en yüksek proteaz üretimi maya özütünde elde edildi. Maya özütünü, sığır eti özütü, et özütü, kazein, tripton ve peptonun izlediği görülürken en düşük proteaz üretimi  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , üre ve jelatinde görüldü.



Şekil 7. Azot kaynaklarının *E. alkaliphilum* VLP1'in proteaz üretimi ve mikrobiyal gelişimi üzerine etkisi

### Farklı konsantrasyonlarda maya özütünün *E. alkaliphilum* VLP1'in proteaz üretimi ve gelişimi üzerine etkisi

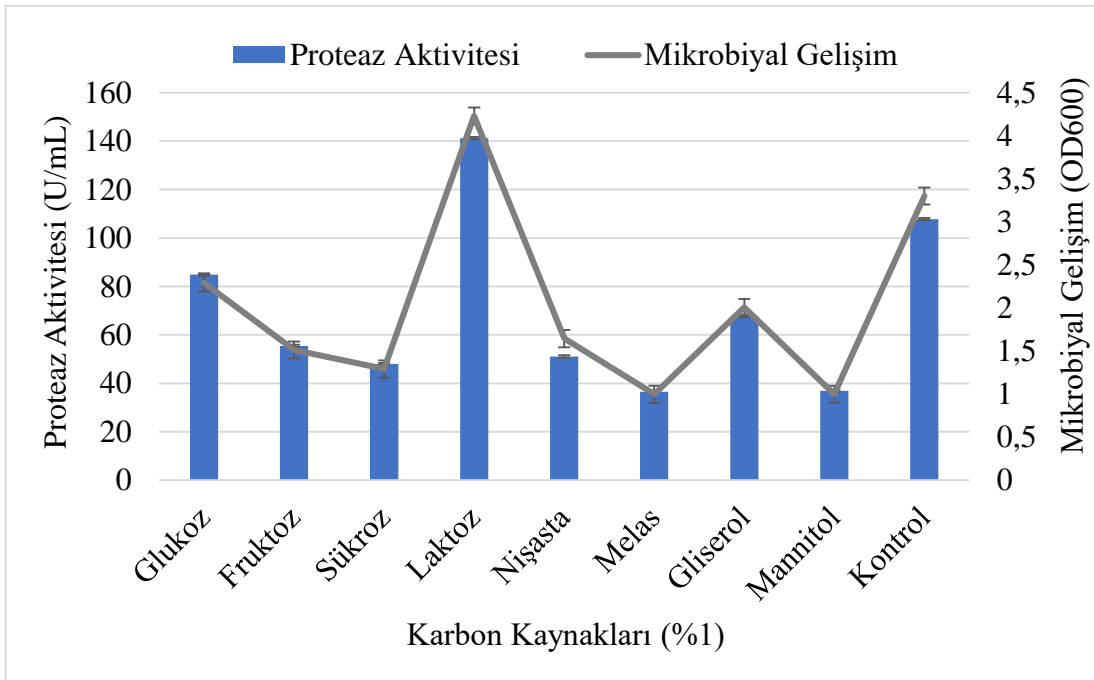
*E. alkaliphilum* VLP1'in farklı maya özütü konsantrasyonlarındaki 2 günlük inkübasyonu sonunda spektrofotometrik ölçümler yapılarak proteaz aktivitesi ve mikrobiyal gelişimi takip edildi. Bakterinin proteaz aktivitesinin, mikrobiyal gelişim ile paralel olduğu tespit edildi. Şekil 8'de görüldüğü gibi en yüksek enzim üretimi 150 U/mL ile %1'lik maya özütü konsantrasyonunda elde edildi.



**Şekil 8.** Maya özütü konsantrasyonlarının *E. alkaliphilum* VLP1'in proteaz üretimi ve mikrobiyal gelişimi üzerine etkisi

### Karbon kaynaklarının *E. alkaliphilum* VLP1'in proteaz üretimi ve gelişimi üzerine etkisi

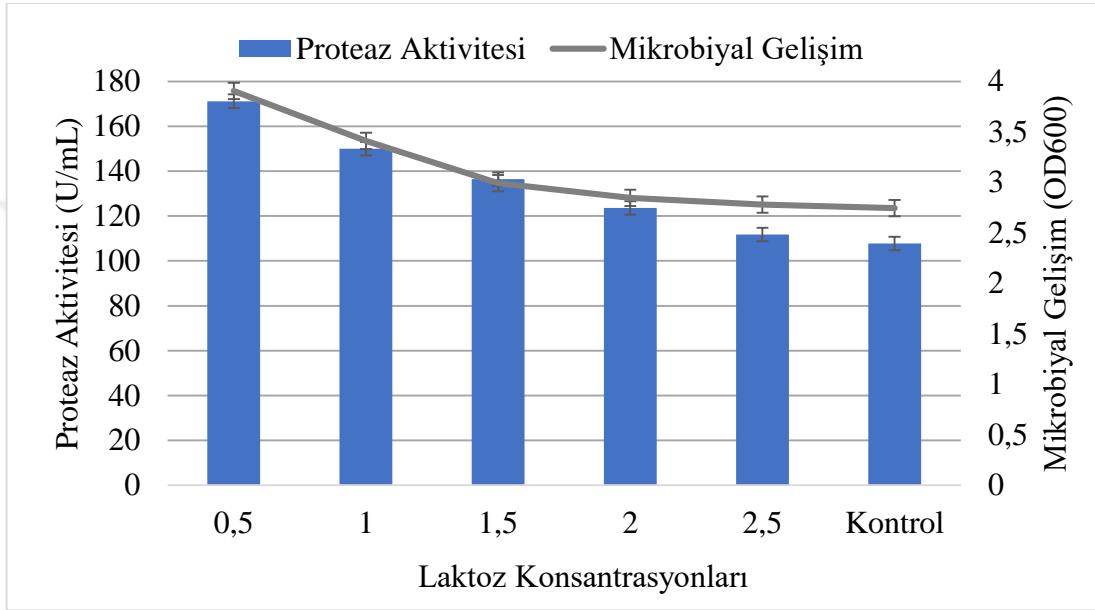
Farklı karbon kaynaklarında *E. alkaliphilum*'un 2 günlük inkübasyonu sonunda spektrofotometrik ölçümler yapılarak proteaz aktivitesine ve mikrobiyal gelişimine bakıldı. Bakterinin proteaz aktivitesinin, mikrobiyal gelişim ile paralel olduğu tespit edildi. Şekil 9'da görüldüğü üzere karbon kaynakları arasından en yüksek proteaz üretimi laktozdan elde edildi. Laktozun proteaz aktivitesini glukoz, gliserol, fruktoz, nişasta, sükroz, mannitol ve melas takip ettiği görülmektedir.



**Şekil 9.** Karbon kaynaklarının *E. alkaliphilum* VLP1'in proteaz üretimi ve mikrobiyal gelişim üzerine etkisi.

### Farklı laktoz konsantrasyonlarının *E. alkaliphilum* VLP1'in proteaz üretimi ve gelişimi üzerine etkisi

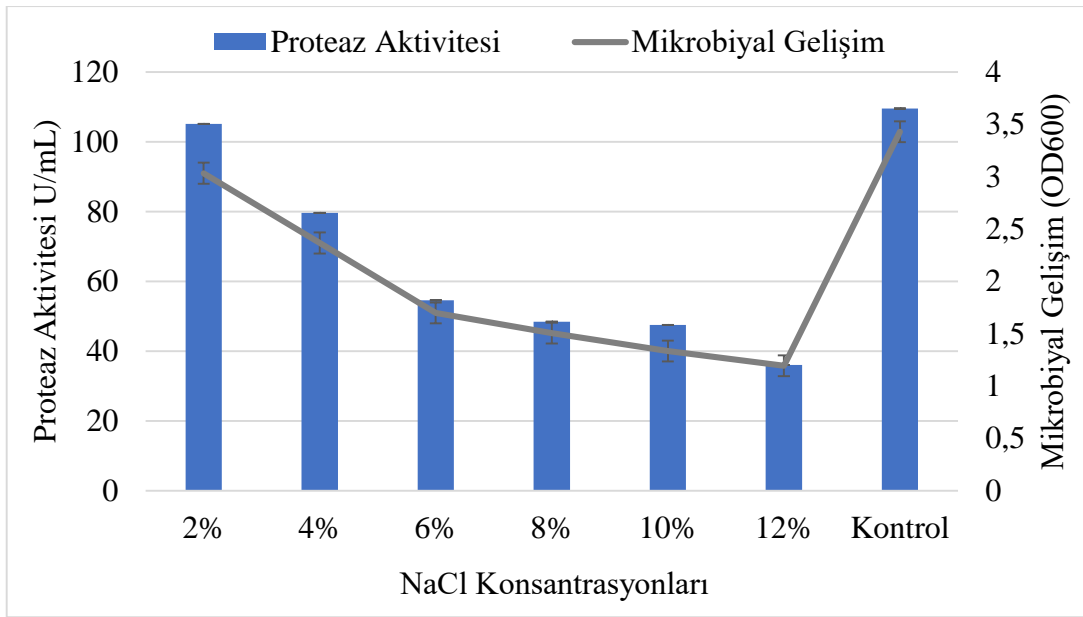
Farklı laktoz konsantrasyonlarında geliştirilen *E. alkaliphilum* VLP1'in 2 günlük inkübasyonu sonunda spektrofotometrik ölçümler yapılarak proteaz aktivitesi ve mikrobiyal gelişimi takip edildi. Bakterinin proteaz aktivitesinin, mikrobiyal gelişim ile paralel olduğu tespit edildi. Şekil 10'da farklı konsantrasyonlardaki laktoz arasından en yüksek enzim üretiminin alındığı konsantrasyon 171 U/mL aktiviteyle %0,5 oranındaki laktoz olduğu gösterilmektedir.



**Şekil 10.** Laktoz konsantrasyonlarının *E. alkaliphilum* VLP1'in proteaz üretimi ve gelişimi üzerine etkisi

### NaCl konsantrasyonunun *E. alkaliphilum* VLP1'in proteaz üretimi ve gelişimi üzerine etkisi

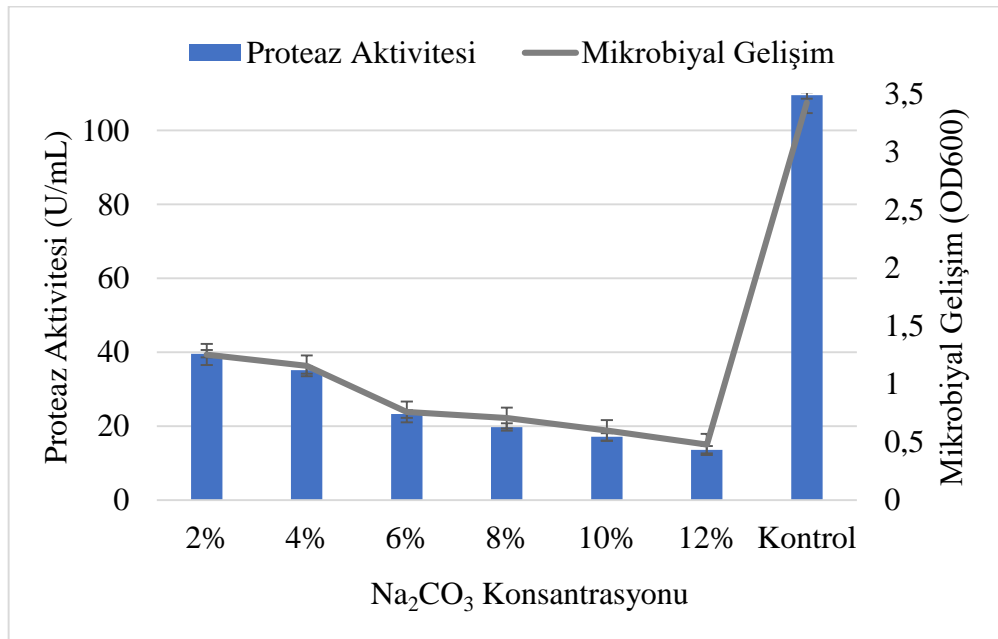
Farklı NaCl konsantrasyonlarındaki *E. alkaliphilum*'un 2 günlük inkübasyonu sonunda spektrofotometrik ölçümler yapılarak proteaz aktivitesine ve mikrobiyal gelişimine bakıldı. Bakterinin proteaz aktivitesinin, mikrobiyal gelişim ile paralel olduğu tespit edildi. Şekil 11'de NaCl konsantrasyonlarının proteaz üretimi ve mikrobiyal gelişim üzerine etkisi verilmiştir. En yüksek enzim üretiminin olduğu NaCl konsantrasyonu 2. günde %2 olarak belirlendi. Yüksek NaCl konsantrasyonlarının (4, 6, 8, 10, 12) bakteri gelişimini ve proteaz üretimini azalttığı tespit edildi.



**Şekil 11.** NaCl konsantrasyonlarının *E. alkaliphilum* VLP1'in proteaz üretimi ve gelişimi üzerine etkisi

#### **Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> konsantrasyonunun proteaz üretimine ve mikrobiyal gelişim üzerine etkisi**

Farklı Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> konsantrasyonlarındaki *E. alkaliphilum*'un 2 günlük inkübasyonu sonunda spektrofotometrik ölçümler yapılarak proteaz aktivitesine ve mikrobiyal gelişimine bakıldı. En yüksek enzim üretiminin olduğu Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> konsantrasyonu 1. günde %2 olarak belirlendi. Şekil 12'de görüldüğü gibi kontrole göre Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> konsantrasyonlarının (2, 4, 6, 8, 10, 12) mikrobiyal gelişimi ve proteaz aktivitesini önemli ölçüde azalttığı tespit edildi.



**Şekil 12.** Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> konsantrasyonlarının *E. alkaliphilum* VLP1'in proteaz üretimi ve gelişimi üzerine etkisi

## Enzim Saflaştırma

Sıvı proteaz üretim ortamında geliştirilen *E. alkaliphilum* VLP1'den proteaz enziminin saflaştırılması için amonyum sülfat çöktürmesi, ultrafiltrasyon ve iyon değişim kromatografisi gerçekleştirildi.

### Amonyum sülfat çöktürmesi ile kısmi saflaştırma

Saflaştırmanın ilk aşamasında *E. alkaliphilum* proteaz üretim besiyerinde 2 gün 185 rpm ve 30 °C'de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından kültür 10000 rpm'de 20 dk santrifüj edilerek bakteri hücreleri uzaklaştırıldı. Elde edilen süpernatant %20, %40, %60 ve %80'lik amonyum sülfat ile muamele edilerek çöktürüldü. Çöken proteinlerin ve süpernatantların proteaz aktivitesi ölçüldü. Proteazın %40'lık amonyum sülfat konsantrasyonunda çöktüğü belirlendi.

### İyon değişim kromatografisi ile saflaştırma

İyon değişim kromatografisi ile saflaştırma için HiTrap Q HP anyon değişim kolonu kullanıldı. Kısmi olarak saflaştırılan proteaz enzimi amonyum sülfat tuzundan ayırmak ve konsantre etmek amacıyla ultrafiltrasyon tüpü ile santrifüj edildi. Elde edilen konsantre örnek, HiTrap Q HP anyon değişim kolonuna uygulandı. Kolondan elde edilen fraksiyonların proteaz enzim aktivitelerine bakılarak proteaz aktivitesine sahip olanlar seçildi.

Fraksiyonlardaki protein miktarları Lowry yöntemine göre Ek 3'te verilen BSA standart eğrisi kullanılarak hesaplandı (Lowry, 1951). SDS-PAGE elektroforezi gerçekleştirilerek saflıkları kontrol edildi.

Proteaz enziminin amonyum sülfat çöktürmesi ve iyon değişim kromatografisi ile saflaştırma basamakları Tablo 6'da verildi. Proteaz enzimi %6,4 verimle, 45 kat saflaştırıldı.

**Tablo 6.** *E. alkaliphilum* VLP1'den Proteaz Enziminin Saflaştırma Basamakları

Saflaştırma Basamağı	Hacim (mL)	Protein kons. (mg/mL)	Toplam protein (mg)	Aktivite (U/mL)	Total aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Saflaştırma verimi (%)	Saflaştırma katsayısı
Ham ekstrakt	350	5,15	1802,5	134	46900	26	100	1
Amonyum Sülfat	50	8	400	390	19500	48,7	41,6	1,9
İyon Değişim Kromatografisi	40	0,065	2,6	76	3040	1169	6,4	45

Spesifik Aktivite (U/mg protein): Proteaz aktivitesi (U/mL)/Protein konsantrasyonu (mg/mL)

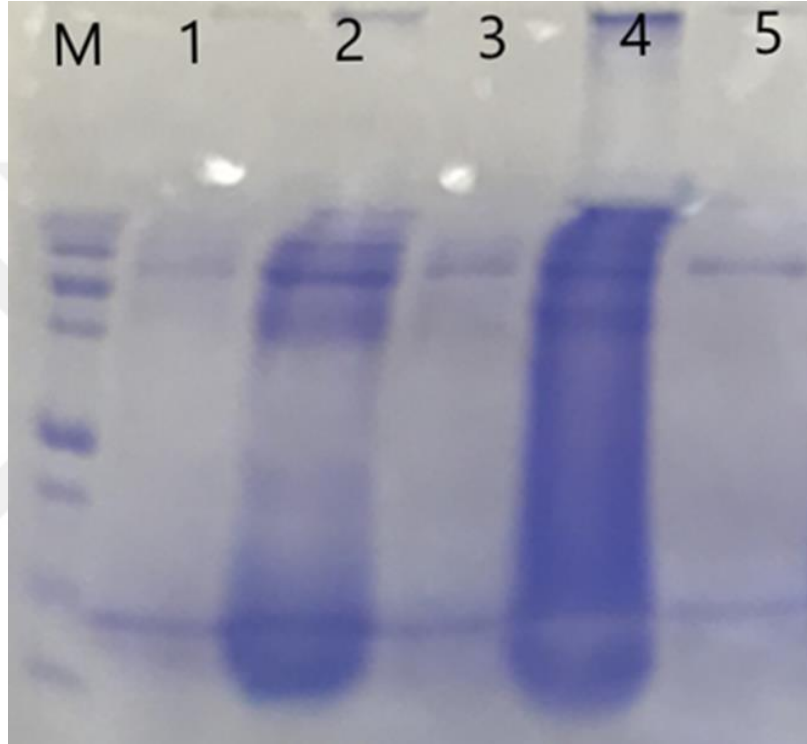
Verim (%): [Toplam proteaz aktivitesi (U/mL)/Ham enzim toplam aktivitesi (U/mL)]x100

Saflaştırma Derecesi: Spesifik proteaz aktivitesi (U/mg)/Ham ekstrakt spesifik proteaz aktivitesi (U/mg)

### SDS-PAGE analizleri ve proteaz enziminin moleküler kütesinin hesaplanması

Proteaz enziminin saflığını kontrol etmek ve yaklaşık molekül ağırlığını belirlemek amacıyla, saflaştırma basamaklarından elde edilen örneklerin SDS-PAGE analizleri Laemmli yöntemine göre yapıldı (Laemmli, 1970). Ayrırma jeli için %12,5'lik yığılma jeli için %5'lik akrilamid jel kullanıldı.

Şekil 13'te gösterilen SDS-PAGE analizine göre kültür süpernatantının protein profiliyle karşılaştırıldığında *E. alkaliphilum* proteaz enziminin yeterli miktarda saflaştırıldığı görülmektedir.



**Şekil 13.** Örneklerin SDS-PAGE analizi. M: Precision Plus Protein Unstained Standart (250-10kD); 1) Kültür süpernatantı; 2 ve 4) 40% amonyum sülfat çöktürmesi; 3 ve 5) iyon değişim kromatografisi

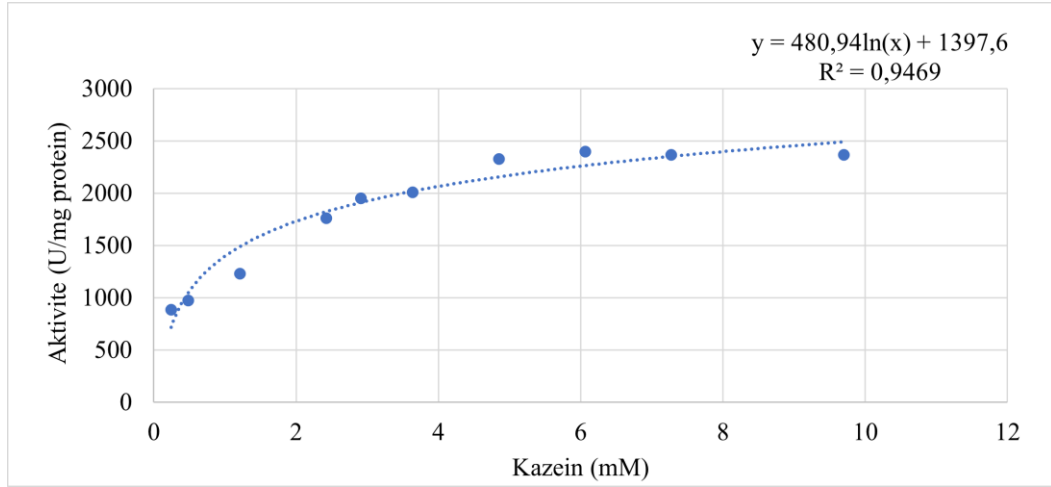
Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standardı kullanılarak çizilen ve Ekler kısmında verilen Çizelge Ek 4.3'ten elde edilen denklemde proteaz enziminin nispi göç mesafesi uygun yere konularak büyüklüğünün logaritması elde edildi. Bu değer enterpolasyonu proteaz protein bandının moleküler ağırlığını 69 kDa olarak verdi.

### Saflaştırılmış Proteaz Enziminin Karakterizasyonu

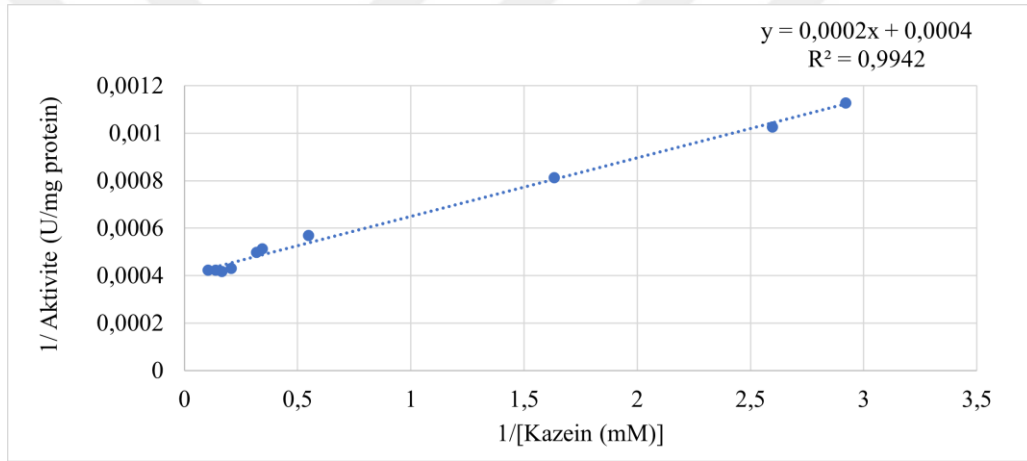
#### Proteaz enzim reaksiyonuna ait $K_m$ ve $V_{max}$ kinetik sabitlerinin saptanması

Saflaştırılan proteaz enziminin kinetik sabitlerinin belirlenmesi için %0,05-%2 konsantrasyon aralığında kazein kullanıldı. Proteaz enziminin Michaelis-Menten grafiği Şekil

14'te, Lineweaver Burk grafiği Şekil 15'te verilmiştir. Enzimin kinetik analiz grafiklerine göre hesaplamalar yapılarak  $V_{max}$  değeri 2000 U/mL ve  $K_m$  değeri 0,4 mg/mL olarak bulundu.



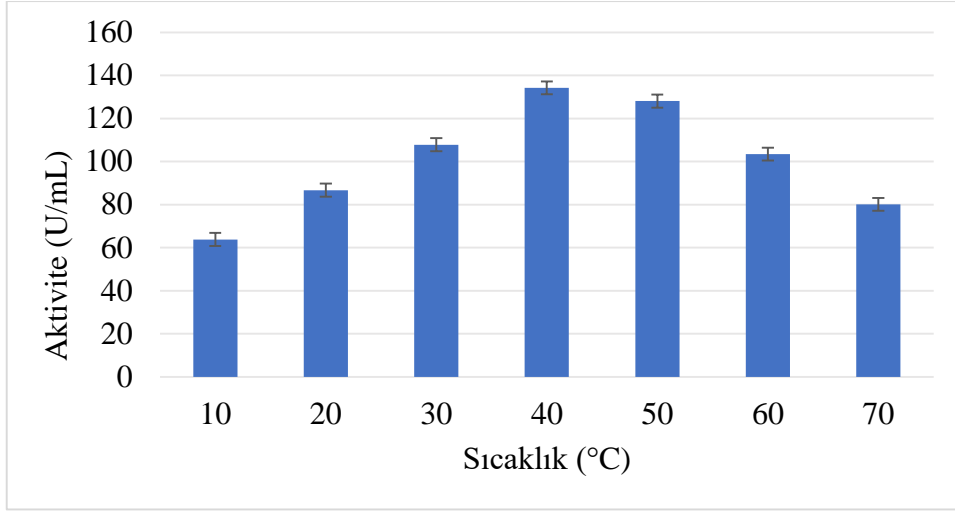
Şekil 14. Proteaz enziminin Michaelis-Menten grafiği



Şekil 15. Proteaz enziminin Lineweaver Burk grafiği

### Enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi

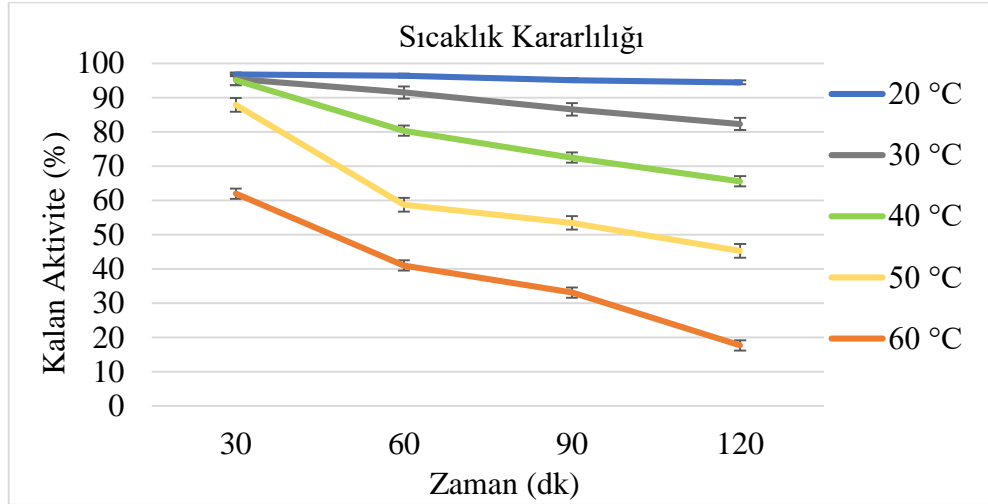
Safılaştırılan proteaz enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi için 10, 20, 30, 40, 50, 60 ve 70 °C'de enzim aktivitesine bakıldı. Şekil 16'da görüldüğü gibi proteaz enziminin 134 U/mL aktivite ile optimal sıcaklığı 40 °C olarak belirlendi. Enzimin 30, 50 ve 60 °C'de de yüksek aktivitelere sahip olduğu gözlemlendi.



Şekil 16. Sıcaklığın *E. alkaliphilum* VLP1 proteaz enzim aktivitesine etkisi

### *E. alkaliphilum* VLP1 proteaz enziminin sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi

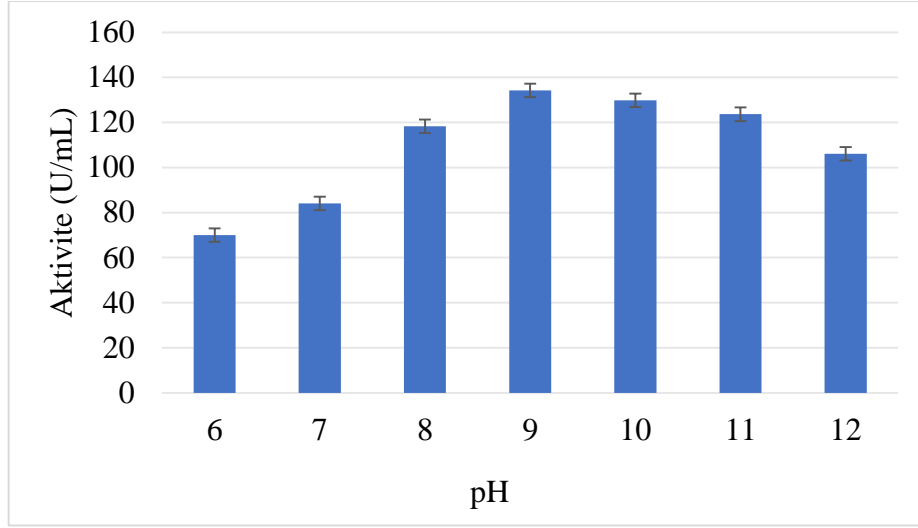
Sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi için ise enzim örnekleri 20, 30, 40, 50, 60 °C’de; 30, 60, 90 ve 120 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda numunelerin enzim aktiviteleri ölçülerek kontrol numunesine göre kalan aktiviteleri hesaplandı. Şekil 17’de görüldüğü gibi enzimin aktivitesini en uzun inkübasyon zamanı olan 120 dk sonunda dahi 20 °C’de %94 oranında, 30 °C’de %82 oranında, 40 °C’de %65 oranında, 50 °C’de %45 oranında ve 60 °C’de ise %18 oranında koruduğu tespit edildi. Daha kısa inkübasyon sürelerinin sonunda ise proteaz enzimi kararlılığını daha yüksek oranlarda korumuştur.



Şekil 17. Sıcaklığın *E. alkaliphilum* VLP1 proteaz enzim stabilitesine etkisi

### Enzimin Optimum pH’sının Belirlenmesi

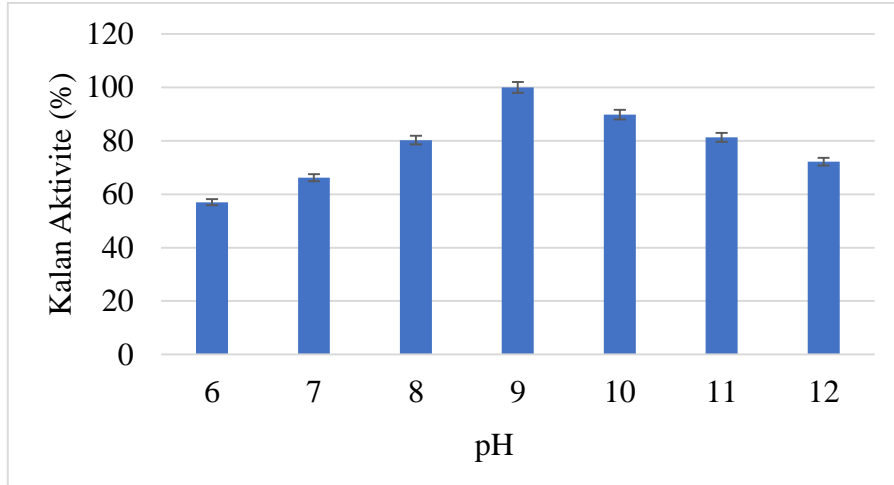
Proteaz enziminin optimum pH’sının belirlenmesi için pH 6,0-12,0 değerlerinde enzim aktiviteleri incelendi. Şekil 18’de proteaz enziminin 134 U/mL aktivite ile optimal pH’sının 9 olduğu görülmektedir.



**Şekil 18.** pH'nın *E. alkaliphilum* VLP1 proteaz enzim aktivitesine etkisi

### Enzimin pH stabilitesinin belirlenmesi

Enzimin pH stabilitesinin belirlenmesi için, enzim örnekleri pH 6-12 aralığında 1 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda Şekil 19'da görüldüğü gibi enzim aktiviteleri ölçülerek kontrol numunelerine göre kalan aktiviteler hesaplandı. Enzimin pH 8-11 aralığında oldukça stabil kaldığı ve %80'den fazla stabilitesini koruduğu gözlemlenmiştir. pH 12'de dahi enzimin bağlı aktivitesinin %70'in üzerinde olduğu tespit edilmiştir. pH 9'da ise oldukça kararlı kaldığı görülmektedir.

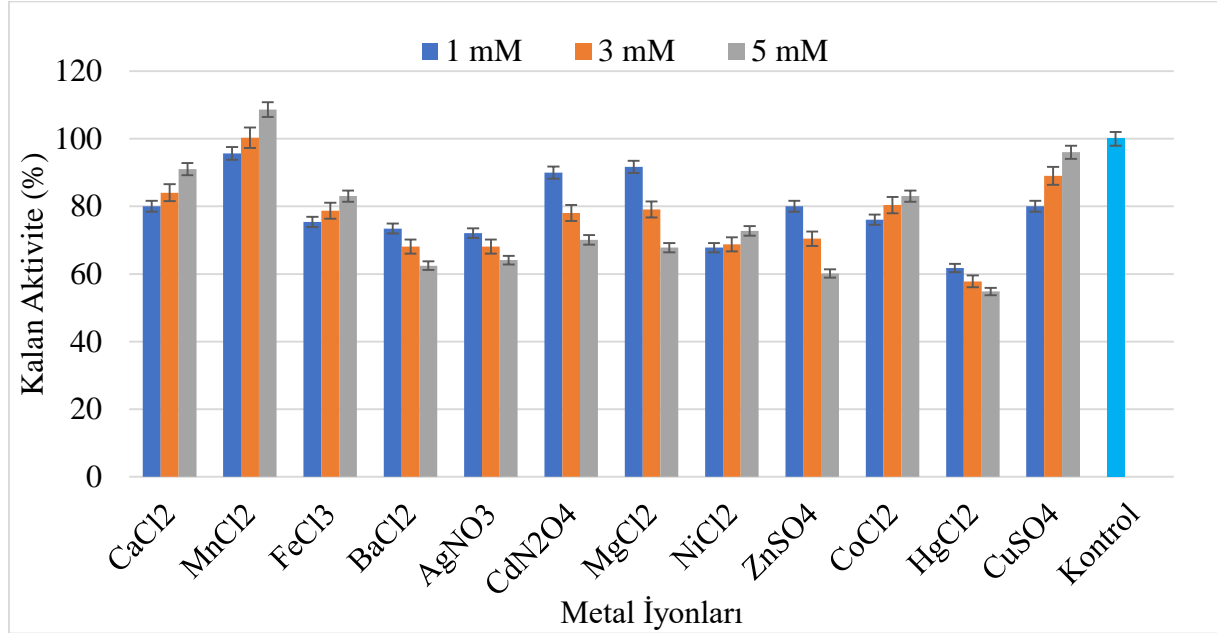


**Şekil 19.** pH'nın *E. alkaliphilum* VLP1 proteaz enzim stabilitesine etkisi

### Metal iyonlarının proteaz enzimi üzerine etkisinin belirlenmesi

Metal iyonlarının proteaz aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesi için CaCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, BaCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, AgNO<sub>3</sub>, CdN<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>, NiCl<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, CoCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub> ve CuSO<sub>4</sub> bileşiklerinin pH 9,0, 50 mM glisin-NaOH tamponu ile 2, 6 ve 10 mM'lık çözeltileri hazırlandı. Enzim ve bileşik çözeltileri eşit hacimlerde (1:1) 25 °C'de, 1 saat inkübe edildi ve enzim aktiviteleri ölçülerek, kontrol numunesine göre bağlı aktiviteleri hesaplandı. Enzimin 1 saatlik

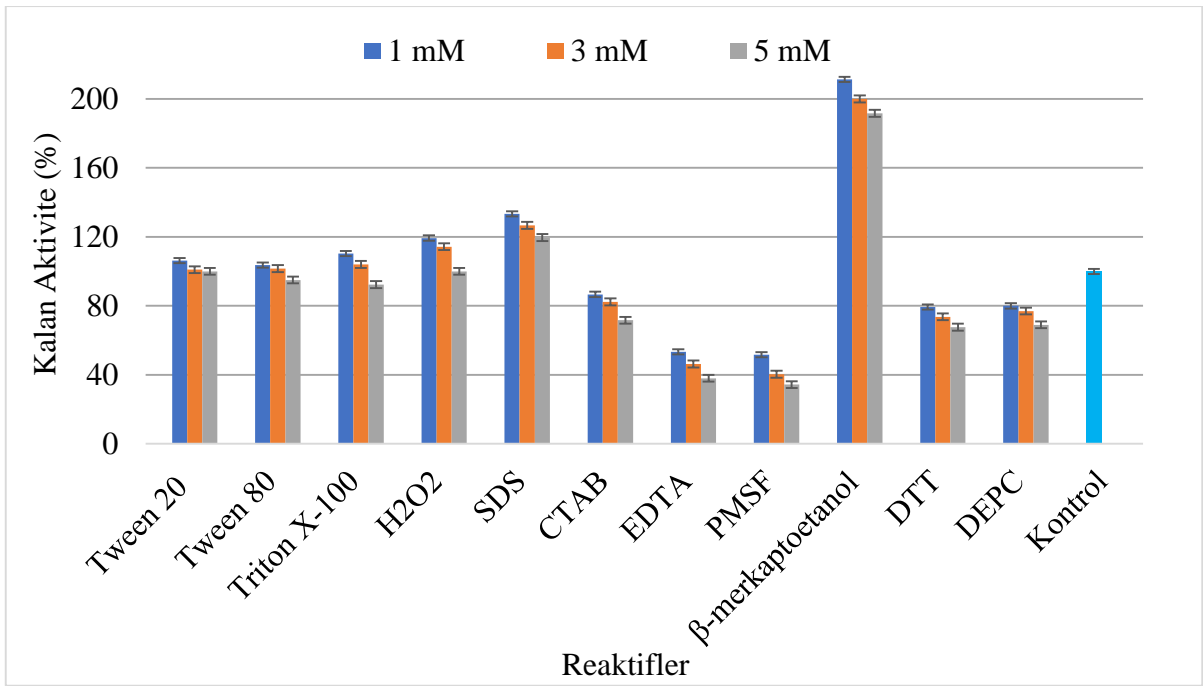
süre sonunda test edilen metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine olan etkileri Şekil 20’de gösterildi. Test edilen metal iyonları arasından sadece  $MnCl_2$ ’in 5 mM konsantrasyonda enzim aktivitesini az miktarda artırdığı gözlemlenmiştir. Diğer iyonlar varlığında enzim aktivitesinde farklı oranlarda azalmalar görülmüştür. En yüksek düşüş ise 5 mM  $HgCl_2$  varlığında gözlemlenmiştir.



Şekil 20. Proteaz enzimi üzerine potansiyel bileşiklerin etkisi

### Reaktiflerin proteaz enzimi üzerine etkisinin belirlenmesi

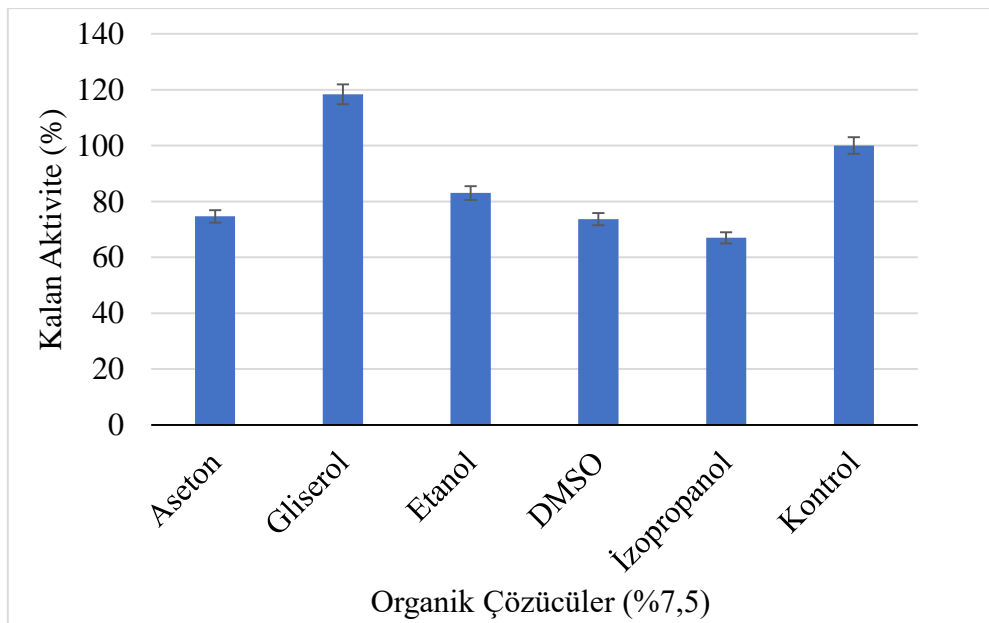
Reaktiflerin proteaz aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesi için Tween 20, Tween 80, Triton X-100,  $H_2O_2$ , SDS, CTAB, EDTA, PMSF,  $\beta$ -merkaptoetanol, DTT, DEPC ve  $MgSO_4$ ’ün pH 9,0, 50 mM glisin-NaOH tamponu ile 2, 6 ve 10 mM’lık çözeltileri hazırlandı. Enzim ve çözeltiler eşit (1:1) oranda 25 °C’de, 1 saat inkübe edildi ve enzim aktiviteleri ölçülerek, kontrol numunesine göre bağıl aktiviteleri hesaplandı. Şekil 21’de proteaz enzimi üzerine çeşitli reaktiflerin etkisi görülmektedir. 5 mM’lık konsantrasyonlarda reaktif varlığında rölatif aktiviteleri sırasıyla; Tween 20 %100, Tween 80 %95, Triton X-100 %92,  $H_2O_2$  %100, SDS %120, CTAB %72, EDTA %38, PMSF %34,  $\beta$ -merkaptoetanol %192, DTT %68 ve DEPC %69 olarak belirlendi. Enzimin EDTA ve PMSF ile yüksek oranda inhibe olduğu, CTAB, DTT ve DEPC varlığında negatif etkilendiği görülmüştür. SDS varlığında düşük oranda ve  $\beta$ -merkaptoetanol varlığında ilginç bir şekilde oldukça yüksek oranda aktivitesinin arttığı gözlemlenmiştir. Diğer reaktiflerin ise enzim aktivitesini çok fazla etkilemediği gözlemlenmiştir.



**Şekil 21.** Proteaz enzimi üzerine çeşitli reaktiflerin etkisi

### Çeşitli organik çözücülerin proteaz enzimi üzerine etkisinin belirlenmesi

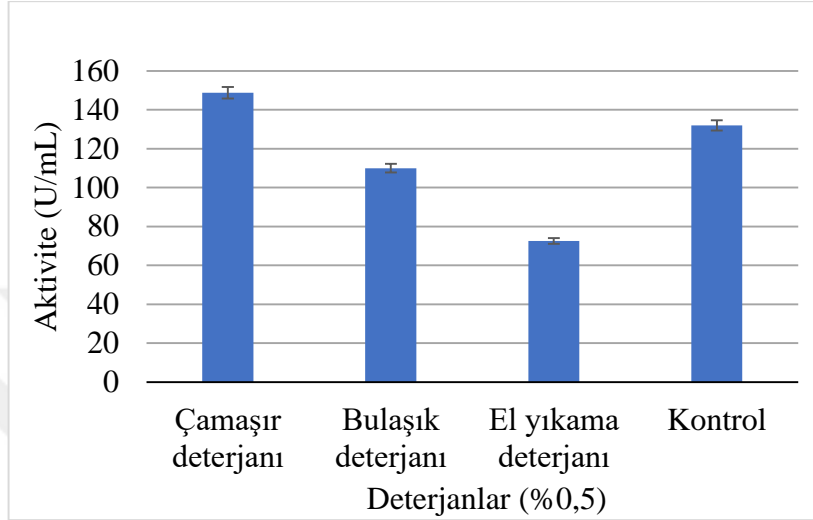
Organik çözücülerin proteaz aktivitesi üzerindeki etkisinin belirlenmesi için DMSO, aseton, gliserol, etanol ve izopropanolun pH 9,0, 50 mM glisin-NaOH tamponu ile %15 lik çözeltileri hazırlandı. Enzim ve çözeltiler eşit (1:1) oranda 25 °C’de, 1 saat inkübe edildi ve enzim aktiviteleri ölçülerek, kontrol numunesine göre bağıl aktiviteleri hesaplandı. Şekil 22’de görüldüğü gibi rölatif aktiviteleri sırasıyla; asetonunda %75, gliserolde %118, etanolde %83, DMSO’da %74 ve izopropanolde %67 olarak belirlendi. Test edilen çözücüler arasından sadece gliserolde %18’lik bir artış gözlemlenmiştir.



**Şekil 22.** Proteaz enzimi üzerine organik çözücülerin etkisi

### Ticari deterjanların proteaz enzimi üzerine etkisinin belirlenmesi

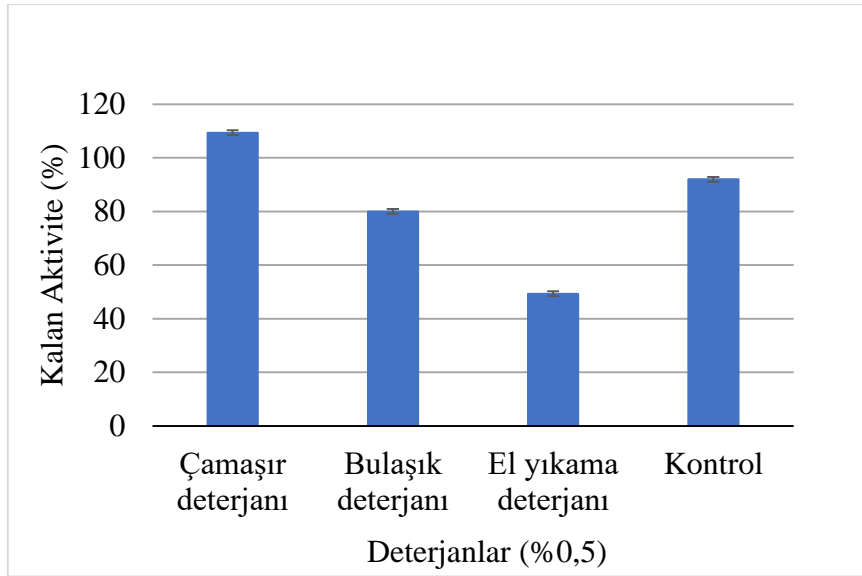
Ticari deterjanların proteaz enzimi üzerine etkisini belirlemek için 50 mM, pH 9,0 glisin-NaOH tamponu içerisine %1 oranında el yıkama deterjanı, sıvı bulaşık deterjanı ve sıvı çamaşır deterjanı çözeltileri hazırlandı. Enzim ve çözeltilerin eşit (1:1) oranda standart proteaz aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Şekil 23'te görüldüğü gibi en yüksek aktivite çamaşır deterjanı varlığında 148,72 U/mL olarak belirlendi.



Şekil 23. Proteaz enzimi üzerine çeşitli deterjanların etkisi

### Ticari deterjanların proteaz enzim stabilitesi üzerine etkisinin belirlenmesi

Deterjanların proteaz kararlılığı üzerindeki etkilerini incelemek için 50 mM, pH 9,0 glisin-NaOH tamponu içerisine %1 oranında el yıkama deterjanı, sıvı bulaşık deterjanı ve sıvı çamaşır deterjanı çözeltileri hazırlandı. Enzim ve çözeltiler eşit (1:1) oranda 25 °C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra enzim aktiviteleri standart aktivite analizi ile ölçüldü. Bağlı aktiviteler, deterjanlar olmadan aynı koşullar altında ön inkübasyona tabi tutulmuş kontrol enzim solüsyonu ile karşılaştırılarak hesaplandı. Rölatif aktiviteleri Şekil 24'te görüldüğü gibi sırasıyla; çamaşır deterjanında %116, bulaşık deterjanında %80 ve sıvı el sabununda %49 olarak belirlendi.



**Şekil 24.** Çeşitli deterjanların proteaz enzim stabilitesi üzerine etkisi

## Enzimin Biyoteknolojik Uygulamaları

### Proteaz enziminin deterjan etkisinin araştırılması

Tablo 4'e göre farklı kompozisyonlarda yıkama solüsyonları hazırlanmış ve kan lekeli pamuklu kumaş parçaları 30 °C ve 180 rpm'de 30 dk bu solüsyonlarda inkübe edilerek proteazın kan lekelerini giderme özelliği değerlendirilmiştir. Şekil 25'te görüldüğü gibi enzimin kan lekesi çıkarma performansına sahip olduğu anlaşılmıştır.



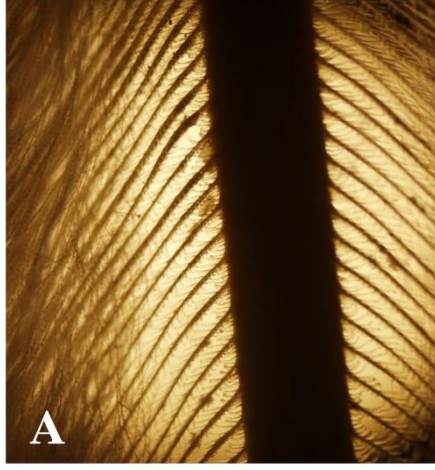
**Şekil 25.** *E. alkaliphilum* VLP1'in farklı yıkama solüsyonlarında kan lekesini çıkarma performansı (1. Tampon ve distile su 2. Tampon ve enzim 3. Sıvı el sabunu ve distile su 4. Sıvı el sabunu, tampon ve enzim, 5. Bulaşık deterjanı ve distile su 6. Bulaşık deterjanı, tampon ve enzim 7. Çamaşır deterjanı ve distile su 8. Çamaşır deterjanı, tampon ve enzim)

## Proteaz enziminin tavuk tüyü parçalama potansiyelinin araştırılması

*E. alkaliphilum* VLP1'in geliştirildiği TTM'da tüy parçalanma oranları, ağırlık kaybı yöntemi kullanılarak değerlendirildi. Tüyler bakteriler tarafından bozunduktan sonra, fermantasyon sıvısı, Whatman No. 1 filtre kâğıdından süzülerek tüy kalıntısı iki kez damıtılmış su ile iyice yıkandı, 60 °C'de kurutuldu ve ardından ağırlık kaybını hesaplamak için tartıldı. Tavuk tüylerinin *E. alkaliphilum* tarafından parçalanmış olduğu Şekil 26'da inkübasyon öncesi (A) ve inkübasyon sonrası (B) fotoğrafı çekilen erlenler kıyaslandığı zaman açıkça görülmektedir. İnkübasyon sonrası tavuk tüyleri mikroskop altında incelendiğinde Şekil 27'de görüldüğü üzere *E. alkaliphilum* VLP1'in, kontrolde (A) bulunan tüy ekseninden (şaft) dallanan ince tüylerin nerdeyse tamamını hidrolize ettiği görülmüştür. İlk kuru tüy ağırlığına göre ağırlık kaybı %78 olarak hesaplanmıştır.



**Şekil 26.** *E. alkaliphilum* VLP1'in TTM'de tavuk tüyü parçalama potansiyeli. A: inkübasyon öncesi, B: inkübasyon sonrası (1. Basal Medium, 2. Basal Medium + *E. alkaliphilum* VLP1, 3. Basal Medium + Tavuk tüyü, 4. Basal Medium + Tavuk Tüyü + *E. alkaliphilum* VLP1)



**Şekil 27.** *E. alkaliphilum* VLP1 tarafından parçalanmış tavuk tüyünün mikroskop altındaki görüntüsü (A: Kontrol tavuk tüyü B: İnkübasyon sonrası parçalanmış tüyü)

## TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Proteazlar endüstriyel enzimler arasında ilk sırada gelmektedir ve gıdadan tarıma, sağıktan kozmetiğe, tekstilden deterjan sektörüne kadar çok farklı alanda yaygın olarak kullanılmaktadır (Chanalia et al., 2011; Mishra et al., 2017; Contesini et al., 2018; Barzkar, 2020). Yüksek pH değerlerinde aktivite göstermeleri, endüstriyel ve biyoteknolojik sektörlerde geniş bir uygulama yelpazesine sahip olmaları ve ekonomik değerlerinden dolayı araştırmacıların ilgisini çeken alkali proteazların kaynağı olarak yeni mikrobiyal suşların keşfedilmesi oldukça önemlidir. Ayrıca, gün geçtikçe artan endüstriyel proteaz talebini karşılamak ve düşük maliyetle yüksek verimde proteaz üretimi sağlamak amacıyla en yüksek proteolitik aktiviteye sahip üreticiler tercih edilmektedir.

Bu çalışmada alkali mikroorganizmalar için çok değerli bir kaynak olan Van Gölü'nden proteaz üretebilen uygun bir bakteri izolatının bulunması hedeflendi. İlk olarak Van Gölü'nün alkali koşullarında yaşayabilen 55 tane bakteri saflaştırıldı, proteaz aktiviteleri SMA besiyerinde gelişimleri sırasında kolonilerin çevresinde oluşturdukları şeffaf zonların büyüklüğüne göre değerlendirildi. Aralarından en geniş proteolitik zon oluşturan 9 bakteri seçilerek hem klasik bakteri tanılama yöntemleriyle hem de 16s rRNA sekans analizi ile moleküler tanılamaları gerçekleştirildi.

Çalışmamızda da yüksek proteolitik aktiviteye sahip izolatların çoğunluğunun *Bacillus* cinsine ait *B. zhangzhouensis* VLP2, *B. zhangzhouensis* VLP4, *B. pumilus* VLP6, *B. australimaris* VLP8, *B. zhangzhouensis* VLP9 ve *B. thuringiensis* VLP15 türleri olduğu belirlendi. Alkalin proteaz üreticileri arasında *Bacillus sp.* türlerinin başta geldiği, en çok araştırılan ve kullanılan proteaz üreticilerinin bu cinse ait olduğu bilinmektedir (Shrinivas and Naik, 2011; Rodrigues et al., 2013; Rekik, 2019; Tekin, 2020). Çalışmada *Bacillus* türleri dışında yüksek aktiviteye sahip türler arasında *P. chengduensis* VLP13 ve *C. amylolyticum* VLP17 suşları da bulunmuştur. Ancak, kantitatif proteaz aktivite tayinlerine göre 103 U/mL aktivite ile *E. alkaliphilum* VLP1'in tüm izolatlardan daha yüksek aktiviteye sahip olduğu görüldüğünden çalışmaya turuncu renkli ve yuvarlak koloniye sahip, hareketli, basil ve Gram-pozitif olan *E. alkaliphilum* VLP1 izolatıyla devam edilmiştir.

*Exiguobacteria* temsilcileri, yüksek ve düşük sıcaklıklara, atmosferik basınçlara, civa ve arsenik gibi ağır metallerin varlığına uyum sağlamak için yeterli metabolik esnekliğe sahiptir (Vishnivetskaya et al., 2009; Karami et al., 2011; Belfiore et al., 2013). Dolayısıyla, *Exiguobacteria* cinsi ekstrem kabul edilen habitatlardan izole edilmiş çeşitli türlere sahiptir. Uttarkand Himalayaları'ndan izole edilen soğuğa toleranslı *E. acetylicum* 1P (MTCC 8707)

(Selvakumar et al., 2010), yine Sibiryaya permafrost ortamından izole edilen *E. sibiricum* (Rodrigues et al., 2006), Grönland'da derin buzul buz çekirdeğinden izole edilen *E. aurantiacum* (Miteva et al., 2004) bu cinsin temsilcileri arasındadır. Bu cinse ait türlerin alkali koşullarda da yaşama esnekliğine sahip oldukları bilinmektedir. Ekstrem kabul edilen habitatlarda yaşayabilen ve umut verici bir cinse ait olan *E. alkaliphilum* biyoteknolojik potansiyeli yeterince çalışılmamış bir türdür. *E. alkaliphilum*'un geniş sıcaklık aralığında gelişebildiği, ham petrol ve hidrokarbonları parçalama yeteneğinde olduğu bildirilmiştir (Delegan et al., 2021).

*E. alkaliphilum* VLP1 ile proteaz üretimi için optimum koşulların belirlenmesi amacıyla inkübasyon süresi, inkübasyon sıcaklığı, başlangıç pH'sı, farklı azot kaynakları, farklı karbon kaynakları ve tuz konsantrasyonları belirlenmiştir. *E. alkaliphilum* VLP1' in gelişimini 2 günde tamamladığı tespit edildiğinden çalışmalarda inkübasyon süresi olarak 2 gün baz alınmıştır. Optimum enzim üretiminin 1 veya 2 gün gibi kısa sürelerde gerçekleşmesi biyoteknolojik uygulanabilirlik açısından avantaj sağlamaktadır (Ahmetoglu et al., 2015).

İzolatin optimum proteaz üretim sıcaklığı 30 °C olarak bulunmuş, 40 °C'de de gelişimi ve enzim üretimi büyük oranda devam etmiştir. Proteaz üretimi için optimum başlangıç pH'sı 9,0 olarak tespit edilmiştir. Alkalifilik ortamlarda pH 10, 11 ve hatta 12'de dahi oldukça iyi gelişim göstererek proteaz üretmeye devam etmesi ve kararlılığını da yüksek oranda koruması, pH'sı 9 üzerinde olan Van Gölü'nden izole edildiği için beklenen bir durumdur.

*E. alkaliphilum* VLP1'de karbon kaynağı olarak en yüksek proteaz üretimi (141 U/mL) laktoz varlığında elde edilirken; azot kaynağı olarak maya özütü (151 U/mL) varlığında gözlemlenmiştir. *E. profundum* BK-P23 suşu ile gerçekleştirilen proteaz üretim ortamının istatistiksel optimizasyon çalışması sırasında benzer karbon kaynakları denenmiş ve bu çalışmada da en yüksek proteaz aktivitesi laktoz ile elde edilmiştir. Benzer olarak *E. profundum* ile %1 laktoz varlığında en yüksek proteaz aktivitesi gözlemlendiği bildirilmiştir (Anbu et al., 2013). Farklı optimizasyon çalışmalarına bakıldığında zaman *B. cereus* SIU1 suşunun optimum sıcaklığı 45 °C, başlangıç pH'sı 9, en iyi karbon kaynağı glukoz, en iyi azot kaynağı maya özütü (Sing et al., 2011); *B. licheniformis* KBDL4 suşunun optimum sıcaklığı 37 °C, başlangıç pH'sı 10 olarak belirlenirken en iyi karbon kaynağı kazein, en iyi azot kaynağı maya özütü (Pathak and Deshmukh, 2012); *Bacillus sp.* SMIA-2 suşunun optimum sıcaklığı 50 °C, başlangıç pH'sı 8,5 olarak belirlenirken en iyi karbon kaynağı nişasta, en iyi azot kaynağı peynir altı suyu protein (Rodrigues et al., 2013) ve *Virgibacillus sp.* EMB13 suşunun optimum sıcaklığı 30 °C, başlangıç pH'sı 8 olarak belirlenirken en iyi karbon kaynağı mannitol, en iyi azot kaynağı pepton olarak bulunmuştur (Sinha and Khare, 2012).

*E. alkaliphilum* VLP1'in en yüksek enzim üretiminin olduğu, NaCl (105 U/mL) ve Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (40 U/mL) konsantrasyonu %2 olarak belirlendi. Daha yüksek tuz konsantrasyonlarının (%4, %6, %8, %10 ve %12) bakteri gelişimini ve proteaz üretimini oldukça azalttığı tespit edildi. Çalışmada araştırdığımız tuz konsantrasyonları, Van Gölü'nün tuz konsantrasyonlarının oldukça üzerinde olduğu için bakteri gelişiminin ve proteaz üretiminin azalmasındaki sebep olarak düşünüldü.

Yüksek saflık gerektiren farmasötik ve tıbbi uygulamalarda kullanılan proteazların aksine, deterjan uyumlu proteazların mutlaka saf formda olması gerekmez; genellikle ham veya kısmen saflaştırılmış enzimler kullanılır. Bu, deterjanla uyumlu proteazların kullanımını uygun maliyetli hale getirir çünkü enzimin saflaştırılması zahmetli, zaman alıcı ve çok pahalıdır (Choudhary, 2012). Ancak, enzimlerin biyoteknolojik ve endüstriyel uygulamalarda kullanılabilirliklerini araştırmak için biyokimyasal, kinetik ve stabilite gibi özelliklerinin bilinmesi gerekmektedir. Dolayısıyla uygulama alanlarında saf halde kullanılması da sıklıkla saflaştırılmış enzim ile karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmektedir. *E. alkaliphilum* VLP1 suşu sıvı proteaz üretim ortamında 2 gün inkübe edildikten sonra kültür sıvısı 10000 rpm'de santrifüj edilerek süpernatantlar saflaştırma işleminde kullanılmıştır. Saflaştırma için ilk olarak amonyum sülfat çöktürmesi yapılmış ve proteaz enziminin %40'luk amonyum sülfat konsantrasyonunda çöktüğü belirlenmiştir. Saflaştırmanın diğer adımında HiTrap Q HP kolonu kullanılarak iyon değişim kromatografi gerçekleştirilmiş ve saflaştırma işlemi tamamlanmıştır.

Kolondan elde edilen fraksiyonlardan proteaz aktivitesi görülenler toplanıp, protein miktarları ölçülmüş ve SDS-PAGE analizleri yapılmıştır. Böylece 45 kat saflaştırma gerçekleştirilerek 1169 U/mg protein spesifik aktiviteye sahip saf proteaz elde edilmiştir. SDS-PAGE ile proteaz enziminin moleküler ağırlığı 69 kDa olarak bulunmuştur. *E. indicum* TBG-PICH-001 proteaz enzimi ile gerçekleştirilen bir çalışmada enzimin moleküler ağırlığı 60 kDa olarak bildirilmiştir (Kumar et al., 2018). Sıklıkla proteazların moleküler ağırlıkları 15–45 kDa arasında bir değere sahiptir (Rao et al., 1998). Fakat *Bacillus* türleri ile yapılan bazı çalışmalar incelendiğinde bu değerlerin üstünde ve altında moleküler kütleyle sahip proteaz enzimleri de görmek mümkündür. Örneğin Kato et al. (1992) yaptığı çalışmada *B. subtilis*'in ürettiği proteaz enziminin moleküler kütlelerini 90 kDa olarak bulurken, Rai ve Mukherjee (2010) *B. subtilis* DM-04'ün ürettiği proteaz enziminin moleküler kütlelerini 16,9 kDa olarak bulmuştur. Görüldüğü üzere proteaz enziminin moleküler kütlesi suşlara göre oldukça değişkendir.

Enzim karakterizasyonu için öncelikle optimum pH ve sıcaklık belirlenmiştir. Enzimin optimum aktivite gösterdiği pH 9,0 ve sıcaklık 40 °C olarak saptanmıştır. *E. alkaliphilum* türüne

oldukça yakın olduğu bilinen *E. aurantiacum* ZBB13 proteaz enziminin optimum pH'sı 10 ve optimum sıcaklığı 60 °C olduğu rapor edilmiştir (Zabin et al., 2021). Başka bir yakın tür olan *E. indicum* TBG-PICH-001 için ise optimum pH 10 olarak bildirilirken enzim aktivitesi için optimum sıcaklığın 35 °C olduğu bildirilmiştir (Kumar et al., 2018). Literatüre bakıldığında proteaz enzimlerinin farklı optimum pH ve sıcaklıklara sahip olabileceği görülmektedir. Demir (2020) *Bacillus* sp. *EBTA6* suşundan elde ettiği proteazın optimum sıcaklığını 50 °C, Çoban (2020) *Microbacterium* izolatından elde ettiği proteazın optimum pH'sını 8, Joshi and Satyanarayana (2013) ise *B. lehensis* proteazının optimum pH'sını 12,8 olarak bildirmişlerdir.

Enzimin sıcaklık stabilitesine bakıldığında, 120 dk sonunda 20 °C'de %94, 30 °C'de %82, 40 °C'de %65 ve 50 °C'de %45 oranında aktivitesini koruyabildiği gözlenirken 60°C'de aktivitesinin yalnızca %18'ini koruyabildiği tespit edilmiştir. Sıcaklık yükseldikçe enzimin stabilitesinde azalma görülmüştür. Deterjanla uyumlu proteazların çoğu, 20 ile 90°C arasındaki geniş bir sıcaklık aralığında aktif ve kararlıdır. Bu sayede sıcak, normal ve soğuk yıkama koşullarında kullanılabilirler. İnatçı ve özellikle yağlı lekelerle kirlenmiş pamuklu kumaşlarda yüksek sıcaklık tercih edilirken, ipek vb. hassas kumaşlarda 30-40 °C'de gerçekleştirilen yıkamalar tercih edilir. Özellikle sentetik liflerin kalitesinin korunması için düşük sıcaklıkta yıkanması gerekir (Nielsen et al., 1998). Düşük sıcaklıkta yıkama aynı zamanda enerji tasarrufu sağlayarak dünya çapındaki enerji krizini azaltır (Gurkok, 2019).

Enzimin pH stabilitesine bakıldığında ise aktivitesini pH 6'da %57, pH 7'de %66, pH 8'de %80, pH 9'de %100, pH 10'da %90, pH 11'de %81 ve pH 12'de %72 oranında koruduğu görülmüştür. Proteazların deterjan formülasyonlarında kullanılması için geniş bir pH aralığında önemli düzeyde proteolitik aktiviteye sahip olması gereklidir (Adinarayana et al., 2003). Genellikle, deterjan endüstrisinde kullanılan bakteriyel kaynaklı proteazlar optimum olarak 9-11 pH aralığında aktivite gösterirler (Gupta et al., 2002). Bu bağlamda, *E. alkaliphilum* proteaz enzimi de pH 9-12 aralığında kararlılığını yüksek oranda koruyarak deterjanların yapısına katılabilme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

Saflaştırılan proteaz enziminin kinetik sabitleri olan  $V_{max}$  değeri 2,000 U/mL ve  $K_m$  değeri 0,4 mg/mL olarak bulunmuştur.  $K_m$  değerinin düşük olması enzimin kazeine karşı afinitesinin yüksek olduğunu göstermiştir. Ayrıca  $V_{max}/K_m$  değerinin yüksekliği de enzimin substratı parçalamak için güçlü bir katalitik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir (Tekin, 2020). Bu durum *E. alkaliphilum* VLP1'in proteaz enziminin substratı olan kazeine karşı yüksek afiniteye sahip olduğunu ve substratını parçalamak için de güçlü katalitik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir.

Çalışmada farklı metal iyonları (1, 3 ve 5 mM), reaktif (1, 3 ve 5 mM) ve organik çözücülerin (%7,5) enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırıldı. *E. alkaliphilum* VLP1 suşundan üretilen proteazın aktivitesi  $Mn^{2+}$  (%108) iyonu etkisiyle artarken,  $Hg^{2+}$  (%54),  $Zn^{2+}$  (%60),  $Ba^{2+}$  (%62),  $Ag^+$  (%64),  $Mg^{2+}$  (%67),  $Cd^{2+}$  (%70) ve  $Ni^{2+}$  (%72 ) iyonları etkisiyle azalmıştır. Diğer iyonların ( $Fe^{3+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ) enzimin aktivitesi üzerine büyük bir etkisi olmadığı belirlenmiştir. Metal iyonlarının gereksinimi bir mikrobiyal proteazdan diğerine değiştiğinden, deterjan uyumlu proteazların katyonlar varlığındaki durumunu karşılaştırmak çok zordur. Örneğin, Sellami ve arkadaşları (2008), çalışmalarında *B. Licheniformis* RP1'in deterjan uyumlu enziminin sıcaklık stabilitesinde, ortama 2 mM  $Ca^{2+}$  eklenmesiyle 60 °C'de 1 saat içinde orijinal aktivitesinin %45'ten %85'e doğru bir artış olduğunu göstermişlerdir. Saracoglu ve arkadaşları (2013), *Bacillus* sp. PX6 suşunun güçlü aktivatörünü  $Fe^{2+}$ , güçlü inhibitörlerini  $Mg^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  ve  $Mn^{2+}$  olarak tespit ederken, Adinarayana ve arkadaşları (2003) çalışmalarında *B. subtilis* PE-11 suşunun aktivatörünü  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ , etkisi olmayan katyonlarını ise  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $Cd^{2+}$  ve  $Al^{3+}$  olarak tespit etmişlerdir. *E. aurantiacum* ZBB13 proteazıyla yapılan bir çalışmada 2 ve 5 mM konsantrasyonlarda  $Mg^{+2}$  ve  $Hg^{+2}$  iyonlarının enzim üzerine etkileri araştırılmıştır. Çalışmada  $Mg^{+2}$ 'nin 2 mM konsantrasyonda enzim aktivitesi üzerinde hiçbir etki göstermediği, 5 mM konsantrasyonda aktivitede hafif bir artış gösterdiği,  $Hg^{+2}$ 'nin 2 mM konsantrasyonda önemli bir etkiye sahip olmadığı, ancak 5 mM konsantrasyonda inhibitör bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Zabin et al., 2021). *E. alkaliphilum* VLP1'de ise  $Mg^{+2}$ 'de çok daha hafif olmak üzere her iki iyon da enzim aktivitesinde azalmaya neden olmuştur.

*E. alkaliphilum* VLP1'in proteaz enzimi üzerine etkisini incelemek için kullanılan reaktiflerden enzim aktivitesini azaltanlar CTAB %72, DEPC %69, DTT %68, EDTA %38 ve PMSF %34 olarak belirlenirken aktiviteyi artıranlar SDS %120 ve  $\beta$ -merkaptolanol %192 olarak saptanmıştır. Tween 20, Tween 80, Triton X-100 ve  $H_2O_2$ 'nin ise enzim aktivitesi üzerinde önemli bir etkisi görülmemiştir. Nadeem ve arkadaşları (2013), *B. licheniformis* UV-9'dan ürettikleri proteazın Tween-20, Tween- 45, Tween-65 ve Triton X-45 gibi yüzey aktif maddelere karşı stabilite gösterdiğini tespit etmişler. Malathu ve arkadaşları (2008) çalışmalarında *Microbacterium luteolum* proteaz enziminin güçlü inhibitörünü PMSF, diğer inhibitörlerini EDTA, TPCK, TLCK olarak belirlerken, Saracoglu ve arkadaşları (2013) *Bacillus* sp. PX61 proteaz enziminin güçlü inhibitörünü: PMSF; inhibitörlerini: üre, EDTA, aktivatörünü ise  $\beta$ -merkaptolanol olarak belirlemiştir. Deterjan uyumlu proteazların bazıları SDS tarafından aktive edilir. Deterjan uyumlu proteazın SDS tarafından uyarılması, deterjan bileşeni olarak uygunluğunu gösterir (Niyonzima et al., 2014). Çalışmamızın sonuçlarına göre,

*E. alkaliphilum* VLP1'in proteaz enzimi PMSF ile inhibisyonundan dolayı serin proteazlara, EDTA ile inhibisyonundan dolayı metalloproteazlara benzerlik göstermektedir.

*E. alkaliphilum* VLP1'in proteaz enzimi üzerine etkisini incelemek için kullanılan organik çözücülerden gliserolün (%118) enzim aktivitesini yükselttiği, etanol (%83), aseton (%75), DMSO (%74) ve izopropanolün (%67) aktiviteyi azalttığı belirlenmiştir. Birçok bakteri türünün hücre dışı enzim üretiminde organik çözücülerden etkilendiği bildirilmiştir (Kumar et al., 2014). *B. sphaericus* DS11, optimize edilmiş gliserol konsantrasyonlarının varlığında yüksek proteaz aktivitesi göstermiştir (Liu et al., 2010). Lakshmi ve arkadaşlarının (2018) *B. cereus* S8 ile yaptığı çalışmada DMSO ilavesiyle proteaz aktivitesi artarken izopropanol, metanol ve etanol ile enzim aktivitesinde azalma gözlenmiştir.

*E. alkaliphilum* VLP1'in alkali proteaz enziminin karakterize edilen tüm bu özelliklerinden yola çıkılarak proteazların en önemli biyoteknolojik uygulama alanlarından biri olan deterjan sektöründe kullanılabilirliği ve leke çıkarma potansiyeli araştırıldı. Suya ve toprağa karışarak eko-sistemlere zarar veren, hassas ciltlerde tahrişe neden olan, sürfaktan, fosfat, klor ve çamaşır suyu gibi pek çok sentetik kimyasal içeren deterjanların kullanımını azaltmak amacıyla çevre dostu temizleyicilerin geliştirilmesi son yıllarda oldukça önem kazanmıştır. Bilinçli tüketicilerin talepleriyle şekillenen deterjan sektörünün son yıllardaki araştırma geliştirme faaliyetlerinde sıklıkla deterjan formülasyonlarına hidrolitik enzimler, en başta da proteazlar katılmaya başlamış ve çevre dostu deterjanlar geliştirilmiştir (Zhang et al., 2021). Yenilenebilir kaynaklardan üretilebilmeleri, toksik olmamaları ve biyobozunur olmalarıyla enzimler sürdürülebilirliğe katkıda bulunmaktadır. Deterjan yapılarına enzimlerin katılmasıyla daha az miktarda deterjan, dolayısıyla daha az sentetik kimyasal madde kullanılarak istenen temizliğe, çevreye daha az zarar vererek ulaşılabilmektedir (Gurkok, 2019).

*E. alkaliphilum* VLP1'in proteazının leke çıkarma potansiyelini araştırmak amacıyla ilk olarak ticari çamaşır, bulaşık ve el yıkama deterjanları varlığında aktivitesi ve kararlılığı incelenmiştir. Deterjanların proteaz enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendiğinde, çamaşır deterjanı varlığında proteaz aktivitesinin arttığı (148,72 U/mL) tespit edilmiştir. Proteaz enziminin deterjanların varlığındaki kararlılığı incelendiğinde; bağlı aktivitesi çamaşır deterjanı varlığında %116, bulaşık deterjanı varlığında %80 ve sıvı el sabunu varlığında %49 olarak belirlenmiştir.

*E. alkaliphilum* VLP1 suşunun proteaz enziminin kan lekesini uzaklaştırma performansını incelemek için çeşitli yıkama testleri yapılmıştır. Tampon + distile su ile sıvı el sabunu + distile su yıkama solüsyonlarının kan lekesini çıkarmada tek başlarına yetersiz olduğu görülmüştür. Tampon+ enzim, sıvı el sabunu + tampon + enzim, bulaşık deterjanı + tampon +

enzim ve çamaşır deterjanı + distile sudan oluşan yıkama solüsyonlarının kan lekesini çıkarmada etkisinin olduğu görülmüş fakat lekeyi tamamen yok etme performansına sahip olmadığı anlaşılmıştır. Çamaşır deterjanı, tampon ve enzimden oluşan yıkama solüsyonunda ise kan lekesinin tamamen uzaklaştırıldığı görülmüştür. Yıkama solüsyonlarına proteaz enziminin eklenmesi leke çıkarmayı belirgin şekilde kolaylaştırdığı ve enzimin çamaşır deterjanı ile kullanılmasının leke çıkarmada daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle, *E. alkaliphilum* VLP1 proteaz enzimi, proteinli lekelerin uzaklaştırılmasını kolaylaştırmada deterjanlara katkı maddesi olarak kullanım için potansiyel bir aday olarak düşünülebilir. Jellouli ve arkadaşlarının (2011) gerçekleştirdiği çalışmada, kan lekesini uzaklaştırmak amacıyla *B. licheniformis* MP1 serin proteazının yıkama performansı değerlendirilmiştir. Enzim ve su içeren yıkama kompozisyonu kan lekelerini bariz şekilde azaltırken, deterjanın da yıkama kompozisyonuna ilavesiyle kan lekelerinin pamuk kumaşlardan tamamen uzaklaştırıldığı gözlenmiştir. Çalışmamızın sonuçları da Jellouli ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile benzerlik göstermektedir.

Çalışmamızda son olarak *E. alkaliphilum* VLP1'nin tavuk tüyü parçalama potansiyeli araştırılmıştır. Herhangi bir karbon ya da azot kaynağı eklenmeyen TTM içerisinde inkübe edilen *E. alkaliphilum*, besin kaynağı olarak tavuk tüyü yapısında bulunan proteinleri kullanmak üzere salgıladığı proteaz enzimiyle tavuk tüylerinin parçalanmasını sağlamıştır. Parçalanmış tüyler mikroskop altında incelendiği zaman *E. alkaliphilum* VLP1'in tüy ekseninden (şaft) dallanan ince tüyleri tamamen hidrolize ettiği görülmüştür. İlk kuru tüy ağırlığına göre ağırlık kaybı %78 olarak hesaplanmıştır. Oliveira ve arkadaşları (2016) yaptıkları bir çalışmada *Bacillus* sp. CL33A'nın tüyleri parçalama potansiyelini araştırmış ve 7 günlük inkübasyon sonunda ilk kuru tüye göre ağırlık kaybını %75 olarak belirlemişlerdir. Son ve arkadaşları (2008) benzer bir şekilde *B. pumilus* F3-4'ün 7 günlük inkübasyon sonunda tüylerin %75'ini parçalayabildiğini tespit etmişlerdir. Datroit ve arkadaşları (2009) yapmış oldukları çalışma neticesinde *Bacillus* sp. P45' in 3 günlük inkübasyon sonunda ilk kuru tüye göre ağırlık kaybını %90 olarak belirlemişlerdir. *B. polymyxa* B20 ve *B. cereus* B5esz suşları ile yapılan bir çalışmada ise tavuk tüyünün 10 günlük inkübasyonu sonunda sırasıyla %56,5 ve %72,1 oranında parçalandığını tespit etmişlerdir (Łaba and Rodziewicz, 2010). Görüldüğü üzere tüyleri parçalama potansiyeli suşlara göre oldukça değişkendir.

Ucuz hammaddelerin veya daha da avantajlı olan atık maddelerin ürün eldesinde kullanımı ve çevre kirliliğinin azaltılmasına katkı, sürdürülebilirlik ve biyoteknolojik çalışmalar açısından oldukça önem teşkil etmektedir. Yenilenebilir enerji kaynakları olarak atık biyokütlelerinin kullanılması endüstriyel uygulamalar açısından da ilgi çekmektedir. Bu tez

alışmasında hem kanatlı hayvancılık atıklarından olan tavuk tüyelerinin neden olduğu evre kirliliğini azaltmak hem de yüksek protein içeriklerinden dolayı tavuk tüyelerinin enzim gibi katma değeri yüksek çeşitli üretim işlemlerinde ucuz hammadde olarak kullanılmasıyla ekonomiye geri kazandırılmasında proteolitik mikroorganizmaların kullanılabilceği gösterildi.



## Sonuçlar

1. Van Gölü'nden proteolitik aktiviteye sahip 9 tane bakterinin izolasyonu, saflaştırılması, klasik ve moleküler yöntemlerle tanılaması gerçekleştirildi. İzolatların *E. alkaliphilum* VLP1, *B. zhangzhouensis* VLP2, *B. zhangzhouensis* VLP4, *B. pumilus* VLP6, *B. australimaris* VLP8, *B. zhangzhouensis* VLP9, *P. chengduensis* VLP13, *B. thuringiensis* VLP15 ve *C. amylolyticum* VLP17 olarak tanılandı.
2. En yüksek proteolitik aktiviteye sahip olan *E. alkaliphilum* VLP1 bakterisinin proteaz enziminin optimum üretim koşulları; 2 günlük inkübasyon süresinde 30 °C, pH 9, %0,5 laktoz ve %1 maya özütü eklendiğinde gerçekleştiği tespit edildi.
3. *E. alkaliphilum* VLP1 proteaz enziminin saflaştırılması amonyum sülfat çöktürmesi, ultrafiltrasyon ve iyon değişim kromatografisi yöntemleriyle gerçekleştirildi. Enzim 45 kat, %6,4 verimle ve 1169 U/mg protein spesifik aktivite ile saflaştırıldı.
4. *E. alkaliphilum* VLP1 proteaz enziminin moleküler ağırlığının 69 kDa,  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerinin ise sırasıyla 0,4 mM ve 2000 U/mg olduğu tespit edildi.
5. Enzim aktivitesi için optimum sıcaklık 40 °C ve optimum pH 9 olarak bulundu.
6. Çeşitli metal iyonları, reaktif ve çözücülerin varlığında *E. alkaliphilum* VLP1 proteaz enziminin kararlı olduğu görüldü.
7. Ticari deterjanlar varlığında *E. alkaliphilum* VLP1 proteaz enziminin kararlı olduğu gözlemlendi.
8. *E. alkaliphilum* VLP1 proteaz enziminin pamuklu kumaşlardan kan lekelerini çıkarmada etkili olduğu görüldü.
9. *E. alkaliphilum* VLP1'in tavuk tüylerini parçalamada etkili olduğu görüldü.

## KAYNAKÇA

- 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.
- Ahmed, S.A., Al-domany, R.A., El-Shayeb, N.M., Radwan, H.H., Saleh, S.A., 2008. Optimization, immobilization of extracellular alkaline protease and characterization of its enzymatic properties. *Research Journal of Agricultural Science*, 4(5), 434-446.
- Ahmetoglu, N., Bekler, F. M., Acer, O., Guven, R. G., Guven, K., 2015. Production, purification and characterisation of thermostable metallo-protease from newly isolated *Bacillus* sp. KG5. *EurAsian Journal of BioSciences*, (9).
- Ali, T.H., Ali, N.H., Mohamed, L.A., 2011. Production, purification and some properties of extracellular keratinase from feathers degradation by *Aspergillus oryzae* NRRL-447. *Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation*, 6(2), 123-136.
- Anbu, P., Annadurai, G., Hur, B., 2013. Production of alkaline protease from a newly isolated *Exiguobacterium profundum* BK-P23 evaluated using the response surface methodology. *Biologia*, 68(2), 186-193.
- Arshad, Z.I.M., Amid, A., Yusof, F., Jaswir, I., Ahmad, K., Loke, S.P., 2014. Bromelain: an overview of industrial application and purification strategies. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(17), 7283-7297.
- Babé, L.M., Craik, C.S., 1997. Viral proteases: evolution of diverse structural motifs to optimize function. *Cell*, 91(4), 427-430.
- Bah, C. S., Bekhit, A. E. D. A., McConnell, M. A., Carne, A., 2016. Generation of bioactive peptide hydrolysates from cattle plasma using plant and fungal proteases. *Food Chemistry*, 213, 98-107.
- Banerjee, G., Ray, A.K., 2017. Impact of microbial proteases on biotechnological industries. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 33(2), 119-143.
- Barzkar, N., 2020. Marine microbial alkaline protease: An efficient and essential tool for various industrial applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 161, 1216-1229.
- Baweja, M., Tiwari, R., Singh, P. K., Nain, L., Shukla, P., 2016. An alkaline protease from *Bacillus pumilus* MP 27: functional analysis of its binding model toward its applications as detergent additive. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1195.
- Belfiore, C., Ordonez, O. F., Farías, M. E., 2013. Proteomic approach of adaptive response to arsenic stress in *E. sp. S17*, an extremophile strain isolated from a high-altitude Andean Lake stromatolite. *Extremophiles*, 17(3), 421-431.
- Benlurvankar, V., Jebapriya, G.R., Gnanadoss, J.J., 2015. Protease production by *Penicillium* sp. LCJ228 under solid state fermentation using groundnut oilcake as substrate. *Life*, 50, 12.
- Benmrad, M.O., Moujehed, E., Elhouli, M.B., Mechri, S., Bejar, S., Zouari, R., et al., 2018. Production, purification, and biochemical characterization of serine alkaline protease from *Penicillium chrysogenum* strain X5 used as excellent bio-additive for textile processing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 119, 1002-1016.

- Bohacz, J., Kornilłowicz-Kowalska, T., 2019. Fungal diversity and keratinolytic activity of fungi from lignocellulosic composts with chicken feathers. *Process Biochemistry*, 80, 119-128.
- Boyce, S., Tipton, K.F., 2001. Enzyme classification and nomenclature. e LS.
- Bradshaw, R.A., 2013. Aminopeptidases, Editor(s): William J. Lennarz, M. Daniel Lane, *Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition)*, Academic Press, Pages 97-99.
- Brandelli, A. (2009). Keratinolytic potential of a novel *Bacillus sp.* P45 isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63(3), 358-363.
- Brandelli, A., Daroit, D.J., Riffel, A., 2010. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 1735-1750
- Brink, B., 2010. Urease test protocol. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Buehler, E., 2006. Bread Science: the chemistry and craft of making bread. Two Blue Books Publisher, Hillsborough, NC, USA, 254 pp.
- Castro, R.J.S., Sato, H.H., 2014. Production and biochemical characterization of protease from *Aspergillus oryzae*: an evaluation of the physical–chemical parameters using agroindustrial wastes as supports. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(3), 20-25.
- Chanalia, P., Gandhi, D., Jodha, D., Singh, J., 2011. Applications of microbial proteases in pharmaceutical industry: an overview. *Reviews and Research in Medical Microbiology*, 22(4), 96-101.
- Charles, P., Devanathan, V., Anbu, P., Ponnuswamy, M.N., Kalaichelvan, P.T., Hur, B.K., 2008. Purification, characterization and crystallization of an extracellular alkaline protease from *Aspergillus nidulans* HA-10. *Journal of Basic Microbiology*, 48(5), 347-352.
- Choudhary, V., 2012. Production, isolation and characterization of alkaline protease from *Aspergillus versicolor* PF/F/107. *Journal of Academia and Industrial Research*, 1(5), 272-277.
- Collins, M.D., Lund, B.M., Farrow, J.A.E., Schleifer, K.H., 1983. Chemotaxonomic study of an alkaliphilic bacterium, *E. aurantiacum* gen. nov., sp. nov. *Microbiology*, 129(7), 2037-2042.
- Cong, M., Jiang, Q., Xu, X., Huang, L., Su, Y., Yan, Q., 2017. The complete genome sequence of *Exiguobacterium arabatum* W-01 reveals potential probiotic functions. *MicrobiologyOpen*, 6(5), e00496.
- Contesini, F.J., Melo, R.R.D., Sato, H.H., 2018. An overview of Bacillus proteases: from production to application. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(3), 321-334.
- Cortezi, M., Contiero, J., Lima, C., Lovaglio, R. B., Monti, R., 2008. Characterization of a feather degrading by *Bacillus amyloliquefaciens* protease: a new strain. *World Journal of Agricultural Sciences*, 4(5), 648-656.
- Çelik Algül, D., 2019. Topraktan İzole Edilen *Bacillus Subtilis* A8'den Proteaz Üretimi ve Karakterizasyonu. MS Thesis, Institute of Natural and Applied Science, Diyarbakır.
- Çiftçi, Y., Işık, M.A., Alkeveli, T., Yeşilova, Ç., 2008. Van Gölü havzasının çevre jeolojisi. *Jeoloji Mühendisliği Dergisi*, 32(2), 45-77.

- Çoban, H.B., 2020. *Axinella damicornis* süngerinden izole edilen sucul bakterilerin proteaz üretkenliklerinin araştırılması ve üretilen proteaz enziminin kısmi karakterizasyonu. *Mediterranean Agricultural Sciences*, 33(2), 223-229.
- Dambmann, C., Holm, P., Jensen, V., Nielsen, M.H., 1971. How enzymes got into detergents. *Developments in Industrial Microbiology*, 12, 11-23.
- Daroit, D.J., Correa, A.P.F., Brandelli, A., 2009. Keratinolytic potential of a novel *Bacillus sp.* P45 isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63(3), 358-363.
- Dayanandan, A., Kanagaraj, J., Sounderraj, L., Govindaraju, R., Rajkumar, G.S., 2003. Application of an alkaline protease in leather processing: an ecofriendly approach. *Journal of Cleaner Production*, 11(5), 533-536.
- de Lima, E. E., Franco, D. G., Galeano, R. M. S., Guimarães, N. C. D. A., Masui, D. C., Giannesi, G. C., & Zanoelo, F. F., 2021. Biochemical characterization of a partially purified protease from *Aspergillus terreus* 7461 and its application as an environmentally friendly dehairing agent for leather industry. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 51(4), 320-330.
- Delegan, Y., Kocharovskaya, Y., Bogun, A., Sizova, A., Solomentsev, V., Iminova, L., et al., 2021. Characterization and genomic analysis of *E. alkaliphilum* B-3531D, an efficient crude oil degrading strain. *Biotechnology Reports*, 32, e00678.
- Demain, A.L., Solomon, N.A., 1981. In *Industrial Microbiology and the Advent of Genetic Engineering*, Scientific American, Freeman & Comp., San Francisco, 3-14.
- Demir, S., 2020. *Bacillus sp.* EBTA6 ile proteaz üretiminin optimizasyonu ve enzimin endüstriyel kullanım olanaklarının araştırılması (Master's thesis, Sakarya Üniversitesi).
- Dettmer, A., Cavalli, É., Ayub, M.A., Gutterres, M., 2013. Environmentally friendly hide unhairing: enzymatic hide processing for the replacement of sodium sulfide and delimid. *Journal of Cleaner Production*, 47, 11-18.
- Dhillon, A., Sharma, K., Rajulapati, V., Goyal, A., 2017. Proteolytic enzymes. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 149-173). Elsevier.
- Duman, Y., 2008. *Bacillus clausii* alkalen proteazının su ile karışabilen organik çözücüler varlığında kinetik ve termodinamik özelliklerinin incelenmesi. PhD Thesis, Institute of Natural and Applied Science. Kocaeli
- El-Khoneyzy, M. I., Elgammal, E. W., Ahmed, E. F., & Abd-Elaziz, A. M., 2021. Detergent stable thiol-dependant alkaline protease produced from the endophytic fungus *Aspergillus ochraceus* BT21: Purification and kinetics. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 35, 102046.
- Ellaiah, P., Srinivasulu, B., Kunamneni, A., 2002. A review on microbial alkaline proteases, *Journal of Scientific and Industrial Research*, 61, 690-704.
- Emran, M.A., Ismail, S.A., Hashem, A.M., 2020. Production of detergent stable thermophilic alkaline protease by *Bacillus licheniformis* ALW1. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 26, 101631.
- Fazilat, A., 2016. Production, isolation, purification and partial characterization of an extracellular acid protease from *Aspergillus niger*. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, 3(3), 32-38.
- Fersht, A., 1998. *Structure and Mechanism in Protein Science*. USA: Freeman and Company

- Freitas, A.C., Baleeiro, F.C.F., Fonseca, R.F., Neto, V.B., Pinto, G.A.S., Farinas, C.S., 2015. Bioprocess development to add value to canola cake used as substrate for proteolytic enzyme production. *Food and Bioproducts Processing*, 95, 173-182.
- Furhan, J., Awasthi, P., Sharma, S., 2019. Biochemical characterization and homology modelling of cold-active alkophilic protease from Northwestern Himalayas and its application in detergent industry. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17, 726-735.
- Gagaoua, M., Dib, A.L., Lakhdara, N., Lamri, M., Botineştean, C., Lorenzo, J.M., 2021. Artificial meat tenderization using plant cysteine proteases, *Current Opinion in Food Science*, 38, 177-188.
- Gençkal, H., Tari, C., 2006. Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus sp.* isolated from natural habitats. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(4), 703-710.
- Gonzalez-Rabade, N., Badillo-Corona, J.A., Aranda-Barradas, J.S., del Carmen Oliver-Salvador, M., 2011. Production of plant proteases in vivo and in vitro-a review. *Biotechnology Advances*, 29(6), 983-996.
- Grazziotin, A., Pimentel, F.A., Sangali, S., de Jong, E.V., Brandelli, A., 2007. Production of feather protein hydrolysate by keratinolytic bacterium *Vibrio sp.* kr2. *Bioresource Technology*, 98(16), 3172-3175.
- Gupta, R., Beg, Q., Khan, S., Chauhan, B., 2002. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(4), 381-395.
- Gurkok, S., 2019. Microbial enzymes in detergents: a review. *International Journal of Scientific and Engineering Research*, 10(9), 75-81.
- Gurkok, S., 2022. Screening of high yield biosurfactant producing strains of agribiotechnological importance. In *Applications of Biosurfactant in Agriculture* (pp. 163-180). Academic Press.
- Gurkok, S., Ozdal, M., 2021. Purification and characterization of a novel extracellular, alkaline, thermoactive, and detergent-compatible lipase from *Aeromonas caviae* LipT51 for application in detergent industry. *Protein Expression and Purification*, 180, 105819.
- Gutiérrez-Preciado, A., Vargas-Chávez, C., Reyes-Prieto, M., Ordoñez, O.F., Santos-García, D., Rosas-Pérez, T., et al., 2017. The genomic sequence of *Exiguobacterium chiriquucha* str. N139 reveals a species that thrives in cold waters and extreme environmental conditions. *PeerJ*, 5, e3162.
- Hinnemann, B., Nørskov, J.K., 2006. Catalysis by enzymes: the biological ammonia synthesis. *Topics in Catalysis*, 37(1), 55-70.
- Ichida, J.M., Krizova, L., LeFevre, C.A., Keener, H.M., Elwell, D.L., Burt Jr, E.H., 2001. Bacterial inoculum enhances keratin degradation and biofilm formation in poultry compost. *Journal of Microbiological Methods*, 47(2), 199-208.
- Jain, P.C., Agrawal, S.C., 1980. A note on the keratin decomposing capability of some fungi. *Transactions of the Mycological Society of Japan*, 21(4), 513-517.
- Jaswal, R., Kocher, G., Virk, M., 2008. Production of alkaline protease by *Bacillus circulans* using agricultural residues: a statistical approach. *Indian Journal of Biotechnology*, 7, 356-360.
- Jellouli, K., Ghorbel-Bellaaj, O., Ayed, H.B., Manni, L., Agrebi, R., Nasri, M., 2011. Alkaline-protease from *Bacillus licheniformis* MP1: purification, characterization and potential

- application as a detergent additive and for shrimp waste deproteinization. *Process Biochemistry*, 46(6), 1248-1256.
- Joshi, S. ve Satyanarayana, T., 2013. Characteristics and applications of a recombinant alkaline serine protease from a novel bacterium *Bacillus lehensis*, *Bioresource Technology*, 131, 76–85.
- Kainoor, P.S., Naik, G., 2010. Production and characterization of feather degrading keratinase from *Bacillus sp.* JB 99, *Indian Journal of Biotechnology* 9(4), 384-390.
- Kara, M., Sivri, D., Köksel, H., 2005. Effects of high protease-activity flours and commercial proteases on cookie quality. *Food Research International*, 38(5), 479-486.
- Karami, K., Zolgharnein, H., Assadi, M.M., Savari, A., Dadollahi, S., 2011. New report on the occurrence of *Exiguobacterium sp.* AT1b in the Persian Gulf and its resistance to mercury pollution. *Current Research in Bacteriology*, 4(1), 23-27.
- Karray, A., Alonazi, M., Horchani, H., & Ben Bacha, A., (2021). A novel thermostable and alkaline protease produced from *Bacillus stearothermophilus* isolated from olive oil mill sols suitable to industrial biotechnology. *Molecules*, 26(4), 1139.
- Kato, T., Yamagata, Y., Arai, T., Ichishima, E., 1992. Purification of a new extracellular 90-kDa serine proteinase with isoelectric point of 3.9 from *Bacillus subtilis* (natto) and elucidation of its distinct mode of action, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 56(7), 1166– 1168.
- Kaur, S., Vohra, R.M., Kapoor, M., Beg, Q.K., Hoondal, G.S., 2001. Enhanced production and characterization of a highly thermostable alkaline protease from *Bacillus sp* P2. *world journal of microbiology & biotechnology* 17(2), 125-129.
- Khan, F., 2013. New microbial proteases in leather and detergent industries. *Innov Res Chem*, 1(1), 1-6.
- Khardenavis, A. A., Kapley, A., Purohit, H. J., 2009. Processing of poultry feathers by alkaline keratin hydrolyzing enzyme from *Serratia sp.* HPC 1383. *Waste management*, 29(4), 1409-1415.
- Kılıçer, H., Özcan, B.A.H.R.İ., 2013. Yem katkısı selüloz enzimlerini üreten termofilik *Bacillus* suşlarının izolasyonu ve enzimlerin kısmi karakterizasyonu. *Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 17(4), 1-8
- Kıran, Ö.E., Çömlekçioğlu, U., Dostbil, N., 2006. Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları. *KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9(1), 12-19.
- Kirk, O., Borchert, T.V., Fuglsang, C.C., 2002. Industrial enzyme applications. *Current opinion in biotechnology*, 13(4), 345-351.
- Kojima, M., Kanai, M., Tominaga, M., Kitazume, S., Inoue, A., Horikoshi, K., 2006. Isolation and characterization of a feather-degrading enzyme from *Bacillus pseudofirmus* FA30-01. *Extremophiles*, 10(3), 229-235.
- Kondo, M., Fukao, T., Shinoda, S., Kawamoto, N., Kaneko, H., Kato, Z., Matsui, E., Teramoto, T., Nakano, T., Kondo, N., 2007. Lymphocyte responses to chymotrypsin or trypsin v-digested beta-lactoglobulin in patients with cow's milk allergy. *Official Journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*, 3(1), 1-9.
- Kudrya, V. A., Simonenko, I.A., 1994. Alkaline serine proteinase and lectin isolation from the culture fluid of *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Miotecnology*, 41(5), 505-509.

- Kulshreshtha, N.M., Kumar, R., Begum, Z., Shivaji, S., Kumar, A., 2013. *E. alkaliphilum* sp. nov. isolated from alkaline wastewater drained sludge of a beverage factory. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 4374-4379.
- Kumar, A., Vishwakarma, H. S., Singh, J., Dwivedi, S., Kumar, M., 2015. Microbial pigments: production and their applications in various industries. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical & Biological Sciences*, 5(1), 365–374.
- Kumar, R.S., Ananthan, G., Prabhu, A.S., 2014. Optimization of medium composition for alkaline protease production by *Marinobacter* sp. GA CAS9 using response surface methodology—a statistical approach. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(2), 191-197.
- Kumar, S.S., Jithin, V., Jijeesh, V., Gayathri, V., Shiburaj, S., Haridas, M., Sabu, A., 2018. Production and purification of alkaline protease from *Exiguobacterium indicum* TBG-PICH-001 isolated from soil samples of Pichavaram Estuary (Tamil Nadu). *Indian Journal of Geo Marine Sciences* 47(03), 580-586.
- Łaba, W., Rodziewicz, A., 2010. Keratinolytic potential of feather-degrading *Bacillus polymyxa* and *Bacillus cereus*. *Polish Journal of Environmental Studies*, 19(2).
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Lakshmi, B.K.M., Kumar, D.M., & Hemalatha, K.P.J., 2018. Purification and characterization of alkaline protease with novel properties from *Bacillus cereus* strain S8. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), 295-304.
- Li, ZW., Liang, S., Ke, Y. et al., 2020. The feather degradation mechanisms of a new *Streptomyces* sp. isolate SCUT-3. *Communications Biology* 3, 191.
- Liu, F., Li, Y., He, W., Wang, W., Zheng, J., Zhang, D., 2021. *Exiguobacterium algae* sp. nov. and *Exiguobacterium qingdaonense* sp. nov., two novel moderately halotolerant bacteria isolated from the coastal algae. *Antonie van Leeuwenhoek*, 114(9), 1399-1406.
- Liu, S., Fang, Y., Lv, M., Wang, S., Chen, L., 2010. Optimization of the production of organic solvent-stable protease by *Bacillus sphaericus* DS11 with response surface methodology. *Bioresource Technology*, 101(20), 7924-7929.
- Lobmann, R., Zemlin, C., Motzkau, M., Reschke, K., Lehnert, H., 2006. Proteaz absorban örtü ile tedavi edilmiş diyabetik ayak yaralarında matriks metalloproteinazlar ve büyüme faktörlerinin ekspresyonu. *Journal of Diabetes and its Complications*, 2(4), 230-238.
- Lowry, O.H., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Mahler, R.H., Cordes, H., 1966. *Biological Chemistry*. New York, 346- 411.
- Malathu, R., Chowdhury, S., Mishra, M., Das, S., Moharana, P., Mitra, J., et al., 2008. Characterization and wash performance analysis of microbial extracellular enzymes from East Calcutta Wetland in India.
- Mishra, S.S., Ray, R.C., Rosell, C.M., Panda, D., 2017. Microbial enzymes in food applications: History of progress. In *Microbial enzyme technology in food applications* (pp. 3-18). CRC Press.
- Miteva, V.I., Sheridan, P.P., Brenchley, J.E., 2004. Phylogenetic and physiological diversity of microorganisms isolated from a deep Greenland glacier ice core. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1), 202-213.

- Morazzani, E.M., Compton, J.R., Leary, D.H., Berry, A.V., Hu, X., et al., 2019. Proteolytic cleavage of host proteins by the Group IV viral proteases of Venezuelan equine encephalitis virus and Zika virus, *Antiviral Research*, 164, 106-122.
- Moyes, R. B., Reynolds, J., Breakwell, D. P., 2009. Differential staining of bacteria: gram stain. *Current Protocols in Microbiology*, 15(1), A-3C.
- Muthulakshmi, C., Gomathi, D., Kumar, D.G., Ravikumar, G., Kalaiselvi, M., Uma, C., 2011. Production, purification and characterization of protease by *Aspergillus flavus* under solid state fermentation. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 4(3).
- Nadeem, F., Mehmood, T., Naveed, M., Shamas, S., Saman, T., Anwar, Z., 2020. Protease production from *Cheotomium globusum* through central composite design using agricultural wastes and its immobilization for industrial exploitation. *Waste and Biomass Valorization*, 11(12), 6529-6539.
- Nadeem, M., Qazi, J.I., Syed, Q., Gulsher, M., 2013. Purification and characterization of an alkaline protease from *Bacillus licheniformis* UV-9 for detergent formulations. *Songklanakarinn Journal of Science & Technology*, 35(2).
- Nakiboğlu, N., Toscali, D., Yaşa, İ., 2001. Silver recovery from waste photographic films by using enzymatic method. *Turkish Journal of Chemistry*, 25(3), 349-353.
- Neklyudov, A.D., Ivankin, A.N., Berdutina, A.V., 2000. Properties and uses of protein hydrolysates. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 36(5), 452-459.
- Ni, H., Chen, Q., Chen, F., Fu, M., Dong, Y., Cai, H., 2011. Improved keratinase production for feather degradation by *Bacillus licheniformis* ZJU31410 in submerged cultivation. *African Journal of Biotechnology*, 10(37), 7236-7244.
- Nielsen, M.H., Jepsen, S.J., Outtrup, H., 1981. Enzymes for low temperature washing. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 58(5), 644-649.
- Nista, E.C., Candelli, M., Cremonini, F., Cazzato, I.A., Zocco, M.A., Franceschi, F., et al., 2004. *Bacillus clausii* therapy to reduce side-effects of anti-*Helicobacter pylori* treatment: randomized, double-blind, placebo controlled trial. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 20(10), 1181-1188.
- Niyonzima, F.N., More, S., 2014. Purification and properties of detergent-compatible extracellular alkaline protease from *Scopulariopsis spp.* *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 44(7), 738-759.
- Oliveira, C.T., Pellenz, L., Pereira, J.Q., Brandelli, A., Daroit, D.J., 2016. Screening of bacteria for protease production and feather degradation. *Waste and Biomass Valorization*, 7(3), 447-453.
- Ordoñez, O.F., Lanzarotti, E., Kurth, D., Gorriti, M. F., Revale, S., Cortez, N., et al., 2013. Draft genome sequence of the polyextremophilic *Exiguobacterium sp.* strain S17, isolated from hyperarsenic lakes in the Argentinian Puna. *Genome Announcements*, 1(4), e00480-13.
- Ozdal, M., Gurkok, S., Ozdal, O.G., 2017. Optimization of rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* OG1 using waste frying oil and chicken feather peptone. *3 Biotech*, 7(2), 117.
- Panda, S.K., Mishra, S.S., Kayitesi, E., Ray, R.C., 2016. Microbial-processing of fruit and vegetable wastes for production of vital enzymes and organic acids: Biotechnology and scopes. *Environmental Research*, 146, 161-172.

- 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(8), 569–576.
- Pranay, K., Padmadeo, S.R., Jha, V., Prasad, B., 2019. Screening and identification of amylase producing strains of *Bacillus*. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 7(4), 5-2.
- Raghunath T. Mahajan, S.B.B., 2010. Biological aspects of proteolytic enzymes: A Review. *Journal of Pharmacy Research*.
- Rai, S.K., Mukherjee, A.K., 2010. Statistical optimization of production, purification and industrial application of a laundry detergent and organic solvent-stable subtilisin-like serine protease (Alzwiiprase) from *Bacillus subtilis* DM-04. *Biochemical Engineering Journal*, 48(2), 173-180.
- Ramnani, P., Singh, R., Gupta, R., 2005. Keratinolytic potential of *Bacillus licheniformis* RG1: structural and biochemical mechanism of feather degradation. *Canadian Journal of Microbiology*, 51(3), 191-196.
- Rani, K., Rana, R., Datt, S., 2012. Review on latest overview of proteases. *The International Journal of Current Life Sciences* 2(1), 12-18.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V., 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 597-635.
- Reimer, A., Landmann, G., Kempe, S., 2009. Lake Van, eastern Anatolia, hydrochemistry and history. *Aquatic Geochemistry*, 15(1), 195-222.
- Reiner, K., 2010. Catalase test protocol. *American Society for Microbiology*, 1-6.
- Rekik, H., Jaouadi, N. Z., Gargouri, F., Bejar, W., Frikha, F., Jmal, N., ... & Jaouadi, B. (2019). Production, purification and biochemical characterization of a novel detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus safensis* strain RH12. *International Journal of Biological Macromolecules*, 121, 1227-1239.
- Rodrigues, D.F., Goris, J., Vishnivetskaya, T., Gilichinsky, D., Thomashow, M.F., Tiedje, J.M., 2006. Characterization of *Exiguobacterium* isolates from the Siberian permafrost. Description of *E. sibiricum* sp. nov. *Extremophiles*, 10(4), 285-294.
- Rodrigues, P.M., Andrade, V.V.V., Martins, M.L.L., 2013. Stability and activity of the partially purified spray-dried protease from *Bacillus* sp SMIA-2 and its characterization as a laundry detergent additive. *International Journal of Bioassays*, 2(03), 562-567.
- Rodrigues, P.R., Alves, L.R.G., 2013. Tecnologia assistiva uma revisão do tema. *Holos*, 6, 170-180.
- Romsomsa, N., Chim-anagae, P., Jangchud, A., 2010. Optimization of silk degumming protease production from *Bacillus subtilis* C4 using Plackett-Burman design and response surface methodology. *Science Asia* 36, 118-124.
- Roskoski, R., 2015. Reference Module in Biomedical Sciences, Principles of Enzymes, Elsevier.
- Röhm, O., 1913. Verfahren zum Reinigen von Wäschestücken aller Art. German Patent, 283, 923.
- Santos Aguilar, J.G., Sato, H.H., 2018. Microbial proteases: production and application in obtaining protein hydrolysates. *Food Research International*, 103, 253-262.

- Saraçoğlu, Z.N., Tanrısever, D., Arıkan, B., Güvenmez, H.K., 2013. Characterization of an oxidant and detergent stable alkaline protease produced from a novel isolate *Bacillus sp.* strain. *Journal of Applied Biological Sciences*, 7(2), 4-9.
- Saravanamuthu, R., Dubey, R.C., Maheshwari, D.K., 2010. *Industrial Exploitation of Microorganisms*. I.K. International Publishing House. 227-235.
- Sarkar, G., Suthindhiran, K., 2020. Extraction and characterization of alkaline protease from *Streptomyces sp.* GS-1 and its application as dehairing agent. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 25, 101590.
- Sawant, R., Nagendran, S., 2014. Protease: an enzyme with multiple industrial applications. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(6), 568-579.
- 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), 299-306.
- Selvakumar, G., Kundu, S., Joshi, P., Nazim, S., Gupta, A.D., Gupta, H.S., 2010. Growth promotion of wheat seedlings by *E. acetylicum* 1P (MTCC 8707) a cold tolerant bacterial strain from the Uttarakhand Himalayas. *Indian Journal of Microbiology*, 50(1), 50-56.
- Shankar, S., More, S.V., Laxman, R.S., 2010. Recovery of silver from waste X-ray film by alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*. *Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology*, 6(1), 60-69.
- Sharma, A.K., Sharma, V., Saxena, J., Yadav, B., Alam, A., Prakash, A., 2015. Isolation and screening of extracellular protease enzyme from bacterial and fungal isolates of soil. *International Journal of Scientific Research in Environmental Science*, (9), 0334-0340.
- Sharma, K.M., Kumar, R., Panwar, S., Kumar, A., 2017. Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1), 115-126.
- 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.
- Sharma, N., 2019. A review on fungal alkaline protease. *Journal of Emerging Technologies and Innovative Research*, 6(6), 1-14
- Shrinivas, D., Naik, G.R., 2011. Characterization of alkaline thermostable keratinolytic protease from thermoalkalophilic *Bacillus halodurans* JB 99 exhibiting dehairing activity. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(1), 29-35.
- Silva, O.S., Gomes, M.H.G., de Oliveira, R.L., Porto, A.L.F., Converti, A., Porto, T.S., 2017. Partitioning and extraction protease from *Aspergillus tamarii* URM4634 using PEG-citrate aqueous two-phase systems. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 9, 168-173.
- Silva, R.R., 2017. Bacterial and fungal proteolytic enzymes: production, catalysis and potential applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 183(1), 1-19.
- Singh, J., Batra, N., Sobti, R.C., 2001. Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus sp.* SSR1. *Process Biochemistry*, 36(8-9), 781-785.

- Singh, R., Mittal, A., Kumar, M., Mehta, P.K., 2016. Microbial proteases in commercial applications. *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, 4(3), 365-374.
- Singh, S. K., Tripathi, V.R., Garg, S.K., 2011. An oxidant, detergent and salt stable alkaline protease from *Bacillus cereus* SIU1. *African Journal of Biotechnology*, 10(57), 12257-12261.
- Singhal, P., Nigam, V.K., Vidyarthi, A.S., 2012. Studies on production, characterization and applications of microbial alkaline proteases. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, 3(3), 653-669.
- Sinha, R., Khare, S.K., 2012. Isolation of a halophilic *Virgibacillus sp.* EMB13: Characterization of its protease for detergent application. *Indian Journal of Biotechnology*, 11(4), 316-326.
- Sivaprakasam, S., Mahadevan, S., Sekar, S., Rajakumar, S., 2008. Biological treatment of tannery wastewater by using salt-tolerant bacterial strains. *Microbial Cell Factories*, 7(1), 1-7.
- Son, H.J., Park, H.C., Kim, H.S., Lee, C.Y., 2008. Nutritional regulation of keratinolytic activity in *Bacillus pumilis*. *Biotechnology Letters*, 30(3), 461-465.
- Sriket, C., 2014. Proteases in fish and shellfish: Role on muscle softening and prevention. *International Food Research Journal*, 21(2).
- Takami, H., Nakasone, K., Takaki, Y., Maeno, G., Sasaki, R., Masui, N., et al., 2000. Complete genome sequence of the alkaliphilic bacterium *Bacillus halodurans* and genomic sequence comparison with *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Research*, 28(21), 4317-4331.
- Tapia, D.M., Simões, M.L.G., 2008. Production and partial characterization of keratinase produced by a microorganism isolated from poultry processing plant wastewater. *African Journal of Biotechnology*, 7(3).
- Tekin, A., 2020. *Bacillus halodurans* c-125 alkalın serin proteazının üretimi, karakterizasyonu ve deterjan katkı maddesi olarak kullanımının araştırılması. PhD Thesis, Institute of Natural and Applied Science, Trabzon.
- Tipton, K., Boyce, S., 2000. History of the enzyme nomenclature system. *Bioinformatics*, 16(1), 34-40.
- Tork, S., Aly, M.M., Nawar, L., 2010. Biochemical and molecular characterization of a new local keratinase producing *Pseudomonas sp.*, MS21. *Asian Journal of Biotechnology*, 2(1), 1-13.
- Turk, B., 2006. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5, 785-799.
- Van Boven, A., Tan, P.S.T., Konings, W.N., 1988. Purification and characterization of a dipeptidase from *Streptococcus cremoris* Wg2. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(1), 43-49.
- Veloortalappil, N.J., Robinson, B.S., Selvanesan, P., Sasidharan, S., Kizhakkepawothail, N. U., Sreedharan, S., et al., 2013. Versatility of microbial proteases. *Advances in enzyme research*, *Advances in Enzyme Research*, 1, 3.
- Verma, A., Ansari, M.W., Anwar, M.S., Agrawal, R., Agrawal, S., 2014. Alkaline protease from *Thermoactinomyces sp.* RS1 mitigates industrial pollution. *Protoplasma*, 251(3), 711-718.

- Vijayalakshmi, S., Venkatkumar, S., Thankamani, V., 2011. Screening of alkalophilic thermophilic protease isolated from *Bacillus* RV. B2. 90 for industrial applications. *Research in Biotechnology*, 2(3).
- Vishnivetskaya, T.A., Kathariou, S., Tiedje, J.M., 2009. The *Exiguobacterium*. Genus: biodiversity and biogeography. *Extremophiles*, 13(3), 541-555.
- Vojcic, L., Pitzler, C., Körfer, G., Jakob, F., Martinez, R., Maurer, K.H., Schwaneberg, U., 2015. Advances in protease engineering for laundry detergents. *New Biotechnology*, 32(6), 629-634.
- Wahab, W.A.A., Ahmed, S.A., 2018. Response surface methodology for production, characterization and application of solvent, salt and alkali-tolerant alkaline protease from isolated fungal strain *Aspergillus niger* WA 2017. *International Journal of Biological Macromolecules*, 115, 447-458.
- Wang, H., Xu, J., Kong, B., Liu, Q., Xia, X., & Sun, F., 2022. Purification and Characterization of the Protease from *Staphylococcus xylosus* A2 Isolated from Harbin Dry Sausages. *Foods*, 11(8), 1094.
- Welker, N.E., Campbell, L.L., 1967. Unrelatedness of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 94(4), 1124-1130.
- White III, R.A., Grassa, C.J., Suttle, C.A., 2013. Draft genome sequence of *Exiguobacterium pavilionensis* strain RW-2, with wide thermal, salinity, and pH tolerance, isolated from modern freshwater microbialites. *Genome Announcements*, 1(4), e00597-13.
- Whitford, D., 2005. *Proteins Structure and Function*. John Wiley & Sons, 9-37, England.
- Wilson, S. A., Peek, K., Daniel, R. M., 1994. Immobilization of a proteinase from the extremely thermophilic organism *Thermus* Rt41A. *Biotechnology and bioengineering*, 43(3), 225-231.
- Wiseman, A., 1987. *Handbook of Enzyme Biotechnology*. 2. ed. New York: EUA John Wiley sons.
- Władyka, B., Pustelny, K., 2008. Regulation of bacterial protease activity. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 13(2), 212-229.
- Zabin, B., Shivalingasarij, D., Basavaraj, H., Uday M., Sharanappa, A., 2021. Purification and characterization of thermostable alkaline protease from *Exiguobacterium aurantiacum* ZBB 13. *Research Journal of Biotechnology* 16(9), 102-111.
- Zakaria, A.Q., Hala, D., Kholoud, A., 2013. Isolation and characterization of thermostable protease producing *Bacillus pumilus* from thermal spring in Jordan. *African Journal of Microbiology Research*, 7(29), 3711-3719.
- Zhang, W., Wu, J., Xiao, J., Zhu, M., Yang, H., 2021. Compatibility and washing performance of compound protease detergent. *Applied Sciences*, 12(1), 150.

## ÖZGEÇMİŞ

<b>Kişisel Bilgiler</b>	
<b>Adı Soyadı :</b>	Asiye HEMŞİNLİ
<b>Doğum tarihi :</b>	
<b>Doğum Yeri :</b>	
<b>Uyruğu :</b>	
<b>Adres :</b>	
<b>Tel :</b>	
<b>E-mail :</b>	
<b>Eğitim</b>	
<b>Lise :</b>	Erzurum Anadolu Sağlık Meslek Lisesi/Hemşirelik – 2010/2014
<b>Lisans :</b>	Erzurum Teknik Üniversitesi/Moleküler Biyoloji ve Genetik – 2015/2019
<b>Yüksek lisans :</b>	Atatürk Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü/Biyoloji – 2020/2022
<b>Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar</b>	
<b>Tezden Üretilmiş Yayınlar</b>	
Gürkök S., Hemşinli A., "Screening, Isolation, Characterization and Identification of Alkaline Protease Producing Bacteria ", International Black Sea Modern Scientific Research Congress, Rize, Türkiye, 30 Eylül - 02 Ekim 2022, ss.737-742 (Sözlü Tam Metin Bildiri)	