**TOPRAKTAN İZOLE EDİLEN BAKTERİLER İLE FİBRİNOLİTİK ENZİM ÜRETİMİ**

**Ayşe VAROL**

**Danışman: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı**

**2021**

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BIYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI

# TOPRAKTAN İZOLE EDİLEN BAKTERİLER İLE FİBRİNOLİTİK ENZİM ÜRETİMİ

(Production of Fibrinolitic Enzyme By Bacteria Isolated From Soil)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ayşe VAROL

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Erzurum
Aralık, 2021

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**
Graduate School of Natural and Applied Sciences

**T.C.**
**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ**
**Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü**
**TEZ KABUL VE ONAY TUTANAĞI**

Topraktan izole edilen bakteriler ile fibrinolitik enzim üretimi

Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL danışmanlığında, Ayşe Varol tarafından hazırlanan bu çalışma,31/12/2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı Mikrobiyoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği / ~~oy çokluğu~~** (3./3) ile kabul edilmiştir.

| | | |
|---|---|---|
| Jüri Başkanı: | Prof. Dr. Mesut TAŞKIN<br>Atatürk Üniversitesi | Aslı Islak İmzalıdır. |
| Danışman: | Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL<br>Atatürk Üniversitesi | Aslı Islak İmzalıdır. |
| Jüri Üyesi: | Dr. Öğretim Üyesi Ayşenur Yazıcı<br>Erzurum Teknik Üniversitesi | Aslı Islak İmzalıdır. |

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

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

Aslı Islak İmzalıdır.

**Not:** Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi olarak Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL danışmanlığında sunulan "Topraktan izole edilen bakteriler ile fibrinolitik enzim üretimi" 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 | *4* | **30** |
| Kuramsal Temeller | *10* | **30** |
| Materyal ve Yöntem | *19* | **35** |
| Bulgular | *7* | **20** |
| Tartışma | *1* | **20** |
| Tezin Geneli | *15* | **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'den*** *büyük olmaması gerekir.*

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

| **Tez Yazarı (Öğrenci)** | **Tez Danışmanı** |
|---|---|
| Ayşe VAROL | Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL |
| 31.12.2021 | 31.12.2021 |
| İmza: Aslı Islak İmzalıdır. | İmza: Aslı Islak İmzalıdır. |

* 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 eğitimim boyunca bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, her zaman yanımda olan ilgi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, değerli fikirlerini benimle paylaşan kıymeti danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e

Tez çalışmamın yürütülmesi esnasında bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Mesut TAŞKIN'a,

Tez çalışmalarım boyunca her an yardımıma koşan, laboratuvarda yaptığım çalışmalarda yanımda olarak tecrübelerini benimle paylaşan, sabrını ve güler yüzünü esirgemeyen Sayın Arş. Gör. Şeyda ALBAYRAK'a

Ve tüm hayatım boyunca yanımda olarak bugünlere gelmemi sağlayan bana benden çok güvenip inanan beraber pek çok zorluğa göğüs gerdiğim kıymetli annem Havva VAROL'a, sevgilerini yüreğimde hissettiğim canım babam Maksut VAROL'a ve canım ablam Elif VAROL'a ve aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayşe VAROL

# ÖZET


## YÜKSEK LİSANS TEZİ

## TOPRAKTAN İZOLE EDİLEN BAKTERİLER İLE FİBRİNOLİTİK ENZİM ÜRETİMİ

**Ayşe VAROL**

**Danışman: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL**

**Amaç:** Fibrinolitik enzimler fibrin pıhtılarını çözebilen trombolitik ajanlardır. Tıpta kullanılan streptokinaz, t-PA, ürokinaz gibi trombolitik enzimler kardiyovasküler hastalıklar, felç, kalp krizi ve serebrovasküler hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında; farklı illerden alınan toprak örneklerinden proteaz ve fibrinolitik enzim aktivitesine sahip suş/suşların belirlenmesi; yüksek fibrinolitik aktivite gösteren izolat ile üretim besiyerinin optimizasyonu ve enzimin saflaştırılması amaçlanmıştır.

**Materyal ve Metot:** Toprak örnekleri steril kaplarda laboratuvar ortamına getirilerek, seri dilüsyonları hazırlanmış, proteaz agar besiyerine yayma ekim yöntemiyle inoküle edilmiş ve 37°C'de 48-72 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Petrilerde gelişen mikroorganizmalardan bakteri suşları seçilerek, proteaz ve fibrinolitik enzim aktiviteleri incelenmiştir. Yüksek fibrinolitik aktiviteye sahip izolat alınmış ve 16S rRNA sekans analizi ile, tür düzeyinde tanılanmıştır. Ardından fibrinolitik enzim üretim ortamının optimizasyonu gerçekleştirilmiş, sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişim, jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılmış ve SDS-PAGE ile protein büyüklüğü tespit edilmiştir.

**Bulgular:** Bu tez çalışmasında; toprak örneklerinden proteaz aktivitesine sahip 60 adet izolat elde edilmiştir. Yapılan mikroskobik incelemeler sonucunda izolatların; 20 tanesinin küf/maya, 40 tanesinin ise bakterilere ait olduğu gözlemlenmiştir. En yüksek fibrinolitik enzim aktivitesine sahip izolatın V4 kodu ile *Bacillus atrophaeus* türüne ait olduğu tespit edilmiştir. Bu izolat kullanılarak fibrinolitik enzim üretimi için optimum Skim Milk Powder, pH, sıcaklık ve inkübasyon süresi sırasıyla; 15 g/l, 7, 35°C ve 72. saat olarak belirlenmiştir. *B.* atrophaeus'un ürettiği enzim saflaştırılarak, molekül kütlesi 36 kDa olarak belirlenmiştir.

**Sonuç:** Mevcut çalışmada, fibrinolitik ve proteolitik enzimler arasında bağlantının olduğu, ancak yüksek proteaz aktivitesine sahip suşların her zaman yüksek fibrinolitik aktivite göstermediği tespit edilmiştir. Pek çok hastalığın tedavisinde rol alan ve maliyeti yüksek fibrinolitik enzimlerin ucuz, kolay erişilebilir bir kaynaktan da elde edilebileceği ortaya konulmuştur. Aynı zamanda enzim saflaştırması için iki kromotagrafik yöntemin de birlikte kullanılması gerektiği sonucuna varılmıştır.



**Anahtar Kelimeler:** Fibrinolitik enzim, proteaz, fibrin, trombin, *Bacillus atrophaeus*

**Aralık 2021, 77 sayfa**

## ABSTRACT

### MASTER THESIS

### PRODUCTION OF FIBRINOLITIC ENZYME BY BACTERIA ISOLATED FROM SOIL

**Ayşe VAROL**

**Supervisor: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL**

**Objective:** Fibrinolytic enzymes are thrombolytic agents which can dissolve fibrin clots. Thrombolytic enzymes such as streptokinase, t-PA, urokinase and fibrinolytic utilised in medicine are used in the treatment of cardiovascular diseases, stroke, heart attack and cerebrovascular diseases. In this thesis study, it was aimed to identify the strain/strains with protease and fibrinolytic enzyme activity from soil samples taken from different provinces, to optimise the production medium for the isolate with high fibrinolytic activity and to purify the enzyme.

**Material and Method:** Soil samples were brought to the laboratory in sterile containers, serial dilutions were prepared, they were inoculated on protease solid medium by spreading method and incubated at 37°C for 48-72 hours. Protease and fibrinolytic enzyme activities were investigated by selecting bacterial strains from microorganisms grown on petri dishes. The isolate with high fibrinolytic activity was taken and identified by 16S rRNA sequence analysis at species level. Then, the fibrinolytic enzyme production medium was optimized, purified by ammonium sulfate precipitation, ion exchange, gel filtration chromatography, respectively, and protein size was determined by SDS-PAGE.

**Results:** In this thesis study, 60 isolates with protease activity were obtained from soil samples. As a result of the microscopic examinations, it was observed that 20 out of isolates belonged to fungus and 40 of them belonged to bacteria. It was determined that the isolate (V4 code) with the highest fibrinolytic enzyme activity belonged to *Bacillus atrophaeus* species. For fibrinolytic enzyme production using this isolate, optimum values for Skim Milk Powder, pH, temperature and incubation time were determined as 15 g/l, 7, 35°C and 72 hour, respectively. The enzyme produced by *B. atrophaeus* was purified and the molecular mass was determined as 36 kDa.

**Conclusion:** In the current study, it was designated that there is an association between fibrinolytic and proteolytic enzymes, but strains with high protease activity do not always demonstrate high fibrinolytic activity. It was shown that costly fibrinolytic enzymes, which play a role in the treatment of many diseases, can also be obtained from inexpensive and easily accessible sources. At the same time, it was concluded that two chromatographic methods should be used together for enzyme purification.



**Keywords**: Fibrinolytic enzyme, protease, fibrin, thrombin, *Bacillus atrophaeus*

**December 2021, 77 pages**

# İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI ..... i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU ..... ii
TEŞEKKÜR ..... iii
ÖZET ..... iv
ABSTRACT ..... v
İÇİNDEKİLER ..... vi
TABLOLAR DİZİNİ ..... x
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... xii
GİRİŞ ..... 1
KURAMSAL TEMELLER ..... 3
Enzimler ..... 3
Enzimlerin Sınıflandırılması ..... 3
Proteazlar ..... 5
Aktivitelerine Göre Proteazların Sınıflandırılması ..... 6
Ekzopeptidazlar ..... 6
Endopeptidazlar ..... 6
Proteazların Başlıca Kullanım Alanları ..... 7
Deterjan Sanayisinde Proteazlar ..... 8
Deri Sanayisinde Proteazlar ..... 9
Gıda Sanayisinde Proteazlar ..... 10
Kozmetik ve İlaç Sanayisinde Proteazlar ..... 10
Tekstil Sanayisinde Proteazlar ..... 11
Bazı Hastalıklarda Proteazların Rolü ..... 11
Doku Hasarının Onarılmasında Proteazlar ..... 11
Fibrinolitik Enzimler ..... 12
Mikrobiyal Fibrinolitik Enzimler ..... 14
Tedavide Kullanılan Fibrinolitik İlaçlar ..... 15
Oral (Ağızdan Verilen) Antikoagülant İlaçlar ..... 16
1. Varfarin ..... 16
2. Heparin ..... 16
3. Nattokinaz ..... 16
İntravenöz Olarak Uygulanan İlaçlar ..... 17

1. Alteplaz ..... 17
2. Tenekteplaz ..... 17
3. Ürokinaz ..... 18
4. Streptokinaz ..... 19
MATERYAL VE METOT ..... 20
Materyal ..... 20
Tez Kapsamında Yapılan Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı ..... 22
Tez Kapsamında Yapılan Deneylerde Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanışı ..... 24
Yöntem ..... 24
Örnek toplanması ..... 24
Proteaz üreten bakterilerin izolasyonu ..... 24
Proteaz ve Fibrinolitik enzim üretimi yönünden suşların karşılaştırılması ..... 25
En iyi izolatların katı besiyerinde fibrinolitik enzim aktivitesinin belirlenmesi ..... 26
En iyi izolatın moleküler karakterizasyonu ..... 27
Test suşunun moleküler yöntemlerle tanımlanması ..... 27
DNA konsantrasyonlarının ölçülmesi ve çalışma solüsyonlarının hazırlanması ..... 28
DNA örneğinin ve çalışma solüsyonunun konsantrasyonunun belirlenmesi (µg/ml) ..... 28
16S rRNA PCR ürünlerinin jel elektroforezi ..... 29
Klonlama ..... 30
Kompotent hücrenin hazırlanması ..... 30
Ligasyon işlemi ..... 30
Transformasyon işlemi ..... 31
Koloni PCR ..... 31
Plazmitlerin Kontrol Edilmesi ve Konsantrasyonlarının Tespiti ..... 32
DNA dizi analizi ..... 32
Sonuçların Değerlendirilmesi ..... 32
En iyi izolat ile fibrinolitik enzim üretiminin optimizasyonu ..... 32
Skim Milk Powder optimizasyonu ..... 33
pH optimizasyonu ..... 33
Sıcaklık optimizasyonu ..... 33
İnkübasyon süresi optimizasyonu ..... 33
Enzim Saflaştırılması ve Karakterizasyon Çalışmaları ..... 34
Fibrinolitik enziminin saflaştırılması ..... 34
Q-Sefaroz iyon değişim kromatografisi ..... 34
Sefadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi ..... 35

SDS PAGE ile enzimin saflığının ve molekül kütlesinin belirlenmesi ..... 35
Enzim Karakterizasyonu ..... 36
Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerindeki etkisi ..... 36
pH'ın enzim aktivitesi üzerindeki etkisi ..... 37
Metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerindeki etkisi ..... 37
Proteaz inhibitörlerinin enzim aktivitesi üzerindeki etkisi ..... 37
ARAŞTIRMA BULGULARI ..... 38
Örneklerin Toplanması ..... 38
Proteaz Üreten Bakterilerin İzolasyonu ..... 38
Proteaz ve fibrinolitik enzim aktivitesi yönünden suşların karşılaştırılması ..... 38
Proteaz aktivitesinin belirlenmesi ..... 38
Fibrinolitik enzim aktivitesinin ölçülmesi ..... 39
En İyi İzolatların Katı Besiyerinde Fibrinolitik Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi ..... 40
En iyi izolatın moleküler karakterizasyonu ..... 40
Test Suşunun Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması ..... 40
Genomik DNA izolasyonu ..... 40
16S rRNA PCR ..... 41
Klonlama ..... 41
Koloni PCR ..... 41
Plazmit izolasyonu ..... 42
DNA dizi analizi ..... 42
En İyi İzolat İle Fibrinolitik Enzim Üretiminin Optimizasyonu ..... 43
Skim milk powder (SMP) optimizasyonu ..... 43
pH optimizasyonu ..... 44
Sıcaklık optimizasyonu ..... 45
İnkübasyon süresi optimizasyonu ..... 46
Enzimin Saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışmaları ..... 47
Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz ..... 47
Q-Sefaroz iyon değişim kromatografisi ..... 47
Sefadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi ..... 47
SDS-PAGE ile enzim saflığının ve moleküler kütlesinin belirlenmesi ..... 48
Enzim Karakterizasyonu ..... 49
Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerindeki etkisi ..... 49
pH'nın Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi ..... 50
Metal İyonlarının Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi ..... 52

Proteaz inhibitörlerinin enzim aktivitesi üzerindeki etkisi.....52
TARTIŞMA VE SONUÇ.....53
KAYNAKLAR.....57
ÖZGEÇMİŞ.....63

# TABLOLAR DİZİNİ

**Tablo 1.** Proteaz'ların Sınıflandırılması ..... 6
**Tablo 2.** Ticari Proteaz Deterjanları ..... 9
**Tablo 3.** Gıda Sanayisinde Kullanılan Enzimler ve Uygulama Alanları ..... 10
**Tablo 4.** Tez Çalışmasında Kullanılan Maddeler ..... 20
**Tablo 5.** Tez Çalışmasında Kullanılan Laboratuvar Ekipmanları ..... 21
**Tablo 6.** 16S rRNA PCR İşleminde Kullanılan Reaktiflerin Konsantrasyon ve Miktarları ..... 29
**Tablo 7.** 16S rRNA PCR İşlemi İçin Uygun Sıcaklık, Süre ve Döngü Sayısı ..... 29
**Tablo 8.** PCR Programı ..... 32
**Tablo 9.** Topraktan İzole Edilen Bakterilerin Fibrinolitik ve Proteaz Aktivitelerinin Karşılaştırılması ..... 39
**Tablo 10.** En İyi İzolat İle SMP Optimizasyonu İçin Yapılan Aktivite Ölçümleri ..... 43
**Tablo 11.** En İyi İzolat İle pH Optimizasyonu İçin Yapılan Aktivite Ölçümleri (Besiyerinin SMP oranı 15g/l olarak ayarlandı) ..... 44
**Tablo 12.** En İyi İzolat İle Sıcaklık Optimizasyon Çalışmaları ..... 45
**Tablo 13.** En İyi İzolat İle İnkübasyon Süresinin Optimizasyonu ..... 46
**Tablo 14.** Proteaz Besiyerinden Fibrinolitik Enzimin Saflaştırma Basamakları ..... 48
**Tablo 15.** Fibrin Besiyerinden Fibrinolitik Enzimin Saflaştırma Basamakları ..... 48
**Tablo 16.** Bazı Metal İyonlarının Fibrinolitik Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi ..... 52
**Tablo 17.** Bazı Proteaz İnhibitörlerinin Fibrinolitik Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi ..... 52

# ŞEKİLLER DİZİNİ

**Şekil 1.** Enzim-substrat kompleksinin şematize gösterimi....3
**Şekil 2.** Şematize enzim modeli....4
**Şekil 3.** Endüstriyel enzimler ve kullanım alanları....5
**Şekil 4.** Enzimlerin endüstriyel alanlara göre kullanım oranları....8
**Şekil 5.** Fizyolojik fibrinolitik sistem şeması....13
**Şekil 6.** İnsan fibrininden çift-d fragmanı'nın kristal yapısı....13
**Şekil 7.** Varfarinin kimyasal yapısı....16
**Şekil 8.** Heparinin kimyasal yapısı....16
**Şekil 9.** Nattokinazın 3-D yapısı....17
**Şekil 10.** Alteplazın moleküler yapısı....17
**Şekil 11.** Tenekteplazın protein yapısı....18
**Şekil 12.** İnsan uPA'sının 3 boyutlu yapısı....18
**Şekil 13.** Streptokinaz β-domaininin kristal yapısı....19
**Şekil 14.** V4 suşuna ait petri görüntüsü....38
**Şekil 15.** **A.** Fibrinolitik enzim aktivitesi için hazırlanan besiyerinin görüntüsü **B.** V4,V20,V36 ve *B. Subtilis* (pozitif kontrol) suşlarının 24 saatlik inkübasyon sonunda oluşturduğu görüntü **C.** V4,V20,V36 ve *B. Subtilis* (pozitif kontrol) suşlarının 48 saatlik inkübasyon sonunda oluşturduğu görüntü....40
**Şekil 16.** *Bacillus atrophaeus* (V4)'un16S rRNA jel görüntüsü....41
**Şekil 17.** Koloni PCR görüntüsü:....42
**Şekil 18.** NJ yöntemi ile filogenetik ağaç çizimi....43
**Şekil 19.** Farklı SMP konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisi....44
**Şekil 20.** Farklı pH konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisi....45
**Şekil 21.** Farklı sıcaklık değerlerinin enzim aktivitesine etkisi....46
**Şekil 22.** Farklı inkübasyon sürelerinin enzim aktivitesine etkisi....47
**Şekil 23.** SDS-PAGE görüntüsü. M: Marker, 1: Proteaz besiyerinden fibrinolitik enzim saflaştırılması, 2: Fibrin besiyerinden fibrinolitik enzimin saflaştırılması....49
**Şekil 24.** Fibrinolitik enzimin optimum sıcaklığının ölçülmesi için çizilen sıcaklık-bağıl aktivite grafiği....50
**Şekil 25.** Sıcaklığın fibrinolitik enzim kararlılığı üzerine etkisi....50
**Şekil 26.** Fibrinolitik enzimin optimum pH'sı için oluşturulan aktivite ölçüm grafiği....51
**Şekil 27.** Fibrinolitik enzim için oluşturulan stabil pH grafiği....51

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|---|---|
| EC | : Avrupa Birliği Komitesi |
| EDTA | : Etilen diamin tetra asetik asit |
| LB | : Luria Bertani Broth |
| NJ | : Neighbor-joining; Komşu Katılımı-Bağlama Yöntemi |
| PMSF | : Fenilmetansülfonil |
| SMP | : Skim Milk Powder |
| TCA | : Trikloroasetik asit |
| TSA | : Triptic Soy Agar |
| TSB | : Triptic Soy Broth |
| WHO | : Dünya sağlık örgütü |

# GİRİŞ

Enzimler, sayısız biyolojik reaksiyonları başlatan ve düzenleyen, canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran proteinik birimlerdir.

Enzimlerin hayatımıza girişi, ilk çağlarda yaşayan insanların farkına varmadan fermentasyon tekniklerini kullanarak; ekmek, peynir, yoğurt ve şarap gibi gıda maddelerini üretmeleriyle gerçekleşmiştir. İlerleyen dönemlerde enzimlerin yapısı ve mekanizmaları üzerinde yapılan çalışmaların artmasıyla, enzimlerin kullanım alanları genişlemiştir. Günümüzde deri, deterjan, kozmetik, gıda ve tekstil sanayisinde enzimlerden faydalanılarak, çevre dostu ve ekonomik ürünler üretilmektedir. Bahsedilen bu kullanım alanlarının yanı sıra tıbbi bilimlerde de yer alan enzimler; birçok hastalığın tedavisinde antikoagülant, trombolitik, anti-inflamatuar, fibrinolitik, mukoitik, antimikrobiyal ve sindirim yardımcıları olarak kullanılmaktadır. Enzim endüstrisinde son yıllarda öne çıkan ve üzerinde çok sayıda çalışmanın yapıldığı terapötik enzimler, sindirim işlevinin gerçekleştirilmesine de yardımcı olmaktadır. İnsan vücudundan salgılanan terapötik enzimlere; pepsin, proteaz, lipaz ve amilaz örnek olarak verilebilir. Bakteriyoloji alanında yapılan çalışmalarda ise; mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerden faydalanılarak, trombolitik tedavinin gerçekleştirilebileceği ortaya konulmuştur (Kotb 2012).

Canlı organizmalarda; fibrin, lökosit, trombosit, eritrosit gibi kan elemanlarının kalp ve damar iç yüzeyine pıhtı şeklinde yapışması ile, hemostazda meydana gelen dengesizlik sonucu tromboz olarak adlandırılan olay meydana gelmektedir. Bu durum gerçekleştiği zaman, ilk önce trombin aktive olur ve fibrinojen fibrine dönüşür. Kan damarlarında fibrin birikmesi sonucunda bireylerde; miyokard enfarktüsü, iskemik kalp hastalığı, periferik damar hastalığı, aritmi, yüksek tansiyon ve felç gibi hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Fibrin pıhtılarının plazmin adı verilen enzim yardımı ile fibrin ağını parçalaması "fibrinoliz" olarak adlandırılmaktadır.

Trombus (kan pıhtısı), kan akışı ile bulunduğu dokudan ayrıldığı zaman; vücuttaki herhangi bir kan damarını tıkayabilmektedir. Venözde ya da artelyalde meydana gelen bu olay, "tromboembolizm" olarak adlandırılmaktadır ( Chapin and Hajjar 2015; Folsom *et al*. 2016).

Dünya sağlık örgütü'nün (WHO) yayınladığı rapora göre, her yıl 17 milyon insan kardiyovasküler hastalıklardan hayatını kaybetmektedir. Kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde başvurulan yöntemlerde ilk sırayı, fibrinolitik enzimlere dayalı tedavi yöntemleri almaktadır. Uygulanan tedavilerin ortaya koyduğu başarı yüzdeleriyle birlikte araştırmacılar,

fibrinolitik enzimlerin insanoğlu için ehemmiyetinin farkına varmış ve yüksek fibrinolitik aktiviteye sahip yeni mikroorganizmaları keşfetmeye yönelmişlerdir. *Streptococcus hemolyticus* kaynaklı streptokinaz, *S. aureus* 'un ürettiği stafilokinaz, *Bacillus natto'*dan elde edilen nattokinaz ve *B. amyloliquefaciens*'den elde edilen subtilisin, mikroorganizmaların ürettikleri trombolitik enzimlere örnek olarak gösterilebilir.

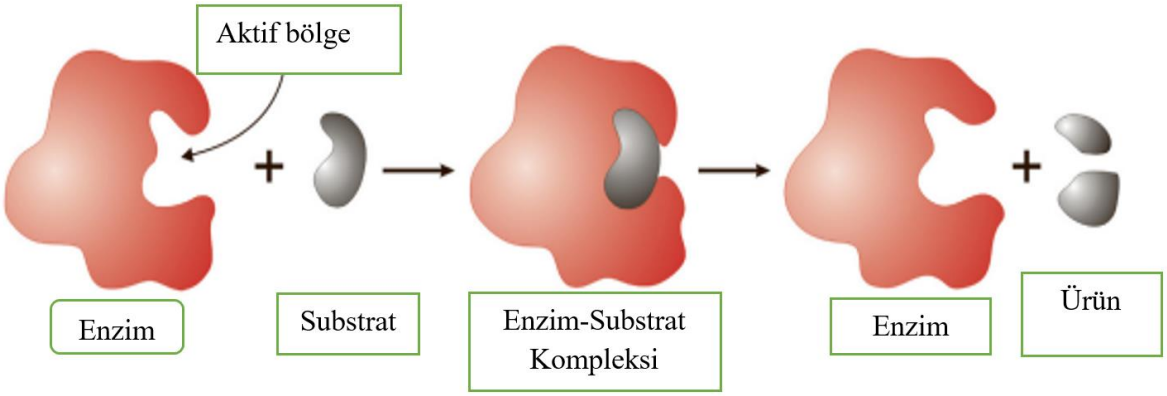
Günümüzde trombolitik tedavide, mikrobiyal kaynaklı doku tipi olan plazminojen aktivatörü (tPA) ve ürokinaz yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu enzimlerin maliyetinin yüksek olması ve mevcut yan etkileri (oral alımlarda bağırsak yolunda iç kanama, koroner tıkanması) araştırmacıları, maliyeti daha ucuz ve güvenilir kaynaklardan trombolitik ajanlar elde etmeye sevketmiştir (Peng *et al*. 2003; Kotb 2017).

Tez çalışmamızda; Türkiyenin çeşitli illerinden alınan toprak örneklerinden, fibrinolitik enzim üretme potansiyeline sahip yerel izolatların belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun için izole edilen suşların ilk olarak proteaz aktiviteleri araştırıldıktan sonra, yüksek aktiviteye sahip olan suşların fibrinolitik enzim üretme potansiyelleri incelenmiştir. Böylece fibrinolitik ve proteolitik enzimler arasında bağlantının olup olmadığı, en iyi fibrinolitik enzim üreten suş/suşların belirlenmesi, enzim ortamlarının tespiti ve optimizasyonu gerçekleştirilerek, minimum maliyet ile maksimum enzim üretimi hedeflenmiştir.

# KURAMSAL TEMELLER

## Enzimler

Genel olarak protein yapısında olan enzimler; canlı organizmalarda gerçekleşen biyokimyasal olayları düzenleyen, hızlandıran ve reaksiyon sırasında sürekli olarak kullanılabilen makromolekülerdir. Reaksiyonları düzenleyerek molekülleri birleştiren, hücreler arası alışverişi sağlayan enzimlerin; solunum, boşaltım ve sindirim gibi biyolojik süreçlerde de rol oynadığı bilinmektedir. Üstlendikleri bu görevler enzimleri, insan sağlığında rol oynayan en önemli yapıtaşlarından biri haline getirmektedir (Patel *et al*. 2005). Enzimler, basit ve bileşik enzimler olarak sınıflandırılmaktadır. Bazı enzimler, katalizleme fonksiyonlarını yalnız protein yapılarıyla yerine getirebilirken; bazıları ise protein yapıda olmayan, kofaktör olarak adlandırılan küçük organik moleküllerin yardımı ile gerçekleştirebilmektedir. Kofaktörler; koenzim denilen kompleks bir organik bileşik yada Fe, Zn, Cu, Co gibi metal iyonlarından oluşmaktadır. Katalitik olarak aktif yapıda bulunan enzim-kofaktör kompleksi haloenzim olarak adlandırılmaktadır. Enzimlerin beraber çalıştığı, katalizlenerek tepkimeye katılan kimyasal moleküller; substrat olarak adlandırılmaktadır. Substratlar enzim üzerindeki aktif bölgeye bağlanır ve enzim-substrat reaksiyonunu başlatır. Bunun sonucunda oluşan maddeye ise ürün adı verilir. Enzimler özgül moleküller olduğu için her enzim, her substratla etkileşime girmez (Blancho and Blancho 2017).

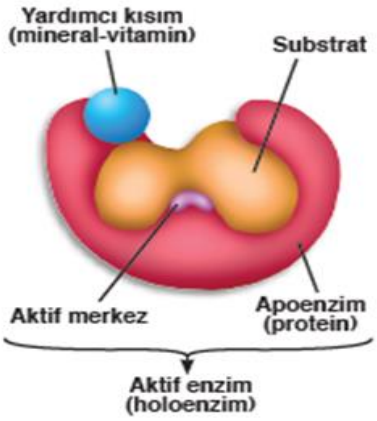



**Şekil 1.** Enzim-substrat kompleksinin şematize gösterimi (Blancho and Blancho 2017)

## Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzim terminolojisi ve sınıflandırılması kapsamında enzimler; katalizledikleri tepkimelere göre altı farklı gruba ayrılmıştır:

1. **Oksidoredüktazlar:** Hücre içerisinde meydana gelen oksidasyonu ve indirgenme reaksiyonlarını katalizleyen tepkimelerdir. Bu sınıf içerisine, oksiredüksiyon reaksiyonlarının katalizlenmesini sağlayan tüm enzimler dahil edilmektedir.
2. **Transferazlar:** İki molekül arasında (verici bir molekülden, alıcı bir moleküle) bir atom veya grubun transferini sağlayan enzimlerdir.
3. **Hidrolazlar:** Kimyasal bağın hidrolizini katalizleyen enzimlerdir.
4. **Liyazlar:** Hidroliz dışındaki yollarla çeşitli kimyasal bağları kırabilen, genellikle yeni bir çift bağ veya halka yapısı oluşturan enzimlerdir.
5. **İzomerazlar:** İzomerlerin yapısal olarak düzenlenmesini sağlayan, bir molekül içerisindeki geometrik değişiklikleri katalizleyen enzimlerdir.
6. **Ligazlar:** ATP veya diğer nükleosit trifosfat içerisindeki yüksek enerjili pirofosfat bileşiklerinden fosfat bağının parçalanması sonucu açığa çıkan enerji yardımıyla, iki bileşiğin bağlanma reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir (Boyce and Tipton 2001) .




**Şekil 2.** Şematize enzim modeli (Boyce and Tipton 2001) .

Beslenme ihtiyacını karşılamak isteyen insanoğlu, geçmişte basit fermentasyon tekniklerini kullanarak; ekmek, peynir, yoğurt gibi besinler üretmişlerdir. Farkına varılmadan yapılan bu eylemle enzimler, insanların yaşamında yerini almıştır. İlerleyen zaman diliminde enzimlerin yapı ve işlevleri ile ilgili yapılan çalışmaların artmasıyla enzimler; kimya, kâğıt, biyoyakıt, kauçuk, fotoğraf, gıda endüstrisi, ziraat ve tıp gibi pek çok alanda aktif olarak rol oynamıştır. Enzimler üzerinde yapılan araştırmalar gösteriyor ki; 2016 yılında endüstriyel enzim pazarının 4,75 milyar dolar seviyesine ulaştığı ve 2018-2023 yılları içerisinde ise bu değerin yıllık % 6,03 oranında artış göstereceği tahmin edilmektedir. Pazardaki enzimlerin %59'unu proteazlar, %28'ini karbohidrolazlar, %3'ünü lipazlar ve %10'unu ise diğer enzimler oluşturmaktadır (Patel *et al*. 2005).

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

**Şekil 3.** Endüstriyel enzimler ve kullanım alanları (Algül 2019)

**Proteazlar**

Peptid ve proteinleri oluşturan aminoasitler arasındaki amid bağlarının hidrolizini katalizleyen enzimlere proteazlar, gerçekleşen bu reaksiyona ise proteoliz adı verilmektedir. Temel besin kaynaklarımızdan biri olan proteinlerin vücudumuza alındıktan sonra parçalanmasında, işlenmesinde, fonksiyonlarının düzenlenmesinde görev alan proteazların; kanın pıhtılaşması, kontrollü hücre ölümü ve doku farklılaşması gibi yaşam için önemli biyolojik süreçlerde rol oynadığı bilinmektedir (Wolfe 2009). Endüstriyel proteaz üreticisi olarak, *Bacillus* cinsine ait türler sıklıkla karşımıza çıkmaktadır.

Proteazlar, canlı vücudunda üstlendikleri görevlerin yanı sıra gıda, deterjan, ilaç, deri, fotoğrafçılık gibi pek çok önemli endüstriyel alandaki görevleriyle de her zaman önemli ve güncel olmuşlardır. Proteazlar, aşağıda verilen tablodaki gibi sınıflandırılmaktadır (Rai and Mukherjee 2010).

**Tablo 1.** Proteaz'ların Sınıflandırılması

| Kaynaklarına göre | Sahip oldukları pH değerlerine göre | Aktivitelerine göre | Aktif bölgelerinin yapısına göre |
|---|---|---|---|
| Hayvansal | Asidik | Endo peptidaz | Serin |
| Bitkisel | Nötral | Ekzo peptidaz | Sistein |
| Mikroorganizma | Alkalin | | Aspartil |
| | | | Metallo |

**Aktivitelerine Göre Proteazların Sınıflandırılması**

EC (Avrupa Birliği Komitesi) sisteminde proteazlar; aktif ve fonksiyonel gruplarına göre endo ve ekzo peptidazlar olarak sınıflandırılmaktadır:

**Ekzopeptidazlar**

Ekzopeptidazlar, proteinlerin yapısındaki peptid zincirinin sonundaki bölgeye etki ederek N- veya C- terminalindeki aminoasitler arasındaki peptit bağlarını kırarlar. Proteinlerin karboksil ya da amino uçlarından amino asitleri uzaklaştırırlar. Aminopeptidazlar, karboksipeptidazlar ve omegapeptidazlar olmak üzere 3 ana gruba ayrılırlar (Rao *et al*. 1998 ).

**Endopeptidazlar**

Endopeptidazlar, polipeptid zincirinin N ve C ucundan uzakta veya polipeptid zincirinin iç bölgesindeki peptid zincirlerini açan enzimler olup; serin proteazlar, aspartil proteazlar, sistein proteazlar ve metallo proteazlar olmak üzere dört ana sınıfdan meydana gelirler (Topkaya vd Ertunç 2018).

***1. Serin proteazlar***

Serin ve serin tipi proteazlar; aminoasitlerin peptid bağlarını parçalayabilen genel olarak pH'sı 7-11 arasında değişen, nötr ve alkali pH'larda aktif olan, 18-35 kDa ağırlığındaki enzimlerdir. Bu tip proteazlar, "3C proteaz" ya da "chymotrypsin benzeri proteaz" olarak adlandırılmaktadır. Serin proteazların tanımlanması ve sınıflandırılmasında, molekül ağırlıkları ve aktiviteleri göz önünde bulundurulmaktadır. Serin proteazlar; kanın pıhtılaşmasında, sindirim olaylarında ve peptit yapıların yıkılmasında sıklıkla başvurulan proteolitik enzimlerdir. Kan pıhtıları damar içinde inaktif formda "fibrinojen" şeklinde bulunurlar. Serin proteaz yapısında olan "trombin" enzimi ise fibrinojen içindeki peptit bağlarını yıkarak, aktif fibrin yapıyı oluşturur. Aynı zamanda bu enzim, kanın damar içindeki hemostatik dengesinden de sorumludur (Kato *et al.* 1992).

### *2. Aspartil proteazlar*

Endopeptit ailesinin üyesi olan aspartil proteazlar, genellikle düşük pH (3-4) değerlerinde aktif olmaktadır. Molekül ağırlıkları 30-45 kDa arasında değişmektedir. Aspartik proteaz enzimi reaksiyon bölgesinde yer alan ve reaksiyonu gerçekleştiren iki aspartil kalıntısı ile karakterize edilmektedir (Dunn 2013).

### *3. Sistein proteazlar*

Ökaryotik ve prokaryotik hücreler tarafından üretilen sistein proteazlar; papaine benzeyen sistein proteazlar, tripsin benzeri tiyol proteazlar, glutamik aside özel tiyol proteazlar ve diğer tipteki tiyol proteazlar olmak üzere dört sınıfa ayrılmaktadır. Bitkilerde büyüme, gelişme ve depo proteinlerinin biriktirilmesinde rol oynarlar. Bitki enzimleri olarak tanınan papayadan elde edilen papain, sistein proteaz ailesinde yapısı en iyi bilinen endopeptidazdır. İncirden elde edilen fisin, ananastan elde edilen bromelain ve kivi meyvesinden elde edilen aktinidin yapısal olarak birbirine benzemektedir. Bitkisel kaynaklı olan bu proteaz ailesi üzerinde geniş araştırmalar yapılmıştır. Sistein proteazlar; nötral pH'larda optimum aktivite gösteren ve moleküler ağırlıkları 20-30 kDa arasında olan küçük moleküllerdir. Bu proteaz grubunda sadece katepsin C oligomerik enzim bulunmaktadır ve molekül ağırlığı 200 kDa'nın üstündedir (Dubey *et al*. 2007).

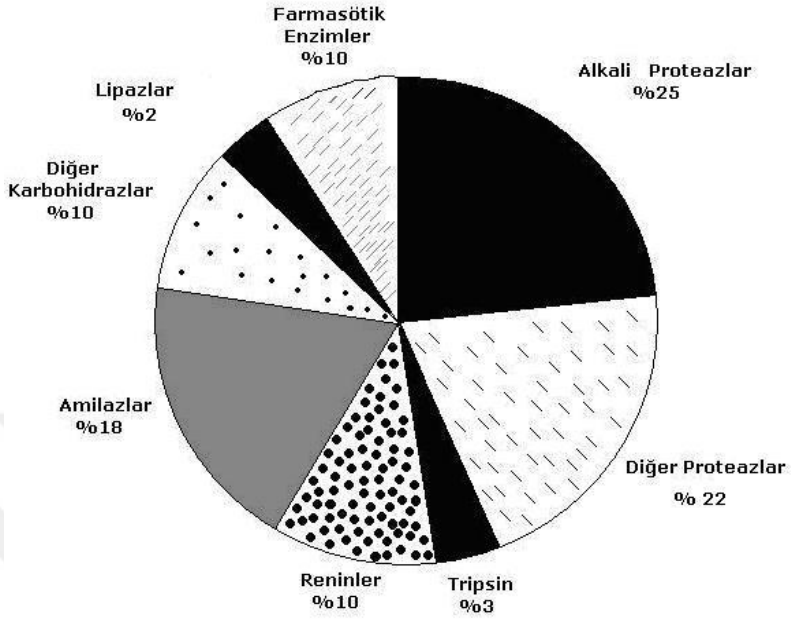
### *4. Metallo proteazlar*

Mantar, bakteri ve yüksek yapılı organizmalarda bulunan metalloproteazlar, ortamda iki değerlikli metalik iyon varlığında aktivite gösterebilmektedir. Genellikle yapısında çinko (Zn) bulunduğu için çinko proteazlar olarak da adlandırılmaktadır. Bazı durumlarda nikel (Ni) ve kobalt (Co) gibi metalik iyon varlığında da aktivite gösterebilmektedir. Optimum aktivite gösterdikleri pH değerleri ise 5-9 aralığındadır. Metallo proteazların çoğu, kinetik ve yapısal çalışmaya uyum sağlayan 15-35 kDA'dan meydana gelen küçük monomerik enzimlerdir (Gerze 2003).

## Proteazların Başlıca Kullanım Alanları

Endüstriyel enzimlerin en önemli gruplarından biri olan proteazlar, toplam enzim satışının yaklaşık %60'ını oluşturmaktadır. Proteaz grubunda bulunan enzimlerden mikrobiyal alkali proteazlar; deterjan üretiminde (düşük sıcaklıklarda yıkamayı sağlar) ve deri endüstrisinde (minimum maliyetle çevre dostu bir şekilde hayvanların cilt ve derisinin tüysüz bir yapıda olmasını sağlar) kullanım alanı bulmaktadır. Ayrıca ilaç sektöründe yanık-iltihaplı yaraların iyileştirilmesinde, gıda alanında protein takviyesi gerektiren diyetlerde, etlerin

yumuşatılmasında, kozmetik, hayvan yemi, peptid sentezi ve X-ışını filmleri üzerindeki jelatinin bozunması gibi pek çok farklı alanda da kullanılabilmektedir (Rao *et al*. 1998; Laxman *et al.* 2005 ).




**Şekil 4.** Enzimlerin endüstriyel alanlara göre kullanım oranları (Rao *et al*. 1998)

**Deterjan Sanayisinde Proteazlar**

Giysilerde meydana gelen süt, kan ve gıda kaynaklı protein yapıdaki lekelerin, yüzeyden dışarı salınarak parçalanmasını, proteaz grubu enzimler sağlamaktadır. İlk enzimatik deterjan olan "Brunus", 1913 yılında üretilmiştir. Daha sonra 1956 yılında, bakteriyel enzimler içeren "Bio-40" deterjanı raflarda yerini almıştır. Deterjanlara olan ilginin artması ile, mikroorganizmalar üzerinde yapılan çalışmalar da hız kazanmıştır. Araştırmalarda; *Bacillus* cinsinin proteolitik enzimler içermesinden ve hücre dışına enzim salgılamasından yola çıkılarak, *B. licheniformis'* in ürettiği enzimleri içeren "Alcalase" adı verilen deterjan kullanıma sunulmuştur. Deterjan endüstrisinin ilerlemesiyle, tüketicilerin de talepleri değişmiş ve düşük sıcaklıklarda çevreye en az zarar veren deterjan arayışı başlamıştır. Tüketicilerin bu talepleri doğrultusunda üreticiler, *B. subtilis'*in ürettiği enzimler üzerinde çalışmalar yapmaya başlamıştır. Proteazların yanı sıra lipazlar, amilazlar ve sellülazlar da deterjan sanayisinde önemli rol oynamaktadır (Kumar *et al*. 2008).

**Tablo 2.** Ticari Proteaz Deterjanları(Kumar *et al*. 2008)

| Ticari Adı | Üretici Firma | Mikrobiyal Suş |
|---|---|---|
| **Alcalase** | Novozymes,Denmark | *Bacillus licheniformis* |
| **Savinase** | Novozymes,Denmark | *Bacillus amyloliquefaciens* |
| **Esperase** | Novozymes,Denmark | *Bacillus licheniformis, halodurans* |
| **Everlase** | Novozymes,Denmark | *Bacillus clausii* |
| **Durayzyme** | Novozymes,Denmark | *Bacillus* sp. |
| **Kannase** | Novozymes,Denmark | *Bacillus clausii* |
| **KAP** | KaoCorporation Japan | *Bacillus alcalophilus* |
| **FNA** | Genencor Internatıonal USA | *Bacillus amyloliquefaciens* |
| **Purafect** | Genencor Internatıonal USA | *Bacillus lentus* |
| **Purafect OxP** | Genencor Internatıonal USA | *Bacillus alcalophilus* PB92 |
| **Properase** | Genencor Internatıonal USA | *Bacillus lentus* |
| **BLAP S** | Henkel,Germany | *Bacillus lentus* |
| **BLAP X** | Henkel,Germany | *Bacillus lentus* |

**Deri Sanayisinde Proteazlar**

Dünya genelinde deri işleme gücü 15 milyon post olarak kayıtlara geçmiştir. Ancak bu işlem, beraberinde tabakhanelerden milyonlarca ton katı atık meydana gelmesine sebep olmuştur. Bu atıkların çevreye verdiği zararı en aza indirmek için, proteazlara başvurulmuştur. Deri yüzeyinde bulunan kılların ve yünlerin deriden uzaklaştırılmasında, derinin ıslatılmasında ve yumuşatılmasında, termofilik proteazlar rol almaktadır. Burada termofilik proteazlar, deri ve kıl yapısının temeli olan proteinleri etkilemektedir. Kıl (saç), α-keratin adı verilen çözünmeyen lifli protein moleküllerinden meydana gelir ve bu molekül α-heliks düzeninden oluşan sistein tortularını içerir.

Farklı deri tabakaları; kollajen, α-keratin (epidermis), albümin, globulin, glikoproteinler, diğer küresel proteinler ve bazı elastin yapılardan oluşurlar. Deriyi ıslatma aşamasında; albümin ya da globülin yapıda olan proteinleri uzaklaştırmak için, alkalin proteazlardan faydalanılır. Alkalin proteazlar sayesinde, kireç banyolarıyla birkaç günü alan bu işlem, çok daha kısa bir sürede tamamlanmıştır. Yine alkalin proteazlar sayesinde daha az atık oluşumu ve elde edilen derinin kalitesinde artış sağlanmıştır. Ayırma aşamasında üreticilerin, postları ve derileri yumuşatarak esnek hale getirmesinde; tripsin ve proteazlardan destek alınmaktadır (De Souza and Gutterre 2012).

### Gıda Sanayisinde Proteazlar

Gıda biyoteknolojisi üzerinde yapılan çalışmalar incelendiği zaman; peynir yapımında aspartil proteaz gurubunda bulunan reninin kullanılması ve *B. amyloliquefaciens'*den elde edilen nötr metallo proteazlar ile bira üretilmesi, proteazların aslında uzun yıllardır hayatımızda olduğunun birer kanıtı olmuştur.

Proteazların gıda sektöründe; gluten yapısındaki elastikiyet kontrolünü gerçekleştirme, yoğurma, işleme zorluğunu giderme ve ürünlerin lezzetini artırma gibi rolleri olduğu bilinmektedir (Tavano *et al.* 2018).

**Tablo 3.** Gıda Sanayisinde Kullanılan Enzimler ve Uygulama Alanları (Fadıloğlu vd Erkmen 2004)

| Sanayi | Enzim | Uygulama Alanı |
|---|---|---|
| **Unlu Mamüller** | Fungal Proteaz<br>Lipoksidaz | Hamurun Yumuşatılması Ekmeğin Beyazlatılması |
| **Bira** | Papain | Soğuktan kaynaklanan bulanıklığın önlenmesi |
| **Peynir** | Rennin | Sütün pıhtılaşması |
| **Et** | Papain | Yumuşatma, olgunlaştırma |
| **Sebze** | Sellülaz | Yumuşatma, tat iyileştirme |
| **Meyve** | Pektinaz | Genel iyileştirme |
| **Yumurta** | Glukoz oksidaz | Glukozun uzaklaştırılması |

### Kozmetik ve İlaç Sanayisinde Proteazlar

Kozmetik sektöründe diş macunlarının, saç bakım ürünlerinin ve kontak lens solüsyonlarının üretiminde proteazlara ihtiyaç duyulmaktadır. Cilt bakım ürünlerinin üretim aşamasında proteinaz K'nın 3D modellemesi yapılmıştır. Modelleme işleminin ardından proteinaz K'nın, epidermis tabakasına zarar vermeden cilt yüzeyinde bulunan ölü deri hücrelerini yok ettiği, anti-aging özellik gösterdiği ve cilt parlaklığının geri kazandırılmasını sağladığı ortaya konulmuştur (Del Rosso 2013).

Proteaz grubunda bulunan enzimler, hastalıkların tedavisinde ve ilaç sanayisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Meme ve kalın bağırsak kanserlerinde; kollejenaz, tripsin, kimotripsin ve papain gibi enzimlerden oluşan karışımların tedavide etkili olduğu tespit edilmiştir. Şeker hastalarında ise, yaraların geç iyileşmesine karşı proteaz absorban örtü tedavisinde, metalloproteaz inhibitörlerinden yardım alınarak, yaraların kronik halden akut hale geçmesi sağlanmıştır. Ayrıca proteaz inhibitörü ilaçlar kullanılarak, virüs kaynaklı hastalıkların tedavisinde (özellikle HIV virüsünün) başarılı sonuçlar ortaya konulmuştur (İnan 2006).

### Tekstil Sanayisinde Proteazlar

Tekstilde enzimlerin kullanımı, hem çevresel etki bakımından hem de ürün kalitesindeki gelişim açısından büyük faydalar sağlamıştır. Tekstil endüstrisinde kullanılan başlıca enzimler, hidrolazlar ve oksidoredüktazlardır. Hidrolaz grubu enzimlerinden olan amilazlar, selülazlar, proteazlar, pektinazlar, lipazlar/esterazlar; özellikle yün ve ham ipeğin işlenme proseslerinde, üreticiler tarafından sıklıkla tercih edilmektedir. Amilazlar; tekstil endüstrisinde haşıl sökme işleminde, selülazlar ise; pamuklu tekstil ürünlerinden fibril ve tüylü liflerin uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır. Ham ipeğin tekstil sanayisinde kullanılabilmesi için yapısındaki zamk'ın giderilmesi ve serisinin uzaklaştırılması gereklidir. Burada alkalin proteazlara başvurularak zamk yapısı ayrıştırılır, ipek yüzeyine parlaklık ve pürüzsülük kazandırılır. *Bacillus* cinsine ait türler tarafından salgılanan Subtisilin tipi proteazlar ile, yün lifleri ön muamele'ye tabi tutulur. Böylece kumaşların çekme önleyici özelliği iyileştirilip, safsızlıkları giderilir ve boyama afinitesi artırılmış olur (Arau´jo *et al.* 2008).

### Bazı Hastalıklarda Proteazların Rolü

Hastalıkların tedavisinde ve klinik tanıda; amilaz, alkalin fosfataz, kolinesteraz gibi enzimlerin yanı sıra proteaz grubu enzimlere de sıklıkla başvurulmaktadır. Non toksik ve anti kanserojen bir bileşik olan Bromelain; apoptotik hücre ölümünü desteklemekte, tümör gelişimini durdurmakta ve meme-akciğer kanserine karşı koruma sağlamaktadır. Bunun yanı sıra arterit (eklem iltihabı)'den muzdarip olan hastalarda eklem ağrılarını azaltarak, bu bireylerin karşılaştığı karıncalanma, parmaklarda his kaybı ve uyuşukluk hissinin tedavisinde de rol almaktadır (Kumar *et al*. 2008).

Fibrinolitik aktiviteye sahip olan serrapeptidaz ve nattokinazlar, proteaz grubu enzim ailesindendir. Serrapeptidaz enzimi üzerinde yapılan çalışmalar ile, bu enzimin fibrinolitik aktiviteye sahip olduğu (kanı incelterek, felç riskini azalttığını) ve vücudumuzda meydana gelen iltihaplanmaların tedavisinde, inflamasyon yanıtını azalttığı ortaya konulmuştur (Tiwari 2017). Güçlü bir fibrinolitik enzim olan nattokinaz, *Bacillus subtilis* var. *natto*'dan saflaştırılmaktadır. Bu enzim; in vivoda trombozu hidrolize etmesinin yanı sıra, plazminojen'in plazmine dönüşümünü sağlamaktadır. Enzimin oral yoldan alınmasının; plazmadaki fibrinolitik aktiviteyi ve doku plazminojen aktivatörü (tPA) üretimini artırdığı gözlemlenmiştir (Peng *et al.* 2005).

### Doku Hasarının Onarılmasında Proteazlar

Kırık, yanık veya cerrahi müdahaleler sonucu meydana gelen tüm hasarlı dokuların yenilenmesinde, proteazlar rol oynamaktadır.

Yaraların iyileşmesi;

- Hemostaz ve pıhtılaşma,
- İnflamasyon,
- Proliferasyon,
- Yeniden şekillenme olmak üzere 4 aşamada incelenebilir.

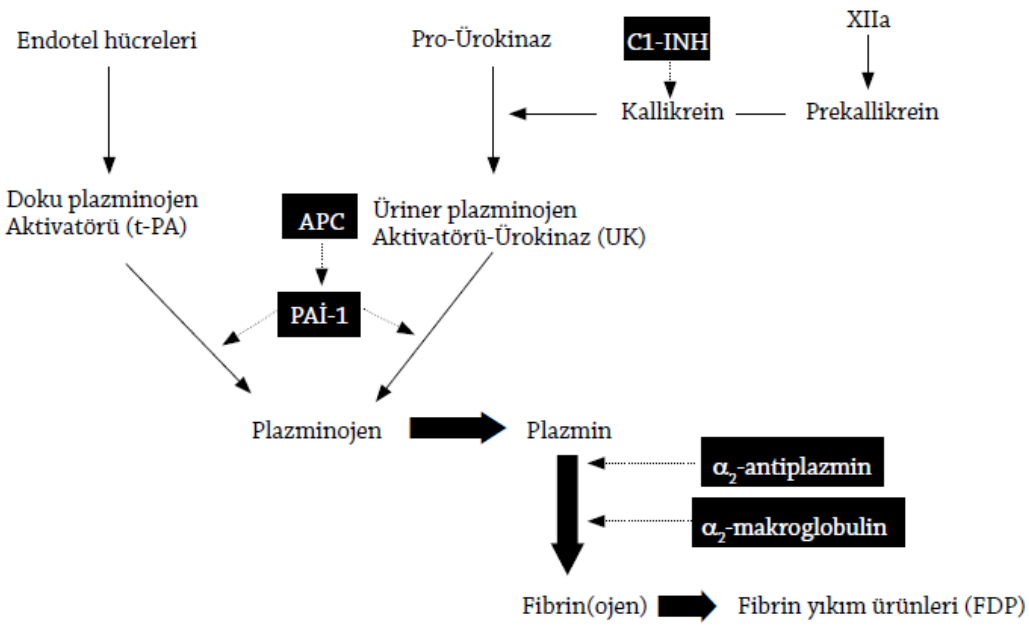
Yaraların iyileşme sürecinde kimotripsinin aktif formu olan tripsin kullanılarak, kronik yara oluşumunun önüne geçilmektedir. Bazen iyileşme sürecinde bir takım aksaklıklar meydana gelir ve buna bağlı olarak meydana gelen kronik yaralar bireylerin yaşam kalitesini düşürebilir, morbidite ve mortaliteye yol açabilir (Kumar *et al*. 2008).

Yanık debridmanlarında ise, sistein proteazlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Yanık sonucu meydana gelen yaralar üzerinde yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarda, bromelainin cansız dokunun etrafını çevreleyerek, yaraların iyileşmesini sağladığı ortaya konulmuştur (Wu *et al.* 2012)

**Fibrinolitik Enzimler**

Fibrin, fibrinopeptidlerin trombin tarafından bölünmesi sonucu üretilir. Fibrin pıhtısı, fibrinojenin trombin tarafından proteolitik bölünmesi üzerine pıhtılaşma kademesinin son adımında oluşturulur (Corte *et al*. 2011).

Fibrinolitik enzimler; aktif olmayan dolaşımdaki plazminojeni aktif plazmine dönüştürerek; vasküler yapıyı düzenleyip, fibrin pıhtısının parçalanmasını katalizleyen enzimlerdir. Gerçekleşen bu reaksiyonların sonunda fibrin yıkım ürünleri ortaya çıkmaktadır (FDP). Plazminojen, üzerindeki bazı özel bölgeler ile fibrinojene bağlanmaktadır. Plazminojeni, plazmine dönüştüren iki önemli enzim; tPA ve ürokinazdır. Bu enzimlerin ana görevleri ise fibrinolizi başlatmaktır. tPA ve ürokinaz, plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1) ve plazminojen aktivatör inhibitör-2 (PAI-2) tarafından kontrol edilmektedir (Ju *et al.* 2017).

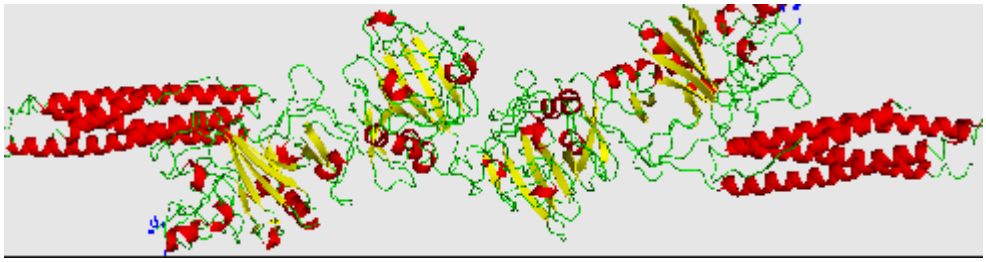



**Şekil 5.** Fizyolojik fibrinolitik sistem şeması (Hasanoğlu 2015)

Fibrinojen, fibrin pıhtısının temelini oluşturan büyük bir glikoproteindir.Fibrinojen molekülü, 29 disülfid köprüsü ile birbirine bağlanmış 2Aα, 2Bβ ve 2γ' polipeptit zincirlerinden oluşan 340-kDa'lık homodimerik glikoproteindir. Fibrinojen biyosentezi, insan kromozomu 4'ün 50 kb'lık bölgesine kümelenmiş üç genin (FGA,FGB,FGG) ekspresyonu ile başlayarak, hepatositlerde gerçekleşmektedir. Hem FGA hem de FGG, iki transkript üretmek için kopyalanmaktadır.

Pıhtılaşma sırasında fibrinojen, çözünmeyen fibrine dönüştürülür. Pıhtı oluşumunun yapısı ve stabilitesi bazı koşullardan etkilenmektedir. Bunlar; prokoagülanların, antikoagülanların, fibrin(ojen) bağlayıcı proteinlerin, moleküllerin ve metal iyonlarının konsantrasyonları, hücre kaynaklı mikro veziküllerin işleyişi ve damarlar arası kan akışı olmak üzere sınıflandırılabilmektedir (Kattula *et al*. 2017).

Fibrinoliz ise; yüksek düzeyde düzenlenmiş enzimatik bir süreçtir. Gereksiz intravasküler fibrin birikimini ve trombozun çıkarılmasını sağlar. Fibrin yüzeyleri, plazminojen ve plazmin bağlanmasını modüle eden fibrinoliz için anahtar aktivasyon bölgeleri olarak kabul edilmektedir.



**Şekil 6.** İnsan fibrininden çift-d fragmanı'nın kristal yapısı (Vilar *et al.* 2020).

**Mikrobiyal Fibrinolitik Enzimler**

Solucan, böcek, mantar, alg, aktinomiset ve bakteri gibi çeşitli canlı gruplarında yapılan çalışmalarda pek çok fibrinolitik enzimin elde edildiği belirtilmiştir. Araştırmalar incelendiğinde; trombolitik tedavide önemli role sahip; streptokinaz (*Streptococcus hemolyticus*'tan), nattokinaz (*Bacillus subtilis* var. *natto*'dan), stafilokinaz (*Staphylococcus aureus*'tan), subtilisin (*Pseudomonas* sp., ve *Bacillus amyloliquefaciens*'ten ) gibi trombolitik ajanların mikroorganizmalardan elde edildiği belirlenmiştir ( Krishnamurthy *et al*. 2018).

Silva ve arkadaşları (2018) tarafından yapılan çalışmada; *Chlorella vulgaris* türüne ait mikroalgden miksotrofik koşullarda, %1'lik mısır likörü kullanılarak fibrinolitik enzim üretilmiştir. Enzimin iyon değişim kromotografisi ile saflaştırılmasından sonra, SDS-PAGE 'de 100,3 kDa ve 45 kDa olan 2 bant gözlemlenmiştir. Daha sonra fibrin zimografi yöntemi ile 45kDa olan bant'ın fibrinolitik aktiviteye sahip olduğu ispatlanmıştır. Yapılan bu çalışmada; *Chlorella vulgaris'*ten kaynaklı fibrinolitik enzimin; trombozu önlemede, tedavide ve ilaç endüstrisi uygulamalarında önemli bir potansiyele sahip olan bir serin proteaz olduğu ortaya konulmuştur (Silva *et al.* 2018).

Velusamy ve arkadaşları (2015), kümes hayvan atıklarının bulunduğu topraktan aldıkları numunelerden, yüksek fibrinolitik aktiviteye sahip suş/suşları belirlemişlerdir. CWD-67 kodlu *Bacillus tequilensis* suşunun fibrinolitik aktivitesinin, diğer suşlardan yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Kültürden enzimin saflaştırılması için sırasıyla; amonyum sülfat çöktürmesi, membran konsantrasyonu, diyaliz, iyon değişimi ve jel filtrasyon yöntemlerini kullanmışlardır. Saflaştırılmış enzimin molekül ağırlığının SDS-PAGE'de 22 kDa olduğu tespit edilmiştir. Fibrinolitik enzim olduğu ise, fibrin zimogram yöntemi ile doğrulanmıştır. Yapılan deneyler sonucunda enzimin, kimotripsin benzeri serin metalloproteaz olduğu tespit edilmiş, bu enzimin trombozu önlemede ve tedavisinde potansiyel bir aday olduğu ortaya konulmuştur (Velusamy *et al.* 2015).

Nascimento ve arkadaşları (2017) tarafından yapılan çalışmada ise, UCP 126 kodlu izolat olan *Mucor subtilissimus* UCP 1262 üzerinden, serin benzeri proteaz enzimi elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bu enzimin molekül ağırlığı 20 kDa, 40 °C'deki fibrinolitik aktivitesi ise 22,53 U/ml olarak kaydedilmiştir. Enzimin felç, pulmoner emboli, trombolitik tedavi ve derin ven trombozunun tedavisinde mevcut tedavilere ek olarak umut verici bir alternatif olduğu ortaya konulmuştur (Nascimento *et al.* 2017).

**Tedavide Kullanılan Fibrinolitik İlaçlar**

Tromboz ve trombozla ilişkili hastalıklar, Batı dünyasında en sık görülen morbidite ve mortalite nedenlerinden biridir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından 2011 yılında yayınlanan rapora göre; 2008 yılında meydana gelen tüm küresel ölümlerin %30 'unu kardiyovasküler hastalıklar oluşturmaktadır. WHO öngörüleri bu sayının 2030 yılında 23,6 milyona çıkacağını öngörmektedir (Anh *et al*. 2015).

Tromboz terimi; kan damarlarında pıhtılaşmadan (trombus) kaynaklı tıkanmayı ifade eder. Trombus (kan pıhtısı), daralmış olan bir damarı tıkar. Eğer toplardamar içinde oluşan kan pıhtısı (tromboz), ilk oluştuğu yerden koparak ayrılır ve toplardamar içerisinde seyahat eder ise, bu olay emboli olarak adlandırılır. Bu durumda;

- ✓ Akut miyokard infarktı (AMI)
- ✓ Derin ven trombozu (VT)
- ✓ Pulmoner emboli (PE)
- ✓ Akut iskemik inme (AIS)
- ✓ Hipertansiyon
- ✓ Serabrovasküler hastalıklar
- ✓ Akut periferal arter tıkanıklığı

gibi kardiyovasküler hastalıklar, bireylerde gözlenir (Furie and Furie 2005).

Trombozun önlenmesi ve tedavisinde trombolitik ajanlar önemli rol oynamaktadır. Tromboliz, kan akışını hızlı ve kolay şekilde yeniden sağlayan tek tedavidir. Trombolitik ilaçların etkinliğini göstermesi, pıhtının oluşum sürecine bağlıdır. Bu nedenle trombolitik ilaçlar, hastalık meydana geldikten sonra en, geç 2 saat içerisinde hastaya verilmelidir (Hogan and Brainard 2015).

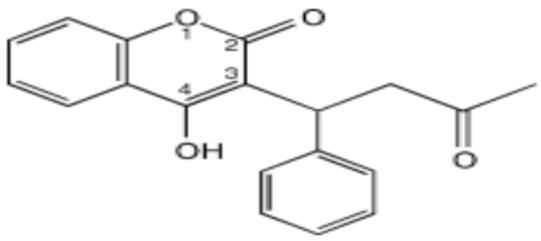
Tedavide kullanılan fibrinolitik ilaçlar vücuda iki şekilde verilir;

1. **Oral (ağızdan verilen) Antikoagülant İlaçlar;**
   - ✓ Varfarin
   - ✓ Heparin
   - ✓ Nattokinaz
2. **İntravenöz Olarak Uygulanan İlaçlar;**
   - ✓ Alteplaz
   - ✓ Tenekteplaz
   - ✓ Ürokinaz
   - ✓ Streptokinaz (Singh *et al.* 2014)

**Oral (Ağızdan Verilen) Antikoagülant İlaçlar**

**1. Varfarin**

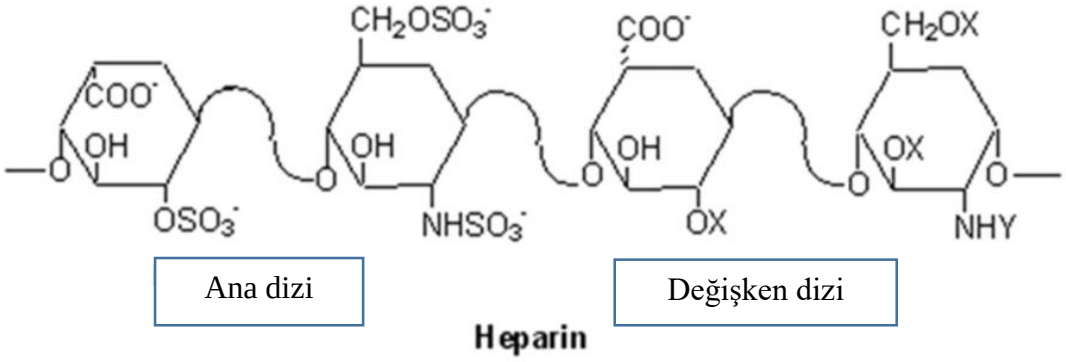
Varfarin, kalp ve damar sisteminde kanın daha kolay akmasını sağlayarak, pıhtılaşmayı önleyen antikoagülant grubu ilaçtır. Kalp krizi, inme ve felç gibi hastalıkların tedavisinde varfarin grubu ilaçlara sıklıkla başvurulmaktadır. Piyasadaki ismi "Coumadin" olan bu ilaç sıklıkla kullanılmasına rağmen, yüksek maliyetlidir (Porter 2010).




**Şekil 7.** Varfarinin kimyasal yapısı (Tie and Stafford 2008)

**2. Heparin**

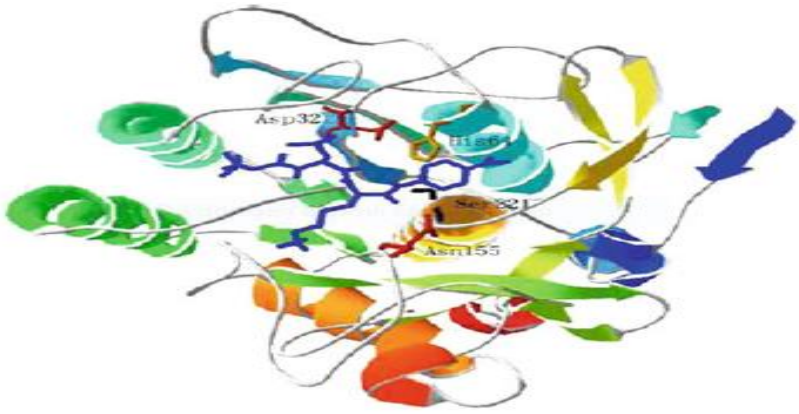
Kan pıhtı oluşumununun önlenmesinde başvurulan heparin, dünya çapında en yaygın kullanılan klinik antikoagülanttır. Kalp, bacak ve akciğerde meydana gelen kan pıhtılarının tedavisinde kullanılmaktadır. Açık kalp ameliyatı ve yatan hastalarda pıhtılaşma sorununun tedavisi için kullanılan bu ilacın maliyeti yaklaşık olarak 49 dolardır (Onishi *et al.* 2016).




**Şekil 8.** Heparinin kimyasal yapısı (Munoz and Linhardt 2004).

**3. Nattokinaz**

Nattokinaz, geleneksel Japon yiyeceği olan natto'dan izole edilmiş bir serin proteaz'dır. 1980 yılında natto'nun yapay fibrini çözebildiği keşfedilmiştir. Bu keşif üzerine natto ile ilgili çalışmalar hızlanmış, nattokinazın fibrin ve plazmin substratını doğrudan hidrolize edip, kan pıhtılarını parçaladığı ortaya çıkarılmıştır. Nattokinaz; kardiyovasküler hastalıkların tedavisi için güvenilir, güçlü ve düşük maliyetli bir enzimdir (Weng *et al.* 2017).

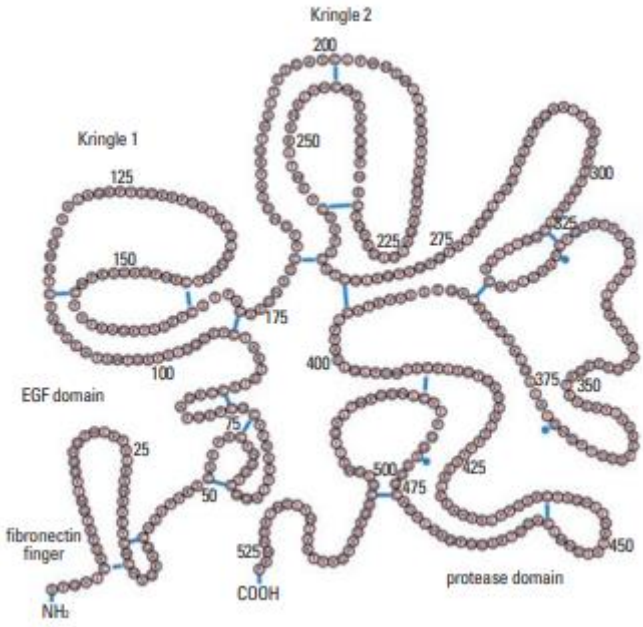


**Şekil 9.** Nattokinazın 3-D yapısı (Kotb 2012)

**İntravenöz Olarak Uygulanan İlaçlar**

**1. Alteplaz**

Alteplaz, insan tPA'sının rekombinant bir formudur. Dokuda damar endoteli tarafından sentezlenmektedir. Fibrine özgüdür ve yarılanma ömrü 4-6 dakika arasında değişmektedir.




**Şekil 10.** Alteplazın moleküler yapısı (Bivard *et al.* 2013)

**2. Tenekteplaz**

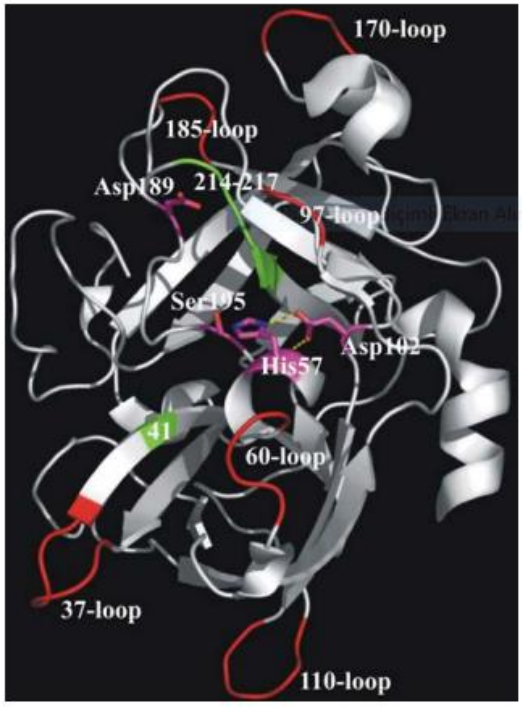
Endotelyal hücreler tarafından sentezlenip salınır. Rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen doku plazminojen aktivitörüdür. Yarılanma süresi 20-24 dakikadır.




**Şekil 11.** Tenekteplazın protein yapısı (Bivard *et al.* 2013)

### 3. Ürokinaz

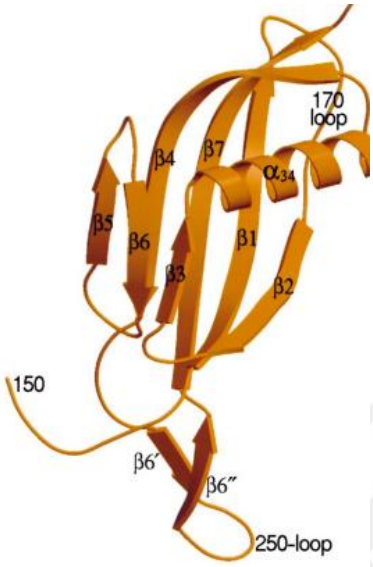
Böbrekler tarafından oluşturulduğu ve idrarda bulunduğu için, üriner tip plazminojen aktivatörü (uPA) olarak adlandırılmaktadır. Böbrek parankim hücrelerinden fizyolojik olarak salınmaktadır. Ürokinaz enziminin, katater tıkanmalarını açmak ve periferal damar içi trombüslerin tedavisine yardımcı olmak gibi önemli görevleri bulunmaktadır. Yarılanma süresi 20 dakikadır. Plazminojen için daha düşük afiniteye sahiptir. Ürokinazlar; bir kofaktör olarak fibrin gerektirmez ve normal koşullar altında ekstravasküler olarak hareket ederler.




**Şekil 12.** İnsan uPA'sının 3 boyutlu yapısı (Carriero *et al.* 2009)

### 4. Streptokinaz

Streptokinazlar, fibrine özgü olan trombolitik ajanlardır. Plazminojenin plazmine dönüştürülmesine yardımcı olmaktadırlar. Maliyetleri düşük olduğu için, trombolitik tedavide sıklıkla kullanılmaktadır.




**Şekil 13.** Streptokinaz β-domaininin kristal yapısı (Wang *et al.* 1999)

# MATERYAL VE METOT

## Materyal

Çalışmada kullanılan toprak örnekleri Türkiye'nin farklı illerinden(Ağrı, Ankara, Artvin, Erzincan, Erzurum, Kars, Samsun, Sivas, Tokat ve Trabzon) temin edildi. Aseptik şartlarda alınan örnekler laboratuvara getirilerek, deney aşamasına geçildi. Saf olarak elde edilen izolatların stok kültürleri hazırlanarak, proteaz ve fibrinolitik enzim aktiviteleri tespit edildi. En yüksek fibrinolitik enzim aktivitesine sahip izolat (V4) ile çalışmaya devam edildi.

**Tez çalışmasında kullanılan maddeler:** Tez kapsamında kullanılan besiyerleri, kitler ve kimyasal maddeler ile firma adları Tablo 4'te verilmiştir.

**Tablo 4.** Tez Çalışmasında Kullanılan Maddeler

| **Kimyasallar** | **Üretici** |
|---|---|
| • Agaroz | Sigma |
| • Akrilamid | Sigma |
| • Amonyum Sülfat | Sigma |
| • Bisakrilamid | Sigma |
| • β-Merkaptaenol | Sigma |
| • Bushnell Haas Broth (BHB) | Sigma |
| • Coomassie Brilliant Blue G-250 | Sigma |
| • DNA Marker | Thermo |
| • Etidyum Bromür | Sigma |
| • $Fe_2SO_4$ | Merck |
| • Fibrinojen | Sigma |
| • Glisin | Sigma |
| • Glukoz monohidrat | Sigma |
| • Gümüş-Nitrat | Merck |
| • HCI | Sigma |
| • Mangan(II)Sülfat (MnSO4) | Merck |
| • Mono Potasyum Sülfat ($KH_2PO_4$) | Merck |
| • N,N,N'',N''Tetrametilendiamin (TEMED) paranitrofenol palmitat (p-NPP) | Sigma |

**Tablo 4.** (devamı)

| | |
|---|---|
| • NaCl | Merck |
| • Promega wizard$^{R}$ genomic DNA purification kit (DNA izolasyon kiti) | Promega |
| • Skim Milk Powder | Sigma |
| • Thrombin | Sigma |
| • Tryptone | Oxoid |
| • Trikloroasetik asit (TCA) | Sigma |
| • Triptic Soy Agar (TSA) | Neogen |
| • Triptic Soy Broth (TSB) | Neogen |

**Tez Çalışmasında Kullanılan Laboratuvar Ekipmanları:** Tez kapsamında kullanılan laboratuvar ekipmanları Tablo 5'de verilmiştir.

**Tablo 5.** Tez Çalışmasında Kullanılan Laboratuvar Ekipmanları

| **Cihazlar** |
|---|
| • Hassas Terazi: Ohaus Pioneer |
| • Çalkalamalı İnkübatör: Midıi Dual 14 |
| • Santrifüj: Hettich |
| • Manyetik Karıştırıcı: Stirrer HS31 |
| • Steril Kabi: Telstar AV -100 |
| • pH Metre: Metler Toledo |
| • Kar Makinesi: Scotsman AF-20 |
| • Mikroskop: Leica |
| • Spektrofotometre: Bechman Coulter |
| • PCR cihazı: Senso Quest |
| • Elektroforez Cihazı ve Güç Kaynağı: 1-Bio Rad Power Pac 3000 2-Apparatus Corporation EC 135 |
| • Elektroforez Tankı: Bio-Rad |
| • Çok Bloklu Isıtıcı: Lab- Line |
| • Su Banyosu: Grant 6G |
| • Jel Görüntüleme Cihazı: Fusion |
| • Buzdolabı (+4°C/(-20°C): Vestel |
| • Çeker ocak: TÜV-SÜD |
| • Dijital Isıtıcı: VWR |

**Tez Kapsamında Yapılan Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı**

- **%0,9'luk Fizyolojik Su Çözeltisi (Toprak Örneklerinden Bakteri İzolasyonu İçin)** 9 gr NaCl tartılıp,1000 ml distile su içerisinde çözüldü.

**Proteaz Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler**

- **%65'lik Kazein Çözeltisi (50 ml):** 50 ml pH'sı 8,5 olan 50 mM Tris-HCl tampon çözeltisi beher içerisine alındı, 0,325 gr kazein tartıldı, ısıtmalı manyetik karıştırıcıda düşük ısıda (30°C-50°C) çözünmesi sağlandı ardından çözeltinin pH'sı 8,5'a ayarlandı.
- **Folin-Ciocalteau (F-C Reaktifi 0,5 M):** 12,5 ml F-C reaktifi 100 ml'lik erlene alındı, son hacim 50 ml olacak şekilde distile su eklenerek reaktif hazırlandı.
- **Triklorik Asit (TCA) Çözeltisi (0,11 mM):** 4,5 gr TCA tartılıp, 250 ml distile suda çözüldü.
- **Sodyum Karbonat Çözeltisi (0,5 M $Na_2CO_3$):** 13,25 gr $Na_2CO_3$ tartılıp, 250 ml $dH_2O$'da çözüldü.

**Fibrinolitik Enzim Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler**

- **%1,5'lik Fibrinojen Hazırlanması:** Ticari olarak satın alınan 0,045 g fibrinojen (Sigma) hassas terazide tartılıp, 3 ml Tris-HCl (50 mM) içerisinde çözüldü.
- **10 U Trombin Hazırlanması:** Ticari olarak satın alınan 1 gr trombin (Sigma) 10 ml Tris-HCl tamponu içerisinde çözüldü. Solüsyon kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.
- **%1'lik 3 mililitre Agaroz:** 0,03 gr agaroz tartılıp, 3 ml Tris-HCl (50 mM ) içerisinde çözüldü.
- **0,2 M TCA Hazırlanışı:** 8,15 gr TCA tartılıp, 250 ml distile suda çözüldü.
- **50 Mm Tris–HCl Tamponu (pH:8,0):** 1,51 gr Tris(trizma) hassas terazi ile tartılıp, 250 ml $dH_2O$'da çözüldü ve pH'sı 8,0'e ayarlandı.

**SDS-PAGE İçin Kullanılan Çözelti ve Tamponlar:**

- **1M–Tris-HCl (pH:8,8):** Hassas terazide 1,2 g Tris tartılıp 90 ml $dH_2O$'da çözüldü. pH= 8,8'e ayarlandı ve tamponun son hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.
- **1M-Tris-HCl (pH:6,8):** Hassas terazide 1,2 g Tris tartılıp, 90 ml $dH_2O$'da çözüldü. pH'sı 6,8'e ayarlandı ve tamponun son hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

- **%30 Akrilamid-%0,8 Bisakrilamid Çözeltisi:** 6 g akrilamid ile 0,16 g bisakrilamid hassas terazide tartıldıktan sonra 13,84 ml $dH_2O$'da çözüldü.
- **Pers Çözeltisi (%10):** 0,5 g amonyum persülfat tartılıp, 4,5 ml distile suda çözüldü.
- **%10'luk SDS:** 0,5 g SDS tartılıp, 4,5 ml $dH_2O$'da çözüldü.
- **Yürütme Tamponu:** 1,5 gr Tris ve 7,2 gr glisin hassas terazi yardımı ile tartıldıktan sonra, üzerine 5 ml SDS (%10) eklendi. Hazırlanan karışım cam şişeye alındı ve son hacim 500 ml tamamlandı.
- **Numune Tamponu;** pH'sı 6,8 olan Tris-HCl (1M) tamponundan 650 µL, 1000 µL SDS (%10), 1000 µL gliserin ve 1000 µL Brom Fenol mavisi (%1), 50 ml'lik bir erlen içerisine alındı ve pipetaj işlemi uygulanarak, çözeltinin homojen bir hal alması sağlandı. Daha sonra çözeltinin son hacmi 10 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan tamponun içerisine 500 µL β -Merkaptoetanol eklendikten sonra, buzdolabına kaldırıldı.

**Gümüş Boyama İçin Kullanılan Çözeltiler**

- **Tespit Çözeltisi:** 30 ml EtOH (%96), 60 ml $dH_2O$ ve 10 ml asetik asit erlen içerisine alınıp, manyetik karıştırıcı yardımı ile hazırlandı.
- **Redüksiyon Çözeltisi:** 80 ml $dH_2O$, 45 ml etanol ile karıştırıldı. Hazırlanan bu karışıma 4,8 gr sodyum asetat eklendi. Asetik asit'in pH'sı 6,0'ya ayarlandı ve üzerine 0,15 gr sodyum tiyosülfat eklendi. Daha sonra karışıma 4 ml glutaraldehit eklendi ve çözeltinin son hacmi 150 ml olacak şekilde $dH_2O$ ile tamamlandı.
- **Boyama Çözeltisi:** 150 ml $dH_2O$, 30 µL Formaldehit ve 0,15 gr gümüş nitrat 100 ml'lik bir beher içerisinde alındıktan sonra etrafı alüminyum folyo ile (gün ışığında fotokimyasal bozunma ile metalik gümüşün açığa çıkmasını engellemek için) sarıldı.
- **Yıkama 1 Çözeltisi:** Hassas terazide 3,75 gr sodyum karbonat tartıldıktan sonra üzerine 270 ml $dH_2O$ eklendi ve manyetik karıştırıcıda homojen hale getirildi. Meydana gelen çözelti bir erlen içerisine alındı ve üzerine 120 µL formaldehit ilave edildi.

**Tez Kapsamında Yapılan Deneylerde Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanışı**

✓ **TSA(Triptic Soy Agar)**

Ticari olarak satın alınan (Lab M) besiyerinden hassas terazide 37 gr tartılıp, 1000 ml $dH_2O$ içerisinde çözüldükten sonra, 121°C 15 dakika otoklavlandı. Hazırlanan besiyeri steril kabin içerisine alındı ve petrilere aktarıldı.

✓ **TSB (Triptic Soy Broth)**

Ticari olarak satın alınan (Lab M) besiyerinden hassas terazide 30 gr tartılıp, 1000 ml $dH_2O$ içerisinde çözüldükten sonra,121°C 15 dakika otoklavlandı. Hazırlanan besiyeri steril kabin içerisine alındı ve petrilere aktarıldı.

✓ **LB (Luria Bertani Broth)**

Ticari olarak satın alınan (Sigma) LB broth besiyerinden hassas terazide 20 gr tartılıp, 1000 ml $dH_2O$ içerisinde çözüldükten sonra, 121°C'de 15 dakika otoklavlandı.

**Yöntem**

Toprak numunelerinden izole edilen bakterilerden, proteaz ve fibrinolitik enzim aktivitesine sahip olan suşlar belirlendi. Bakterilerin konvensiyonel ve moleküler yöntemlerle karakterizasyonu yapıldı. En iyi fibrinolitik aktiviteye sahip suş belirlendi ve enzim üretimi optimize edildi. Daha sonra fibrinolitik enzim saflaştırıldı ve karakterize edildi.

**Örnek toplanması**

Çalışmada kullanılan toprak örnekleri farklı illerden aseptik şartlarda alınarak, laboratuvar ortamına getirildi. Örnekler çalışma yapılıncaya kadar, oda sıcaklığında muhafaza edildi.

**Proteaz üreten bakterilerin izolasyonu**

Aseptik koşullarda laboratuvar'a getirilen toprak örnekleri şeffaf, steril mikro plastik tüplerin içerisine alındı ve tez çalışmasında kullanılmak üzere kodlandı.

Bu aşamadaki deneyler için hazırlanan besiyerinin içeriği ve hazırlanışı aşağıda belirtildiği gibidir;

**Proteaz Agar Besiyeri**

- 3,27 gr/L Bushnell Haas Broth,
- 20 gr/l Agar

- 20 gr/l Glikoz tartılıp, 800 ml $dH_2O$ içerisinde çözüldü ve besiyerinin pH'sı 7,0 olacak şekilde ayarlandı. Besiyeri 121°C 15 dakika otoklavlandı.
- Başka bir erlen içerisinde ise, 200 ml $dH_2O$ 121°C'de 15 dakika süreyle otoklavlandı. Daha sonra 20 gr/l Skim Milk Powder (SMP) tartılarak, steril suya kabin içerisinde ilave edildi. 5 dakika boyunca manyetik karıştırıcı yardımı ile çözüldü. Hazırlanan SMP steril kabin içerisinde besiyerine eklendi.

%0,9'luk fizyolojik steril su (NaCl) kullanılarak, bir seri dilüsyon tüpü ($10^{-1}$ 'den $10^{-7}$ 'ye kadar) hazırlandı. Daha sonra toprak örneklerinden 1 gr alınarak, dilüsyon işlemi başlatıldı. İşlemden sonra tüm dilüsyon tüplerinden 100'er µl alınarak, Proteaz agar besiyeri 'ne inoküle edildi. Petriler 37°C'de 48-72 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda petrilerde gelişen koloniler morfolojik olarak incelendi. Bakteri, maya ve küf olduğu düşünülen koloniler birbirlerinden ayırt edildi, bakteri kültürleri seçilerek suşlar saf düşürülünceye kadar 3 faz çizgi ekimi yapıldı ve stok kültürleri hazırlandı (Liu *et al.* 2021).

**Proteaz ve Fibrinolitik enzim üretimi yönünden suşların karşılaştırılması**

Bu aşamadaki deneyler için hazırlanan besiyerinin içeriği ve hazırlanışı aşağıda belirtildiği gibidir;

**Proteaz Besiyeri**

- 3,27 gr/L Bushnell Haas Broth,
- 20 gr/L Glikoz tartılıp, 800 ml $dH_2O$ içerisinde çözüldü ve besiyerinin pH'sı 7,0 olacak şekilde ayarlandı. Besiyeri 121°C 15 dakika otoklavlandı.
- Başka bir erlen içerisinde ise, 200 ml $dH_2O$ 121°C'de 15 dakika süreyle otoklavlandı. Daha sonra 20 gr/l Skim Milk Powder (SMP) tartılarak, steril suya kabin içerisinde ilave edildi. 5 dakika boyunca manyetik karıştırıcı yardımı ile çözüldü. Hazırlanan SMP steril kabin içerisinde besiyerine eklendi.

Besiyeri hazırlandıktan sonra, suşların proteolitik enzim aktiviteleri aşağıda yer alan prosedüre göre belirlendi.

Kültürden 2 ml alınarak ependorf tüplerine aktarıldı. 6000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminin sonrasında süpernatant kısımları proteaz aktivitesinin ölçülmesi için cam tüplere alındı.

%65'lik kazein çözeltisinden (pH 7,4) cam tüpe 2,5 ml konulduktan sonra, üzerine 0,5 ml enzim içerdiği düşünülen süpernatant ilave edildi. Kör olarak enzim yerine 100 mM pH'sı 7,4 olan Tris-HCl tampon çözeltisi ilave edildi. Tüpler 30°C'de 10 dakika inkübasyona

bırakıldı. Süre sonunda karışımın üzerine 2,5 ml (0,1 M) Trikloroasetik asit (TCA) eklenerek, 30°C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı ve 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant kısımlarından 1 ml alınarak, cam tüplere aktarıldı. Üzerine 2,5 ml (0,5 M) $Na_2CO_3$ ve Folin-Ciocaltcau (0,5 M) reaktifinden 0,5 ml eklendikten sonra, karışım 37°C'lik su banyosunda 30 dakika inkübasyona bırakıldı. 30 dk'lık inkübasyon süresinin sonunda, 660 nm'de spektrofotometrik olarak absorbansı köre karşı ölçüldü (Takami *et al.* 1989).

***Fibrinolitik enzim aktivitesinin ölçülmesi***

Bu aşamadaki deneyler için hazırlanan besiyerinin içeriği ve hazırlanışı aşağıda belirtildiği gibidir;

**Fibrin Besiyeri (Sıvı)**

- 20 gr/l Glikoz,
- 5 gr/l Fibrin
- 3,27 gr/L Bushnell Haas Broth tartılıp, 1000 ml $dH_2O$'da erlen içerisinde çözüldü ve 121°C 15 dakika otoklavlandı.

Besiyeri hazırlandıktan sonra, suşların fibrinolitik enzim aktiviteleri aşağıda yer alan prosedüre göre belirlendi.

Kültürden 2 ml alınarak ependorf tüplerine aktarıldı. 6000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminin sonrasında süpernatant kısımları fibrin aktivitesinin ölçülmesi için cam tüplere alındı.

Aktivite tayin etmek için; 1,4 ml (50 mM) Tris-HCl (pH: 7,4) ile 0,4 ml (%0,72) fibrinojen falkon içerisine konularak, 37°C'de 5 dakika bekletildi. Sürenin sonunda 10 U/ml trombin'den, 0,1 ml olacak şekilde eklendi ve 37°C'de 10 dakika bekletildi. Süpernatant kısımlarından 0,1 ml, eklenerek 37°C'de 60 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda reaksiyonu durdurmak için, 0,2 M TCA eklendi ve 15000 g'de 5 dakika santrifüj edildi. 275 nm'de spektrofotometrik olarak absorbansı köre karşı ölçüldü da (Silva *et al.* 2018; Vijayaraghavan *et al.* 2019).

(*Kör olarak enzim yerine, saf su kullanıldı)

**En iyi izolatların katı besiyerinde fibrinolitik enzim aktivitesinin belirlenmesi**

En yüksek fibrinolitik enzim aktivitesine sahip 3 suş ve fibrinolitik aktiviteye sahip olduğu bilinen *Bacillus subtilis* (pozitif kontrol olarak kullanıldı) bakterisi canlandırılarak, ön kültüre alındı, OD (Optical density) değerleri eşit olacak şekilde hesaplandı.

Bu aşamadaki deneyler için hazırlanan fibrin içeren ortamın içeriği ve hazırlanışı aşağıda belirtildiği gibidir;

**Fibrin içeren ortam**

- %1,5'lik bovine fibrinojen çözeltisinden 3 ml,
- 10 U trombin'den 1 ml,
- %1'lik agaroz çözeltisinden 3 ml alınarak oluşturuldu.

Hazırlanan ortam sıcak su banyosunda 80°C'de 30 dakika bekletildi. Sürenin sonunda steril cam petriye döküldü. Ön kültüre alınan suşlar katı fibrin ortamına inoküle edildi ve 24-48 saat süre ile 37°C'de inkübasyona bırakıldı (De Souza *et al*. 2016; Hu *et al*. 2019).

## En iyi izolatın moleküler karakterizasyonu

### Test suşunun moleküler yöntemlerle tanımlanması

#### *Genomik DNA izolasyonu*

Stok kültürden alınan test izolatı TSA besiyerinde canlandırılıp, her bir petriden tek koloni alınarak, TSB besiyerine inoküle edildi ve 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda bakteriye ait genomik DNA, Promega WizardR genomic DNA purification kit (A2360) protokolüne göre izole edildi (Arslan 2017).

#### *İzolasyon prosedürü*

- TSB sıvı besiyerinde gelişim gösteren hücrelerden 2 ml alınarak, ependorf tüplere aktarıldı ve 16000 rpm'de 2 dk çöktürüldü. Pellet üzerine 480 µl, pH'sı 8 olan 50 Mm EDTA ilave edildi.
- Homojenatın üzerine 120 µl (10 mg/ml) lizozim eklenerek, 37°C'de 1 saat süre ile inkübasyona bırakıldı.
- Homojenat 2 dk süreyle 13000 rpm'de santrifüjlendi, süpernatant kısmı uzaklaştırıldı ve tüplerin üzerine 600 µl Nüklei Lizis Solüsyonu eklenip, pipetajlandı.
- Homojenat 80°C'de 5 dk süre ile inkübasyona bırakıldı, daha sonra oda ısısına gelinceye kadar soğuması beklendi. Üzerine 3 µl RNase A eklenerek, çalkalanmak suretiyle birkaç kez alt üst edildi ve 30 dk süreyle, 37°C'de inkübe edildi.
- Oda sıcaklığına gelmesi beklenen karışıma, Protein Presipitasyon solüsyonundan 200 µl eklendi ve 20 saniye süre ile vortexlendi. Bu işlemin ardından 5 dk boyunca buzda bekletildi.
- Buz üzerinden alınan test tüpleri 30 saniye süre ile 13000 rpm'de santrifüjlendi.

- Oluşan süpernatant kısmı içerisinde 600 µl izoproponal bulunan yeni ependorf tüplerine aktarıldı ve pellet oluşuncaya kadar alt üst edildi.
- 13000 rpm'de 2 dk boyunca tüpler santrifüjlendi ve süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı.
- Ependorfların içerisine %70'lik EtOH'dan 600 µl eklendikten sonra, tüpler fazla sarsılmamak suretiyle alt üst edildi ve 13000 rpm'de 2 dk süre ile santrifüjlendi.
- Santrifüj işleminin sonunda tüplerin üzerine EtOH eklendi. Tüplerden etanol tamamen uzaklaşıncaya kadar, 37°C'de 15-20 dakika süresince inkübasyona bırakıldı.
- Ependorf tüplerinin üzerine 100 µl DNA Rehidrasyon Solüsyonu eklendi, 60 dk 65°C'de inkübasyona bırakıldı. İçerisinde genomik DNA bulunan ependorf tüpler, kullanılacağı zamana kadar +4°C'de muhafaza edildi (Adıgüzel 2006).

**DNA konsantrasyonlarının ölçülmesi ve çalışma solüsyonlarının hazırlanması**

Kuvartz küvetin içerisine 998 µl TE çözeltisi konularak, 260 nm'ye ayarlı spektrofotometrede ölçüm yapıldı ve çıkan değer kör olarak kaydedildi. Daha sonra üzerine 2 µl DNA ilave edildi ve karışımın homojen hale gelmesi sağlandı. 260 nm dalga boyunda absorbans ölçümü gerçekleştirildi. Elde edilen bu absorbans değerinden kör değeri çıkarılarak, DNA'nın absorbans değeri bulundu ve aynı işlemler 280 nm dalga boyu için tekrarlandı. A260/A280=1-1,9 arasında olan DNA örneklerinin çalışma solüsyonları hazırlanıp kullanıldı.

**DNA örneğinin ve çalışma solüsyonunun konsantrasyonunun belirlenmesi (µg/ml)**

DNA Konsantrasyonu (µg/ml)=$A_{260}$ **x** Seyreltme Faktörü (500)**x**50 (DNA için sabit değer) formülü kullanılarak, stok DNA solüsyonunun konsantrasyonu tespit edildi.

DNA çalışma solüsyonunun konsantrasyonu;

| |
|---|
| İstenen Konsantrasyon (100ng/µl) **x** İstenen Hacim (200 µl) **/** Stok DNA Konsantrasyonu (µg/ml) |

çözeltisi ile 200 µl'ye tamamlandı ve 100 ng/µl konsantrasyondaki DNA çalışma solüsyonu hazırlandı. Çözelti çalışma esnasında kullanılıncaya kadar -86°C'de muhafaza edildi (Adıgüzel 2006).

***16S rRNA PCR***

Evrimsel olarak korunmuş olan 16S rRNA gen bölgesi, bakteri sistematiği açısından oldukça önemli olup, universal 16S rRNA primerleri kullanılarak in vitro koşullar altında çoğaltılmıştır (Albayrak 2018).

***PCR reaksiyon ortamı***

Her bir DNA örneği için, 30 µl'lik reaksiyon tüpleri hazırlandı. Kullanılan kimyasalların konsantrasyonları ve miktarları aşağıda yer alan Tablo 6.'da verilmiştir.(Her bir tüpe 3 µl DNA eklenmiştir)

**Tablo 6.** 16S rRNA PCR İşleminde Kullanılan Reaktiflerin Konsantrasyon ve Miktarları

| **REAKTİF** | **KONSANTRASYON** | **MİKTAR**(µl) |
|---|---|---|
| PCR Buffer (sigma) | 10X | 3 |
| dNTP | 10 mM | 0,6 |
| MgCl2 | 25 mM | 1,8 |
| 27F | 5 mM | 3 |
| 1492R | 5 mM | 3 |
| DMSO | %99 | 1,2 |
| ddH2O | - | 14,4 |

**PCR programı:** PCR tüpleri termal döngü cihazına yerleştirildi ve Tablo 7.'de yer alan program koşullarına göre ayarlama yapıldı. İstenilen DNA bölgesi çoğaltıldı.

**Tablo 7.** 16S rRNA PCR İşlemi İçin Uygun Sıcaklık, Süre ve Döngü Sayısı

| **İŞLEM** | **SICAKLIK (°C)** | **SÜRE (dk)** | **DÖNGÜ SAYISI** |
|---|---|---|---|
| Ön Denatürasyon | 94 | 2 | 1 |
| Denatürasyon | 94 | 1 | 36 |
| Bağlanma | 49 | 1 | 36 |
| Uzama | 72 | 2 | 1 |
| Son Uzama | 72 | 5 | |
| Saklama | 4 | ∞ | |

**16S rRNA PCR ürünlerinin jel elektroforezi**

Jel elektroforezi için öncelikle 0,8 gr agaroz tartılarak üzerine 80 ml 1X TAE(Sigma, T9650) tamponu ilave edildi. Hazırlanan karışımın (%1'lik Agaroz jel), mikrodalga fırında çözünmesi sağlandı. Jel 50°C'ye kadar soğutuldu, 4 µg/ml etidyum bromür çeker ocak

içerisinde eklendi ve içerisine tarak yerleştirilmiş olan elektroforez jel küvetine döküldü. Jelin katılaşması için 30-35 dk beklendikten sonra, donan jelden tarak dikkatlice çıkarıldı. Daha sonra jel, içerisinde 1X TAE tamponu bulunan elektroforez tankına yerleştirildi. Jeldeki ilk kuyucuğa, 10 kb'lık DNA markırdan [100-200-300-400-500-600-700-800-900-1000-1200-1500-2000-3000-4000-5000-6000-8000-10000] (New England Bio Labs, N0550S) 4 µl ve diğer kuyucuklara ise her bir örnek için 1 µl 6X yükleme tamponu + 5 µl PCR ürünü yüklendi. Elektroforez jel düzeneği 110 volta ayarlandı ve örnekler 100 dk süre boyunca yürütüldü. Süre sonunda jel, elektroforez tankından çıkarıldı ve jel dökümantasyon sistemi (Quantum Vilber Lournat Gel Documentation System) kullanılarak, görüntülendi (Albayrak 2018).

**Klonlama**

**Kompotent hücrenin hazırlanması**

- Stok kültürden *Escherichia coli* JM101 suşu, üç faz ekim yöntemiyle canlandırıldı.
- Gelişen bu kültürden tek bir koloni alınmak suretiyle, içerisinde LB besiyeri bulunan erlen içerisine inoküle edildi. 37°C'de 1 gece çalkalamalı inkübatöre bırakıldı.
- Bu kültürden 300 µl alınarak, 2700 µl steril saf su ile seyreltildi ve 600 nm dalga boyuna ayarlı spektrofotometrede ölçüm yapıldı. 30 (hazırlanacak ml cinsinden miktar) X 0.1 (sabit değer) / Çıkan değer X 10 (seyreltme oranı) formülünden elde edilen sonuç bize kültürden alınması gereken miktarı verir.
- 30 ml LB broth üzerine bu kültürden eklenerek, 37°C'de 0,044-0,055 değerlerine ulaşılıncaya kadar inkübe edildi.
- İstenilen değere ulaşılınca kültür çalkalamalı inkübatörden alınarak, 4400 rpm'de santrifüjlendi. Daha sonra süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı, çökeleğin üzerine buzdolabında bekletilen soğuk 100 mM $CaCl_2$'den 10 ml ilave edildi ve 30-45 dakika buzda bekletildi.
- Süre sonunda 4400 rpm'e ayarlı santrifüjde (4°C) 10 dk süreyle çöktürme işlemine tabi tutuldu ve süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı. Daha sonra çökelek üzerine soğuk 100 mM $CaCl_2$'den 2 ml eklendi ve bir gece süreyle buzdolabında bekletildi (Arslan 2017).

**Ligasyon işlemi**

Ligasyon işlemi için kullanılan kimyasallar:

- 5 µl, 2X Ligasyon buffer,
- 3 µl, PCR ürünü
- 1 µl T4 DNA ligaz

- 1 µl vektör

0,2 ml'lik tüplerde bir araya getiridi ve karışım 16°C'de 13-15 saat süre ile inkübe edildikten sonra, +4°C'de muhafaza edildi (Baltacı 2020).

**Transformasyon işlemi**

- ✓ Her bir ependorf tüpüne buzdolabında bekletilen kompotent hücreden 200 µl eklendikten sonra, üzerine 2,5 µl ligasyon ürünü ilave edildi ve 30 dk süre ile buz üzerinde bekletildi.
- ✓ Süre sonunda karışımın ısı şokuna maruz kalabilmesi için; buzda bekletilen tüpler alınarak 42°C'ye ayarlanmış su banyosunda 2 dk süreyle bekletildi.
- ✓ Her bir tüpdeki solüsyonun üzerine, 200 µl LB eklenildi ve 37°C'de 100 dk bekletildi.
- ✓ Daha sonra buzdolabında saklanan 40 µl X-Gal ve 40 µl IPTG çıkarılarak, oda ısısına gelmesi sağlandı. Ardından her ikisi de amfisilinli katı besiyerine yayıldı.
- ✓ Petrilerin yüzeyi kuruduktan sonra, Ligasyon ürünü+Kompotent hücre solüsyonundan 150 µl alındı ve petrilerin tam ortasına konuldu. Oluşan karışım drigalski özesi ile iyice yayıldıktan sonra, petriler 37°C'de yaklaşık 14 saat süre ile inkübasyona bırakıldı.
- ✓ Süre sonunda petriler inkübatörden çıkarıldı, +4°C'de bir gece bekletildi.
- ✓ Petrilerde oluşan mavi ve beyaz kolonilerden, beyaz olanlar seçildi ve koloni PCR prosesine geçildi (Doğan 2021).

**Koloni PCR**

Koloni PCR reaksiyonu aşağıdaki bileşenlerin karışımından oluşmaktadır;

- ✓ 16,1 µl $dH_2O$
- ✓ 3 µl tampon ($MgCl_2$'süz)
- ✓ 0,6 µl dNTP mix
- ✓ 1,8 µl $MgCl_2$ (25mM)
- ✓ 2'şer µl 5 µM primer [T7 (5'-AATACGACTCACTATAG–3') ve SP6 (5'–ATTTAGGTGACACTATAG–3')]
- ✓ 0,3 µl Taq DNA polimeraz
- ✓ 1,2 µl DMSO
- ✓ Koloni (Doğan 2021).

**PCR programı ve Plazmit İzolasyonu**

Örnekler PCR cihazına konuldu ve PCR programı için cihaz şu şekilde programlandı;

**Tablo 8.** PCR Programı

| İŞLEM | SICAKLIK (°C) | SÜRE (dk,sn) | DÖNGÜ SAYISI |
|---|---|---|---|
| Ön Denatürasyon | 94 | 30 sn | 1 |
| Denatürasyon | 94 | 30 sn | 36 |
| Bağlanma | 55 | 30 sn | 36 |
| Uzama | 72 | 2 dk | 36 |
| Son Uzama | 72 | 10 dk | 1 |

EtBr içeren %1'lik agaroz jel'e markır ve pozitif örnekler (içerisinde istenen geni içeren) yüklendikten sonra, 110 voltta 1 saat süre ile yürütüldü. İstenen geni taşıyan koloniler, PCR görüntülerine göre seçildikten sonra, plazmit izolasyonu için 4ml amfisilinli LB broth içeren besiyerine inoküle edildi ve 24 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. İnkübatörden çıkarılan kültürler, 10.000–12.000 rpm'de 10 dk santrifüjlendikten sonra, süpernatant kısımları uzaklaştırıldı. Plazmitler, Promega firmasına ait "A1330 plazmit izolasyon kit" protoküle göre saflaştırıldı.

**Plazmitlerin Kontrol Edilmesi ve Konsantrasyonlarının Tespiti**

Koloni PCR ile bu basamak kısmen aşılmış olsada, istenilen bölgenin klonlanıp klonlanmadığını kontrol etmek amacıyla, örnekler EcoRI enzimiyle kesildi. Pozitif çıkan plazmitlerin konsantrasyonları (100-200 ng), Baltacı (2020) tarafından belirtilen yönteme göre ayarlandı ve sekans analizi için Macrogen (Hollanda) firmasına gönderildi (Baltacı 2020).

**DNA dizi analizi**

Macrogen firmasının gönderdiği sekans sonuçları, BioEdit programı ile analiz edilerek, anlamlı hale getirildi.

**Sonuçların Değerlendirilmesi**

Elde edilen sekans sonuçları, Genbank (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) ve Eztaxonda kayıtedilen (http://www.ezbiocloud.net/eztaxon/identify) veriler ile karşılaştırılarak, % benzerlik oranları belirlendi. Daha sonra örneklerin Genbank numaraları NCBI'dan alındı.

**En iyi izolat ile fibrinolitik enzim üretiminin optimizasyonu**

V4 izolatı için Triptic Soy Broth (TSB) besiyerinde ön kültür hazırlandı. OD'si ölçüldü ve optimizasyon çalışmaları için hazırlanan fibrin besiyerine inoküle edildi.

Bu aşamadaki deneyler için hazırlanan fibrin besiyerinin içeriği ve hazırlanışı aşağıda belirtildiği gibidir;

**Fibrin Besiyeri (Sıvı)**

- 20 gr/l Glikoz,
- 5 gr/l Fibrin
- 3,27 gr/L Bushnell Haas Broth tartılıp, 1000 ml $dH_2O$'da erlen içerisinde çözüldü ve 121°C 15 dakika otoklavlandı.

V4 izolatı inoküle edeilen besiyerleri çalkalamalı inkübatörde, 37°C'de 48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı.

Fibrinolitik enzim üretimini artırmak için besiyerinde; Skim Milk Powder'ın farklı konsantrasyonları (5-10-15-20-25 g/l), pH aralıkları (4-5-6-7-8-9), sıcaklıkları (20-25-30-35-40°C) ve inkübasyon süreleri ( 24-48-72-96 saat) test edildi.

**Skim Milk Powder optimizasyonu**

Fibrin besiyeri hazırlanıldıktan sonra, 121°C 15 dakika otoklavlandı. SMP sırası ile 5-10-15-20-25 gr/l tartılarak, steril kabin içerisinde besiyerlerine eklendi. Fibrinolitik enzim aktiviteleri için ölçümler 275 nm dalga boyunda gerçekleştirildi.

**pH optimizasyonu**

pH optimizasyonu için sırasıyla; pH 4-5-6-7-8-9 olacak şekilde ayarlandı. Besiyeri 121°C 15 dakika otoklavlandı, ardından SMP 15 gr/l olacak şekilde tartılarak, steril kabin içerisinde eklendi ve V4 bakterisinin gelişebildiği maksimum pH değeri belirlendi.

**Sıcaklık optimizasyonu**

Belirlenen optimum pH ve SMP konsantrasyonlarında hazırlanan fibrin besiyerine bakteri inokülasyonu gerçekleştirildikten sonra, sıcaklık sırasıyla; 15-20-25-30-35-40-45-50°C'de olacak şekilde 24-48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. İzole edilen suşun maksimum enzim üretimi için gerekli sıcak değeri tespit edildi.

**İnkübasyon süresi optimizasyonu**

Belirlenen optimal pH, SMP konsantrasyonunda ve sıcaklık değerinde hazırlanan fibrin besiyerine bakteri inoküle edildikten sonra, 12, 24, 36, 48, 72 ve 96.'ıncı saatlerde aktvitelerine bakılarak, en uygun inkübasyon süresi belirlendi (Anusree *et al*. 2020; Sharma *et al.* 2020).

## Enzim Saflaştırılması ve Karakterizasyon Çalışmaları

### Fibrinolitik enziminin saflaştırılması

#### *Amonyum sülfat çöktürmesi ve Diyaliz*

Homojenat kısmı kullanılarak, %0-20, %20-40, %40-60, %60-80, %80-90 aralıklarında ayrı ayrı amonyum sülfat çöktürme işlemi gerçekleştirildi. Amonyum sülfat çöktürmesinin her aralığında, elde edilen çökeltide ve süpernatantta aktivite ölçümü yapılarak, enzim aktivitesinin en yüksek olduğu değer kaydedildi. Enzim aktivitesinin süpernatant kısmında en fazla olduğu aralık, enzimin amonyum sülfat doygunluk aralığı olarak belirlendi. Yapılan çöktürme işlemleri, belirlenen bu aralığa göre yapıldı. Yapılan tüm işlemler +4°C'de buzun üzerinde gerçekleştirildi. Her defasında homojenatlar 6000 rpm'de 15 dakika santrifüjlendi. Santrifüj işleminden sonra, süpernatantlar ayrı beherlere alındı ve çökeltiler çözülebilecek kadar Tris-HCl (pH: 7,4) tampon içerisinde çözüldü. Daha sonra hem süpernatantta hem de çökeltide ayrı ayrı enzim aktivitesine bakıldı.

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen karışım diyaliz torbasına yerleştirildi ve 50 mM Tris-HCl (pH: 7,4) tamponunda 2-3 saat süreyle +4°C'de ve buz içerisinde magnetik karıştırıcı üzerinde, düşük hızda diyaliz edildi. protein ve aktivite tayini gerçekleştirildi.

Amonyum sülfat çöktürmesinde kullanılan amonyum sülfat tuzunun miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Dubey *et al.* 2011; Özkan 2020).

$$g\ (NH_4)_2SO_4 = 1{,}77 \times V \times (S_2 - S_1) / 3{,}54 - S_2$$

- V: Enzim çözeltisinin hacmi
- S1: 1'in Kesri olarak çözeltideki amonyum sülfat doygunluğu
- S2: 1'in Kesri olarak hedeflenen amonyum sülfat doygunluğu

### Q-Sefaroz iyon değişim kromatografisi

Çalışmada kullanılan anyon değişim kromatografisi kolon dolgu materyali (Q-Sefaroz) hazır olarak satın alındı. Kolon dolgu materyali öncelikle $dH_2O$ ile daha sonra da Tris-HCl tamponu (pH: 7,4, 50 mM) ile yıkandı. İçerisinde dengeleme tamponu (pH: 7,4, 50 mM Tris-HCl) olan kolona döküldükten sonra, yerçekimine karşı jelin yatak hacmi sabit oluncaya kadar kolon paketlendi. Daha sonra akış hızı 3 ml/saat olacak şekilde, peristaltik pompa yardımıyla kolonun dengelenme tamponu ile dengelenmesi sağlandı. Dengelenen ve Tris-HCl tamponunun (pH: 7,4, 50 mM) uzaklaştırıldığı kolona diyaliz sonunda elde edilen enzim yüklendi. Yıkama işlemi (pH: 7,4, 50 mM Tris-HCl) tamamlandıktan sonra elüsyon işlemi için farklı tuz gradientlerinde (50-100-150-200-300-400-500-600-800-1000 mM NaCl) hazırlanmış pH'sı 7,4

/ 50 mM Tris-HCl tamponu kullanılarak, kolon akış hızı 12 ml/saate ayarlandı ve elüatlar 3 ml'lik tüplerin içerisine toplandı. Her bir elüat için 280 nm'de absorbans ölçümü yapıldı. Bir sonraki aşamada, absorbans gösteren tüm tüpler için fibrinolitik enzim aktivite tayini yapıldı (Sasmita *et al.* 2018; Özkan 2020).

**Sefadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi**

Kolon materyali olarak kullanılan Sefadex G-100 jelinden 3 g tartılıp, 200 ml $dH_2O$'da çözüldü ve oda sıcaklığında 1 gece bekletildi. Jelin vakum ile havası alındıktan sonra, Tris-HCl tamponu (pH: 7,4, 50 mM) ile dolu olan kolona paketlendi. Kolonu dengelmek için, Tris-HCl tamponu (pH: 7,4, 50 mM) kullanıldı. Q-Sefaroz iyon değişim kolon kromatografisi (%10'luk gliserol çözeltisi ile hazırlanan) sonucunda elde edilen ve aktivite veren örnekler birleştirilerek dengelenen kolona uygulandı. Toplanan elüatlarda sırasıyla; 280 nm'de kalitatif protein tayini, fibrinolitik enzim aktivite ve kantitatif protein tayini yapıldı. Spesifik aktivite hesaplanarak, saflaştırma oranı belirlendi (Nascimento *et al.* 2017; Özkan 2020).

**SDS PAGE ile enzimin saflığının ve molekül kütlesinin belirlenmesi**

İşleme başlamadan önce elektroforez plakaları, su ve alkolden geçirilerek sterilize edildi. İki cam plaka üst üste getirilerek, kıskaçlarla tutturuldu. Sabitlenen plakalar, jel hazırlama kabininin içerisine yerleştirildi. İlk olarak ayırma jeli hazırlandı ve 5 ml'lik mikropipet yardımıyla plakların arasına dolduruldu. Hava kabarcıklarının oluşumunun önlenmesi için izo-propanol, plakalardan taşıncaya kadar döküldü. Ayırma jelinin katılaştığından emin olduktan sonra, jelin üst kısmında bulunan izo-propanol uzaklaştırıldı. Ardından yığma jeli hazırlandı. Hazırlanan yığma jeli, ayırma jelinin üst kısmına yavaş yavaş mikropipetle döküldü ve ve numune kuyucuklarının oluşması için öncesinde izo-propanol içerisinde bekletilen tarak dikkatli bir şekilde takıldı. Jel katılaştıktan sonra plakalarla birlikte elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının belirli bir kısmı yürütme tamponu ile dolduruldu. Tarak dikkatli bir şekilde çıkarılarak numune kuyuları belirlendi. Enzim örnekleri ve numune tamponu, 1:1 oranında 10 µl olacak şekilde hazırlandı. Enzim örneğinden 10 µl ve numune tamponundan 10 µl olacak şekilde ependorfta karıştırıldı. Numunelerin takip edilmesi ve kolay yüklenebilmesi, numune tamponunda bulunan brom-timol mavisi sayesinde gerçekleştirildi. Sonra numuneler 5 dk kaynar suda bekletildi. İlk adımda 2 µl markır ilk kuyucuğa, ardından diğer kuyucuklara 18 µl numuneler yüklendi. Elektroforez tankı kapatıldı. Önce 60 voltta 30 dk yürütme yapıldı. Akrilamid yoğunluğu düşük olduğu için örnekler 30 dk süresince ayırma jeline kadar gelip yığılma gösterdi. Sonra akım şiddeti 120 volta çıkarılarak 1 saatlik süre boyunca ve numuneler jelin alt kısmına gelinceye kadar yürütüldü. Yürütme

işleminin tamamlanmasının ardından güç kaynağına akım gelmesi durduruldu ve plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı. Daha sonra gümüş boyama yapılarak bantlar belirginleşince jelin en uygun görüntüsünün fotoğrafı çekildi (Matsumoto *et al.* 2019).

**Örneklerin gümüş boyama metodu ile boyanması**

Örnekler jel elektroforezi ile yürütülüp, plakalar yürütme kabından çıkarıldı ve jel düz bir boyama kabı içerisine alındıktan sonra, hazırlanan tespit çözeltisiyle 30 dk boyunca ışık almayan ortamda çalkalandı. 30 dk'lık sürenin sonunda, tespit çözeltisi döküldü ve jel distile su ile yıkandı. Yıkama işleminin hemen ardından, jel redüksiyon çözeltisi ile kap içerisinde muamele edildi ve 30 dk karanlık ortamda çalkalamaya bırakıldı. Redüksiyon çözeltisi, kaptan uzaklaştırıldı ve yıkama işlemine geçildi. Bu işlem $dH_2O$ kullanılarak, 3 kez 5'er dakika olacak şekilde tekrarlandı. Bu süre zarfında hazırlanan boyama çözeltisi ise, yıkama işlemi bittikten sonra kaba eklendi ve 20 dk yine karanlık ortamda çalkalamaya bırakıldı. Boyama çözeltisi jel ve kaptan uzaklaştırıldıktan sonra, jel bantlar belirginleşinceye kadar yıkama 1 çözeltisi ile çalkalandı. Jelde bantlar görünmeye başladığı andan itibaren en iyi görüntü yakalanarak, yıkama 1 çözeltisi uzaklaştırıldı ve gümüş boyama işlemi sonlandırıldı (Alçiçek 2017).

**Enzim Karakterizasyonu**

Bu aşamada yapılan deneyler V4 suşunun aşağıda verilen besiyerine inkübasyonunun ardından amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz, Q-Sefaroz iyon değişim kromatografisi ve Sefadex G-100 jel filitrasyon kromatografisi ile saflaştırılması sonucu elde edilen enzimin kullanılmasıyla gerçekleşmiştir.

**Fibrin Besiyeri (Sıvı)**

- 20 gr/l Glikoz,
- 5 gr/l Fibrin
- 3,27 gr/L Bushnell Haas Broth tartılıp, 1000 ml $dH_2O$'da erlen içerisinde çözüldü ve 121°C 15 dakika otoklavlandı.

**Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerindeki etkisi**

Fibrinolitik enzimin optimum sıcaklığının belirlemesi için 50 mM Tris-HCl (pH:7,4) tamponunun içerisine 0,5 µl saf enzim eklendi. Hazırlanan çözelti 15-20-25-30-35-40-45-50°C sıcaklık aralıklarında, 30 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda, enzim aktivitesi tayin edildi. Enzimin optimum sıcaklığını belirlemek için çizilen grafikte en yüksek aktivitenin tespit edildiği sıcaklık değeri, 100 olarak kabul edildi ve diğer sonuçlar bağıl aktivite (%) cinsinden birbiriyle karşılaştırıldı.

Enzimin sıcaklık kararlılığının belirlenmesi için enzim aktivitemizin yüksek olduğu; 25-30-35-40-45°C'de her bir sıcaklık için; 10, 30, 60, 90, 120 ve 150 dk'lık inkübasyon süresinin sonunda fibrinolitik enzim aktivite tayini yapıldı. Enzim sıcaklık kararlılığını gösteren grafik için, farklı sıcaklık değerlerinde inkübasyondan önceki aktivite değeri 100 olarak alındı ve en yüksek aktivitenin tespit edildiği süre değeri ise 100 olarak kabul edildi. İnkübasyon süresi sonrasında elde edilen değerler, kalan aktivite yüzdesi (%) olarak ifade edildi (Souza *et al.* 2020).

**pH'ın enzim aktivitesi üzerindeki etkisi**

Fibrinolitik enzimin optimum pH değerinin belirlemesi için, 50 mM Tris-HCl (pH:7,4) tamponunun içerisine 0,5 µl saf enzim eklendi. Hazırlanan çözeltiden 500 µl alınıp, pH değerleri 4-10 arasında değişen 50 mM Tris-HCl (pH:7,4) tamponu içerisine eklendi. Oluşan çözeltiler 35°C'de 15 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda, enzim aktivitesi tayin edildi. Enzimin pH değerlerine göre oluşturulan grafikte en yüksek aktivitenin gözlendiği pH değeri 100 olarak kabul edildi ve diğer sonuçlar, ona göre bağıl aktivite (%) cinsinden birbiriyle karşılaştırıldı (Sharma *et al.* 2020).

**Metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerindeki etkisi**

İzolatımızın ürettiği fibrinolitik enzim karakterizasyonunda, diğer bir adım metal iyon varlığında enzim aktivitesinin tayinidir. Bunun için; $Fe^{+2}$, $Zn^{+2}$, $Mg^{+2}$, $Cu^{+2}$, $Ca^{+2}$, Na ve K metalleri kullanıldı. 50 mM Tris-HCl (pH:7,4) tamponunda 2,5-5,0 ve 10,0 mM metal iyonlarını içeren solüsyona 0,5 µl saf enzim eklenip, 30 dk süre ile inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, kaydedilen fibrinolitik aktivite değerleri incelendi. Metal iyonları içermeyen enzim çözeltisinin aktivite miktarı 100 olarak kabul edildi. Elde edilen verilere ait grafikler Şekil 28.'da gösterilmiştir.

**Proteaz inhibitörlerinin enzim aktivitesi üzerindeki etkisi**

Fibrinolitik enzime proteaz inhibitörlerinin etkisini araştırmak için fenilmetansülfonil (PMSF), etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), Pepstatin A, β-merkaptoetanol ve Iodoacetic asit (IAA) inhibitörleri kullanıldı. 50 mM Tris-HCl (pH:7,4) tamponu içerisine 2,5 ve 5 mM konsantrasyonunda hazırlanan inhibitörler eklendi ve 35°C'de 30 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı. Sürenin sonunda inhibitör içermeyen enzim çözeltisinin aktivite miktarı 100 olarak kabul edildi (Mahajan *et al.* 2012).

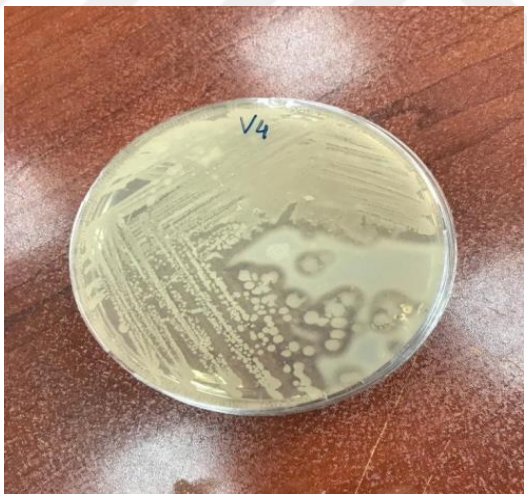
# ARAŞTIRMA BULGULARI

## Örneklerin Toplanması

Tez çalışması için ülkemizin farklı illerinden (Ağrı, Ankara, Artvin, Erzincan, Erzurum, Kars, Samsun, Sivas, Tokat ve Trabzon) temin edilen toprak örnekleri aseptik şartlarda laboratuvara getirilip, çalışılıncaya kadar oda sıcaklığında muhafaza edildi.

## Proteaz Üreten Bakterilerin İzolasyonu

Toprak örneklerinden bir seri dilüsyon tüpü hazırlandı ve mikroorganizmaların izolasyonu için proteaz agar besiyerine ekim yapıldı. 37°C 48 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Toplam 60 adet bakteri, küf ve mantar izole edildi. Bakteriler için; V1-V40, mayalar için; V41-V49, küfler için; V50-V60 kodları verildi. Bu suşlardan proteaz aktivitesine sahip olduğu düşünülen bakteriler saflaştırılarak, stok kültürleri hazırlandı.




**Şekil 14.** V4 suşuna ait petri görüntüsü

## Proteaz ve fibrinolitik enzim aktivitesi yönünden suşların karşılaştırılması

### Proteaz aktivitesinin belirlenmesi

Stok kültürden alınan bakteriler inkübasyon süresinin sonunda her izolat için, inokülümün OD (Optical density) değeri 2,0 olacak şekilde proteaz besiyerine aşılandı ve 37°C'de 48 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda proteaz aktivite tayin prosedürü (660 nm'de) ile suşların aktiviteleri ölçüldü. Elde edilen veriler Tablo 9'da gösterildi.

**Fibrinolitik enzim aktivitesinin ölçülmesi**

Stok kültürden alınan bakteriler inkübasyon süresinin sonunda her izolat için, inokülümün OD (Optical density)'si 2,0 olacak şekilde fibrin besiyerine inoküle edildikten sonra, 37°C'de 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, bakterilerin sıvı fibrinolitik enzim aktivite tayin prosedürü (275 nm'de) ile aktiviteleri ölçüldü. Elde edilen veriler Tablo 9'da gösterildi.

**Tablo 9.** Topraktan İzole Edilen Bakterilerin Fibrinolitik ve Proteaz Aktivitelerinin Karşılaştırılması

| İzolatın Kodu | Proteaz Aktivitesi (U/ml) | Fibrinolitik Aktivite (U/ml) |
|---|---|---|
| V1 | 110,3 | 11,2 |
| V2 | 93,2 | 7,02 |
| V3 | 169,2 | 7,4 |
| V4 | 456,3 | 43,7 |
| V5 | 230,3 | 11,1 |
| V7 | 322,9 | 22,3 |
| V8 | 165 | 6,76 |
| V9 | 394,5 | 3,12 |
| V10 | 112,3 | 3,20 |
| V11 | 234 | 19,4 |
| V12 | 120 | 12,6 |
| V13 | 345 | 18,3 |
| V14 | 234 | 10,3 |
| V15 | 102 | 7,6 |
| V16 | 201 | 18 |
| V17 | 578 | 3,19 |
| V18 | 543 | 7,12 |
| V19 | 311 | 16 |
| V20 | 488 | 30,15 |
| V21 | 276 | 17,7 |
| V22 | 133 | 18,1 |
| V23 | 412 | 11 |
| V24 | 135 | 9,8 |
| V25 | 122 | 6,3 |
| V26 | 279 | 16,78 |
| V27 | 138 | 9,11 |
| V28 | 147 | 6,67 |
| V29 | 133 | 3,45 |
| V30 | 357 | 0,16 |
| V32 | 456 | 10,74 |
| V33 | 443 | 6,63 |

**Tablo 9.** Devamı

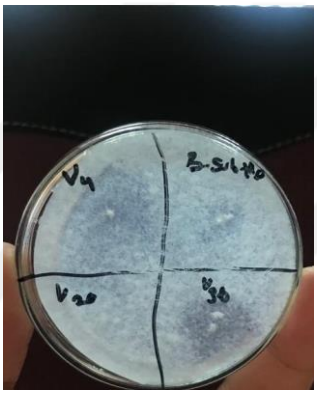
| | | |
|---|---|---|
| V34 | 323 | 20,3 |
| V35 | 432 | 28 |
| V36 | 502 | 38,2 |
| V37 | 138 | 17,5 |
| V38 | 211 | 11,3 |
| V39 | 356 | 11,6 |
| V40 | 275 | 10,81 |

**En İyi İzolatların Katı Besiyerinde Fibrinolitik Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi**

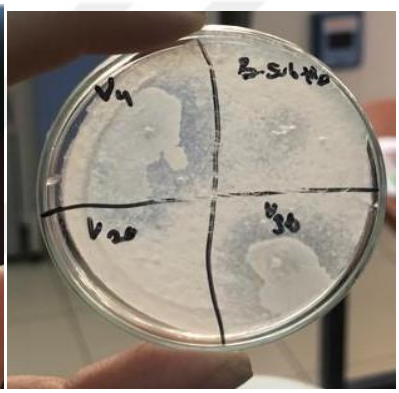
Proteaz ve fibrinolitik enzim aktivitesi yüksek olan 3 suşun petride fibrinolitik enzim aktivitesi incelendi. İnkübasyon süresinin sonunda, petride oluşan berrak bölgeler suşların fibrinolitik enzim aktivitesine sahip olduğunu gösterdi.



**Şekil 15.A**



**Şekil 15.B**



**Şekil 15.C**

**Şekil 15. A.** Fibrinolitik enzim aktivitesi için hazırlanan besiyerinin görüntüsü **B.** V4,V20,V36 ve *B. Subtilis* (pozitif kontrol) suşlarının 24 saatlik inkübasyon sonunda oluşturduğu görüntü **C.** V4,V20,V36 ve *B. Subtilis* (pozitif kontrol) suşlarının 48 saatlik inkübasyon sonunda oluşturduğu görüntü

**En iyi izolatın moleküler karakterizasyonu**

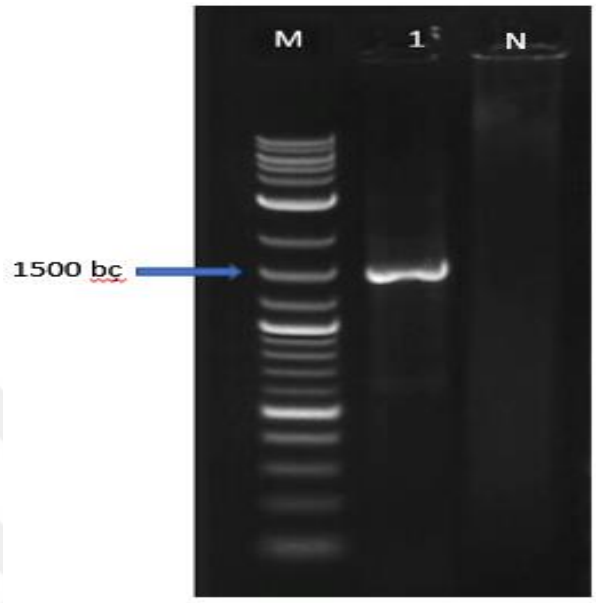
**Test Suşunun Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması**

**Genomik DNA izolasyonu**

Test izolatları TSA besiyerine inoküle edildi ve 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Her bir petriden tek koloni alınıp, TSB besiyerine aktarıldı ve ardından 48 saat süre ile çalkalamalı inkübatöre bırakıldı. Süre sonunda bakterilere ait genomik DNA, Promega Wizard$^{R}$ genomic DNA purification kit (A2360) protokolüne göre izole edildi.

**16S rRNA PCR**

Bakteride bulunan 16S rRNA gen bölgesi, 27F ve 1492R primerleri kullanılarak amplifiye edildi. Daha sonra PCR örneği, %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve 1500 bç'de tek bant elde edildi.



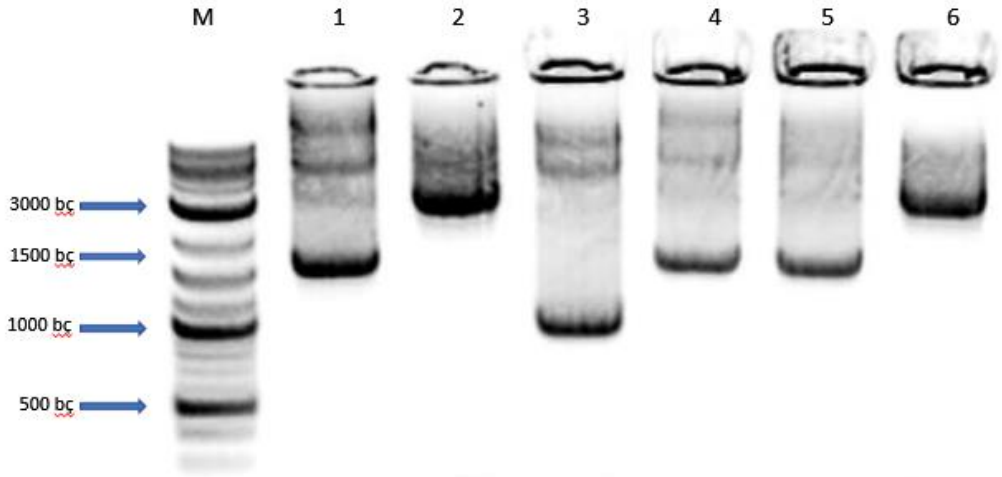

**Şekil 16.** *Bacillus atrophaeus* (V4)'un16S rRNA jel görüntüsü

**Klonlama**

16S rRNA gen bölgesi amplifiye edildikten sonra, uygun vektör sistemi kullanılarak klonlama aşamasına geçildi. Bu amaçla ilk önce ligasyon ve daha sonra transformasyon işlemi gerçekleştirildi. Rekombinant ürünleri ihtiva *E. coli* izolatları; amfisilin, X-gal ve IPTG içeren petrilere yayılarak, inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda petriler inkübatörden çıkarıldı ve mavi-beyaz koloni oluşturma açısından tarama işlemine tabi tutuldu.

**Koloni PCR**

Transformasyon işlemi sonucunda beyaz renkli koloniler petriden alınarak, koloni PCR işlemine geçildi. Elde edilen ürünler %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve 1500 bç'de bant veren koloni pozitif örnek olarak kabul edilerek işleme onunla devam edildi. Elde edilen koloni PCR görüntüsü Şekil 17'de gösterildi.




**Şekil 17.** Koloni PCR görüntüsü: [M;Markır (BioLabs N0550S), 1,4 ve 6. Pozitif olarak alınan örnekler]

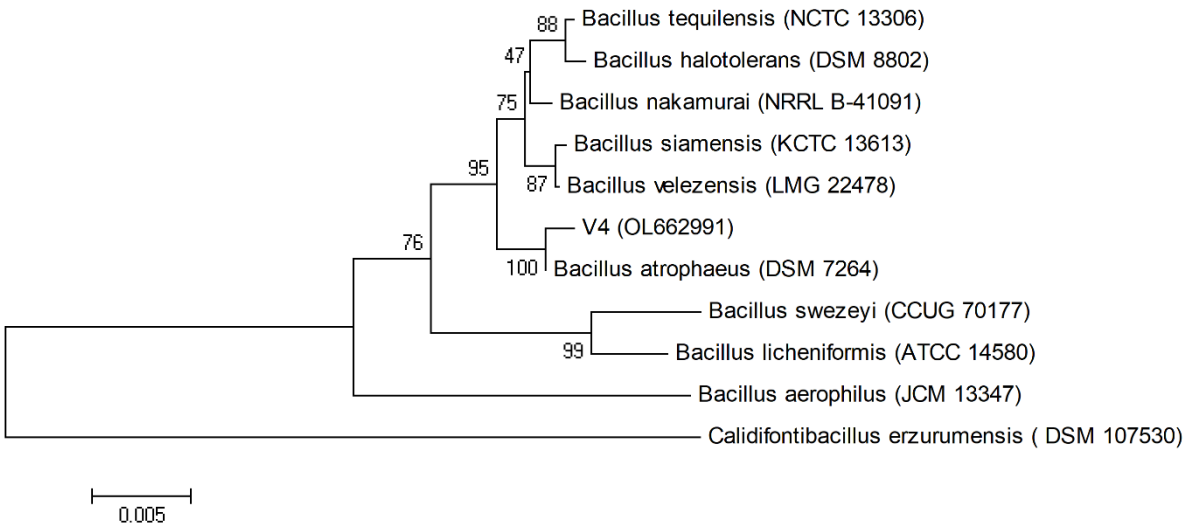
**Plazmit izolasyonu**

Agaroz jelde, 1500 bç'de bant veren koloni PCR ürünü kullanılarak, plazmit izolasyon aşamasına geçildi. Bunun için ilgili koloni petriden alındı ve amfisilinli LB Broth'a aktarılarak, 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonunun ardından Promega firmasına ait izolasyon kiti (A1330) kullanılarak, plazmitler izole edildi. Daha sonra plazmitlerin istenen gen bölgesini taşıyıp taşımadığı, *EcoRI* kesim enzimi kullanılarak incelendi. Pozitif sonuç veren ve en uygun konsantrasyona sahip olan örnekler, Macrogen (Hollanda) firmasına sekans analizi için gönderildi.

**DNA dizi analizi**

Sekans analizleri için Macrogen (Hollanda) firmasından gelen, 16S rRNA sekans verileri anlamlı hale getirildikten sonra, Eztaxon'daki diziler ile kıyaslandı. Elde edilen veriler sonucunda, V4 suşunun %99 oranında *Bacillus atrophaeus* türüne benzediği tespit edildi ve OL662991 kodu ile Gen Bankasına kaydı gerçekleştirildi.

Daha sonra test suşunun diğer yakın akraba bakteriyel türlerle olan taksonomik ilişkisini ortaya koyamak için, NJ (Neighbor-joining; Komşu Katılımı-Bağlama) yöntemi ile filogenetik ağaç çizildi.




**Şekil 18.** NJ yöntemi ile filogenetik ağaç çizimi

## En İyi İzolat İle Fibrinolitik Enzim Üretiminin Optimizasyonu

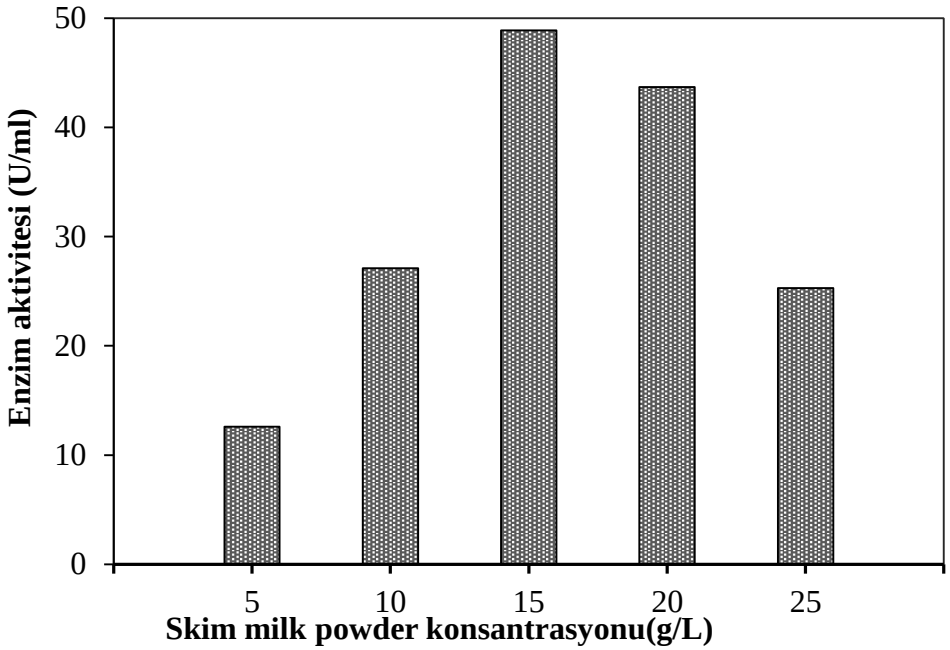
### Skim milk powder (SMP) optimizasyonu

SMP'ın enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendiği zaman; 15-20 gr/l SMP eklendiğinde aktivitenin arttığı, 20 gr/l'den fazla ilave edildiğinde ise azaldığı tespit edildi. Elde edilen veriler Tablo 10'da ve Şekil 19'da gösterildi.

En iyi kantitafif sonuç SMP oranı; 15 gr/l olan ortamdan elde edildiği için, sonraki optimizasyon çalışmalarında hazırlanan besiyeri içeriğinde SMP, 15 gr/l olarak kullanıldı.

**Tablo 10.** En İyi İzolat İle SMP Optimizasyonu İçin Yapılan Aktivite Ölçümleri

| Parametreler | Fibrinolitik (U/ml) |
|---|---|
| **SMP 5 gr** | 12,6 |
| **SMP 10 gr** | 27,1 |
| **SMP 15 gr** | 48,9 |
| **SMP 20 gr** | 43,7 |
| **SMP 25 gr** | 25,3 |




**Şekil 19.** Farklı SMP konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisi

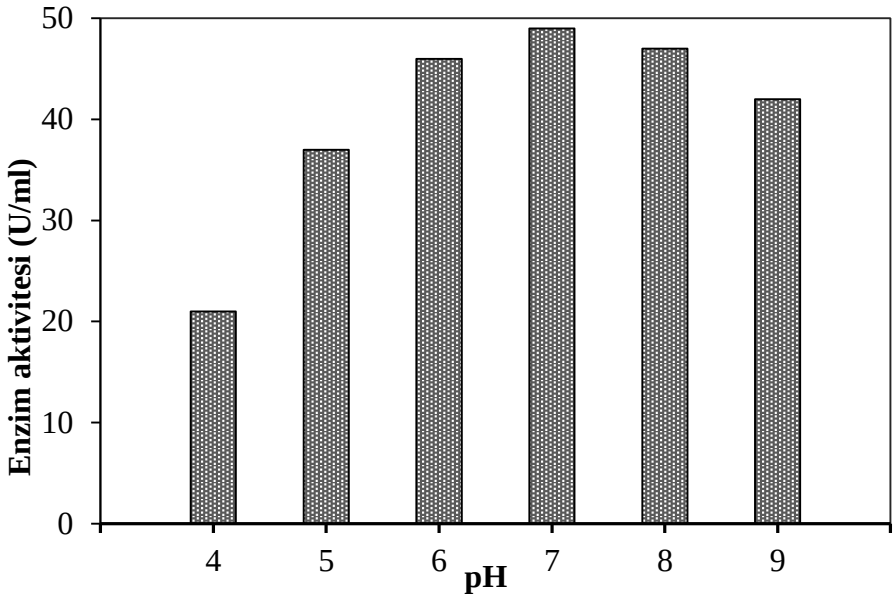
**pH optimizasyonu**

pH'nın enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendiği zaman; pH 5-6 arasında aktivitenin arttığı, maksimum fibrinolitik enzim aktivitesine pH 7'de ulaşıldığı ve pH 8-9 arasında aktivitede azalma meydana geldiği gözlemlendi. Ancak pH 6-9 arasında, bakterinin fibrinolitik enzim aktivitesinde ve hücre büyüme performansında önemli bir değişim gözlenmediği için, bakterinin geniş bir pH aralığında üreyebildiği belirlendi. Elde edilen veriler Tablo 11'de ve Şekil 20'de gösterildi.

En iyi kantitafif sonuç pH 7'de elde edildiği için, sonraki optimizasyon çalışmalarında hazırlanan besiyeri içeriğinde, ortamın pH değeri 7 olarak ayarlandı.

**Tablo 11.** En İyi İzolat İle pH Optimizasyonu İçin Yapılan Aktivite Ölçümleri (Besiyerinin SMP oranı 15g/l olarak ayarlandı)

| **Parametreler** | **Fibrinolitik (U/ml)** |
|---|---|
| **pH 4** | 21 |
| **pH 5** | 37,4 |
| **pH6** | 46 |
| **pH 7** | 48,9 |
| **pH 8** | 46,5 |
| **pH 9** | 41,7 |




**Şekil 20.** Farklı pH konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisi

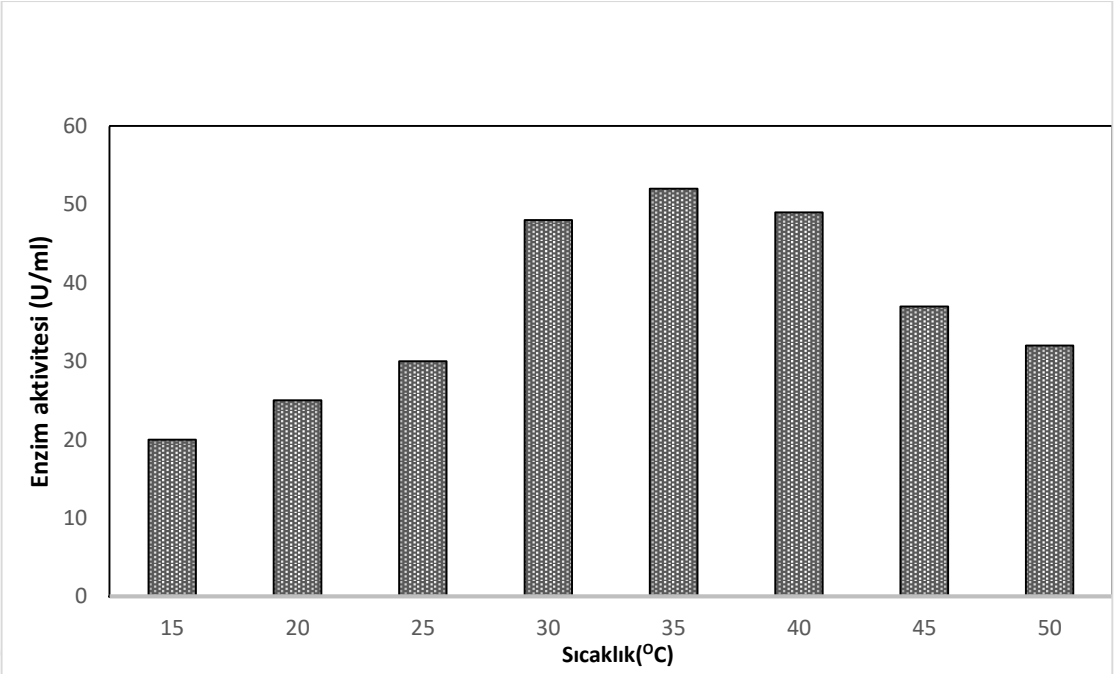
**Sıcaklık optimizasyonu**

Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendiği zaman aktivitenin; 25-30-35°C'de arttığı, 35°C'de maksimum'a ulaştığı ve 40°C'nin üzerinde ise azaldığı tespit edildi. Elde edilen veriler Tablo 12.'de ve Şekil 21.'de gösterildi.

En iyi kantitafif sonuç 35°C'de elde edildiği için, sonraki optimizasyon çalışmalarında ortam sıcaklığı 35°C'ye ayarlandı.

**Tablo 12.** En İyi İzolat İle Sıcaklık Optimizasyon Çalışmaları (Besiyerinin SMP oranı 15g/l, pH:7 olarak ayarlandı)

| **Sıcaklık (°C)** | **Fibrinolitik (U/ml)** |
|---|---|
| **15** | 20,3 |
| **20** | 24,5 |
| **25** | 30 |
| **30** | 47,9 |
| **35** | 51,8 |
| **40** | 49 |
| **45** | 36,8 |
| **50** | 32,3 |



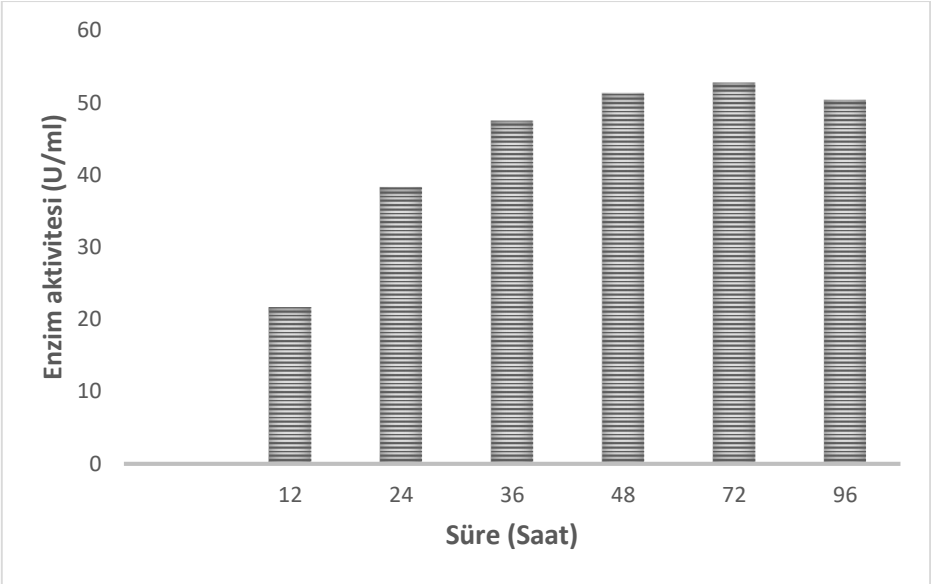

**Şekil 21.** Farklı sıcaklık değerlerinin enzim aktivitesine etkisi

### İnkübasyon süresi optimizasyonu

İnkübasyon süresi optimizasyonu için, fibrinolitik enzim aktivitesi incelendiğinde, 72. saate kadar aktivitenin inkübasyon süresine paralel olarak arttığı, en yüksek aktivitenin 72. saatte meydana geldiği ve 96. Saatte ise aktivite de azalma olduğu tespit edildi. Elde edilen veriler Tablo 13'de ve Şekil 22'de gösterildi.

**Tablo 13.** En İyi İzolat İle İnkübasyon Süresinin Optimizasyonu (Besiyerinin SMP oranı 15g/l, pH:7, sıcaklığı 35°C olarak ayarlandı.)

| Saat | Fibrinolitik (U/ml) |
|---|---|
| **12** | 21,7 |
| **24** | 38,3 |
| **36** | 47,5 |
| **48** | 51,3 |
| **72** | 51,8 |
| **96** | 50,4 |




**Şekil 22.** Farklı inkübasyon sürelerinin enzim aktivitesine etkisi

**Enzimin Saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışmaları**

**Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz**

*Bacillus atrophaeus* (V4) bakterisi, optimizasyon koşullarına uygun olarak hazırlanan fibrin besiyerinde 48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda elde edilen kültür 6000 rpm, 15 dk santrifüj edildi ve süpernatat kısmı alındı. Homojenat kısmına; %0-20, %20-40, %40-60, %60-80, %80-90 aralıklarında amonyum sülfat ilave edildi. Uygun amonyum sülfat oranı'nın %60-80 aralığında olduğu belirlendi. Çökelti uygun tamponda (Tris-HCl pH. 7,4) çözüldükten sonra, çökelti ve süpernatat kısmında aktiviteye bakıldı. Yüksek aktivite çökelti kısmında tespit edildi ve bu kısım diyaliz torbasına alındı. Daha sonra, içerisinde enzim tamponu bulunan buz içerisindeki behere torba daldırıldı ve tuz uzaklaşıncaya kadar diyaliz işlemine devam edildi.

**Q-Sefaroz iyon değişim kromatografisi**

Diyaliz basamağının ardından elde edilen enzim, Q-Sepharose anyon değişim kolonu üzerinde kromotografi işlemine tabi tutuldu. Örnek, 50 mM'lık Tris-HCl (pH: 7,4) tamponu ile dengelenmiş Q-Sefaroz kolonuna yüklendi ve kolonun akış hızı ayarlandı. Elüatlar 3 ml'lik tüplerin içerisine alındı ve her bir elüat için 280 nm'de absorbans ölçümü yapıldı.

**Sefadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi**

İyon değişim kolonu sonunda elde edilen elüatlar arasında en yüksek aktiviteyi gösterenler, 50 mM'lık Tris-HCl (pH: 7,4) tamponu yardımıyla dengelenmiş olan Sefadex G-100 jel filtrasyon kolonuna yüklendi ve kolonun akış hızı ayarlandı. Kolondan elde edilen elüatlar tüplere alındı. Her bir elüat için 280 nm'de absorbans ölçümü yapıldı.

**Tablo 14.** Proteaz Besiyerinden Fibrinolitik Enzimin Saflaştırma Basamakları

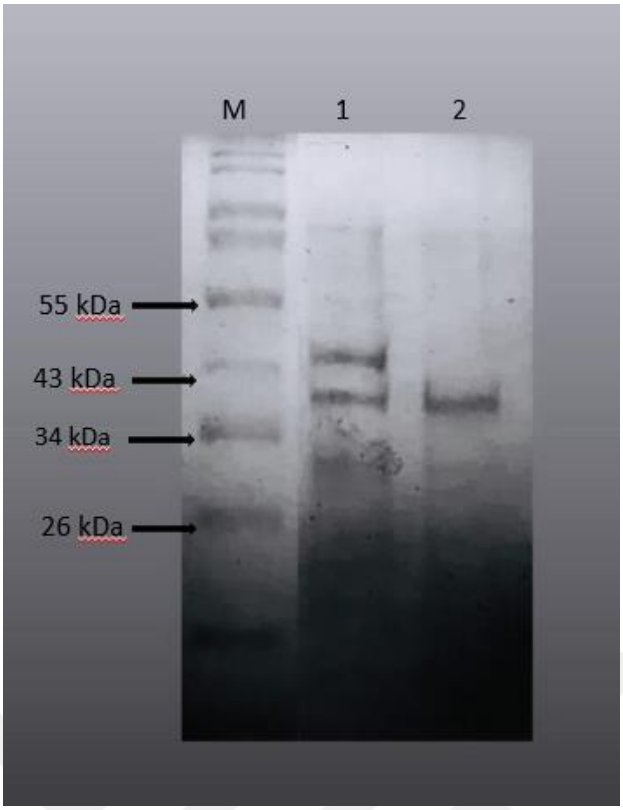
| **Method** | **Volume (ml)** | **Toplam Aktivite (U/100 ml)** | **Enzim aktivite (U/ml)** | **Toplam Protein (mg)** | **Spesifik Aktivite (U/mg)** | **Purification fold** | **Recovery (%)** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Enzim (Süpernatant) | 100 | 5280 | 52,8 | 54,36 | 97,13 | 1 | 100 |
| Amonyum Sülfat | 60 | 3780 | 63 | 19,1 | 197,9 | 2,03 | 71,59 |
| İyon Değişim Kromotografisi | 25 | 3660 | 146,4 | 1,55 | 2361,2 | 24,3 | 69,31 |
| Jel Filtrasyon Kromotagrafisi | 10 | 1859 | 185,9 | 0,26 | 7150 | 73,61 | 35,20 |

**Tablo 15.** Fibrin Besiyerinden Fibrinolitik Enzimin Saflaştırma Basamakları

| **Method** | **Volume (ml)** | **Toplam Aktivite (U/100 ml)** | **Enzim aktivite (U/ml)** | **Toplam Protein (mg)** | **Spesifik Aktivite (U/mg)** | **Purification fold** | **Recovery (%)** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Enzim (Süpernatant) | 100 | 3988 | 39,88 | 63 | 63,30 | 1 | 100 |
| Amonyum Sülfat | 60 | 3500 | 58,33 | 28,5 | 122,8 | 1,94 | 87,76 |
| İyon Değişim Kromotografisi | 25 | 2655 | 106,2 | 2,02 | 1314,3 | 20,76 | 66,57 |
| Jel Filtrasyon Kromotagrafisi | 10 | 2181 | 218,1 | 0,34 | 6414,7 | 101,3 | 54,68 |

**SDS-PAGE ile enzim saflığının ve moleküler kütlesinin belirlenmesi**

Gümüş boyama sonrası elde edilen SDS-PAGE görüntüsü incelendiğinde; 1. örnekde proteaz besiyerinde fibrinolitik enzimin saflaştırılmasıyla; 45-36-32 kDa büyüklüğünde 3 bant, 2. örnekde ise fibrin besiyerinden fibrinolitik enzimin saflaştırılması ile 36 kDa büyüklüğünde tek bant elde edildi.



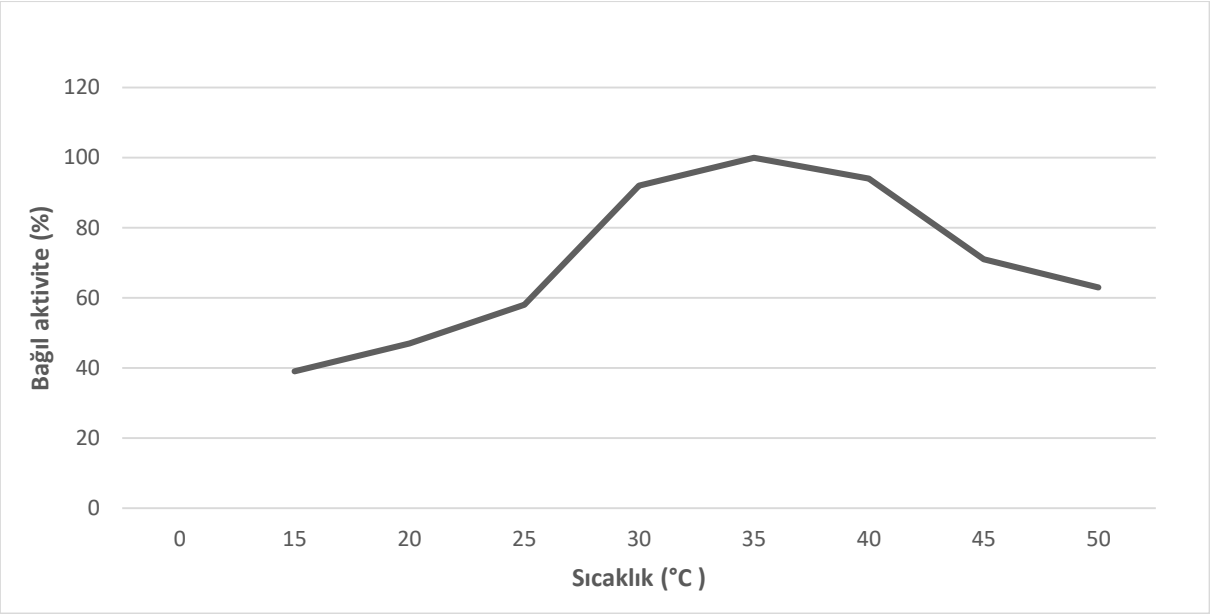

**Şekil 23.** SDS-PAGE görüntüsü. M: Marker, 1: Proteaz besiyerinden fibrinolitik enzim saflaştırılması, 2: Fibrin besiyerinden fibrinolitik enzimin saflaştırılması

**Enzim Karakterizasyonu**

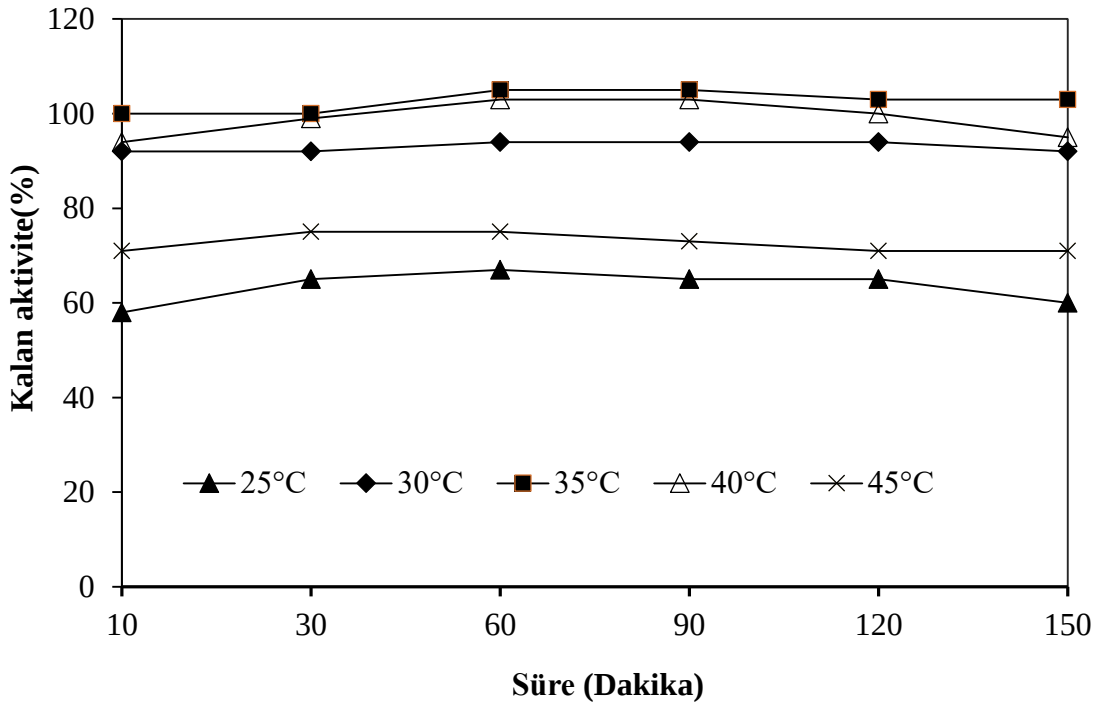
**Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerindeki etkisi**

*Bacillus atrophaeus* (V4)'dan elde edilen fibrinolitik enzimin optimum sıcaklığını belirlemek için, 15°C-50°C'deki sıcaklık değerleri incelendi. Aktivite sonuçlarına göre;15-35°C arasında bağıl aktivitenin düzenli olarak arttığı, 35°C'de maksimum değere ulaştığı, 40-50°C'de ise aktivitede azalma meydana geldiği gözlemlendi. Elde edilen sonuçlar Şekil 24'de gösterildi.

*Bacillus atrophaeus* (V4)'dan elde edilen fibrinolitik enzimin sıcaklık kararlığının belirlenmesinde, her bir sıcaklık değeri için farklı inkübasyon sürelerinde (10, 30, 60, 90,120 ve 150 dk) aktiviteleri incelenmiş, buna göre; 30-60-90 dk'lık süre sonunda aktivitenin arttığı, 120-150 dk'lık inkübasyonun sonunda ise, aktivitede azalma meydana geldiği gözlemlendi. Elde edilen sonuçlar Şekil 25.'de gösterildi.



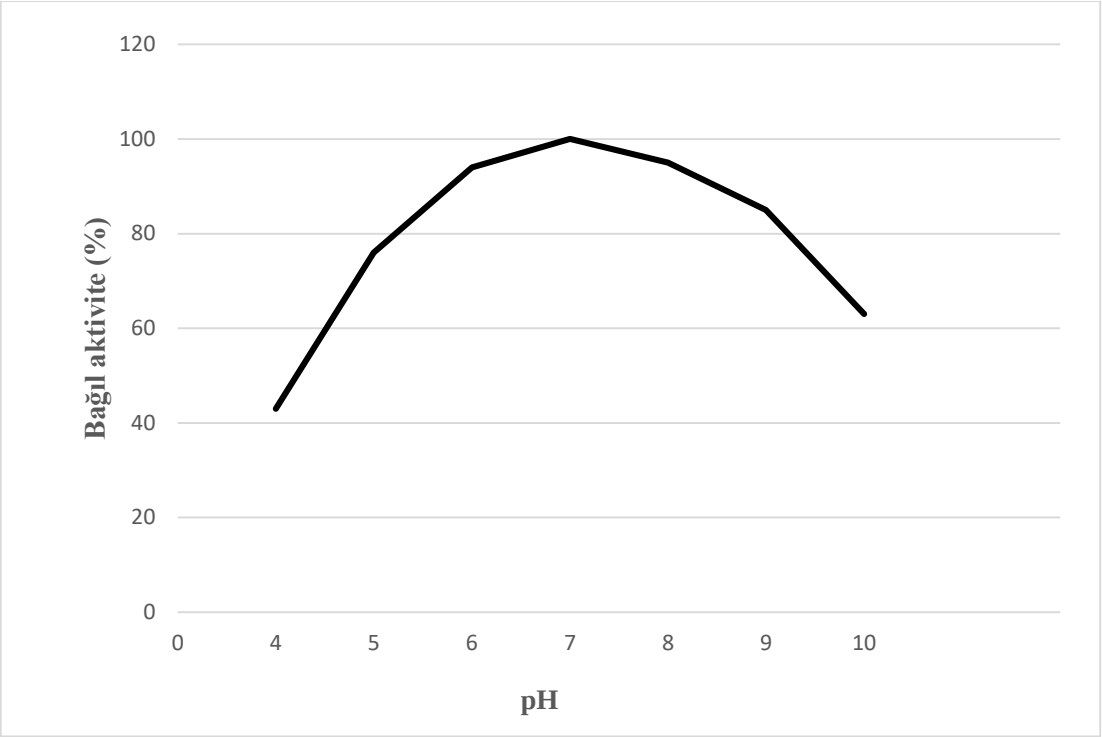

**Şekil 24.** Fibrinolitik enzimin optimum sıcaklığının ölçülmesi için çizilen sıcaklık-bağıl aktivite grafiği



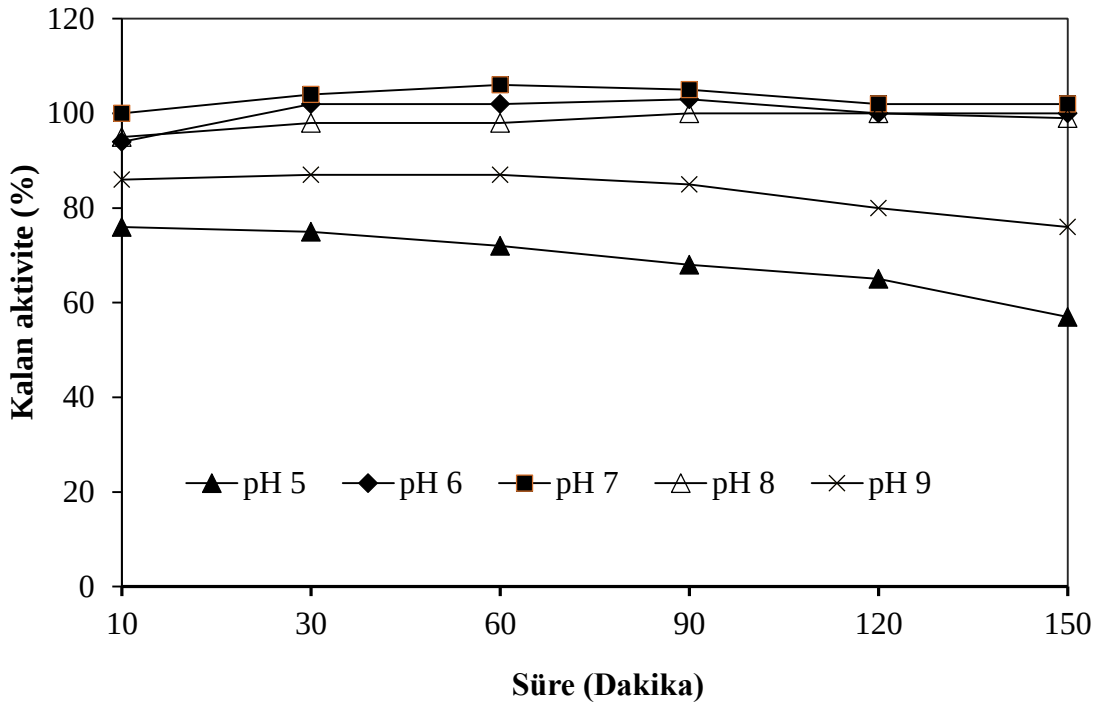

**Şekil 25.** Sıcaklığın fibrinolitik enzim kararlılığı üzerine etkisi

**pH'nın Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi**

*Bacillus atrophaeus* (V4)'dan elde edilen fibrinolitik enzimin aktivite sonuçlarına göre; pH 4-7 arasında enzim aktivitesini arttığı, maksimum değere ise pH 7'de ulaştığı gözlendi. pH 7-10 arasında ise, aktivitenin azaldığı tespit edildi. Elde edilen verilere ait grafik Şekil 26 ve Şekil 27'de gösterildi.




**Şekil 26.** Fibrinolitik enzimin optimum pH'sı için oluşturulan aktivite ölçüm grafiği




**Şekil 27.** Fibrinolitik enzim için oluşturulan stabil pH grafiği

**Metal İyonlarının Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi**

Enzim aktivitesi üzerinde metal iyonlarının etkisini incelemek için yapılan deneyde; 2,5 ve 5 mM konsantrasyonunda enzim aktivitesinin azaldığı [$Zn^{+2}$ (5 mM) hariç], 10 mM'da ise aktivitelerde artış gözlendiği, en fazla artışın $Zn^{+2}$ iyonunda olduğu sonucuna varıldı. $Ca^{+2}$ve $Cu^{+2}$'nin 10 mM konsantrasyonunda dahi enzim aktivitesini düşürdüğü, $Fe^{+}$, $Mg^{+2}$, Na ve K'nın ise aktiviteyi arttırdığı gözlemlendi. Elde edilen veriler Tablo 16'da gösterildi.

**Tablo 16.** Bazı Metal İyonlarının Fibrinolitik Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

| Metal İyonları | 2,5 mM | 5,0 mM | 10,0 mM |
|---|---|---|---|
| Kontrol | 100 | 100 | 100 |
| $Fe^{+2}$ | 91,50 | 99,40 | 113,20 |
| $Zn^{+2}$ | 73,59 | 100,23 | 180,20 |
| $Mg^{+2}$ | 88,8 | 94,1 | 100,3 |
| $Cu^{+2}$ | 75,20 | 76,35 | 89,42 |
| $Ca^{+2}$ | 86,04 | 88,09 | 86,04 |
| Na | 79,60 | 86,5 | 107,10 |
| K | 97,79 | 104,70 | 110,30 |

**Proteaz inhibitörlerinin enzim aktivitesi üzerindeki etkisi**

Proteaz inhibitörlerinden Pepstatin A, IAA, β-merkaptoetanol, PMSF ve EDTA'nın fibrinolitik enzim aktivitesi üzerine göstermiş olduğu bağıl aktivite değerleri, Tablo 17'de gösterilmiştir.

**Tablo 17.** Bazı Proteaz İnhibitörlerinin Fibrinolitik Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

| **İnhibitör** | **Bağıl Aktivite (%)** |
|---|---|
| Fenilmetansülfonil (PMSF) | 30,6 |
| Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) | 58,7 |
| Pepstatin A | 92,7 |
| β-merkaptoetanol | 76,5 |
| Iodoacetic asit (IAA) | 88,3 |

# TARTIŞMA VE SONUÇ

Moleküler biyolojinin ortaya çıkışı ile birlikte proteolitik enzimler, temel ve uygulamalı araştırmaların odağı haline gelmiştir. Proteazları kodlayan yeni genlerin tanılanması ile bu enzim hakkındaki bilgiler önemli ölçüde artmıştır. Proteolitik enzimler, endüstriyel uygulamalarda ve terapotik ajanların sentezinde yer aldığı için, bilim insanları tarafından yoğun ilgi görmektedir (Dubey *et al.* 2007).

Fibrin; trombin aracılığıyla fibrinojenden oluşturulan kan pıhtılarının ana proteinidir (Syahbanu *et al.* 2020). Trombin fibrinojeni fibrine dönüştürürken, fibrin polimerlerinin (pıhtılarının) oluşmasıyla sonuçlanan tromboz olarak adlandırılan olay meydana gelmektedir (Choi *et al.* 2017). Kan damarlarında pıhtı (trombüs) oluşumu, kanın kalbe veya beyne ulaşmasını engeller. Bu durum bireylerde; intravasküler tromboz, derin ven trombozu, felç, kalp krizi, kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıkları meydana getirmektedir (Vijayaraghavan *et al.* 2019). Fibrinolitik sistem, aktifleştirilmiş trombin yoluyla sadece fibrinojenden kaynaklanan fibrin pıhtılarını çözmekle kalmaz, aynı zamanda hemostatik yanıt olarak vasküler yaralanma bölgesinde kan akışı için kanal sağlamaktadır (Hu *et al.* 2019).

Fibrinolitik enzimler, fibrin pıhtılarını çözebilen trombolitik ajanlardır. Streptokinaz, t-PA ve ürokinaz trombolitik tedavide başvurulan temel fibrinolitik enzimlerdir. Ancak bunların, maliyetinin yüksek olması; gastrointestinal kanama, koroner kalp tıkanması ve alerjik reaksiyonlar gibi istenmeyen yan etkileri bilim insanlarını düşük maliyetli, etkili ve daha güvenilir trombolitik ajanlar bulmaya yönlendirmiştir (Yong *et al.* 2005; Xin *et al.* 2018).

Mikrobiyal fibrinolitik enzimler araştırıldığında *Bacillus* türleri karşımıza çıkmaktadır. Özellikle *B. subtilis*'in üretim aşamasında yüksek ürün verimi ve istenmeyen yan ürün oluşturmaması, enzim üreticileri arasında popüler mikroorganizmalardan biri olmasını sağlamıştır (Moharam *et al.* 2019). *Bacillus polymyxa* ve *Bacillus cereus* ile fibrinolitik enzim üretimine ait çalışmalar bulunmaktadır (Amat *et al.* 2014). Tez çalışmamızda kullandığımız *Bacillus atrophaeus* (V4) türünün fibrinolitik enzim üretebilirliği gösteren, elde ettiğimiz sonuçlara paralel verileri ortaya koyan, benzer çalışmalar bulunmaktadır (Rejiniemon *et al.* 2015; Wang *et al.* 2011).

Sharma *et al*. 2020 yılında yaptıkları çalışmada, fibrin plate yönteminin fibrinolitik enzim üreten suşların belirlenmesinde oldukça etkin bir yöntem olduğunu belirtmiş olup, çalışmamızda da özellikle yüksek fibrinolitik aktiviteye sahip üç izolatın belirlenmesinde, literatür verisine paralel olarak, bu yöntemin oldukça başarılı olduğu sonucuna varıldı.

Fibrinolitik enzim üretim ortamında; skim milk powder miktarı, pH, sıcaklık ve inkübasyon süresi gibi parametrelerin enzim aktivitesine etki ettiği gözlemlenmektedir. Bu nedenle mevcut tez çalışmasında *B. atrophaeus*'un fibrinolitik enzim üretme potansiyelini arttırmak için, kültür parametrelerinin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Öncelikle kültür ortamına konulan skim milk powder konsantrasyonu test edilmiş,15 g/l SMP'nin fibrinolitik enzim üretimini artırdığı, daha yüksek konsantrasyon değerlerinin ise, enzim aktivitesinde azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir. Anusree *et al*. 2020 yılında yaptıkları çalışmada, skim milk powder konsantrasyonunu optimize etmiş, verilerimize paralel bir şekilde 15 g/l'de enzim aktivitesinin daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır.

Kültür ortamının pH'sı fibrinolitik enzim üretimini etkileyen faktörlerden biridir. Yapılan deneylerde pH aralığının 6-8 arasında hücre büyümesini arttırdığı, pH 8'in üzerindeki değerlerde ise, hücre konsantrasyonunda azalmaya neden olduğunu ortaya konulmuştur. Enzim üretiminde pH 7'de aktivitenin maksimuma ulaştığı kaydedilmiştir. Singh *et al*. tarafından 2021 yılında yapılan çalışmada, maksimum enzim üretim pH'sı 8 olarak kaydedilmiş, Taneja *et al*. 2017 yılında yapılan çalışmada ise, maksimum aktivitenin pH 7'de olduğu gözlemlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar literatür bilgileri ile paralellik göstermektedir.

Üretim ortamındaki sıcaklıkla ilgili yapılan araştırmada ise; izolatın gösterdiği maksimum hücre büyüme performansının 35°C'de olması, topraktan izole edilen bakterilerle yapılan çalışmalarla uyumludur. Velusamy *et al*. 2015 yılında atık topraktan izole edilen *Bacillus tequilensis* CWD-67 izolatı ile yapılan çalışmada, optimum sıcaklık değerine 35-45°C arasında ulaşılmıştır.

Son olarak kültür ortamında farklı inkübasyon sürelerinin fibrinolitik enzim üretimi üzerine etkisi incelenmiş; 12-24. saatlerde enzim üretiminin arttığı, 48-72. saatin sonunda aktivitenin maksimuma ulaştığı gözlemlenmiştir (Deepak *et al*. 2008; Mothe and Sultanpuram 2016). Hmood and Aziz'in 2016 yılında yaptığı çalışmalar incelendiğinde, aktivitenin 72. saate kadar arttığı, 96. saatte ise aktivitede azalma meydana geldiği gözlemlenmiştir. Bu veriler ile bulgularımız paralellik göstermektedir.

Enzim karakterizasyon çalışmalarında; sıcaklık, pH, metal iyonları ve proteaz inhibitörleri incelenmiştir. Düşük sıcaklıklarda aktivitenin az olduğu, optimum enzim aktivitesinin 25-45°C'de; maksimum aktivitenin ise 35°C'de gerçekleştiği sonucuna varılmıştır. 45°C'den sonra aktivitede düşüş meydana geldiği, enzimin 120 dk'ya kadar çalışılan sıcaklıklarda, stabil kalabildiği sonucuna varılmıştır. Xin *et al*. 2018 yılında topraktan izole edilen bakterilerle yaptığı çalışmada, optimum enzim aktivitesinin 30-55°C arasında, maksimum aktivitnin ise, 50°C'de gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Bu veriler; *Bacillus*

türlerinden saflaştırılan enzimin karakterizasyonunda optimum sıcaklığın, örneğin alındığı çevresel koşullara bağlı olarak değişkenlik gösterebileceği sonucunu bize göstermektedir.

pH'nın enzim aktivitesi üzerine etkileri incelendiğinde ise; pH 7'ye kadar enzim aktivitesinin arttığı, maksimum aktivitenin pH 7'de gözlemlendiği, ortam alkali oldukçada aktivitede düşüş meydana geldiği sonucuna varılmıştır. Souza *et al.* 2016 yılında *Bacillus amyloliquefaciens* ile yaptığı çalışmada, enzim aktivitesinin pH 7'ye kadar arttığını, bu değerden sonra aktivitede azalma meydana geldiğini belirlemiştir. Elde edilen sonuçlar ile literatür bilgileri paralellik göstermektedir.

Metal iyonları incelendiğinde; aktivitede ki en yüksek artışın Zn'da meydana geldiği; Fe, Mg, Na, K'da da aktivitenin arttığı, ancak Cu ve Ca'un aktivitede inhibisyona sebep olduğu ortaya konulmuştur. Sonuçlar metal iyonlarının enzimin aktif bölgesinde veya yakınında yer alabileceği, enzimin bir metalloproteaz olabileceğini düşündürmektedir. Proteaz inhibitörleri ile yapılan araştırmada ise; EDTA ve PMSF inhibitörleri aktiviteyi önemli oranda düşürürken; sistein metalloproteaz grubunda bulunan indolasetik asit'in ve aspartil proteaz grubunda bulunan pepstatinA inhibitörünün aktivite üzerinde etki yapmaması, bize üretilen enzimin metalloproteaz veya serin proteaz grubuna ait olabileceğini düşündürmektedir (Ueda *et al.* 2007). Sasmita *et al.* 2018 yılında yaptığı çalışmada; Na ve Mg'un aktiviteyi artırdığını, Cu ve PMSF'nin ise aktiviteyi azalttığı tespit edilmiştir. Bu veriler tez çalışmamız ile paralellik göstermektedir.

Mahajan *et al.* 2012 tarafınan yapılan çalışmada, *Bacillus subtilis* ICTF-1 suşunun ürettiği enzimin üç basamakta saflaştırılması sonucunda; spesifik aktivitede 34,42 kat artış, %7,5 geri kazanım, enzimin moleküler ağırlığı 28 kDa olarak tespit edilmiştir. Hu *et al.* 2019 tarafından yapılan başka bir çalışmada ise; Douchi'den izole edilen *B. subtilis* 'den elde edilen fibrinolitik enzimin moleküler ağırlığının 28-30 kDa arasında değiştiği ortaya konulmuştur. Çalışmamızda, *Bacillus atrophaeus* (V4)*'* dan izole edilen fibrinolitik enzim, proteaz besiyerinde fibrinolitik aktivitede 73,61 kat artış ile %35,2 geri kazanım sağlarken; fibrin besiyerinde spesifik aktivite de 101,3 kat artış ve %54,68 geri kazanım ile üç aşamada saflaştırılmıştır. Son olarak saflaştırılan protein SDS-PAGE'e tabi tutulmuş, proteaz besiyerinde 45,36 ve 32 kDa büyüklüğüne sahip üç bant elde edilirken; fibrin ortamında 36 kDa'ait tek bant elde edilmiştir. Bu 36 kDa'luk tek bantın fibrinolitik enzime ait olduğu öngörülmektedir.

Enzim saflaştırmasında iki farklı ortamın kullanılmasının nedeni; suşumuzun proteaz besiyerinde fibrinolitik enzime ek olarak başka proteolitik enzimlerde ürettiği, fibrinolitik enzimin tek bant vermesi gerektiği, ancak burada 3 bant oluştuğu gözlemlenmiştir. Daha sonra, fibrin içeren besiyeri hazırlanmış, enzim üretimi gerçekleştirilmiş, saflaştırma basamakları

yapılıp SDS-PAGE ile görüntülenmiştir. İki farklı besiyerinden enzim saflaştırılması bakımından mevcut çalışmamız, literatürde ilk olma özelliği taşımaktadır.

Mikrobiyal kaynaklardan izole edilen enzimin, şuan mevcut tedavide kullanılan ajanlara göre; uzatılmış plazma yarı ömrü, artan fibrin özgüllüğü, yüksek terapötik indeks, düşük alerjik yanıt ve kanama komplikasyon riskinin azalması gibi avantajlara sahip olduğu bilinmektedir. Bu yüzden, mikrobiyal enzim üreten suşlara çalışmalarda daha fazla yer verilmesi gerekmektedir. Tezimizde de düşük maliyetle, yerel kaynaklardan fibrinolitik enzim üreten suşların belirlenmesi amaçlanmıştır.

Elde edilen veriler ışığında;

- Tezimizde, topraktan elde edilen yerel izolatlardan, oldukça değerli fibrinolitik enzimin üretilebileceği,
- Fibrinolitik enzim saflaştırılmasında amonyum sülfat, TPP gibi kısmi saflaştırmaların tek başına yeterli olmadığı, saflaştırma da en iyi sonuç için iyon değişim ve jel filtrasyon kromotografilerinin de yapılması gerektiği,
- Bakterimizle yapılan pH, sıcaklık, Skim Milk Powder konsantrasyonu ve inkübasyon süresi optimizasyonları ile enzim üretiminin arttırılabileceği,
- Proteaz aktivitesi yüksek olan bazı suşların, düşük fibrinolitik enzim aktivitesine sahip olabileceği,
- İzolatların fibrin içeren besiyerinde oluşturdukları zon büyüklükleri ile fibrinolitik enzim aktivitelerinin paralellik gösterdiği,
- Literatüre paralel olarak, en iyi fibrinolitik enzim üreten suşun *Bacillus* cinsine ait olduğu,
- Literatür verilerine göre; fibrinolitik enzim üreten mikroorganizmaların, farklı kDA'larda SDS-PAGE bant görüntülerinin bulunduğu ve bu değişkenliğin suş farklılığına bağlı olarak gerçekleştiği sonucuna varılmıştır.

Vasküler tıkanıklık dünya çapında önemli bir morbidite ve mortalite nedeni olmaya devam etmektedir. Çeşitli kaynaklardan çok sayıda trombolitik ajan tanımlanmış ve karakterize edilmiş olsa da; in vitro ve in vivo çalışmalardan elde edilen umut verici bilimsel veriler, klinik deneylerde başarıya dönüştürülememiştir. Bu nedenle daha etkili, güvenli ve uygun maliyetli olan mikrobiyal türevli trombolitik ajanların araştırılmasına çok fazla önem verilmelidir.

# KAYNAKLAR


Adıgüzel, A., 2006. Bazı Termal Tesislerden Alınan Su Örneklerinden İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Albayrak, Ş., 2018. Türkiyenin Farklı Bölgelerinde Bulunan Kaplıcalardan Alınan Örneklerden Termofilik Bakterilerin İzolasyonu,Konveksiyonel ve Moleküler Yöntemlerle İdentifikasyonu, Endüstriyel Açıdan Önemli Olan Enzimleri Üretme Potansiyeline Sahip Suşların Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Alçiçek, E, 2017. Van İlinden Alınan Sıcak su örneklerinden Termofilik Bakterilerin İzolasyonu, İdentifikasyonu, *Bacillus licheniformis* E10'danProteaz Enziminin Üçlü Faz Sistemiyle(TPP) ile Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Algül, D., 2019. Topraktan İzole Edilen *Bacillus subtilis* A8'den Proteaz Üretimi ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi Fen Biilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.

Amat, D., Arora, A., Nain, L., & Saxena, A. K. 2014. Biomass hydrolyzing enzymes from plant pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. punicae: optimizing production and characterization. Annals of microbiology, 64(1), 267-274.

Anh, D. B. Q., Mi, N. T. T., & Van Hung, P., 2015. Isolation and optimization of growth condition of *Bacillus sp*. from fermented shrimp paste for high fibrinolytic enzyme production. Arabian Journal for Science and Engineering, 40(1), 23-28.

Anusreea,M., Swapnaa, K., Aguilar, C.N., & Sabu, A., 2020. Optimization of process parameters for the enhanced production of fibrinolytic enzyme by a newly isolated marine bacterium. Bioresource technology reports, 11, 100436.

Arau´jo, R., Casal, M., & Cavaco-Paulo, A., 2008. Application of enzymes for textile fibres processing. Biocatalysis and biotransformation, 26(5), 332-349.

Arslan, S., 2017. Türkiye'nin Farklı Yörelerinden Toplanan Beyaz Peynir Örneklerinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Baltacı, M.Ö., 2020. Ham Petrol Kontaminasyonunun Mikrobiyal Olarak Biyoremediasyonu. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Benjamin, E. J., Virani, S. S., Callaway, C. W., Chamberlain, A. M., Chang, A. R., Cheng, S., & Muntner, P. 2018. Heart disease and stroke statistics-2018 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, *137*(12), e67-e492.

Bivard, A., Lin, L., & Parsons, M.W., 2013. Review of Stroke Thrombolytics. Journal of stroke, 15(2), 90-98.

Blancho, A., & Blancho, G., 2017. Medical Biochemistry. Academic Press,153-175.

Boyce,S., & Tipton, K. F., 2001. Enzyme classification and nomenclature. Encyclopedia of life sciences, 1-11.

Carriero , M.V., Franco, P., Vocca, I., Alfano, D., Votta,D., Longanesi-Cattani, I., Bifulco,K., Mancini, A., Caputi, M., Stoppelli,M.P., 2009. Structure, function and antagonists of urokinase-type plasminogen activator. Frontiers in bioscience, 14, 3782-3794.

Chapin, J. C., Hajjar, K.A., 2015. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. Blood reviews,29(1),17-24.

Choi, J. H., Kim, D. W., Kim, S., & Kim, S. J. 2017. Purification and partial characterization of a fibrinolytic enzyme from the fruiting body of the medicinal and edible mushroom Pleurotus ferulae. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 47(6), 539-546.

Corte, A.L.C., Philıppou, H., & Ariëns, R.A., 2011. Role of fibrin structre in thrombosis and vascular disease. Advances in protein chemistry and structural biology, 83,75-127.

De Souza, F. R., & Gutterres, M., 2012. Applıcatıon of enzymes in leather processıng: A comparıson between chemical and coenzymatıc processes. Brazilian journal of chemical engineering, 29(3), 473-481.

De Souza, F.A.S.D., Sales, A.E., e Silva, P.E.C., Bezerra, R.P., e Silva, G.M.M., de Araújo, J.M., Takaki, G.M.C., & Porto,T.S., Teixeira, J.A.C., Porto,A.L.F., 2016. Optimization of production, biochemical characterization and in vitro evaluation of the therapeutic potential of fibrinolytic enzymes from a new *Bacillus Amyloliquefaciens.* Macromolecular research, 24(7), 587-595.

De Souza, D. H., Bhattacharya, S., & Das, A. 2020. Fibrinolytic protease from Bacillus cereus S46: Purification, characterization, and evaluation of its in vitro thrombolytic potential. Journal of Basic Microbiology, 60(8), 661-668.

Deepak, V., Kalishwaralal, K., Ramkumarpandian, S., Babu, S. V., Senthilkumar, S. R., & Sangiliyandi, G. 2008. Optimization of media composition for Nattokinase production by *Bacillus subtilis* using response surface methodology. Bioresource technology, 99(17), 8170-8174.

Del Rosso, J.Q., 2013. Application of protease technology in dermatology: rationale for incorporation into skin care with initial observations on formulations designed for skin cleansing, maintenance of hydration, and restoration of the epidermal permeability barrier. The journal of clinical and aesthetic dermatology, 6(6), 14–22.

Doğan, S., 2021. Erzurum Yöresinden Toplanan Çiğ Süt Örneklerinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Dubey, V.K., Pande, M., Singh, K.B., & Jagannadham, M.V., 2007. Papain-like proteases: Applications of their inhibitors, African journal of biotechnology, 6(9), 1077-1086.

Dubey, R., Kumar, J., Agrawala, D., Char, T., & Pusp, P. 2011. Isolation, production, purification, assay and characterization of fibrinolytic enzymes (Nattokinase, Streptokinase and Urokinase) from bacterial sources. African Journal of Biotechnology, 10(8), 1408-1420.

Dunn, B.M., 2013. Aspartic Proteases. Encyclopedia of biological chemistry. 1, 137-140.

eSilva, P.E. D.C., de Barros, R.C., Albuquerque,W.W.C., Brandão, R.M.P., Bezerra,R.P., & Porto, A.L.P., 2018. In vitro thrombolytic activity of a purified fibrinolytic enzyme from *Chlorella vulgaris*. Journal of Chromatography B, 1092,524-529.

Fadıloğlu, S., & Erkmen, O., 2004. Gıda sanayinde enzimlerin önemi. Gıda, 29(5), 393-400.

Folsom, A,R., Tang, W., George, K,M., Heckbert, S,R., MacLehose, R, F., Cushman, M., Pankow, J,S., 2016. Prospective study of γ′ fibrinogen and incident venous thromboembolism: The longitudinal investigation of thromboembolism etiology (LITE). Thrombosis research, 139, 44–49.

Furie, B., & Furie, B.C., 2005. Thrombus formation in vivo. The Journal of clinical investigation, 115(12), 3355-3362.

Gerze, A., 2003. Proteaz enziminin *Bacıllus Subtılıs Megatherium* ve *Bacıllus Polymxa* bakteri türlerinden kısmi saflaştırılması ve özelliklerinin incelenmesi.Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Hmood, S. A., & Aziz, G. M. 2016. Optimum conditions for fibrinolytic enzyme (Nattokinase) production by *Bacillus sp*. B24 using solid state fermentation. Iraqi Journal of Science, 57(2C), 1391-1401.

Hasanoğlu, C., 2015. Trombolitik tedavi:kime,ne zaman, nasıl ?. Güncel göğüs hastalıkları serisi, 3(1), 34-44.

Hogan, D. F., & Brainard, B. M. 2015. Cardiogenic embolism in the cat. Journal of Veterinary Cardiology, 17, 202-214.

Hu, Y., Yu, D., Wang, Z., Hou, J., Tyagi, R., Liang, Y., & Hu, Y. 2019. Purification and characterization of a novel, highly potent fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* DC27 screened from Douchi, a traditional Chinese fermented soybean food. Scientific reports, 9(1), 1-10.

İnan, A., 2006. HIV infeksiyonu ve tedavisi ile ilişkili metabolik sorunlar. Türk HIV AIDS dergisi, 9(4), 104-111.

Ju Yeon, S., Chung, G.Y., Sang Hong J.S., Ha Hwang, J.H., & Shin H.S., 2017. Purification of serine protease from polychaeta, Lumbrineris nipponica, and assessment of its fibrinolytic activity. İn vitro cellular & developmental biology -Animal, 53(6), 494-501.

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.

Kattula, S., Byrnes, J. R., & Wolberg, A. S., 2017. Fibrinogen and fibrin in hemostasis and trombosis. Arterioscler thrombosis, vascular biology, 37(3), 13-21.

Kotb, E., 2012. Fibrinolytic bacterial enzymes with thrombolytic activity. In Fibrinolytic Bacterial Enzymes with Thrombolytic Activity (pp. 1-74). Springer, Berlin, Heidelberg.

Kotb, E., 2017. Microbial fibrinolytic enzyme production and applications. Microbial functional foods and nutraceuticals, 13, 175.

Krishnamurthy, A., Belur, P.D, & Subramanya, S.B., 2018. Methods available to assess therapeutic potential of fibrinolytic enzymes of microbial origin: a review. Journal of analytical science and technology, 9(1), 1-11.

Kumar, D., Savitri, Thakur, N., Verma, R., and Bhalla, T.C., 2008. Microbial proteases and application as laundry detergent additive. Research journal of microbiology, 3(12), 661-672.

Laxman, R.S., Sonawane, A.P., More, S.V., Rao, B.S., Rele, M.V., Jogdand, V.V., Deshpande, V.V., & Rao, M.B., 2005. Optimization and scale up of production of alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* . Process biochemistry,40(9), 3152–3158.

Liu, Y., Shao, Z., Reng,X., Zhou, J., & Qin,W., 2021. Dye-decolorization of a newly isolated strain *Bacillus amyloliquefaciens* W36. World Journal of Microbiology and biotechnology, 37(1), 1-11.

Mahajan, P. M., Nayak, S., & Lele, S. S. 2012. Fibrinolytic enzyme from newly isolated marine bacterium *Bacillus subtilis* ICTF-1: Media optimization, purification and characterization. Journal of bioscience and bioengineering, 113(3), 307-314.

Matsumoto, H., Haniu, H., & Komori ,N., 2019. Determination of protein molecular weights on SDS-PAGE. In electrophoretic separation of proteins.101-105.

Moharam, M. E., El-Bendary, M. A., El-Beih, F., Easa, S. M. H., Elsoud, M. M. A., Azzam, M. I., & Elgamal, N. N. 2019. Optimization of fibrinolytic enzyme production by newly isolated *Bacillus subtilis* Egy using central composite design. Biocatalysis and agricultural biotechnology, 17, 43-50.

Mothe, T., & Sultanpuram, V. R. 2016. Production, purification and characterization of a thermotolerant alkaline serine protease from a novel species *Bacilluscaseinilyticus*. 3 Biotech, 6(1), 53.

Muñoz, E.M., & Linhardt, R.J., 2004. Heparin-binding domains in vascular biology. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 24(9), 1549-1557.

Nascimento, T.P., Sales, A.E., Porto, T.S., Costa, R.M.P.B., Breydo, L., Uversky, V.N., Porto, A.F., & Converti, A., 2017. Purification, biochemical, and structural characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Mucor subtilissimus* UCP 1262. Bioprocess and biosystems engineering, 40(8), 1209-1219.

Onishi, A., St Ange**,** K., Dordic, J. S., & Linhardt**,** R.J., 2016. Heparin and anticoagulation. Frontiers in biosicience, 21, 1372-1392.

Özkan, İ., 2020. Termofilik Bakterilerden Lipaz Üreticisi Suşların Belirlenmesi,Lipaz Enziminin Saflaştırılması,Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulanabilirliğinin Saflaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Pan, S., Chen, G., Wu, R., Cao, X., & Liang, Z. (2019). Non-sterile submerged fermentation of fibrinolytic enzyme by marine *Bacillus subtilis* harboring antibacterial activity with starvation strategy. Frontiers in microbiology, 10, 1025.

Patel , R., Dodia, M., & Singh, S, P., 2005. Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic Bacillus sp.: Production and optimization. Process biochemistry, 40(11), 3569–3575.

Peng, Y., Huang, Q., Zhang, R., & Zhang, Y., 2003. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 screened from douchi, a traditional Chinese soybean food. Comparative biochemistry and physiology part b: biochemistry and molecular biology, 134(1), 45–52

Peng, Y., Yang, X., & Zhang, Y., 2005. Microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source, production, properties, and thrombolytic activity in vivo. Applied microbiology and biotechnology, 69(2), 126–132.

Porter, W. R. 2010. Warfarin: history, tautomerism and activity. Journal of computer-aided molecular design, 24(6), 553-573.

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 (Alzwiprase) *from Bacillus subtilis* DM-04. Biochemical engineering journal, 48(2), 173-180.

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.

Rejiniemon, T. S., Hussain, R. R., & Rajamani, B. 2015. In-vitro functional properties of *Lactobacillus* plantarum isolated from fermented ragi malt. South Ind J Biol Sci, 1(1), 15-23.

Sasmita, I. R. A., Sutrisno, A., Zubaidah, E., & Wardani, A. K., 2018. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from tempeh bongkrek as an alternative of thrombolytic agents. In IOP conference series: earth and environmental science (Vol. 131, No. 1, p. 012041). IOP Publishing.

Sharma, C., Salem, G.E.M., Sharma, N., Gautam, P., & Singh, R., 2020. Thrombolytic Potential of Novel Thiol-Dependent Fibrinolytic Protease from *Bacillus cereus* RSA1. Biomolecules, 10(1), 3.

Singh, M. K., Rajagopalan, A., Tanimu, H., & Sukumaran, B. O. 2021. Purification, characterization and fibrino (geno) lytic activity of cysteine protease from Tabernaemontana divaricata latex. 3 Biotech, 11(2), 1-12.

Singh, T.A., Devi, K.R., Ahmed, G., & Jeyaram, K., 2014. Microbial and endogenous origin of fibrinolytic activity in traditional fermented foods of Northeast India. Food research international, 55, 356-352.

Syahbanu, F., Kezia, E., Puera, N., Giriwono, P. E., Tjandrawinata, R. R., & Suhartono, M. T. 2020. Fibrinolytic bacteria of Indonesian fermented soybean: preliminary study on enzyme activity and protein profile. Food Science and Technology, 40, 458-465.

Taneja, K., Bajaj, B. K., Kumar, S., & Dilbaghi, N. 2017. Production, purification and characterization of fibrinolytic enzyme from *Serratia* sp. KG-2-1 using optimized media. 3 Biotech, 7(3), 1-15.

Tavano, O.L., Berenguer-Murcia, A., Secundo, F., & Fernandez-Lafuente, R., 2018. Biotechnological applications of proteases in food technology. Comprehensive reviews in food science and food safety, 17(2), 412-436.

Tie, J., & Stafford, D.W., 2008. Structure and Function of Vitamin K Epoxide Reductase. Vitamins & hormones, 78, 103-130.

Takami, H., Akiba, T., & Horikoshi, K., 1989. Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. no. AH-101. Applied microbiology and biotechnology , 30(2), 120-124.

Topkaya, Ş., & Ertunç, F., 2018. Bitki patojeni virüslerde proteaz tipleri ve fonksiyonları. Selçuk üniversitesi fen fakültesi fen dergisi, 44(2), 175-186.

Townsend, N., Nichols, M., Scarborough, P., & Rayner, M. 2015. Cardiovascular disease in Europe-epidemiological update 2015. European heart journal, 36(40), 2696-2705.

Ueda, M., Kubo, T., Miyatake, K., & Nakamura, T. 2007. Purification and characterization of fibrinolytic alkaline protease from Fusarium sp. BLB. Applied microbiology and biotechnology, 74(2), 331-338.

Velusamy, P., Pachaiappan, R., Christopher, M., Vaseeharan, B., Anbu, P., & So, J.S., 2015. Isolation and identification of a novel fibrinolytic *Bacillus tequilensis* CWD-67 from dumping soils enriched with poultry wastes. The journal of general and appied microbiology, 61(6), 241-247.

Vijayaraghavan, P., Arasu, M. P., Rajan, R.A., & Al-Dhabi, N. A., 2019. Enhanced production of fibrinolytic enzyme by a new *Xanthomonas oryzae* IND3 using low-cost culture medium by response surface methodology. Saudi journal of biological sciences, 26(2), 217-224.

Vijayaraghavan, P., Rajendran, P., Prakash Vincent, S. G., Arun, A., Abdullah Al-Dhabi, N., Valan Arasu, M., ... & Kim, Y. O., 2017. Novel sequential screening and enhanced production of fibrinolytic enzyme by *Bacillus sp*. IND12 using response surface methodology in solid-state fermentation. BioMed research international, 2017.

Vilar, R., Fish, R.J., Casini, A., & Neerman-Arbez, M., 2020. Fibrin(ogen) in human disease both friend and foe. Haematologica, 105(2), 284-296.

Wang, S. L., Wu, Y. Y., & Liang, T. W. 2011. Purification and biochemical characterization of a nattokinase by conversion of shrimp shell with *Bacillus subtilis* TKU007. New biotechnology, 28(2), 196-202.

Wang, X., Tang,J., Hunter, B., Zhang, X.B., 1999.Crystal structure of streptokinase L-domain. Federation of european biochemical societie,459,85-89.

Weng, Y., Yao, J., Sparks, S., & Wang, K. Y., 2017. Nattokinase: An oral antithrombotic agent for the prevention of cardiovascular disease. International Journal of molecular sciences, 18(3), 523.

Wolfe, M.S., 2009. Intramembrane-cleaving proteases. The journal of biological chemistry, 284(21), 13969-13973.

Wu, S. Y., Hu, W., Zhang, B., Liu, S., Wangi J.M., &Wang, A.M., 2012. Bromelain ameliorates the wound microenvironment and Improves the healing of firearm wounds. Journal of surgıcal research, 176(2), 503-509.

Xin, X., Ambati, R. R., Cai, Z., & Lei, B. 2018. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme from a bacterium isolated from soil. 3 Biotech, 8(2), 1-8.

Yong , P., Xiaojuan, Y., Zhang, Y., 2005. Microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source, production, properties, and thrombolytic activity in vivo. Applied Microbiology and Biotechnology ,69(2), 126–132.

Yuan, J., Yang, J., Zhuang, Z., Yang, Y., Lin, L., & Wang, S. 2012. Thrombolytic effects of Douchi Fibrinolytic enzyme from Bacillus subtilis LD-8547 in vitro and in vivo. BMC biotechnology, 12(1), 1-9.

# ÖZGEÇMİŞ

| | |
|---|---|
| **Kişisel Bilgiler** | |
| **Adı Soyadı:** | Ayşe VAROL |
| **Doğum tarihi:** | |
| **Doğum Yeri:** | |
| **Medeni Hali:** | |
| **Uyruğu:** | |
| **Adres:** | |
| **Tel:** | |
| **Faks:** | |
| **E-mail:** | |
| **Eğitim** | |
| **Lise:** | Ziya Gökalp Lisesi |
| **Lisans:** | Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü |
| **Yüksek lisans:** | Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Mikrobiyoloji Bilim Dalı |
| **Doktora:** | |
| **Yabancı Dil Bilgisi** | |
| İngilizce: | Orta |
| Almanca: | - |
| Rusça: | - |
| **İlgi Alanları ve Hobiler** | |
| | |