



**T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PROTEAZIN FAZLA ÜRETİMİ İÇİN UV MUTASYON YOLUYLA *BACILLUS  
SUBTILIS* STRAIN 168 E6-5'DE SUŞ GELİŞTİRME ÇALIŞMALARI VE ÜREME  
ORTAMININ OPTİMİZASYONU**

**Meltem GÖKÖZ**

**Prof. Dr. Elif DEMİRKAN**

**( Danışman )**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**BURSA -2016**

## TEZ ONAYI

Meltem GÖKÖZ tarafından hazırlanan "Proteazın fazla üretimi için UV mutasyon yoluyla *Bacillus subtilis* strain 168 E6-5'de suş geliştirme çalışmaları ve üreme ortamının optimizasyonu" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

**Danışman** : Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

**Başkan** : Prof. Dr. Elif DEMİRKAN  
Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi,  
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza



**Üye** :Doç.Dr.Bilal BALKAN  
Kırklareli Üniversitesi,Sağlık Meslek Okulu

İmza



**Üye** :Doç.Dr.Serap ÇELİKLER KASIMOĞULLARI  
Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi,  
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza



Yukarıdaki sonucu onaylarım

  
Prof. Dr. Ali Osman DEMİR  
Enstitü Müdürü  
06/10/2016

**U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;**

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı **beyan ederim.**

09/09/2016

Meltem GÖKÖZ



## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### PROTEAZIN FAZLA ÜRETİMİ İÇİN UV MUTASYON YOLUYLA *BACILLUS SUBTILIS* STRAIN 168 E6-5'DE SUŞ GELİŞTİRME ÇALIŞMALARI VE ÜREME ORTAMININ OPTİMİZASYONU

**Meltem GÖKÖZ**

Uludağ Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

**Danışman:** Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

Bu çalışmada, UV ile muamele edilen *Bacillus subtilis* 168 E6-5 suşundan klasik mutasyon işlemleri ile proteaz üreten 369 adet mutant elde edilmiştir. Bu mutantlar arasında en geniş proteaz zonuna (12 mm) sahip mutant suş seçilmiş ve bu suş *Bacillus subtilis* MET39 olarak isimlendirilmiştir. Yeni mutantın sıvı ortamda enzim üretim kapasitesi test edilmiş ve mutant suş ana suştan 1.2 kat daha fazla enzim üretimi göstermiştir. Mutant suşun 28. saatte maksimum seviyede proteaz ürettiği bulunmuştur. Ayrıca besinsel faktörlerin enzim üretimi üzerindeki etkileri incelenmiş ve bu amaçla, enzim üretimi üzerine farklı karbon, nitrojen kaynakları ve metal iyonları gibi temel ortam maddelerinin etkileri araştırılmıştır. En iyi karbon kaynağı olarak gliserol (114 IU/mL) bulunmuştur. Kullanılan inorganik azot kaynakları arasında, tripton (348 IU/mL) enzim üretimi üzerinde çok yüksek bir potansiyel göstermiştir. İnorganik azot kaynaklarının organik kaynaklar kadar etkili olduğu belirlenmiştir. Ancak  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  varlığında enzim üretimi saptanmamıştır. Kullanılan metal iyonlarının enzim üretimi üzerinde fazla bir etkisi olmamıştır.

Proteaz üretimini artırmak amacıyla, yeni ortam en iyi karbon, azot kaynakları ve metal iyonlarının birleştirilmesi ile elde edilmiştir. Bu ortamda, enzim verimi (150 IU/mL), bazal ortamına (80 IU/mL) oranla % 88 artırılmıştır. Elde edilen mutant suşun endüstriyel ölçekte proteaz üretimi, büyük bir potansiyele sahip olabilir.

**Anahtar Kelimeler:** *Bacillus* sp., Proteaz, Ultraviyole, Besinsel Faktörler

**2016, xi +72**

## ABSTRACT

MSc Thesis

### STUDIES OF STRAIN IMPROVEMENT IN *BACILLUS SUBTILIS* STRAIN 168 E6-5 THROUGH UV MUTATION FOR OVER PRODUCTION OF PROTEASE AND OPTIMIZATION OF GROWTH MEDIUM

**Meltem GÖKÖZ**

Uludağ University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

**Supervisor:** Prof. Dr. Elif DEMIRKAN

In this study, the parent strain *Bacillus subtilis* 168 E6-5 was exposed to UV irradiation by classical mutation procedure, and 369 mutants were obtained. Among of these mutants, a mutant strain was selected based on its ability to produce highest zone formation, and strain is named as *Bacillus subtilis* 168 MET39. New mutant was tested for enzyme production capacity in the liquid media, the mutant MET39 showed 1.2-fold increase in protease production over the parent strain *B.subtilis* 168 E6-5. It was found that mutant strain produced protease on maximum level at 28<sup>th</sup> hour. The effects of nutritional factors on the production of enzymes were studied, and for this purpose, the effects of major medium ingredients, such as different carbon, nitrogen sources and metal ions, on the production of the enzyme were used. The best carbon source was found to be gliserol (114 IU/mL). Among the inorganic nitrogen sources, the highest enzyme production was obtained in the presence of tripton (348 IU/mL). Inorganic nitrogen sources were detected as effective as organic sources. But enzyme production only wasn't determined in the presence of NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. The metal ions were not much effect on enzyme production.

In order to enhance the production of protease, a new medium was obtained by combining the best carbon and nitrogen sources, and metal ions. In this medium, enzyme yield (150 IU/mL) was enhanced 88% compared to basal medium. This obtained mutant strain may be great potential for protease production at industrial scale

**Key words:** *Bacillus* sp., Protease, Ultravirole, Nutritional Factors

2016, xi +72

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım süresince anlayış ve yardımlarını esirgemeyen, geniş bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, görüş ve önerileri ile beni yönlendiren danışmanım Sayın Prof. Dr.Elif DEMİRKAN'a,

Laboratuvar çalışmalarımda her zaman yardımını gördüğüm Arş.Gör.Tuba SEVGİ'ye

Tezimin hazırlanma aşamasında dostluklarını ve desteklerini esirgemeyen, zevkle çalıştığım laboratuvar arkadaşlarım Baran Enes GÜLER ve Büşra ÖZALPAR'a,

Tüm yaşamım boyunca hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan, maddi ve manevi desteklerini hep yanımda hissettiğim canım annem Arzu TEK ve kardeşim Mehtap GÖKÖZ'e,

Tanıdığım günden itibaren hep yanımda olan ve tezimin daha kısa sürede bitmesinde ve başarıya ulaşmasında büyük katkı sağlayan sevgili nişanlım Adnan PEKER'e en içten dileklerle teşekkür eder, sevgi ve saygılarımı sunarım.

Meltem GÖKÖZ  
09/09/2016

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa
<b>ÖZET</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	iii
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	iv
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	vi
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	ix
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	xi
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. KAYNAK ARAŞTIRMASI</b> .....	4
2.1. Proteazların Tarihçesi.....	4
2.2. Proteazların Katalitik Mekanizmaları .....	6
2.3. Proteazların Sınıflandırılması.....	6
2.3.1. Endopeptidazlar.....	7
2.3.1.1. Serin Proteazlar .....	8
2.3.1.2. Aspartik Proteazlar .....	8
2.3.1.3. Sistein/Tiyol Proteazlar .....	9
2.3.1.4. Metalloproteazlar .....	9
2.3.2. Oligopeptidazlar .....	10
2.3.3. Ekzopeptidazlar .....	10
2.3.3.1. Aminopeptidazlar .....	10
2.3.3.2. Karboksipeptidazlar.....	10
2.3.4. Omegapeptidaz .....	11
2.4. Proteaz Kaynakları .....	11
2.4.1. Bitkisel Proteazlar .....	11
2.4.2. Hayvansal Proteazlar .....	13
2.4.3. Mikrobiyal Proteazlar.....	14
2.5. <i>Bacillus</i> Genel Özellikleri .....	16
2.6. <i>Bacillus</i> Proteazı.....	18
2.7. Proteazların Endüstriyel Kullanım Potansiyeli .....	19
2.7.1. Gıda Endüstrisi .....	20
2.7.2. Fotoğraf Endüstrisi .....	21
2.7.3. İpek İşlenmesi .....	22
2.7.4. Endüstriyel ve Evsel Atıkların Yönetimi .....	22
2.7.5. İlaç Endüstrisi.....	22
2.7.6. Deri Endüstrisinde Kullanımı .....	23
2.7.7. Deterjan Endüstrisinde Kullanımı .....	24
2.8. Mutasyon .....	25
2.8.1. Radyasyon .....	27
2.8.2. Radyasyon Etkileri .....	28
2.8.3. UV ile İndüklenmiş DNA Lezyonları ve Mutasyonlar .....	30
2.8.4. UV Tamir Mekanizmaları .....	32
2.8.4.1. Fotoreaktivasyon Tamir Mekanizması .....	32
2.8.4.2. Eksizyon Tamir mekanizmaları .....	32
2.8.4.3. Baz Eksizyon Tamir Mekanizması .....	33
2.8.4.4. Nükleotid Eksizyon Tamir Mekanizması.....	34



2.8.4.5.Replikasyon Sonrası Onarım (Post -Replikasyon) Tamir Mekanizması .....	35
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM</b> .....	37
3.1. Materyal .....	37
3.2. Yöntem .....	37
3.2.1.Fiziksel Mutajen UV İle Yapılan Mutasyon Çalışmaları .....	37
3.2.2 Bakteri Üretiminde Kullanılan Besiyerleri ve Bakteri Üretim Koşulları.....	38
3.2.3. Bakteri Üremesinin Ölçülmesi .....	39
3.2.4. Toplam Proteaz Aktivitesinin Tayin Edilmesi .....	39
3.3. Enzim Üretimi Üzerine Etki Eden Besinsel Faktörler .....	40
3.3.1. Karbon (C) Kaynaklarının Etkisi .....	40
3.3.2. Azot Kaynaklarının Etkisi .....	40
3.3.3. Metal İyonu Kaynaklarının Etkisi .....	41
3.3.4. Maksimum Proteaz Üretimi İçin Modifiye Ortamın Hazırlanması.....	41
<b>4. BULGULAR</b> .....	42
4.1 Mutant Bakterilerin Elde Edilmesi.....	42
4.2.Sıvı Ortamda Mutantların Proteaz Enzimi Üretim Kapasitelerinin Saptanması....	46
4.3. Tirozin Standart Grafiği ve Hazırlanışı .....	48
4.4.Enzim Üretimi Üzerine Etki Eden Besinsel Faktörler .....	49
4.4.1. Karbon Kaynaklarının Etkisi.....	49
4.4.2. Azot Kaynaklarının Etkisi .....	51
4.4.3. Metal İyonu Kaynaklarının Etkisi .....	52
4.4.4. Maksimum Proteaz Üretimi İçin Modifiye Ortamın Hazırlanması.....	54
<b>5.TARTIŞMA VE SONUÇ</b> .....	55
<b>KAYNAKÇA</b> .....	61
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	72

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde Orantı
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Amonyum Sülfat
°C	Santigrat Derece
Å	Angström
Asp	Aspartik Asit
Ba <sup>2+</sup>	Baryum İyonu
C	Sitozin
Ca <sup>2+</sup>	Kalsiyum İyonu
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	Kalsiyum Klorür Dihidrat
cm	Santimetre
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
Cu <sup>2+</sup>	Bakır İyonu
CuSO <sub>4</sub>	Bakır Sülfat
dk	Dakika
Fe <sup>2+</sup> / Fe <sup>3+</sup>	Demir İyonu
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Demir Sülfat Heptahidrat
G	Guanin
g	Gram
g/mol	Mol Kütlesi
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen Peroksit
His	Histidin
HCl	Hidroklorik Asit
IU	Uluslararası Enzim Ünitesi
K <sup>+</sup>	Potasyum İyonu
kb	Kilobaz
KCl	Potasyum Klorür
kDa	Kilodalton
kg	Kilogram
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Potasyum Dihidrojen Fosfat
KI	Potasyum İyodür
KNO <sub>3</sub>	Potasyum Nitrat
LiSO <sub>4</sub>	Lityum Sülfat
Log	Logaritmik
M	Molar
mg	Miligram
Mg <sup>2+</sup>	Magnezyum İyonu
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Magnezyum Sülfat
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
mmol	Milimol
Mn <sup>2+</sup>	Mangan İyonu
MnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	Mangan Sülfat Heptahidrat
Na	Sodyum
Na <sup>2+</sup>	Sodyum İyonu

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

$\text{NaCl}$

$\text{NaDPH}_2 \cdot \text{Na}_4$

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

$\text{NaHPO}_4$

$\text{NaNO}_3$

$\text{NH}_4\text{Cl}$

$\text{NH}_4\text{NO}_3$

nm

P

pKa

$R_2$

UV

$\text{Zn}^{2+}$

$\text{ZnCl}_2$

$\text{ZnSO}_4$

$\alpha$

$\beta$

$\mu\text{L}$

$\mu\text{m}$

$\mu\text{M}$

$\mu\text{mol}$

Disodyum Hidrojen Fosfat Heptahidrat

Sodyum Klorür

Dihyronicotinamide Adenin Dinucleotide

Sodyum Dihidrojen Fosfat Dehidrat

Sodyum Fosfat

Sodyum Nitrat

Amonyum Klorür

Amonyum Nitrat

Nanometre

Fosfor

Asidik iyonlaşma sabitesinin negatif logaritması

Regresyon Katsayısı

Ultraviyole

Çinko İyonu

Çinko Klorür

Çinko Sülfat

Alfa

Beta

Mikrolitre

Mikrometre

Mikromolar

Mikromol

## Kısaltmalar

AMP  
Asp  
ATP  
cDNA  
DNA  
DTT  
EC  
EDTA  
Ex  
His  
HIV  
In  
IUBMB  
MW  
O.D.  
PMSF  
rpm  
s  
Ser  
sp.  
UV  
TCA  
Vmax

## Açıklama

Adenozin Monofosfat  
Aspartik Asit  
Adenozin Trifosfat  
Complementary Deoksiribonükleik Asit  
Deoksiribonükleik Asit  
1,4-dithiothreitol  
Enzim Komisyonu  
Etilendiamin tetraasetik asit  
Ekstrasellüler  
Histidin  
Human Immunodeficiency Virus  
İntrasellüler  
Uluslar Arası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği  
Moleküler ağırlık  
Optik Densite  
Phenylmethylsulfonyl Fluoride  
Revolutions Per Minute  
Saniye  
Serin  
Tür  
Ultraviyole  
Trikloro asetik asit  
Maksimum enzim aktivitesi

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 2.1. Proteazların katalitik mekanizması .....	6
Şekil 2.2. Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Uluslararası Sınıflandırma Komitesinin (NC-IUBMB) peptidazlar için ileri sürdüğü enzim sınıflandırması.....	7
Şekil 2.3. Aminopeptidazların alt grupları ve etki mekanizmaları .....	10
Şekil 2.4. Karboksipeptidazların alt grupları ve etki mekanizmaları.....	11
Şekil 2.5. Omega peptidazların etki mekanizması .....	11
Şekil 2.6. Proteazların endüstride kullanım yüzdeleri .....	19
Şekil 2.7. Coğrafi olarak dünya çapında proteaz enzimi market payı 2013-2019 arası .....	20
Şekil 2.8. Radyasyonun sınıflandırılması .....	27
Şekil 2.9. UV dalga boyu ve ozon absorpsiyonu .....	29
Şekil 2.10. UV ışığı etkisi sonucu dimer oluşumu.....	30
Şekil 2.11. UV radyasyonu sonucu en toksik ve mutajenik DNA lezyonu, siklobütan pirimidin dimerleri oluşumu; (A) timin-timin siklobütan pirimidin dimeri, (B) timin-sitosin dimeri .....	30
Şekil 2.12. Fotoreaktivasyon (fotoreversal) tamir mekanizması .....	32
Şekil 2.13. Baz eksizyon tamir mekanizması .....	33
Şekil 2.14. Timin dimerinin T4 fajına özgü baz eksizyon tamir mekanizması .....	34
Şekil 2.15. Nükleotid eksizyon tamir mekanizması.....	35
Şekil 2.16. Replikasyon sonrası onarım (Post-Replikasyon) tamir mekanizması .....	36
Şekil 3.1. UV mutasyonu oluşturma düzeneği.....	37
Şekil 4.1. Ana suş <i>Bacillus subtilis</i> E 6-5'in yağsız süt tozlu ortamındaki proteaz zon çapı (8 mm).....	44
Şekil 4.2. Mutant MET39 (A) ve MET41 (B)'in yağsız süt tozlu ortamındaki proteaz zon çapları sırasıyla, 12 mm ve 10 mm. UV'ye maruz kalma koşulları: MET39 nolu mutant 15 cm uzaklık ve 5 dakika ışınlama süresi, MET41 15 cm uzaklık ve 15 dakika ışınlama süresi .....	44
Şekil 4.3. <i>Bacillus subtilis</i> E6-5 'in proteaz üretim kapasitesi ve üreme değerlerinin zamana bağlı değişimleri.....	47

<b>Şekil 4.4.</b> MET39'un proteaz üretim kapasitesi ve üreme değerlerinin zamana bağlı değişimleri.....	47
<b>Şekil 4.5.</b> MET41'in proteaz üretim kapasitesi ve üreme değerlerinin zamana bağlı değişimleri.....	48
<b>Şekil 4.6.</b> Tirozin standart grafiği .....	49
<b>Şekil 4.7.</b> Karbon kaynaklarının 28. saatte, MET39'un proteaz üretim kapasitesi üzerine etkileri.....	50
<b>Şekil 4.8.</b> Azot kaynaklarının 28. saatte MET39'un proteaz üretim kapasitesi üzerine etkileri.....	52
<b>Şekil 4.9.</b> Metal iyonların 28. saatte MET39'un proteaz üretim kapasitesi üzerine etkileri.....	53



## ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
<b>Çizelge 3.1</b> Bakterilerin saklanması, geliştirilmesi ve enzim üretim kapasitelerinin ölçülmesinde kullanılan besiyerleri.....	38
<b>Çizelge 4.1.</b> 5 cm uzaklıktan yapılan UV denemeleri sonucu elde edilen mutant suşların koloni ve zon çapları .....	43
<b>Çizelge 4.2.</b> 10 cm uzaklıktan yapılan UV denemeleri sonucu elde edilen mutant suşların koloni ve zon çapları .....	43
<b>Çizelge 4.3.</b> 15 cm uzaklıktan yapılan UV denemeleri sonucu elde edilen mutant suşların koloni ve zon çapları .....	44
<b>Çizelge 4.4.</b> <i>Bacillus subtilis</i> E 6-5'in hayatta kalma oranı üzerindeki UV radyasyonun etkisi .....	45
<b>Çizelge 4.5.</b> Ana suş ve bunun mutant suşlarının proteaz üretim kapasitelerinin zamana bağlı karşılaştırılması .....	46
<b>Çizelge 4.6.</b> Farklı karbon kaynaklarının 28. saatte, MET39'un enzim üretimi ve üreme üzerine etkileri.....	50
<b>Çizelge 4.7.</b> Farklı azot kaynaklarının 28. saatte, MET39'un enzim üretimi ve üreme üzerine etkileri.....	51
<b>Çizelge 4.8.</b> Metal kaynaklarının 28. saatte MET39'un proteaz aktivitesi ve üreme miktarı üzerine etkileri .....	53
<b>Çizelge 4.9.</b> Modifiye ortamdaki proteaz aktivitesi ve bakteri üremesi .....	54

## GİRİŞ

Canlılar, yaşamlarını devam ettirebilmek için birçok biyokimyasal tepkimeyi meydana getirmek zorundadırlar. Bu tepkimelerin uygun koşullarda gerçekleştirilmesini sağlayan ve bu tepkimeleri düzenleyen protein yapılı biyolojik katalizörlere "enzim" denir. Enzimlerin ortamda olmamaları durumunda, canlılar tarafından gerçekleştirilen metabolizma faaliyetlerini organizma hayatta kalmak için çok yavaş bir hızla devam ettirir. Enzim terimi ilk kez Alman fizyolog Wilhelm Kühne tarafından kullanılmıştır. Kelime anlamı olarak eski yunanca da "mayada bulunan" (in yeast) anlamına gelse de, günümüzde enzimler tüm canlı organizmalardan; hayvanlardan, bitkilerden ve özellikle de mikroorganizmalardan elde edilebilmektedir (Polaina ve Maccabe 2007).

Hücrelerde önemli metabolik görevlere sahip olan enzimler, günümüzde çok çeşitli amaçlar da kullanılmak üzere günlük ve ekonomik hayata da girmişlerdir. Yiyecek ve içecek endüstrisinde kullanılan proteazlar, bazı lezzetlerin ve kıvamın oluşmasında yardımcı olmaktadır. Örneğin; transglutaminaz ile daha iyi bir ekmek kıvamı ve beta glukanaaz ile de daha iyi bir şarap tadı elde edilir. Gıda endüstrisinde et ve balık işlenmesinde önemli rollere sahip olan bu enzimler, et tokmağı ve bazen glutamik asit oluşturarak tatlandırıcı ajan gibi hareket ederler ve bundan dolayı monosodyum glutamat yerine geçebilirler. Diğer etkileri arasındaki, soya sütü ve buğday gluteni işleme endüstrileri ayrıca önemli uygulama alanlarıdır. Temizleme amacıyla çamaşır uygulamalarına uygun olan çoğu proteaz paylaşımları; daha yüksek veya düşük sıcaklıklarda, daha yüksek veya düşük pH değerlerinde etki edebilen, ayrıca ağartıcı varlığında çalışabilmek için oksitlenme yoluyla stabil olabilen ekstremofilik doğal proteazın bulunmasında tam destek sağlamıştır. Proteaz uygulamalarında, kontak lens solüsyonları, yüz maskeleri, cilt temizleyicileri, saç bakım kremleri diş temizleme macunu ve ağız temizliği hijyeni en iyi bilinenleridir. Peeling özellikleri nedeniyle papain, bromelin, tripsin, pankreatin ve kollajenaz potansiyel kozmetik uygulamalarında kullanılmaktadır. Deri endüstrisinde, proteaz yardımı bazı proteinleri çözmede, kuruma özelliklerini iyileştirmek için deri kalıntılarını açmayı hızlandırmada, deriyi esnek, yumuşak ve daha temiz yapmakta kullanılır. Proteazlar ayrıca derinin kıl temizleme sürecinde dokuya en az zarar verecek şekilde katalizörlerle bir araya gelmektedir (Ather 2009).



Modern teknolojik gelişmeler dünya çapında endüstriyel enzim üretiminde artışa sebep olmuştur. Günümüzde, endüstriyel öneme sahip enzimler arasından proteazlar Novo, Gist-Brocades, Genencor ve Miles laboratuvarları gibi büyük üretici firmalar ile dünya çapındaki toplam enzim market payının yaklaşık olarak %60'ına hakimdir (Feijoo-Siota ve Villa 2011). Proteaz pazarı özellikle son birkaç yıl içinde hızla büyüme göstermiş ve 2016'dan 2021 kadar %6 yıllık bileşik büyüme oranı (CAGR) ile 2021'de 2.21 milyar değere ulaşacağı tahmin edilmektedir (Anonim 2016a).

Proteolitik enzim aktivitesi, gıdasal proteinlerin parçalanması, proteinlerin membranlar arası geçişi, hücre bölünmesi, kan pıhtılaşma kaskad reaksiyonu, polipeptid hormonların üretimi, apoptozis ve retroviruslerin replikasyonu dahil olmak üzere birçok hastalığa neden olan organizmaların hücre siklusu gibi bir çok fizyolojik süreçte gereklidir (Neurath ve Walsh 1976, Devlin 2002). Birçok konakçı ve patojenlerin hücre siklusundaki anahtar rollerinden dolayı, tıbbi, farmasötik ve akademik öneme sahiptirler (Antonelli ve Turriziani 2012, Li ve ark. 2013). İnsan genlerin yaklaşık %2'inin proteolitik enzimleri kodladığı tahmin edilmektedir (Craik 2011). Proteazlar biyoteknoloji ve endüstrinin birçok sektöründe yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca Klenow fragmentlerinin üretimi dahil olmak üzere, peptid sentezi, nükleik asit pürifikasyonu sırasında istenmeyen proteinlerin parçalanması, doku ayrışmasında ve hücre kültürü deneylerinde proteazların kullanımı, araştırma, teşhis ve terapi için rekombinant antikor fragmanlarının hazırlanması, yapısal çalışmalar ile yapı-işlev ilişkilerinin keşfi, peptid sekansları ve proteomiklerdeki proteinlerin proteolitik sindirimi gibi çok sayıda araştırma uygulamalarında da proteazların kullanımı gerekmektedir (Tözsér ve ark. 2013).

Genel olarak mikroorganizmalardan yüksek oranda enzim verimi elde etmek için, ya mutasyonla yeni mutantlar elde edilmekte ya mikroorganizma doğrudan izole edilmekte ya da üretim ortamının değiştirilmesi yoluna gidilmektedir. Özellikle besin ortamında bulunan karbon ve nitrojen kaynakları, inorganik tuzlar ve diğer büyüme faktörleri, bakterilerin enzim üretme kapasiteleri üzerinde önemli etkiye sahiptir (Khalil ve ark. 2003).

Klasik mutasyon teknikleri ile yeni mutantların eldesi ve böylece ana suştan birkaç misli enzim üretimi mümkün olmaktadır. Birçok araştırı tarafından endüstriyel öneme sahip olan proteaz enzimini yüksek verimde üreten yeni suşlar elde etmek için çeşitli mutajenler mutasyon etkeni olarak kullanılmışlardır.

Bu tez çalışmasında daha önceden izole edilmiş ve adlandırılmış olan *Bacillus subtilis* 168 E6-5 suşundan fiziksel mutasyon yoluyla yeni verimli mutant suşların elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla fiziksel mutajen etkeni olarak DNA timin dimerlerinin oluşumuna neden olan ultraviyole (UV) kullanılmıştır. Besinsel faktörlerin enzim aktivitesi üzerine etkilerini araştırmak için, farklı karbon (C), nitrojen (N) kaynakları ve metal iyonları gibi temel ortam maddeleri kullanılmıştır. Ayrıca enzimin yüksek verimde elde edilmesi için, tarafımızdan modifiye ortam hazırlanmış, bu ortamda üretilen mutant *Bacillus subtilis* suşunun üreme ve proteaz aktivite tayinleri yapılmıştır.



## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. Proteazların Tarihçesi

İnsanlar hayvansal doku ya da bitki ekstratlarından elde edilen enzimleri, enzimlerin doğası ve özelliklerini bilinmeden öncede de çeşitli alanlarda kullanmışlardır.

Uzun zamandan beri hayvan ve bitkilerden elde edilen ham materyallerin işlenmesinde mikroorganizmalar ve enzimler kullanılmıştır. Mısır duvar resimlerinde alkollü içeceklerin üretimi, ekmek yapımında fermente maya hamurları gibi geleneksel süreçler rastlanılmaktadır.

Günümüzde endüstriyel öneme sahip mikrobiyal enzimlerin üretimi Jokichi Takamine tarafından küflerden enzim üretimi üzerine yaptığı çalışmalarıyla başlamıştır. 1984 yılında Takamine *Aspergillus oryzae*'den ürettiği karbohidraz ve proteolitik enzimlerden oluşan diastatik enzim preparatına "Takadiastase" adını vermiştir (Takamine 1984). Ayrıca hayvansal organlardan elde edilen enzim preparatları da önemli endüstriyel rollere sahiptir. 1907 yılında Otto Röhm tarafından deri üretiminde postların sama ve kıl giderme de pankreatik proteazların etkileri keşfedilmiştir (Röhm 1907). Daha sonra ilk standardize edilmiş enzimatik sama maddesi geliştirilmiş ve "Oropon" adı altında satışa sunulmuştur. Röhm ürettiği pankreatik enzimleri ham ipeğin zamklaşmasında da kullanmıştır. 1913 yılında "Burnus" adıyla ilk ticari enzimatik deterjan yine Röhm tarafından piyasa sürülmüş ve pankreatik enzimlere ek olarak, içerisine deterjanın pH değerini 9'un altında düzenleyen sodyum bikarbonat ve sodyum karbonat eklenmiştir. Pankreatik enzimler düşük sıcaklıklarda bu pH aralığında stabil ve yeterli aktiviteye sahipken, sekestranlar, anyonik deterjanlar ve yükseltgen maddeler içeren yeni deterjan formüllerinde inaktiflerdir. Bitkisel kaynaklı enzimler özellikle papain meyvesinden elde edilen proteazlar da endüstriyel öneme sahiptirler. 1911'de ilk kez Wallerstein tarafından biranın donmaması için papain kullanılmıştır (Uhling 1998).

1917 yılında Boidin ve Effront, sıvı nütrient ortamda büyüyen *Bacillus subtilis* kültürlerinden enzim preparatı üretmek için patent almışlardır. Bu preparat malt yerine geçebilen amilaz ve az miktarda proteaz içermektedir. 1932'lerin başlarında Röhm ve Haas yarı katı kültürlerde mantarlardan proteaz üretmeye başlamışlardır. 1934'lerde meyve sularını berraklaştırma ve üzümlerden su ekstraksiyonu işlemlerinde kullanılan ilk pektinaz preparatları benzer metodlarla üretilmiştir (Aunstrup 1973).

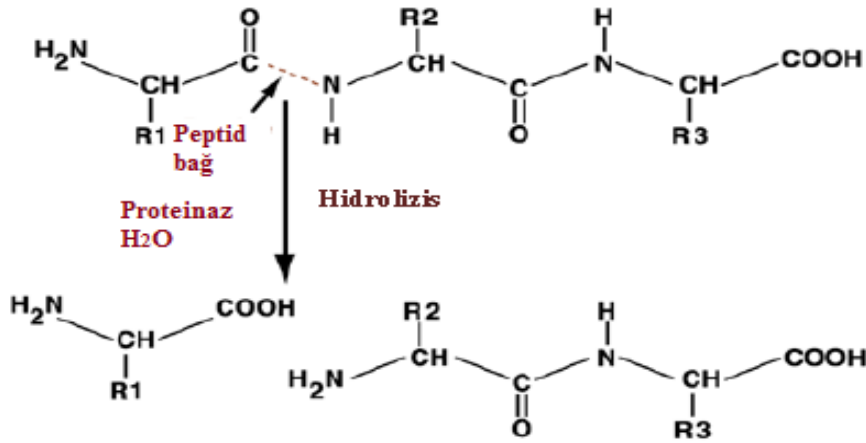
İlk araştırmacılar enzimlerin proteinlerle ilişkili olduğunu rapor etmiş buna karşı, Willstatter, proteinlerin enzim taşıyıcısı olduğunu ve kendi başlarına katalitik aktivitelerinin bulunmadığını ileri sürmüştür. Ancak 1926'da Sumner, üreaz enzimini kristal hale getirerek, saf bir protein olduğunu açıklamıştır. 1838 yılında ise Northrop, Kunitz ve Herriott (Northrop 1938) adlı araştırmacılar ilk defa "Kristalize Enzimler" adlı yayınlarında, genel görüşlerin aksine, izole edilen kristal proteolitik enzimler ve proteaz inhibitörlerinin, sabit çözünürlükteki kimyasal maddeler olduğunu kanıtlamış ve bundan dolayı saf bileşiklerin termodinamik kriterlerine sadık kalmışlardır. Bu bileşikler; pepsinojen, pepsin ve pepsin inhibitörü, kimotripsin, tripsin, onların zimogenleri ve inhibitörleri, karboksipeptidaz, ribonükleaz, heksokinaz, difteri antitoksini, ve birkaç farklı çeşitte enzimdir (Neurath 1999). Bu çalışmaları ile Summer'ın vardığı sonuç geniş çapta kabul görmüş ve 1946 Nobel kimya ödülü ile onurlandırılmışlardır (Anonim 2015).

1958'de Underkofler ve arkadaşlarının yayınladığı ticari enzim preparatları listesine göre, bira ve deri endüstrisinde kullanılmak üzere en fazla mikrobiyal proteaz ve amilaz üretilirken, pektinaz, laktaz, invertaz, lipaz ve sellülozlar gibi diğer enzimler düşük miktarlarda üretilmiştir. 1959 yılında ise Jaag adlı araştırmacı aktif bileşen olarak *Bacillus subtilis*'ten elde edilmiş proteaz içeren farklı bir enzimatik deterjan geliştirmiştir (Uhling 1998). Daha sonra Novo şirketi ticari ölçekte *Bacillus licheniformis*'ten alkali bakteriyel proteaz üretimine başlamıştır. Ancak Amerika da rapor edilen alerjik reaksiyonlar ve akciğer hastalıkları nedeniyle bakterial proteazların kullanılmasına kısa süreliğine ara verilmiştir. Özellikle bu alerjiler deterjanların üretilmesi boyunca toz enzim konsantreleriyle direkt temas eden çalışanlarda meydana gelmiştir. Konsantrelerin granüler hale getirilmesiyle mevcut riskler önlenmiş ve 1971'de National Academy of Sciences (USA), tüketicilere deterjanların içeriğinde bulunan enzimlerin tamamen sağlığa zararsız olduğunu açıklamıştır (Uhling 1998).

Günümüzdeki kromatografik ve elektroforetik metodların geliştirilmesiyle proteaz ve diğer enzimlerle ilgili çalışmalar hız kazanmaktadır.

## 2.2. Proteazların Katalitik Mekanizmaları

Proteazlar ya da diğer isimlendirilmeleri olan peptidazlar/ proteolitik enzimler proteinlerdeki peptid bağlarının hidrolizini katalizleyen enzimlerdir (Polgar 1989) (Şekil 2.1)



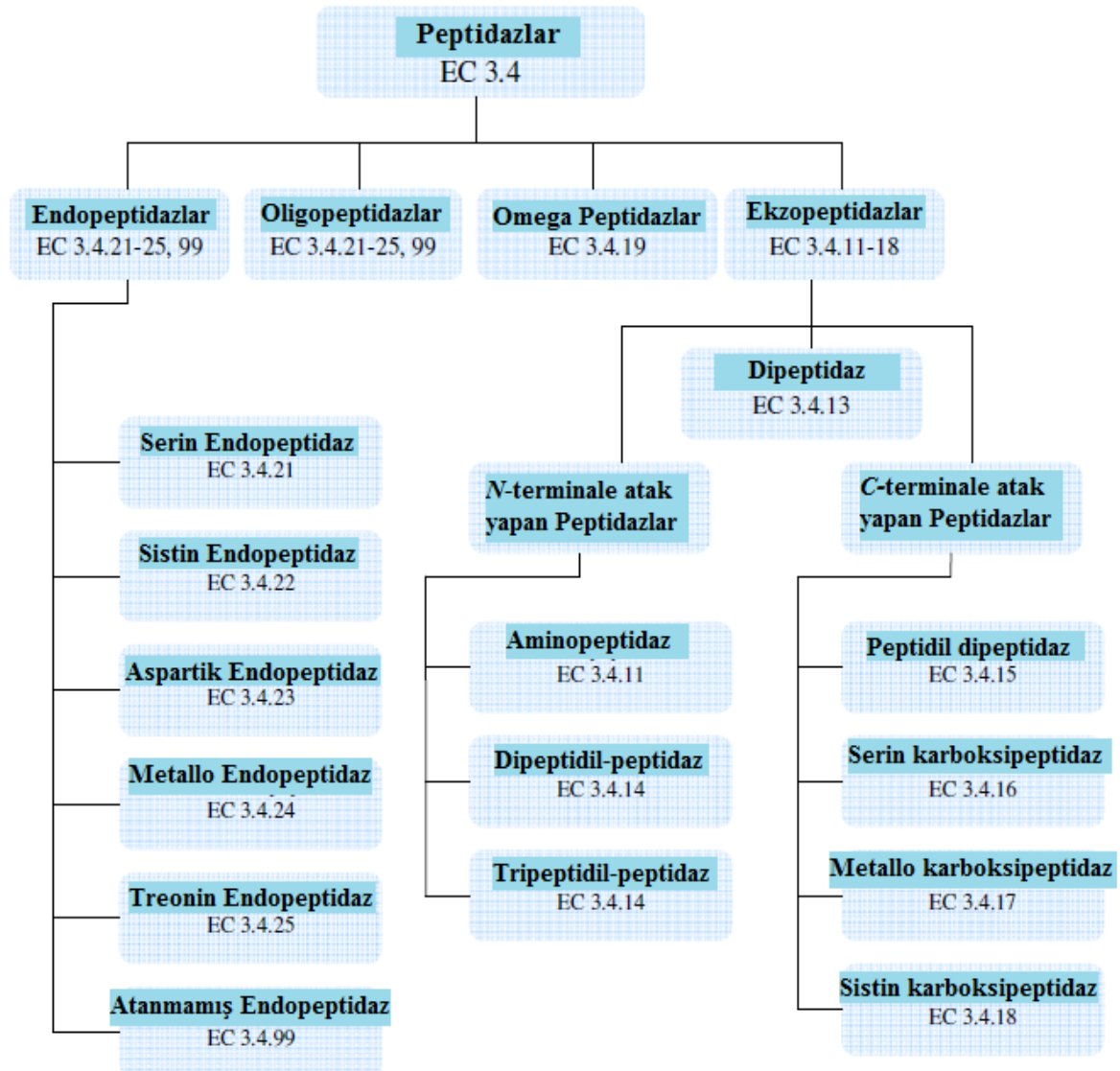
Şekil 2.1. Proteazların katalitik mekanizması (Polgar 1989)

Barrett' e göre şimdiye kadar 2.000'den fazla peptidaz türü tanınmıştır ve bunlar MEROPS (peptidaz veri bankası) verilerinde listelenmiştir (<http://merops.sanger.ac.uk/>). MEROPS'da mevcut tüm veri tabanının üçte ikisinden fazlası bilinen proteolitik dizilerin arasında sinyal grupları bilinmeyen peptidaz grupları da yer almaktadır. Bunun nedeni mevcut peptid türlerinin holo tipine yeteri kadar benzememeleridir, ancak birçoğu benzer spesifik ve holo tipe sahip yeni tanınmış türlerin içine konulmaktadır (Barrett and Rawlings 2007).

## 2.3. Proteazların Sınıflandırılması

Proteazların sınıflandırılmasında benzer gruptaki hidroliz için göreceli seçicilik esası üzerinden daha geniş kapsamlı sınıflandırılmaya gidilmiştir. Bunlar; iki büyük sınıf olan endopeptidazlar (büyük proteinlerin uçlarından uzağa atak yapanlar) ve ekzopeptidazlara (polipeptidin ucuna atak yapanlar), iki küçük sınıf olan oligopeptidazlar (küçük proteinlerin uçlarından uzağa atak yapanlar) ve omega-peptidazlara (proteinlerin uçlarına hareket edenler) ayrılabilirler.

İki büyük sınıf daha sonra etki mekanizmasına göre ve etkinin izlediği yol ve bölgelerine bağlı olarak alt sınıflara ayrılır (Barrett 1998). Bu sınıflandırma, esas olarak Enzim Komisyonları Adlandırma Komitesi (IUBMB) tarafından ileri sürülmüştür (Tipton 1994, <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC34/>). Bu terminolojinin genel detayları Şekil 2.2' de verilmiştir (Ather 2009).



**Şekil 2.2** Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Uluslararası Sınıflandırma Komitesinin (NC-IUBMB) peptidazlar için ileri sürdüğü enzim sınıflandırması (Ather 2009)

### 2.3.1. Endopeptidazlar

Endopeptidazlar, N ya da C terminal uçlarından uzak konumlu alfa-peptidaz bağlarına atak yaparlar. Kimotripsin, pepsin ve papain en yaygın örnekleridir. Endopeptidazlar, proteolizis olayında özgül ve sınırlı rollere sahiptirler. Örneğin; salınan proteinlerden sinyal peptidlerin uzaklaştırılması (sinyal peptidaz I) ve öncül proteinlerin olgunlaşması (enteropeptidaz) (Barrett ve Rawlings 1991).

Endopeptidazlar katalik mekanizmalarına göre alt sınıflara ayrılır ve spesifikiteyi sadece gruplar içinde bireysel enzimleri tanımlamak için kullanılır. Bunlar; serin endopeptidazlar (E.C 3.4.21), sistin endopeptidazlar (E.C 3.4.22), aspartik endopeptidazlar (E.C 3.4.23), metallo endopeptidazlar (E.C 3.4.24), treonin endopeptidazlardır (E.C 3.4.25). Ayrıca katalik

etkisi bilinmeyen endopeptidazlar (E.C 3.4.99) ayrı bir grup olarak bulunmaktadır (Bergmann ve Ross 1936, Rowan, Buttle ve ark.1990, Barrett ve Rawlings 1991, Rawlings ve Barrett 1994, Rawlings ve Barrett 1995, Rawlings ve Barrett 1995).

### **2.3.1.1.Serin Proteazlar**

Serin proteazlar, spesifik aktif bölgelerinde bulunan serin (Ser), histidin (His) ve aspartik (Asp) ile karakterize edilen, bugüne kadar çalışılmış en geniş çaplı proteolitik enzimlerdir (Castro ve ark. 2010). Serin proteazlar, kimotripsin ve subtilin olmak üzere iki büyük familyaya ayrılırlar. Kimotripsin, tripsin ve elastaz kimotripsin ailesindedir (Neurath 1989). Kimotripsin, tirozin, triptofan ve fenilalanin gibi spesifik hidrofobik aminoasitlerden sonra gelen peptid bağlarını ayırırlar. Tripsin, lizin ve arjinin gibi pozitif yüklü aminoasitleri takip eden peptid bağlarını hidrolize ederler. Elastaz, alanin, glisin ve valin gibi aminoasitlerin yanındaki peptid bağlarını hidrolize eder.

Kimotripsin ailesinden farklı, subtilisin familyasının katalitik triyadın dizilişi Asp-32, His-64 ve Ser-221 şeklindedir. Subtilisin aromatik ya da hidrofobik aminoasit dışında tüm aminoasit peptid bağlarını ayırır (Bond 1989). Subtilisin, aminoasit dizi modelleri baz alınarak, sınıf I ve II olarak ayrılır. Sınıf I subtilisin, bakterilerde bulunan ekstrasellüler enzimlerdir ve sınıf II subtilisin, mantarlarda bulunan ekstrasellüler enzimlerdir. Her ikisi de besin alınımında rol oynar (Monod ve ark. 1991). Bugüne kadar karakterize edilmiş tüm mantar subtilisinler, *Tritirachium album*'den üretilen proteinaz K'la homologdurlar. Subtilisin benzeri proteazlar için çeşitli fizyolojik roller ileri sürülmüştür (Seeger ve ark. 1999).

### **2.3.1.2.Aspartik Proteazlar**

Çoğunlukla asidik proteazlar olarak bilinen aspartik proteazlar, katalitik aktiviteleri için aspartik asit köküne bağlı, bir endopeptidaz çeşididirler. Asidik proteazlar; pepsin (A1), retropepsin (A2) ve pararetrovirüsler için enzimler (A3) olmak üzere üç familyada kategorize edilirler. A1 ve A2 familyalarının birbirleriyle ilişkili olduğu bilinirken A3 familyası bu iki familyayla daha az benzerlik gösterir. Çoğu aspartik proteaz düşük pH'larda maksimum aktivite gösterir ve izoelektirik noktaları pH 3-4.5 aralığında değişir. Moleküler ağırlıkları 30-45 kDa aralığındadır. Mikrobiyal aspartik proteazlar iki gruba ayrılabilirler; *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Neurospora* tarafından üretilen pepsin benzeri enzimler ve *Mucor* ve *Endothia* tarafından üretilen renin benzeri enzimler (Rao ve ark. 1998).

### 2.3.1.3.Sistein/Tiyol Proteazlar

Sistein proteazlar hem prokaryot hem de ökaryotlarda bulunabilirler. Yaklaşık 20 familyası olduğu rapor edilen sistein proteazlar, sistein (Cys) ve histidin (His) rezidüsüne bağlı aktivite gösterirler. His ve Cys köklerinin sıralanışı (Cys-His veya His-Cys) familyalar arasındaki farklılıkları oluşturur. Sistein proteazlar genellikle sistein gibi indirgeyici maddelerin varlığında aktivite gösterirler. Aktif merkezlerinin spesifiteleri temel alındığında; papain benzerleri, tripsin benzerleri, glutamik asite spesifik olanlar ve diğer tiplerdeki sistein proteazlar olmak üzere dört gruba ayrılırlar. Papain en iyi bilinen sistein proteazıdır (Maheshwari ve ark.2000).

Bazı sistein proteazlar nötral pH'da optimum aktiviteye sahiptirler (Rao ve ark.1998). *Humicola lanuginosa* üretilen proteazlar tercihen, hidrofobik aminoasit kalıntılarının C-terminal ucunu ayırırlar. Bu proteazların sentetik substratlara karşı substrat spesifikliğı ve üç afinite matriksiyle etkileşimi bitki enzimi olan papain gruplarından farklıdır. Bu enzim mantarlardan elde edilmiş sistein proteazının benzersiz bir örneğini temsil eder (Shenolikar ve ark.1982).

### 2.3.1.4.Metalloproteazlar

Metalloproteazlar, proteazın katalitik tiplerinin en çeşitli olanlarıdır. Aktiviteleri için divalent metal iyonlarına ihtiyaç duymalarıyla karakterize edilirler. Katalitik fonksiyonları çoğunlukla çinko tarafından yürütülür. Ancak bazı enzimlerde bu fonksiyon manganez, kobalt, nikel veya bakır iyonları tarafından da gerçekleştirilir (Sari 2011). Metal iyonları; histidin, glutamat, aspartat, arjinin veya lisin aminoasit kalıntılarında üçü tarafından çevrelenerek kompleks oluşturur. Kataliz sırasında metal iyonu, aktif bölgedeki su molekülünün oksijen atomu ile karbonil karbon üzerine olan nükleofilik saldırısını teşvik eder ve aktif bölgedeki aminoasit H<sub>2</sub>O'dan H<sup>+</sup> uzaklaştırarak bu reaksiyona yardım eder (Anonim 2000).

Yaklaşık 30 familyası olduğu rapor edilen metalloproteazların, 17 familyası endopeptidaz, 12 familyası ekzopeptidaz ve yalnızca 1 familyası endo ve ekzopeptidazlara dahildir. Metalloproteazların tamamı EDTA gibi şelat ajanları tarafından inhibe edilebilirler ancak DFP ya da sülfidril ajanlar tarafından inhibe edilmezler. *Thermoascus aurantiacus* (Dini ve ark. 2009), *Aspergillus oryzae* (Sumantha ve ark. 2005) metalloproteazlara örnektir.



### 2.3.2.Oligopeptidazlar

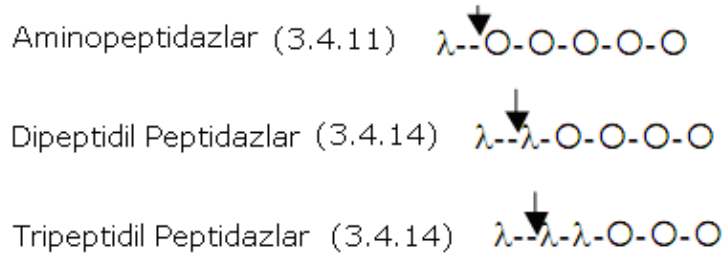
Oligopeptidazlar, proteinlerden daha küçük olan substrat yüzeylerine atak eğilimindedirler. Örneğin; Thimet Oligopeptidaz (Barrett, Brown ve ark. 1995, Knight, Dando ve ark. 1995).

### 2.3.3.Ekzopeptidazlar

Ekzopeptidazlar, serbest N-terminal amino grubu, C-terminal karboksil grubu ya da her ikisine de ihtiyaç duyarlar ve uçtan üçü geçmemek üzere kalıntıları hidroliz ederler (Hasegawa 1960, Nardi 1960). Polipeptid zincirlerin N ve C uçlarına atak yapan bölgelerine bağlı olarak, aminopeptidaz ve karboksipeptidaz şeklinde adlandırılırlar.

#### 2.3.3.1.Aminopeptidazlar

E.C 3.4.11 grubuna giren aminopeptidazlar, substratın serbest N-terminal ucuna hareket ederler ve hidroliz etmesine göre; tek bir aminoasit kalıntısı, dipeptid ya da tripeptid bırakırlar. E.C. 3.4.14 grubuna giren dipeptidil-peptidaz, substrattan N-terminal dipeptid hidroliz eder. E.C 3.4.14 grubuna giren tripeptidil peptidaz, substratın N-terminal ucundan tripeptid hidroliz eder (Şekil 2.3). Aminopeptidazlar *E. coli*'den üretilen 400 kDa'luk büyük proteazlardır. Aminopeptidazlar optimum aktivitesi için  $Mg^{+2}$  ya da  $Mn^{+2}$  ve pH 7.5-10.5 pH aralığına ihtiyaç duyarlar (Marco ve Dick, 1978).



Şekil 2.3. Aminopeptidazların alt grupları ve etki mekanizmaları (Tanksale 2001)

#### 2.3.3.2. Karboksipeptidazlar

Bu peptidazlar substratın serbest C-terminal ucundan tek bir kalıntı ya da dipeptid hidroliz ederler. Karboksipeptidazlar (E.C 3.4.16-18); serin-karboksipeptidazlar (E.C 3.4.16) metallo-karboksipeptidazlar (E.C 3.4.17) ve sistein-karboksipeptidazlar (E.C 3.4.18) olmak üzere alt sınıflara ayrılırlar (Şekil 2.4) (Rawlings ve Barrett 1997). Ayrıca peptidil-dipeptidaz (E.C 3.4.15) substratın C-terminal ucundan dipeptid hidroliz eder. Buna peptidil-dipeptidaz A ve anjiyotensin dönüştürücü enzim örnektir (Cushman ve Cheung 1971, Lee, Larue ve ark. 1971).

Karboksipeptidazlar (3.4.16-18)  $\text{O}-\text{O}-\text{O}-\text{O}-\text{O} \downarrow \lambda$

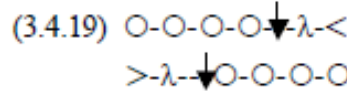
karboksipeptidaz -serin (3.4.16)  
karboksipeptidaz -metallo (3.4.17)  
karboksipeptidaz -sistein (3.4.18)

**Şekil 2.4.** Karboksipeptidazların alt grupları ve etki mekanizmaları (Tanksale 2001)

### 2.3.4. Omegapeptidaz

Omegapeptidazlar substratın serbest N ya da C terminal ucuna ihtiyaç duymazlar, ancak terminal uca yakın hareket bölgeleri artar (Şekil 2.5). Hareket bölgeleri  $\alpha$ -karboksilin  $\alpha$ -amino grubuyla yaptığı bağ dışındaki yerlerdir. Bu nedenle, endo- ve ekzo- peptidazlardan tamamen farklıdır. İzopeptid bağlarla bağlı ya da siklize terminal kalıntıları üzerine hareket edebilirler. İzopeptid bağlar,  $\alpha$ -karboksilin  $\alpha$ -amino grubuyla yaptığı bağlar dışındaki peptid bağlarıdır.

Omega peptidaz



**Şekil 2.5.** Omega peptidazların etki mekanizması (Tanksale 2001)

### 2.4. Proteaz Kaynakları

Proteazlar bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar gibi çeşitli kaynaklardan izole edilebilirler.

#### 2.4.1. Bitkisel Proteazlar

Bitkisel kaynaklı proteazlar katalitik aktivitelerinden sorumlu, aktif bölgelerindeki sülfidril grupları tarafından karakterize edilmekte ve özellikle tropikal bitkiler olmak üzere sayısız bitkiden izole edilebilmektedir. Ayrıca bitkilerden proteaz üretimi, zaman alıcı bir işlemdir. Papain, bromelain, keratinaz ve fisin bitkisel kökenli en iyi bilinen proteazların bazılarıdır (Uhling 1998). Endüstriyel enzimlerin ana kaynağı yeşil papaya bitkisidir ve bu bitkiden elde edilen enzime "papain" adı verilmektedir. Enzimin ham preparatı, birkaç proteaz ve peptidaz izozimleri bulundurmasından dolayı geniş spesifikiteye sahiptir. Enzim pH 5.0-9.0 değerleri aralığında aktif ve substrat varlığında 80 ya da 90°C dereceye kadar dayanıklıdır. Papain enzimi yüksek çözünürlükteki ve aromalı proteinlerin hidrolizatlarının hazırlanmasında endüstride geniş kapsamlı kullanılmaktadır (Rao ve ark 1998).

Papainin kullanımı uzun bir tarihe sahiptir (Schechler 1967). Hindistan, batı ve orta Afrika subtropikal bölgelerinde yetişen *Carica papaya* meyvesinin lateksinden elde edilmektedir. Enzim verimliliği bitkinin yetiştiği iklim koşullarına ve bitkisel kaynaklı proteazların ekstraksiyonu ve saflaştırılması için kullanılan yöntemlere bağlıdır. Yeşil genç meyvenin, yüzeyi boyunca keskin bir bıçakla çizilmesiyle, yapısındaki renksiz lateks maddesi ortaya çıkar ve koagülasyondan önce birkaç dakika içinde süt beyazı rengine döner. 1 kilogram lateks yaklaşık 200 gram ham papain içermekte ve ortalama ağaç başına 450 gram lateks elde edilebilmektedir. Ham papain, %10 protein, papaine benzer fakat spesifiteleri farklı %45 kimopapain A ve B (Kunimastu ve Yasunobu 1967) ve diğer enzimlerin birkaçını içermektedir. Bu enzimler; Endo- $\beta$ -1,4-glukanaz, kitin-parçalayıcı hidrolaz, karboksipeptidaz, lizozim ve lipazdır. Ayrıca taze papaya lateksinde amilaz aktiviteside ölçülebilir (Uhling 1998).

Bromelain ananasın suyu ya da kökünden elde edilebilen bir proteazdır. Ananas suyundan (*Ananas comosus*) ağırlıklı olarak (EC 3.4.22.33) meyve bromelain elde edilirken, ananas kökünden (EC 3.4.22.32) ananın ve (EC 3.4.22.31) comasain adı verilen sistein proteazları da elde edilmektedir (Rowan ve ark. 1990). Ayrıca benzer proteazlar yüksek proteolitik aktiviteyle ananasın kabuğu, çekirdek, taç ve yapraklarında da bulunmaktadır (Ketnawa 2012). Bromelain enzimi sindirime yardımcı ürünler, sağlık preparatları, kozmetik, diyet gıdalar, bira stabilizasyonu, tenderizasyon ve tekstil gibi birçok uygulamada kullanılmaktadır. Ayrıca diş beyazlatma macunları ve cilt ürünlerinde de aktif katkı maddesi olarak yaygın bir şekilde kullanımı tasarlanmıştır (Chakravarthy ve Achary 2012). Bu enzimin dünyadaki en büyük üreticisi Great Food (Biochem) firmasıdır. Enzim pH 5.0-9.0 değerleri aralığında aktiftir ve 70°C gibi papainden düşük sıcaklıklarda inaktiftir.

Keratinaz bitkilerin bazıları tarafından üretilen, saçı degrade eden bir proteazdır. Saç ve yün sindirimi atık su sistemlerin tıkanmasını önlemek ve lizin gibi esansiyel aminoasitlerin üretimi için oldukça önemlidir.

Fisin incir lateksinden elde edilen, çok yüksek proteolitik aktiviteye sahip bir enzimdir, ancak kurutma işlemi aktivitenin çoğunu yok eder. Çoğunlukla *Ficus glabrata*'nın kurutulmuş lateksinden izole edilmektedir ve ayrıca *F.carica*, *F. elastica* gibi *Ficus* 'un diğer türlerinde de fisin enzimi mevcuttur (Polaina ve MacCabe 2007).

## 2.4.2. Hayvansal Proteazlar

Hayvansal orijinli en bilinen proteazlar; pankreatik tripsin, kimotripsin, pepsin ve renindir. Tripsin, gıda olarak alınan proteinlerin hidrolizinden sorumlu başlıca bağırsak sindirim enzimidir. Bir serin proteazı olan tripsin, lisin ve arjinin rezidülerinin katıldığı karboksil gruplardaki peptid bağlarını hidrolizler. Proteaz inhibitörlerinin böcek bağırsağındaki enzimi inhibe etme özelliklerinden yola çıkarak, bu enzim zararlı haşerelerin biyokontrolü için hedef olarak ilgi görmüştür. Enzimin oluşturduğu protein hidrolizatlarının çok acı tada sahip olmasından dolayı gıda endüstrisinde tripsinin uygulama alanları sınırlıdır. Bakteriyel ortamların hazırlanmasında ve saf ya kristalize formlarda yara tedavisinde tıbbi kullanımı mümkündür (Mahajan ve Badgujar 2010).

Kimotripsin hayvansal pankreatik ekstraktlar da bulunan bir sindirim enzimidir. Saf kimotripsin pahalı bir enzim olduğundan, sadece teşhis ve analitik uygulamalarda kullanılabilir. Kimotripsin özellikle fenilalanin, tirozin ya da triptofan, aromatik aminoasitlerinden birinin bulunduğu karboksil gruplarındaki peptid bağlarının hidrolizi için spesifiktir. Öncü madde olarak kimotripsinojen şeklinde pankreas da depolanır ve çok aşamalı süreçler de tripsin tarafından aktive edilirler (Mahajan ve Badgujar 2010).

Pepsin, 1836 da Ch. Schwann tarafından keşfedilen ilk hayvansal proteazdır. İnaktif proenzim "pepsinojen" olarak gastrik mukoz membranlarından salgılanır ve mide asidinin etkisiyle aktif proteazlara dönüşür. Bu otokatalitik etkinliği pH 6.0'nın altında meydana gelir. Mide optimal pH'ı 2.0-4.0 olduğu halde, pH 1.0-2.0 aralığında optimal aktivite gösterirler. Pepsin, tercihen aromatik aminoasitleri bağlayan peptidlerle, glutamik asit, sistein ve sistin peptidlerinin hidrolizini katalizler (Rao ve ark. 1998).

Renin (rennet, kimozin) tüm süt veren memelilerin midesinde bulunan, pepsin benzeri bir asidik proteazdır. Mide mukoz membranlarında inaktif öncü madde "pro-renin" olarak üretilirler (Rao ve ark 1998). Aktivasyonu pH 5.0'in altındaki H<sup>+</sup> iyon konsantrasyonlarında gerçekleşir. Yüksek oranda saflaştırılmış bir birim kimozin , 10 dakika içinde 72 milyon birim sütü koagüle edebilir (Uhling 1998).

### 2.4.3.Mikrobiyal Proteazlar

Mikrobiyal proteazlar daha kolay kültüre edilebilmeleri ve hızlı büyümelerinden dolayı bitki ve hayvansal protezlardan daha çok tercih edilmektedir (Sharma ve ark. 2006). Mikrobiyal proteazlar dünya çapındaki enzim satışlarının yaklaşık olarak %40'ına tekabül etmektedir. Proteaz kaynağı olarak bakteri, fungus ve virüs gibi mikroorganizmalar kullanılmaktadır.

Fungal kaynaklı proteaz enziminin potansiyel kullanımının artmasıyla, bunlardan elde edilen proteaz da büyük bir uygulama alanına sahip olmuştur. Örneğin; süt endüstrisinde, *Rhizomucor pusillus* ve *R. miehei*'den elde edilen renin proteazları peynir yapımında (Aehle 2004), *Aspergillus oryzae*'den elde edilen asit proteazları sindirime yardımcı olarak ve besinsel proteinlerin modifikasyonunda (Vishwanatha ve ark. 2009), ilaç endüstrisinde, *A. fumigatus*'dan elde edilen proteazlar invaziv aspergilloz tanı ve izlenmesinde kullanılmaktadır (Schaal ve ark. 2007). *Aspergillus niger*'den elde edilen alkali proteazlar ise deterjan endüstrisinde uygulanmaktadır (Devi ve ark.2008). Fungal proteazlar, istenilen ürünün hücre kütlelerinden ayrılarak saflaştırılmasını kolaylaştırılması, mantar hücrelerinin basit filtreleme ile son üründen kolayca arındırılabilmesi, mantarların ucuz substratlar üzerinde gelişebilme yeteneği, tekrar eden kullanımlar için miselyumun kolay bloke edilmesi ve pH 4-11 gibi geniş bir aralıkta gelişebilmeleri açısından belirgin avantajlar sunmaktadır (Gupta ve ark. 2002, Sharma ve ark 2006, Hussain ve ark. 2010).

Viral proteazlar, AIDS ve kanser gibi bazı ölümcül hastalıklara neden olan, virüslerin proteinlerin fonksiyonel etkilerinden dolayı önem kazanmıştır. Serin, aspartik ve sistein peptidazlar çeşitli virüslerde bulunmaktadır (Rawlings ve Barrett 1993). Virüs kaynaklı proteazların tamamı endopeptidazdır, ancak aralarında metalloendopeptidaz bulunmaz. Viral replikasyon ve birleşme için gerekli retroviral aspartik proteazlar homodimerlerdir ve öncül proteaz olarak ifade edilirler. Bu öncül proteazlar otoliz ile olgun proteaz haline gelmektedirler. Mutantlarının ve retroviral aspartik proteazların ekspresyonu, saflaştırılması ve enzimatik analizleri üzerine kapsamlı bir literatür mevcuttur (Kuo ve Shafer 1994).

Bakteriyel proteazlar, mikroorganizmaların geniş bir aralığının bilinmesine rağmen, ticari olarak önemli alkali proteazların büyük bir bölümü *Bacillus* türünden elde edilmektedir (Puri ve ark. 2002, Huang ve ark. 2003). Bunun nedeni, çok çeşitli ortamlardan izolasyonlarının nispeten kolay olmasıdır. *Bacillus* grubunun en önemli özelliği dirençli sporlara sahip olmalarıdır. Bununla birlikte *Bacillus*, hem kompleks hem de sentetik besi ortamında

gelişebilmektedir. Ayrıca *Bacillus* türleri post-eksponansiyal ve durgunluk fazlarında da ekstraselluler proteazlar üretebilmektedir (Mabrouk ve ark. 1998).

Alkali proteazlar yüksek sıcaklıklarda ve alkali pH'larda stabildir, ayrıca yerel ve ticari deterjanlarda bulunabilir (Adinarayana ve ark. 2003). HS08 *Bacillus* türünden üretilen serin proteazlar deterjan endüstrisinde kullanılan, ısıya dayanıklı enzimlerdir (Guangrong ve ark. 2006). *Bacillus subtilis* JB tarafından üretilen subtilisin JB1 balıkçılıktaki verim kaybında kullanılmaktadır (Sung ve ark. 2010). Bunun yanında, bu tip enzimlerin büyük çoğunluğu nötrofilik *Bacillus* türleri tarafından üretilmektedir. Nötrofilik *Bacillus* türlerinden elde edilen subtilisinler genellikle pH 8-10 aralıklarında değere sahiptir (Laan ve ark. 1991). Bu enzimler alkalofilik *Bacillus* türleri tarafından üretilen enzimlerle karşılaştırıldığında daha düşük pH ve termal kararlılığa sahiptir. *Bacillus licheniformis* tarafından Carsberg'de üretilen subtilisin ve *Bacillus amyloliquefaciens* tarafından üretilen subtilisin BPN gibi yaygın şekilde kullanılan alkali proteazlar 50 °C sıcaklıkta 3.4 dakika ve pH 10.5 değerinde 2.4 dakika sınırlı yarılanma ömrüne sahiptirler (Durham ve ark. 1987).

Deterjanlardaki alkali şartları karşılamak için, proteazlar daha yüksek alkali pH ve yüksek pH stabilite de çalışılmalıdır. Bu özelliklerden ziyade, enzim yüksek termostabiliteye sahip olmalıdır. Üreticilerin karşılaştığı bir diğer problem ise fermantasyon prosesi esnasında tekrar eden subkültürleme sonrasında üretim kapasitesinin azalmasıdır. Bu problem ancak stabil verimli bir doğaya sahip yeni türlerin tanıtılmasıyla üstesinden gelinebilir. Bir fakültatif alkalofilik *Bacillus clausii* proteinli noktaları temizlemek için deterjan eklentisi olarak kullanılan "savinaz" (ticari olarak önemli serin proteazı) üretmekte kullanılmaktadır (Christiansen ve Nielsen 2002).

Ağır şartlar altında endüstriyel proseslerle başa çıkabilen biokatalizörler için artan endüstriyel talepler ile birlikte, gelecek vaat eden yeni türlerin ayrıştırılması ve karakterize edilmesi bu enzimlerin dayanımını arttırmak için son zamanlardaki bir girişimdir. Buna rağmen şimdiye kadar 3000'den fazla farklı enzim yeterli değildir. Bunun için, büyük bir neden ise uygun olan çoğu enzimin endüstriyel reaksiyon koşullarına karşı koyamamasıdır. Sonuç olarak, ekstrem koşullarda gelişebilen mikroorganizmaların karakterize edilmesi büyük bir ilgi kazanmıştır.

## 2.5. *Bacillus* Genel Özellikleri

Bacillaceae familyası içerisinde *Bacillus* ve *Clostridium* olmak üzere iki ana alt grup bulunmaktadır (Garrity 2004). Carl Woese tarafından 16 ve 18S rRNA dizilerinin karşılaştırılmasıyla oluşturulmuş sınıflandırmaya göre *Bacillus* cinsi mikroorganizmalar Eubakteri domanini içerisine dahil edilmiştir (Woese ve Wolfe 1985, Woese 1999). *Bacillus* cinsi organizmalar Gram (+), spor oluşturabilen, çubuk şeklinde, aerob bazıları fakültatif anaerob gelişen, katalaz pozitif mikroorganizmalardır (Claus ve Berkeley 1986). Çoğu basil saprofittir.

*Bacillus* türleri sıcağa, soğuğa, radyasyona ve dezenfektanlara karşı dayanıklı sadece bir tane spor meydana getirirler ve çöl kumları, kaynarcalar ve kutup toprakları gibi ekstrem özelliklere sahip ortamlarda yaşamalarına izin veren birçok fizyolojik özelliğe sahiptirler. *Bacillus* türleri termofilik, psikrofil, asidofilik, alkalifilik, halotoleranslı/halofilik ve sadece bir kaç organizmanın hayatta kalabileceği sıcaklık, pH değerleri ve tuz konsantrasyonlarında gelişebilme özellikleri gösterirler. Bu özellikleriyle basiller medikal kullanımlarının yanında, ısı sterilizasyonu teknikleri ve kimyasal dezenfektanların test edilmesinde kullanılırlar. Aynı zamanda önemli enzimleri sentezleme becerisi nedeniyle deterjan üretim endüstrisinde de kullanılmaktadır. Örneğin; *Bacillus insolitus* 0°C ve altında büyüyebilir (Rüger ve ark.2000). *Bacillus marinus* gelişmek için sodyum ve potasyum iyonlarına bağımlı olan bir deniz türüdür. *B. insolitus* Na<sup>+</sup> olmadan gelişebilir ve rafinozu fermente edebilir, fakat glukoz, fruktoz, maltoz, mannoze, sükroz veya mikozu fermente edemez. *B. marinus* ise glukoz, mannoz ve mikozu fermente edebilir, fakat rafinozu fermente edemez (Rüger, 1983).

*Bacillus* cinsi 34 tür ve birçok alt tür içeren çok büyük bir gruptur. *Bacillus* cinsinde çok çeşitli özellikler gösteren ve metabolizmaları da oldukça farklı türler bulunur. Örneğin *B. coagulans* glukozu homofermantatif olarak laktik aside kadar parçalarken; *B. subtilis*, *B. licheniformis* ve *B. cereus* ana ürün olarak 2,3-bütandiol ile gliserol üretir. *B. polymxa*'nın glukozu; 2,3-bütandiol, H<sub>2</sub>, etanol oluşturarak katabolize ettiği görülür. *B. macerans* temel ürünler olarak; aseton, asetik asit, formik asit, etanol meydana getirir. Ayrıca içlerinden bir kısmı fakültatif kemolitotrof (kimyasal bileşikleri enerji, inorganik maddeleri elektron kaynağı olarak kullanan organizma) olup organik materyalin bulunmadığı ortamlarda enerji kaynağı hidrojeninden yararlanabilirler. Bu örnekler bile *Bacillus* üyelerinin fizyolojik olarak ne denli farklı olduklarını ve türlerin cins altında gruplandırılmalarının ne kadar zor olduğunu göstermektedir (Tunail 2009).

*Bacillus subtilis* in genom dizilimi araştırması 1997 yılında tamamlanmıştır ve tek hücreli bakteri için yayınlanmış ilk dizilimdir. Genom 4100 protein kodlayan alan ile 4.2 mega-baz çift uzunluğundadır. *Bacillus subtilis* bitki yetiştirmeyi destekleyen rizobakteriyuma (mantar önleyici peptitleri sentezlediği gösterilen) sahiptir. Bu özellik *B. subtilis* in biyokontrol de kullanılmasına yol açmıştır ve *B. subtilis*' in tarımsal verimi arttırdığı gösterilmiştir. *Bacillus anthracis*'in genomu tahminen 5508 protein kodlayan alan ve 5,227,293 baz çift uzunluğundadır. *B. anthracis* in genomu, hem *B. cereus* hem de *B. thuringiensis* ile yüksek derecede benzerlik göstermektedir. *B. anthracis*'in genomu *B. cereus*'un protein grubundan farklı olarak sadece 141 protein bulundurur. Antraks ile ilgili virülans faktörlerin neredeyse tamamı onun iki plazmidi üzerinde kodlanmıştır ve şaşırtıcı bir şekilde, bu genlerin neredeyse tümü *B. cereus* ile benzeştir. Buda virülens arttıran genlerin spesifik olarak *Bacillus anthracis*'e özgü olmağını akla getirmektedir. *B. anthracis*, ayrıca *B. subtilis*'te bulunan kapsamlı karbonhidrat metabolizması için yüksek bir arttırılmış kapasiteye sahip olduğu görünmektedir (Turnbull 1996).

*Bacillus* üyelerindeki metabolik çeşitlilik sayesinde, basiller toprak ve böcekten insana kadar değişen çeşitli ortamlarda kolonize olabilirler. *Bacillus thuringiensis* böceklerde parazitlenir ve haşere kontrolünde ticari olarak kullanılır. Basil türlerinde en iyi bilinenlerinin patojenik türler olmasına rağmen, çoğu *Bacillus* çürüten madde ile yaşamını sürdüren saprofitlerdir. Hala *Bacillus subtilis* olarak adlandırılan diğerleri, bitki kökleri ve çevreleyen toprak arasında ara yüz olan rizosferde yaşar. Bitki kökleri ve ilgili biyofilm eşsiz bir çevre yaratmak için toprağın kimyasında önemli bir etkiye sahip olabilir. *Bacillus subtilis*'in kannibalizm uyguladığı yakın zamanda gösterilmiştir. Onlar kannibalizmi ekstrem durumlardan kolay bir kaçma yolu olarak kullanmaktadırlar. Şiddetli çevrelerde hayatta kalabilmek için, spor formuna geçebilirler, fakat bu onlar için enerji yönetimi açısından oldukça pahalıya mal olmaktadır. Bakteri için daha kolay bir yol da komşu basilleri yok eden antibiyotikler üretmektir. Böylelikle, yok edilen basillerin içerikleri sindirilerek, birkaç bakterinin yaşamasına izin verilebilir (Rüger 1983).

Basilli kulak enfeksiyonlarından menenjitte, idrar yolu enfeksiyonlarından kan zehirlenmesi gibi enfeksiyonlara neden olurlar. Çoğunlukla, bağışıklık sistemi yetersiz olan veya zarar görmüş konaklarda ikincil enfeksiyon olarak ortaya çıkarlar. Bu bakteriler doku zedeleyen toksinler veya tedaviyi engelleyen metabolitler üreterek asıl enfeksiyonun daha da kötüye gitmesine neden olabilirler.



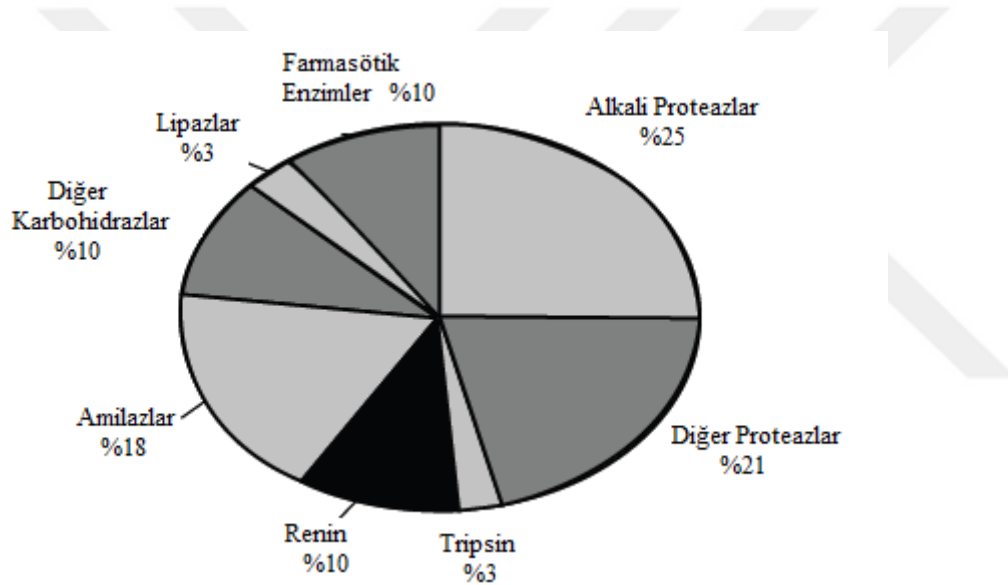
*Bacillus anthracis* etkeni ile oluşan en bilinen hastalık antrakstır (şarbon). 1600'larda, şarbon "Kara Afet" olarak bilinmekteydi ve 60.000'in üzerinde ineği öldürdüğü rapor edilmiştir. Şarbon yakın zaman da biyoterörizm için bir metot olarak kullanılarak dünyanın gündemine oturmuştur. Bazı basillerin patolojik kapasitelerine rağmen, birçok diğer tür medikal ve farmasötik proseslerde kullanılmaktadır. Bu uygulamalar bakterinin belirli protein ve antibiyotikleri sentezleyebilme kabiliyetlerinden avantaj sağlamaktadırlar. Neosporinin iki bileşeni olan Basitrasin ve polimiksin, basil ürünleridir. Ayrıca, zararsız *Bacillus* mikropları virülant *Bacillus* türlerinin incelenmesinde kullanışlıdır (Anonim 2016).

## 2.6. *Bacillus* Proteazı

*Bacillus* cinsi mikroorganizmalar tarafından proteaz tiplerinden çoğunlukla alkali serin proteazları (subtilisinler) üretilmektedir. Bunlar DFP veya bir patates proteaz inhibitörü tarafından etkisiz hale gelirler. Ayrılan bağın karboksil tarafında tirozin, fenilalanin veya lösin bulunduran peptid bağlarını hidrolizlerler. Çoğu alkalın proteazların optimal pH değeri pH 10 ve izoelektrik noktaları pH 9 civarlarındadır. Alkalın serin proteazların molekül ağırlıkları 15-30 kDa arasında değişmektedir. Alkalın serin proteazlar *Arthrobacter*, *Streptomyces* ve *Flavobacterium* ssp. gibi çeşitli bakteriler tarafından üretilmesine rağmen (Boguslawski ve ark. 1983), subtilisinin en bilinen üreticisi *Bacillus* spp'dir (Rao ve ark 1998). En potansiyel *Bacillus* cinsi alkali proteaz üreticileri *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquifaciens* ve *B. mojavensis* suşlarıdır. Potansiyel üretici olarak bilinen diğer bir bakteriyal kaynak *Pseudomonas* sp'dir (Bayoudh ve ark. 2000). *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, and *B. subtilis* subtilisin Carlsberg-tip enzim üretirler. Enzim üretimi yıllık saf enzimin yaklaşık 500 metrik ton tutarındadır. Alkali proteazların deterjan, gıda, farmasötik ve deri imalatında kullanılabilir olması üretimine olan ilgiyi daha da arttırmaktadır ( Saeki ve ark. 2007, Dias ve ark. 2008). Bakteriyal alkali proteazlar alkali pH (pH 9.0-11.0) aralıklarında yüksek aktiviteleri ve geniş substrat spesifiteleri ile karakterize edilirler. Optimum sıcaklık değeri yaklaşık 60°C'dir. Bakteriyal alkali proteazlar bu özellikleriyle deterjan endüstrisinde kullanım için uygun hale gelirler (Rao ve ark. 1998). Alkalofilik *Bacillus* türleri deterjan formülasyonlarında ağırlıklı olarak kullanılan daha yüksek alkali toleransa sahip enzimler üretirler. Nötral *Bacillus* türlerinden izole edilen proteazlar ise yaklaşık optimal pH 7.0 olan, süt protein modifikasyonlarında, azot kontrol, püre çıkarma ve birada bulanıklığın giderilmesinde, tatlandırıcı olarak kullanılmak için soya modifikasyonlarında ve hayvansal gıdalarda kullanılan çinko metalloproteinazlardır (Ward ve ark. 2004).

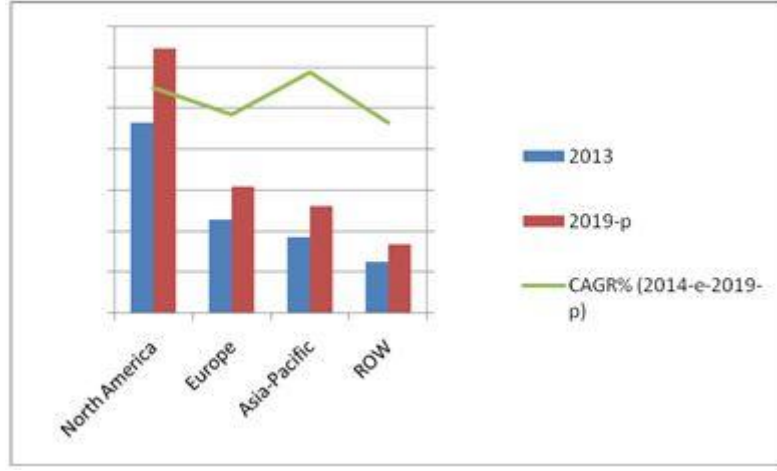
## 2.7. Proteazların Endüstriyel Kullanım Potansiyeli

Proteazlar hem fizyolojik hem de ticari alanlardaki uygulamaları açısından endüstriyel enzimlerin en önemli grubudur. Proteazlar çoğunlukla deterjan, farmasötik ve gıda endüstrisi olmak üzere çok çeşitli uygulamalarda kullanılmakta ve tek başına endüstriyel enzimlerden elde edilen toplam dünya çapındaki satış gelirinin yaklaşık %60'ını oluşturmaktadır (McGrath 2005). Ancak, mısırın biyoyakıt olarak kullanıldığı Amerika gibi ülkelerde proteaz talebi karbohidratlara yakındır ve daha brüt karlı endüstride kullanılabilir ürünlerle ilgili enzimler daha büyük öneme sahiptir (Hayes ve ark. 2006). Proteazların tüm dünya genelinde yıllık kullanım oranlarına bakıldığında % 25 alkalın proteazlar, % 21 diğer proteazlar, % 10 renin, % 3 tripsindir (Ahmad 2013), (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Proteazların endüstride kullanım yüzdeleri (Ahmad 2013)

Diğer endüstriyel enzimler arasında önemli bir pazar payı bulunan proteaz enziminin, 2019 yılına kadar pazar payının global enzim piyasasındaki toplam yıllık değeri 2.767 \$ milyon olarak tahmin edilmekte ve 2014-2019 global proteaz piyasası yıllık bileşik büyüme oranı %5.3 olarak öngörülmektedir. Enzim piyasası Kuzey Amerika, Avrupa, Asya-Pasifik ve diğer dünya ülkeleri gibi önemli bölgelerdeki enzim uygulamaları ve kaynakları baz alınarak bölümlere ayrılmakta ve piyasa değerleri tahmin edilmektedir (Şekil 2.7), (Anonim 2016b).



**Şekil 2.7.** Coğrafi olarak dünya çapında proteaz enzimi market payı 2013-2019 arası (Anonim 2016)

### 2.7.1. Gıda Endüstrisi

Mikrobiyal proteazlar gıda sanayisinde birçok şekilde kullanılmıştır. İlk olarak, proteazlar gıda endüstrisinde yüksek besin değerli protein hidrolizatlarının üretiminde kullanıldı. Protein hidrolizatları kan basıncını düzenlemede, bebek besini formülasyonlarında, belirli tedavisel diyet ürünlerinde, meyve suları ve alkolsüz içeceklerin zenginleştirilmesinde önemli bir rol oynar (Ward 1985, Neklyudov ve ark.2000). Rebeca ve ark. (1991) *B. subtilis* proteazını kullanarak yüksek besin değerli balık hidrolizatlarını ürettiler. Matsui ve ark. (1993) *B. licheniformis* alkaline proteazı ile etkileşimi sonrası sardalye kasından elde edilen anjiyotensin-I-dönüştürücü enzim-engelleyici aktivite gösteren proteaz hidrolizatları bulunduğunu rapor etmişlerdir. Proteazlar bebek maması sütünde ki süt proteinini peptitlere ve serbest aminoasitlere indirgeyerek alerjik reaksiyonlara karşı olan hassaslık riskini azaltır. Bu özellik, gelişen alerjiler için yüksek risk grubuna dahil olan yada inek sütüne alerjisi olan bebekler için çok önemlidir. Fujimaki ve ark.(1970) alkaline proteazını soya protein hidrolizatlarını üretmek için kullanmıştır.

Protein hidrolizatları diyet, sağlık ürünleri ve klinik beslenme supplementleri bileşenleri olarak çeşitli uygulamalara sahiptir. Hidrolizatın acı tadı kullanım alanındaki ana sınırlayıcıdır. Acı yoğunluğu, hidrolizatta bulunan hidrofobik aminoasitler ile doğru orantılıdır. Ayrıca prolinin merkezde bulunması acılığa yol açan sebeplerden biridir. Laktik asit bakterisinden elde edilen amino peptidaz, acılık gidermede büyük bir potansiyele sahiptir (Rao ve ark. 1998).

Proteazların mandıra endüstrisindeki ana uygulaması peynir yapımıdır. Peynir yapımında proteazların ilk fonksiyonu, belirli peptit bağlarını p-kazein ve makro peptitler oluşturmak için hidrolize etmesidir. Ohmiya ve ark. (1979) immobilize alkaline proteazının peynir yapımında kullanımını rapor etmiştir. *Bacillus subtilis*, *Mucor michei* ve *Endothia parasitica* gibi genellikle güvenilir kabul edilen mikroplar tarafından üretilen proteazlar peynir yapımında kullanılmıştır (Rao ve ark.1998). Whey peynir üretimi prosesinin verimli bir yan ürünüdür. Proteazlar ayrıca biyokonversiyon prosesi esnasında wheyi protein hidrolizata dönüştürürler (Perea ve ark. 1993). proteazlar et yumuşatma proseslerinde de kullanılırlar. Et yumuşatma için kullanılan enzimlerin etkimesindeki farklılık bitkide ve mikrobiyal proteazlarda gözlemlenmiştir. Papain gibi bitki proteazları ana olarak kolajen ve elastin üzerinde etki ederken, mikrobiyal proteazlar kolajen üzerinde zayıf bir etkiye ve kas lifleri üzerinde önemli ölçüde etkimeye sahiptir. Bu avantajlar araştırmacıları hem bitki hem de mikrobiyal proteazlar içeren formülasyonlar geliştirmeye yöneltmiştir (Mathew 1999).

Mikrobiyal proteazlar pişirme prosesinde kullanılırdırlar. Un gluten, nişasta, nişasta içermeyen polisakkaritler, lipitler ve eser miktarda minerallerden meydana gelmektedir. Proteaz, proteoliz etkimesi ile gluteni zayıflatmakta böylelikle hamur oluşumunu arttırmaktadır. Lyones (1982) glutenin hidrolize edilmesinden dolayı proteazların varlığında yumuşak hamur oluşumunu gözlemlemiştir. Keratinolitik aktiviteye sahip alkalın proteazlar, kuş tüyünden ya da keratin içeren maddelerden proteinli hayvan yemi üretiminde kullanılırlar. Dalev (1990, 1994) ve Cheng ve ark. (1995) *B. subtilis* ve *B. licheniformis* PWD-1'den alkalın proteazları kullanarak proteinli hayvan yemi üretimini rapor etmişlerdir.

### **2.7.2.Fotoğraf Endüstrisi**

Alkalın proteazları kullanılmış röntgen ya da fotoğrafik filmlerden gümüşün geri kazanılmasında önemli bir rol oynar. Bu atık filmlerin jelatin katmanı ağırlık olarak % 1.5 - 2 oranında gümüş içermektedir. Geleneksel olarak filmlerdeki gümüşün geri kazanılması çevreye zarar veren bir yöntem olan filmlerin yakılmasıyla yapılmaktaydı. Filmin ana maddesi olan polyester bu metot kullanılarak geri kazanılamamaktadır. Gümüş, jelatine bağlı olduğundan gümüşü protein katmanından proteolitik işlemlerle çıkarmak mümkündür. Jelatinin enzimatik hidrolizi, sadece gümüşü çıkarmaya değil aynı zamanda filmin ana maddesi olan polyesterinde geri dönüşümde değerlendirilmesine olanak tanır. Fujiwara ve ark. (1989) *B.subtilis* proteazının varlığında 50-60+°C sıcaklıkta 30 dakika içerisinde ayrıştırıldığını rapor etmiştir. Ishikawa ve ark. (1993) *Bacillus* sp. B21-2 alkalın proteazının

röntgen filmlerindeki gümüş parçacıklarını çıkarmak için jelatin katmanının enzimatik hidrolizinde kullanıldığını rapor etmiştir. *Bacillus* sp. B18 (Fujiwara ve ark. 1991) ve *B. coagulans* PB-77' nin alkalın proteazlarının da kullanılmış röntgen filmlerindeki jelatin kaplamasından gümüşün geri kazanılmasında etkili olduğu gösterilmiştir.

### **2.7.3.İpek İşlenmesi**

Proteazlar ipeğin işlenmesinde de kullanılmaktadır. Saf ipeğin iplikleri ipek özünü temizlemek için pişirilmelidir. İpek özü, proteinli bir bileşen olup ipek liflerini kaplamakta ve ipek liflerine sert bir yapı sağlamaktadır. Geleneksel pişirme yöntemi sabun içeren bir alkalın çözelti içerisinde yapılmaktadır (Kanehisa 2000). Bu genellikle pahalı ve kaba bir uygulamadır, çünkü lifin kendisi ve lifli protein hasar almaktadır. Bununla birlikte, proteolitik enzimlerin kullanılması daha iyi bir yöntemdir, çünkü ipek özünü lifli proteine hasar vermeden temizler. Puri (2001) *Bacillus* sp. RGR-14' ten elde edilen alkalın proteazının ipek pişirme verimliliği üzerine çalışmış ve işlem görmüş lifleri elektron mikroskopuyla incelemiştir. Elektron mikroskopu altındaki incelemeler, işlem görmüş ipek lifleri kümelenmelerinin yumuşak ve kompakt işlem görmemiş lif yapısıyla karşılaştırıldığında dağıldığını göstermiştir.

### **2.7.4.Endüstriyel ve Evsel Atıkların Yönetimi**

Proteazlar proteinli atıkları su sisteminin biyolojik oksijen gereksinimini azaltarak çözerler. Son yıllarda, proteazlar çeşitli gıda-işleme endüstrileri ve evsel aktivite sonrası oluşan atıkların yönetiminde kullanılmaktadır. Dalev (1994) *B. subtilis*'ten üretilen alkalın proteazı kümes hayvanları kesim evlerinde ortaya çıkan atık kuş tüylerinin yönetiminde kullanmıştır. Takami ve ark. 1992 giderlerdeki tüyleri temizlemek için tüy dökücü ajan olarak kullanıldığını rapor etmiştir.

### **2.7.5.İlaç Endüstrisi**

Proteazların geniş çeşitlilik ve spesifikliği tıbbi öneme sahip ürünlerin geliştirilmesinde kullanıldı. Kudrya ve Simonenko (1994) *B. subtilis* 316M nin elastolitik aktivitesini yanıkların tedavisinde, iltihaplı yaralarda, çibanlarda ve apselerde uygulanan elastoterazin hazırlanması için kullanmıştır. *Aspergillus oryzae*'dan proteazların ağızdan alınması belirli litik enzim eksikliği sendromunu tedavi etmek için sindirim yardımcısı olarak kullanılmıştır

(Rao ve ark.1998). Kim ve ark. (1996) *Bacillus* sp. CK 11-4'ten üretilen alkalın proteazının fibrinolitik aktiviteye sahip trombolitik ajan olarak kullanımını rapor etmiştir.

### **2.7.6.Deri Endüstrisinde Kullanımı**

Deri endüstrisi, çeşitli kimyasalların kullanımı ve zararlı maddeler yayması nedeniyle çevre kirliliğine neden olur (Pvanakrishnan ve Dhar 1986, Meraz ve ark. 2006). Deri prosesi emdirme, tüy alma, yıkama ve atık prosesi gibi birçok etaptan oluşur. Emdirme aşamasında proteolitik enzimlerin kullanımı interfibriler proteinlerin çözünmesini hızlandırır, su emilimini kolaylaştırır ve emdirme operasyonunun süresini kısaltır. Geleneksel metotlar kullanarak tüylerin alınması çeşitli çevre problemleri oluşturmuştur. Endüstriyel sıkalada enzimatik tüy alma genellikle az miktarda kireç kullanılması ile tüy alma verimini artırır ve tüy alma prosesinin maliyetini azaltır (Thanikaivelan ve ark. 2004). Bununla birlikte, son dönemlerde mikrobiyal alkalın proteazların kullanımı kireç gereksiniminin ve tüy alma süresinin azaltılması, atık arıtma maliyetini düşürme, deri yüzeyini arttırma ve boyamayı iyileştirmesi gibi birçok nedenden dolayı popüler oldu. Alkalın proteazları tüy alma prosesini hızlandırır, çünkü alkalin koşulları tüy köklerinin genişlemesini kolaylaştırır ve daha sonra saç bezciği proteinindeki proteazların atağı tüylerin kolay alınmasına imkan verir (Gupta ve ark. 2002). Varela ve ark. (1996) *B. subtilis* IIQDB32 alkalın proteazının koyun derisindeki tüyleri alma için kullanıldığını rapor etmiştir. George ve ark. (1995) post ve deride ki tüyleri almak için *B. amyloliquefaciens* alkalın proteazlarını kullanmıştır. Tüylerin tamamıyla alınması kimyasalların yardımı olmadan enzimler sayesinde başarılmıştır (Thangam ve ark. 2001, Dayanandan ve ark. 2003, Macedo ve ark. 2005). Tüy alma hakkındaki benzer bulgular *B. pumilus* BA06'nın mutant türüyle üretilen alkalın proteazlar ile de rapor edilmiştir (Wang ve ark. 2007).

Günümüzde, bakteriyal proteazlar kimyasalların yerine temizleme ajanı olarak kullanılmaktadır. Hameed ve ark. (1996 ve 1999) *B. subtilis* k2 alkalın proteazını temizleme ve deri prosesinde kullanmıştır. Proteazlar ayrıca deri artığı prosesinde de yararlıdır. Dalev ve Simeonova (1992) deri endüstrisi atıklarının tam kullanımı için alkalın proteaz içeren bir teknik geliştirmişlerdir.

### 2.7.7. Deterjan Endüstrisinde Kullanımı

Performans arttırıcı olarak enzimlerin deterjanlarda kullanımı geçtiğimiz çeyrek yüzyıldan bu yana muhtemelen deterjan endüstrisindeki en büyük yeniliklerden biridir. Proteazlar endüstriyel öneme sahip çeşitli enzimler arasında en önemli olanlarıdır. Proteazların çamaşır deterjanlarında kullanımı enzimlerin dünya çapındaki toplam satışlarının %25'ine tekabül etmektedir (Rao ve ark. 1998). Enzimin deterjanlardaki ilk kullanımı 1913 yılında, Röhm ve Hass'ın deterjanları Burnus ta kullanmış oldukları işlenmemiş pankreatik enzim tripsini tanıtımlarıyla ortaya çıkmıştır, fakat deterjanın yüksek alkalınlığı nedeniyle, pankreatik enzimlerle çok iyi çalışılmamıştır. *Bacillus* türünden bir alkalın proteaz (subtilisin), 1960'ların başlarından itibaren deterjanlarda kullanılmıştır. O tarihten sonra, deterjanlar için uygun olan alkalaz ve savinaz (novoenzimler), maxacal ve purafect (Genencor), KAP (Kao) ve balp (Henkle) gibi birçok yüksek alkalın enzimi bulunmuştur. Bu subtilinlerle ilgili ciddi problem kimyasal oksidanlarla etkileşime girmemeleridir. Novoenzimler ve Genencor, oksitlenmeyen aminoasitli Met kalıntılarıyla protein mühendisliği tarafından yer değiştirmiştir (Bott 1997). Son dönemlerde, E-1 ve KP-43 gibi oksitlenebilen stabil serin proteazları alkalofilik *Bacillus* sp. içerisinde bulunmuştur (Saeki ve ark. 2000, Saeki ve ark.2002). Enzimler, çamaşır ve bulaşık temizleme deterjanlarında fonksiyonel katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Bu enzimler yüksek verimlilikte, çevreye uyumlu ve enerji tasarrufu sağlayan bir şekilde çalışırlar. Proteazlar gündelik çamaşırlardan, kontak lensleri ya da takma dişleri temizleme reaktifleri kadar her çeşit deterjanlar için standart katkı maddeleri olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, alkalın proteazın deterjan formulasyonunda kullanımı deterjan kalitesindeki çok büyük etkilerinden dolayı önemli derecede artmaktadır. Şimdiki market trendi ve tüketici ihtiyaçları imalatçıları düşük fiyatlı ve lekelerle karşı etkili yeni enzimler bulmaya yöneltmektedir. Geçtiğimiz 30 yıldan beri, deterjanlardaki proteazlar küçük katkı maddeleri olmaktan anahtar katkı maddesi seviyesine değişim gösterdi. Deterjan katkı maddesi için proteazlar, belirli kriterleri karşılamalıdır. Enzimler, yüksek sıcaklık ve pH değerlerinde stabil olmalı ve deterjanlarda bulunan çamaşır suyu, sürfaktan, kıskaçlayıcı ve oksitleme ajanları ile uyumlu olmalıdır. Bu yüzden, oksitleme ajanlarına karşı yüksek kararlılık gösteren enzimler deterjan endüstrisi için muazzam bir ticari öneme sahiptirler. Peroksitler ve perboratlar modern çamaşır suyu esaslı deterjan formulasyonları için yaygın katkı maddeleridir. Alkalın proteazının kararlılığı konusundaki önceki araştırmalar, *Bacillus calusii* 1-52 proteazının %1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile işlemeden sonra %114'e kadar artık aktivite sergilerken (Joo ve ark.2003), *Vibrio fluvialis* türü VM10'dan bir alkalın proteazı %4 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile

inkübasyonundan sonra %132 aktivite sergilediği gösterilmiştir (Venugopal ve Saramma,2006). *B. licheniformis* tarafından üretilen alkalın proteazları deterjan formülasyonlarında baskın kullanıma sahiptir. *Bacillus* sp. JB-99 (Johnvesly ve Naik 2001), *Bacillus mojavensis* (Beg ve Gupta 2003), *Bacillus* sp. L21 (Tari ve ark. 2006), *Bacillus licheniformis* RP1(Sellami-Kamoun ve ark. 2008) ve alkalofilik *Bacillus* sp. 2-5 (Khosravi-Darani ve ark. 2008) türlerinden alkalın proteazlarının deterjan endüstrisi için yararlı seçenekler oldukları bildirilmiştir. Çamaşır deterjanı kullanımlarının dışında, gündelik bulaşık deterjanlarının formülasyonunda da oldukça popülerdirler (Godfrey ve West 1996, Showell 1999). Enzimin deterjan formülasyonunda ki uygunluğunu kontrol etmek için bir diğer önemli parametrede kan lekesini çıkarmadır. Önceki raporlar, alkalofilik bakteri ve *Pseudomonas aeruginosa* PD100 türlerinden proteazların deterjan eksikliğinde pamuklu kıyafetlerden kan lekesini çıkarmak için kullanıldığını göstermektedir (Kanekar ve ark. 2002, Najafive ark.2005).

Yukarıda bahsedilen uygulamalara ek olarak, mikrobiyal proteazlar bazı diğer amaçlar içinde kullanılmaktadır. Proteazlar soya sosunun ve soya ürünlerinin hazırlanmasında kullanılmaktadır. Rao ve ark.(1998) belirli yiyecek ve içeceklerde düşük kalorili tatlandırıcı olarak kullanılan "Aspartame" (L-aspartyl-L-phenyl alanine methyl ester)'ın üretimi için proteaz kullanıldığını rapor etmiştir. Mikrobiyal proteazlar, maya özütü ve tek hücreli protein vb. üretiminde kullanışlı olabilir (Ward 1985). Proteazlar ayrıca direkt ya da dolaylı olarak porsinin insan insülinine dönüştürülmesinde kullanılırlar (Morihara ve ark.1980, Glass 1981).

## 2.8. Mutasyon

Mutasyon genetik materyaldeki kalıtsal değişikliklerdir. Bazı mutasyonlar organizmaya yararlı veya nötr olabilir, ancak mutasyon genellikle önemli bir hücresel fonksiyonun kaybına neden olacağından çoğu aslında zararlıdır. Mutasyonlar bakterilerde ilk replikasyon esnasında baz çifti başına  $10^{-7}$ - $10^{-8}$  oranında spontan yani doğal olarak meydana gelir ve bu oran mutajen varlığında önemli ölçüde arttırabilir. Mutajenler; ya fiziksel formda örneğin elektromanyetik radyasyon formunda ya da kimyasal formda örneğin nikotin gibi olabilir.

Protein mühendisliği denilen yeni bir alt dal ile fonksiyonel ve yapısal öneme sahip aminoasitlerin aydınlatılmasında DNA dizisi bilinen gen üzerinde değişiklikler yani mutasyonlar yapılması ve fonksiyonel olarak mutant proteinin aydınlatılması mümkün hale gelmiştir. Mutagenез olarak da adlandırılan bu teknikler, tesadüf olarak bir defada sayısı ve tam yeri belirsiz farklı bölgeleride kapsayan rastgele mutagenез (Random mutagenesis)



teknikleri ve sadece belirli hedef aminoasitlerin delesyonu, insersiyonu ve değişimini ifade eden bölge hedefli mutasyonlar ya da yönlendirilmiş mutagenез (Site-directed mutagenesis) teknikleri olarak ikiye ayrılabilir.

Rastgele Mutagenез Teknikleri: Mutagenез konusundaki erken yaklaşımlar, mutasyon üretiminin de tamamen rastgele metotlara dayanmaktaydı. Hücreler veya organizmalar UV radyasyonu veya mutajenik kimyasallar gibi mutajenlere maruz bırakılmak suretiyle arzu edilen özelliklere sahip mutantlar seçilir. Hermann Muller X-ışınlarının meyve sineklerinde genetik mutasyonlara yol açtığını keşfetti (Muller 1927) ve genetik üzerine yaptığı çalışmalar için Drosophila mutantlar kullanma yoluna gitti. *Escherichia coli* için, hücreler ilk olarak UV radyasyona maruz bırakıldıktan sonra mutantlar agar ortamı üzerinde seçilebilir. Koloniler biri zengin ortam, diğeri minimal ortamda olmak üzere replike petrilere alınır, ve özel besinsel gereksinimlere sahip mutantlar, minimal ortamda gelişim için yetersizlik sayesinde tespit edilebilir. Benzer prosedürler diğer hücre tipleri ile ve seçim için farklı bir ortam ile tekrar edilebilir. Belirli proteinlerde rastgele mutasyonlar üretilmesi için bir dizi yöntem, ilgi çekici veya daha iyi özelliklere sahip mutantlar için taranması için geliştirilmiştir (Anonim 2016).

Hayvan çalışmalarında, N-ethyl-N-nitrosourea gibi alkilleyici ajanlar mutant fareler üretmek için kullanılmaktaydı. Ayrıca, Ethyl methanesulfonate (EMS)'da mutant bitki ve hayvan üretmek için kullanılmaktadır (Hrabé ve Balling 1998, Flibotte ve ark.2010).

Bölge hedefli mutasyonlar ya da yönlendirilmiş mutagenез: Bir gendeki özgül değişimlerin yapıldığı işlemlerdir. Bu teknikle protein yapısı ve görevi ile ilgili araştırmalar yapılmaktadır. “Site directed Mutagenез Uygulamaları” ile bir gendeki baz değişimi ve dizi delesyon ve insersiyonu yapılabilir. Bu yöntem aynı zamanda vektördeki restriksiyon alanların değiştirilmesi, vektör elementlerin insersiyon veya delesyonu, promotor eklenmesi veya değiştirilmesi gibi DNA yapılarının modifiye edilmesinde kullanılır (Anonim 2006).

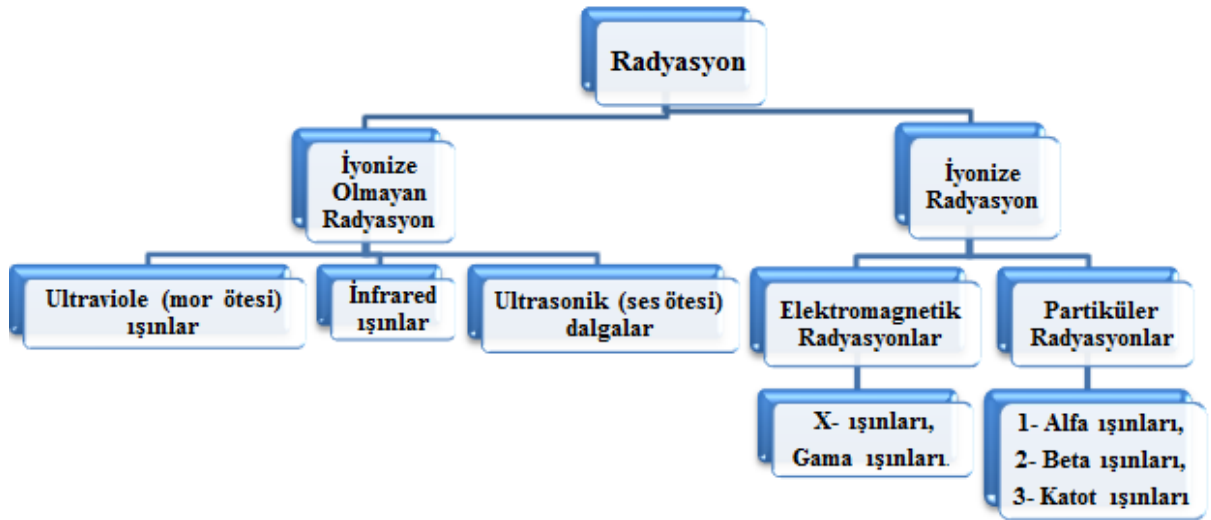
Birçok araştırmacı bir alana bir şekilde DNA'da seçilen değişiklikleri araştırarak ortaya koymak istemektedir. İlk olarak nükleotidlerin analogları ve diğer kimyasallar lokalleştirilmiş nokta mutasyonlar oluşturmak için kullanılmıştır (Shortle 1981).

Bazı kimyasalları içeren aminopürinler AT-GC transisyonunu (Caras ve ark.1982), indüklerken nitrosoguanin (McHugh ve Miller 1974), bisülfite (Shortle ve Nathans 1978), ve N<sup>4</sup>-hydroxycytidine GC-AT transisyonunu (Flavell ve ark. 1975) indükleyebilir. Bu teknikler, bir proteine özgü düzenlemeye yarayan özel mutasyonlara izin verir, ancak bu teknikle oluşturulan mutant çeşitleri esnek değildir ve bu nedenle rastgelelik derecesi azdır.

Alana yönelik (site-specific) mutasyon için kullanılan mevcut teknikler genel olarak DNA polimeraz ile primer uzatma reaksiyonlarında mutajenik oligonükleotidler kullanılmasını kapsamaktadır. Bu metotlar DNA'da tanımlanacak özel bölgelerin küçük alanlarında nokta mutasyonu delesyon veya insersiyona izin verir. Metodolojideki gelişmeler mutagenesiste oldukça basit ve etkili süreçleri ortaya koymuştur (Papworth ve ark.1996).

### 2.8.1.Radyasyon

Radyasyon bilinen ilk mutajenik ajandır, genler üzerindeki etkileri ilk olarak 1920 yılında rapor edilmiştir. Radyasyonun kendisi ise 1890 yılında keşfedilmiştir. Roentgen 1895'de X-ışınlarını, Becquerel 1896'da radyoaktiviteyi, Marie ve Pierre Curie 1898'de radyoaktif elementi keşfetmiştir. Bu üç keşif ve diğerleri atom fiziğinin doğuşuna ve elektromanyetik radyasyonu anlamamıza yol açmıştır (Anonim 1999). Radyasyonlardan, Sterilizasyon-dezenfeksiyon ve mutasyonlar oluşturmak üzere başlıca iki amaçla yararlanılmaktadır (Arda 2006). Fiziksel mutajenik radyasyonların iki formu vardır; iyonize radyasyon ve iyonize olmayan radyasyon. Radyasyon şekil 2.8'de detaylı olarak sınıflandırılmıştır (Arda 2006).



Şekil 2.8. Radyasyonun sınıflandırılması (Arda 2006)

X-ışınları ya da gama radyasyonları gibi iyonize radyasyonlar hücrede moleküllerden elektronları koparmak için yeterli enerjiye sahiptirler. Elektronlar moleküllerden ayrıldığında, serbest radikaller adını alan iyonlar oluşur. Bu serbest radikaller hücredeki DNA ya da RNA gibi çoğu diğer moleküllere oksidasyonla zarar verebilirler. Ultraviyole (UV) gibi iyonize olmayan radyasyonlar ise moleküllerdeki elektronları uyararak mutajenik etkilerini

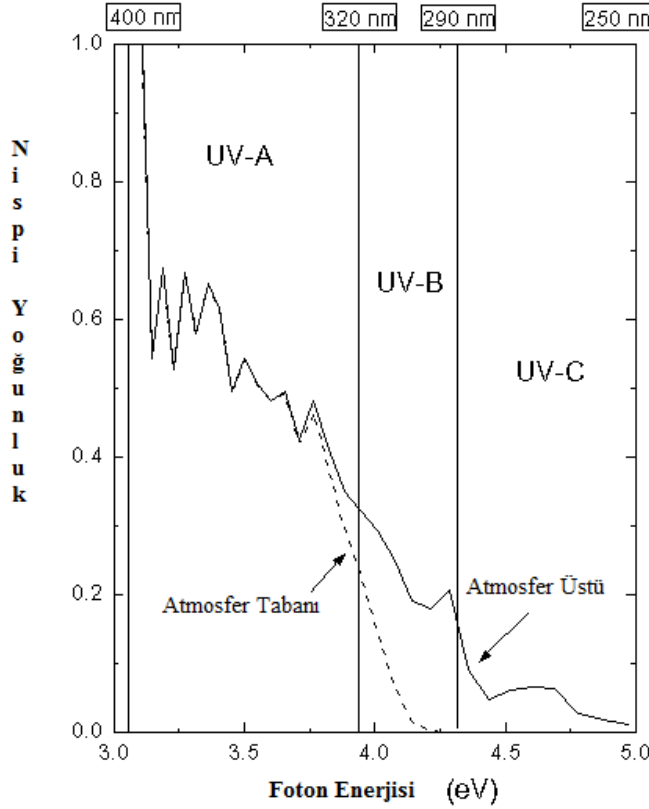
gösterirler. DNA molekülündeki elektronların uyarımı genellikle DNA'daki komşu iki primidin (özellikle timin) arasında ekstra bağ oluşumuyla sonuçlanır. Elektromanyetik radyasyonlar dalga boyu, frekans ve enerjilerine göre ayırt edilebilirler (Anonim 2013). Radyasyonun dalga boyuna rağmen, radyasyonun artmasıyla dışarıya verilen enerji azalır. Örneğin; iyonize radyasyon genellikle 1 nm (nanometre)'den az dalga boyuna ve 100 eV (elektron volt)'dan fazla enerjiye sahiptir. İyonize olmayan radyasyon ise 100-390 nm arasında dalga boyuna ve 100 eV'dan az enerjiye sahiptir. Bu nedenle, iyonize radyasyonlar iyonize olmayan radyasyonlardan daha tehlikeli olarak kabul edilir. Örneğin, kıyafetler UV ışınlarını engelleyebilir ancak, X-ışınlarını engellemek için kurşun yelek gerekir. Hem iyonize hem de iyonize olmayan radyasyonlar gıda endüstrisi ve laboratuvarlarda, klinik ortamlar içerisinde mikroorganizmaların büyümesini kontrol etmek için kullanılmaktadır. İyonize radyasyon daha fazla enerjiye sahip olduğundan, çok kolay ve hızlı bir şekilde endospor ve hücrelere nüfuz edebilir. Tıbbi malzemelerin sterilizasyonu ve bazı gıda ürünlerinde kullanılırlar. İyonize olmayan radyasyonun ise sadece bazı formları kontrollü mikrobiyal büyüme için kullanışlıdır (Anonim 2013).

Radyasyon kaynaklarını, doğal ve yapay olmak üzere iki gruba ayırabiliriz. Doğal radyasyon kaynakları; güneş ve uzay boşluğundan gelen kozmik ışınlar, atmosferde (radon), toprak ve karasal ürünlerde (ahşap, taş) bulunan radyoaktif elementlerdir ve günlük yaşantıda doğal radyasyon kaynaklarından belli miktarlarda radyasyon dozuna maruz kalınmaktadır. Bunlara ek olarak, yapay radyasyon adı verilen insan eliyle oluşturulan radyasyonlara, tıbbi testler (tanı ve tedavi amaçlı kullanılan X-ışınları ve diğer prosedürler), nükleer deneme ve enerji santralleri ve çeşitli diğer ürünler (Tv, Duman dedektörleri, Havaalanı X-ışınları) örnek verilebilir. Doğal ve yapay radyasyon kaynaklarından total ortalama mazuriyet dozu yaklaşık 350 mrem/yıl'dır ve ortalama mazuriyet değerini arttıran en önemli sebeplerden biri radon gazıdır (Anonim 1999).

### **2.8.2.Radyasyon etkileri**

İyonize radyasyonlar su molekülleriyle etkileşime girerek serbest radikallerin (hidroksil ya da OH radikal) oluşmasına neden olurlar. Serbest radikaller çiftlenmemiş elektronlara sahiptir ve kimyasal olarak çok reaktiftirler. Bu nedenle X-ışınları lipid, protein veya DNA gibi moleküllerle etkileşime girebilir ve hücre ölümü, hücre bölünmesinin engellenmesi ve organ kayıplarıyla sonuçlanabilir, DNA ve protein zararlarına neden olabilirler.

İyonize olmayan radyasyon olan Ultraviyole (UV), mutasyonları indükleyen, DNA’da hasar oluşturan ve en kötü ihtimalle tümör gelişimine neden olan güçlü genotoksik etkilere sahiptir. UV’nin başlıca doğal kaynağı güneştir ve güneşsel UV’nin cilt kanserlerinin ana nedenlerinden biri olduğu bilinmektedir (Setlow 1974, Brash ve ark.1991). UV ışığının UVA, UVB ve UVC olmak üzere üç genel türü vardır ve bunlardan her biri insan vücudunu bronzlaştıran UVA (320–400 nm), cilt üzerinde güçlü karsinojenik etki gösteren UVB (280–320 nm), germisidal (antiseptik, mikrop öldürücü) etki yapan UVC (200–280 nm) gibi farklı mutajenik özelliklere sahiptir. Yeryüzüne ulaşan güneş ışığının UV bileşenleri UVA ve UVB (290–400 nm)’den oluşmaktadır, UVC ise yeryüzüne ulaşmadan ozon tabakası tarafından absorblanır (Anonim 1999) , (Şekil 2.9).

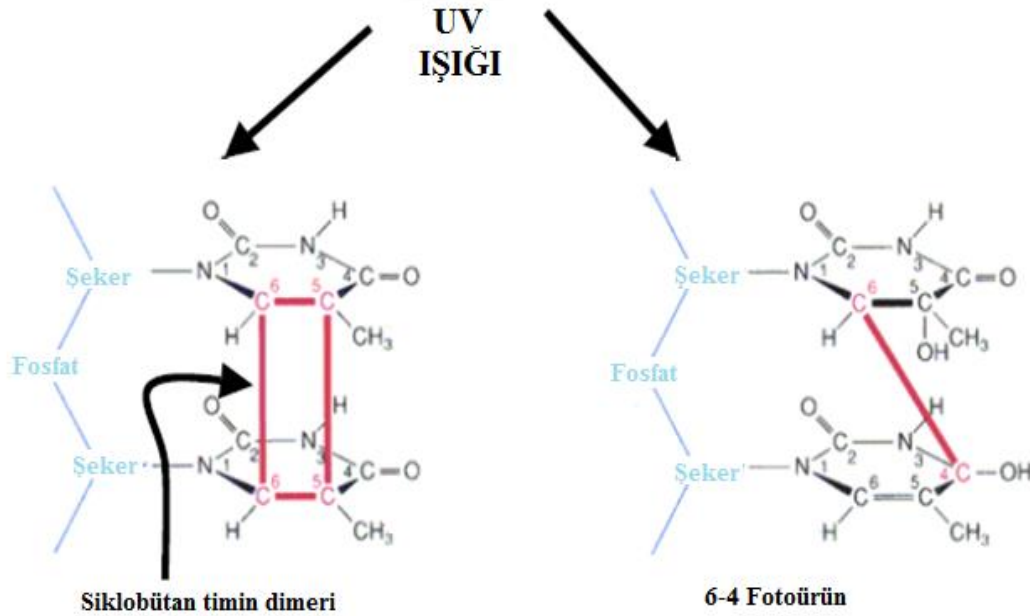


**Şekil 2.9.** UV dalga boyu ve ozon absorpsiyonu

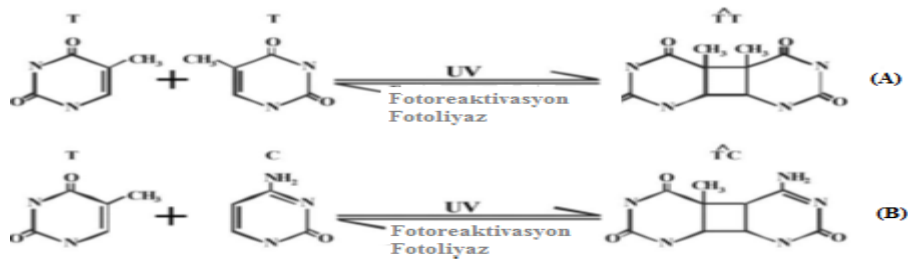
UVC, UVA ve UVB’den daha kısa dalga boyuna ve yüksek enerjiye sahip olduğundan, potansiyel olarak en zararlı UV formudur ve bakteri, virüs, protozoa, maya, küf ve alg gibi mikroorganizmalara karşı öldürücü etkiye sahiptir. 254 nm’de UVC en büyük antimikrobik etkinliğe sahiptir (Tran ve Farid 2004, Keyser ve ark. 2008, Pala ve Tokluca 2010).

### 2.8.3. UV ile İndüklenmiş DNA Lezyonları ve Mutasyonlar

UV radyasyonuna özgü olarak DNA'da iki farklı mutajenik ve sitotoksik DNA lezyonu meydana gelir. UVB ya da UVC tarafından uyarılan en sık lezyonlar, siklobütan pirimidin dimerleri ve 6-4 fotoürün oluşumudur (Anonim 2004). (Şekil 2.10). Siklobütan halka yapısı, iki komşu pirimidin bazının 5,6 bağları arasında oluşurken, 6-4 fotoürün yapısı iki komşu pirimidinin 6. ve 4. pozisyonları arasındaki kovalent bağ oluşumuyla karakterize edilir (çoğunlukla 5'CC3' ve 5'TC3'), (Hader ve Sinhab 2005), (Şekil. 2.11). 6-4 fotoürün oluşumu, siklobütan pirimidin dimerlerine kıyasla çok daha düşük seviyelerde meydana gelir (Mitchell ve Nairn 1989, Yoon ve ark. 2000).



Şekil 2.10. UV ışığı etkisi sonucu dimer oluşumu (Anonim 2004)



Şekil 2.11. UV radyasyonu sonucu en toksik ve mutajenik DNA lezyonu, siklobütan pirimidin dimerleri oluşumu; (A) timin-timin siklobütan pirimidin dimeri, (B) timin-sitosin dimeri (Hader ve Sinhab 2005)

Bu UV lezyonlar, etkinliği dalga boyu ve takiben DNA bazlarının direkt UV enerji absorpsiyonuna bağlı fotokimyasal reaksiyonlar yoluyla oluşturulur (Markovitsi ve ark. 2010). Siklobütöl halkası ve 6-4 fotoürünleri oluşumu yaklaşık 260 nm'de en yüksektir ve oluşumlarının etki spektrumları DNA'nın absorpsiyon spektrumuna paraleldir.

Dimer oluşumu; DNA heliks yapısını bozar, replikasyon ve transkripsiyonu bloke eder, hücre bölünmesini durdurur. Hücre için řu sonuçlar ortaya çıkabilir; hücre bölünmesi hücre onarımı sırasında durabilir, hata düzeltildiği zaman tekrar başlar (Bakteriyostatik etki). Hücre canlılığını kaybeder ve artık replikasyon yapamaz (Bakteriyosidal etki) (Kirchner 2016).

Ayrıca UV, daha sonra hücre sel oksijeni etkinleştiren (Peak 1987, Tyrrell 2000) riboflavin, triptofan ve porfirin gibi bazı küçük molekülleri aktive ederek (Krasnovsky 1979, Peak 1984), reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ile uyarılmış hücrelerde oksidatif strese neden olur. ROS, DNA'ya atak yapar ve DNA'da timin glikol ve 8-hidroksiguanin (8OH-G) gibi oksidatif baz hasarı oluşturabilir ya da zincir kırıkları yapabilir (Kielbassa ve ark. 1997, Kino ve Sugiyama 2005). Aynı zamanda, ROS DNA sentezi için nükleotid öncü-maddeleri olarak kullanılabilen, 8-hidroksideoksiguanosin-trifosfat (8OH-dGTP) gibi oksitlenmiş nükleotidleri üreten (Sekiguchi ve Tsuzuki 2002), hücre sel nükleotid havuzlarına atak yapar. Oksidatif DNA ve nükleotid hasarın bazılarının mutajenik olduğu bilinmemektedir (Grollman ve Moriya 1993, Kino ve Sugiyama 2005). Bu nedenle; UV dolaylı bir mekanizması yoluyla genomda oksidatif kaynaklı mutasyonlara neden olabilir.

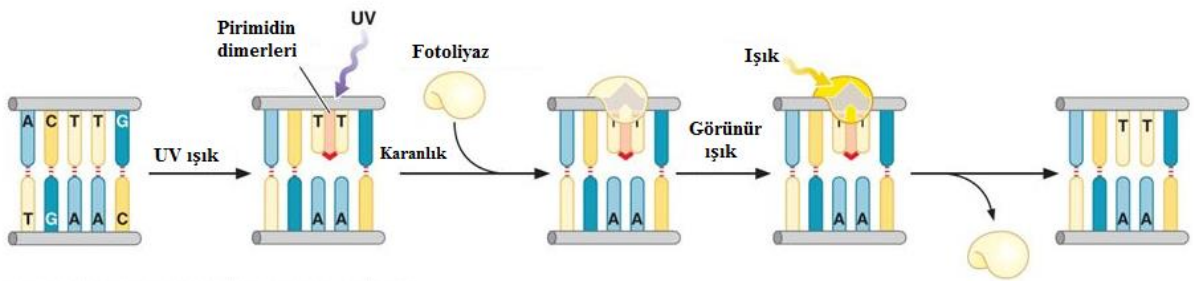
UV, dipirimidin bölgelerinde sitosin (C) → timin (T) baz değiştirme ve nadiren meydana gelmesine rağmen CC → TT tandem baz değiştirme gibi spesifik mutasyon tiplerine neden olmaktadır. Mutasyonun bu iki tipi ayrıca UV signatürü olarak adlandırılır (Brash ve ark.1991) ve algılanmaları UV'ya maruz kaldıktan sonra meydana gelir. Bu UV spesifik mutasyon oluşum mekanizmalarının birinde, siklobütan pirimidin dimerinde sitozin bazlarının deaminasyonunun ilgili olduğu düşünülmektedir (Tessman ve Kennedy 1991, Tessman, Liu ve Kennedy 1992).

## 2.8.4. UV Tamir Mekanizmaları

İnsan hücreleri UV ile indüklenen dipirimidin DNA fotoürünlerini uzaklaştıran nükleotid eksizyon tamir mekanizması adı verilen tek bir mekanizmaya sahipken, bakteri, bakteriofaj ve bazı ökaryotik virüsler gibi basit organizmalar UV ile indüklenmiş dipirimidin onarımını fotoreaktivasyon (fotoreversal), nükleotid eksizyon ve baz eksizyon tamir mekanizması olmak üzere 3 farklı mekanizmaya sahiptir (Llyod 2005).

### 2.8.4.1. Fotoreaktivasyon (fotoreversal) Tamir Mekanizması

Kellner 1949'da UV ile ışınlanan bakterilerin hayatta kalmasının, sonrasında yoğun bir mavi ışık kaynağına maruz bırakılmasıyla büyük oranda arttırılabileceğini gözlemlemiştir. 1960'larda Rupert, fotoreaktif bir enzimin varlığını kanıtlamış ve temel özelliklerini belirlemiştir. Karanlıkta, fotoliyaz enzimi spesifik olarak UV ile ışınlanan DNA'daki timin dimerlerine enzim-substrat kompleksi oluşturmak için bağlanır. Bu kompleks 320-410 nm aralığında ışığın absorpsiyonu ile aktive edilir. Pirimidin dimerleri monomerik pirimidinlere dönüştürülür ve enzim serbest bırakılır (Anonim 2008a), (Şekil 2.12) Belirli deneysel şartlar altında, 254 nm'de UV radyasyonun düşük ışınımlarıyla bakterilerde oluşan letal hasarın %80 kadarı fotoreaktiflenebilir (Setlow 1966).



Şekil 2.12. Fotoreaktivasyon (fotoreversal) tamir mekanizması (Anonim 2008a)

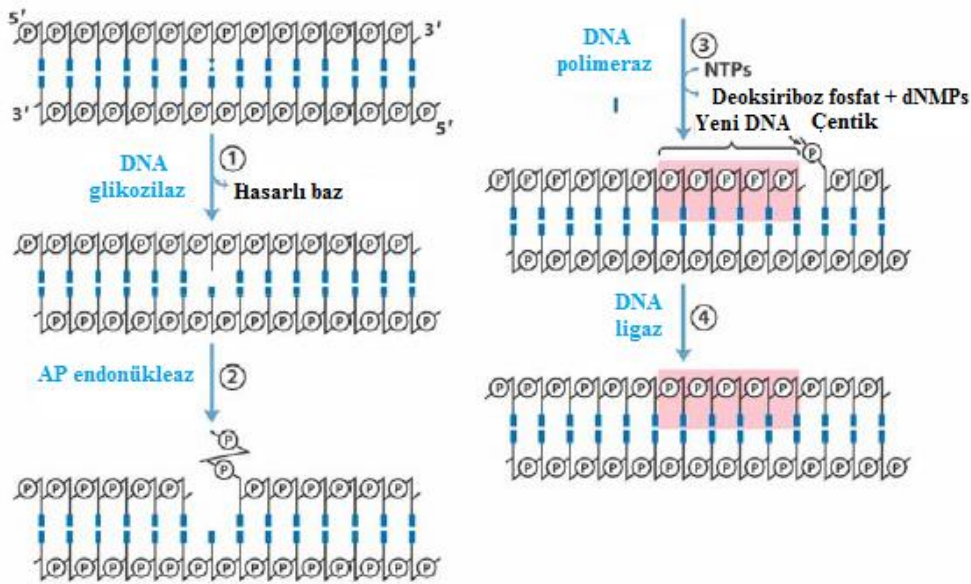
### 2.8.4.2. Eksizyon Tamir mekanizmaları

Fotoreaktivasyonun aksine, ışıktan bağımsız olan tamir mekanizmaları çok daha kompleksdir ve DNA'da meydana gelen hasarı doğrudan onarılmaz, bunun yerine hasarlı bölgedeki nükleotidleri yeni hasarsız nükleotidlerle değiştirir (Prakash 1993, Seeberg 1995, Britt 1996, Lindahl ve Wood 1999). Eksizyon tamir mekanizmasının baz eksizyon ve nükleotid eksizyon olmak üzere iki ana yolu vardır.

### 2.8.4.3. Baz Eksizyon Tamir Mekanizması

Baz eksizyon tamiri, iyonize radyasyon, güçlü alkilleyici ajanlar, hidrolitik deaminasyon ya da farklı intrasellüler metabolitlerden kaynaklanan baz lezyonlarına ve T4 Fajına özgü timin dimerlerinin tamirinde kullanılan DNA tamir yoludur.

Baz eksizyon tamir mekanizmasına katılan en önemli enzimler baz ve nükleotid rezidülerinin 2-deoksiriboz kısımları arasındaki N-glikosidik bağları kopararak, modifiye ya da hasarlı bazların farklı tiplerini uzaklaştıran DNA glikosilazlardır. Farklı DNA glikosilazlar hasarın farklı türlerini giderir ve tamir yolunun spesifisitesi ilgili glikosilazın tipi tarafından belirlenir (Seeberg ve ark. 1995). Baz uzaklaştırıldıktan sonra, apürinik/apirimidinik (AP) bölge oluşur ve bu bölge DNA ipliğinin 5' veya 3' ucunda çentikler açan AP endonükleaz ya da AP liyaz tarafından uzaklaştırılır. Kalan deoksiriboz fosfat rezidü fosfodiesteraz tarafından ortadan kaldırılır; oluşan boşluk DNA polimeraz tarafından doldurulur ve DNA ligaz iplikleri birleştirir (Sakumi ve Sekiguchi 1990, Seeberg ve ark.1995), (Anonim 2005), (Şekil 2.13).

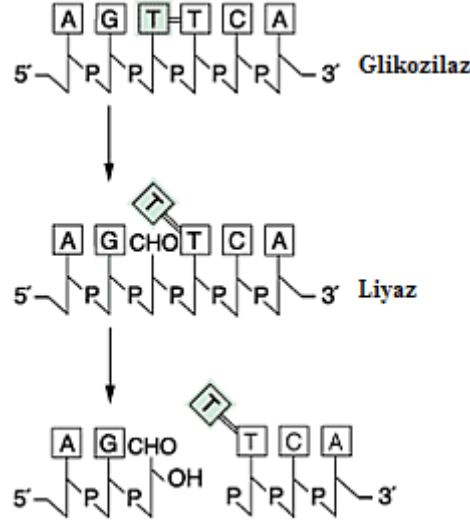


Şekil 2.13. Baz eksizyon tamir mekanizması (Anonim 2005)

Birçok DNA glikosilaza ek olarak, bazı organizmalar daha çok pirimidin dimer oluşumlarının bulunduğu bölgede zincir kırıklarına neden olan ve UV-endonükleaz olarak bilinen enzimler içerirler. UV endonükleazlar, dimeri 5'-pirimidin N-glikosidik bağından ayırır ve bunu AP liyazın zincir ayrılması takip eder (Anonim 2016) (Şekil 2.14). Bu enzimin yapısı X-ışını kristalografik yöntem ile resmedilmiş (Morikawa ve ark. 1995) ve reaksiyon mekanizma yapısı bölgeye yönelik mutajenez deneyler ile açıklanmıştır (Dodson ve ark.



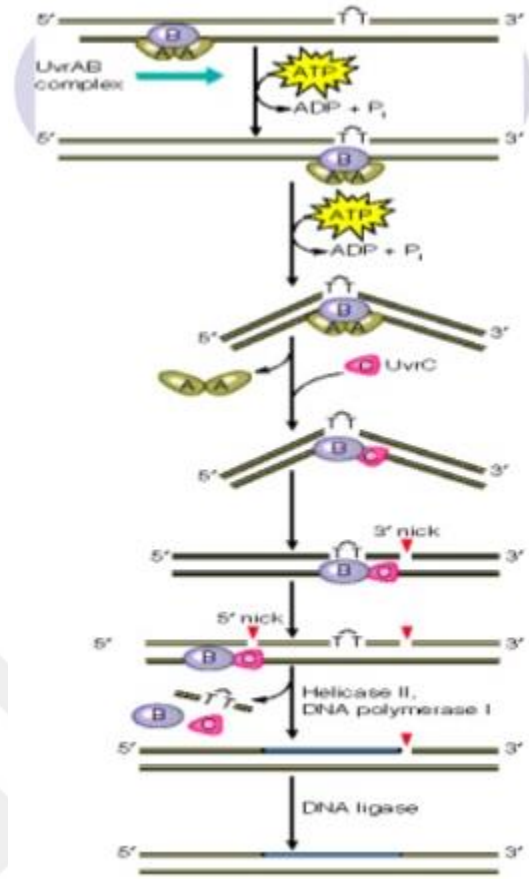
1993). Bu enzimler normalde sadece *Micrococcus luteus* gibi UV-dirençli organizmalarda bulunur (Dodson ve ark. 1994). Bununla birlikte, benzer bir enzim bakteriyofaj T4'ün *denV* geni tarafından kodlanmıştır ve buna benzer bir aktivite *S. cerevisiae* de saptanmıştır (Hamilton ve ark. 1992). Siklobütan pirimidin dimeri ve 6-4 fotoürün oluşumunu tanıyan, hemen lezyona 5' ucundan bir kesik oluşturan gerçek ökaryotik UV- endonükleazlar *S. pombe* ve *N. crassa*'da tespit edilmiştir (Bowman ve ark. 1994, Yajima ve ark. 1995).



Şekil 2.14. Timin dimerinin T4 fajına özgü baz eksizyon tamir mekanizması (Anonim 2016)

#### 2.8.4.4. Nükleotid Eksizyon Tamir Mekanizması

Nükleotid eksizyon tamir mekanizmasında hasarlı bazlar oligonükleotid olarak kesip çıkartılır. Bu işlem "ekzinükleaz" adı verilen enzim kompleksi tarafından gerçekleştirilir. Trimetrik protein (UvrA2+ UvrB)+ATP tarafından DNA taranır. UvrA2 hasarı algılar ve uzaklaşır. UvrB tek iplikte kabarcık oluşturmak üzere DNA'ı bükür. Daha sonra UvrC bağlanır, UvrB-UvrC kompleksi oluşur. UvrC hasarın 3' ucuna 4 ya da 5 bazlık, 5' ucuna 8 bazlık uzaktan çentikler açar. DNA helikaz (UvrD) bu 12-13 bazlık parçayı uzaklaştırır. DNA polimeraz I UvrB'yi uzaklaştırır, boşlukları doldurur ve zincir ligazla kapatılır (Şekil 2.15), (Anonim 2005).



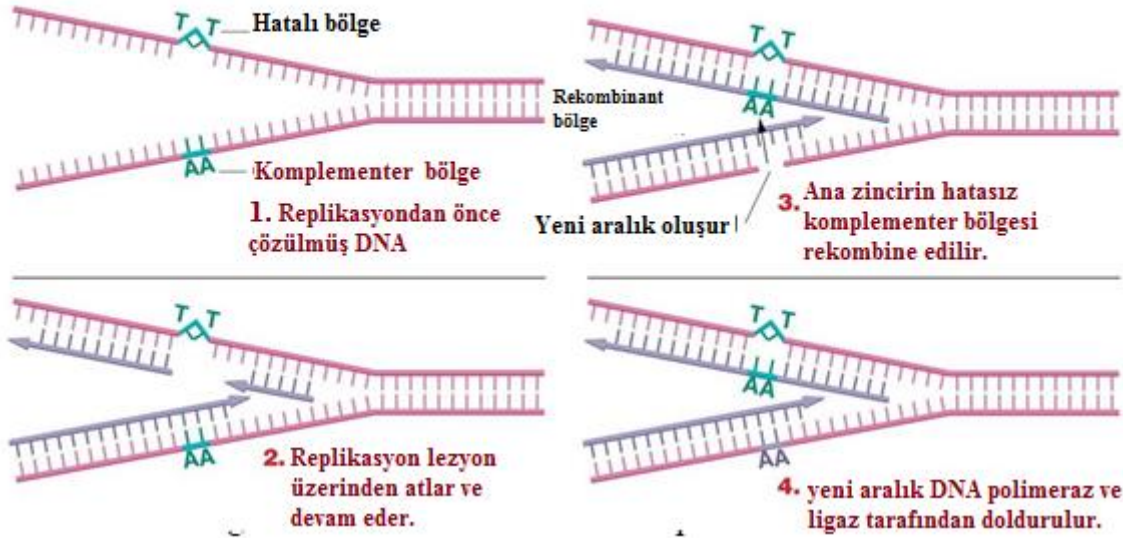
Şekil 2.15. Nükleotid eksizyon tamir mekanizması (Anonim 2005)

#### 2.8.4.5. Replikasyon Sonrası Onarım (Post-Replikasyon) Tamir Mekanizması

DNA hasarının tipi genellikle hücrenin kullandığı DNA tamir mekanizmasını belirlemekte etkilidir. Post-replikasyon onarım prosesi ilk olarak DNA hasarı kaynağı olarak ultraviyole ışığa kullanılırken keşfedilmiştir. UV-indüklenmiş lezyonların (örn; primidin dimeri oluşumu) birkaç tipi vardır ve bunların birçoğu nükleotid-eksizyon onarımı ve fotoreaktivasyon onarımı yolları ile ortadan kaldırılabilir. Bununla birlikte hasarlı DNA tamir mekanizmaları tarafından onarılamadığında ve tam olarak replike edilemediğinde replikasyon sonrası onarım (post-replikasyon) devreye girer. Herhangi bir lezyon bulunduran (örn; primidin dimeri oluşumu) DNA replike olurken, DNA polimeraz lezyonun bulunduğu kısımda duraklar ve yeni sentezlenen zincir üzerinde boşluk bırakarak üzerinden atlar. Son yıllarda, post-replikasyon onarımı *Escherichia coli*'deki RecF yolunun rekombinasyonu ile eşanlamı sayılmaya başlandı. Rekombinasyonel DNA onarımının RecF yolu büyük olasılıkla replikasyon çatalında kodlama yapmayan lezyonun kısmen çoğaltılmasından sonra ortaya çıkan boşluklu DNA substratları üzerinde etki etmektedir. Kodlanmamış lezyon üzerindeki kayıp bilgi daha sonra DNA'nın diğer ipliği tarafından RecA proteini gerektiren bir proses

içerisinde yerine doldurulur. Bu işlemde, tam olarak replikasyona uğrayan kardeş iplikten gelen bilgi, yeni zincirdeki boşluğa aktarılmış olur. Hasarsız kalıp zincirdeki boşluk ise daha sonra onarım sentezi ile giderilir (Sandler 2000), (Şekil 2.16).

### Post Replikasyon Tamiri



Şekil 2.16. Replikasyon sonrası onarım (Post-Replikasyon) tamir mekanizması (Anonim 2000)

*E. coli*'de SOS tamir sistemi denilen bir durum daha vardır. Bu sistemde, replikasyon sırasında görülen bir lezyonda duraklayıp boşluk bırakma yerine hata olduğunu belirten bir takım moleküller sentezlenir (lexA, recA, ve uvr gibi 20 kadar gen ürünü). Bu moleküller de lezyon bölgesini hataya eğilimli bölge haline dönüştürür ve replikasyon hızlıca devam eder.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

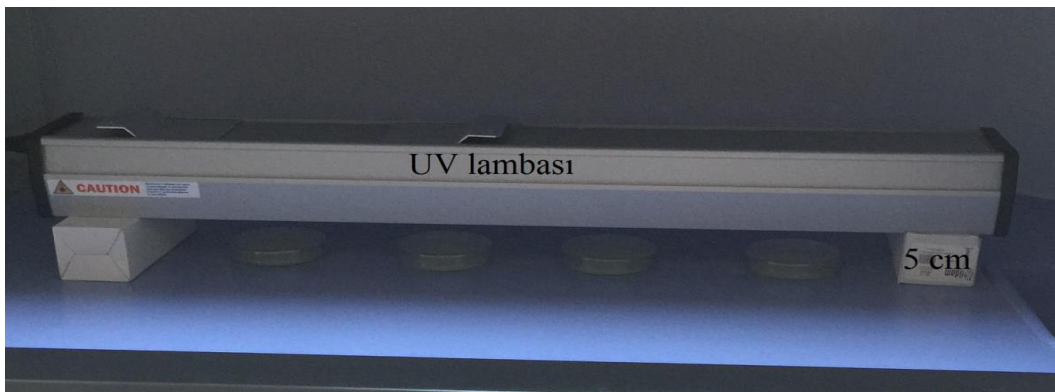
#### 3.1. Materyal

Uludağ Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Laboratuvar'ında daha önceden proteaz enzimi üretimi için topraktan izole edilmiş ve adlandırılmış olan *Bacillus subtilis* strain 168 E6-5 şusu kullanılmıştır.

#### 3. 2. Yöntem

##### 3.2.1.Fiziksel Mutajen UV İle Yapılan Mutasyon Çalışmaları

UV denemeleri Ultraviyole lambası (UltraViolet 254nm, Intensity ( $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ) 60, Lamba- VL-130.G, 1x30W Germination Lamp, Vilber) kullanılarak yapılmıştır (Şekil 2.1). Kültür saklama ortamından alınan bakterileri kültürü 18 saat boyunca öninkübasyona tabii tutulmuştur. Bu süre sonunda steril fizyolojik tuzlu su (FTS) ile uygun dilusyonlar kullanılarak katı besiyeri içeren petrilere yayma yöntemi ile ekim yapılmıştır. Bakterilerin üreme ortamına adaptasyonu için petrilere belirli sürelerde (6, 8 ve 10 saat) inkübatörde bekletilmiştir. Herbir süre sonunda petri kapları açılarak farklı zaman aralıklarında ( 0,5, 1, 5, 10, 15 ve 20 dakikalarda) UV ışınları besiyeri yüzeyindeki bakterilere direkt olarak uygulanmıştır. UV lambasının besiyeri üzerine olan uzaklığı herbir deneme için 5, 10 ve 15 cm olarak seçilmiştir. UV mutasyonu sırasında fotoreaktivasyonun önlenmesi amacıyla UV çalışmaları karanlıkta yapılmıştır ve tüm petrilere karanlık odadaki inkübatörde 48 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda canlılık gösteren koloniler mutant olarak seçilmiştir. Her bir deneme için 2 paralel çalışma yapılmıştır. Elde edilen mutanların proteaz aktiviteleri kalitatif olarak skim milk içeren agarlı ortamda zon çapları cetvel ile mm olarak ölçülerek saptanmıştır. En geniş proteaz zonu gösteren bir adet mutant suş seçilerek ve diğer çalışmalarda kullanılmıştır.



Şekil 3.1 UV mutasyonu oluşturma düzeneği

### 3.2.2 Bakteri Üretiminde Kullanılan Besiyerleri ve Bakteri Üretim Koşulları

Çalışmada mutant bakterilerin saklanması (kültür saklama), geliştirilmesi (öninkübasyon) ve enzim üretim kapasitelerinin ölçülmesinde farklı içerikli besiyerleri kullanılmıştır (Çizelge 3.1). Tüm besiyerleri pH'ları 7.0'ye ayarlandıktan sonra 121 °C'de 15 dk. süre ile otoklavda sterilize edilmiştir.

**Çizelge 3.1** Bakterilerin saklanması, geliştirilmesi ve enzim üretim kapasitelerinin ölçülmesinde kullanılan besiyerleri

İçerik (%g)	Kültür Saklama Besiyeri (Sevinç 2010)	Bakteri Geliştirme Besiyeri (Sevinç 2010)	Enzim Üretim Besiyeri (Qadar ve ark.2009)
Nutrient Broth	0.8	0.8	-
NaCl	0.8	-	-
Agar	2.0	-	-
Glukoz	-	-	0.1
Pepton	-	-	1.0
Maya özütü	-	-	0.02
MgSO <sub>4</sub>	-	-	0.01
CaCl <sub>2</sub>	-	-	0.01
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	-	0.05
pH	7.0	7.0	7.0

Kültür saklama ortamından alınan bakteri kültürü 18 saat boyunca öninkübasyona tabii tutularak, bu süre sonunda bakteri kültürlerinin 600 nm'deki optik yoğunlukları (OD) spektrofotometre kullanılarak steril fizyolojik tuzlu su ile 0.3'e ayarlanmıştır. Bu şekilde ayarlanan kültürden, içerisinde 150 mL enzim üretim ortamı bulunan 500 mL'lik erlenlere % 1 oranında aşılansak ve 37 °C'de 150 devir/dk çalkalama hızına sahip inkübatörde 56 saat boyunca inkübe edilmiştir. Bakteri üremesi ve enzim aktivite tayinleri 18., 24., 28., 32., 48., ve 56. saatlerde yapılarak bakterinin gelişme grafiği çıkarılmıştır. Böylece ana bakteri ve mutant suşların maksimum enzim üretim zamanı saptanmıştır.

### 3.2.3. Bakteri Üremesinin Ölçülmesi

Bakteri üremesinin belirlenmesi amacıyla, besiyerinin bulanıklılığı spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. İnkübasyon ortamından alınacak olan örnekler 600 nm dalga boyunda optik yoğunluk (OD) değerlerinin okunmasıyla bakteri üreme miktarı belirlenmiştir. Proteaz üretiminde kullanılan besiyeri kör olarak kullanılmıştır ve optik yoğunluk (OD) değerlerinin okunmasıyla bakteri üreme miktarı tespit edilmiştir.

### 3.2.4. Toplam Proteaz Aktivitesinin Tayin Edilmesi

Toplam proteaz tayini Anson tarafından önerilen yöntemin bir modifikasyonu ile yapılmıştır (Keay ve Wildi 1970). Enzim tayini için belirli aralıklarda (18., 24., 28., 32., 48., ve 56. saatler) alınan 10 mL örnek 6000 devir/dakika'da 15 dakika santrifüjlenerek enzim içeren süpernatant kısım peletten ayrılmıştır. Süpernatant kısım ham enzim çözeltisi olarak kullanılmıştır.

Proteaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla, substrat olarak %2'lik kazein çözeltisi kullanılmıştır. 2 gram kazein 20 mL 0.1 M NaOH içerisinde tamamen çözülünceye kadar sürekli karıştırılarak ısıtılmıştır. Bu şekilde hazırlanan kazein çözeltisinin hacmi 0.05 M fosfat tamponu (pH 7.0) ile 100 mL'ye tamamlanmış ve pH'sı 1/3 oranında seyreltilmiş fosforik asit ile 7.0'ye ayarlanmıştır.

Deneylerde 1 adet kör tüp ve her bir enzim örneği için 2 adet örnek tüpü kullanılmıştır. Her iki örnek tüpüne 1'er mL substrat çözeltisi, kör tüpüne ise 2 mL Triklor asetik asit (TCA) çözeltisi aktarılmış ve tüpler 37°C'lik su banyosunda 10 dakika bekletilerek reaksiyon sıcaklığına getirilmiştir. Daha sonra substrat içeren tüplere 1'er mL enzim çözeltisi, kör tüpe ise 1 mL fosfat tamponu (pH 7.0) ilave edilerek 37°C'de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda tepkime, örnek tüpler içerisine, 2 mL 0.4 M TCA çözeltisi konarak durdurulmuş ve kör tüpüne ise 1 mL substrat eklenmiştir. Bu karışım, 37°C'de 20 dakika bekletildikten sonra oluşan pütürlü yapıyı gidermek için 6000 devir/dakika'da 10 dakika santrifüjlenerek süpernatant kısmından alınan 1 mL'lik örneklere, 5 mL 0.4 M NaCO<sub>3</sub> ve 1 mL 1/3 oranında seyreltilmiş folin çözeltisi eklenmiş, karışım vortekslelendikten sonra 20 dakika oda sıcaklığında, karanlıkta bekletilmiştir. Bu süre sonunda çözeltinin optik yoğunluğu, enzim aktivitesinin belirlenmesi için 660 nm'de köre karşı okunmuştur.

Proteaz aktivitesi ölçümlerinde, standart eğri 0-60 U/g/mL tirozin içeren çözeltiler ile hazırlanmıştır. Yönteme göre 1 U/g/mL tirozin, 2 U/mL enzim aktivitesine karşılık

gelmektedir (Keay ve Wildi 1970). Enzim aktivitesi standart koşullarda, 1 Ug/mL tirozin açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

### **3.3. Enzim Üretimi Üzerine Etki Eden Besinsel Faktörler**

Bu çalışmada, besinsel parametrelerin (karbon, azot, metal iyonları) proteaz üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Bakteri maksimum enzim üretiminin saptandığı saatte kadar üretilmiş ve bu saatte bakteri üremesi ve enzim aktivite deneyleri yapılmıştır. Üretim ortamında bulunan karbon, azot ve metal iyonlarının yerine aynı oranlarda olmak üzere farklı karbon, azot ve metal kaynakları denenmiştir. Tüm deneyler 3 kez yapılarak ve ortalama değerler alınmıştır.

#### **3.3.1. Karbon (C) Kaynaklarının Etkisi**

Mikroorganizmaların üremesinde karbon kaynaklarının önemi göz önüne alınarak farklı karbon kaynakları ile çalışılmıştır. Bu amaçla, Çizelge 2.1’de içeriği verilen enzim üretim besiyerinde bulunan ve karbon kaynağı olarak kullanılan glukoz yerine, aynı oranda fruktoz, gliserol, sukroz, mısır nişastası, buğday nişastası, patates nişastası, maltoz, buğday kepeği kullanılarak proteaz enzimi üzerine etkisine bakılmıştır.

Bakterinin aşılması ve üretimi 2.2.4’de belirtildiği gibi yapılmış ve belirlenmiş olan örneklerde üreme ve proteaz aktivite tayinleri yapılmıştır.

#### **3.4.2. Azot Kaynaklarının Etkisi**

Azot kaynaklarının bakteri üreme kapasiteleri üzerine olan etkilerinin araştırılması amacıyla çeşitli azot kaynaklarının, enzim üretimine olan etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla Çizelge 2.1’de içeriği verilen enzim üretim besiyerinde azot kaynağı olarak kullanılan pepton ve maya özütü çıkarılarak yerine aynı oranda mısır ıslatma suyu (corn steep-liquor), tripton, yağsız süt tozu (skimmed milk), ve et özütü (meat ekstrakt), inorganik azot kaynağı olarak ise  $NH_4NO_3$ ,  $KNO_3$ ,  $(NH_4)_2SO_4$ ,  $NaNO_3$  ve  $NH_4Cl$  kullanılmış ve proteaz enzimi üzerine etkisine bakılmıştır.

Bakterinin aşılması ve üretimi 2.2.4’de belirtildiği gibi yapılmış ve belirlenmiş olan örneklerde üreme ve proteaz aktivite tayinleri yapılmıştır.

### **3.4.3. Metal İyonu Kaynaklarının Etkisi**

Besiyerinde bulunan metal iyonlarının bakteri gelişmesi ve enzim aktivitesi üzerine etkisini araştırmak amacıyla, Çizelge 2.1’de içeriği verilen enzim üretim besiyerinde bulunan  $\text{CaCl}_2$  ve  $\text{MgSO}_4$  çıkarılarak yerine bunların toplam miktarında  $\text{LiSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{MnSO}_4$  ve  $\text{ZnSO}_4$  kullanılmıştır. Üreme ve proteaz aktivite tayinleri yapılmıştır.

### **3.4.4. Maksimum Proteaz Üretimi İçin Modifiye Ortamın Hazırlanması**

2.4.1, 2.4.2 ve 2.4.3’de maksimum proteaz aktivitesinin saptandığı karbon, azot kaynakları ve metal iyonlarını içeren yeni bir modifiye ortam oluşturularak enzim veriminin sağlanması yoluna gidilmiştir. Üreme ve proteaz aktivite tayinleri yapılmıştır.





## 4. BULGULAR

### 4.1 Mutant Bakterilerin Elde Edilmesi

Mutant suşların elde edilmesi amacıyla bakterilerin besiyerine adaptasyon süreleri ve UV'ye maruz kalma zaman aralıkları her bir deneme için sabit tutulmuş, UV ışığının petri yüzeyine olan uzaklığı değiştirilerek çalışmalar yapılmıştır. Çalışmalar sonucunda, bakteriler UV ışığına maruz bırakılmadan önce besiyerine adaptasyonları için 6, 8 ve 10 saatlik petrielerde üretimleri sağlanmıştır. Her bir adaptasyon süresinin bakteri üzerinde olumlu etkisi görülmüştür. Fiziksel mutajen etkeni olan UV ışını ile yapılan çalışmalarda farklı zaman aralıkları (0,5, 1, 5, 10, 15 ve 20 dakikalarda) ve UV ışığının petri yüzeyine farklı uzaklıkları (5, 10 ve 15 cm) seçilmiştir. Besiyerine adaptasyon süresinin 10 saatin mutasyona uğrayacak bakterilerin gelişimi için uygun olduğu saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda en iyi mutasyon oluşturma zaman aralığı farklılık gösterirken, en iyi uzaklık olarak 15 cm bulunmuştur.

Mutasyon çalışmaları her bir deneme için iki paralel olarak yapılmıştır. Paralel çalışmalarda genellikle aynı sonuçlar elde edilmiştir. Çizelgelerde en geniş proteaz zon çapına sahip mutantlar gösterilmiştir. *Bacillus subtilis* strain 168 E6-5 şusu ile yapılan UV mutasyonu sonucu toplam olarak yaklaşık 369 mutant suş elde edilmiştir (Çizelge 4.1, 4.2 ve 4.3). Tüm çalışmalar sonucunda enzim üretimine sahip kolonilerin etrafında açık berrak zonlar cetvelle ölçülmüş ve kontrol olan ana suşa yakın ve geniş zonlu olanlar seçilmiştir. Bu mutant suşların zon çapları ana şusun zon çapı (8 mm) ile karşılaştırılmış, zon çapı ana şustan büyük olan MET39 (12 mm) ve MET41 (10 mm) olarak adlandırılan 2 adet mutant suş seçilmiştir (Şekil 4.1 ve 4.2). MET39 nolu mutata UV'ye maruz kalma koşulları 15 cm uzaklık ve 5 dakika ışınlama süresi ile elde edilirken, MET41 ise 15 cm uzaklık ve 15 dakika ışınlama süresi ile elde edilmiştir. Her iki mutantın koloni zon çapları ve proteaz zon çapları farklı çıkmıştır (Çizelge 4.3). Ancak toplam zon çapları birbirine yakın olduğundan dolayı her iki mutant enzim üretim kapasitelerini kantitatif olarak saptamak üzere denemeye alınmışlardır.

**Çizelge 4.1.** 5 cm uzaklıktan yapılan UV denemeleri sonucu elde edilen mutant suşların koloni ve zon çapları

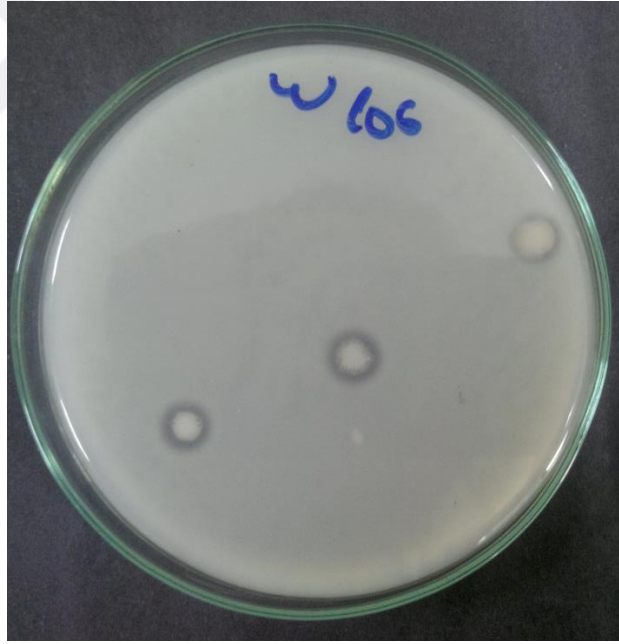
Adaptasyon Süresi 6 saat					8 saat				10 saat			
Zaman	Petri No	Toplam Mutant Sayısı	Zon Çapı	Koloni Çapı	Petri No	Toplam Mutant Sayısı	Zon Çapı	Koloni Çapı	Petri No	Toplam Mutant Sayısı	Zon Çapı	Koloni Çapı
30 sn	1-2	>20	8 mm	5 mm	Koloni Gözlenmedi				13-14	>20	5 mm	3 mm
1 dk.	3-4	>20	10 mm	3 mm					15-16	6	10 mm	6 mm
5 dk.	5-6	>20	6 mm	4 mm	11	1	8 mm	6 mm	17	4	10 mm	6 mm
10 dk.	7-8	17	6 mm	4 mm	12	4	7 mm	5 mm	18	1	10 mm	6 mm
15 dk.	9-10	10	7 mm	4 mm	Koloni Gözlenmedi				19	1	8 mm	3 mm
20 dk.	Koloni Gözlenmedi								Koloni Gözlenmedi			

**Çizelge 4.2.** 10 cm uzaklıktan yapılan UV denemeleri sonucu elde edilen mutant suşların koloni ve zon çapları

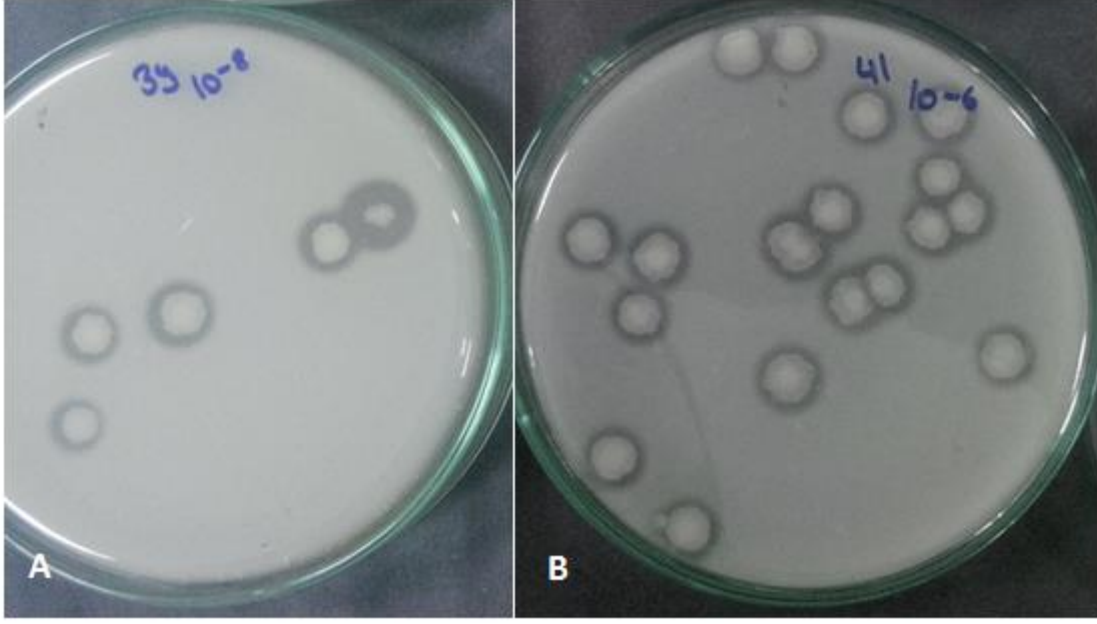
Adaptasyon Süresi 6 saat					8 saat				10 saat			
Zaman	Petri No	Toplam Mutant Sayısı	Zon Çapı	Koloni Çapı	Petri No	Toplam Mutant Sayısı	Zon Çapı	Koloni Çapı	Petri No	Toplam Mutant Sayısı	Zon Çapı	Koloni Çapı
30 sn	20-21	14	10 mm	6 mm	26-27	15	7	5	31-32	18	8 mm	5 mm
1 dk.	22-23	4	7 mm	5 mm	28-29	6	10	8	33	>20	10 mm	4 mm
5 dk.	24	1	10 mm	8 mm	Koloni Gözlenmedi				Koloni Gözlenmedi			
10 dk.	Koloni Gözlenmedi											
15 dk.	25	2	9 mm	7 mm	Koloni Gözlenmedi							
20 dk.	Koloni Gözlenmedi											

**Çizelge 4.3.** 15 cm uzaklıktan yapılan UV denemeleri sonucu elde edilen mutant suşların koloni ve zon çapları

Adaptasyon süresi 6 saat					8 saat				10 saat			
Zaman	Petri No	Toplam Mutant Sayısı	Zon Çapı	Koloni Çapı	Petri No	Toplam Mutant Sayısı	Zon Çapı	Koloni Çapı	Petri No	Toplam Mutant Sayısı	Zon Çapı	Koloni Çapı
30 sn	34	10	8 mm	5 mm	42-43	>50	8 mm	6 mm	37	35	6 mm	4 mm
1 dk.	35	1	9 mm	7 mm	44-45	>20	7 mm	5 mm	38	15	9 mm	6 mm
5 dk.	36	1	6 mm	4 mm	46-47	8	8 mm	3 mm	39	5	12 mm	4 mm
10 dk.	Koloni Gözlenmedi				Koloni Gözlenmedi				40	6	10 mm	7 mm
15 dk.					48	1	9 mm	6 mm	41	12	10 mm	8 mm
20 dk.					Koloni Gözlenmedi				Koloni Gözlenmedi			



**Şekil 4.1.** Ana suş *Bacillus subtilis* strain 168 E 6-5'in yağsız süt tozlu ortamındaki proteaz zon çapı (8 mm)



**Şekil 4.2.** Mutant MET39 (A) ve MET41 (B)'in yağsız süt tozlu ortamındaki proteaz zon çapları sırasıyla, 12 mm ve 10 mm. UV'ye maruz kalma koşulları: MET39 nolu mutant 15 cm uzaklık ve 5 dakika ışınlama süresi, MET41 15 cm uzaklık ve 15 dakika ışınlama süresi

UV ışığına bağlı mutasyon letal (ölüm) oranı aşağıdaki denkleme göre değerlendirilmiştir (Zong ve ark. 2011);

$$\text{Letal (ölüm) oran (\%)} = \frac{K - M}{K} \times 100$$

Burada; **K**: UV uygulanmayan ana suşun petrideki toplam koloni sayısı

**M**: UV'den sonra mutant suşun petrideki toplam koloni sayısı

Çizelge 4.4'de ana suş ile mutantlar kıyaslandığında MET39'da %90 oranında ölüm saptanırken, MET41'de bu oran %76 olarak bulunmuştur.

**Çizelge 4.4.** *Bacillus subtilis* strain 168 E 6-5'in hayatta kalma oranı üzerindeki UV radyasyonunun etkisi

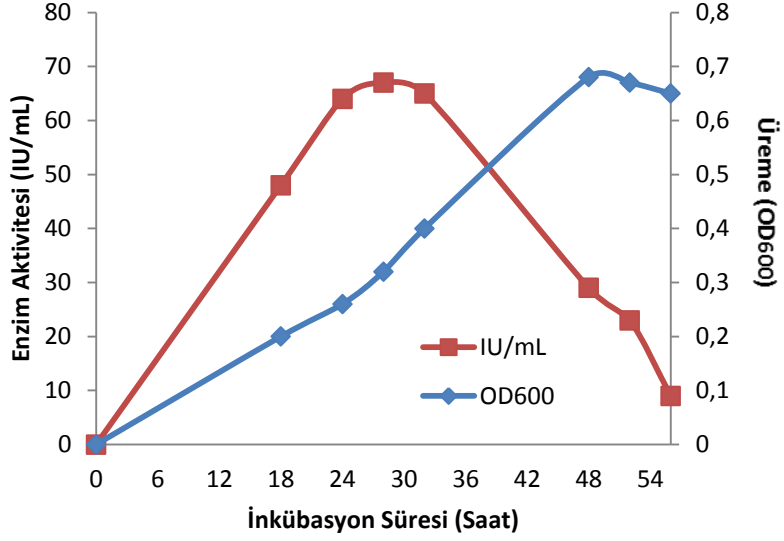
Bakteriler	Koloni Sayısı	Canlılık Oranı (%)	Letal (ölüm) Oranı (%)
Ana suş E 6-5	50	100	0
Mutant MET39	5	10	90
Mutant MET41	12	24	76

#### 4.2. Sıvı Ortamda Mutantların Proteaz Enzimi Üretim Kapasitelerinin Saptanması

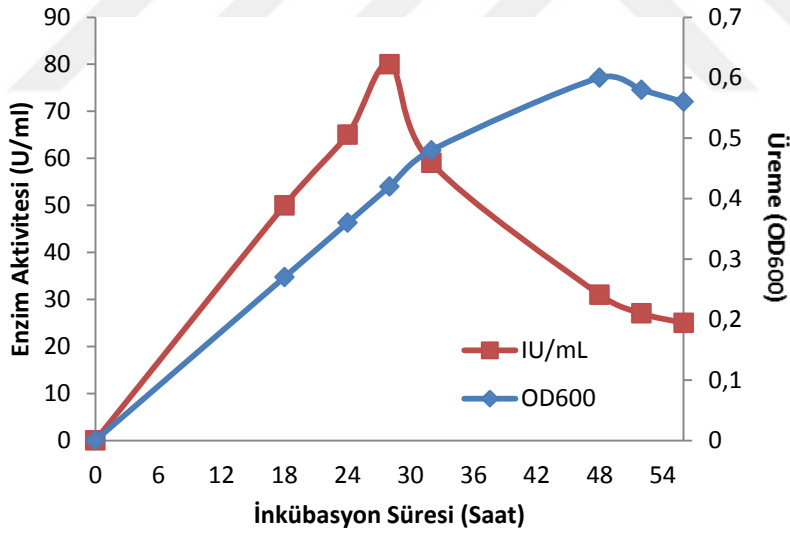
Yapılan UV mutasyon denemeleri sonucunda zon çapları dikkate alınarak seçilen iki adet mutant suş üreme eğrileri çıkarılmak üzere denemeye alınmıştır. Denemeye alınan bu 2 mutant suş Çizelge 2.1'deki içeriği verilen besi ortamında 18-56 saatler arasında üretilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda en yüksek enzim üretimi 28 saat sonunda ana suş için 67 IU/ml ve üreme OD<sub>600</sub> 0.32, mutantlar MET 39 için 80 IU/mL ve üreme OD<sub>600</sub> 0.4 olarak saptanırken, diğer mutant olan MET41 için 65 IU/mL ve üreme OD<sub>600</sub> 0.4 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.5, sırasıyla Şekil 4.3, Şekil 4.4 ve Şekil 4.5). Her iki suşun maksimum üremesi 48.saatte elde edilmiştir. Ana suş ve bunun mutant suşlarının üremelerine bakıldığında üremenin enzim üretimi ile birlikte paralellik göstermediği saptanmıştır. Maksimum enzim üretimi ana ve mutant suşta logaritmik fazın ortasında elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre MET39 ile daha yüksek enzim aktivitesi saptandığından dolayı, çalışmalara MET39 ile devam edilmiştir.

**Çizelge 4.5.** Ana suş ve bunun mutant suşlarının proteaz üretim kapasitelerinin zamana bağlı karşılaştırılması

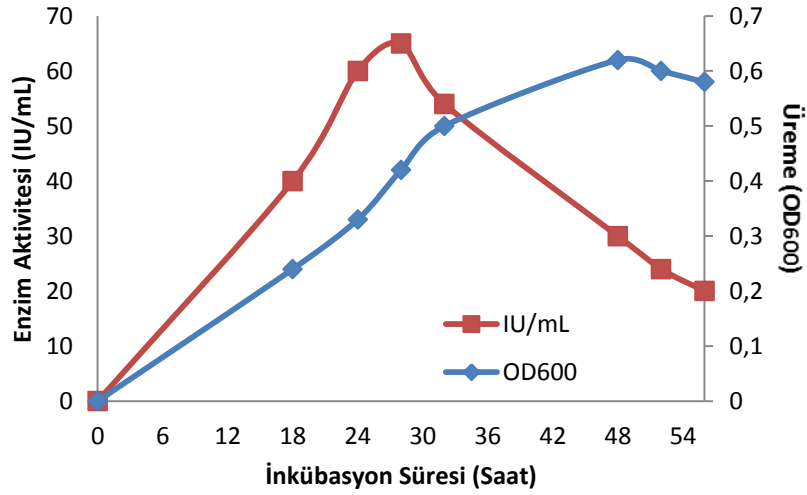
Saat	E6-5		MET39		MET41	
	IU/mL	OD <sub>600</sub>	IU/mL	OD <sub>600</sub>	IU/mL	OD <sub>600</sub>
18.	48	0,2	50	0,27	40	0,24
24.	64	0,26	65	0,36	60	0,33
28.	67	0,32	80	0,42	65	0,42
32.	65	0,4	59	0,48	54	0,5
48.	29	0,68	31	0,6	30	0,62
52.	23	0,67	27	0,58	24	0,6
56.	9	0,65	25	0,56	20	0,58



Şekil 4.3. *Bacillus subtilis* strain 168 E6-5 'in proteaz üretim kapasitesi ve üreme değerlerinin zamana bağlı değişimleri



Şekil 4.4. MET39'un proteaz üretim kapasitesi ve üreme değerlerinin zamana bağlı değişimleri

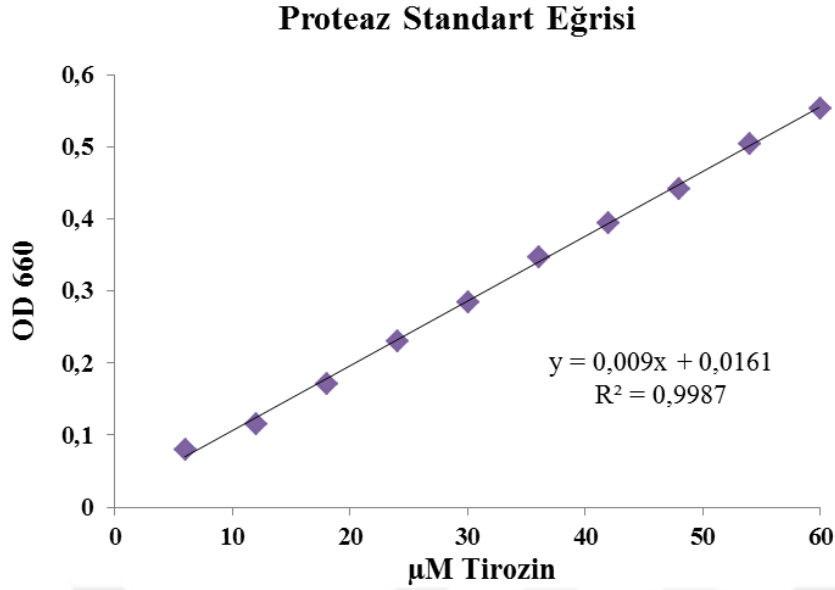


**Şekil 4.5.** MET41'in proteaz üretim kapasitesi ve üreme değerlerinin zamana bağlı değişimleri

Mutant suşlardan en iyi proteaz enzim aktivitesine sahip olan suş *Bacillus subtilis* MET39 olarak adlandırılmıştır. Çalışmalara bu suş ile devam edilmiştir.

#### 4.3. Tirozin Standart Grafiği ve Hazırlanışı

Enzim aktivitesinin hesaplanmasında, standart eğri için 0-60 µg/mL tirozin çözeltileri hazırlanmıştır. Tirozin miktarı, daha önce tarif edildiği gibi spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Konsantrasyona karşı absorbans grafiği lineer regresyon analiziyle çizilerek konsantrasyonu bilinmeyen örneğin tirozin konsantrasyonu, standart grafiğinden elde edilen doğru denkleminin formülünden hesaplandı (Şekil 4.6). Doğrunun denklemi  $y = 0,009x + 0,0161$  regresyon katsayısı  $R^2 = 0,9987$ 'dir.



**Şekil 4.6.** Tirozin standart grafiği

#### 4.4.Enzim Üretimi Üzerine Etki Eden Besinsel Faktörler

Bakterilerin buldukları ortama bağlı enzim üretim kapasiteleri değişir, bu nedenle ortam şartlarının değiştirilmesi enzim üretim miktarına etki etmektedir. Enzim üretim besiyerindeki karbon (C), azot (N) ve metal iyonu kaynakları değiştirilmiş, değişen ortam şartlarının *Bacillus subtilis* MET39 mutata suşunun proteaz üretimi üzerine olan etkileri belirlenmiştir.

Çalışmalarda her deney 3 kez tekrarlanmış olup, grafik ve çizelgelerde ortalama değerler verilmiştir.

##### 4.4.1. Karbon Kaynaklarının Etkisi

Üreme ortamında bulunan karbon kaynaklarının bakteri gelişmesi ve enzim üretimi üzerine etkilerini belirlemek amacıyla, Çizelge 2.1'de içeriği verilen besiyerindeki karbon kaynağı yerine aynı oranda Fruktoz, Sukroz, Maltoz, Gliserol, Patates nişastası, Buğday kepeği, Mısır nişastası ve Buğday nişastası kullanılmıştır. Farklı karbon kaynağı içeren besiyerinde mutata suş 28 saat boyunca inkübe edilmiş ve 28. saatte alınan örneklerde proteaz aktivitesi ve üreme değeri tayinleri yapılmıştır (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.7).

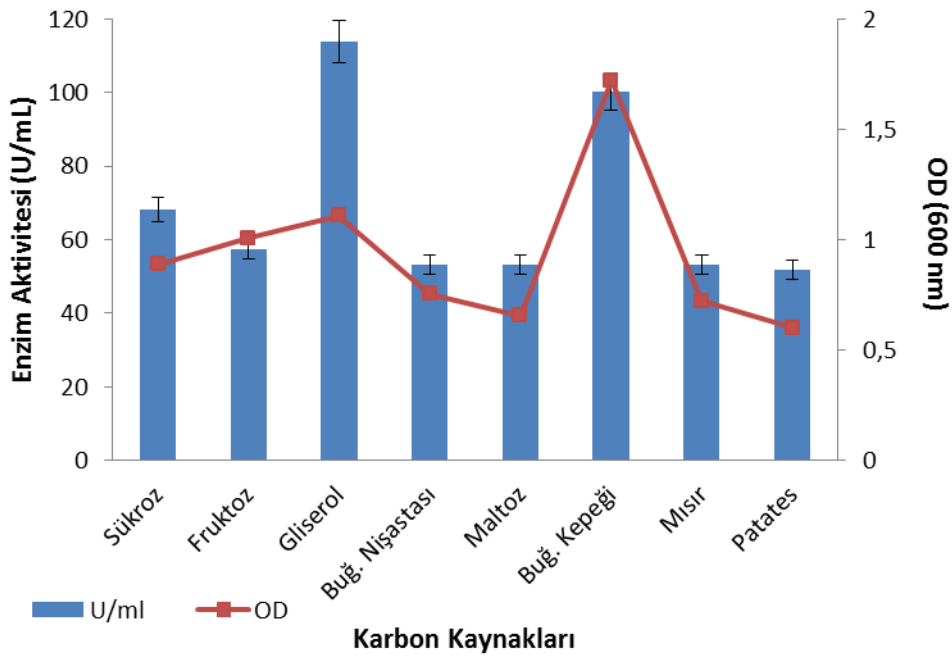
*Bacillus subtilis* MET39'un enzim üretimi açısından karbon kaynağı tercih sırası sırasıyla Gliserol > Buğday kepeği > Glukoz (kontrol) > Sükroz > Fruktoz > Buğday nişastası = Maltoz = Mısır > Patates olarak belirlenmiştir. Maksimum bakteri üremesinin sırasıyla Buğday kepeği > Gliserol > Fruktoz > Sükroz > Buğday nişastası = Mısır > Glukoz (kontrol) > Maltoz



>Patates varlığında olduğu görülmektedir. Gliserol bulunan besiyerinde proteaz aktivitesinde kontrole göre %42 ve buğday kepeğinde ise %25'lik artış gözlenirken, patatesli ortamın aktivitesinde %35, buğday nişastası, maltoz ve mısırlı ortamların aktivitesinde 34'lük kayıplar gözlenmiştir (Çizelge 4.6).

**Çizelge 4.6.** Farklı karbon kaynaklarının 28. saatte, MET39'un enzim üretimi ve üreme üzerine etkileri

Karbon Kaynakları	IU/mL	Üreme OD <sub>600</sub>	Bağıl Aktivite
Glukoz (Kontrol)	80	0,678	100
Sükroz	68	0,888	85
Fruktoz	58	1,006	72,5
Gliserol	114	1,11	142,5
Buğ. Nişastası	53	0,754	66,25
Maltoz	53	0,657	66,25
Buğ. Kepeği	100	1,722	125
Mısır	53	0,724	66,25
Patates	52	0,602	65



**Şekil 4.7.** Karbon kaynaklarının 28. saatte, MET39'un enzim üretimi üzerine etkileri

#### 4.4.2. Azot Kaynaklarının Etkisi

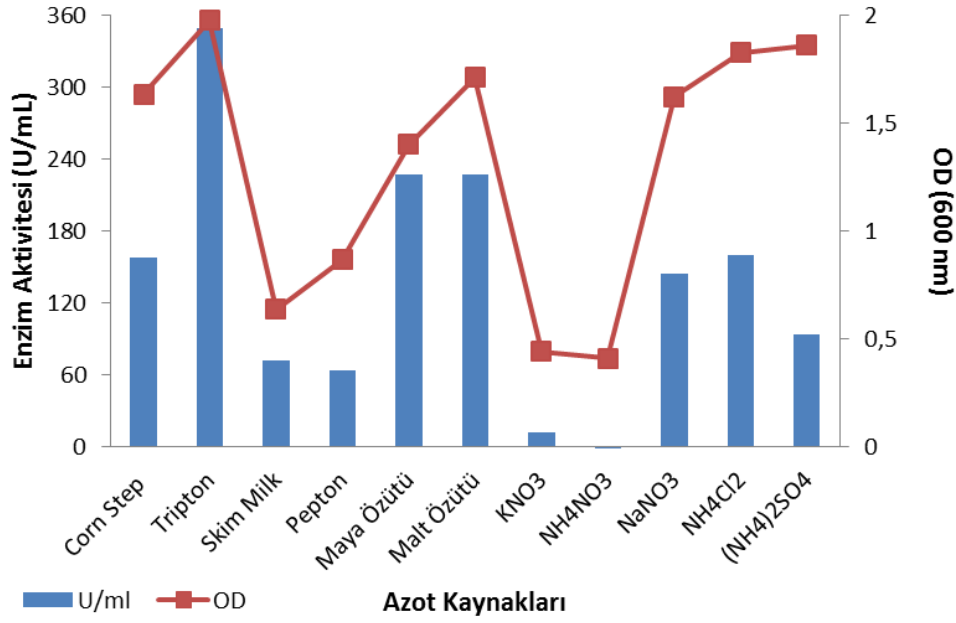
Azot kaynaklarının bakteri üremesi ve enzim üzerine etkilerini belirlemek amacıyla kontrol ortamındaki pepton ve maya özütü yerine sırasıyla mısır ıslatma suyu (corn step-liquor), tripton, yağsız süt tozu, pepton, maya özütü ve et özütü; inorganik azot kaynağı olarak ise  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaNO}_3$  ve  $\text{NH}_4\text{Cl}$  kullanılmıştır. Farklı azot kaynakları içeren besiyerlerinden 28. saatte alınan örneklerin üreme değerleri ölçülmüş ve enzim aktivite tayinleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar grafik ve çizelge olarak ayrı ayrı verilmiş olup, buralarda da görülebileceği gibi en yüksek enzim aktivitesi tripton varlığında elde edilmiştir (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.8).

*Bacillus subtilis* MET39'un enzim üretimi açısından organik azot kaynağını sırası Tripton > Maya özütü > Malt özütü > Corn step liquer > Kontrol > Skim milk > Pepton şeklinde tercih ettiği görülmüştür. İnorganik azot kaynaklarını ise sırasıyla  $\text{NH}_4\text{Cl}_2$  >  $\text{NaNO}_3$  >  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  >  $\text{KNO}_3$  şeklinde tercih edildiği görülmüştür.  $\text{NH}_4\text{Cl}_2$  (159 IU/mL) ve  $\text{NaNO}_3$  (144 IU/mL) varlığında ise kontrolden fazla aktiviteler görülürken,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (0 IU/mL) varlığında enzim aktivitesi göstermemiştir. Belirtilen tercih sıraları incelendiğinde, kullanılan azot kaynakları içerisinde triptonun varlığında enzim aktivitesinin (348 IU/mL) kontrole göre (80 IU/mL)'e oldukça fazla olduğu saptanmıştır.

**Çizelge 4.7.** Farklı azot kaynaklarının 28. saatte MET39'un enzim üretimi ve üreme üzerine etkileri

Azot Kaynakları	IU/mL	Üreme $\text{OD}_{600}$	Bağlı Aktivite
Kontrol	80	0,678	100
Corn Step Liquor	158	1,633	197,5
Tripton	348	1,974	435
Skim Milk	72	0,637	90
Pepton	64	0,867	80
Maya Özütü	227	1,4	283,75
Malt Özütü	226	1,71	282,5
$\text{KNO}_3$	12	0,442	15
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	0	0,409	0
$\text{NaNO}_3$	144	1,621	180
$\text{NH}_4\text{Cl}_2$	159	1,824	198,75
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	94	1,858	117,5

Bakteri üremesi üzerine organik azot kaynaklarının etkisi incelendiğinde tercihin farklı şekilde sıralandığı görülmektedir. Buna göre; Tripton > Malt özütü > Corn step liquor > Maya özütü > Pepton > Kontrol > Skim milk olarak belirlenmiştir. İnorganik azot kaynaklarının etkisi incelendiğinde ise,  $(NH_4)_2SO_4 > NH_4Cl_2 > NaNO_3 > KNO_3 > NH_4NO_3$  şeklinde bir sıralama gerçekleşmektedir.



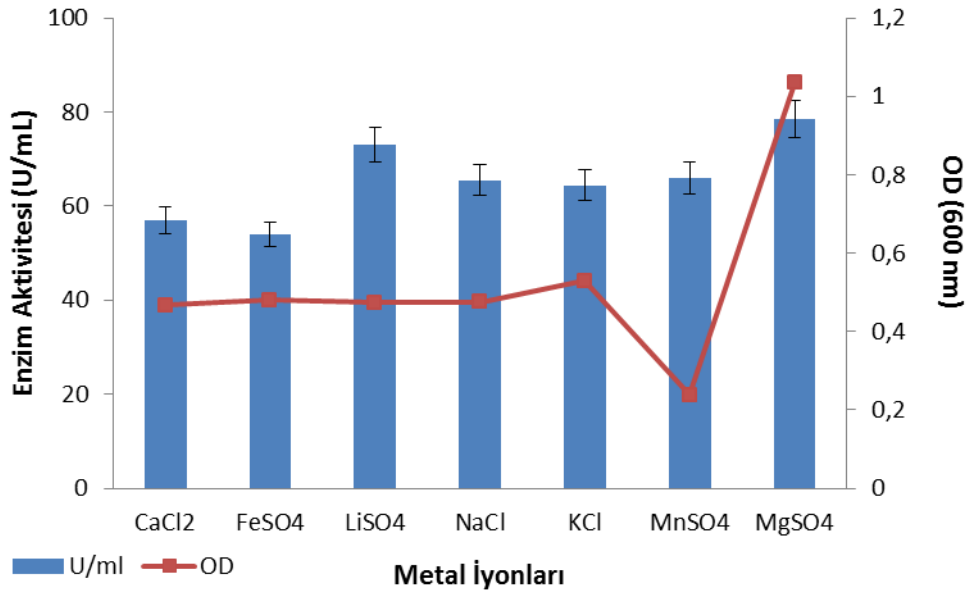
Şekil 4.8. Azot kaynaklarının 28. saatte MET39'un enzim üretimi üzerine etkileri

#### 4.4.3. Metal İyonu Kaynaklarının Etkisi

Metal iyonlarının bakteri üremesi ve enzim üretimi üzerine etkisini araştırmak üzere yapılan çalışmalarda kontrol ortamındaki  $MgSO_4 + CaCl_2$  yerine sırasıyla  $MgSO_4$ ,  $LiSO_4$ ,  $FeSO_4$ ,  $CaCl_2$ ,  $KCl$ ,  $NaCl$  ve  $MnSO_4$  kullanılmıştır. Farklı metal kaynakları içeren besiyerlerinden 28. saatte alınan örneklerde üreme değerleri ve enzim aktivite tayinleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar grafik ve çizelge olarak ayrı ayrı verilmiş olup, buralarda da görülebileceği gibi kontrole en yakın aktivite değeri metal kaynağı  $MgSO_4$  varlığında elde edilmiştir (Çizelge 4.8 ve Şekil 4.9). Metal iyonlarının fazla bir etkisi görülmemiştir.

**Çizelge 4.8** Metal kaynaklarının 28. saatte MET39'un proteaz aktivitesi ve üreme miktarı üzerine etkileri

Metal İyonları	IU/mL	Üreme OD <sub>600</sub>	Bağl Aktivite
Kontrol	80	0.678	100
CaCl <sub>2</sub>	57	0,467	71,25
FeSO <sub>4</sub>	54	0,481	67,5
LiSO <sub>4</sub>	73	0,474	91,25
NaCl	66	0,476	82,5
KCl	64	0,529	80
MnSO <sub>4</sub>	66	0,239	82,5
MgSO <sub>4</sub>	78	1,034	97,5



**Şekil 4.9.** Metal iyonların 28. saatte MET39'un enzim üretimi üzerine etkileri

MET39'un enzim üretiminde metal kaynağını sırası ile Kontrol (MgSO<sub>4</sub> + CaCl<sub>2</sub>) > MgSO<sub>4</sub> > LiSO<sub>4</sub> > MnSO<sub>4</sub> = NaCl > KCl > CaCl<sub>2</sub> > FeSO<sub>4</sub> şeklinde tercih ettiği görülmüştür. Belirtilen tercih sıraları incelendiğinde, kullanılan metal kaynakları içerisinde kontrol (80 IU/mL)'e göre bir verim artışı sağlanmadığı saptanmıştır.

#### 4.4.4. Maksimum Proteaz Üretimi İçin Modifiye Ortamın Hazırlanması

Maksimum proteaz sentezinin saptandığı karbon, azot ve metal iyonlarını içeren yeni oluşturulacak bir modifiye ortamda enzim veriminin sağlanması yoluna gidilmiştir. Modifiye ortamda en iyi karbon kaynağı olarak elde edilen gliserol, azot kaynağı olarak tripton ve metal iyonları olarak  $MgSO_4+CaCl_2$  kullanılmıştır (Çizelge 4.9).

**Çizelge 4.9.** Modifiye ortamdaki proteaz aktivitesi ve bakteri üremesi

Kontrol Ortam	IU/mL	OD <sub>600</sub>	Modifiye Ortam	IU/mL	OD <sub>600</sub>
Glukoz			Gliserol		
Pepton+ Maya özütü	80	0,678	Tripton	150	1,6
$MgSO_4 + CaCl_2$			$MgSO_4 + CaCl_2$		

Modifiye ortamın kontrole göre bağlı aktivitesi %88'lik bir artış göstermiştir (Çizelge 4.9).

## 5.TARTIŞMA Ve SONUÇ

Enzimler çevre kirliliğine daha az yol açmaları, kimyasal süreçleri daha ılımlı koşullarda ve ekonomik olarak gerçekleştirebilmeleri sebebi ile gıda, tekstil, deri ve deterjan endüstrileri, tıpta teşhis ve tedavide, ziraatta ve atık giderme işlemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Enzimler hayvanlar ve bitkiler tarafından sentezlenmesine rağmen, kontrollü koşullarda kısa sürede ürün elde edilmesinden dolayı mikroorganizmalar asıl kaynağı oluşturmaktadır. Ayrıca mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha kararlı ve ucuz olmaları ve fazla miktarda elde edilebilmeleri sebebi ile mikrobiyal enzimler daha çok tercih edilmektedirler (Wiseman 1987). Ticari olarak kullanılan enzimlerin üretiminde çoğunlukla *Bacillus* türleri kullanılmaktadır (Denizci ve ark. 2004).

Geleneksel olarak yeni enzimler doğal kaynaklardan doğrudan izole edilen mikroorganizmaların seçilmesi yoluyla elde edilmektedir. Dünyada farklı endüstriyel alanlarda en fazla kullanılan bir enzim olan proteazı yüksek verimde üreten yeni suşların elde edilmesi son derece önemlidir. Araştırılması en uzun süren safhası da budur. Bu tür suşların eldesinde alışlagelmiş mutasyon yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Diğer yandan yüksek üretken suşların fiziksel ve kimyasal mutajenlerle mutasyona uğratılması ile yeni verimli mutantların elde edilmesi önem kazanmıştır. Bu amaçla fiziksel mutajen etkeni olarak ultraviyole kullanılmaktadır. Bir klasik mutasyon tekniği olan UV ile spontan mutasyonların oluşturulması önemlidir. Spontan mutasyon sıklığı organizmalar arasında büyük farklılık gösterir. Aynı tür içinde bile spontan mutasyon sıklığı genden gene değişir. Organizmalar arasındaki değişkenlik, onların hata okuma ve onarım sistemlerinin göreceli etkinliklerinden dolayı oluşabilir (<http://bektastepe.net/course-slides/15-gen-mutasyonu-dna-onarm.pdf> 2016).

Bu çalışmada yüksek oranda proteaz üreten yeni bir mutant elde edilmesi amacıyla yapılan spontan UV mutasyon çalışmalarında farklı adaptasyon süresi, zaman aralıkları, UV ışığının uzaklığı koşulları kullanılmıştır. Uygulanan besiyerine adaptasyon süresi olarak 10 saatin daha uygun olduğu saptanmıştır. Bunun nedeni 6 ve 8 saatlik adaptasyon sürelerinde bakterilerin ortama alışması ve üreme göstermesi yavaş olduğundan uygulanan UV bakterilerin çoğunun ölümüne neden olmuş olabilir. 10 saat süresinde koloni içindeki bakteriler sayı olarak arttığından uygulanan UV ışına dirençli bakterilerin hayatta kalması olasıdır. Diğer yandan, UV maruz kalma zaman aralığının artması ile UV dirençli bakterilerin sayısında azalma görülmüştür. Bu beklenen bir durumdur. Çünkü zaman arttıkça daha yoğun

UV ışığına maruz kalındığından dolayı bakterinin DNA'sında dimerler oluşmakta ve bunlar ise onarım mekanizmalarınca tamir edilememektedir. Bakteride letal sonuçlar ortaya çıkmaktadır. Ancak bu çalışmada birinci verimli mutant olan MET39 kodlu suş 5 dakikalık UV uygulaması ile elde edilirken, ikinci verimli mutant olan MET41 kodlu suş 15 dakika UV ışığı uygulanması ile dirençli suşlar olarak elde edilmiştir.

Ana suş ile mutantlar kıyaslandığında MET39'da %90 oranında ölüm saptanırken, MET41'de bu oran %76 olarak bulunmuştur. UV koşulları her iki mutant için karşılaştırıldığında 15 dakika ışınlama süresinde daha fazla mutant elde edilmesi petriye yapılan dilüsyon oranlarından kaynaklanmaktadır. Aksi durumda daha az koloni eldesi beklenmekteydi. Ana suşun canlılık oranı ile UV'ye maruziyet süresi ters orantılı olarak bulunmuştur.

*Bacillus subtilis* E6-5 suşu ile yapılan UV mutasyonu sonucu toplam yaklaşık 369 mutant suş elde edilmiştir. Bu mutant suşlar arasında 2 adet mutant suş koloni ve proteaz zon çapları farklılık göstermesine rağmen toplam zon çapında birbirine yakın değerler verdiği için kantitatif enzim üretim kapasiteleri saptanmıştır. En iyi proteaz enzimi üreten mutant suş MET39 olarak belirlenmiş ve *Bacillus subtilis* MET39 olarak adlandırılmıştır. Mutant *Bacillus subtilis* MET39'dan proteaz üretiminde 1.2 kat artış gözlenmiştir. Çıkarılan üreme eğrisinde ana ve mutant suşun üremesi ve enzim üretim kapasitesinin paralellik göstermediği, maksimum enzim üretiminin üremenin logaritmik fazın ortasında elde edildiği saptanmıştır.

Birçok araştırmacı endüstriyel öneme sahip olan proteaz enzimini yüksek verimde üreten yeni mutant suşlar elde etmek için çeşitli yöntemler kullanmışlardır. UV kullanılarak elde edilen *Bacillus subtilis* mutant suşlarında proteaz verimlerindeki değişim araştırılmış ve mutasyonla farklı proteaz artışları saptanmıştır. Üretim ortamı içeriği enzim üretimi üzerinde arttırıcı bir etkiye sahiptir (Gulati 2007). Çünkü kültür ortamının içeriği ve fermantasyon koşulları enzim üretimini etkileyen önemli parametrelerdendir. Ortam içeriğinin optimize edilmesi amacıyla farklı karbon, azot ve metal iyon kaynakları kullanılmaktadır (Lan 2002). Bu amaçla elde ettiğimiz yeni mutant *B.subtilis* MET39'un proteaz üretim kapasitesini arttırmak için üretim ortamında farklı karbon, azot ve metal iyonları kaynakları denenmiş ve elde edilen sonuçlara göre yeni bir modifiye ortam oluşturulmuştur. Bu amaçla yapılan çalışmada en iyi karbon kaynağı olarak gliserol bulunmuştur. Gliserol bulunan besiyerinde proteaz aktivitesinde kontrole göre %42 ve buğday kepeğinde ise %25'lik artışlar gözlenmiştir. En iyi organik azot kaynağı tripton olarak saptanmış ve kontrole göre tiptonlu ortamda % 335 artışla enzim üretimi sağlanmıştır. Bunu takiben maya özütü ortamda %184, malt özütülü ortamda %182,

corn steep liquorlu ortamda %97'lik enzim artışları saptanmıştır. İnorganik azot kaynakları içinde ise en iyi enzim üretimleri %99 artışla  $\text{NH}_4\text{Cl}_2$ ' lu ortamda elde edilmiştir. Bunu sırasıyla %80 ve 17 artışla  $\text{NaNO}_3$  ve  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  izlemiştir.

Metal iyonları ile yapılan çalışmalarda ise besi ortamına eklenen metal iyonlarının enzim üretiminde bir artışa neden olmadığı saptanmıştır. Kontrol besi ortamında  $\text{MgSO}_4$  ve  $\text{CaCl}_2$  birlikte bulunmasına rağmen, sadece  $\text{MgSO}_4$  kullanıldığında da kontrole yakın bir enzim üretimi elde edilmiştir.

Ultraviyole radyasyon genetiği değiştirilmiş suşların eldesinde evrensel olarak bilinen ve sıklıkla kullanılan bir mutajendir. Sanchez ve ark. (1992) *B. megaterium*'da germinasyona uğramış sporlarda timin dimerlerinin ve dormant sporlarda da spor fotoürünlerinin oluşumu için *B.subtilis* sporlarından daha az UV dozuna ihtiyaç duyduğunu belirlemiştir. Nariman ve ark. (2001) ise sporsuz *Bacillus sphaericus* izolasyonunda UV muamelesinin mutajenik bir ajan olan MNNG'den daha efektif olduğunu tespit etmiştir. Wayne ve Belinda, 2003 ise *B. anthracis* sporlarının sık kullanılan *B. subtilis*'e göre UV'ye 3 veya 4 kat daha dirençli olduğunu tespit etmiştir.

Çeşitli araştırmacılar en iyi enzim üretimi için farklı karbon, azot kaynakları ve metal iyonları kullanmışlar ve bu araştırmalar neticesinde birbirinden farklı sonuçlara ulaşmışlardır.

Solaiman ve ark. (2005) *B. Pumilus* ile yaptıkları UV mutasyon çalışmalarında maruz kalma süresi olarak 20 dakika ve uzaklık olarak ise 5 cm'de en iyi mutant suşları elde ettiklerini ifade etmişlerdir.

Wang ve ark. (2016) UV mutasyon çalışmalarında elde ettikleri *Bacillus subtilis* S1-4 mutantını 24 saatlik besi ortamda üretimi sonunda ana suştan 2.5 kat daha yüksek proteaz üretimi elde etmişlerdir. Farklı metal iyonları kullandıklarında aktivitede bir artış saptamamışlardır.

Nadeem ve ark. (2010) *Bacillus licheniformis* N-2 suşunu UV, NTG(N-metil-N-nitro-N-nitrosogunidin) ve MMS (metil metan sulfonat) 3'lü kombinasyonu ile muamele ettiklerinde 9 proteaz pozitif mutant elde etmişler, bunların arasından en iyi proteolitik mutant suş ana suştan 1.4 kat daha yüksek proteaz aktivitesi göstermiştir. UV mutasyon denemelerinde en iyi maruz kalma süresini 15 dakika olarak saptamışlardır.



Nadeem ve ark. (2011) *Bacillus pumilus* ana suşu 30-120 dakika aralığında UV'ye maruz bırakmıştır. %1.95 minimum yaşam oranı 254 nm'de UV ışını ile 120 dakika maruz kaldıktan sonra gözlenmiştir. Çeşitli mutantlar arasından ana suşa göre 1.95 kat daha fazla enzim üreten en iyi pozitif mutant *Bacillus pumilus* M15 seçilmiş ve 90 dk UV'ye maruz bırakıldıktan sonra en geniş zon 26 mm, proteaz aktivitesi 67.84 U/mL olarak bulunmuştur.

Shikha ve Darmwal (2007) tarafından *Bacillus pantotheneticus*'un ana suşa göre alkali üretimde 1.44 kat artışa sahip olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca başka bir araştırmada, UV mutant *Pseudomonas* sp. JNGR242 tarafından alkali proteaz üretiminde 2.5 kat artış gözlenmiştir (Dutta ve Banerjee 2006).

Dutta ve ark. (2006) Ekstraselüler proteaz üretimi için yöresel topraklardan izole edilen bakteri *Pseudomonas* sp. RAJR 044 olarak isimlendirilmiş ve UV radyasyonla elde edilen mutant suş JNGR 242'nin proteaz aktivitesi yabancı tipe göre 2.5 kat fazla bulunmuştur.

Raju ve Divakar (2013), *Bacillus cereus* ile yaptıkları (UV) radyasyon, etil metan sülfonat (EMS) and etidyum bromidli mutasyon çalışmalarında ana suştan 2 kat daha fazla proteaz üreten mutant elde ettiklerini ve *Bacillus cereus* GD55 olarak isimlendirdikleri mutantın karbon kaynağı olarak fruktoz, organik azot kaynağı olarak pepton ve inorganik azot kaynağı olarak ise NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> varlığında en iyi proteaz üretimi elde ettiklerini rapor etmişlerdir.

Basavaraju ve ark. (2014), topraktan izole ettiği *Bacillus* sp. suşlarından yüksek skim milk hidrolizi gösteren verimli alkalın proteaz üreticisi (3.32U) olarak seçmişler ve bu suşu geliştirmek için 0, 5, 10, 15 ve 20 dak. UV radyasyona maruz bırakmışlar ve sonuç olarak proteaz aktivitesi 4.78 U'ya yükselmiştir.

Çeşitli mutasyon teknikleri ile de maksimum verimde enzim üreten yeni suşlar geliştirmek mümkündür (Chand ve ark. 2005). Rao ve arkadaşları (1998), mutajenezin geleneksel yöntemlerle veya rekombinant DNA teknolojiyle proteaz veriminin artırılmasında önemli rol oynadığını vurgulamıştır. Azad (1994) tarafından *Bacillus subtilis*'in mutajenez yoluyla enzim aktivitesinde binlerce kat artış gözlemlendiği rapor edilmiştir.

Mehrotra ve ark. (1999) mutant *Bacillus* sp. suşunun glukoz, Mabrouk ve ark. (1999) da laktoz ve glukoz varlığında en yüksek seviyede proteaz üretimi rapor etmişlerdir.

Basa ve ark. (2014) *Bacillus* sp. suşu ile yaptıkları UV mutasyon çalışmalarından elde ettikleri mutantın en iyi karbon kaynağı olarak glukoz ve azot olarak da kazein varlığında yüksek

proteaz üretimine sahip olduklarını belirtmişlerdir. Diğer yandan, *Prevotella ruminicola* (Wang ve Hsu 2005), *Bacillus* sp. (Rao ve Sarma 2006), *Pseudomonas aeruginosa* (ARahman ve ark 2005) mutantlarının kazein, pepton, maya özütü varlığında en iyi proteaz ürettikleri saptanmıştır.

Proteaz üreticisi *Bacillus cereus* UV radyasyon, Etil Metan Sülfonat ve Etidyum Bromid kullanarak rastgele mutasyonla suş geliştirme yoluna gidilmiş ve en verimli proteaz üreticisi suş *Bacillus cereus* GD 55 Etil Metan Sülfonat (EMS) ve Etidyum Bromid kullanılarak elde edilmiş ve farklı organik ve inorganik azot, karbon kaynakları gibi üretim parametreleri incelendiğinde maksimum proteaz üretimi fruktoz (18.60 U/ml),  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (34.24 U/ml), peptone (35.68 U/ml) olarak bulunmuştur.

Sher ve ark. (2012) *Bacillus subtilis* suşu 5 ile 25 dak. arasında değişen UV radyasyona (2600 AO) maruz bırakıldığında verimli mutant *Bacillus subtilis* G-4 suşu elde edilmiş ve optimum üretim koşullarının belirlenmesinde karbon kaynakları olarak glukoz, sükroz, früktoz, maltoz, ksiloz, sorbitol ve galaktoz; organik azot kaynakları corn steep liquor, pepton, üre ve maya özütü; inorganik azot kaynakları olarak  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , ve  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  kullanılmış ve maksimum enzim aktivitesi değeri karbon kaynağı olarak %1 oranında glukoz, organik azot kaynağı olarak %1 oranında pepton, inorganik azot kaynağı olarak ise %0,5 oranında  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  kullanıldığında  $455.25 + 1.66$  U/mL olarak bulunmuştur (Sher 2012).

Dutta ve ark. (2006) mutant *Pseudomonas* sp. RAJR 044'dan maksimum aktivite dekstroz (2%), maltoz (2%), amonyum sülfat (2%) ve potasyum nitrat (2%) varlığında bulunurken, ana bakteride sükroz (2%) ve amonyum nitrat (2%) kullanıldığında bulunmuştur.

Mrudula ve ark. (2012), UV radyasyonla elde ettiği *Bacillus subtilis* ile yaptığı proteaz enzim aktivitesi ortamının optimizasyonu çalışmalarında sıcaklık, pH, inkübasyon periyodunun yanında karbon, azot ve iz elementlerin de etkisinin olduğunu göstermiş ve en verimli sonucun  $35^\circ\text{C}$ , 12, 24 saat, glukoz, üre ve  $\text{MgSO}_4$  kullanımında olduğunu rapor etmiştir.

Yapılan bu çalışmada ayrıca bu mutantın üreme ortamlarının optimize edilmesi ile enzim veriminin daha da artırılması yoluna gidilmiştir. Karbon kaynağı olarak gliserol, azot kaynağı olarak tripton ve metal iyonu olarak  $\text{MgSO}_4 + \text{CaCl}_2$  kullanılarak yeni bir modifiye ortam oluşturulmuş ve kontrol ortama göre %88'lik yüksek bir artış elde edilmiştir.

Bu çalışma kapsamında araştırılan proteaz enzimi, çeşitli endüstri dallarında kullanılan ve her geçen gün kullanım oranı artan bir enzimdir. Çalışma sonucunda elde edilen yeni mutant *Bacillus subtilis* MET39 proteaz enziminin endüstride kullanılabilirliği olabilir. Böylece dış ülkelerden satın alınan proteaz enziminin ülkemizde geniş çapta üretilmesi ve böylece ülke ekonomisine katkıda bulunması mümkün olabilecektir.



## KAYNAKÇA

- Aehle, W. 2004.** Enzyme in industry. Wiley, VCH Verlag, Weinheim.
- Ahmad, J., Ansari, T.A. 2013.** Alkaline Protease Production Using Proteinaceous Tannery Solid Waste. *J Pet Environ Biotechnol* 4: 136.
- Anonim, 1999.** <http://www-personal.ksu.edu/~bethmont/mutdes.html> Erişim tarihi:2016
- Anonim,2000.**<https://www.rpi.edu/dept/bcbp/molbiochem/MBWeb/mb2/part1/protease> Erişim tarihi:2016
- Anonim,2004.**[http://biochem.uvm.edu/courses/files/302\\_spring\\_2004\\_rjkleecture013004020204.pdf](http://biochem.uvm.edu/courses/files/302_spring_2004_rjkleecture013004020204.pdf) Erişim tarihi:2016
- Anonim, 2006.** <http://www.refgen.com/egitim.asp>. Erişim tarihi:2016
- Anonim,2005.**[http://biochem.uvm.edu/courses/files/302\\_spring\\_2005\\_lecture013105.pdf](http://biochem.uvm.edu/courses/files/302_spring_2005_lecture013105.pdf) Erişim tarihi:2016
- Anonim, 2008a.** <http://slideplayer.com/slide/8421707/> Erişim tarihi:2016
- Anonim, 2008b.** <http://slideplayer.com/slide/8421707/> Erişim tarihi:2016
- Anonim,2013.**<http://www.clayton.edu/portals/438/Microsoft%20Word%20%20UV%20lbpdf> Erişim tarihi:2016
- Anonim, 2015.** [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1946/](http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1946/) Erişim tarihi:2016
- Anonim, 2016.** <https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bacillus> Erişim tarihi:2016
- Anonim, 2016.** [http://www.researchandmarkets.com/research/l7qrqp/proteases\\_market](http://www.researchandmarkets.com/research/l7qrqp/proteases_market) Erişim tarihi:2016
- Anonim, 2016.** <https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bacillus> Erişim tarihi:2016
- Anonim,2016.**[https://en.wikipedia.org/wiki/Mutagenesis\\_\(molecular\\_biology\\_technique\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Mutagenesis_(molecular_biology_technique)) Erişim tarihi:2016
- .
- Antonelli, G., Turriziani, O. 2012.** Antiviral therapy: Old and current issues. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 40, 95–102.
- Aunstrup, K. 1973.** Industrial production of proteolytic enzymes. B. Spencer (Editor), Industrial aspects of biochemistry. *Federation of European Biochemical Societies*. 30 (1):23-46.
- Ather, A. 2009.** Identification, Cloning and Expressions of Proteases from a Cold Adapted Organism *Aliivibrio salmonicida*. *Master thesis in structural Biology Faculty of science University of Tromsø* ,24-26.
- Barrett, A. J., N. D. Rawlings. 1991.** Types and families of endopeptidases. *Biochem Soc Trans.*, 19(3): 707-15.

- Barrett, A. J. 1995.** Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Enzyme nomenclature. Recommendations 1992. Supplement 2: corrections and additions (1994). *Eur J Biochem.*, 232(1): 1-6.
- Barrett, A. J. 1996.** Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Enzyme nomenclature. Recommendations 1992. Supplement 3: corrections and additions (1995). *Eur J Biochem.*, 237(1): 1-5.
- Barrett, A. J. 1997.** Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Enzyme Nomenclature. Recommendations 1992. Supplement 4: corrections and additions (1997). *Eur J Biochem.*, 15;250 (1):1-6.
- Barrett, A. J., Rawlings, N.D., Woessner, J.F. 1998.** Handbook of Proteolytic Enzymes. London, Academic Press.
- Barrett A. J. and N. D. Rawlings 2007.** Species' of peptidases. *Biol. Chem.*,388(11):1151-7.
- Bairoch, A. 2000.** The enzyme database in 2000. *Nucleic Acids Res.*, 28: 304–305
- Bayouh, A., Gharsallah, N., Chamkha, M., Dhouib A., Ammar, S., Nasri M. 2000.** Purification and characterization of an alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa* MN1. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 24: 291–295.
- Bergmann, M., W. F. Ross. 1936.** On proteolytic enzymes, X. The enzymes of papain and their activation. *Biol. Chem.*, 114(2169): 717-26.
- Britt, B. 1996.** DNA damage and repair in plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 47, 75–100.
- Boguslawski, G., J.L. Shultz, C.O. Yehle.1983.** Purification and Characterization of an Extracellular Protease from *Flavobacterium arborescens*, *Anal. Biochem.* 132:41–49.
- Bond, J. S.1989.** Commercially available protease In Proteolytic enzyme a practical approach, 232-240 Edited by Beynon R. England: Information Press Ltd.
- Boidin, A., Effront J. 1917.** Process manufacturing diastases and toxins by oxidizing ferments. U.S Patent 1,277,525
- Bowman, K.K., K. Sidik, C. A. Smith, J.-S. Taylor, P. W. Doetsch and G. A. Freyer.1994.** A new ATP-dependent DNA endonuclease from *S. pombe* that recognizes cyclobutane pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts. *Nucleic Acids Res.*, 22, 3026–3032.
- Brash, D.E., Rudolph, J.A., Simon, A., Lin, G. J., McKenna, H. P., Baden, A. J., Halperin, J. 1991.** A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 88:10124–10128.
- Caras, I. W., MacInnes, M. A., Persing, D. H., Coffino, P., Martin, Jr. D. W. 1982.** Mechanism of 2-aminopurine mutagenesis in mouse T-lymphosarcoma cells. *Molecular and Cellular Biology*, 2 (9): 1096–1103.
- Chakravarthy, P. K., Acharya, S. 2012.** Efficacy of extrinsic stain removal by novel dentifrice containing papain and bromelain extracts. *J Young Pharm.*, 4(4):245–249.
- Cech, T.2000.** Structural biology. The ribosome is a ribozyme. *Science*, 289 (5481): 878–9.

**Cheng-gang, C. A. I., Bing-gang, L. O. U., Xiao-dong, Z., 2008.** Keratinase production and keratin degradation by a mutant strain of *Bacillus subtilis*. *J. Zhejiang Uni. Sci., B.*, 9:60-67.

**Christiansen, T., Nielsen J. 2002.** Production of extracellular protease and glucose uptake in *Bacillus calusii* in steady-state transient continuous cultures. *J. Biotechnol.*, 97: 265-273.

**Craik, C.S., Page, M.J., Madison E.L. 2011.** Proteases as therapeutics. *Biochem. J.*, 435:1–16.

**Cohnheim, O. 1901.** Die Umwandlung des Eiweißes durch die Darmwand.. *Zeitschrift für Physiologische Chemie*, 33: 451–465.

**Cushman, D. W., Cheung H. S. 1971.** Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem Pharmacol.*, 20(7): 1637-48.

**Dalev, P. 1990.** An enzyme-alkaline hydrolysis of feather keratin for obtaining a protein concentrate for fodder. *Biotechnol. Lett.*, 12: 71–72.

**Dalev, P. G. 1994.** Utilization of waste feathers from poultry slaughter for production of a protein concentrate. *Bioresour. Technol.*, 48: 265–267.

**Dayanandan, A., Kanagaraj, J., Sounderraj, L., Govindaraju, R., Rajkumar G. S., 2003.** Application of an alkaline protease in leather processing: an eco-friendly approach. *J. Clean prod.*, 11: 533-536.

**Ruiz, D.M., Iannuci, N.B., Cascone, O., De Castro, R.E. 2010.** Peptide synthesis catalysed by a haloalkaliphilic serine protease from the archaeon *Natrialba magadii* (Nep). *Letters in Applied Microbiology*, 51: 691-696.

**De Marco A., Deuerling E. et al. 2007.** Chaperone-based procedure to increase yields of soluble recombinant proteins produced in *E. coli*. *BMC Biotechnol* 7: 32.

**Devlin, T.M. 2002.** Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations, 5th ed.; Wiley and Sons: New York, NY, USA.

**Devi, K. et al. 2008.** Purification characterization of alkaline protease enzyme from native isolates *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Indian Journal of Science and Technology*, 1:1-6.

**Dias, D. R., Vilela D. M., Silvestre M. P. .C, Schwan R. F. 2008.** Alkaline protease from *Bacillus* sp. isolated from coffee bean grown on cheese whey. *World J Microbiol Biotechnol.*, 24:2027-2034.

**Dini, C. M. et al. 2009.** Biochemical and functional characterization of a metalloprotease from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57:9210-9217.

**Dodson, R. D. Schrock I., Lloyd, R.S. 1993.** Evidence for an imino intermediate in the T4 endonuclease V reaction. *Biochemistry*, 32, 8284–8290.

**Dodson, M. L. Michaels., Lloyd, R. S. 1994.** Unified catalytic mechanism for DNA glycosylases, *J. Biol. Chem.*, 269, 32709–32712.

- Durham, D. R., Stewart, D. B. and Stellwag, E. J. 1987.** Novel alkaline and heatstable serine proteases from alkalophilic *Bacillus* sp. strain GX6638." *J. Bacteriol.* 169: 2762-2768.
- Feijoo-Siota, L., Villa, T. 2011.** Native and biotechnologically engineered plant proteases with industrial applications. *Food Bioprocess Technol.*, 4(6):1066–1088.
- Flavell, R. A., Sabo, D. L., Bandle E. F. ve Weissmann C. 1975.** Site-directed mutagenesis: effect of an extracistronic mutation on the in vitro propagation of bacteriophage Qbeta RNA. Proceedings of the National Academy of Sciences. 72 (1): 367–371.
- Flibotte, S., Edgley, M.L., Chaudhry, I., Taylor, J., Neil, S.E., Rogula, A., Zapf, R., 2010.** Whole-genome profiling of mutagenesis in *Caenorhabditis elegans*., *Genetics*.185(2):431-41..
- Fruton, J.S. 1990.** Contrasts in Scientific Style: Research Groups in the Chemical and Biochemical Sciences. American Philosophical Society, 191, 105–106.
- Fujimaki, M., Yamashita, M., Okazawa, Y., Arai, S. 1970.** Applying proteolytic enzymes on soybean. 3. Diffusible bitter peptides and free amino acids in peptic hydrolyzate of soybean protein. *J. Food Sci.*, 35: 215–218
- Garrity, G.M. 2004.** Taxonomic Outline of the Prokaryotes. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second Edition, Release 5.0, Springer-Verlag, New York. P:529-531.
- George, S., Raju V., Krishnan M. R. V., Subramanian T. V., Jayaraman, K., 1995.** Production of protease by *Bacillus amyloliquefaciens* in solid-state fermentation and its application in the unhairing of hides and skins. *Process Biochem.*, 30: 457–462.
- Grollman, A. P., Moriya, M. 1993.** Mutagenesis by 8-oxoguanine: an enemy within. *Trends Genet.*, 9: 246–279.
- Guangrong, Huang. et al. 2006.** Purification and characterization of a protease from Thermophilic bacillus strain H08. *African Journal of Biothechnology*.5: 2433-2438.
- Gulati, H.K., Chadha, B.S., Saini, H.S. 2007.** Production of feed enzymes (phytase and plant cell wall hydrolyzing enzymes) by *Mucor indicus* MTCC 6333: Purification and characterization of phytase. *Folia Microbiol.*, 52859:491-497.
- Gupta, R., Qasim, K., Beg., Lorenz, P. 2002.** Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 59: 15-32.
- Hader, D. P., Sinhab, R. P. 2005.** Solar ultraviolet radiation-induced DNA damage in aquatic organisms: potential environmental impact. *Mutation Research*, 571 (2005) 221–233.
- Hameed, A. C., Natt, M. A., Evans, C. S., 1996.** Production of alkaline protease by a new *Bacillus subtilis* isolate for use as a bating enzyme in leather treatment. *World. J. Microbiol. Biotechnol.*, 12: 289-291.
- Hamilton, K. K., Kim, P.M.H., Doetsch, P.W. 1992.** A eukaryotic DNA glycosylase/lyase recognizing ultraviolet light-induced pyrimidine dimers. *Nature*, 356, 725–728.

- Hasan, H., et al. 2010.** Purification and characterization of alkaline protease from *Aspergillus terreus*. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, 32:497-504.
- Hasegawa, J. 1960.** Exopeptidases of the human skin. An application of ultramicrotitration and volume measurement methods to a quantitative study of the exopeptidases in skin sections. *Arch Dermatol.*, 82: 595-604.
- Hayes, T.L., Zimmerman, N., et al. 2006.** *Industry Market Research For Business Leaders, Strategists, Decision-Makers.* Cleveland, OH, The Freedonia Group, Inc.
- Hemmings, G. 1980.** *Biochemistry of Schizophrenia and Addiction: Chapter 19.* pp 277-285. The digestion and absorption of dietary protein.
- Hirst, M., Butterfield, Y., Jones, S.J., Marra, M.A., Barstead, R.J., Moerman, D.G. 2010.** Whole-genome profiling of mutagenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 185 (2): 431-41.
- Hrabé de Angelis, M., Balling, R. 1998.** Large scale ENU screens in the mouse: genetics meets genomics. *Mutation Research*, 400 (1-2): 25-32.
- Huang, Q., Peng, Y., Li X., Wang H., Zhang Y. 2003.** Purification and characterization of an extracellular alkaline serine protease with dehairing function from *Bacillus pumilus*. *Curr. Microbiol.*, 46: 169-173.
- Ishikawa, H., Ishimi, K., Sugiura, M., Sowa, A., Fujiwara, N, 1993.** Kinetics and mechanism of enzymatic hydrolysis of gelatin layers of X-ray film and release of silver particles. *TJT. T Ferment. Bioeng.*, 76: 300-305.
- Jaag, H. 1968.** Über proteolytische enzyme, deren prüfmöglichkeit in der waschmittelindustrie. *Eur. Hochschulschr. Reihe VII Chemie Sec. B, Biochem.* Herbert Lang Bern
- Jayati, R. D., Banerjee R. 2006.** Isolation and Characterization of a Newly Isolated *Pseudomonas* Mutant for Protease Production. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Vol. 49: 1, 37-47.
- Johnvesly, B., Naik G.R. 2001.** Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkalophilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. *Process Biochem.*, 37: 139-144.
- Kanehisa, K. 2000.** Woven or knit fabrics manufactured using yarn dyed raw silk US Patent 6,080,689.
- Keyser, M., Müller, I.A., Cilliers, F.P., Nel, W., Gouws, P.A. 2008.** Ultraviolet radiation as a nonthermal treatment for the inactivation of microorganisms in fruit juice. *Innovat. Food Sci. Emerg. Technol.*, 9: 348-354.
- Kino, K., Sugiyama, H. 2005.** UVR-induced G-C to C-G transversions from oxidative DNA damage. *Mutat Res.*, 571: 33-42.
- Krasnovsky, J. A. A. 1979.** Photoluminescence of singlet oxygen in pigment solutions. *Photochem Photobiol.*, 29: 29-36.



- Ketnawa, S., Chaiwut P., Rawdkuen, S. 2012.** Pineapple wastes: a potential source for bromelain extraction. *Food Bioprod Process.*, 90(3):385–391
- Kim, W., Choi K., Kim, Y., Park, H., Chol, J., Lee, Y., Oh, H., Kwon, I., Lee, S. 1996.** Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from chungkook-jangs. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 2482 -2488
- Khalil, A. B., Ghandi H., Anfoka H., Bdour S. 2003.** Isolation of plasmids present in thermophilic strains from hot springs in Jordan. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19:239-241.
- Knamneni, A., Ellaiyah, P., Prasad D.S. 2003.** Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* PE11. *AAPS PharmSciTech*, 5;4(4):E56
- Knight, C. G., Dando, P. M. et al. 1995.** Thimet oligopeptidase specificity: evidence of preferential cleavage near the C-terminus and product inhibition from kinetic analysis of peptide hydrolysis. *Biochem J.*, 308 (1): 145-50.
- Kudrya, V. A., Simonenko, I. A., 1994.** Alkaline serine proteinase and lectin isolation from the culture fluid of *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 41: 505–509.
- Kuo, L.C., Shafer J. A., Darke P. L., Jordan S.P., Hall D. L., Zugay J.A. 1994.** Dissociation and association of the HIV-1 protease dimer subunits: equilibria and rates. *Biochemistry*, 11;33(1):98-105
- Laan, J.C.V., Gerritse G., Mulleners L.J., Hoek R.A.V., Quax, W. J. 1991.** Cloning, characterization, and multiple chromosomal integration of a *Bacillus* alkaline protease gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 901-909.
- Lan, G.O., Abdullah, N., Jalaludin, S., Ho, Y.W. 2002.** Optimization of carbon and nitrogen sources for phytase production by *Mitsuokella jalaludinii*, a new Rumen bacterial species. *Letters in Applied Microbiology*, 35(2), 157-161.
- Lee, H.J., Larue J. N. et al. 1971.** Angiotensin-converting enzyme from porcine plasma. *Biochim Biophys Acta.*, 235(3): 521-8.
- Li, Q., Yi, L., Marek, P., Iverson, B.L. 2013.** Commercial proteases: Present and future. *FEBS Lett.*, 587, 1155–1163.
- Lilley, D. 2005.** Structure, folding and mechanisms of ribozymes. *Curr Opin Struct Biol.*, 15 (3): 313–23.
- Lindahl, T., Wood R.D. 1999.** Quality control by DNA repair. *Science*, 286, 1897–1905.
- Mahajan, R., Badgular, S. 2010.** Biological aspects of proteolytic enzymes: A Review. *Journal of Pharmacy Research*, 3(9), 2048-2068.
- Maheshwari, R. et al. 2000.** Termophilic fungi: Their physiology and enzyme. *Microbiology and molecular biology review*. 64:461-488
- Marco, D.A.C., Dick A.J. 1978.** Aminopeptidase I activities in several microorganisms. *Can. J. Biochem.*, 56:66–71.

- Mathew, J. 1999.** Microbial proteases-isolation, purification and characterization. Ph.D. Thesis, School of Biosciences, Mahatma Gandhi University, Kerala, India.
- Matsui, T., Matsufujii, H., Seki, E., Osajima, K., Nakashima, M., Osjima Y. 1993.** Inhibition of angiotensin I-converting enzyme by *Bacillus licheniformis* alkaline protease hydrolyzates from sardine muscles. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 57: 922-925.
- Meraz, I. M., Choudhury, T., Hoq M. M., 2006.** Optimization of mutation conditions of *Bacillus* sp. to increase the yield of alkaline protease. *J. Human Life Sci.*, 4: 43-50.
- Mehrotra, S., Pandey, P.K., Gaur, R., Darmwai, N.S. 1999.** The production of alkaline protease by a *Bacillus* species isolate. *Bioresource Technology*, 67(2): 201- 203.
- McGrath, B.W.G. 2005.** Directory of Therapeutic Enzymes, CRC Press.
- McHugh, G. L. Miller, C. G. 1974.** Isolation and Characterization of Proline Peptidase Mutants of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, 120 (1): 364–371.
- Mitchell, D. L., Brash, D. E., Nairn, R. S. 1990.** Rapid repair kinetics of pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts in human cells are due to excision rather than conformational change. *Nucleic Acids Res.*, 18:963–971.
- Monod, M. et al. 1991.** Isolation and characterisation of an extracellular alkaline protease of *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Medicine Microbiology*. 35:23-28.
- Morikawa, K., Ariyoshi M., Vassylyev, D.G., Matsumoto, O., K. Katayanagi K., E. Ohtsuka, E. 1995.** Crystal structure of a pyrimidine dimer-specific excision repair enzyme from bacteriophage T4: refinement at 1.45 Å and X-ray analysis of the three active site mutants, *J. Mol. Biol.*, 249, 360–375.
- Mrudula, S., Apsana B.A., Ashwitha, K., Pindi, P. K. 2012.** Enhanced Production Of Alkaline Protease By *Bacillus Subtilis* In Submerged Fermentation, *Int J Pharm Bio Sci.*, 3(3): 619 – 631.
- Muller, H. J. 1927.** Artificial Transmutation of the Gene. *Science*, 66 (1699): 84–87.
- Nardi, G. L. 1960.** Serum "trypsin" (or arginine exopeptidase) screening test for cancer of the panceas. *Gastroenterology*, 38: 50-1.
- Nariman, A.H. Aly, Farag, A., El-Sayed, O.E. 2001.** Isolation and characterization of sporless mutants in *Bacillus sphaericus*. *Arab J. Biotech.*, 4(2): 207-216.
- Neklyudov, A.D., Ivankin, A.N., Berdutina, A.V. 2000.** Properties and uses of protein hydrolysates (review). *Appl. Biochem. Microbiol.*, 36: 452–459.
- Northrop, J.H, Kunitz, M, Herriott, R.M. 1938.** Crystalline Enzymes. Columbia Univ. Press, New York.
- Neurath, H. 1989.** The diversity of proteolytic enzyme. In Proteolytic enzyme a practical approach, 1-12. Edited by Beynon, Robert J and Bond Judits S. England: Information Press Ltd.

- Neurath, H. 1999.** Proteolytic enzymes, past and future. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 10962–10963
- Ohmiya, K., Tanimura, S., Kobayashi, T., Shimizu S. 1979.** Application of immobilized alkaline protease to cheese-making. *J. Food Sci.*, 44: 1584–1588
- Pala, C.U., Tokluca, A.K. 2010.** Ultraviyole ışın (UV) teknolojisinin meyve sularına uygulanması. *Akademik Gıda*, 8(1): 17-22.
- Papworth, C., Bauer, J. C., Braman, J. and Wright, D. A. 1996.** Site-directed mutagenesis in one day with >80% efficiency. *Strategies*, 9 (3): 3–4.
- Peak, M. J., Peak, G., Moehring, P., Webb, R. B. 1984.** Ultraviolet action spectra for DNA dimer induction, lethality and mutagenesis in *Escherichia coli* with emphasis on the UVB region. *Photochem. Photobiol.*, 40, 613–620.
- Peak, M. J., Peak, J. G. 1987.** Photosensitized DNA damages. *Photochem Photobiol.*, 45: 57S.
- Perea, A., Ugalde, U., Rodriguez, I., Serra, J. L. 1993.** Preparation and characterization of whey protein hydrolysates: application in industrial whey bioconversion processes. *Enzyme Microb. Technol.*, 15: 418–423.
- Prakash, S., Sung, P., Prakash, L. 1993.** DNA repair genes and proteins of *Saccharomyces cerevisiae*, *Annu. Rev. Genet.*, 27, 33–70.
- Prakash, S., Sung, P., Prakash, L. 1993.** DNA repair genes and proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.*, 27,33–70.
- Polaina, J., Maccabe, A.P. 2007.** *Industrial Enzymes Structure: Function and Applications*, Springer Netherlands. P:747-842.
- Polgar, L. 1989.** *Mechanisms of Protease Action*. Boca Raton, CRC Press Inc.
- Puri, S., Khalil, O., Gupta, R., 2002.** Optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. by response surface methodology. *Cur. Micobiol.*, 44: 286-290.
- Pvanakrishnan, R., Dhar, S. C. 1986.** Recent advances in the depletion of hides and skins. *Leather Sci.*, 33: 177-191.
- Qadar, S. A., Shireen, E., Iqbal, S., Anwar, A., 2009.** Optimization of protease and lipase production by *Bacillus pumilus* SG 2 isolated from an industrial effluent. *Indian Journal of Biotechnology*, Vol:8, 286-290.
- Rao, B. M., Tanksale, M. A., Ghathe, S. M., Deshpande, V.V. 1998.** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology*, 62: 597-635.
- Raju, E. V. N., Divakar, G., 2013.** *Bacillus Cereus* GD 55 Strain Improvement by Physical and Chemical Mutagenesis for Enhanced Production of Fibrinolytic Protease *International Journal of Pharma Sciences and Research*, 4(5):81-93
- Rebeca, B. D., Pena-Vera, M. T., Diaz-Castaneda, M., 1991.** Production of fish protein hydrolysates with bacterial proteases; yield and nutritional value. *J Food Sci.*, 56: 309–314

**Rowan, A. D., Buttle, D. J., 1990.** The cysteine proteinases of the pineapple plant. *Biochem J*, 266(3):869-75.

**Röhm, O., 1908.** Preparation of hides for the manufacture of leather., U.S Patent. 886,411

**Rüger, H. J., 1983.** Differentiation of *Bacillus globisporus*, *Bacillus marinus* comb. nov., *Bacillus aminovorans*, and *Bacillus insolitus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 33(2): 157-161.

**Rüger, H. J., Fritze, D., Spröer, C., 2000.** New psychrophilic and psychrotolerant *Bacillus marinus* strains from tropical and polar deep-sea sediments and emended description of the species. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 50(3):1305-1313.

**Sandler, S. J. 2000.** Post-Replication Repair A New Perspective Focusing on the coordination Between Recombination and DNA Replication. Springer, Humana Press. Chapter DNA Damage and Repair, p: 21-42

**Sakumi, K. , Sekiguchi, M., 1990.** Structures and functions of DNA glycosylases, *Mutat. Res.*, 236: 161–162.

**Sanchez, J., Leticia, M., Barbara, S., Michael, D., Peter, S., 1992.** Properties of *Bacillus megaterium* and *Bacillus subtilis* mutants which lack the protease that degrades small, acid-soluble proteins during germination. *J. Bacteriol.*, 174(3): 807-814.

**Sari, E., 2011.** *Bacillus circulans* M34'ten Proteaz Enziminin Saflastırılması ve Karakterizasyonu, Yüksek lisans tezi., AÜ Fen Fakültesi, Kimya A.B.D. Ankara.

**Saeki, K., Ozaki, K., Kobayashi, T. Ito, S. J. 2007.** Detergent alkaline proteases: enzymatic properties, genes, and crystal structures., *Biosci Bioeng*; 6: 501-508.

**Schall, R., 2007.** Systematic identification of substrates for profiling of secreted protease from *Aspergillus* species. *Journal of Microbiological Methods*.71: 93-100.

**Schechler, I., Berger, A. 1967.** On the size of the active site in proteases I papain. *Biochem Biophys Res Commun*.27:157–162.

**Sher, M. G., Nadeem, M., Syed, Q., Irfan, M., Baig, S., 2012.** Protease Production from UV Mutated *Bacillus subtilis*. *Bangladesh J. Sci. Ind. Res.* 47(1):69-76.

**Segers, R., 1999.** The subtilisins of fungal pathogens of insects, nematodes and plants: distribution and variation., *Mycology. Res.*, 103(4): 395-402.

**Seeberg, E., Eide L., Bjoras M., 1995.** The base excision repair pathway, *Trends Biochem. Sci.*, 20:391–397.

**Sekiguchi, M., Tsuzuki, T. 2002.** Oxidative nucleotide damage: consequences and prevention. *Oncogene*, 21: 8895–8904.

**Setlow, R.B. 1974.** The wavelengths in sunlight effective in producing skin cancer: a theoretical analysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71:3363–3366.

**Shortle, D., Nathans, D. 1978.** Local mutagenesis: a method for generating viral mutants with base substitutions in preselected regions of the viral genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75 (5): 2170–2174.

**Shortle, D., Dimaio, D., Nathans, D. 1981.** Directed Mutagenesis. *Annual Review of Genetics*. 15: 265–294.

**Sharma, J., Singh, A., Kumar, R., Mittal, A. 2006.** Partial purification of an alkaline protease from a new strain of *Aspergillus oryzae* AWT 20 and its enhanced stabilization in entrapped Ca-alginate beads. *Internet J Microbiol.* 2(2):1–14.

**Shenolikar, S. Kenneth, J.S., 1982.** "Purification and partial characterization of a thiol proteinase from the thermophilic fungus *Humicola lanuginosa*." *Biochem. Journal.* 205:147-152.

**Sreedevi, B., Chandrasekhar, K., Pramoda, K., 2014.** Induction of Alkaline Protease Production by *Bacillus* Mutants Through U.V. Irradiation. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 26(1):78-83

**Sumantha, A., 2005.** Production and partial purification of a neutral metalloprotease by fungal mixed substrate fermentation. *Food Technology Biotechnology.* 43:313-319.

**Sung, J.H., Ahn, S.J., Kim, N.Y., Jeong, S.K., Kim, J.K., Chung, J.K., Lee, H.H. 2010.** Purification molecular cloning and biochemical characterization of subtilisin JB1 from a newly isolated *Bacillus subtilis* JB1. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 162:900-901

**Takamine, J. 1894.** Preparing and making taka-loji. U.S. Patent: 525,820

**Takami, H., Nakamura, S., Aono, R., Horikoshi K., 1992.** Degradation of human hair by a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Bacillus* sp. No. AH- 101. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 56:1667–1669

**Tessman, I., Kennedy, MA. 1991.** The two-step model of UV mutagenesis reassessed: deamination of cytosine in cyclobutane dimers as the likely source of the mutations associated with photoreactivation. *Mol Gen Genet.*, 277: 144–148.

**Tessman, I., Li, S., Kennedy, MA. 1992.** Mechanism of SOS mutagenesis of UV-irradiated DNA: mostly error-free processing of deaminated cytosine. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 1159–1163.

**Thangam, E. B., Nagarajan, T., Suseela, R. G., Chandrababu, N. K., 2001.** Application of alkaline protease isolated from *Alcaligenes faecalis* for enzymatic unhairing in tanneries. *J. Ind. Leather.*, 37: 215-222.

**Thanikaivelan, P., Rao, J. R., Nair, B. U. and Ramasami, T., 2004.** Progress and recent trends in biotechnological methods for leather processing. *Trends Biotechnol.*, 22: 181-188.

**Tipton, K. F. 1994.** Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Enzyme nomenclature. Recommendations 1992. Supplement: corrections and additions. *Eur J Biochem* 223(1): 1-5.

**Tran, M.T.T., Farid. M. 2004.** Ultraviolet treatment of orange juices. *Innovat. Food Sci.*

Emerg. Technol., 5: 495-502.

**Tozser, J., Toth, F., Andras, J. 2013.** Research Applications of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology *Biomolecules*, 3, 923-942.

**Tyrrell, R. M. 2000.** Role for singlet oxygen in biological effects of ultraviolet A radiation. *Methods Enzymol.*, 319, 290–296

**Uhlig, H., 1998.** Industrial enzymes and their applications. *Jhon Wiley&Sons, U.S* p:116-144.

**Underkoffler, L. A., Barton, R. R. , Rennert, S. S., 1958.** Production of microbial enzymes and their applications. *Appl. Microbiol.*, 6:212.

**Varela, H., Ferrari, M. D., Belobradjic, L., Weyrauch, R. , Loperena, M. L., 1996.** Effect of medium composition on the production by a new *Bacillus subtilis* isolate of protease with promising unhairing activity. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 12: 643–645.

**Venugopal, M., Saramma, A. V., 2006.** Characterization of alkaline protease from *Vibrio fluvialis* strain VM10 isolated from a mangrove sediment sample and its application as a laundry detergent additive. *Process Biochem.*, 41:1239-1243.

**Vishwanatha, K.S., Appu, G. A., Sridevi, A., 2009.** Charecterization of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC5341. *Food Chemistry*. 114:402-407.

**Yajima H., M. Takao, S. Yasuhira, J. H. Zhao, C. Ishii, H. Inoue and A. Yasui, A, 1995.** eukaryotic gene encoding an endonuclease that specifically repairs DNA damaged by ultraviolet light, *EMBO J.*, 14:2393–2399.

**Yoon, J. H., Lee C. S., Connor T. O., Yasui A., Pfeifer G. P.2000.** The DNA damage spectrum produced by simulated sunlight, *J. Mol. Biol.*, 299 681–693.

**Wang X. C., Zhao, H.Y., Liu, G., Cheng, X.J., Feng, H., 2016.** Improving production of extracellular proteases by random mutagenesis and biochemical characterization of a serine protease in *Bacillus subtilis* S1-4. *Genetics and Molecular Research* 15:2.

**Wallerstein, L. 1911.** Treating beer or ale. *U.S. Patent* P:995-825

**Ward, O.P., Ajay, S., Marcus, S. 2004.** Developments in the use of Bacillus species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology*, 50:1-17.

**Wayne, L.N. and Belinda, G., 2003.** UV resistance of *Bacillus anthracis* spores revisited: Validation of *Bacillus subtilis* spores as UV surrogates for spores of *B. anthracis* Sterne. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(2): 1327-1330.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Meltem GÖKÖZ  
Doğum Yeri : İzmir  
Doğum Tarihi : 13.01.1990

### Eğitim Durumu

Lise : Bursa Hasanali Yücel Lisesi / 2005 - 2008  
Lisans : Uludağ Üniversitesi / 2009 - 2014  
Yüksek Lisans : Uludağ Üniversitesi / 2014 - 2016

Çalıştığı Kurumlar : ---  
İletişim (e-posta) : meltemgkz@hotmail.com