

***Bacillus pumilus* NK14 İzolatının Proteaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi ve Enzimin Leke Çıkarıcı Etkisinin Tespiti**

Arzu Görmez¹, Ebru Öztaş Gülmüş^{1*}

¹Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Fen Fakültesi, Erzurum Teknik Üniversitesi, Erzurum, Türkiye
*(ebru.oztas@erzurum.edu.tr)

Özet - Proteaz enzimi deri, gıda, tekstil, deterjan ve ilaç sanayisi gibi pek çok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle termofilik bakterilerden elde edilen alkalın proteaz enzimleri uzun raf ömürleri, yüksek katalitik aktiviteleri ve stabiliteyi nedeniyle oldukça ilgi çekmektedir. Bu bağlamda yapılan çalışmada Erzurum sıcak su kaynaklarından bakteriyel izolasyonlar yapılarak bu izolatların proteaz enzim aktiviteleri analiz edildi. İzolatlar; Gram boyama, endospor, katalaz, oksidaz, proteaz, lipaz ve amilaz testlerine tabi tutuldu. Bu amaçla izolatlar öncelikle %10 Skim Milk içeren besiyerlerinde inkübasyona bırakılarak proteaz enzim aktiviteleri tespit edildi. Besiyerlerinde proteolitik zon oluşturan izolatlar 16S rRNA dizi analiziyle tür seviyesinde tanımlandı. En yüksek proteolitik zon oluşturan *Bacillus pumilus* NK14 izolatının kültür süpernatantından elde edilen proteaz enziminin aktivite testi yapıldı (91,17 EU/ml) ve birtakım parametrelerin bu enzim aktivitesi üzerine etkileri tespit edildi. *B. pumilus* NK14 izolatının optimum enzim aktivitesini 50°C'de pH 10'da gösterdiği, sıcaklık ve pH stabilite testleri sonucunda 40°C'de ve pH 8'de kararlı yapıda olduğu gözlemlendi. Enzimin PMSF ile büyük bir oranda inhibe olduğu (%17), EDTA, EGTA, SDS ve üre ile de aktivitesinin azaldığı (%75, %80, %65, %88) belirlendi. Tween 20 (%108) ve Tween 80 (%115) ile muamele sonucunda enzim aktivitesinde artış olduğu, Ca⁺², Mg⁺² ve Mn⁺² divalent metal iyonlarıyla enzim aktivitesinin sırasıyla %110, %112, %125 oranında arttığı, buna karşın Zn⁺² ve Cu⁺² ile de %86 ile %78 oranında azaldığı tespit edildi. İzolata ait Lineweaver-Burk grafiği çizilerek *K_m* ve *V_{max}* değerleri hesaplandı (0,673 mg/ml-99 EU/ml). *B. pumilus* NK14 izolatının kültür süpernatantından elde edilen proteaz enziminin deterjan sanayi uygulamalarında kullanılabilirliğini test etmek amacıyla kan lekesi bulaştırılmış kumaş parçaları üzerinde leke çıkarıcı etkisi test edilerek sonuçların oldukça etkili olduğu tespit edildi.

Anahtar Kelimeler - termofil, proteaz, *Bacillus pumilus*, 16S rRNA, deterjan sanayi

I. GİRİŞ

Endüstriyel işlem ve uygulamalar için potansiyel olan termofilik enzimlerin büyük bir kısmını proteazlar oluşturmaktadır. Proteaz enzimlerinin deterjan, gıda, deri, et, süt sanayi, fotoğraf uygulamaları, evcil hayvan gıdaları, moleküler çalışmalar, tıbbi uygulamalar gibi çeşitli alanlar ve sanayilerde kullanımı mevcuttur [18, 3, 12, 21, 5, 17].

Proteazlar; gen ifadesi, protein mobilasyonu ve enzim modifikasyon çalışmaları gibi oldukça önemli biyolojik süreçlerde rol almaktadır. Ayrıca bu enzimler; bitki, hayvan ve mikroorganizma kalıntılarının yok edilmesi ile besin döngüsünün devamlılığının sağlanmasında önemli görevler üstlenmiştir. Canlılığın devamı için bütün organizmalarca yoğun olarak üretilen bu enzimlerin biyoteknoloji açısından önemi oldukça büyüktür [19, 7].

Endüstriyel amaçlı olarak en çok tercih edilen enzimler, bakteriyel proteaz enzimleridir.

Biyoteknolojik uygulamalarda yoğun olarak çalışılan *Bacillus* cinsi bakterilerden elde edilen proteaz enzimleri yüksek sıcaklık değerlerinde dahi enzim stabiliteyi koruyabilmekte ve bakteri durgunluk fazındayken dahi enzim üretimi yapabilmektedir [21, 5]

Proteaz enziminin yaygın olarak kullanıldığı alanların başında deterjan sanayisi gelmektedir. Bir deterjanın içeriğindeki bileşenler, raf ömrü uzunluğu, sağlığa zararlı içerinin olmaması, mikrobiyal proteaz barındırması onun kullanılabilirliğini artırmaktadır. Bakteriyel enzimlerce harmanlanmış deterjanların en önemli avataji enzimin raf ömrü boyunca kararlılığını korumasıdır. Özellikle termofilik proteazlar yüksek sıcaklık ve pH'ya direnç göstermeleri nedeniyle leke çıkarıcı etken olarak kullanılmaktadırlar. Bu sayede deterjan sanayiinde çevre dostu uygulamaların önü açılmış, sağlığa zararlı maddelerle çalışmanın zorunluluğu ortadan kalkmıştır [18, 3]

Erzurum İli jeolojik konumu nedeniyle mineralce zengin pek çok sıcak su kaynağına sahiptir. Bu nedenle çalışmada şehirdeki mevcut termal sıcak su kaynaklarından (Pasinler, Ilıca, Nenehatun) termofilik bakterilerin izolasyonu, tanılaması ve proteaz enzim aktivitelerinin incelenmesi adına araştırmalar yapılmıştır. İzolatlardan elde edilecek proteaz enziminin biyoteknolojik nitelikleri belirlenerek deterjan sanayi uygulamalarında kullanılabilirliği test edilmiştir.

II. MATERYAL VE METOD

A. Bakteri İzolatlarının Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

İzolasyon amacıyla, termal su kaynaklarından alınan su numuneleri Nutrient Agar (NA) besi yerine yayma ekim yapılarak 45°C ve 55°C'de inkübe edildi. Gelişen bakteri kolonilerinden morfolojik olarak farklı olanlar seçilerek saf kültürleri oluşturuldu. Bakteri izolatlarının basit boyamalar ile hücre morfolojileri belirlendikten sonra Gram boyama ve spor boyama yöntemleri uygulandı [25, 4, 10]. İzolatlar; amilaz, katalaz, oksidaz, proteaz ve lipaz testlerine tabi tutularak biyokimyasal özellikleri bakımından incelendi [27, 13, 10, 18, 22].

B. Proteaz Aktivitesi Tespit Edilen Bakteri İzolatlarının 16S rRNA Bölgesinin PCR ile Amplifikasyonu, Klonlanması ve Sekans Analizi

Proteaz aktivitesi gösteren izolatların DNA izolasyonunda Lazo et al. [15] (1987)'un kullandığı yöntem modifiye edilerek uygulandı. İzole edilen DNA'ların 16S rRNA bölgesi evrensel primerler (forward; 27F=5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' ve reverse; 1492R=5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') kullanılarak çoğaltıldı. 3 µl 10X PCR tamponu, 0,6 µl dNTP mix, 3'er µl primerler, 1,2 µl DMSO, 1,8µl MgCl₂, 12,1 µl sdH₂O, 0,3 µl 5 unit/µl Taq DNA polimeraz ve 5 µl DNA karışımı ile 95°C'de 5 dk, 94°C'de 1 dk, 48°C'de 1 dk, 72°C'de 1,5 dk ve 72°C'de 8 dk döngü şartlarında reaksiyon gerçekleştirildi [6].

16S rRNA gen bölgesi CaCl₂ metoduyla kompetent hale getirilen *E. coli*'ye, pGEM®-T Easy vektör sistemi kullanılarak transfer edildi. 16S rRNA gen bölgelerini ihtiva eden plazmitlerin baz dizi analizleri yapıldı. Sekans sonuçları BioEdit programı ile yorumlanarak dizi anlamlı hale getirildi ve 16S rRNA dizileri Gen Bankasında

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>) kayıtlı olan bakteriyel dizilerle kıyaslandı [1].

C. Proteaz Enzim Aktivitesi Tayini

İzolatların proteaz aktivitesi gösterdikleri besiyeri (g/l: kazein 5 g, pepton 5 g, yeast extract 2 g, NaCl 5 g, MgSO₄.7H₂O 0,2 g, CaCl₂

0,1 g, K₂HPO₄ 1 g. pH:9) ile inkübasyonundan sonra örnekler, 20 dk +4°C'de 5000 rpm'de santrifüj edildi. 1 EU/ml (bir ünite) alkalen proteaz aktivitesi, substratın parçalanması ile 1 dk'da 1µg tirozinin oluşması için gerekli olan enzim miktarı olarak tespit edildi. Stok çözeltiden konsantrasyonları; 5, 10, 15, 20, 25, 30, 50, 75, 100, 200 µg/ml olan tirozin çözeltileri hazırlanarak tirozine ait ekstinksiyon katsayısının belirlendi ve konsantrasyon eğrisi oluşturuldu. Grafiğin eğiminden ekstrinsiyon katsayısı belirlenerek aktiviteler hesaplandı. Proteaz enzimi aktivite tayini için; 0,5 ml enzim çözeltisi ve 2,5 ml kazein çözeltisi (%0,6 kazein içeren pH 9, 50 mM Glisin-NaOH tamponunu) karıştırıldı, 37°C'de 20 dk inkübasyona bırakıldı. Akabinde 2,5 ml 0,1 M TCA (trikloroasetik asit) çözeltisi ile 37°C'de 30 dakika bekletilerek reaksiyon sonlandırıldı. Karışımın filtre kağıdından geçirilmesiyle elde edilen süzüntü (0,5 ml) üzerine 2,5 ml 0,5 M Na₂CO₃ çözeltisi ve 0,5 ml 1 N Folin-ciocalteu's phenol reaktifi eklenerek 30 dakika inkübe edildi. 660 nm'de çözeltilerin absorbanları saptandı [8, 29, 24].

D. Enzim Aktivitesi Üzerine Çeşitli Parametrelerin Etkisinin Araştırılması ve Enzimin Km ve Vmax Değerlerinin Belirlenmesi

Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla kültür süpernatantlarının 35-75 °C aralığındaki sıcaklık değerlerinde aktivite ölçümleri yapıldı [8]. Sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi amacıyla enzim; 1, 2 ve 3 gün boyunca 40, 50, 55 ve 60°C sıcaklıklarda inkübasyona bırakıldı [24]. Aktivite üzerine pH'nın etkisini gözlemlemek amacıyla ise pH 6,0-13,0 aralığında kazein substratı içeren tamponlar kullanıldı. pH stabilitesinin tespiti amacıyla enzim 1, 2 ve 3 gün boyunca pH: 8, 9, 10 ve 11'de hazırlanmış tampon çözeltilerde 30°C'de inkübasyona bırakıldı [24].

Enzim aktivitesi üzerine 5mM konsantrasyonundaki EDTA, EGTA, DTT, PMSF, üre ve %1 konsantrasyondaki SDS, Tween 20, Tween 80, Triton X-100 ve H₂O₂'nin etkisinin belirlenmesi amacıyla kültür süpernatantları bu çözeltiler ile 2 saat boyunca 37°C'de inkübe edildi [30, 29]. Divalent metal iyonlarından olan MnCl₂, ZnSO₄.7H₂O, MgCl₂, FeCl₃, CuSO₄ ve CaSO₄'ün aktivite üzerine etkisinin saptanması amacıyla kültür süpernatantları bu iyonlardan 5 mM içeren tampon çözeltilerde 2 saat bekletildi [30, 29].

Aktivite üzerine substrat konsantrasyonunun etkisini belirlemek amacıyla kazeinin 0,5, 1, 2, 4, 6 ve 8 mg/ml'lik çözeltileri hazırlandı. Enzim konsantrasyonu sabit tutularak kazeinin farklı konsantrasyonlarıyla aktivite tayini yapıldı. Sonuçlar değerlendirilerek 1/S (substrat, kazein, mg/ml) değerine karşılık 1/V (reaksiyon hızı, E.U/ml) hesaplandı ve Lineweaver-Burk grafikleri

çizildi. Bu grafikten K_m ve V_{max} değerleri belirlendi [16].

E. Proteaz Enzimi ile Biyoteknolojik Uygulamalar

Proteaz aktivitesi gösteren bakteri izolatlarına ait kültür süpernatantlarının leke çıkarma gücünü test etmek amacıyla, kan ve çimen lekeleri bulaştırılmış steril kumaş parçaları steril su, besiyeri, deterjanlı su, kültür süpernatantı ve deterjan-kültür süpernatantı içerisinde bekletildi. Uygulama öncesi ve sonrasında kumaşların fotoğrafları alınarak değerlendirme yapıldı.

III. BULGULAR

A. 16S rRNA Bölgesinin Sekans Sonuçlarına Göre Tanılanan İzolatların Morfolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Tespiti

İnoküle edildikleri besiyerinde proteolitik zon oluşturan izolatlar 16S rRNA gen bölgesi sekans sonuçlarına göre tür seviyesinde tanılandı ve izolatlar ait GenBank Numaraları alındı. İzolatların morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları Tablo1'de gösterildi.

B. Proteaz Enzim Aktivitesi

İzolatların proteaz enzim aktiviteleri hesaplandı ve en yüksek aktivite gösteren izolat *Bacillus pumilus* NK14 (91,17 EU/ml) olarak tespit edildi. *B. pumilus* NK14 izolatının enzim aktivitesi için en uygun sıcaklık aralığının 45-65°C (optimum 50°C) olduğu gözlemlendi. Bu enzimin, birinci gün sonunda 45 ve 50°C'lerde stabilitesinin yaklaşık %10 ve 16 azaldığı, 55°C'de aktivitesinin yaklaşık %15'ini 60°C'de ise %28'ini kaybettiği gözlemlendi. İkinci gün sonunda enzim stabilitesinin 40°C'de %26'sı, 50 ve 55°C'de %35 ve 40'ı, 60°C'de ise %75'i kaybedildi. Üçüncü gündeki aktivitelerde ise stabilitede 40°C'de %65, 50 ve 55°C'de yaklaşık olarak %80 ve 82, 60°C'de %95 oranlarında azalmaların olduğu tespit edildi.

B. pumilus NK14 izolatının proteaz aktivitesi için en uygun pH aralığı 8-11 olarak tespit edildi (optimum pH 10). Enzimin pH stabilitesi birinci gün sonunda % 100 iken ikinci gündeki inkübasyonlardan sonra pH: 8 ve 9'da %100, pH: 10'da %95 ve pH: 11'de %88 olarak kaldığı belirlendi. Üçüncü günde ise aktivitenin pH: 8 ve 9'da % 85, pH: 10'da % 76, pH:11'de ise yaklaşık olarak %70 oranında korunduğu gözlemlendi. İzolatın proteaz aktivitesinin EDTA ile %75, EGTA ile %80, DTT ile %97, PMSF ile %17, üre ile %88, SDS ile %65, Tween 20 ile %108, Tween 80 ile %115, Triton X-100 ile %105 ve H₂O₂ ile de %103 olduğu tespit edildi (Şekil 1a). Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺ iyonlarının aktiviteyi artırırken (% 110, %112, %125), Zn²⁺ ve Cu²⁺ iyonlarının ise aktivitenin

azalmasına neden olduğu (%86, %78) gözlemlendi (Şekil 1b).

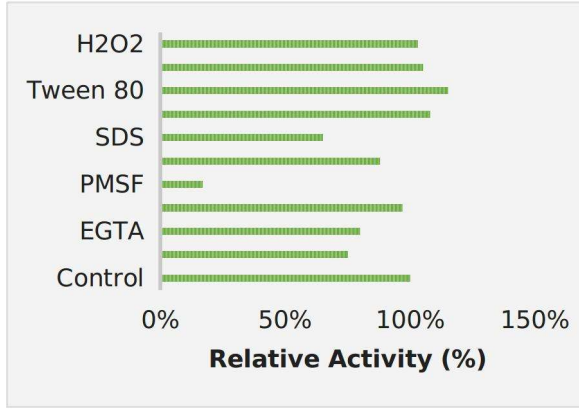
Tablo 1. İzolatların Morfolojik&Biyokimyasal Özellikleri ile Tanı Sonuçları

Tanı sonucu	İzolasyon Kodları	Morfolojik özellikler		Biyokimyasal özellikler				
		Gram test	Endospor	Katalaz	Oksidaz	Amliaz	Lipaz	Proteaz
<i>Bacillus circulans</i> (MG01650 3)	HK1, HK4, HK5, HK6, HK7, HK9, HK11, IK2, IK7, IK10, IK12, IK13, IK16, NK1, NK3, NK5, NK10, HY2, HY6, HY7, IY1, IY11, IY15, NY2	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus firmus</i> (MG01650 5)	HK2, HK3, HK8, IK3, IK5, IK6, IK8, NK7, NK8, NK9, HY9, HY12, IY3, IY4, IY6, IY8, IY9	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus sralis</i> (MG01651 1)	IK15	+	+	+	+	-	+	+
<i>Bacillus pumilus</i> (MG01651 3)	NK14, HY1, HY5, IY14	+	+	+	+	-	+	+

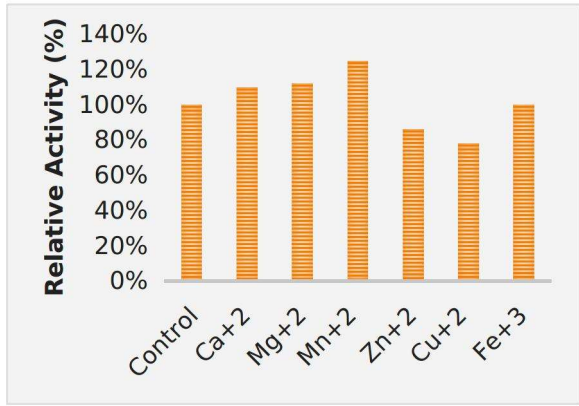
Substrat miktarı değiştirilerek sabit enzim konsantrasyonuna karşı gösterilen aktiviteler dikkate alınarak çizilen Lineweaver-Burk grafiği sonucunda K_m değeri 0,673 mg/ml, V_{max} değeri ise 99 EU/ml olarak belirlendi.

C. Biyoteknolojik Uygulamalar

B. pumilus NK14'ten elde edilen proteaz enzimi kan ve çimen lekeleri üzerine uygulanarak sonuçlar Şekil 3.'de verilmiştir. Enzimlerin deterjan ile beraber kullanıldığında diğer uygulamalara kıyasla daha etkili olduğu gözlemlendi.

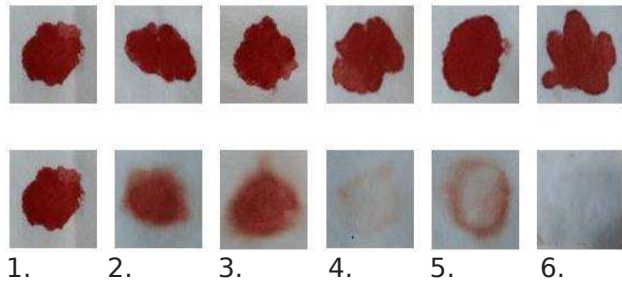


a.

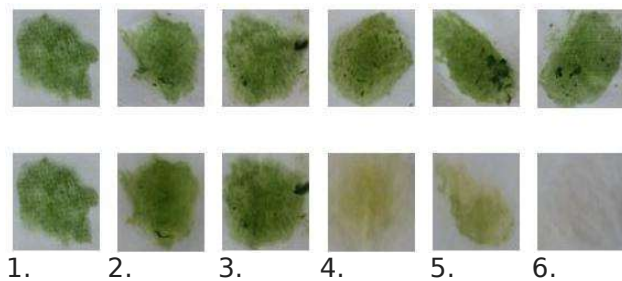


b.

Şekil 1. *B. pumilus* NK14'ün enzim aktivitesi üzerine bazı parametrelerin etkisi (a) 5mM EDTA, EGTA, DTT, PMSF, üre ve % 1 SDS, Tween 20, Tween 80, Triton X-100 ve H₂O₂'nin etkileri. (b) Divalent metal iyonlarının etkisi.



a.



b.

Şekil 2. Proteaz Enziminin Kan ve Çimen Lekelerine Etkisi. (1) Kontrol, (2) Besiyeri ile muamele, (3) Distile su ile muamele, (4) Deterjanla muamele, (5) *B. pumilus* NK14 proteaz enzimi ile muamele, (6) Deterjan ve *B. pumilus* NK14 proteaz enzimi ile muamele

IV. TARTIŞMA

Çalışma kapsamında bakteri izolasyonlarının yapıldığı Pasinler ve Ilica sıcak su kaynaklarından daha önce de başka çalışmaların gerçekleştirildiği ve benzer bazı türlerinde izole edildiği bilinmektedir [1, 33, 28]. Söz konusu çalışmada enzim aktivitesi gösteren izolatların 16S rRNA gen bölgelerinin dizi analizi yapılarak *Bacillus* cinsi bakteriler tanılandı. Yapılan çalışma sonucunda *Bacillus circulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus pumilus* ve *Bacillus sralis* olarak tanıı yapılan izolatların morfolojik ve biyokimyasal özelliklerinin literatürdeki verilerle paralellik gösterdiği göze çarpmaktadır [20, 31, 26].

Yapılan çalışmada güçlü proteaz aktivitesi sergileyen *B. pumilus* NK14 izolatının enzim aktivitesi için en uygun sıcaklığın 50°C, pH'nın ise 10 olduğu belirlendi. Literatürdeki verilerle kıyaslandığında, bu izolattan elde edilen proteazın termofilik alkalin proteaz enzimi olduğu tespit edildi [32, 33, 5, 11]. *B. pumilus* NK14 izolatı, 3 günlük inkübasyon sonunda 40°C'de enzim aktivitesinin %65'ini ve pH 8'de aktivitesinin %15'ini kaybetti. Üç günlük inkübasyon süresinin, daha önce yapılan çalışmalara kıyasla uzun bir süreç olduğu göz önünde bulundurulacak olursa, elde edilen proteaz enziminin stabilitesinin oldukça yüksek olduğu söylenebilmektedir. Özellikle deterjan sanayi uygulamalarında proteaz enziminin pH stabilitesi önemli bir yer tutmaktadır. Bu çalışmada, izolatın enzim aktivitesinin pH 8'de oldukça stabil olduğunun görülmesi ve özellikle de üç gün kadar uzun bir inkübasyon süresine rağmen aktivitenin %50'nin altına düşmemesi büyük bir önem arz etmektedir. Tüm bu durumlar değerlendirildiğinde, elde edilen proteaz enziminin deterjan sanayi uygulamalarında kullanılacak ürünlerinin raf ömrü bakımından dayanıklı olabileceği öngörüldü.

Proteaz enzim aktivitesi üzerine yapılan pek çok çalışmada, genel olarak PMSF, EDTA, EGTA, SDS, DTT, H₂O₂ ve ürenin enzim aktivitesi üzerinde olumsuz etkide bulunduğu, buna karşın Tween 20, Tween 80 ve Triton X-100'ün enzim stabilitesine ciddi bir etkide bulunmadığına hatta bazı durumlarda aktiviteyi artırdığına rastlandı [23, 32, 5, 9, 17]. Çalışmada *B. pumilus* NK14'ten elde edilen proteaz enziminin 5 mM PMSF ile büyük bir oranda inhibe olduğu görüldü ve bu durum elde edilen enzimin serin proteaz grubundan olabileceğini düşündürdü. Yine 5 mM EDTA ile aktivite kaybına uğraması, enzimin aynı zamanda metal bağlama bölgesinin olduğunu, bu nedenle metalloproteaz ailesine de dahil olabileceğini gösterdi. Diğer taraftan oksitleyici bir ajan olan H₂O₂'ye karşı alkalin proteaz enzimleri güçlü bir stabilite gösteriyorsa bu enzimin beyazlatıcı etkide olan deterjan formülleri açısından uygunluk gösterebileceği söylenmektedir. Çalışma

kapsamında, *B. pumilus* NK14'ten elde edilen proteaz enziminin %1'lik H₂O₂'ye karşı aktivitesini koruduğu hatta aktivitesinin %3 oranında arttığı gözlemlendi. Bu durum H₂O₂'nin proteaz enzimlerinin aktivitelerini etkilemediğini ve bu enzimin deterjan sanayinde kullanılabilirliğini gösterdi.

Alkalin proteaz enzimlerinin yüksek sıcaklık değerlerinde kararlılıklarını sürdürebilmek ve aktif formlarını koruyabilmek için bir takım metal iyonlarına gereksinim duydukları belirlenmiştir [14]. Yapılan bir takım çalışma sonucunda Ca²⁺, Mg²⁺ ve Mn²⁺ iyonlarının enzim aktivitesi üzerinde olumlu etkisi olduğu ortaya konmuştur. Diğer taraftan Cu²⁺ ve Zn²⁺ iyonlarının aktiviteyi düşürmekte olduğu görülmüştür [2, 11]. Çalışma kapsamında elde edilen proteaz enzimi üzerine Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺ ve Fe³⁺ iyonlarının etkisi incelendi ve sonuç olarak Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺ iyonlarının aktiviteyi artırdığı, Zn²⁺ ve Cu²⁺ iyonlarının ise aktivite üzerinde olumsuz bir etkisinin olduğu gözlemlendi. Bu bağlamda Ca²⁺, Mg²⁺ ve Mn²⁺ iyonlarının proteaz enzimi için kofaktör olabileceği düşünüldü.

B. pumilus NK14 izolatından elde edilen proteaz enziminin saflaştırılmasına rağmen ham enzim solüsyonunun deterjan sanayinde kullanılabilirliğini gözlemlenmek amacıyla biyoteknolojik uygulaması yapıldı. Enzim solüsyonları kan ve çimen lekeli bulaştırılmış kumaş parçalarına hem tek başına hem de hali hazırda kullanımda olan bir deterjan ile karıştırılarak uygulandı. Sonuçlar kontrollerle kıyaslandığında enzim solüsyonunun tek başına uygulamalarının lekeyi azaltıcı yönde etki gösterdiği görüldü. Deterjan ile beraber kullanımında ise lekelerin neredeyse tamamının kaybolduğu gözlemlendi. Yapılan bu uygulama sonucunda bu enzimin daha ileri çalışmalarda saflaştırılmalarıyla beraber deterjan sanayiinde kullanılabilirliği öngörüldü.

V. SONUÇ

Bu çalışma ile Erzurum ili sıcak su kaynaklarının termofilik bakteri florası belirlendi, izolatların konvensiyonel ve moleküler olarak tanımlaması yapıldı. Çalışma kapsamında izolatlar proteaz enzim aktiviteleri açısından tarandı ve en iyi aktivite gösteren izolat üzerinden çalışmalara devam edildi. Yapılan enzim aktivite tayinleri ve biyoteknolojik uygulamalar neticesinde endüstriyel açıdan büyük bir öneme sahip olabilecek bilgiler literatüre kazandırıldı. Aynı zamanda bu çalışma ile daha pek çok çalışmaya kaynak olabilecek veriler elde edildi. Tanısı yapılan izolatların biyoteknolojik bakımdan önemli başka enzimlere sahip olmaları açısından incelenmeleri gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Adiguzel, A., Nadaroglu, H., Adiguzel, G. (2015) Purification and Characterisation of β -mannanase from *Bacillus pumilus* (M27) and Its Applications in Some Fruit Juices. *Journal of Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1609-y>
- [2] Alpan, L. G. (2008) Bazı Ekstrem Termofil Anaerobik Bakterilerin Alkali Proteazlarının Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- [3] Çevik, S., (2010) Ege Bölgesi Sıcak Su Kaynakları ve Toprak Örneklerinden İzole Edilen Termofilik Aktinomisetlerin Proteaz Üretimlerinin Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ege Üniversitesi, Bornova İzmir.
- [4] Dülger, S., (1997) Ayder Kaplıcasından Termofilik Bakteri İzolasyonu ve Teşhisi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon.
- [5] El-Gendi, S.M., Helal, S.F., Nagem, S.A. (2016) Mismatch repair protein expression status in Egyptian colorectal carcinoma: a single-centre study. *Egyptian Journal of Pathology*. 36(2), pp.185-193., <https://doi.org/10.1097/01.XEJ.0000504540.12465.b7>
- [6] Görmez, (2011) Erzurum İli'nde Kayısı Ağaçlarından İzole Edilen *Pseudomonas Türlerinin Tanısı, Karakterizasyonu Ve Çeşit Reaksiyonları*. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi, Erzurum
- [7] Güder, S., (2014) *Scytalidium thermophilum* Ksilanazının Kromatografik Yöntemlerle Saflaştırılması ve Biyokimyasal Karakterizasyonu. Yüksek lisans tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Karaman.
- [8] Hameş-Kocabaş, E. E., Uçar, F., Ersin, N. K., Uzel, A., Alpöz, A. R. (2008). Colonization and vertical transmission of *Streptococcus mutans* in Turkish children. *Microbiological research*. 163(2), 168-172., <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.03.016>
- [9] Hammami, A., Hamdi, M., Abdelhedi, O., Jridi, M., Nasri, M., Bayouh, A. (2017) Surfactant-and oxidant-stable alkaline proteases from *Bacillus invictae*: Characterization and potential applications in chitin extraction and as a detergent additive. *International journal of biological macromolecules*. 96, 272-281., <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.12.035>
- [10] Harley, J.P. and Prescott, L.M. (2002) *Laboratory Exercises in Microbiology 4th Edition*. The McGraw-Hill Companies: New York.
- [11] Hussain, F., Kamal, S., Rehman, S., Azeem, M., Bibi, I., Ahmed, T., Iqbal, H. M. 2017. Alkaline Protease Production Using Response Surface Methodology, Characterization and Industrial Exploitation of Alkaline Protease of *Bacillus subtilis* sp. *Catalysis Letters*, 147(5), 1204-1213., <https://doi.org/10.1007/s10562-017-2017-5>
- [12] Jiménez-Moreno, E., Frikha, M., de Coca-Sinova, A., Lázaro, R. P., Mateos, G. G. (2013) Oat hulls and sugar beet pulp in diets for broilers. 2. Effects on the development of the gastrointestinal tract and on the structure of the jejunal mucosa. *Animal feed science and technology*. 182(1-4), 44-52., <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.03.012>
- [13] Klement, Z., Rudolph, K. and Sands, D.C., (1990) *Methods in Phytopathology*. Akademiai Kiado, 153-180, Budapest.
- [14] Kumar, C.G., Takagi, H., (1999) *Microbial Alkaline Proteases: From A Bioindustrial Viewpoint*. *Biotechnol Advances* 17: 561-594., [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(99\)00027-0](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00027-0)
- [15] Lazo, G. R., Roffey, R., Gabriel, D. W. (1987). Pathovars of *Xanthomonas campestris* are distinguishable by restriction fragment-length polymorphism. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 37(3), 214-221., <https://doi.org/10.1099/00207713-37-3-214>

- [16] Lineweaver, H., Burk, D., (1934) The determination of enzyme dissociation constants. J. Am. Chem. Soc. 57, 685-1934. <https://doi.org/10.1021/ja01318a036>
- [17] Marathe, S. K., Vashistht, M. A., Prashanth, A., Parveen, N., Chakraborty, S., Nair, S. S. (2017) Isolation, partial purification, biochemical characterization and detergent compatibility of alkaline protease produced by *Bacillus subtilis*, *Alcaligenes faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* obtained from sea water samples. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.10.001>
- [18] Matpan, F., (2007) Diyadin (Ağrı) Sıcak Su Kaynaklarından Bakteri İzolasyonu ve Bazı Enzimleri Üzerinde Çalışmalar. Fen Bilimleri Enstitüsü, Dicle Üniversitesi, Diyarbakır
- [19] Önal, S., (2010) Enzimler, Bölüm 8. Moleküler biyoloji, Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M., Tanyolaç, B. Ankara, 249-296.
- [20] Pan J, Huang Q, Zhang Y. Gene cloning and expression of an alkaline serine protease with dehairing function from *Bacillus pumilus*. Current microbiology. 2004;49(3):165-9. Accessed April 11, 2012., <https://doi.org/10.1007/s00284-004-4305-8>
- [21] Pant, G., Prakash, A., Pavani, J. V. P., Bera, S., Deviram, G. V. N. S., Kumar, A., Prasuna, R. G. (2015) Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. Journal of Taibah University for Science. 9(1), 50-55., <https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2014.04.010>
- [22] Pirinçcioğlu, H., (2010) Dargeçit ve Güçlükonak Sıcak Su Kaynaklarından Termofilik Bakteri İzolasyonu ve Tanımlanması. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Dicle Üniversitesi, Diyarbakır.
- [23] Raval, V.H., Pillai, S., Rawal, C.M. and Singh, S.P., (2014) Biochemical and structural characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from seawater haloalkaliphilic bacteria. Process Biochemistry. 49(6), pp.955-962., <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.03.014>
- [24] Sarı, E., (2011) *Bacillus circulans* M34'ten Proteaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- [25] Saygılı, H., (1995) Fitobakteriyoloji. Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 203, Bornova-İzmir.
- [26] Seiler, H., Wenning, M., Schmidt, V., Scherer, S. (2013) *Bacillus gottheilii* sp. nov., isolated from a pharmaceutical manufacturing site. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 63(3), 867-872. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.036277-0>
- [27] Tamer, A.Ü., Uçar, F., Ünver, E., Karaboz, İ., Bursalıoğlu, M., Oğultekin. R. (1989) 3-4 Sınıf Laboratuvar Klavuzu, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, 81-90.
- [28] Tarakçioğlu, S., (2016) Erzurum İlica Kaplıcalarından Alınan Su Örneklerinden Termofilik Bakterilerin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve *Bacillus thermoamylovorans* ST10 İzolatından Lipaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- [29] Tekin, N., (2008) Türkiye Kaynaklı *Bacillus* Sp.'lerin Alkalen Proteaz Üretim Kapasiteleri ve Enzimlerin Kısmen Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara Üniversitesi. Ankara.
- [30] Thumar, J.T., Singh, S.P. (2007) Secretion of an alkaline protease from a salt-tolerant and alkaliphilic, *Streptomyces clavuligerus* strain MIT-1. Brazilian journal of Microbiology. 38(4), pp.766-772., <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822007000400033>
- [31] Vaz-Moreira, I., Figueira, V., Lopes, A. R., Lobo-da-Cunha, A., Spröer, C., Schumann, P., Manaia, C. M. (2012) *Bacillus purgationiresistans* sp. nov., isolated from a drinking-water treatment plant. International journal of systematic and evolutionary microbiology. 62(1), 71-77., <https://doi.org/10.1099/ijs.0.028605-0>
- [32] Vijayaraghavan, P., Lazarus, S., Vincent, S.G.P. (2014) De-hairing protease production by an isolated *Bacillus cereus* strain AT under solid-state fermentation using cow dung: Biosynthesis and properties. Saudi journal of biological sciences. 21(1), pp.27-34., <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2013.04.010>
- [33] Yılmaz, B., Baltacı, M. O., Sisecioglu, M., Adiguzel, A. (2015) Thermotolerant alkaline protease enzyme from *Bacillus licheniformis* A10: purification, characterization, effects of surfactants and organic solvents. Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry. 31(6), 1241-1247., <https://doi.org/10.3109/14756366.2015.1118687>