

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

**SÜNME ETMENİ *Bacillus* TÜRÜ BAKTERİLERİN HÜCRE DIŞI PEPTİDAZ
ÜRETME YETENEKLERİNİN BELİRLENMESİ, PEPTİDAZ ÜRETİMİNİN
KISMİ OPTİMİZASYONU, SAFLAŞTIRILMASI ve KARAKTERİZASYONU**

Fundagül EREM

DOKTORA TEZİ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

2014

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

**SÜNME ETMENİ *Bacillus* TÜRÜ BAKTERİLERİN HÜCRE DIŞI PEPTİDAZ
ÜRETME YETENEKLERİNİN BELİRLENMESİ, PEPTİDAZ ÜRETİMİNİN
KİSMİ OPTİMİZASYONU, SAFLAŞTIRILMASI ve KARAKTERİZASYONU**

Fundagöl EREM

DOKTORA TEZİ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından 2010.03.0121.020 proje numarasıyla desteklenmiştir.**

2014

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SÜNME ETMENİ *Bacillus* TÜRÜ BAKTERİLERİN HÜCRE DIŞI PEPTİDAZ
ÜRETME YETENEKLERİNİN BELİRLENMESİ, PEPTİDAZ ÜRETİMİNİN
KİSMİ OPTİMİZASYONU, SAFLAŞTIRILMASI ve KARAKTERİZASYONU

Fundagül EREM

DOKTORA TEZİ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Bu tez 27.06 2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

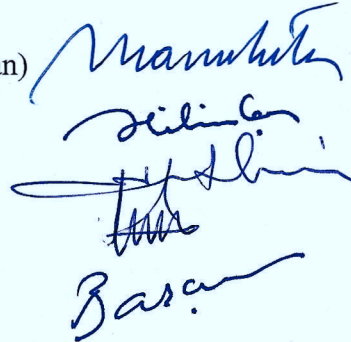
Prof. Dr. Muharrem CERTEL (Danışman)

Prof. Dr. Ahmet Hilmi ÇON

Prof. Dr. Mehmet İNAN

Yrd. Doç. Dr. Cengiz İKTEN

Yrd. Doç. Dr. Barçın KARAKAŞ


Muharrem CerTEL
Ahmet Hilmi ÇON
Mehmet İNAN
Cengiz İKTEN
Barçın KARAKAŞ

ÖZET

SÜNME ETMENİ *Bacillus* TÜRÜ BAKTERİLERİN HÜCRE DIŞI PEPTİDAZ ÜRETME YETENEKLERİNİN BELİRLENMESİ, PEPTİDAZ ÜRETİMİNİN KISMİ OPTİMİZASYONU, SAFLAŞTIRILMASI ve KARAKTERİZASYONU

Fundagül EREM

Doktora Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Muharrem CERTEL

Haziran 2014, 157 Sayfa

Bu çalışmada; *Bacillus* türlerinin peptidaz üretme kapasitelerinin ve bu peptidazların endüstriyel kullanım için uygun olup olmadıklarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, üretilen peptidazların kısmi optimizasyonu, saflaştırılması ve karakterizasyonu yapılmıştır.

Çalışmanın ilk aşamasında sünmüş ekmekten izole edilmiş 39 adet *Bacillus* türü hemolitik (Hbl) ve hemolitik olmayan (Nhe) enterotoksin üretimi açısından toksin kitleri yardımıyla taranmıştır. Ardından bu toksinlerin her ikisini de üretmediği tespit edilen 14 adet suşun 30 °C, 37 °C, 50 °C ve 55 °C’de hücre dışı peptidaz üretme yetenekleri, peptidaz aktivitesinin ölçülmesi suretiyle belirlenmiştir. Peptidaz üretiminde kullanmak üzere bu 14 suştan ünite/ml cinsinden peptidaz aktivitesi en yüksek olan K1 ve K10 suşları ile ünite/ml/OD cinsinden aktivitesi en yüksek olan N8 suşu seçilmiştir. Karşılaştırma sağlayabilmek için *Bacillus subtilis* PY22, *B. subtilis* RSK 244 ve *B. subtilis* RSK 246 suşlarının da peptidaz aktivitesi belirlenmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında; bir kerede bir faktör yaklaşımı kullanılarak seçilen K1, K10 ve N8 suşları için en uygun enzim üretim besiyeri bileşimi ve koşulları belirlenmiştir. Bu amaçla en iyi aktivite değerini sağlayan karbon ve azot kaynağı ile karbon/azot oranı, çalkalama hızı ve ön kültür besiyeri maliyet unsuru da göz önünde bulundurularak tespit edilmiştir. En iyi karbon ve azot kaynağının sırasıyla, glukoz ve maya ekstraktı olduğu saptanmıştır. Ayrıca karbon/azot oranının 1:5, çalkalama hızının 250 rpm olması durumunda ve ön kültür hazırlanması için enzim üretim ortamı ile aynı besiyeri kullanıldığında daha iyi aktivite değeri elde edilmiştir.

Çalışmanın üçüncü aşamasında; bir önceki aşamada en iyi peptidaz aktivitesi sağlayan K1 suşu kullanılarak yanıt yüzey yöntemi ile peptidaz üretiminin optimizasyonu çalışması yapılmış; sıcaklık, besiyeri başlangıç pH’sı ve inokülasyon oranı faktör olarak seçilmiştir. Peptidaz üretimi açısından K1 suşu için en uygun sıcaklık 33.4 °C, besiyeri başlangıç pH’sı 6.62, inokülasyon oranı %2.3 olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda peptidaz aktivitesi 49.17 ünite/ml olarak ölçülmüş, spesifik aktivite ise 504.77 ünite/mg olarak hesaplanmıştır.

Son aşamada ise optimum koşullarda üretilen ham enzim çözeltisi (peptidazlar), afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırılıp bazı özellikler açısından karakterize

edilmiştir. Peptidazlar %25 verim ve 1.53 katlık saflaştırma katsayısı ile kısmi olarak saflaştırılabilmektedir. Kısmi saflaştırılan peptidaz çözeltisinin optimum pH'sının 7.5 olduğu ve pH 7.0-8.5 arasında 37 °C'de 2 saat inkübasyon sonunda aktivitesini yaklaşık %90 oranında koruduğu tespit edilmiştir. Kısmen saflaştırılan peptidaz çözeltisinin optimum sıcaklığının 60 °C olduğu ancak 50 °C'de aktivitesini 60 °C'ye göre daha uzun süre koruduğu belirlenmiştir. Kısmi olarak saflaştırılan enzim çözeltisinin O-FEN ve EDTA (1-4 mM) varlığında inaktive olması, baskın peptidazın metalopeptidaz olduğunu göstermiştir. Ayrıca SDS-PAGE ve zimografi analizlerinin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi ile kısmen saflaştırılan enzim çözeltisindeki metalopeptidazın molekül ağırlığının 36 kDa civarında olduğu tespit edilmiştir. Enzim aktivitesini 5 mM K⁺ %4, 5 mM Mn²⁺ iyonu da %6 oranında artırırken; Hg²⁺ ve Fe³⁺ iyonları, enzimi inaktive etmiştir. Kısmi saflaştırılan enzim çözeltisinin SDS (%0.1-1.0 w/v) varlığında inaktive olduğu; %0.1-1.0 (v/v) Triton X-100, Tween 20, Tween 80 ile %1-20 (v/v) ksilen, etanol, aseton ve asetonitril varlığında ise bu maddelerin konsantrasyonuna da bağlı olmak üzere 37 °C'de 30 dakika inkübasyon sonunda aktivitesini büyük ölçüde koruduğu belirlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: *Bacillus*, karakterizasyon, peptidaz (proteaz), saflaştırma, yanıt yüzey yöntemi

JÜRİ: Prof. Dr. Muharrem CERTEL (Danışman)
Prof. Dr. Ahmet Hilmi ÇON
Prof. Dr. Mehmet İNAN
Yrd. Doç. Dr. Cengiz İKTEN
Yrd. Doç. Dr. Barçın KARAKAŞ

ABSTRACT

DETERMINATION OF EXTRACELLULAR PEPTIDASE PRODUCING ABILITY OF ROPE-FORMING STRAINS OF *Bacillus*, PARTIAL OPTIMIZATION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE PEPTIDASE

Fundagül EREM

PhD. in Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Muharrem CERTEL

June 2014, 157 Pages

In this study, the aim was to evaluate the peptidase producing capacity of *Bacillus* species and whether they are suitable for industrial use. For this purpose, partial optimization, purification and characterization of the peptidases produced was performed.

In the first part of the study 39 *Bacillus* species isolated from ropy bread were investigated by toxin kits for the production of hemolytic (Hbl) and non-hemolytic (Nhe) enterotoxins. Then, 14 of the strains which were found not to produce either of these toxins were analysed for their extracellular peptidase production capacity at 30 °C, 37 °C, 50 °C and 55 °C, by measuring the peptidase activity. Among these 14 strains, K1 and K10 which has the highest peptidase activity in unit/ml and N8 which has the highest activity in unit/ml/OD were selected for use in the production of peptidase. Peptidase activity of *Bacillus subtilis* PY22, *B. subtilis* RSK 244 and *B. subtilis* RSK 246 were also determined for comparison purposes.

In the second part of the study, the optimum enzyme production media composition and conditions were determined for the strains K1, K10 and N8 selected by using one factor at a time method approach. For this purpose, carbon source, nitrogen source, carbon/nitrogen ratio, agitation rate and inoculum culture media which ensure the best peptidase activity were determined by considering the cost-effectiveness. The best carbon and nitrogen source was determined as glucose and nitrogen, respectively. Furthermore, better enzyme activity was obtained with a carbon/nitrogen ratio of 1:5, agitation rate of 250 rpm and use of the same media for preparing inoculum culture as for enzyme production.

The third part of the study involved the optimization of peptidase production through response surface methodology using the K1 strain, which yielded the best peptidase activity in the previous part. Temperature, initial pH of media and inoculation rate were used as the factors for this process. The optimum temperature, initial pH of media and inoculation rate in terms of peptidase production were found as 33.4 °C, 6.62 and 2.3% respectively. Peptidase activity of 49.17 unit/ml was measured and specific activity of 504.77 units/mg was calculated for the crude enzyme under these conditions.

In the last part of the study crude enzyme solution (peptidases) produced under the optimum conditions mentioned above were purified by affinity chromatography and characterized in terms of some of their properties. Peptidases could be partially purified with an efficiency of 25% and a purification coefficient of 1.53. It was determined that the optimum pH of partially purified peptidase solution was 7.5 and the peptidases retained approximately 90% of its initial activity between the pH range of 7.0-8.5 after an incubation at 37 °C for 2 hours. It was found that the optimum temperature for the partially purified peptidase was 60 °C, however, the enzyme mixture did retain its activity for a longer period of time at 50 °C. The inactivation of the partially purified enzyme in the presence of O-FEN and EDTA (1-4 mM) showed that the peptidases produced were metallopeptidase. Furthermore, it was determined with the use of SDS-PAGE and zymography analysis that the approximate molecular weight of the partially purified enzyme was 36 kDA. Five mM of K⁺¹ and 5 mM of Mn⁺² ions increased the enzyme activity by 4 and 6% respectively, on the other hand, Hg⁺² and Fe⁺³ ions inactivated the enzyme. It was determined that the partially purified enzyme was inactivated in the presence of SDS (%0.1-1.0 w/v), however the enzyme retained most of its activity upon incubation at 37 °C for 30 minutes in the presence of %0.1-1.0 (v/v) Triton X-100, Tween 20, Tween 80 and %1-20 (v/v) xylene, ethanol, acetone and acetonitrile.

KEYWORDS: *Bacillus*, characterization, peptidase (protease), purification, response surface methodology

COMMITTEE: Prof. Dr. Muharrem CERTEL (Supervisor)
Prof. Dr. Ahmet Hilmi ÇON
Prof. Dr. Mehmet İNAN
Asst. Prof. Dr. Cengiz İKTEN
Asst. Prof. Dr. Barçın KARAKAŞ

ÖNSÖZ

İnsanoğlunun enzimleri kullanması çok eski zamanlara dayanmaktadır. İlk zamanlarda enzimlerden bilinçsizce faydalanılırken, bilimsel ve teknolojik gelişmelerle birlikte enzimlerin varlığı ve önemi anlaşılmış, enzimler farklı kaynaklardan ticari olarak üretilmeye başlanmıştır. Üretimde mikrobiyal kaynakların kullanılması ve enzim teknolojisindeki gelişmeler, arzu edilen özelliklere sahip enzimleri üretebilmek için alternatif yolların bulunmasına olanak tanımıştır. Dünyadaki büyük enzim pazarı karşısında Türkiye yeterli üretim seviyelerine ulaşamamış, enzim konusunda dışarıya bağımlı kalmıştır. Özellikle mikrobiyal enzim üretimindeki darboğazların giderilmesi, enzim verimliliği yüksek suşların bulunması ve enzim mühendisliği çalışmaları ile aradaki açığın kapatılabilmesi, Türkiye'nin kendine yetebilir hale gelmesi sağlanmalıdır.

Endüstriyel olarak en fazla yararlanan enzimlerden olan peptidazlar ticari olarak en fazla *Bacillus* türleri aracılığıyla üretilmektedir. Bu çalışmada da sünmüş ekmek içinden izole edilen *Bacillus* türleri aracılığıyla peptidaz üretimi gerçekleştirilmiş ve enzimin endüstriyel açıdan önem arz eden bazı temel özellikleri belirlenmiştir. Üretimde kullanılan suş ve elde edilen enzimle ilgili ileri düzeydeki çalışmalarla enzimin ticari düzeyde kullanılabilirliğinin sağlanabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesi sırasında yardım ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Sayın Muharrem CERTEL'e, yorum ve katkılarıyla çalışmaya yön veren Prof. Dr. Sayın Mehmet İNAN'a, tecrübe ve tavsiyelerinden yararlandığım Yrd. Doç. Dr. Sayın Barçın KARAKAŞ'a ve Doç. Dr. Sayın İrfan TURHAN'a teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca çalışmaya tavsiyeleriyle destek veren ve bazı analizlerin gerçekleştirilmesi sırasında laboratuvarını kullanma imkanı sunan Tez İzleme Komitesi üyelerinden Yrd. Doç. Dr. Sayın Cengiz İKTEN'e (Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü) teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmaları sırasında destekleri ile her an yanımda olan arkadaşlarım, doktora öğrencileri Mert KARAOĞLAN ve Fidan ERDEN ile Araş. Gör. Ülgen İknur KONAK'a; manevi desteği ile yardımını esirgemeyen Doç. Dr. Sayın Ahmet KÜÇÜKÇETİN'e ve desteklerini her zaman hissettiğim arkadaşlarım Araş. Gör. Ayşe AŞCI ARSLAN'a, Araş. Gör. Cüneyt DİNÇER'e ve Öğr. Gör. Mehmet TORUN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez metninin şekilsel olarak düzenlenmesindeki katkılarından dolayı doktora öğrencisi Nisa DURAK'a ve araştırmayı maddi olarak destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne ayrıca teşekkür ederim.

Son olarak en büyük teşekkürü ise destekleriyle her zaman yanımda olan, beni cesaretlendiren, çalışmamın tamamlanması sırasında büyük özveri gösteren babam Mehmet Nail EREM'e, annem İnci EREM'e ve kardeşim Bilge Rüya EREM'e sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI	4
2.1. <i>Bacillus</i> 'lar Hakkında Genel Bilgi	4
2.1.1. Toksin Üreten <i>Bacillus</i> Türleri	5
2.2. Enzimler Hakkında Genel Bilgi	7
2.2.1. Enzim biliminin kısa tarihçesi	7
2.2.2. Enzimlerin endüstrideki yeri ve önemi	8
2.2.3. Enzimlerin yapısı ve enzim üretimi	10
2.2.3.1. Mikrobiyal enzim üretimi	10
2.3. Peptidazlar	12
2.3.1. Peptidazların sınıflandırılması	13
2.3.1.1. Peptidazların katalizledikleri reaksiyonun türüne göre sınıflandırılması	13
2.3.1.2. Peptidazların kimyasal kataliz mekanizmalarına göre sınıflandırılması	15
2.3.1.3. Peptidazların moleküler yapı ve homolojilerine göre sınıflandırılması	18
2.3.1.4. Peptidazların aktivite gösterdikleri pH aralığına göre sınıflandırılması	19
2.3.2. Peptidaz kaynakları	20
2.3.3. Peptidazların kullanım alanları	21
2.3.3.1. Gıda endüstrisinde peptidazların kullanımı	22
2.3.3.2. Deterjan endüstrisinde peptidazların kullanımı	24
2.3.3.3. Deri endüstrisinde peptidazların kullanımı	24
2.3.3.4. Tekstil endüstrisinde peptidazların kullanımı	25
2.3.3.5. Kozmetik endüstrisinde peptidazların kullanımı	25
2.3.3.6. Farmakoloji ve tıpta peptidazların kullanımı	25
2.3.3.7. Diğer kullanım alanları	26
2.3.4. <i>Bacillus</i> peptidazları	26
2.4. Yanıt Yüzey Yöntemi	30
2.5. Saflaştırma İşleminde Kullanılan Bazı Kromatografik Tekniklerin Temel Prensipleri	31
2.5.1. Jel filtrasyon yöntemi	31
2.5.2. Afinite kromatografisi	32
3. MATERYAL ve METOT	34
3.1. Materyal	34
3.2. Metot	34
3.2.1. Optik yoğunluk (OD) ölçümü	34
3.2.2. Ham enzim çözeltisinin hazırlanması	34
3.2.3. Peptidaz aktivitesinin belirlenmesi	34

3.2.3.1. Spektrofotometrik yöntemle aktivitenin tespit edilmesi	34
3.2.3.2. Zon alanının ölçülmesi ile aktivitenin kalitatif olarak tespit edilmesi	35
3.2.4. Protein miktarının belirlenmesi	36
3.2.5. Glukoz miktarının belirlenmesi	36
3.2.6. Gram boyama	36
3.2.7. <i>Bacillus</i> suşlarının enterotoksin üretme açısından taranması	36
3.2.7.1. Hücre kültürlerinin hazırlanması	36
3.2.7.2. BCET-RPLA ile enterotoksin tespiti	37
3.2.7.3. BDEVIA ile enterotoksin tespiti	38
3.2.8. <i>Bacillus</i> suşlarının peptidaz üretme kapasitelerinin belirlenmesi	39
3.2.9. Peptidaz üretimi için kültür koşullarının belirlenmesi	39
3.2.9.1. Ön kültürün hazırlanması ve fermantasyon koşulları	39
3.2.9.2. Peptidaz üretimi için en uygun karbon kaynağının belirlenmesi	40
3.2.9.3. Peptidaz üretimi için en uygun azot kaynağının belirlenmesi	40
3.2.9.4. Peptidaz üretimi için çalkalama hızının belirlenmesi	40
3.2.9.5. Peptidaz aktivitesi üzerine besiyeri başlangıç pH'sının etkisi	40
3.2.9.6. Peptidaz aktivitesi üzerine karbon kaynağı/azot kaynağı oranının belirlenmesi	40
3.2.9.7. Ön kültür hazırlamada kullanılan besiyerinin etkisi	41
3.2.10. Yanıt yüzey yöntemi ile peptidaz üretiminin optimizasyonu	41
3.2.10.1. Stok bakteri kültürünün hazırlanması	41
3.2.10.2. K1 suşunun büyüme eğrisinin oluşturulması, spesifik gelişme oranı ve ikiye katlanma süresinin hesaplanması	41
3.2.10.3. Yanıt yüzey yöntemi	41
3.2.11. Üretilen peptidazın saflaştırılması	43
3.2.11.1. Amonyum sülfatla çöktürme	43
3.2.11.2. Enzimin ultrafiltrasyon tüpleri ile konsantre edilmesi	43
3.2.11.3. Afinite kromatografisi ile yapılan saflaştırma	43
3.2.12. Üretilen peptidazın karakterize edilmesi	44
3.2.12.1. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)	44
3.2.12.2. Zimografi	45
3.2.12.3. Enzimin optimum pH değeri ve pH kararlılığının belirlenmesi	46
3.2.12.4. Enzimin optimum sıcaklık değeri ve sıcaklık kararlılığının belirlenmesi	46
3.2.12.5. Enzim aktivitesi üzerine peptidaz inhibitörlerinin etkisinin belirlenmesi	47
3.2.12.6. Enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisinin belirlenmesi	47
3.2.12.7. Enzim aktivitesi üzerine bazı organik çözücü, deterjan katkı maddeleri ve yüzey aktif maddelerin etkisinin belirlenmesi	47
3.2.13. İstatistiksel değerlendirme	48

3.2.14. Bazı suşların moleküler metotlarla tanınması	48
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	49
4.1. Toksin Tarama Sonuçları	49
4.2. Peptidaz Aktivitesi En Fazla Olan <i>Bacillus</i> Suşunun Belirlenmesi	52
4.3. Seçilen <i>Bacillus</i> Türleri için Tespit Edilen Kültür ve Enzim Üretim Koşulları	57
4.3.1. Peptidaz aktivitesi üzerine farklı karbon kaynaklarının etkisi	57
4.3.2. Peptidaz aktivitesi üzerine farklı azot kaynaklarının etkisi	60
4.3.3. Peptidaz aktivitesi üzerine çalkalama hızının etkisi	63
4.3.4. Peptidaz aktivitesi üzerine karbon kaynağı/azot kaynağı oranının etkisi	65
4.3.5. Peptidaz aktivitesi üzerine ön kültür hazırlamada kullanılan besiyerinin etkisi	69
4.3.6. Peptidaz aktivitesi üzerine besiyeri başlangıç pH'sının etkisi	70
4.4. K1 Suşu ile Peptidaz Üretiminin Optimizasyonu	70
4.4.1. K1 suşunun gelişim eğrisi ve peptidaz aktivitesinin değişimi	71
4.4.2. Yanıt yüzey yöntemi ile K1 suşunun optimum peptidaz üretim koşullarının tespit edilmesi	75
4.5. K1 Suşu ile Üretilen Peptidazın Saflaştırılması	99
4.5.1. Ham enzim çözeltisinin en iyi aktivite gösterdiği pH değeri	99
4.5.2. Ham enzim çözeltisinin konsantre edilmesi	100
4.5.3. Konsantre enzim çözeltisinin afinite kromatografisi ile saflaştırılması	102
4.5.3.1. Konsantre enzim çözeltisinin afinite kromatografisinde kullanılan bağlayıcı tampon çözeltiye adaptasyonu	102
4.5.3.2. Afinite kromatografisi ile (HiTap Blue kolon) enzimin kısmi olarak saflaştırılması	104
4.6. K1 Suşu ile Üretilen Peptidazın Karakterize Edilmesi	113
4.6.1. Üretilen peptidazın optimum pH değeri ile pH kararlılığı	113
4.6.2. Üretilen peptidazın optimum sıcaklık değeri ile sıcaklık kararlılığı	115
4.6.3. Peptidaz aktivitesi üzerine inhibitörlerin etkisi	118
4.6.4. Peptidaz aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi	120
4.6.5. Peptidaz aktivitesi üzerine bazı organik çözücü, deterjan katkı maddeleri ve yüzey aktif maddelerin etkisi	121
5. SONUÇ	125
6. KAYNAKLAR	129
7. EKLER	149
Ek 1. Kalibrasyon eğrileri	149
Ek 2. Sünmüş ekmekten izole edilen suşlara ait tanılama sonuçları	151
Ek 3. Yanıt yüzey yöntemi ile peptidaz üretiminin optimizasyonu sırasında her fermantasyon koşulu için gerçekleştirilen işlemler	152
Ek 4. K1, K10 ve N8 suşlarının nükleotid dizilimleri	153
Ek 5. K1 suşunun nutrient agardaki koloni yapısı	155
Ek 6. <i>Bacillus subtilis</i> 'in sporlaşma döngüsü (Errington 2003)	155
Ek 7. Konsantre enzim çözeltisinin afinite kromatografisinde kullanılan bağlayıcı tampon çözeltiye adaptasyonu sırasındaki ekran görüntüsü	156
Ek 8. Afinite kromatografisi ile saflaştırma esnasındaki ekran görüntüsü	157
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

cm	Santimetre
dak.	Dakika
g	Gram
kDa	Kilodalton
kg	Kilogram
l	Litre
s	Saniye
sa	Saat
mg	Miligram
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
mAu	Miliabsorbans ünitesi
nm	Nanometre
\$	Amerikan doları
%	Yüzde

Kısaltmalar

API	Analitik Profil İndeksi (Analytical Profile Index)
BHIB	Brain heart infusion broth
BCET-RPLA	<i>Bacillus cereus</i> enterotoksini- ters fazlı lateks çöktürme (<i>Bacillus cereus</i> enterotoxin-reversed phase latex agglutination)
BDEVIA	<i>Bacillus</i> diyarel enterotoksini görsel immunotesti (<i>Bacillus</i> diarrhoeal enterotoxin visual immunoassay)
E-64	Epoksisüksinil-L-lösilamido-(4-guanidino) bütan [Epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino) butane]
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
EÜO	Enzim üretim ortamı
C/N	Karbon kaynağı / Azot kaynağı oranı
DTT	Ditiotreitol (indirgeme ajanı)
GRAS	Genel olarak güvenli olduğu kabul edilen
Hbl	Hemolisin BL (Hemolitik enterotoksin)
HE	Ham enzim çözeltisi
KE	Konsantre enzim çözeltisi
KO	Kareler ortalaması
MOPS	3-(N-morfolino)propansülfonik asit [3-(N-morpholino)propanesulfonic acid]
NB	Nutrient broth
Nhe	Hemolitik olmayan enterotoksin
NC-IUBMB	Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği Terimleme Komitesi
OD	Optik yoğunluk
OFAT	Bir kerede bir faktör (one-factor-at-a-time)
O-FEN	1,10-fenantrolin (1,10-phenanthroline)
PEP-A	Pepstatin A

PES	Polietersülfon
SD	Serbestlik derecesi
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
SE	Standart hata katsayısı
StdH	Standart hata
PMSF	Fenil metil sülfonil florid (Phenylmethylysulphonyl fluoride)
X	Ortalama Değer
T.E.	Tespit Edilemedi
v/v	hacim/hacim
VIF	Varyans yükseltme faktörü
w/v	ağırlık/hacim
YNB	Yeast extract nitrogen base

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>Bacillus</i> 'ların sistematik sınıflandırmadaki yeri	4
Şekil 2.2. <i>Bacillus cereus</i> toksinlerinin sınıflandırılması.....	6
Şekil 2.3. Bir fermentasyon prosesinin temel işlemleri (Aehle 2004)	11
Şekil 2.4. Peptid bağının hidrolizi	12
Şekil 2.5. Peptidazların genel olarak isimlendirilmesi	12
Şekil 2.6. Peptidazların katalizledikleri reaksiyonların şematik gösterimi (Rawlings vd 2007).....	14
Şekil 2.7. a) Tek metal iyonlu b) iki metal iyonlu metalopeptidazların şematik gösterimi (Auld 2013).....	18
Şekil 2.8. Peptidazların moleküler yapı ve homolojilerine göre sınıflandırılması (Barrett ve Rawlings 2007)	19
Şekil 2.9. a) Box-Behnken b) merkezi tümleşik deneme desenlerinin küp olarak gösterimi	30
Şekil 2.10. Jel filtrasyon ile farklı boyuttaki moleküllerin ayrılması	32
Şekil 2.11. Afinite kromatografisinin prensibi.....	33
Şekil 3.1. BCET-RPLA kiti için mikropılaka	37
Şekil 3.2. BCET-RPLA kiti sonuç değerlendirme şeması	38
Şekil 3.3. BDEVIA kitinin antikör kaplı kuyucukları ve kuyucuk tablası.....	38
Şekil 3.4. BDEVIA kitinin sonuç değerlendirme renk kartı	39
Şekil 4.1. Bazı <i>Bacillus</i> suşları için BCET-RPLA sonuçları	50
Şekil 4.2. Bazı <i>Bacillus</i> suşları için BDEVIA sonuçları	51
Şekil 4.3. 37 °C'de fermentasyona bırakılan suşların a) peptidaz aktivitesi (ünite/ml) b) peptidaz aktivitesi/OD sonuçları.....	55
Şekil 4.4. 30 °C'de fermentasyona bırakılan suşların a) peptidaz aktivitesi (ünite/ml) b) "peptidaz aktivitesi/OD" sonuçları	56
Şekil 4.5. a) K1 b) K10 ve c) N8 suşlarının peptidaz aktivitesi değeri üzerine farklı karbon kaynaklarının etkisi (X±StdH).....	58

Şekil 4.6. a) K1 b) K10 ve c) N8 suşlarının peptidaz aktivitesi değeri üzerine farklı azot kaynaklarının etkisi.....	61
Şekil 4.7. K1 ve K10 suşlarının peptidaz aktivitesi değeri üzerine çalkalama hızının etkisi.....	64
Şekil 4.8. a) K1 ve b) K10 suşlarının peptidaz aktivitesi değeri üzerine farklı karbon kaynağı / azot kaynağı (g/g) oranının etkisi.....	66
Şekil 4.9. Suşların kazeinli besiyerinde oluşturdukları hidroliz zonları.....	68
Şekil 4.10. Suşların peptidaz aktivitelerinin ünite/ml ve zon alanı (cm ²) olarak karşılaştırılması.....	68
Şekil 4.11. Suşların peptidaz aktivitesi değeri üzerine ön kültür besiyerinin etkisi.....	69
Şekil 4.12. Besiyeri başlangıç pH'sının K1 suşunun peptidaz aktivitesi değeri üzerine etkisi.....	70
Şekil 4.13. K1 suşunun 37 °C'deki gelişme eğrisi.....	71
Şekil 4.14. K1 suşu için 37°C'de inkübasyon sırasındaki gram boyama sonuçlarına ait mikroskop görüntüleri.....	72
Şekil 4.15. K1 suşunun 37 °C'deki OD değeri ve peptidaz aktivitesi değişimi.....	74
Şekil 4.16. K1 suşunun 30 °C'de fermantasyonu sırasında OD değeri ve peptidaz aktivitesi değişimi.....	75
Şekil 4.17. K1 suşunun farklı sıcaklık derecelerinde pH 7 ve %3 inokülasyon oranındaki a) OD ve peptidaz aktivitesi ile b) glukoz ve protein miktarının değişimi.....	77
Şekil 4.18. K1 suşunun 32.5 °C'de pH 7'de farklı inokülasyon oranlarındaki a) OD ve peptidaz aktivitesi ile b) glukoz ve protein miktarının değişimi.....	78
Şekil 4.19. K1 suşunun 32.5 °C'de farklı pH değerlerinde %3 inokülasyon oranındaki a) OD ve peptidaz aktivitesi ile b) glukoz ve protein miktarının değişimi.....	79
Şekil 4.20. K1 suşunun 25 °C'de pH 5.81'de farklı inokülasyon oranlarındaki a) OD ve peptidaz aktivitesi ile b) glukoz ve protein miktarının değişimi.....	80
Şekil 4.21. K1 suşunun 25 °C'de pH 8.19'da farklı inokülasyon oranlarındaki a) OD ve peptidaz aktivitesi ile b) glukoz ve protein miktarının değişimi.....	81

Şekil 4.22. K1 suşunun 39.9 °C’de pH 5.81’de farklı inokülasyon oranlarındaki a) OD ve peptidaz aktivitesi ile b) glukoz ve protein miktarının değişimi.....	82
Şekil 4.23. K1 suşunun 39.9 °C’de pH 8.19’da farklı inokülasyon oranlarındaki a) OD ve peptidaz aktivitesi ile b) glukoz ve protein miktarının değişimi.....	83
Şekil 4.24. K1 suşunun peptidaz aktivitesine bağlı kontur grafikleri	92
Şekil 4.25. K1 suşunun peptidaz aktivitesine bağlı yüzey grafikleri	93
Şekil 4.26. K1 suşunun peptidaz aktivitesi için Minitab 17 programı ile elde edilen optimizasyon grafiği	95
Şekil 4.27. K1 suşunun peptidaz aktivitesi açısından tespit edilen optimum koşullarda (33.4 °C, pH6.62, inokulasyon oranı %2.3) OD, peptidaz aktivitesi, protein miktarı ve glukoz miktarı değişimi.....	97
Şekil 4.28. K1 suşu ile elde edilen ham enzim çözeltisinin substrat olarak kazein kullanıldığı zaman farklı pH’larda tespit edilen peptidaz aktivitesi değerleri	99
Şekil 4.29. K1 suşu ile elde edilen ham enzim çözeltisinin substrat olarak hemoglobun kullanıldığı zaman farklı pH’larda tespit edilen peptidaz aktivitesi değerleri.....	100
Şekil 4.30. Ham enzim çözeltisinin konsantrasyon işlemi öncesi ve sonrasında ultrafiltrasyon tüpleri	101
Şekil 4.31. Peptidaz inhibitörleri varlığında K1 suşunun ham enzim çözeltisi ile ultrafiltrasyon tüpü üst ve alt sıvısında aktivite değerlerinin değişimi.....	102
Şekil 4.32. K1 suşuna ait konsantre ham enzim çözeltisi HiTrap desalting kolondan geçerken absorbans, iletkenlik ve peptidaz aktivitesi değişimi	103
Şekil 4.34. Saflaştırma sırasında toplanan fraksiyonların SDS-PAGE görüntüleri	107
Şekil 4.35. Saflaştırma sırasında toplanan fraksiyonların zimogram görüntüleri	109
Şekil 4.36. Saflaştırma sırasında birleştirilmiş fraksiyonlara ait a) SDS-PAGE ve b) zimogram görüntüleri	110
Şekil 4.37. K1 suşu ile üretilen peptidazın farklı pH değerlerindeki aktivite sonuçları	113

Şekil 4.38. K1 suşu ile üretilen peptidazın farklı pH değerlerinde a) 2 saat b)18 saat inkübasyon sonundaki pH kararlılığı.....	115
Şekil 4.39. K1 suşu ile üretilen peptidazın farklı sıcaklıklarda gösterdiği aktivite değerleri.....	116
Şekil 4.40. Farklı sıcaklık derecelerinde K1 suşuna ait a) ham enzim çözeltisi ve b) kısmi saflaştırılmış enzimin kararlılığı.....	117

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Uygulama alanına göre dünya enzim pazarı (Milyon \$).....	9
Çizelge 2.2. Peptidazların sistematik olarak sınıflandırılması ve enzim komisyonu (EC) kodları.....	15
Çizelge 2.3. Farklı katalitik tipteki peptidazların bazı özellikleri	17
Çizelge 2.4. En bilinen bitkisel ve hayvansal kaynaklı peptidazlar ve yaygın kullanım alanları.....	21
Çizelge 2.5. <i>Bacillus</i> türleri ile peptidaz üretimine ilişkin bazı çalışmalar	28
Çizelge 3.1. <i>Bacillus</i> türlerinin peptidaz üretme kapasitelerinin belirlenmesi için fermantasyonda kullanılan temel sıvı besi ortamının bileşimi.....	39
Çizelge 3.2. Yanıt yüzey yöntemi merkezi tümleşik (central composite) deneme deseni	42
Çizelge 3.3. SDS-PAGE’de kullanılan jellerin bileşimi	45
Çizelge 3.4. Zimografide kullanılan jellerin bileşimi.....	46
Çizelge 3.5. Çalışmada kullanılan peptidaz inhibitörleri	47
Çizelge 4.1. <i>Bacillus</i> izolatlarının enterotoksin analizi sonuçları	52
Çizelge 4.2. Farklı sıcaklıklarda fermantasyona bırakılan <i>Bacillus</i> izolatlarının optik yoğunluk değişimleri	54
Çizelge 4.3. Farklı karbon kaynakları için birim fiyat listesi.....	57
Çizelge 4.4. K1, K10 ve N8 suşlarının karbon kaynaklarına bağlı peptidaz aktivitesi değerlerine ait varyans analizi sonuçları	59
Çizelge 4.5. K1, K10 ve N8 suşlarının karbon kaynaklarına bağlı peptidaz aktivitesi ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları ($X \pm \text{StdH}$).....	59
Çizelge 4.6. Farklı azot kaynakları için birim fiyat listesi	62
Çizelge 4.7. K1, K10 ve N8 suşlarının azot kaynaklarına bağlı peptidaz aktivitesi değerlerine ait varyans analizi sonuçları	62
Çizelge 4.8. K1, K10 ve N8 suşlarının azot kaynaklarına bağlı peptidaz aktivitesi ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları ($X \pm \text{StdH}$).....	63
Çizelge 4.9. K1 suşu için spesifik büyüme hızı ve ikiye katlanma süresi.....	73

Çizelge 4.10. Deneme desenindeki fermantasyon koşullarına göre K1 suşu için maksimum OD değerine ulaşıldığı an ve sonrasındaki spesifik aktivite değerleri.....	86
Çizelge 4.11. Yanıt yüzey yöntemi deneme desenine göre K1 suşu için ölçülen ve tahmin edilen peptidaz aktivitesi değerleri.....	87
Çizelge 4.12. K1 suşunun peptidaz aktivitesi için tahmin edilen regresyon katsayıları	89
Çizelge 4.13. K1 suşunun peptidaz aktivitesi değerlerine ait varyans analizi sonuçları	90
Çizelge 4.14. K1 suşu ile optimum koşullarda üretilen enzim için spesifik aktivite değeri ve tüketilen glukozaya karşı üretilen enzim miktarı	98
Çizelge 4.15. K1 suşu ile optimum koşullarda üretilmiş olan enzimin farklı ünite tanımlarına göre hesaplanmış aktivite değerleri	98
Çizelge 4.16. Amonyum sülfatla yapılan çöktürme sonrası aktivite değerleri	100
Çizelge 4.17. Ham enzim çözeltisinin asıl saflaştırma öncesi hazırlık aşamalarında aktivite değerleri	104
Çizelge 4.18. Saflaştırma kolonundan toplanan fraksiyonların aktivite değerleri	106
Çizelge 4.19. Saflaştırma kolonundan toplanarak birleştirilen fraksiyonların aktivite değerleri.....	109
Çizelge 4.20. Saflaştırma öncesi ve sonrasında inhibitör ilavesi sonucu K1 suşuna ait kalan peptidaz aktivitesinin % olarak değerleri	111
Çizelge 4.21. K1 suşunun (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>) ürettiği peptidazın saflaştırma profili	112
Çizelge 4.22. Farklı konsantrasyonlardaki peptidaz inhibitörlerinin K1 suşunun enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	119
Çizelge 4.23. Metal iyonlarının K1 suşunun peptidaz aktivitesi üzerine etkisi (%)	121
Çizelge 4.24. Bazı organik çözücü, deterjan katkı maddeleri ve yüzey aktif maddelerin K1 suşunun enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	122

1. GİRİŞ

Biyoteknoloji, yeni olarak nitelendirilebilecek bir bilim olmasına rağmen, teknoloji olarak oldukça eskidir. Çok eski zamanlardan beri yapılan; peynir, ekmek, şarap, bira gibi ürünlerin üretimi, tarımsal uygulamalar ve daha birçok geleneksel aktivite biyoteknolojinin kapsamı içindedir. Biyoteknoloji terimi ilk kez 1917 yılında, geniş ölçekli fermantasyon prosesi ile farklı endüstriyel kimyasalların üretilmesiyle birlikte kullanılmaya başlanmıştır. Çok çeşitli tanımlar yapılabilmesine rağmen, genel anlamda biyoteknoloji çeşitli maddelerin üretimi için canlı organizmaların, hücrelerin ya da hücresel bileşenlerin kontrollü olarak kullanılması olarak tanımlanabilmektedir (Nair 2008). Biyoteknoloji; mikrobiyoloji, genetik, biyokimya/kimya, gıda bilimi, gıda teknolojisi ve mühendisliği, mekanik mühendisliği, biyokimya/kimya mühendisliği, elektronik gibi farklı alanları kapsayan disiplinlerarası bir bilimdir (Smith 2004). Biyoteknolojinin bir alt dalı olan enzim teknolojisinin temel ilgi alanı, enzimler aracılığıyla yeni prosesler ya da yüksek katma değerli ürünler geliştirebilmek veya ihtiyaçları karşılayabilecek yeni enzimler üretmektir (Buchholz vd 2005).

Enzimler, canlı hücreler tarafından oluşturulan ve kimyasal reaksiyonları spesifik olarak katalizleme yeteneğinde olan, protein yapısındaki maddelerdir. Hücredeki işlevlerinin yanı sıra hücre dışında da aktivite gösterebilen enzimler ticari olarak bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kaynaklardan üretilmektedir (Temiz 1998).

Bitkisel ve hayvansal dokular 1960'lı yıllarda, %70'lik bir pay ile enzim üretiminde kullanılan en önemli kaynaklar iken; 20 yıl sonra durum değişmiş, birçok endüstriyel enzim mikrobiyal kaynaklar kullanılarak üretilmeye başlanmıştır. Günümüzde bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal enzimlerin toplam enzim üretimindeki payları yaklaşık olarak, sırasıyla, %5, %10 ve %85'dir (Illanes 2008).

Mikrobiyal enzimlere karşı artan ilgi, bitkisel ve hayvansal kökenli enzimlerin dünyadaki talebi karşılayamamasının bir sonucudur. Bunun yanı sıra mikrobiyal kökenli enzimlerin diğer kaynaklara tercih edilmelerinin nedeni, biyoteknolojik uygulamalar için gerekli olan özelliklerin neredeyse tamamına sahip olmalarıdır. Daha geniş bir ifade ile; mikroorganizmaların oldukça dinamik bir metabolizmaya sahip olması, mikrobiyal enzimlerin katalitik aktivitelerinin bitkisel ve hayvansal enzimlere göre çok daha yüksek olması, ortama kolay uyum sağlayabilmeleri, derin ya da yüzey kültür fermantasyonu ile kolaylıkla çoğaltılabilmeleri, besin isteklerinin az olması, bulunabilirliklerinin mevsimsel faktörlere bağlı olmaması, hem çevresel hem de genetik olarak kolaylıkla idare edilebilmeleri, üretimi artırmak için suş geliştirmenin mümkün olması mikrobiyal kökenli enzimlerin tercih edilmesinde önemli rol oynamaktadır (Adrio ve Demain 2005, Illanes 2008). Mikrobiyal enzimler daha güvenilir, stabil ve ucuz olup fazla miktarda üretilmekte, aktiviteleri sonucu istenmeyen yan ürün oluşturmamaktadır (Kıran vd 2006). Ayrıca ideal olmayan koşullarda depolandıklarında bile aktivitelerinde meydana gelen kayıp, bitkisel ve hayvansal enzimlerde oluşan kayıplardan daha az olmaktadır (Gupta vd 2002a). Ticari olarak üretilen ve kullanılan enzimlerin çok büyük bir kısmı, mikrobiyal organizmalar tarafından üretilmekte ve endüstriyel enzim kullanımı tüm dünyada büyük bir hızla artmaktadır (Gümüsel 2010). Mikrobiyal enzimlerin biyoteknolojik süreçler eliyle üretilmeleri ve çeşitli matrikslere bağlanarak daha kararlı kılınmaları, enzimlerin endüstriyel kullanımındaki artışın temel nedenleri arasındadır.

Enzim ürettiği bilinen bir çok mikroorganizma olmasına rağmen, üretimde ticari olarak kullanılabilen, genel olarak güvenli olduğu kabul edilen (GRAS), toksik ve patojen olmayan çok az sayıda mikroorganizma bulunmaktadır. Bunlardan en önemlisi büyümeleri ve sporlaşmaları sırasında birçok enzimi sentezleyen, ticari olarak bulunabilen enzimlerin yaklaşık %60'ının karşılandığı *Bacillus* türleridir. Dünya enzim pazarının yaklaşık %20'lik bir kısmını *Bacillus* türlerinden elde edilen termostabil proteolitik enzimler, bunların çoğunluğunu ise deterjan endüstrisinde (%35) kullanılan peptidazlar oluşturmaktadır (Beg vd 2002, Gupta vd 2002b, Westers vd 2004). Üretilen peptidazların çoğunlukla deterjan endüstrisinde kullanılıyor olması enzimin yüksek sıcaklıklara dayanıklı olmasını, aktivitesini koruyabilmesini yani termostabil olmasını gerekli kılmaktadır. Deterjanlarda kullanılan peptidaz ve amilazların neredeyse tamamının *Bacillus* kaynaklı olduğu bildirilmektedir (Outtrup ve Jørgensen 2002).

En önemli endüstriyel enzimler arasında yer alan, dünya çapında, endüstriyel pazarda yaklaşık %60'lık bir paya sahip olan peptidazların oldukça geniş bir uygulama alanı bulunmaktadır (Lazim vd 2009). Özellikle gıda, deterjan, ilaç, deri, dokuma ve kimya sanayiinde peptidazlardan yoğun olarak yararlanılmaktadır (Guangrong vd 2008).

Peptidazlar saf enzimlerden daha ziyade karışım halinde kullanılmaktadır. İlk olarak bazı bitki öz suları ve hayvanların midesinden elde edilen kimozin içeren rennet şeklinde, peynir yapımında sütü pıhtılaştırmak için kullanılmıştır. Ayrıca etleri yumuşatmak, birayı durultmak, peynir ve hayvansal gıdalara aroma kazandırmak, deri sanayinde kılları uzaklaştırmak, deriyi daha yumuşak ve esnek hale getirmek için de peptidazlardan yararlanılmaktadır. Peptidazların deterjan ve kontakt lens temizleme çözeltilerinde de çok yaygın bir kullanım alanı bulunmaktadır. Tıpta; bağırsak parazitleri ile mücadelede, yanıklarda ölü derinin uzaklaştırılmasında, kan gruplarının belirlenmesinde, fitik vakalarında disklerdeki kırıkların parçalayarak sırt ağrılarının azaltılmasında peptidazlar etkili olmaktadır. Peptidazlar, laboratuvarlarda proteinlerin sınırlı proteolizi ve protein dizilimlerinin belirlenmesi için gerekli peptidlerin oluşturulması amacıyla ayrıca olarak da kullanılmaktadır (Rawlings vd 2007).

Enzim sistematüğinde hidrolazlar grubu altında yer alan peptidazlar (EC 3.4), proteinlerin peptid bağlarının hidrolizini katalizleyerek protein ya da büyük polipeptidleri kısa peptidlere ya da serbest amino asitlere dönüştüren bir enzim grubudur (Barrett 2001, Salleh vd 2006). Peptidaz, proteaz, proteolitik enzim gibi farklı şekillerde ifade edilebilmelerine karşın Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliğı-Terimleme Komitesi (NC-IUBMB), bu enzimlerin peptidaz olarak isimlendirilmesini önermektedir¹.

Ekmeklerde görülen ve ekonomik kayıplara yol açan en önemli mikrobiyal bozulmalardan/hastalıklardan biri olan sünme (rope) hastalığının etmeni *Bacillus* türleridir. Baskın türler başta *Bacillus subtilis* olmak üzere *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus* ve *B. cereus*'dur (Sorokulova vd 2003). Toprak kökenli olan

¹Bu tez çalışmasında peptidaz ifadesine yer verilmiş, mevcut literatürlerde bulunan farklı ifadeler de karışıklık oluşmaması için peptidaz olarak değiştirilerek kullanılmıştır.

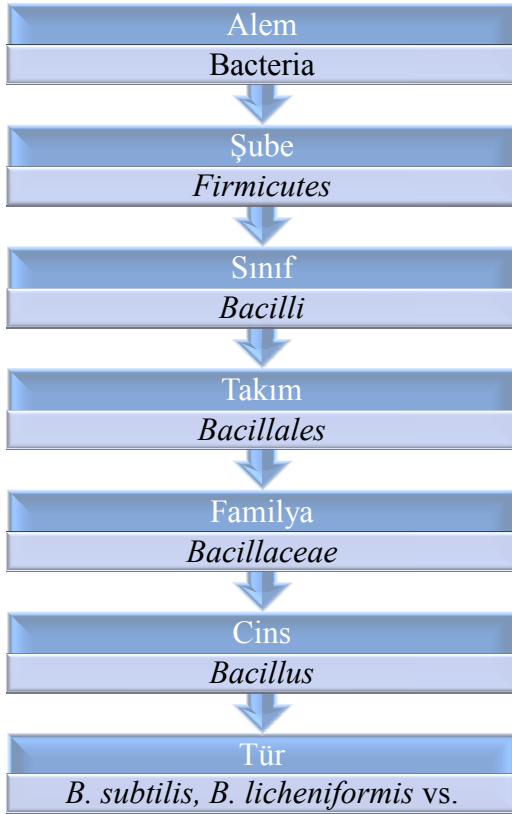
bu bakteriler ekmeğe un, su, maya ve katkı maddeleri gibi hammaddeler yoluyla bulaşmaktadır (Smith vd 2004). Hastalığın oluşmasına, pişirme işlemi sırasında, hastalık etmeni bakterilerin vejetatif formlarının çoğu ölürken, özellikle ekmeğin merkezine yakın kısımlarda sıcaklığın 100 °C'nin altında kalması ve bu bakterilerin sporları aracılığıyla canlılıklarını sürdürmeleri neden olur. Ekmeklerin, bakteri sporlarının çimlenmesine elverişli nem ve sıcaklık koşullarında depolanması ile bakteriler vejetatif hale geçer, çoğalır, amilaz ve peptidaz salgılayarak ekmekte hastalığı başlatır (Volavsek vd 1992). Sporları sayesinde ekmeğin içindeki yüksek sıcaklığa dayanabilen bu bakterinin ürettiği peptidazın da termostabil bir enzim olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada; sünme (rope) hastalığı oluşan ekmeğin içinden izole edilmiş *Bacillus* türleri ile peptidaz üretiminin kısmen optimizasyonu, saflaştırılması ve karakterizasyonu yapılarak, üretilen enzimin endüstriyel kullanım için uygun olup olmadığının değerlendirilmesi, endüstriyel üretim için bazı ön parametrelerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu bağlamda, öncelikle ekmeklerden izole edilmiş *Bacillus* türlerinde enterotoksin taraması yapılmış ve çalışmaya toksin üretmeyen türler ile devam edilerek bu türlerin peptidaz üretme kapasiteleri belirlenmiştir. Peptidaz üretme kapasitesi en yüksek olan *Bacillus* türü kullanılarak peptidaz üretimi için uygun karbon ve azot kaynağı ile çalkalama hızı gibi bazı parametreler tespit edilmiş ve yanıt yüzey yöntemi ile optimizasyonu denemesi yapılmıştır. Bunun için sıcaklık, besiyeri başlangıç pH'sı ve inokülasyon oranı faktör olarak seçilmiştir. Fermentasyon işlemi çalkalamalı inkübatörde engelli erlenlerde gerçekleştirilmiş ve enzim aktivitesindeki artış referans olarak alınmıştır. Fermentasyon süresince belirli aralıklarla örnek alınarak hücre konsantrasyonu, enzim aktivitesi, toplam protein ve glukoz miktarı tayin edilmiş ve ardından üretimin değerlendirilmesi için bazı hesaplamalar yapılmıştır. Optimizasyonu tamamlanan enzim, afinite kromatografisi ile kısmen saflaştırılmış ve enzimin karakterizasyonu yapılmıştır.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

2.1. *Bacillus*'lar Hakkında Genel Bilgi

İlk kez 1872'de Ferdinand Cohn tarafından tanımlanan *Bacillus* cinsi, fizyolojik ve ekolojik özelliklerden, DNA dizilimi ve gen düzenlemesine kadar çok büyük farklılıklar gösteren türleri içermektedir. Bu nedenle sınıflandırılmalarında zorluklar yaşanmış, sadece *Bacillus subtilis* ve *Bacillus anthracis*'i içeren ilk sınıflandırma zaman geçtikçe büyük değişime uğramıştır (Fritze 2004, Slepecky ve Hemphill 2006). *Bacillus* türlerinin gerek fizyolojik özelliklerinin gerekse kültürel ve besinsel özelliklerinin doğru olarak belirlenmesini sağlayacak izolasyon prosesleri ve zenginleştirme metotların uygulanmaya başlanması, bunun yanı sıra bakteri türlerinin tanılanması ve karakterize edilmesi için yeni yöntemlerin geliştirilmesiyle birlikte, *Bacillus*'ların sınıflandırılmasında önemli düzeyde ilerleme sağlanmıştır. *Bacillus* cinsinin sistematik sınıflandırmadaki yeri Şekil 2.1'de verilmiştir (Fritze 2004).



Şekil 2.1. *Bacillus*'ların sistematik sınıflandırmadaki yeri

Bacillaceae familyasından olup doğada çok yaygın olarak bulunan *Bacillus*'lar; aerobik ya da fakültatif anaerobik, Gram-pozitif, çubuk şeklinde bakterilerdir. En önemli ayırt edici özellikleri ise endospor oluşturarak çok çeşitli çevresel stres koşullarına (ısı, radyasyon, kurutma, ekstrem pH değerleri, toksik kimyasallar gibi) karşı dayanıklılık gösterebilmeleridir (Sneath vd 1984). Açlık durumunda oluşan sporeler dormant (hareketsiz ya da uyku hali) haldedir ve bu şekilde canlılığını milyonlarca yıl

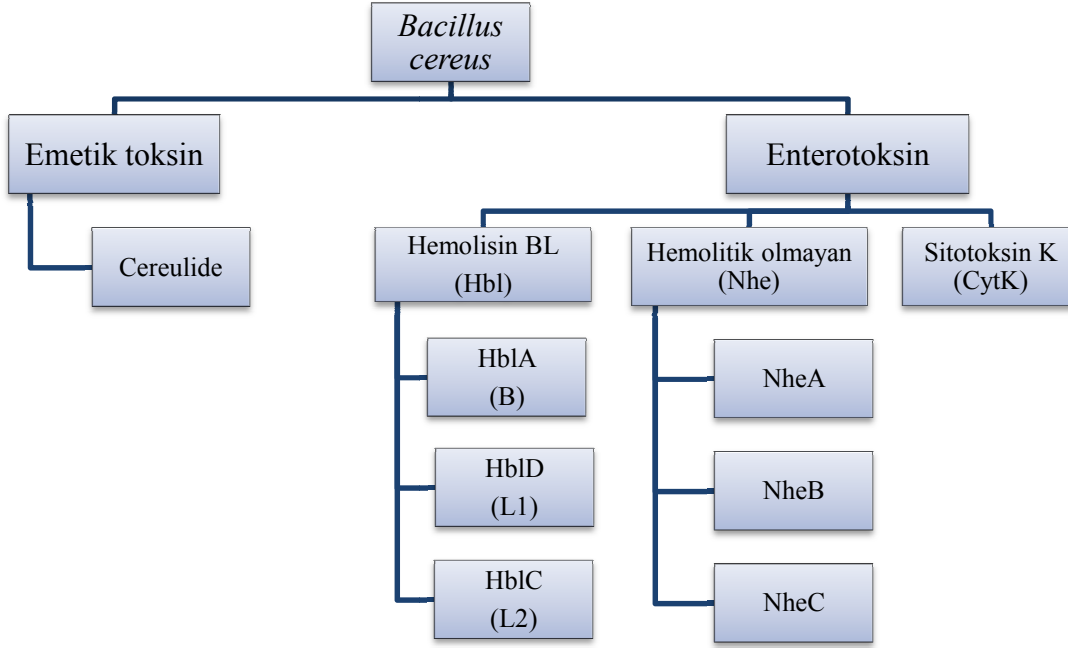
muhafaza etmesi mümkündür (Nicholson vd 2000). Sporlar doğada sadece, germinant olarak isimlendirilen, besin maddelerine cevap olarak çimlenmektedir. Çimlenmeyi tetikleyen besin maddeleri genellikle tek başlarına amino asitler, şekerler ya da purin nükleositleridir. Ancak kombine haldeki besin maddeleri de çimlenmeyi tetikleyebilmektedir. Spor, çevresini sürekli kontrol etmekte ve büyümesi için uygun koşullar oluştuğunda çimlenerek her türlü yaşamsal faaliyetini gerçekleştirebileceği vejetatif hale geçmektedir (Moir 2003, Setlow 2003).

Bacillus cinsi bakteriler, endüstriyel alanda çok fazla kullanılmakta ve bu bakterilere olan ilgi her geçen gün artmaktadır. *B. subtilis* başta olmak üzere bu cinse ait türlerin biyokimyasal, fizyolojik ve genetik özellikleri hakkında fazla bilgi sahibi olunması (uzun zamandır çalışılıyor olması nedeniyle), bu türlerin endüstriyel proseslerde kullanılma oranının artması ve geliştirilmesinin hızlanmasında büyük rol oynamıştır (Schallmey vd 2004). *Bacillus* cinsi, fermantasyonla metabolit ve enzim üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunun en önemli nedeni, bu cinse ait türlerin çoğunun patojen olmaması (GRAS türlerin bulunması), protein ve metabolit salgılamalarının çok iyi olması ve kültüre alınmalarının yani geliştirilmelerinin çok kolay olmasıdır. Patojen olmayan *Bacillus* türlerinden, doğrudan gıdaların ya da gıda ve ilaç imalinde kullanılan enzimlerin üretiminde güvenilir olarak yararlanılabilmektedir (Dahl 1999, van Dijk ve Hecker 2013). Ayrıca antibiyotik, probiyotik bileşen, antagonistik madde, yüzey aktif madde üretiminde ve zenobiyotik degradasyonunda *Bacillus* türlerinden özellikle de *B. subtilis*'den büyük ölçüde yararlanılmaktadır (Fritze 2004).

2.1.1. Toksin Üreten *Bacillus* Türleri

Bacillus cinsi bünyesinde çoğunlukla GRAS olan türler olmasına rağmen, aralarında patojen olan türler de bulunmaktadır ve bunlar genetik olarak da benzerlik arz etmektedir. *Bacillus anthracis* memelilerde antraksa, insektisidal özelliği sebebiyle yaygın olarak kullanılan *Bacillus thuringiensis* ise gıda kaynaklı hastalıklara neden olmaktadır. Ürettiği toksinler aracılığı ile gıda zehirlenmesine neden olan *Bacillus cereus*, ayrıca endoftalmit (gözün iç dokularının iltihaplanması), endokardit (kalp iç zarının iltihaplanması), menenjit (beyin zarının iltihaplanması), periodontit (diş dokularının iltihaplanması), osteomyelit (kemik iliğinin iltihaplanması), yara enfeksiyonları ve septisemi (kan zehirlenmesi) gibi lokal ve sistemik enfeksiyonlara da neden olmaktadır (Schoeni ve Wong 2005). Bunların yanı sıra, daha az bilinmekle birlikte, birçok endüstriyel uygulamada yaygın olarak kullanılan *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. mojavensis*, *B. pumilus* ve *B. fusiformis* gibi türlerin de toksin üretebildiği ve gıda zehirlenmesine neden olabileceği belirlenmiştir (Salkinoja-Salonen vd 1999, Suominen vd 2001, From vd 2005).

Bacillus cereus tarafından üretilen toksinler, diyarel ve emetik sendrom olarak ifade edilen iki farklı tipte gıda zehirlenmesine neden olmaktadır. *Bacillus cereus* toksinlerinin sınıflandırılması Şekil 2.1'de verilmiştir.



Şekil 2.2. *Bacillus cereus* toksinlerinin sınıflandırılması

Diyarel sendrom, bakterinin ince bağırsakta ürettiği, ısıya karşı dayanıklı olmayan enterotoksin aracılığı ile oluşmakta, epitel hücrelere etki ederek bağırsakta aşırı miktarda sıvı salgılanmasına ve bunun sonucu olarak da diyareye neden olmaktadır (Lindbäck ve Granum 2006). Bakterinin kendi gelişim evresi açısından bakıldığında ise enterotoksin, vejetatif büyüme esnasında, temel olarak da logaritmik fazın sonlarında üretilmektedir (Granum vd 1993).

Diyarel hastalıklarda büyük rol oynadığı iddia edilen; hemolitik [hemolisin BL (Hbl)], hemolitik olmayan (Nhe) ve sitotoksin K (CytK) olmak üzere 3 farklı enterotoksin bulunmaktadır. Hbl, membran parçalayıcı bir sistem olup 3 farklı alt bileşenden (B, L₁, L₂) oluşmaktadır. Bunlar arasında HblB bağlayıcı (binding), HblL₁ ve HblL₂ parçalayıcı (litik) bileşen olarak bilinmektedir. Protein yapısındaki bu üç farklı bileşen, birbirinden bağımsız olarak salgılanmaktadır ve toksinin maksimum biyolojik aktivite göstermesi için üçüne de gerek duyulmaktadır. Nhe de Hbl gibi birbirlerinden bağımsız olarak salgılanan üç alt bileşenden (A, B, C) oluşmaktadır ve neredeyse bütün *B. cereus* suşları tarafından üretilmektedir. NheB, enterotoksin kompleksinin bağlayıcı bileşenidir. Maksimum toksik aktivitenin oluşabilmesi için NheA, NheB ve NheC'nin molar oranlarının 10:10:1 olması gerekmektedir, NheC'nin oranının artması Nhe'nin toksik aktivitesinde azalmaya yol açmaktadır. CytK ise tek bileşenli, hücre zarında β-fiçisi (β-barrel) yapısında por oluşturan, hemolitik bir toksindir (McKillip 2000, Senesi ve Ghelardi 2010).

Enterotoksin T (bceT) ve Enterotoksin FM isimli, tek bileşenli iki enterotoksinin daha varlığı öne sürülmüştür. Bunlardan bceT geni ilk olarak Agata vd (1995) tarafından tanımlanmış ve gıda kaynaklı diyareye neden olabileceği bildirilmiştir. Ancak daha sonra bu gen ile çalışan diğer araştırmacılardan Choma ve Granum (2002),

bceT geninin ya bilinenden farklı bir enterotoksik aktivitesi olduğunu ya da hiç olmadığını savunmuş; Hansen vd (2003) ise Agata vd'nin (1995) belirlediği gen diziliminin yalnızca bir kısmının kendi belirledikleri ile homoloji gösterdiğini, bceT için tespit edilen enteroksik aktivitenin ya füzyon genden ya da ligasyon sırasında gerçekleşen hatadan dolayı *B. anthracis*'in açık okuma alanı ile homoloji gösteren fragmandan kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir. Enterotoksin FM1 geni ise Asano vd (1997) tarafından *B. cereus* FM1 ve *B. thuringiensis*'den klonlanmıştır. Ancak bu gene ait dizilimin *B. subtilis*'in hücre duvarındaki hidrolazın dizilimi ile homoloji gösterdiği belirlendiğinden muhtemelen enterotoksin olmadığı vurgulanmıştır (Lindbäck ve Granum 2006).

B. cereus'un neden olduğu gıda zehirlenmesi türlerinden olan emetik sendrom ise "cereulide" adı verilen, küçük, ısı ve aside karşı dayanıklı, sulu çözeltilerde çözünmeyen, halkalı yapıdaki dodekadepsipeptid aracılığı ile oluşmaktadır (Ehling-Schulz vd 2004, Kim vd 2010). Vejetatif büyüme esnasında gıdada üretilen toksin, kararlı yapısı nedeniyle gıdanın tüketilmesinden sonra mide asidi ve intestinal proteolitik enzimlerden de etkilenmemekte ve on iki parmak bağırsağında 5-HT₃ reseptörüne bağlanarak bulantı ve kusmaya neden olmaktadır (Granum ve Lund 1997). Cereulide'in vakuol oluşumuna neden olduğu ve vakuolün de mitokondrial şişmeye yol açtığı, ayrıca solunumun kontrolünü yavaşlattığı bildirilmiştir (Mikkola vd 1999, Schoeni ve Wong 2005).

2.2. Enzimler Hakkında Genel Bilgi

2.2.1. Enzim biliminin kısa tarihçesi

Yaşam, bir dizi kimyasal reaksiyondan oluşmaktadır. Kendi halinde çok yavaş ilerleyebilen ancak yaşamın devamı için gerekli olan bu reaksiyonların çoğu enzim adı verilen, biyolojik katalistler aracılığıyla hız kazanmaktadır (Aehle 2004). Enzimlerin çoğu, katalitik özelliklerini canlı hücreden ekstrakte edilip ayrıldıktan sonra da göstermektedir.

Dolayısıyla bu özellik enzimlerin ticari amaçla kullanımını mümkün kılmaktadır. Enzimlerin insanlar tarafından kullanılması medeniyet tarihi kadar eskidir. Her ne kadar bilinçli olarak yapılmasa da ilkel toplumlardaki yiyecek ve içecek üretimi, giysi amacıyla derilerin tabaklanması gibi önemli uğraş alanları tamamen enzim aktivitesine dayalı işlemlerdir (Polaina ve MacCabe 2007). Enzimlerin ticari olarak kullanımına ilişkin bilinen en eski kaynağın şarap yapımını tanımlayan Hammurabi Kanunları (M.Ö. 2100) olduğu (Copeland 2000), Homeros'un İlyada destanında peynir yapımı için çocuk midesinin kullanıldığından bahsedildiği (Buchholz vd 2005) ayrıca enzimatik dönüşüm prosesleri olan sirke, ekmek, peynir, alkollü içecek üretimi ve etlerin yumuşatılmasına ilişkin eski kaynakların da olduğu bildirilmektedir. Ancak bu kaynaklar sistematik ve kimyasal temelli çalışmalardan ziyade, ampirik gözlemlere dayanan üretim yöntemlerini yansıtmaktadır (Copeland 2000).

Copeland (2000), Aehle (2004) ve Buchholz vd'nin (2005)¹ bildirdiğine göre enzimlerle ilgili olarak daha sistematik ve bilinçli çalışmalar 18. yy.'da yapılmaya başlanmıştır. Réaumur (1683-1757) tarafından etin sindirimi ile ilgili olarak yapılan ilk çalışmalar daha sonra Spallanzani (1729-1799) tarafından geliştirilmiş ve mide öz suyundaki aktif madde Schwann (1836) tarafından pepsin olarak adlandırılmıştır. Payen ve Persoz, 1833 yılında, çimlendirilmiş arpanın nişastayla muamelesi sonucu dekstrin ve şeker açığa çıktığını belirlemiş ve aktif maddeyi diyastaz olarak isimlendirmişlerdir. Bu çalışmanın ardından diyastaz (amilaz), önemli bir çalışma konusu haline gelmiştir. Maya ekstraktlarının katalizini çalışan Kühne, 19. yy.'ın sonlarında, Yunanca'da "**maya içinde**" anlamına gelen "**enzymos**" kelimesinden "**enzyme-enzim**" terimini türetmiş ve bu terim literatürde kullanılmaya başlanmıştır.

Enzimlerin doğası ve nasıl çalıştıkları ancak 19. yüzyılda biyokimyanın gelişmesi ile birlikte aydınlanmaya başlamıştır. 20. yüzyılda enzimlerin protein yapısında olduklarının belirlenmesi, saflaştırma ve analiz tekniklerinin ortaya koyulması, enzimlerin endüstriyel olarak üretilmesi ve kullanılmasını kolaylaştırmıştır. Enzimler saf olarak elde edilmeye başlandıktan sonra enzimatik reaksiyonların mekanizmaları, anahtar kilit modeli, substrat spesifikliğı, matematiksel modelleme gibi konular üzerine çalışılmış ve enzimlerle ilgili daha net bilgiler literatüre kazandırılmıştır.

1960'lar enzim sanayinde büyük etki bırakan iki önemli buluşa tanıklık etmiştir. Bunlardan birincisi nişastadan glukoz üretimini katalizleyen glucoamilazın ticari olarak üretilmesidir. Glukoz eldesi bu şekilde, asit hidrolizi ile kimyasal olarak üretilene göre çok daha verimli olmuştur. İkinci önemli buluş ise enzim içeren ilk deterjanın üretilmesidir. Genetik mühendisliğinin 1980'lerde gelişmesiyle birlikte yeni enzimler üretilmiş, enzim sanayinde milyar dolarlık genişleme olmuştur. Son zamanlarda protein kimyası ve moleküler tekniklerdeki gelişmeler enzimlerin yapı ve fonksiyonları ile ilgili çalışmalara anlam katmıştır (Polaina ve MacCabe 2007).

2.2.2. Enzimlerin endüstrideki yeri ve önemi

Enzimlerin kimyasal reaksiyonları canlı hücre dışında da katalizleyebildiğinin bilimsel olarak tespitinden sonra, enzimler endüstriyel ölçekte yoğun olarak kullanılmaya başlanmıştır. Enzimlerden gıda, yem, ilaç, kimyasal madde, hijyen ve çevre teknolojileri gibi doğrudan insani tüketim malzemelerinin üretim proseslerinde yararlanıldığı kadar analitik ve tanı amaçlı olarak da yararlanılmaktadır (Buchholz vd 2005).

Hücrelerde oldukça önemli metabolik görevleri olan enzimler, çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere gündelik ve ekonomik hayata girmiştir. Bugüne kadar 2000'den fazla enzim tanımlanmış ve bunlardan yaklaşık 100 tanesi ticari olarak kullanıma uygun bulunmuştur. Ticari olarak kullanılan enzimlerin yaklaşık %60'ını peptidazlar, %28'ini karbohidrazlar, %3'ünü lipazlar, %10'unu ise diğer enzimler oluşturmaktadır. Karbohidrazlar arasında α -amilaz %13'lük pay ile önemli bir yer tutmaktadır (Kıran vd 2006).

¹ Enzim tarihçesi ile detaylı bilgiye bu kaynaklardan ulaşılabilir.

Peptidazlar en önemli endüstriyel enzim gruplarından birini oluşturmaktadır. Bu enzimler deterjan, deri, gıda, ilaç sanayi, remediasyon ve tıbbi uygulamalar gibi pek çok alanda kullanılmaktadır (Gupta 2002b). Ekmek yapımında, etlerin yumuşatılmasında, kuru temizlemede leke giderme amacıyla, benzer şekilde çamaşır deterjanlarında, tıpta yaraların temizlenmesinde, tekstil sanayinde haşıl gidermede ve daha bir çok alanda peptidazlardan yararlanılabilmektedir (Madigan ve Martinko 2006).

Enzim sektörü, yıllık 2 milyar Avro'nun üzerindeki cirosuyla ekonomik açıdan oldukça önemli bir sektör haline gelmiştir. Sadece Avrupa'da yıllık 900 ton peptidazın deterjanlarda kullanılmak üzere üretilmesi sektörün önemini açıklar niteliktedir. Yüksek verimli enzimler, sürdürülebilir biyoteknoloji bazlı ürünler olarak geleneksel kimyasal proseslere alternatif sağlamada kilit rol oynamaktadır. Verimli enzimlere karşı duyulan ihtiyacın sürekli artması ve bunları en ekonomik şekilde elde edebilme arzusu, enzim üretimini en iyi ölçüde sağlayacak organizmaların bulunması ya da geliştirilmesi konusunu gündeme getirmiştir (van Dijl ve Hecker 2013).

Dünya enzim pazarı ile ilgili olarak 2008 yılında hazırlanan bir raporda sunulan, uygulama alanına göre dünya enzim pazarının durumu Çizelge 2.1'de verilmiştir (Thakore 2008). Rapor, 2012 yılında güncellenmiş; dünyadaki endüstriyel enzim pazarının, 2009 yılında 3.1 milyar dolar değerinde iken 2010'da 3.6 milyar dolara ulaştığı ve yıllık %9.4'lük bir büyüme oranı ile 2016'da 6 milyar dolara ulaşacağını tahmin edildiği bildirilmiştir. Yine bu rapora göre gıda ve içecek enzimleri sektördeki en büyük payı oluşturmakta ve bunu teknik enzimler takip etmektedir (Dewan 2012).

Çizelge 2.1. Uygulama alanına göre dünya enzim pazarı (Milyon \$)

Uygulama Alanı	2005	2006	2007	2012	Yıllık büyüme oranı (%) 2007-2012
Teknik enzimler	1075	1105	1140	1355	3.5
Gıda enzimleri	775	800	830	1,010	4.0
Hayvan yemi enzimleri	240	260	280	375	6.0
Toplam	2090	2165	2250	2740	4.0

Ülkemizde enzim üretimini gerçekleştiren sınırlı sayıda firma bulunmaktadır. İnternet üzerinden yapılan tarama ile yalnızca üç firmaya ulaşılabilmektedir. İstanbul'da 1977 yılında kurulan Orba Biyokimya San. ve Tic. A.Ş. ilk olarak ekmek üretiminde kullanılmak üzere α -amilaz üretmiş, zamanla yem, tekstil ve deri sanayine yönelik enzim üretimi de gerçekleştirmiştir (Anonim 2014a). Belice Kimya 2005 yılında Gaziantep'de kurulmuş olup tekstil sanayinde kullanılan bazı enzimlerin üretimini yapmaktadır (Anonim 2014b). ABP ve Mühlenchemie ortaklığı ile 2013 yılında İzmir'de kurulan üretim tesisinde ise özellikle un sanayi için iyileştirici enzim üretimi gerçekleştirilmektedir (Anonim 2014c). Türkiye İstatistik Kurumu'nun 2013 yılı verilerine göre "albuminoid maddeler, değişikliğe uğramış nişasta esaslı ürünler, tutkallar, enzimler" grubunun ihracat ve ithalat miktarları, sırasıyla, 197 milyon dolar ve 527 milyon dolardır (Anonim 2014d).

2.2.3. Enzimlerin yapısı ve enzim üretimi

Kimyasal reaksiyonların hızını artırarak kendileri değişmeksizin reaksiyondan çıkan enzimlerin birçoğu saf proteindir. Buna karşılık birçok enzim de katalitik aktivite için protein yapıya (apoenzim) ek olarak bir protein olmayan kofaktöre (koenzim, prostetik grup veya metal iyonları) gereksinim duymaktadır. Apoenzim ve kofaktör birlikte haloenzim olarak adlandırılmaktadır. Prostetik gruplar ve koenzimler ise protein olmayan küçük moleküllerdir (Tunail 2009).

Enzimler, bitkisel ya da hayvansal dokulardan elde edilmekte ya da mikroorganizmalar aracılığı ile üretilmektedir. Ancak miktar ve çeşitlilik açısından düşünüldüğünde mikroorganizma kaynaklı üretim birinci sırayı alırken, bunu sırasıyla bitkisel ve hayvansal kaynaklı üretim takip etmektedir. Bitkisel kaynaklı ticari enzimler papain, bromelain, fisin gibi proteolitik enzimlerle, lipoksigenaz gibi soyadan elde edilen spesifik, diğer bazı enzimlerdir. Hayvansal kaynaklı enzimler ise pepsin ve rennin gibi proteinazlardır. Önceleri, güvenlik ve mikroorganizma ya da toksinlerinin kontaminasyonu gibi korkular nedeniyle bitkisel ve hayvansal kaynaklı üretim mikrobiyal üretime tercih edilmiş ancak bu kaynakların kısıtlı olmasına bağlı olarak düzenli arzın sağlanamaması ve artan enzim talebini karşılayamaması gibi nedenlerle mikrobiyal enzim uygulamaları artmaya başlamıştır (Leisola vd 2010).

Enzim üretim prosesi, kaynağa ve enzimin lokalize olduğu yere bağlı olarak değişiklik arz etmektedir. Bitkisel ve hayvansal orijinli enzimler ilgili doku ya da sıvılardan basit bir ekstraksiyonla elde edilirken, mikrobiyal enzimler fermentasyonla üretilip fermentasyon ortamından ya direkt ekstraksiyonla (ekstraselüler enzim) ya da hücre parçalanması sağlandıktan sonra (intraselüler enzim) ekstraksiyonla elde edilmektedir (Illanes 2008).

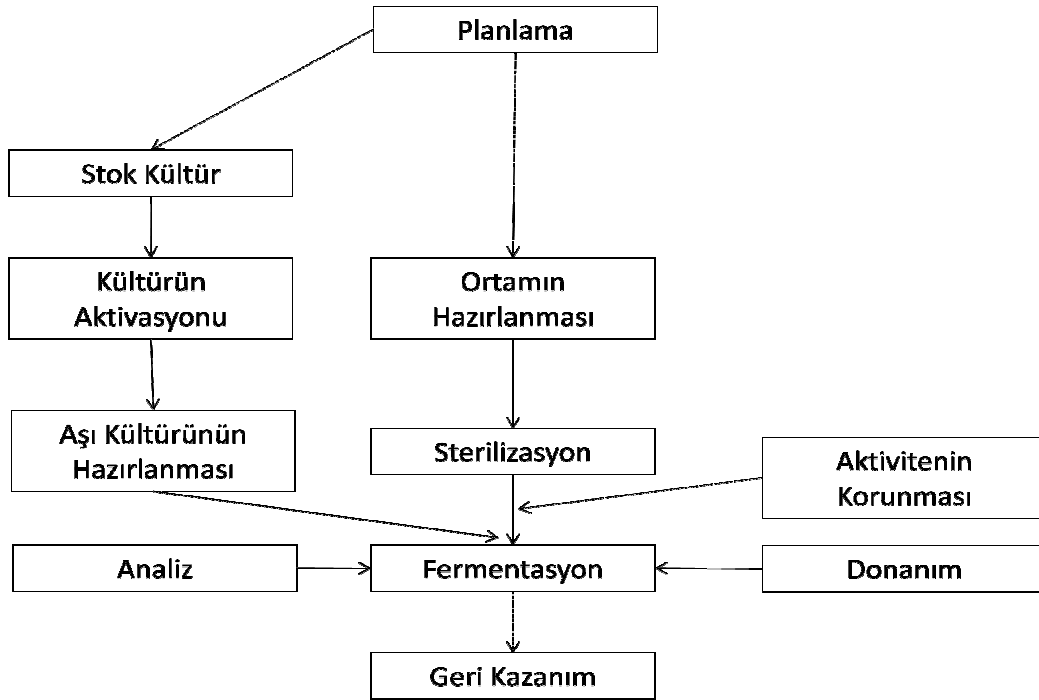
2.2.3.1. Mikrobiyal enzim üretimi

Mikrobiyal enzim üretim prosesinde, hangi enzimin üretileceğine karar verildikten sonra uygun bir suş seçilir, suşun geliştiği kültür ortamı ve üretim koşullarının optimizasyonu yapılır, üretim ortamından enzimin kazanım prosesi optimize edilir ve gerekli ise saflaştırma işlemi yapılır. Moleküler tekniklerle enzim üretimi geliştirilmek ya da artırılmak isteniyorsa, suş seçiminin ardından genetik mühendisliği teknikleri ile suşun enzim üretme yeteneği olumlu yönde değiştirilmektedir (Pazarlıoğlu 1997).

Mikrobiyal enzim üretimi için ilk yapılacak işlem uygun suşun seçilmesi ve geliştirilmesidir. Ancak suş seçimi yapılırken bazı faktörlerin göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Öncelikle seçilecek suşun GRAS statüsünde olması önem arz etmektedir. Özellikle enzim gıda sanayinde ve medikal uygulamalarda kullanılacaksa bu hususun göz ardı edilmesi söz konusu değildir (Waites vd 2001). Bir diğer husus, geri kazanım ve saflaştırma aşamalarının daha basit olması açısından ekstraselüler enzim üretimi intraselüler enzim üretiminden daha kolay olmaktadır. Dolayısıyla ekstraselüler enzim üreten suşun seçilmesi avantaj sağlayabilmektedir. Ayrıca seçilen suş, arzu edilen enzimi makul bir sürede maksimum miktarda üretebilmeli ancak diğer metabolitler minimum oranda oluşmalıdır (Leisola vd 2010).

Mikrobiyal enzim üretimindeki ikinci adım fermentasyon yönteminin seçilmesi ve fermentasyon ortamının iyileştirilmesidir. Üretim için katı kültür fermentasyonu da kullanılabilir. Ancak mikrobiyal enzimler temel olarak kontrollü koşullar altında derin kültür fermentasyonu ile üretilmektedir. Ekonomik olarak en iyi sonuca ulaşabilmek için fermentasyon prosesinin mümkün olan en etkin şekilde düzenlenmesi gerekmektedir (Pazarlıoğlu 1997, Waites vd 2001).

Fermentasyonun gerçekleştirileceği kültür ortamı, mikroorganizmanın gelişebileceği tüm besin maddelerini yeterli oranda içermeli, kullanılan besin maddeleri kolay bulunabilir olmalıdır. Ayrıca sıcaklık, pH, karıştırma hızı, O₂ transferi, inokulum yaşı, inokulum yoğunluğu, fermentasyon süresi, metal iyonu gibi fermentasyon parametreleri de optimize edilebilecek faktörler arasındadır. Optimizasyon çalışmaları ile üretim miktarının artırılması için maksimum üretim miktarı-minimum maliyet dengesi kurulmaya çalışılmaktadır (Nadeem vd 2008). Peptidaz üretimini artırmak amacıyla bir yandan istatistiksel olarak kültür ortamının optimizasyonu ve genetik müdahalelere dayalı ölçümlerin, diğer yandan yeni suşların aranmasına yönelik çalışmaların yapıldığı bildirilmektedir (Jaswal vd 2008). Şekil 2.3’de bir fermentasyon prosesinin temel işlemleri gösterilmiştir.



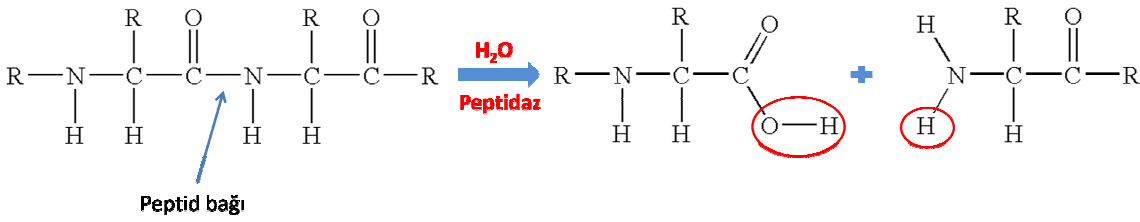
Şekil 2.3. Bir fermentasyon prosesinin temel işlemleri (Aehle 2004)

Enzimin saflaştırılması ve sahip olduğu karakteristik özelliklerin belirlenmesi yani nitelendirilmesi, enzim üretiminin ardından yapılması gereken en önemli işlem olmaktadır. Enzimin nitelendirilmesinde kullanılacak birçok yöntem olmakla birlikte, seçilecek yöntemi enzimin kullanılacağı yer, daha geniş bir ifade ile çalışmanın amacı belirlemektedir. Enzimler için genellikle araştırılan ana konular spesifik aktivite

taini, substrat konsantrasyon aralığı ve spesifikliğinin belirlenmesi, kinetik özelliklerin belirlenmesi, sıcaklık, pH gibi bazı faktörlerin etkisinin tespit edilmesidir. Ancak amaca yönelik olarak fonksiyonel özellikler daha detaylı incelenmektedir (Zihnioğlu 2007).

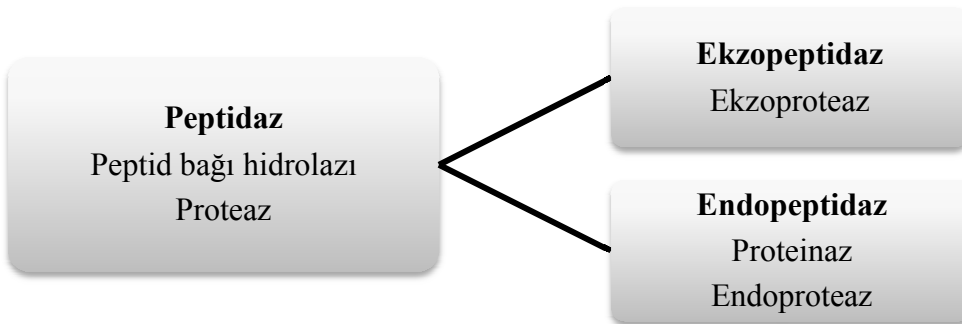
2.3. Peptidazlar

Peptidazlar, su yardımıyla peptid bağını parçalayarak protein ya da büyük polipeptidleri kısa peptitlere ya da serbest amino asitlere dönüştüren bir enzim grubudur (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Peptid bağının hidrolizi

Bu enzimler ilk zamanlarda proteolitik enzim olarak isimlendirilmiş fakat zamanla isimlendirmede değişiklikler olmuştur. Barrett'in (2001) bildirdiğine göre Alman literatüründe 19. yy.'ın sonlarında "proteolitik enzim" yerine proteinler üzerine etki eden ya da protein fragmanlarını ileri düzeyde parçalayabilen tüm hidrolazları kapsayan "proteaz" terimi kullanılmaya başlanmıştır. Daha sonra, 1930'larda, farklı türdeki proteaz aktivitelerini ayırtetme ihtiyacı hissedilmiş ve birbirlerinden bağımsız olmak üzere Almanya ve Amerika Birleşik Devletleri'nde iki yeni terimin kullanımı önerilmiştir. Almanya'daki araştırmacılar proteinler üzerine etki eden enzimleri "proteinaz"; tercihen oligopeptidler üzerine etki eden, diğer bir deyişle peptid zincirinin sadece uç kısımlarında aktivite gösterebilen enzimleri de "peptidaz" olarak isimlendirmişlerdir. Fakat daha sonra Amerika Birleşik Devletleri'ndeki araştırmacılar "peptidaz" terimini genel bir ifade olarak peptid bağı hidrolazları için kullanmış ve bunu kendi arasında ikiye ayırarak endopeptidaz ve ekzopeptidaz ifadelerine yer vermişlerdir ve günümüzde de kullanılan ifadeler bu şekildedir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Peptidazların genel olarak isimlendirilmesi

NC-IUBMB, İnsan Geni İsimlendirme Komitesi ve MEROPS veritabanı, peptid bağımlı hidrolize eden her enzim için, “peptid hidrolazı” ile eş anlamlı olarak “peptidaz” kullanılmasını önermektedir (Rawlings vd 2007). Şekil 2.5’te birbiriyle eş anlamlı olarak kullanılabilen terimler verilmiştir. Ancak NC-IUBMB tarafından önerilen, koyu olarak yazılan terimlerin kullanılmasıdır (Anonymous 2014a). Ayrıca dikkat edilmesi gereken önemli bir nokta da, her proteolitik enzimin peptidaz olmadığıdır. Proteolitik bir enzimi peptidaz olarak ifade edebilmek için enzimin hidroliz reaksiyonu gerçekleştirmesi gerekmektedir.

2.3.1. Peptidazların sınıflandırılması

Peptidazlar dört farklı şekilde sınıflandırılmaktadır (Anonymous 2014b):

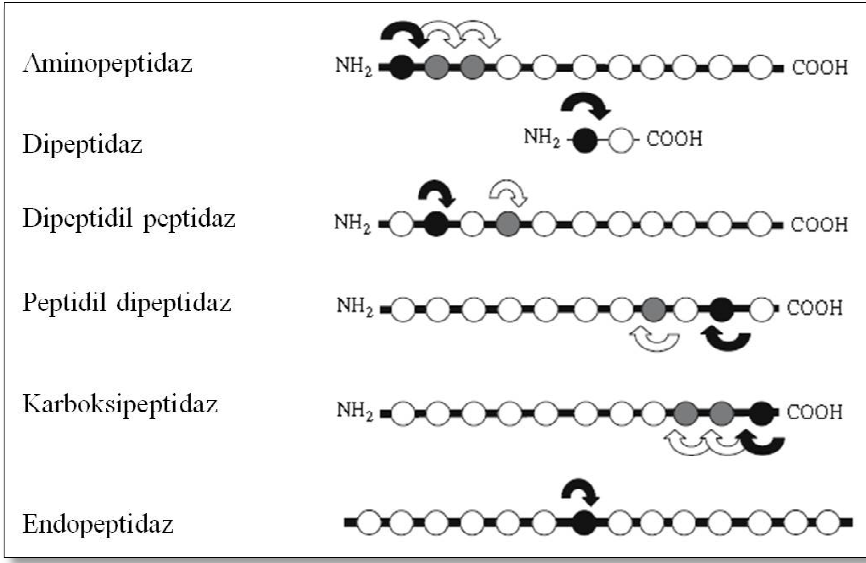
- Katalizledikleri reaksiyonun türüne göre
- Kimyasal kataliz mekanizmalarına göre
- Moleküler yapı ve homolojilerine göre
- Optimum pH düzeylerine göre

2.3.1.1. Peptidazların katalizledikleri reaksiyonun türüne göre sınıflandırılması

Bu sınıflandırma, enzimin etki mekanizması göz ardı edilerek, enzimin meydana getirdiği kimyasal değişikliğe göre yapılmaktadır. Enzimin isminde kofaktör ya da prostetik grup bulunmaz. Herhangi bir enzimin katalizlediği reaksiyon tanımlanmadığı sürece, enzimin sistematik olarak isimlendirmesi yapılamamaktadır (Aehle 2004).

Bu tip sınıflandırma NC-IUBMB tarafından da benimsenmiş ve sistematik sınıflandırma oluşturulmuştur. Bu grup enzimler, hidroliz reaksiyonu gerçekleştirdiklerinden hidrolazlar (EC 3.) grubu altında ve peptid bağımlı hidrolizini katalizlemeleri sebebiyle de peptid bağı üzerine etki eden enzimler alt grubunda (EC 3.4) yer almaktadırlar (Anonymous 2009). Prensipte olarak peptidazlar peptid bağı üzerinde etkili olsa da her peptidaz her peptid bağımlı parçalayamamakta, bağımlı pozisyonuna karşı spesiflik göstermektedir (Anonymous 2014b).

Peptidazlar katalizledikleri reaksiyonlara göre polipeptid zincirinin sadece uç kısımlarında faaliyet gösterebilen **ekzopeptidazlar** ve polipeptid zincirinin iç kısımlarında aktivite gösteren **endopeptidazlar** olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Bunlar da kendi aralarında aminopeptidazlar, karboksipeptidazlar, omega peptidazlar, dipeptidil peptidazlar, tripeptidil peptidazlar, peptidil dipeptidazlar ve dipeptidazlar olarak ayrılmaktadır. Ekzopeptidazlardan polipeptid zincirinin amino (N)-ucunda aktif olanlar (aminopeptidazlar) faaliyetleri sonucu serbest amino asit, dipeptid ya da tripeptid oluşturabilmektedir. Serbest karboksil (C)-ucunda aktif olanlar (karboksipeptidazlar) ise faaliyetleri sonucunda serbest amino asit ya da dipeptid açığa çıkarmaktadır. Peptidazların katalizledikleri reaksiyonların şematik gösterimi Şekil 2.6’da gösterilmiştir. Şekilde siyah oklar ilk parçalanma yerine, beyaz oklar ise devamında gelen parçalanma yerlerine işaret etmektedir.



Şekil 2.6. Peptidazların katalizledikleri reaksiyonların şematik gösterimi (Rawlings vd 2007)

Peptidazların katalizledikleri reaksiyona göre sınıflandırılmalarındaki en önemli kısıtlama, bu sınıflandırmanın peptidazlar arasındaki evrimsel ilişkiyi yansıtmamasıdır. Çünkü peptidazların spesifiklikleri oldukça komplekstir. Birbiriyle ilişkili peptidazlar farklı substrat spesifikliği gösterebilirken, ilişkili olmayan peptidazlar neredeyse aynı substrat spesifikliği gösterebilmektedir. Ancak bu şekilde sınıflandırıldıklarında bunları aynı grup içinde değerlendirilme zorunluluğu doğmaktadır. Bunun yanı sıra benzer reaksiyonları katalizleyen ve prensipte aynı ismi kullanabilmelerine rağmen; farklı genlerin ürünleri oldukları, farklı promotorlarla ifade edildikleri ya da farklı hücre tipi veya hücre bölümlerinde lokalize oldukları ve oldukça farklı biyolojik fonksiyon gösterdikleri için ayırt edilmeleri gereken birçok peptidaz bulunmaktadır (Barrett 1999). Ayrıca bu sistem ile endopeptidazların da sınıflandırılmasında, katalizlenen reaksiyonu tanımlamak zor olduğundan, güçlükler yaşanmaktadır. Hem karboksipeptidazlar hem de endopeptidazlar için (substrat tercihinin kataliz mekanizması ile ilgisi olsa bile) kataliz mekanizması, bu grupları alt bölümlere ayırmada kullanılmıştır. Fakat bu durum, farklı kataliz mekanizmasına sahip peptidazları da içeren diğer alt-alt gruplarla uyum sağlamamaktadır (Rawlings vd 2007). Peptidazların sistematik sınıflandırmadaki yerleri Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Peptidazların sistematik olarak sınıflandırılması ve enzim komisyonu (EC) kodları

Enzim	EC kodu
Peptidazlar	EC 3.4
Ekzopeptidazlar	EC 3.4.11-19
Aminopeptidazlar	
Tek amino asit oluşturan peptidazlar	EC 3.4.11
Dipeptidil peptidazlar	EC 3.4.14
Tripeptidil peptidazlar	EC 3.4.14
Karboksipeptidazlar	
Tek amino asit oluşturan peptidazlar	EC 3.4.16-18
Dipeptidazlar	EC 3.4.13
Peptidil dipeptidazlar	EC 3.4.15
Serin karboksipeptidazlar	EC 3.4.16
Metalokarboksipeptidazlar	EC 3.4.17
Sistein karboksipeptidazlar	EC 3.4.18
Omega peptidazlar	EC 3.4.19
Endopeptidazlar	EC 3.4.21-25 ve EC 3.4.99
Serin endopeptidazlar	EC 3.4.21
Sistein endopeptidazlar	EC 3.4.22
Aspartik endopeptidazlar	EC 3.4.23
Metaloendopeptidazlar	EC 3.4.24
Treonin endopeptidazlar	EC 3.4.25
Katalitik mekanizması tanımlanmamış olanlar	EC 3.4.99

*Çizelge Anonymous'a (2014a) göre hazırlanmıştır

Peptidazlarla ilgili en son yayımlanan kitaplardan birinde “katalizlenen reaksiyonun türüne göre sınıflandırılması” ifadesi yerine “spesifikliğe göre sınıflandırma” ifadesi kullanılmıştır (Rawlings 2013).

2.3.1.2. Peptidazların kimyasal kataliz mekanizmalarına göre sınıflandırılması

Kataliz mekanizmasına göre (ya da katalitik tipe göre) sınıflandırma, peptidazın aktif bölgesinde bulunan ve katalizden sorumlu kimyasal grup/gruplara göre yapılmaktadır (Barrett 1999). Katalitik tip, peptidazların en önemli özelliklerinden biridir. Peptidazın çalışabileceği pH'nın ve peptidazı inaktive edecek inhibitörün belirlenmesinde katalitik tipin önemli rolü bulunmaktadır (Rawlings 2013). Peptidazlar bu sisteme göre sınıflandırıldığında **serin (S)**, **sistein (C)**, **treonin (T)**, **aspartik (A)**, **glutamik (G)** ve **metalo (M)** peptidazlar gibi gruplar oluşmaktadır (Anonymous 2014). Literatürde, genel olarak, katalitik tipine göre 6 grup peptidazın olduğu ve **katalitik tipi bilinmeyen peptidazların (U)** da 7. grup olabileceği bildirilmektedir. MEROPS veritabanında (Anonymous 2014b) verilen sınıflandırma proteolitik enzimlere göre yapıldığından asparajin katalitik grubunun da olduğu görülmektedir. Ancak her proteolitik enzimin peptidaz olmadığı göz ardı edilmemelidir. Asparajin kimyasal grubuna sahip proteolitik enzimlerin hidrolaz değil liyaz oldukları bildirilmiştir (Rawlings vd 2011).

Peptidazların gerçekleştirdiği hidroliz reaksiyonu genel olarak asit-baz reaksiyonu olarak tanımlanmaktadır. Bazı peptidazlarda substrattaki peptid bağı üzerine olan nükleofilik saldırı sonucunda açıl ara ürünü olarak bilinen geçici bir kompleks oluşmaktadır. Bu ara ürün hızla yıkılmakta ve peptidaz bünyesindeki, genel baz olarak bilinen, bir kimyasal gruba proton transferi gerçekleşmektedir. Bunun sonucu olarak da bir su molekülü, peptid bağını hidrolize etmektedir. Söz konusu nükleofilik saldırı farklı kimyasal gruba sahip, yani farklı katalitik tipteki peptidazlarda farklı şekilde gerçekleşmektedir. Bu nedenle farklı katalitik tipteki 6 peptidaz grubu, kendi içlerinde “nükleofili protein olan” ve “nükleofili su molekülü olan” peptidazlar olarak gruplandırılabilir. Bu gruplandırmaya göre serin, sistein ve treonin peptidazlar nükleofili protein olan; aspartik, glutamik ve metalopeptidazlar ise nükleofili su molekülü olan peptidazlar grubunda yer almaktadır (Rawlings 2013). Nükleofili su molekülü olan peptidazlarda peptid baının hidrolizi sırasında ara ürün oluşmamaktadır. Farklı katalitik tipteki peptidazların bazı özellikleri Çizelge 2.3’te verilmiştir.

Bilinen proteolitik enzimlerin yaklaşık üçte birinin serin peptidaz olduğu bildirilmektedir (Page ve Cera 2008). Serin peptidazların çoğunun katalitik aktivitesi, aktif bölgelerindeki üçlü bir yapıdan (serin-histidin-aspartik asit) kaynaklanmaktadır. Bu üçlü grupta serin, nükleofil (nükleofilik hidroksil grubunu taşır); histidin genel baz olarak faaliyet göstermektedir. Aspartik asidin ise histidinin yapısındaki imidazol halkasını yönlendirdiğine inanılmaktadır. Farklı serin peptidazlarda bu üç aminoasitin dizilişi farklı olduğundan, kataliz mekanizmalarında da farklılık gözlenebilmektedir (Polgár 2005).

Sistein peptidazların temel yapısında sistein ve histidin ikili olarak bulunmaktadır. Sistein nükleofil, histidin ise genel baz olarak faaliyet göstermektedir. Ancak bu enzimlerin çoğunda üçüncü ve dördüncü gruplar da bulunmaktadır. Asparajin, aspartat veya glutamat olabilen üçüncü grubun, histidinin yapısındaki imidazol halkasını yönlendirmede; dördüncü grubun (glutamin, asparajin ya da tirozin) ise açıl ara ürününün stabilize edilmesinde önemli olduğu düşünülmektedir (Rawlings 2013).

Treonin peptidazların amino-(N) ucunda treonin bulunduğu ve bu treoninin de hem nükleofil (yan gruplardaki hidroksil sayesinde) hem de genel baz (amino grubu nedeniyle) olarak faaliyet gösterdiği tahmin edilmektedir (Rawlings 2013).

Tamami endopeptidaz olan aspartik peptidazlar ya selüler ya da homodimer enzim yapısındadır. Bu enzimde aktive olmuş su molekülü iki aspartat molekülü tarafından bağlanmakta, aspartik asit su molekülü için ligand görevi görmekte ve su molekülünü aktive etmektedir. Aspartat molekülleri çoğunlukla aspartik asit-treonin/serin-glisin-treonin/serin motifi şeklinde bulunmaktadır ve karboksil grupları için uygun ortamın oluşturulması ve korunmasında önemli rol oynamaktadır (Wlodaver vd 2013).

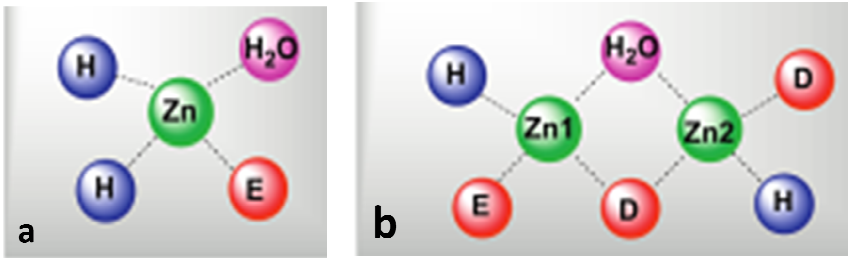
Çizelge 2.3. Farklı katalitik tipteki peptidazların bazı özellikleri

Katalitik tip	Katalizden sorumlu kimyasal grup	İnhibitörler	Örnek enzim
Serin peptidazlar	Serin Aktif bölgede tek başına bulunabildiği gibi, çoğu enzimde özellikle histidin ve aspartik asit gibi aminoasitlerle birlikte ikili ya da üçlü olarak bulunur	Diisopropil fluoro fosfat (DFP), Fenilmetan sulfonil florid (PMSF), 3,4-dikloroisokumarin (DCI)	Tripsin, Kimotripsin, Subtilisin, Laktoferrin
Sistein peptidazlar	Sistein Sistein ve histidin ikili olarak bulunur. Çoğu enzimde üçüncü ve dördüncü gruplar da mevcuttur	İyodoasetik asit, İyodoasetamid, N-etilmaleimid, Epoksisüksinil-L-löslamido-(4-guanidino) bütan [E64]	Papain, Kalpain, Hemoglobininaz
Treonin peptidazlar	Treonin	-	Proteazom endopeptidaz kompleksi
Aspartik peptidazlar	Aspartik asit Aktif bölgede su molekülü iki aspartat molekülü tarafından bağlanmıştır	Pepstatin, Diazoasetilnorlösin metil ester (DAN), 1,2-epoksi-3-(p-nitrofenoksi) propan [EPNP]	Pepsin, Retropepsin, Napsin
Glutamik peptidazlar	Glutamik asit Aktif bölgede glutamin ya da aspartat ile ikili olarak bulunur	-	Eqolisin
Metalopeptidazlar	Metal iyonu Aktif bölgede bir ya da iki metal iyonu bulunur	Etilendiamintetraasetik asit (EDTA), 1-10 phenanthroline	Termolisin, Mikolisin, Fungalisin, Karboksipeptidaz A

Barrett 1999, Page ve Cera 2008, Oda 2012, Rawlings 2013

Glutamik peptidazların, asidik karakterli olmaları nedeniyle, önceleri aspartik peptidaz oldukları düşünülse de pepstatin (aspartik peptidaz inhibitörü) varlığında inhibe olmadıklarının ve pepsin ile retropepsin gibi iyi bilinen aspartik peptidazlarla dizilimlerinin farklı olduğunun tespit edilmesi sonucu, glutamik peptidazlar yeni bir grup peptidaz olarak değerlendirilmiştir (Kondo vd 2010). Bu enzimlerin aktif bölgesinde ya glutamat ve glutamin ya da glutamat ve aspartat bulunmaktadır. Glutamat, nükleofilik saldırıyı gerçekleştirecek olan su molekülünü aktive etmektedir (Rawlings 2013).

Metalopeptidazlarda, su molekülü bir ya da iki değerlikli metal iyonu tarafından tutulmakta ve amino asitlerdeki yüklenmiş yan zincirler metal iyonu için ligand görevi görmektedir. Enzimin aktif bölgesinde metal iyonu olarak çinko başta olmak üzere kobalt, mangan ya da bakır bulunabilmekte; bazı metalopeptidazlar bir, bazıları ise iki metal iyonu içermektedir. Enzim tek bir tane metal iyonu içeriyorsa, metal iyonu için üç amino asit ve bir de aktive olmuş su molekülü ligand görevi görmekte, dolayısıyla metal tetrahedral olarak düzenlenmektedir. Aktif bölgede iki metal iyonu mevcutsa, her biri yine tetrahedral olarak düzenleneceği için bir amino asit her iki metali bağlamakta ve yapıya bir tane de aktive olmuş su molekülü bağlanmaktadır. Ligandlar çoğunlukla histidin (H), glutamat (E) ya da aspartattır (D) ancak lösil (leucyl) aminopeptidazda metal ligandı olarak lizin bulunmaktadır (Rawlings vd 2007, Rawlings 2013). Tek ve iki metal iyonlu metalopeptidazların şematik gösterimi sırasıyla Şekil 2.7a ve Şekil 2.7b'de verilmiştir.



Şekil 2.7. a) Tek metal iyonlu b) iki metal iyonlu metalopeptidazların şematik gösterimi (Auld 2013)

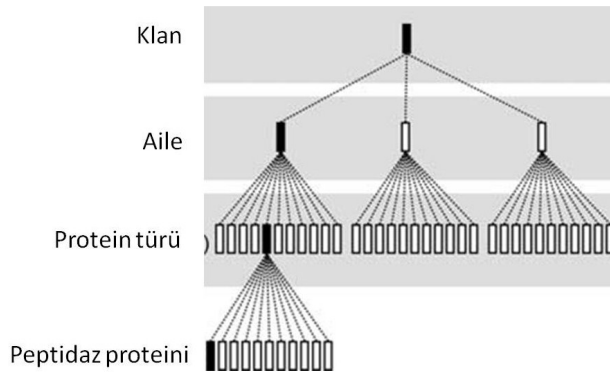
2.3.1.3. Peptidazların moleküler yapı ve homolojilerine göre sınıflandırılması

Moleküler yapı ve homolojiye göre yapılan sınıflandırma amino asit dizilimi ve üç boyutlu yapıya dayandığından, mevcut sınıflandırma sistemleri arasında en yeni olanıdır. Bu sistemde peptidazlar önce ailelere (families), ve klanlara (clans) ayrılmaktadır. MEROPS veritabanı, bu şekilde sınıflandırmayı benimsemiş ve sınıflandırmaya peptidaz inhibitörlerini de dahil etmiştir¹ (Anonymous 2014b).

Proteolitik enzimler ve protein inhibitörleri genellikle çok bölgeli (multi-domain) proteinlerden oluşmaktadır. Ancak enzimlerde peptidaz aktivitesi, tek bir

¹ MEROPS veritabanı sınıflandırmayı, sadece peptidaz bazında değil, proteolitik enzimlere göre yapmaktadır.

yapısal bölgeyle sınırlı iken, inhibitörlerin etkisi çoklu ve homolog bölgelerde gerçekleşmektedir. MEROPS veritabanında, tek peptidaz bölgesi (peptidaz ünitesi) ya da tek inhibitör bölgesindeki (inhibitör ünitesi) yapı ve dizilimi karşılaştırmak suretiyle sınıflandırma yapılmaktadır. Peptidaz ünitesi olarak ifade edilen molekül, katalitik aktiviteden sorumlu olmaktadır (Rawlings vd 2012). Sınıflandırmada hiyerarşi söz konusudur. Hiyerarşinin tabanında peptidaz ya da inhibitör ünitesi bulunmaktadır. Bir sonraki basamakta protein türleri (protein species) yer almaktadır. Farklı organizmalardan aynı proteini temsil ettiği düşünülen dizilimler protein türü (tripsin, katepsin B gibi) olarak gruplandırılmaktadır. Dolayısıyla her bir protein türü birçok organizmada bulunabilmektedir ve bunların biyolojik fonksiyonları benzerlik arz etmektedir. Ardından bu protein türleri arasında aminoasit dizilimi bakımından önemli benzerlikler olanlar aileler adı altında gruplandırılmakta, dizilimlerinde önemli benzerlik olmasa bile aralarında evrimsel ilişki olduğuna dair işaretler bulunan aileler de klanlar olarak değerlendirilmektedir. Söz konusu işaretler, ya aktif bölgelerinde bulunan grupların lineer düzenlenmesinin ya da protein katlanmalarının benzer olması şeklindedir. Bir klan içinde gruplandırılmış olan bir peptidaz, diğer klanlarda bulunanlardan tamamen farklıdır. Farklı klanlarda bulunan peptidazlar arasında bir benzerlik varsa bile bu benzerlik homologiden kaynaklanmamaktadır (Barrett ve Rawlings 2007, Rawlings vd 2012). Şekil 2.8’de peptidazların moleküler yapı ve homolojilerine göre sınıflandırılması şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.8. Peptidazların moleküler yapı ve homolojilerine göre sınıflandırılması (Barrett ve Rawlings 2007)

Peptidaz ve inhibitörlerini bu şekilde hiyerarşik olarak sınıflandırmanın en güvenilir yöntem olarak kabul edildiği bildirilmektedir (Barrett 1999).

2.3.1.4. Peptidazların aktivite gösterdikleri pH aralığına göre sınıflandırılması

Tam anlamıyla bir sınıflandırma sistemi olarak kullanılsa da peptidazlar aktivite gösterdikleri pH aralığına göre asidik, nötr ve alkali olarak gruplandırılabilir. Peptidazın çalışacağı pH aralığı üzerinde katalitik tipinin önemli etkisi bulunmaktadır. Genel olarak aspartik, glutamik ve sistein peptidazların optimum pH'ları asidik, treonin ve metalopeptidazların nötr, serin peptidazların ise nötr ya da baziktir. Ancak bazı istisnalar da bulunmaktadır. Örneğin; metalopeptidaz olan meprin B'nin optimum pH'sı asidikken, aspartik peptidaz olan renin ve retropepsin ile

sistein peptidaz olan kalpain ve kaspazasın optimum pH'sı nötrdür (Rao vd 1998, Rawlings 2013).

Her üç tip peptidazın da (asit, nötr, alkali) farklı kullanım alanları bulunmasına rağmen, endüstriyel uygulamalarda en yaygın kullanılanlar alkali peptidazlardır. Özellikle alkali serin peptidazların ticari uygulamalarda yararlanılan en önemli enzim grubu olduğu bildirilmektedir (Kumar ve Takagi 1999, Gupta vd 2002a, Gupta vd 2002b).

2.3.2. Peptidaz kaynakları

Peptidazlar canlı organizmalar için fizyolojik açıdan gerekli olduklarından bitki, hayvan ve mikroorganizma gibi farklı kaynaklarda bulunabilmekte ve dolayısıyla bunlardan izole edilerek endüstriyel amaçlı kullanılabilir (Gupta vd 2002a, Gupta vd 2002b).

Bitkilerin peptidaz kaynağı olarak kullanılması, bitkinin yetiştirilebilmesi için uygun tarım alanlarının bulunması ve bitki için gerekli iklim koşullarının sürekliliği gibi faktörlere bağlı olmaktadır. Dolayısıyla bitki için gerekli toprak ve iklim koşulları ile mevsimsel farklılıklar göz önünde bulundurulduğunda, her istenilen yerde ve zamanda üretimin gerçekleştirilemeyeceği açıktır. Ticari olarak üretilen başlıca bitkisel kaynaklı peptidazlar başta papain olmak üzere bromelain, keratinaz ve fisindir (Rao vd 1998). Bitkisel kaynaklı papain ve bromelainin enzim pazarında yaklaşık %5'lik bir paya sahip olduğu bildirilmektedir (Illanes 2008).

Hayvansal orjinli peptidazların üretimi kesim için uygun hayvanın bulunabilirliğine bağlı olmaktadır. Ancak hayvan kıyımını önlemek için, bu durum hükümet ve tarım politikaları ile yönetilmektedir. Ancak diğer bir taraftan, enzim üretimi için kesim atıklarının da değerlendirilebilmesi ekonomik açıdan fayda sağlamaktadır. Hayvansal kaynaklı peptidazlar arasından en bilinenleri tripsin, kimotripsin, kimozin ve pepsindir (Rao vd 1998). En bilinen bitkisel ve hayvansal kaynaklı peptidazlar ile bunların kullanım alanları Çizelge 2.4'te gösterilmiştir.

Bitkisel ve hayvansal kökenli peptidazların dünyadaki talebi karşılama yetersiz kalması ve mikroorganizmaların da biyoteknolojik uygulamalar için gerekli olan özelliklerin neredeyse tamamına sahip olmalarının sonucu olarak mikrobiyal kaynaklı peptidazlar önem kazanmaya başlamıştır (Sandhya vd 2005).

Mikroorganizmalar proteinleri parçalamakta ve parçalanma sonucu oluşan ürünleri gelişmeleri için besin kaynağı olarak kullanmaktadır. Proteinin parçalanması mikroorganizmanın salgıladığı endopeptidazlar aracılığıyla başlamakta, ileri düzeydeki hidroliz reaksiyonlarına ise ekzopeptidazlar aracılık etmektedir. Üretici mikroorganizmanın türüne ve hatta aynı tür içindeki farklı suşlara bağlı olmak üzere çok sayıda mikrobiyal peptidaz üretilmektedir. Ayrıca aynı suşun farklı kültür koşullarında farklı peptidaz üretebileceği de bildirilmektedir (Sandhya vd 2005, Jisha vd 2013).

Çizelge 2.4. En bilinen bitkisel ve hayvansal kaynaklı peptidazlar ve yaygın kullanım alanları

Peptidazlar	Elde edildiği kaynak	Enzim sınıfı	Yaygın kullanım alanları
Bitkisel kaynaklı			
Papain	Papaya	Sistein	Biranın durultulması, maya ekstraktı üretimi, etlerin yumuşatılması (tenderizasyon), kozmetik sanayi ve tıbbi uygulamalarda
Bromelain	Ananas	Sistein	Tıbbi uygulamalarda (yara iyileştirici, sindirim yardımcısı ve iştah kesici olarak)
Fisin	İncir	Sistein	Medikal uygulamalarda (sindirime yardımcı, bağırsak kurtlarının tedavisi), papain ve bromelainle birlikte etlerin yumuşatılmasında
Hayvansal kaynaklı			
Tripsin	Pankreas	Serin	Bazı özel tıbbi uygulamalarda
Kimotripsin	Pankreas	Serin	Analitik ve tanı amaçlı uygulamalarda
Kimozin (Rennin)	Mide	Aspartik	Peynir yapımında sütü pıhtılaştırma
Pepsin *	Mide	Aspartik	Peynir yapımında sütü pıhtılaştırma

*Rennin ile birlikte faaliyet göstermektedir.

Kaynaklar: Rao vd 1998, Grzonka vd 2007, Illanes 2008

Peptidaz üretebilen çok sayıda bakteri, maya, küf olmasına rağmen, çok az sayıda mikroorganizmadan ticari olarak yararlanılabilmektedir. Çünkü kullanılacak suşun GRAS olması, toksik ya da patojen olmaması gerekmektedir (Gupta vd 2002a). Özellikle GRAS olduğu belirlenmiş olan *Bacillus* ve *Aspergillus* türlerinden elde edilen peptidazlar endüstride yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu mikroorganizmaların hızlı gelişebilmeleri, yüksek aktiviteli enzim üretebilmeleri ve bunlarla çalışmanın güvenli olması kullanımlarının yaygınlaşmasında etkili olmuştur (Waites vd 2001). Ticari olarak kullanılan nötr ve alkali serin peptidazların çoğu, *Bacillus* türleri tarafından üretilmektedir. *Aspergillus oryzae* suşları aracılığıyla üretilen serin peptidazlar da bulunmaktadır. Ayrıca *Mucor* sp., *Conidiobolus coronatus*, *Penicillium* sp., *Streptococcus* sp. gibi mikroorganizmalardan elde edilen peptidazlardan da ticari olarak yararlanılmaktadır (Sandhya vd 2005). Bunların dışında halofilik bir bakteri olan *Pseudoalteromonas* sp. CP76'dan elde edilen peptidazın da ilaç ve gıda sanayi dahil pek çok farklı biyoteknolojik proseste kullanıldığı bildirilmektedir (Mellado vd 2005).

2.3.3. Peptidazların kullanım alanları

Peptidazlar protein katabolizması, kanın pıhtılaşması, hücre büyümesi, doku düzenlemesi, iltihap oluşumu, tümör büyümesi ve metastaz, zimojen aktivasyonu, öncü proteinlerden hormon ve farmakolojik açıdan aktif peptidlerin oluşturulması, salgılanan

proteinlerin membrandan taşınması gibi birçok fizyolojik ve patolojik proseste kritik rol oynamaktadır. Bunların yanı sıra, bu enzimler gıda sanayi, ilaç sanayi, tekstil sanayi, çamaşır deterjanları, deri işleme, biyoremediasyon prosesleri ve daha birçok proseste uygulama alanı bulmaktadır (Sandhya vd 2005).

2.3.3.1. Gıda endüstrisinde peptidazların kullanımı

Gıda endüstrisinde peptidazların kontrollü kullanımı ile protein hidrolizi gerçekleştirildiğinde gıdanın işlenebilirliğinin kolaylaşmasının yanı sıra besinsel değeri ve fonksiyonel özellikleri de iyileşmektedir. Protein hidrolizi ile gıdalardan kaynaklanan protein alerjisi azaltılabilmekte, açığa çıkan biyoaktif peptidlerle sağlığa yararlı gıdaların üretimi mümkün olmakta, gıdaların sindirilebilirliği iyileştirilebilmekte, gıdaların tekstür ve aroma gibi duyuşsal özellikleri modifiye edilebilmektedir. Gıdalarda arzu edilen özelliklerin oluşturulmasında, peptidazların spesiflikleri göz önünde bulundurulup uygun peptidazın seçilmesi önem arz etmektedir (Tavano 2013).

Peptidazlardan gıda işlemede yüzyıllardır yararlanılmaktadır ve ilk kez peynir üretiminde kullanılmıştır. Süt emen buzağuların (4-6 aylık) midelerinin dördüncü bölümünden (abomasum) elde edilen rennet (kimozi ve pepsin karışımı) sütün pıhtılaştırılması amacıyla kullanılan bir aspartik peptidazdır. Rennin benzeri mikrobiyal enzimler, bazı *Mucor* türleri tarafından üretilmekte olup ticari açıdan büyük öneme sahiptir (Sumantha vd 2006). Mazorra-Manzano vd (2013) turunç (*Citrus aurantium* L.) çiçeğinden ekstrakte ettikleri peptidazı karakterize etmiş, aspartik peptidaz olduğunu ve 35-70 °C gibi geniş bir sıcaklık aralığında sütü pıhtılaştırma özelliği olduğunu belirlemişlerdir.

Peptidazlar fırın ürünleri endüstrisinde hamur işleme özelliklerinin iyileştirilmesinde dolayısıyla onların modifiye edilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Çok kuvvetli un söz konusu olduğunda uzama yeteneği düşük hamur elde edileceği için düşük hacimli ekmek üretimine neden olmaktadır. Bu gibi durumlarda uygun peptidazın kullanımı ile gluten modifiye edildiğinde hamur oluşum süresinin kısaltılması sağlanmakta, uzama yeteneği iyi, hızlı gelişen ve bu sayede daha iyi tekstür ve hacime sahip son ürün elde edilebilmektedir (Aehle 2004).

Ekmeklik unların peptidazla muamelesinin aroma ve kabuk rengi üzerine de etkisi bulunmaktadır. Peptidaz aktivitesi ile açığa çıkan amino asitler aromatik bileşiklerin üretiminde ara ürün iken; peptidler potansiyel okside edici, lezzet artırıcı, tatlandırıcı ve acılık unsuru maddelerdir. Ayrıca amino asitler glutenle etkileşip Maillard reaksiyonu sonucu aroma ve kabuk renginin oluşmasına katkıda bulunmaktadır (Aehle 2004).

Kuvvetli un kurabiye, bisküvi, kraker ve pizza üretiminde de sorunlara neden olmaktadır. Üretimde kullanılacak olan unlara peptidaz ilavesi, gluten proteinlerini belli bir seviyeye kadar hidrolize ederek özelliklerinin iyileşmesini sağlamaktadır. Bu amaçla sodyum metabisülfid gibi kimyasal ajanlarla da gluten modifiye edilebilmektedir. Fakat son zamanlarda bu amaçla peptidaz kullanımı tercih edilmektedir. Kara vd (2005) kurabiye formülasyonlarına peptidaz (bakteriyel ve bitkisel) ilavesinin kurabiye özelliklerini iyileştirdiğini, yayılma oranını artırdığını tespit etmişlerdir. Bombara vd

(1997) *Aspergillus oryzae*'den elde edilmiş nötral peptidazla modifiye ettikleri buğday unlarının çözünürlük, köpük genişmesi (foam expansion), yağ ve su tutma ile farinograf özelliklerinin iyileştiğini belirlemişlerdir. Ayrıca glutenin belirli bir seviyeye kadar hidrolizinin keklerin hacim, nem ve iç rengi gibi özelliklerini geliştirdiğini, kek iç neminin artışının kekin tazeliğini daha uzun süre korumasını sağladığını, kek iç renginin sarılığının artması sayesinde formülasyondaki yumurta miktarının azaltılmasına olanak sağladığını bildirmişlerdir. Gluten modifikasyonu ile hamur elastikiyetinin azaltılması sayesinde kurabiye ve kraker özelliklerinde de iyileşme sağlandığı, gofret üretiminde de hamurun vizkozitesindeki azalma ile sistemde herhangi bir tıkanmaya sebebiyet vermeden hamurun pompalanmasının kolaylaştığı, çalışmada elde edilen diğer bulgulardır. Çölyak hastaları için en güvenilir tedavi yöntemi gluten tüketmemektir. Dolayısıyla bu hastalar buğday, arpa, çavdar unları ile üretilen fırın ürünlerini tüketemediklerinden alternatif unlarla üretim yapılmaktadır. Ancak glutenin olmaması bu tip ürünlerde kalite kusurlarına neden olmaktadır. Renzetti ve Arendt (2009) esmer pirinç unu ile yapılan ekmeğin kalitesini iyileştirmek için *Bacillus licheniformis* ve *B. subtilis*'den elde edilmiş ticari peptidazları kullanmış ve sonuçta ekmeğin spesifik hacminin arttığını, ekmeğin sertliği ve çıgınebilirliğinin azaldığını tespit etmişlerdir.

Bira üretiminde, proteinler sıcak ve soğuk çöktürme sırasında yeterli miktarda uzaklaştırılmazsa üretimin son aşamalarında (soğutma) polifenoller ile etkileşerek bulanıklığa neden olmaktadır. Bu amaçla polivinilpolipirrolidon (PVPP) gibi stabilize edici ajanlar kullanılabilir. Sistein peptidazların kullanımı ile de biranın koloidal stabilitesi sağlanmakta ve raf ömrü uzatılabilir (Aehle 2004). Lopez ve Edens (2005) *Aspergillus niger* kaynaklı prolin spesifik-peptidaz muamelesi ile bulanıklığa neden olan prolince zengin proteinleri hidrolize etmiş ve bulanıklık oluşturamayan peptid fraksiyonuna dönüştüğünü tespit etmişlerdir. Enzimin köpük oluşumundan sorumlu proteinler üzerindeki aktivitesi sınırlı olduğundan köpük oluşumu olumsuz etkilenmemiştir.

Etlere yumuşatılması, sosilerin olgunlaştırılmasının hızlandırılması gibi amaçlarla sistein peptidazlardan yararlanılabilmektedir (Grzonka vd 2007). Soğutulmuş etlere *Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp.'den elde edilen serin peptidazının uygulandığı bir çalışmada proteolitik aktivite sonucu açığa çıkan serbest amino asitlerin etlerin tadını geliştirdiği belirlenmiştir. Soğuk adaptasyonu olması nedeniyle *Pseudomonas* sp.'den elde edilen peptidaz tat geliştirmede daha etkili olmuştur (He vd 2004). Timón vd (2014) *Aspergillus oryzae* kaynaklı ticari bir peptidazı kürlenmiş sosis üretiminde kullanmış ve lipid oksidasyonu sonucu oluşan ransidite ve renk açılmalarının engellendiğini tespit etmişlerdir. Bu durumun da proteolitik aktivite sonucu açığa çıkan ve antioksidan etki gösteren peptid ya da amino asitlerden kaynaklandığını savunmuşlardır.

Soya proteinlerinin hidrolizinde, soya sosu üretiminde, jelatin, kazein ve peynir altı suyu proteinlerinin hidrolizinde, balık proteinlerinin hidrolizinde alkali peptidazlardan yararlanılmaktadır. Protein hidrolizatları kan basıncının düzenlenmesinde önemli rol oynamakta; bebek gıdalarında, özel tedavi amaçlı diyet ürünlerinde ve meyve sularında kullanılabilir (Gupta vd 2002b). *Bacillus licheniformis*'den elde edilen alkali peptidazın yüksek besinsel değere sahip protein hidrolizatlarının elde edilmesinde kullanıldığı bildirilmektedir (Sumantha vd 2006).

2.3.3.2. Deterjan endüstrisinde peptidazların kullanımı

Deterjanlarda ilk ve en çok kullanılan enzim alkali peptidazdır. Protein lekelerinin giderilmesini sağlaması nedeniyle oldukça önem arz etmektedir. İlk başlarda, deterjanlarda pankreatik enzimler kullanılmış fakat bunlar, deterjanların yüksek pH'sında iyi çalışmamıştır. Daha sonra *Bacillus* türlerinden elde edilen alkali peptidazlardan (subtilisin) yararlanılmaya başlanmıştır. Şu an deterjanlarda kullanılan ticari birçok alkali peptidaz bulunmaktadır ve bunların neredeyse tamamı *Bacillus* orjinlidir (Gupta vd 2002b, Ito vd 2005).

Deterjan formülasyonlarında kullanılan alkali peptidazların geniş bir pH ve sıcaklık aralığında aktif ve stabil olması, düşük miktarlarda (%0.4-0.8) etkili olabilmesi ve deterjan bileşimindeki okside edici ajan, yüzey aktif madde, ağartıcı ve parfüm gibi maddelerle uyumlu olması gerekmektedir (Kumar ve Takagi 1999). Subtilisinlerle ilgili en büyük sıkıntı, bunların kimyasal oksidantlarla inaktive olmasıdır. Ancak *Bacillus* sp. suşları ile oksidatif açıdan stabil serin peptidazlar da üretilmiştir (Ito vd 2005). Bunun yanı sıra Gupta vd (1999) topraktan izole ettikleri *Bacillus* SP5 suşu ile ağartma maddelerine karşı stabil; Oberoi vd (2001) de yine topraktan izole edilen *Bacillus* sp. RGR-14 ile pH 11'de aktif, sodyum dodesil sülfata (SDS) karşı stabil alkali peptidaz üretimini gerçekleştirmişlerdir.

Artık deterjanlar için peptidazlar minör bir katkı maddesinden ziyade önemli bir temel bileşen haline gelmiştir. Yıkama performansını artırma, daha düşük sıcaklık derecelerinde de etkin temizlik sağlayabilme gibi gelişmiş özelliklere sahip yeni enzimlerin bulunup değerlendirilmesi son zamanlarda deterjanlar açısından üzerinde en çok çalışılan konudur. Özellikle tüketicilerin sentetik kumaşlara olan ilgisinin artması ancak bunların yüksek sıcaklığa dayanıklı olmaması, düşük sıcaklıklarda aktif olabilen enzimlerin kullanılmasını gerektirmektedir (Gupta vd 2002b). Novo Nordisk tarafından *Bacillus clausii* kullanılarak üretilen KannaseTM düşük sıcaklıklarda (10-20 °C) ve düşük su sertliklerinde de iyi yıkama performansı sergileyen bir alkali peptidazdır (Outtrup ve Jørgensen 2002).

2.3.3.3. Deri endüstrisinde peptidazların kullanımı

Deri işleme; ıslatma, kıl giderme, sama (temizleme) ve tabaklama gibi çeşitli aşamalardan oluşmaktadır. Geleneksel yöntemlerde deri işlenirken önemli ölçüde kirlilik problemlerine neden olan, sodyum sülfat gibi zararlı kimyasallar kullanılmaktadır. Hem daha kaliteli deri ürünleri elde etmek hem çevresel kirliliği azaltmak hem de işçilerin bu zararlı kimyasalları soluyarak sağlık problemleri yaşamalarını engellemek amacıyla deri işlemede enzimler de kullanılabilir. Deri ve kılların çoğunlukla proteinden oluşmaları, peptidazların kullanımını mümkün kılmaktadır. Peptidazlar kıl giderme ve temizleme aşamalarında kullanılmakta; seçici hidrolizle derideki kollojen olmayan bileşenlerin parçalanmasını, albumin ve globulin gibi fibriller olmayan proteinlerin uzaklaştırılmasını sağlamaktadır. Alkali şartlarda kıl kökleri şiştiği için alkali peptidazın kıl köklerindeki proteinlere ulaşması ve etki etmesi kolay ve hızlı olmaktadır. Kılların uzaklaştırılmasının ardından yapılan temizleme aşamasında derinin elastik, şekillendirilebilir bir hal alması amaçlanmaktadır. Peptidazlar bu aşamada elastin ve keratinin parçalanmasını sağlamaktadır. Deri işleme

yüksek sıcaklıklarda yapıldığından kullanılacak peptidazın termostabil olması gerekmektedir. *Bacillus*, *Aspergillus* ve *Streptomyces* türlerinden elde edilen alkali peptidazlar deri sanayinde kullanılabilir (Salleh vd 2006, Madhavi vd 2011).

2.3.3.4. Tekstil endüstrisinde peptidazların kullanımı

Yünün işlenmesi, kozanın kaynatılarak uzaklaştırılması ve ipeğin rafine edilmesinde peptidazlardan yararlanılabilmektedir. Peptidaz sayesinde ipek üzerindeki zamksı maddeler uzaklaştırılarak, daha parlak ve yumuşak bir ipek elde edilmesi sağlanmaktadır (Grzonka vd 2007). Yünün işlenmesi sırasında kontrollü olarak peptidaz uygulanması ile yün ipliği üzerindeki burkulma yükü ve enerjinin azaltılarak daha yumuşak kumaşların elde edilmesi sağlanabilmektedir (Durán ve Durán 2000).

Tekstil endüstrisinin önemli bir girdisi olan sentetik liflerin ıslanabilme ve boyanabilme özelliklerinin iyileştirilmesi yönünde çalışmalar yapılmaktadır. Poliamid lifler, amid bağlarının hidrojen bağı kurması nedeniyle farklı sıcaklıklara ve aşınmaya karşı dirençli olup kimyasal dayanıklılıkları oldukça iyidir. Ancak hidrofobik yapıları dolayısıyla parlatma ve boyama ajanlarına karşı etkinlikleri düşüktür. El-Bendary vd (2012) *Bacillus*'dan elde ettikleri peptidazı poliamid yüzeyini modifiye etmek amacıyla kullanmış, liflerin dayanıklılığında sadece %6'lık bir kayıp olduğunu tespit etmiş, fakat lifin hidrofilik özelliklerini geliştirdiklerinden temel boyalarla boyanabilirliğini sağlamışlardır.

2.3.3.5. Kozmetik endüstrisinde peptidazların kullanımı

Soyma (peeling) etkisi sebebiyle bitkisel (papain ve bromelain gibi) ve bakteriyel peptidazlar yüz bakım kremlerinde kullanılmaktadır. Peeling etkisi, epidermal hücre proteinlerinin belirli bir ölçüye kadar hidrolize edilmesi ile sağlanmaktadır. Son zamanlarda daha ekonomik olması nedeniyle bakteriyel peptidazlar (örneğin subtilisin) bu amaçla daha fazla tercih edilmektedir. Yüz temizleme solüsyonlarında peptidaz kullanımı ile sivilceler giderilebilmekte ve ayrıca kanın sirkülasyonu teşvik edildiğinden cildin daha sağlıklı olması sağlanmaktadır. Gıda artıklarının parçalanması, diş taşlarının giderilmesi ve dişlerin beyazlatılması amacıyla diş macunlarında da peptidazlar (papain gibi) kullanılabilir (Aehle 2004, Grzonka vd 2007).

2.3.3.6. Farmakoloji ve tıpta peptidazların kullanımı

Teröpatik (tedavi edici) ajanların geliştirilmesinde peptidazlardan büyük ölçüde yararlanılmaktadır. Oral yolla alınan *Aspergillus oryzae* peptidazının sindirim yardımcısı olduğu, subtilisinin geniş spektrumlu antibiyotiklerle kombine olarak yanık ve yaraların tedavisinde kullanıldığı bildirilmektedir (Rao vd 1998). Ayrıca bağırsak parazitleri ile mücadelede, kan gruplarının belirlenmesinde, fitik vakalarında disklerdeki kırıkdağları parçalayarak sırt ağrılarının azaltılmasında peptidazlar etkili olmaktadır (Rawlings vd 2007).

2.3.3.7. Diğer kullanım alanları

Pest kontrolünde, kontakt lens temizleme çözeltilerinde, cerrahi malzemelerin temizlenmesinde, membranların temizlenmesinde (Khan 2013), X-ray ve fotoğraf filmlerinde jelatini hidrolizleyerek gümüşün geri kazanılmasında, yapı-fonksiyon ilişkisinin aydınlatılması, nükleik asit izolasyonu, peptid sentezi ve protein dizilimlerinin belirlenmesi gibi araştırma alanlarında (Jisha vd 2013) protein kökenli çevresel kirlilik unsurlarının zararsız ya da az zararlı maddelere dönüştürülmesinde (biyoremediasyon) peptidazlardan yararlanılmaktadır (Karigar vd Rao 2011).

Sen vd (2014) dört farklı ticari peptidaz (üçü *Bacillus licheniformis* kaynaklı, biri bakteriyel tip VIII) ile deri fabrikası arazisinden izole ettikleri *Bacillus pseudofirmus* SVB1 aracılığıyla ürettikleri peptidazı süt ve et işleme tesislerinde kullanılan malzemelerin yüzeyinde oluşan protein yanıklarını temizlemek için kullanmış; etkin bir temizlik sağlandığını ve kendi ürettikleri peptidazın (saflaştırılmamış) daha iyi sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Temizlikte kullanılan asit ve alkali miktarını azalttığı için enzimatik temizliği çevre dostu bir yöntem olarak ifade etmişlerdir.

2.3.4. *Bacillus* peptidazları

Bacillus türleri, peptidaz üretimi açısından üzerinde en çok çalışılan mikroorganizma grubunu oluşturmaktadır. GRAS olmalarının yanı sıra kültür ortamına yüksek konsantrasyonda (g/l düzeyinde) peptidaz salgılayabilme yetenekleri, çevresel değişimlere kolay uyum sağlayabilmeleri ve uzun süredir çalışılıyor olması nedeniyle *Bacillus* cinsinin özelliklerinin iyi bilinmesi, endüstriyel peptidaz üretiminde *Bacillus* türlerini vazgeçilmez kılmıştır (Schallmey vd 2004).

Bacillus türlerinin hücre dışı peptidazları mikrobiyal gelişme evresinin logaritmik fazının sonunda (Simonen ve Palva 1993), durgun fazın başında ya da durgun faz süresince salgıladıkları bildirilmektedir (Mabrouk vd 1999). Ancak logaritmik fazın erken dönemlerinden itibaren peptidaz salgılamasının başladığını bildiren çalışma da mevcuttur (Beheshti Maal vd 2011). Peptidaz salgılanmasının, *Bacillus* gibi sporlu bakterilerde, durgun fazda besin maddelerindeki (özellikle azot ve karbon kaynağı) azalmayla birlikte, vejetatif hücrelerin spor haline dönüşmesiyle ilgili olabileceği (Hanlon ve Hodges 1981, O'hara ve Hageman 1990), durgun fazın uzatılmasına yönelik uygulamaların enzim verimini artırabileceği bildirilmektedir (Gupta vd 2002a). Özellikle eski yayınlarda peptidaz üretiminin sporlaşma esnasında gerçekleştiği ifade edilse de (Prestidge vd 1971, Dancer ve Mandelstam 1975, James ve Mandelstam 1985), sporlaşma ve peptidaz üretiminin aynı anda olmasına rağmen, aralarında bir ilişki olmadığını ileri süren yayınlar da bulunmaktadır. Fleming vd (1995) gen delesyonu yöntemiyle sporlaşma özelliğini tamamen yitiren *Bacillus licheniformis*'in serin peptidazı sentezinin normal şekilde devam ettiğini tespit etmişlerdir. Daha eski bir makalede Fleming vd'nin (1995) yaptığı çalışmanın tam tersi olarak, peptidaz üretiminin sporlaşma için gerekli olup olmadığını araştırmak için nötr ve alkali peptidaz üretiminden yoksun mutant suş geliştirilmiş, çalışma sonucunda sporlaşma için peptidaza ihtiyaç duyulmadığı tespit edilmiştir (Kawamura ve Doi 1984). Hamoen vd'ne (2003) göre besin maddeleri azalıp da durgun faz başlayınca, *Bacillus*

subtilis peptidaz gibi degradatif enzimleri salgılayarak normal şartlarda ulaşılması zor olan alternatif kaynaklardan besin oluşturmaktadır. Besinsel stresin devam etmesi durumunda, sporlaşma son aşama olarak gerçekleşmektedir. Yani hücre, alternatif kaynakların yeterli olmadığı kararını verinceye kadar sporlaşmayı baskılamaktadır (Stephens 1998, Schultz vd 2009).

Hücrelerinde dış zar olmaması nedeniyle *Bacillus* türleri salgıladıkları proteinleri kolaylıkla kültür ortamına aktarabilmektedirler. *Bacillus* türleri ile yüksek konsantrasyonlu ürün elde edilebilmesi, *Bacillus*'ların bu özellikleri ile ilişkilendirilmektedir. *Bacillus subtilis*'in "kalite kontrol" ve "besleme" peptidazları olarak iki gruba ayrılan hücre dışı peptidaz ürettiği bildirilmektedir. Kalite kontrol peptidazları; parçalanmış sinyal peptidler, eksik olarak sentezlenmiş ya da yapısal olarak yanlış katlanmış proteinler gibi hücre için potansiyel zararlı molekülleri uzaklaştırmada önemli rol üstlenmektedir. Besleme peptidazları ise kültür ortamındaki protein ve peptidleri parçalayarak hücre için besin sağlamaktadır (Harwood ve Cranenburgh 2008, van Dijl ve Hecker 2013). Hücre dışı peptidaz açısından yoksun, mutant *Bacillus* suşlarının, parçalanmaya (lysis) daha meyilli olduğu ve bu suşların gelişme hızlarının düştüğü belirtilmektedir (Nijland ve Kuipers 2008).

Literatürde peptidaz üretimine, üretimin optimizasyonuna, üretilen enzimin saflaştırılması ve karakterizasyonuna yönelik birçok çalışma bulunmaktadır. *Bacillus*'ların salgıladıkları ekstraselüler peptidazların %95'inden fazlasını oluşturan subtilisin (alkali serin peptidaz) ve nötral peptidazların (metalopeptidaz), üzerinde en çok çalışılan peptidazlar olduğu bildirilmiştir (Simonen ve Palva 1993). Çizelge 2.5'te literatürde derin kültür yöntemi ile hücre dışı peptidaz üretimiyle ilgili olarak yapılmış bazı çalışmalarda hangi *Bacillus* türlerinden yararlandığı, hangi tip peptidazın üretildiği ve ham enzim çözeltisinde ulaşılan maksimum aktivite değerleri verilmiştir.

Konu ile ilgili ulaşılabilen çalışmaların çoğunda peptidaz üretme amacıyla *Bacillus*'lar genellikle başta toprak olmak üzere (Gupta vd 1999, Kumar vd 1999, Singh vd 2001, Beg ve Gupta 2003, Abdulrahman ve Yasser 2004, Nascimento ve Martins 2004, Naidu ve Devi 2005, Shafee vd 2005, Chu 2007, Guangrong vd 2008, Nadeem vd 2008, Oskouie vd 2007, Reddy vd 2008) deniz suyu (Patel vd 2006), sıcak kaynak suyu (Abusham vd 2009), atık su (Chu 2007), çiğ süt (Matta and Punj 1998), şeker kamışı melası (Johnvesly ve Naik 2001) gibi kaynaklardan izole edilmiş ya da kültür koleksiyonlarından (Yang vd 2000, Beg vd 2003) satın alınmıştır. Bu çalışmaların bazılarında sadece üretim ve/veya üretimin optimizasyonu yapılırken, bazılarında ise üretim ve optimizasyonun ardından, enzimin saflaştırılması ve karakterizasyonu da yapılmıştır.

Peptidaz üretimi ile ilgili olarak Türkiye'de yapılan bazı çalışmalarda ise *Bacillus* türleri topraktan (Muderriszade vd 2001, Uyar ve Baysal 2004, Sevinç ve Demirkan 2011, Tekin vd 2012), doğal yetiştirme ortamlarından (deri sanayi yan ürünlerinden ve topraktan) (Genckal ve Tari 2006), deri sanayi yan ürünlerinden (Tari vd 2006), komposttan (Denizci vd 2004), sanayi arıtma tesisinden (Gerze vd 2005, Orhan vd 2005), Van Gölü'nden (Öztürk vd 2009), deri, toprak ve at dışkısından (Akbalık vd 2004), peynirden (Molva vd 2009) izole edilmiştir.

Çizelge 2.5. *Bacillus* türleri ile peptidaz üretimine ilişkin bazı çalışmalar

<i>Bacillus</i> türü	Peptidaz türü	Enzim aktivitesi	Fermantasyon süresi (sa)	Kaynak*
<i>Bacillus</i> sp. SSR 1	Serin alkali	~900 U/ml ^a	15	Singh vd 2001
<i>Bacillus</i> sp.	Alkali	1939 U/ml ^b	96	Puri vd 2002
<i>Bacillus</i> sp. RGR-14	Alkali	400 U/ml ^b	48	Oberoi vd 2001
<i>Bacillus</i> sp. RGR-14	Alkali	3914 U/ml ^b	96	Chauhan ve Gupta 2004
<i>Bacillus</i> sp. K-30	Alkali	81.1 U/ml ^b	96	Naidu ve Devi 2005
<i>Bacillus</i> sp.	Alkali	410 U/ml ^b	48	Patel vd 2005
<i>Bacillus</i> sp.	Alkali	222 U/ml ^b	96	Gençkal ve Tari 2006
<i>Bacillus</i> sp.	Alkali	2560 U/ml ^b	48	Chu 2007
<i>Bacillus</i> sp. HS08	Nötr	6804 U/ml ^b	18	Guangrong vd 2008
<i>Bacillus</i> sp. RKY3	Nötr	939 U/ml ^b	24	Reddy vd 2008
<i>Bacillus</i> sp. PCSIR EA-3	Nötr	~0.7 U/ml ^c	48	Qadar vd 2009
<i>Bacillus</i> sp. T5	Alkali	83.39 U/ml ^b	72	Güngör 2011
<i>Bacillus</i> sp. GPA4	Alkali	465 U/ml ^c	48	Hindhmathi vd 2011
<i>Bacillus circulans</i>	Alkali	8320 U/ml ^b	24	Rao vd 2007
<i>Bacillus circulans</i>	Alkali	808.68 U/ml ^c	101	Jaswal vd 2008
<i>Bacillus clausii</i> GMBAE 42	Alkali	45 U/ml ^b	65	Denizci vd 2004
<i>Bacillus clausii</i>	Alkali	1520 U/ml ^b	40	Oskouie vd 2008
<i>Bacillus licheniformis</i>	Serin alkali	441 U/ml ^d	37	Çalık vd 1998
<i>Bacillus licheniformis</i>	Serin alkali	390 U/ml ^d	43	Çalık vd 2002
<i>Bacillus licheniformis</i>	Alkali	221 U/ml ^b	36	Abdulrahman ve Yasser 2004
<i>Bacillus licheniformis</i> N-2	Alkali	991 U/ml ^b	24	Nadeem vd 2008

Devamı arkada

Çizelge 2.5.'in devamı

<i>Bacillus</i> türü	Peptidaz türü	Enzim aktivitesi	Fermentasyon süresi (sa)	Kaynak*
<i>Bacillus licheniformis</i> BA17	Alkali	6.66 U/ml ^b	24	Öztürk 2007
<i>Bacillus licheniformis</i> BA17	Alkali	15.7 U/ml ^b	12	Nikerel vd 2008
<i>Bacillus cereus</i> SV1	Metalo-peptidaz	5700 U/ml ^b	48	Manni vd 2008
<i>Bacillus mojavensis</i>	Alkali	1770 U/ml ^b	36	Beg vd 2002
<i>Bacillus mojavensis</i>	Alkali	2389 U/ml ^b	12	Beg vd 2003
<i>Bacillus subtilis</i>	Alkali	753 U/ml ^b		Prasanthi vd 2008
<i>Bacillus subtilis</i>	-	445 U/ml ^e	24	Abusham vd 2009
<i>Bacillus subtilis</i>	Alkali	585 U/ml ^b	36	Mahto ve Bose 2012
<i>Bacillus subtilis</i> AKR83	Alkali	43 U/ml ^b	24	Ravishankar vd 2012
<i>Bacillus marmariensis</i> GMBE 72	Alkali	22.57 U/ml ^f	54	Kerimak Öner 2008
<i>Bacillus sphaericus</i> DS11	-	1182.68 U/ml ^b	48	Liu vd 2010

^a Bir ünite enzim aktivitesi =1 dakikada absorbansı 1 birim artıran enzim miktarı

^b Bir ünite enzim aktivitesi = analiz koşullarında 1 dakikada 1 µg ml⁻¹ tirozin açığa çıkaran enzim miktarı

^c Bir ünite enzim aktivitesi = analiz koşullarında 1 dakikada 1 µmol tirozin açığa çıkaran enzim miktarı

^d Bir ünite enzim aktivitesi = analiz koşullarında 1 dakikada 4 nmol tirozin açığa çıkaran aktivite

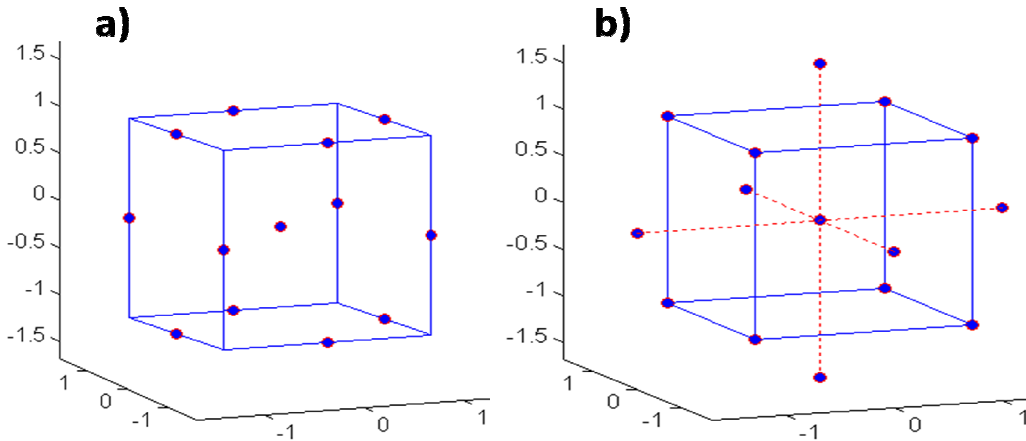
^e Bir ünite enzim aktivitesi =analiz koşullarında 1 dakikada 450 nm'de absorbansı 0.001artıran enzim miktarı

^f Bir ünite enzim aktivitesi = analiz koşullarında 1 dakikada 1 mg ml⁻¹ tirozin açığa çıkaran enzim miktarı

*Çalışmalar biyoreaktör ya da çalkalamalı inkübatörde erlenle yapılmış olması dikkate alınmaksızın seçilmiştir. Verilen aktivite değerleri, ham enzim çözeltilisinde ulaşılan maksimum aktivitedir.

2.4. Yanıt Yüzey Yöntemi

Optimizasyon çalışmalarında yaygın olarak kullanılan tekniklerden biri Yanıt Yüzey (Response Surface) Yöntemi'dir. Bu yöntem, sistem yanıtının birkaç değişkenden etkilendiği problemlerin modellenmesinde ve analizinde yararlı olan matematiksel ve istatistiksel tekniklerin bileşkesidir (Harman 2000). Yanıt yüzey yönteminde ilk aşamada sistem yanıtı üzerinde etkili olduğu düşünülen faktörler ve bunların düzeyleri belirlenmektedir. Daha sonra regresyon analizi ile bir model oluşturularak, regresyon katsayıları yardımıyla bir faktörün ana veya interaksiyon etkilerinin yanıt değişkeni üzerinde ne derecede etkili olduğuna karar verilmektedir. Son aşamada, yanıt ile bağımsız değişkenler arasındaki fonksiyonu gösteren yanıt yüzey grafikleri ile kontur grafikleri çizilmekte ve optimum nokta tespit edilmektedir. Üç farklı faktörün düzeylerinin sistem yanıtı üzerine etkisinin araştırıldığı deneme düzenlerinde faktörlerin $2^3=8$ farklı kombinasyonu söz konusudur ve bunların şekilsel gösterimlerinde küp kullanılmaktadır. Üç düzeyli faktörlerden oluşan deneme düzenlerine "Box-Behnken ve Central Composit (merkezi tümleşik) deneme düzenleri" adı verilir. Bu tip deneme düzenleri ikinci dereceden bir yanıt yüzeyi modelinin oluşturulması için en çok faydalanılan yöntemlerdir (Kul 2004). Box-Behnken ve merkezi tümleşik deneme desenlerinin küp olarak gösterimleri Şekil 2.9a ve 2.9b'de gösterilmiştir (Anonymous 2014c).



Şekil 2.9. a) Box-Behnken b) merkezi tümleşik deneme desenlerinin küp olarak gösterimi

Box-Behnken deneme düzenlerinde sırayla her bir faktörün değeri merkez değerinde sabitlenirken, diğer faktörlerin tüm düzeylerinin kombinasyonları uygulanmakta, son olarak da her bir faktörün merkez değeri deneme düzeninde yer almaktadır (Kul 2004).

Central Composit (merkezi tümleşik) deneme düzenleri ise k faktör sayısı olmak üzere $2k$ sayıda iki düzeyli faktöriyel denemenin, $2k$ sayıda eksen nokta ya da yıldız nokta ile kombinasyonundan oluşmaktadır. Ayrıca n_c sayıda merkez nokta içerir. Modelde yer alan faktörlerin en az iki düzeyli olması gerekmektedir. Oluşturulacak olan ikinci dereceden modelin ana etkileri ve birinci dereceden interaksiyon etkileri $2k$

denemesinden elde edilirken merkez noktalar yardımıyla sistemin eğriselliği test edilmektedir. Eksen noktaları yardımıyla modeldeki karesel terimler tahmin edilmektedir (Tekindal 2009).

Peptidaz üretiminin optimizasyonu için yanıt yüzey yönteminden yararlanılan çalışmalarda (Puri vd 2002, Guangrong vd 2008, Oskouie vd 2008, Reddy vd 2008) genellikle central composit deneme düzeni kullanılmıştır.

2.5. Saflaştırma İşleminde Kullanılan Bazı Kromatografik Tekniklerin Temel Prensipleri

Kromatografi, örnek bileşenlerinin biri hareketli diğeri sabit olan iki faz arasında diferansiyel (farklı özelliklerine göre) olarak ayrılması olayıdır. Uygulamaların çoğunda durağan faz, bir kolon içinde paketlenmiş olan küresel partiküllerden oluşmaktadır. Ayrılması istenen karışım mobil faza tanıtılmakta ve kolon içinden geçmeye zorlanmaktadır. Katı faza ilgisi daha fazla olan moleküller, mobil faza ilgisi daha fazla olan moleküllere göre kolondan daha yavaş geçmektedir (Roe 1994, Miller 2005).

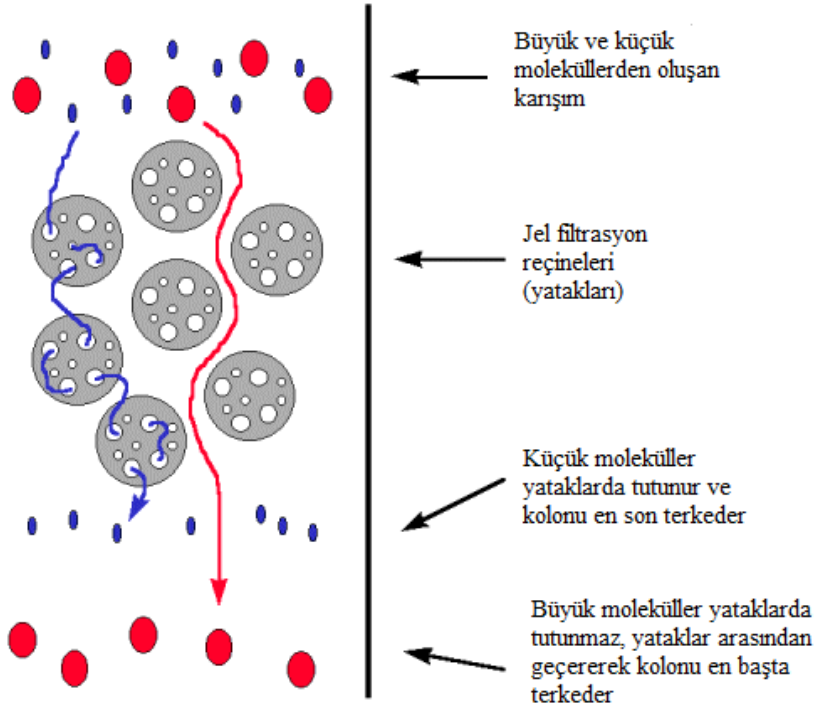
2.5.1. Jel filtrasyon yöntemi

Jel filtrasyonu, molekülleri bir kolon içine yerleştirilmiş jel filtrasyon ortamından geçirmek suretiyle boyutlarındaki farklılığa göre ayıran, en basit kromatografik tekniktir. Protein, enzim, polisakkarit, nükleik asit ve diğer biyolojik makromoleküllerin saflaştırılmasında kilit rol oynamaktadır. Özellikle pH, metal iyonu ya da kofaktör konsantrasyonu ve çevresel koşullardaki değişimlere karşı hassas olabilen biyomoleküllere oldukça iyi uyum sağlamaktadır. Yöntem iki farklı şekilde uygulanabilmektedir. Grup ayrılması olarak ifade edilen birinci yöntemde, örnek bileşenleri boyut aralığına göre iki ana gruba ayrılmaktadır. Bu yöntem düşük ya da yüksek moleküler ağırlığa sahip kontaminantları (bulaşanları) ortamdan uzaklaştırmak ya da tamponu desalinize etmek (tuzdan arındırmak) ve değiştirmek için kullanılabilir. İkinci yöntem ise biyomoleküllerin yüksek çözünürlükle (kararlılıkla) fraksiyonlarına ayrılması olarak ifade edilmekte, örnek bileşenleri moleküler boyutlarındaki farklılığa göre birbirinden ayrılmaktadır. Bu yöntem, bir veya daha fazla bileşeni izole etmek, monomerleri agregatlardan (kümelerden) ayırmak, moleküler ağırlığı tahmin etmek ya da moleküler ağırlık dağılımı analizi gerçekleştirmek için kullanılabilir (Hagel 2011).

Jel filtrasyon yönteminde, iyon değişimi ve afinite kromatografilerinin aksine moleküller, kromatografik bir ortama bağlanmaz; dolayısıyla tampon çözeltinin pH'sı, iyonik kuvveti, bileşimi ve konsantrasyonu, çözünürlüğü yani pikler arasındaki ayrılma derecesini doğrudan etkilemez. Bu faktörler, sadece tampon çözelti değişimi hedeflendiği zaman göz önünde bulundurulmalıdır (Rosenberg 2005).

Bir ayırma işlemini gerçekleştirmek için jel filtrasyon ortamı bir yatak oluşturacak şekilde kolon içinde paketlenmiştir. Kolon içindeki filtrasyon ortamı gözenekli bir matriksten, bu matriks de fiziksel ve kimyasal dayanıklılıkları ile inörtlük durumlarına (reaktif ya da adsorptif özelliği olmayan) göre seçilmiş küresel partiküllerden oluşmaktadır. Kolondan öncelikle tampon madde geçirilerek matriksteki

gözeneklerin ve partiküller arasındaki boşlukların tamponla dengelenmesi sağlanmaktadır. Gözenekler içindeki sıvı kimi zaman durgun faz olarak tabir edilir ve bu sıvı, mobil faz olarak tabir edilen partiküller arasındaki sıvı ile denge halindedir. Ayırma işlemi sırasında farklı tampon çözeltiler kullanmaya gerek yoktur, elüsyon izokratik olarak yapılabilir. Fakat kolonda kalmış herhangi bir molekülü uzaklaştırmak, kolonu bir sonraki kullanıma hazır hale getirmek için ayırma işleminden sonra yıkama aşamasının uygulanması gerekmektedir (Anonymous 2014d). Şekil 3.4'te jel filtrasyon yöntemi ile moleküllerin ayrılması şematik olarak gösterilmiştir (Anonymous 2014e).



Şekil 2.10. Jel filtrasyon ile farklı boyuttaki moleküllerin ayrılması

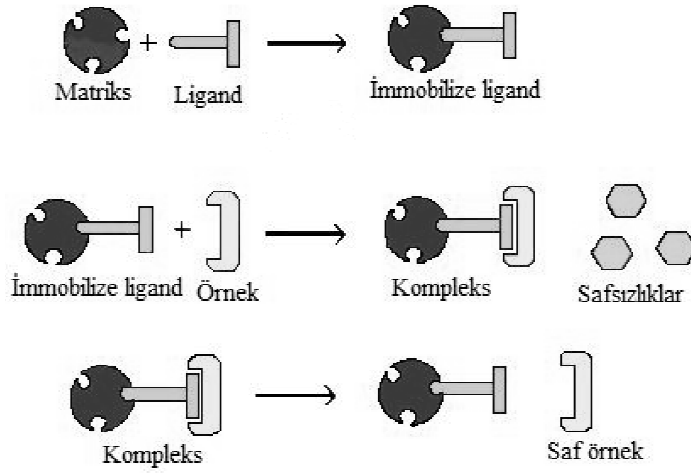
2.5.2. Afinite kromatografisi

Afinite kromatografisi, birçok biyolojik molekülün ayırma ve saflaştırılmasında yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Bu teknik; enzim-substrat, enzim-inhibitör, antijen-antikor gibi biyolojik molekül çiftleri arasındaki oldukça spesifik interaksyonlara (etkileşimlere) bağlıdır ve bu yöntemle ayırma işlemi, moleküllerin fonksiyonu veya kimyasal yapısı temel alınarak yapılmaktadır (Stanbury vd 1995).

Afinite kromatografisi tekniğinde kullanılan kolon, çözünmez bir destek materyali (matriks) içermekte olup molekül çiftlerinden biri olan bağlayıcı madde (ligand) bu matrikse immobilize edilmiştir (Stanbury vd 1995). Yanlış immobilizasyon yönteminin seçilmesi ligandın değişmesine ya da denatüre olmasına neden olabilmektedir. Örneğin immobilizasyon sırasında enzimin optimum pH noktası değişebilmekte veya ligandın aktivitesinin değişimine ve hatta destek maddesinin gözenekliliğinin değişimine neden olabilen bağ oluşumu söz konusu olabilmektedir. Bu

nedenle immobilizasyon yönteminin seçimi, ayırma tekniğinin başarısında önemli bir rol oynamaktadır (Kim ve Hage 2006).

Ayırma işlemi için hedef alınan bileşeni içeren örnek, uygulama tamponu olarak da isimlendirilen, uygun bir mobil faz (zayıf) yardımıyla kolondan geçirilmektedir. Örnek kolondan geçerken birbirini tamamlayıcı olan biyolojik molekül çiftleri bağlanıp kolonda tutulurken diğer bileşenler kolonda tutunmadan geçmektedir. Bu işlemin ardından kolonda tutulan hedef maddeyi ayırmak için kolondan, oluşan molekül çiftlerini ayırabilecek, elüsyon tamponu olarak da ifade edilebilen, başka bir mobil faz (kuvvetli) geçirilmekte ve ilgilenilen maddenin kolondan ayrılması sağlanmaktadır. Ardından kolondan tekrar uygulama tamponu geçirilerek kolonun rejenerasyonu sağlanmaktadır (Hage ve Ruhn 2006). Afinite kromatografisinin temel prensibi Şekil 2.11’de gösterilmiştir (Anonymous 2014f).



Şekil 2.11. Afinite kromatografisinin prensibi

Afinite kromatografisi biyoafinite, immunoafinite, DNA afinitesi, boronat afinitesi, biyomimetik afinite ve metal iyonu afinitesi gibi çeşitli alt dallara ayrılmaktadır. Bu yöntemler protein, enzim, karbonhidrat, vitamin gibi pek çok molekülün ayrılmasında, antijen ve antikor saflaştırılmasında kullanılabilir (Hage 2006).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Araştırma kapsamında kullanılan *Bacillus* suşları, Erem (2007) tarafından sünme (rope) hastalığı oluşmuş ekmeklerden izole edilip klasik testler ve API test kitleri ile tanılanmıştır. Kontrol suşları olarak kullanılan *Bacillus cereus* 2248 (enterotoksijenik suş) ve *Bacillus cereus* 2455/2 (emetik suş) Helsinki Üniversitesi HAMBİ Kültür Koleksiyonu'ndan (<http://www.helsinki.fi/hambi/>), *Bacillus subtilis* RSK 244 ve *Bacillus subtilis* RSK 246 suşları Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı'ndan temin edilmiş; *Bacillus subtilis* PY22 suşu ise daha önceki bir çalışmada (Karakaş 2009) kullanılmış olup araştırmacı tarafından sağlanmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Optik yoğunluk (OD) ölçümü

Fermantasyon ortamından alınan örnek, steril suyla seyreltilmiş ve kör olarak steril besiyeri kullanılarak 600 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır. Seyreltmeler maksimum 0.4 absorbans verecek şekilde ayarlanmıştır.

3.2.2. Ham enzim çözeltisinin hazırlanması

Fermantasyon ortamından alınan örneğin 20000g 4 °C'de 15 dak. santrifüjlenmesi ile elde edilen supernatant, ham enzim çözeltisi olarak analizlerde kullanılmıştır.

3.2.3. Peptidaz aktivitesinin belirlenmesi

3.2.3.1. Spektrofotometrik yöntemle aktivitenin tespit edilmesi

Peptidaz aktivitesinin belirlenmesi için Anson (1938) ve Cupp-Enyard'ın (2008) metodu modifiye edilmiş; substrat olarak kazein kullanılarak, mevcut peptidaz varlığında kazeinin parçalanması sonucu açığa çıkan serbest tirozinin spektrofotometrede (Biochrom Libra, Cambridge-İngiltere) 660 nm'de absorbansı ölçülmüştür. Bunun için; bir tanesi kör olmak üzere 3 adet 3 ml'lik test tüpüne %0.65'lik (w/v) kazein çözeltisinden¹ 1 ml aktarılmış ve 37 °C'de 5 dak. bekletilmiştir. Ardından kör dışındaki tüplere farklı miktarlarda (en fazla 200 µl olacak şekilde) ham enzim çözeltisi² ilave edilip vorteks (Vortex Genie 2, ABD) ile karıştırılarak 37 °C'de 10 dak. inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonunda reaksiyonu durdurmak için bütün tüplere 1 ml 110 mM triklorasetik asit (TCA)³ ilave edilmiş, kör dahil olmak üzere bütün tüplere son enzim çözeltisi miktarı 200 µl olacak şekilde ham enzim çözeltisi eklenmiş ve tüpler vorteks ile karıştırılarak 37 °C'de 30 dak. inkübasyona bırakılmıştır. Örnekler

¹ pH 7.5 olan 50 mM potasyum fosfat tamponu ile taze olarak hazırlanıp kullanılmıştır.

² Gerekli olduğu durumlarda ham enzim çözeltisi, pH'sı 7.5 olan 5 mM kalsiyum asetat içeren 10 mM sodyum asetat tamponu ile seyreltilerek kullanılmıştır.

³ 6.1 N stok TCA'nın 1:55 oranında saf su ile seyreltilmesi ile hazırlanmıştır.

10000g 4 °C’de 10 dak. santrifüjlendikten sonra 2 ml’lik mikrosantrifüj tüplerine 400 µl supernatant paralelli olarak aktarılmış, üzerlerine 1 ml 500 mM sodyum karbonat (Na₂CO₃) ve 200 µl 0.5 M Folin Ciocalteu ilave edilmiş ve vorteks ile karıştırılarak tekrar 37 °C’de 30 dak. inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda örnekler tekrar 10000g 4 °C’de 5 dak. santrifüjlenmiş ve spektrofotometre küvetine 1 ml supernatant aktararak 660 nm’de absorbans ölçülmüştür.

Hesaplamalar L-tirozin standardı ile oluşturulmuş kalibrasyon eğrisine ve aşağıda verilen formüle göre yapılmıştır. Tirozin için standart eğri örneği Ek 1’de verilmiştir.

$$\text{Peptidaz aktivitesi} = \frac{\text{Açığa çıkan tirozin miktarı} \times \text{Analizdeki toplam hacim}}{\text{Reaksiyon süresi} \times \text{Enzim miktarı} \times \text{Küvete aktarılan örnek hacmi}}$$

- Peptidaz aktivitesi = ünite/ml
- Açığa çıkan tirozin miktarı = mg (L-tirozin kalibrasyon eğrisine göre hesaplanır)
- Analizdeki toplam hacim = 2.2 ml
- Reaksiyon süresi = 10 dak.
- Enzim miktarı = 10 dakikalık reaksiyon öncesinde ilave edilen enzim miktarı (ml)
- Küvete aktarılan örnek hacmi = 1 ml

Bir ünite enzim aktivitesi; kazeinin parçalanması ile 37 °C’de 1 dakikada 1 mg ml⁻¹ tirozin açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

3.2.3.2. Zon alanının ölçülmesi ile aktivitenin kalitatif olarak tespit edilmesi

Peptidaz aktivitesinin kalitatif olarak, petride oluşturduğu zon alanına göre belirlenmesi için kazeini sindirme metodu (casein digestion method) kullanılmıştır (Saran vd 2007). Bu amaçla 90 mm çaplı petrilere 14 ml milk agar dökülmüş, agar katılaştıktan sonra petrilerin ortalarına 1 cm çaplı steril mantar delici (cork borer) ile kuyucuk oluşturulmuştur. Kuyucukların içine önce 40 µl agar agar ardından 40 µl ham enzim çözeltisi ilave edilmiş ve 37 °C’de 1 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda petrilere %10’luk tannik asitten 10 ml ilave edilmiş ve kuyucuk etrafında berrak zon oluşumu gözlenerek kumpas yardımıyla zonun çapı ölçülmüştür. Zon alanı aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$\text{Zon alanı} = \text{Berrak zonun alanı} - \text{Kuyucuk alanı}$$

$$\text{Zon alanı} = \pi \left(\frac{R}{2} \right)^2 - \pi \left(\frac{r}{2} \right)^2 \quad (3.1.)$$

R: Berrak zonun çapı

r: Kuyucuk çapı

3.2.4. Protein miktarının belirlenmesi

Protein miktarının belirlenmesi için Bradford (1976) ve Anonymous'un (2013) metodu modifiye edilerek kullanılmıştır. Bunun için ham enzim çözeltisinden uygun dilüsyonlar hazırlandıktan sonra 100 µl alınmış ve üzerine 3 ml Bradford ayırıcı ilave edilerek oda sıcaklığında, karanlıkta, 10 dak. inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 595 nm dalga boyunda absorbans ölçülmüş ve standart olarak bovine serum albumin kullanılarak oluşturulan eğri yardımıyla hesaplamalar yapılmıştır. Albumin ile elde edilen standart eğri örneği Ek 1'de verilmiştir.

3.2.5. Glukoz miktarının belirlenmesi

Glukoz miktarının belirlenmesi¹ için Miller'in (1959) metodu modifiye edilerek kullanılmıştır. Bunun için ham enzim çözeltisinden 600 µl alınarak üzerine 600 µl DNS ayırıcı ilave edilmiştir. Ardından 90 °C'de 15 dak. ısıtım uygulanmış ve süre sonunda tüplere 200 µl %40'luk potasyum sodyum tartarat çözeltisi ilave edilmiştir. Tüpler 5 dak. buzda bekletildikten sonra 575 nm dalga boyunda absorbans ölçülmüştür. Standart çözelti olarak glukoz kullanılmış ve bununla oluşturulan eğri yardımıyla hesaplamalar yapılmıştır. Glukoz ile elde edilen standart eğri örneği Ek 1'de verilmiştir.

3.2.6. Gram boyama

Temiz bir lam üzerine hücre kültürü ince bir film halinde yayılmış, havada kurumaya bırakıldıktan sonra bunzen bekenden üç kez geçirilerek bakterilerin lam üzerine tespiti (fiksasyon) yapılmıştır. Hazırlanmış preparatın üzerine kristal viyole boyası damlatılıp 1 dakika bekledikten sonra distile su ile yıkanarak kristal viyole uzaklaştırılmıştır. Preparata bu kez lugol çözeltisi damlatılarak 1 dakika bekletilmiş ve distile su ile yıkanarak lugol çözeltisi uzaklaştırılmıştır. Preparatın üzerine %96'luk etil alkol damlatılarak 10-15 saniye beklenmiş, distile su ile yıkanmış ve karşıt boya olarak safranin damlatılarak 10-30 saniye bekletilmiştir. Preparat distile su ile yıkanarak havada kendi halinde kurumaya bırakılmış ve preparata immersiyon yağı damlatılarak 100'lük objektifle incelenmiştir (Temiz 2000).

3.2.7. *Bacillus* suşlarının enterotoksin üretme açısından taranması

3.2.7.1. Hücre kültürlerinin hazırlanması

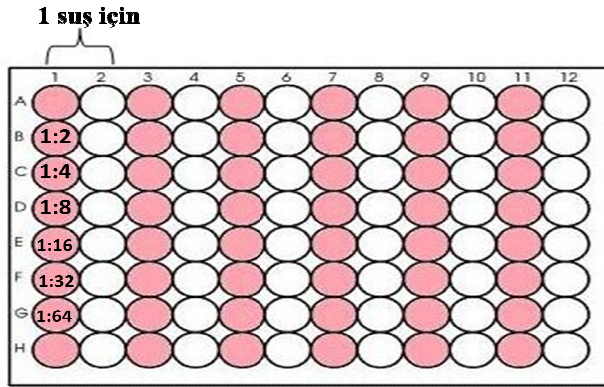
Mevcut bakteriler 50 ml nutrient broth (NB) içeren engelli erlenlerde 37 °C'de 200 rpm'de 18 saat inkübe edilmiş, inkübasyon sonunda bakterilerin optik yoğunluğu 600 nm dalga boyunda ölçülmüş ve içerisinde 50 ml brain heart infusion broth (BHIB) bulunan engelli erlenlere, her bir bakterinin başlangıç optik yoğunluğu (OD) 0.1 olacak şekilde, hesaplanan hacimlerde inokülasyon yapılmıştır. Çalkalamalı inkübatörde (New Brunswick Scientific, Excella E24, ABD) 37 °C'de 200 rpm'de 18 saat inkübasyonun

¹ Aslında yöntem toplam indirgen şeker miktarını tespit etmektedir. Ancak fermentasyon ortamında sadece glukoz bulunduğundan, glukoz miktarının belirlenmesi olarak ifade edilmiştir.

ardından bakteri hücrelerini ayırmak için hücre kültürü santrifüjlenmiş (10000g, 10 dak., 4 °C) ve supernatant ayrılarak analizlerde kullanılmıştır¹.

3.2.7.2. BCET-RPLA ile enterotoksin tespiti

BCET-RPLA (*Bacillus cereus* enterotoxin-reversed phase latex agglutination) kiti (Oxoid, İngiltere) ile gerçekleştirilen, *Bacillus cereus* diyarel enterotoksin (hemolitik toksin) testi için V tabanlı 96 kuyucuklu mikrolakada, her bir suş için ise mikrolakada 2 sütun kullanılmıştır. Mikrolakanın şematik gösterimi Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1. BCET-RPLA kiti için mikrolakada

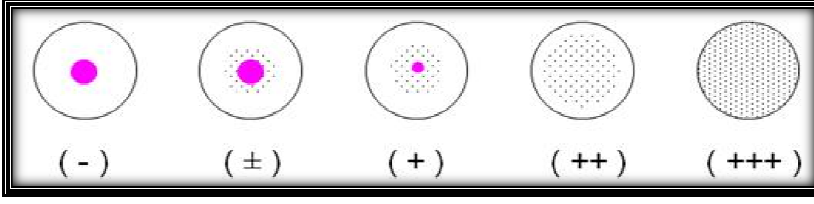
Öncelikle A satırı hariç olmak üzere, kullanılacak olan tüm kuyucuklara kitle birlikte gelen seyreltme çözeltilisinden (diluent)² 25 µl koyulmuştur. Ardından A ve B satırlarındaki tüm kuyucuklara 25 µl test örneği (supernatant) ilave edilmiş, plaka hafif sallanarak seyreltme çözeltilisi ile test örneğinin karışması sağlanmıştır. Daha sonra B satırından başlanarak her bir kuyucuktan 25 µl örnek alınmış ve aynı sütun boyunca kendinden sonraki satırdaki kuyucuğa aktararak test örneğinin seyreltilmesi sağlanmıştır. Seyreltme işlemine H satırına kadar devam edilmiştir. Bu durumda A satırındaki tüm kuyucuklarda sadece test örneği, H satırındaki tüm kuyucuklarda sadece seyreltme çözeltilisi, ara satırlarda ise farklı oranlarda seyreltilmiş test örneğinin olması sağlanmıştır. Daha sonra her bir suş için ilk sütundaki kuyucuklara duyarlı lateks (sensitised latex), ikinci sütundaki kuyucuklara ise kontrol lateks (latex control) çözeltilisinden ilave edilmiştir. Plakanın kapağı kapatılarak siyah zemin üzerinde 20-24 saat bekletilmiş ve süre sonunda kuyucuklarda çökme olup olmadığı incelenmiştir (Anonymous 2011a). Çökme durumuna göre sonuç değerlendirilmesi Şekil 3.2'ye göre yapılmıştır. Analizlerde *Bacillus cereus* 2248³ (Agata vd 1995), enterotoksin açısından referans suş olarak kullanılmış, ayrıca kitle birlikte gelen pozitif kontrolden de (saf toksin)⁴ bu amaçla yararlanılmıştır.

¹ *Bacillus* diyarel enterotoksini cama yapışabildiğinden yapılan analizlerde polipropilen (PP) veya polikarbonat (PC) malzemeler kullanılmıştır.

² Bovine serum albumin içeren tuzlu fosfat tamponu.

³ Agata vd (1995) bu suşu B-4ac olarak kodlamışlardır.

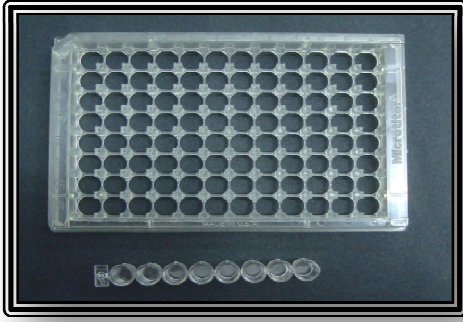
⁴ Liyofilize edilmiş *Bacillus cereus* enterotoksini.



Şekil 3.2. BCET-RPLA kiti sonuç değerlendirme şeması

3.2.7.3. BDEVIA ile enterotoksin tespiti

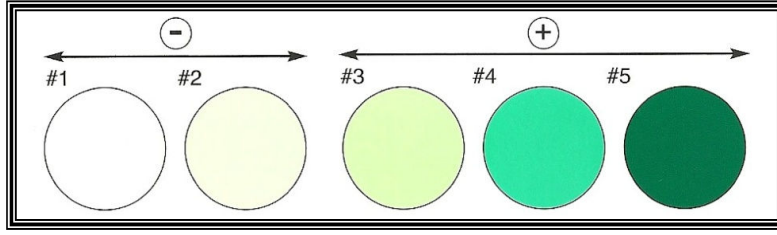
BDEVIA (*Bacillus diarrhoeal enterotoxin visual immunoassay*) kiti (3M Tecra, ABD) ile gerçekleştirilen, *Bacillus cereus* diyarel enterotoksin (hemolitik olmayan toksin) testi için kitle birlikte gelen antikor kaplı kuyucuklar kullanılmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. BDEVIA kitinin antikor kaplı kuyucukları ve kuyucuk tablası

Tablaya yerleştirilen kuyucuklara öncelikle yıkama çözeltisinden doldurularak 20-25 °C’de 10 dak. beklenmiştir. Süre sonunda yıkama çözeltisi boşaltılmış ve kuyucuklara 200 µl örnek çözeltisi ile pozitif kontrol (PC) ve negatif kontrol (NC) koyularak 37 °C’de 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon bitiminde mikropolaka yıkayıcı (BioTek ELx800, ABD) kullanılarak yıkama çözeltisi ile kuyucuklar 4 kez yıkanmıştır. Ardından kuyucuklara conjugate eklenip 20-25 °C’de 1 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda kuyucuklar mikropolaka yıkayıcı ile 5 kez yıkanmış, 200 µl substrat çözeltisi eklenerek 20-25 °C’de 30 dak. süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda rengin dağılması için plaka yavaşça sallanmış ve Şekil 3.4.’deki renk kartı kullanılarak değerlendirme yapılmıştır. Testin geçerli olması için PC’nin rengi en az #4 kadar koyu, NC’nin rengi ise en fazla #2 kadar koyu olmalıdır. PC’nin rengi en az #4 kadar koyu ise tepkimeyi sonlandırmak için kuyucuklara 20 µl durdurma (stop) çözeltisi eklenmiş ve mikropolaka okuyucu (BioTek µQuant Monochromatic Spectrophotometer, ABD) ile PC’nin maksimum absorbans verdiği belirlenen 420 nm dalga boyunda 30 dak. içinde okuma yapılmıştır (Anonymous 2011b). Absorbansı 0.2’den daha büyük olan örnekler test açısından pozitif olarak değerlendirilmiştir¹.

¹ Değerlendirmenin, absorbans ölçülmeden, sadece renk kartı ile yapılması da mümkündür.



Şekil 3.4. BDEVIA kitinin sonuç değerlendirme renk kartı

3.2.8. *Bacillus* suşlarının peptidaz üretme kapasitelerinin belirlenmesi

Toksin analizleri sonucunda toksin üretmediği tespit edilen *Bacillus* izolatları için peptidaz aktivitesi testi yapılmış ve aktivitesi en yüksek olan türler optimizasyon çalışmasında kullanılmıştır. Peptidaz aktivitesinin tespiti için *Bacillus* izolatları NB'de 37 °C'de 18 saat olmak üzere 250 rpm çalkalama hızında geliştirilerek ön kültür hazırlanmış, ardından bu ön kültürden temel sıvı besi ortamına (Çizelge 3.1) başlangıç yoğunluğu 0.1 OD olacak şekilde aktarım yapılmıştır. Daha sonra 3 gün farklı sıcaklıklarda fermantasyon yapılmış ve fermantasyon süresince 24 saatte bir örnek alınıp önce OD ölçümü gerçekleştirilmiş, ardından 20000g 4 °C'de 15 dak. santrifüjlenerek elde edilen supernatanta (ham enzim çözeltisi) peptidaz aktivitesi testi uygulanmıştır.

Fermantasyonlar 30 °C, 37 °C, 50 °C ve 55 °C'de, 50 ml besiyeri içeren 250 ml'lik engelli cam erlenlerde çalkalamalı inkübatörde (Sartorius Certomat IS, Almanya) 250 rpm hız ile yapılmıştır. Daha önce ön denemelerle, bakterilerin bu sıcaklıklarda gelişme gösterip göstermedikleri optik yoğunluk ölçümü ile takip edilmiş ve fermantasyonun gerçekleştirileceği sıcaklık derecelerine buna göre karar verilmiştir.

Çizelge 3.1. *Bacillus* türlerinin peptidaz üretme kapasitelerinin belirlenmesi için fermantasyonda kullanılan temel sıvı besi ortamının bileşimi

Glukoz	2 g/L
Maya ekstraktı	10 g/L
KH ₂ PO ₄	1 g/L
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	3 g/L
Na ₂ SO ₄	2 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.1 g/L

3.2.9. Peptidaz üretimi için kültür koşullarının belirlenmesi

3.2.9.1. Ön kültürün hazırlanması ve fermantasyon koşulları

İnokülasyon için ön kültür, bakterilerin nutrient brothda 37 °C 250 rpm'de 18 saat geliştirilmesi ile elde edilmiş ve enzim üretiminin gerçekleştirileceği 50 ml besiyeri içeren 250 ml'lik erlenlere başlangıç OD 0.1 olacak şekilde (v/v) aktarılmıştır. Her bir

suş, bir önceki aşamada belirlenen en iyi peptidaz aktivitesi gösterdiği sıcaklıkta (K1 30 °C, K10 ve N8 37 °C'de) 250 rpm'de 48 saat fermantasyona bırakılmış ve 24 saatte bir örnek alınarak OD ve peptidaz aktivitesi ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.9.2. Peptidaz üretimi için en uygun karbon kaynağının belirlenmesi

Mevcut bakterilerin peptidaz üretme kapasitelerinin belirlenmesinin ardından aktivite açısından en uygun bulunan üç suş (K1, K10, N8) için karbon kaynağı testi uygulanmıştır. Karbon kaynağının seçilmesi, bir kerede bir faktörün (one-factor-at-a-time/OFAT) değiştirilmesi yaklaşımına göre yapılmış, bu amaçla Çizelge 3.1'de verilen temel sıvı besi ortamındaki glukoz yerine aynı oranda sakaroz, nişasta, arabinoz, ksiloz, manitol ve sorbitol içeren besiyerlerinden yararlanılmıştır. Bundan sonra yapılan tüm fermantasyonlarda besiyerine, aktivite-maliyet dengesi açısından en uygun karbon kaynağı ilave edilmiştir.

3.2.9.3. Peptidaz üretimi için en uygun azot kaynağının belirlenmesi

Karbon kaynağının seçilmesinin ardından, seçilen karbon kaynağı kullanılarak aktivite açısından en uygun olan azot kaynağı belirlenmiştir. Bunun için bir kerede bir faktörün (one-factor-at-a-time/OFAT) değiştirilmesi yaklaşımına göre Çizelge 3.1'de verilen temel sıvı besi ortamındaki maya ekstraktı yerine aynı oranda kazein, pepton ve yeast nitrogen base (YNB) kullanılmıştır. Bundan sonra yapılan tüm fermantasyonlarda besiyerine, aktivite-maliyet dengesi açısından en uygun azot kaynağı ilave edilmiştir.

3.2.9.4. Peptidaz üretimi için çalkalama hızının belirlenmesi

Daha önceki aşamalarda seçilen karbon ve azot kaynağını içeren besiyerlerine inokülasyon yapıldıktan sonra fermantasyon 100, 180 ve 250 rpm'de gerçekleştirilmiştir. En iyi aktivite değerinin elde edildiği çalkalama hızı sonraki aşamalarda kullanmak üzere seçilmiştir.

3.2.9.5. Peptidaz aktivitesi üzerine besiyeri başlangıç pH'sının etkisi

Seçilen karbon ve azot kaynağını içeren besiyerlerinin pH'sı 6 N NaOH ve 6 N HCl kullanılarak 5.0, 5.8, 6.8, 8.2 ve 9.0'a ayarlanmış; inokülasyondan sonra, tespit edilen çalkalama hızında 24 saat fermantasyon yapılmıştır.

3.2.9.6. Peptidaz aktivitesi üzerine karbon kaynağı/azot kaynağı oranının belirlenmesi

Tespit edilen karbon ve azot kaynakları besiyerine, oranları 1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 2:5, ve 2:1 olacak şekilde ilave edilmiş ve fermantasyon gerçekleştirilmiştir.

3.2.9.7. Ön kültür hazırlamada kullanılan besiyerinin etkisi

Peptidaz üretimi için ön kültür, hem nutrient brotha hem de önceki aşamalarda üretim için belirlenmiş bileşenleri (karbon, azot, C/N oranı) içeren sıvı besi ortamına nutrient agarda gelişmiş birer kolonininin aktarılması suretiyle hazırlanmış ve 37 °C 250 rpm'de 18 saat inkübe edilmiştir.

3.2.10. Yanıt yüzey yöntemi ile peptidaz üretiminin optimizasyonu

3.2.10.1. Stok bakteri kültürünün hazırlanması

Yanıt yüzey yöntemi ile optimizasyon işlemine geçmeden önce ön kültür koşullarından kaynaklanabilecek sapmaları en aza indirmek için stok bakteri kültürleri hazırlanmıştır. Bunun için; nutrient agarda geliştirilmiş olan K1 kültüründen tek koloni alınıp 50 ml nutrient brothda 37 °C 250 rpm'de 18 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültür, %50'lik gliserol ile eşit oranda karıştırılmış, karışımdan 2 ml'lik steril tüplere 1'er ml aktarılmış ve tüpler -80 °C'de muhafaza edilmiştir. Bundan sonraki tüm fermentasyon işlemlerinde ön kültür, -80 °C'de muhafaza edilmiş olan tüplerden 1 tane alınıp 50 ml'lik besiyerine tamamen aktarılmak suretiyle hazırlanmıştır.

3.2.10.2. K1 suşunun büyüme eğrisinin oluşturulması, spesifik gelişme oranı ve ikiye katlanma süresinin hesaplanması

Stok bakteri kültürü kullanılarak ön kültür hazırlanmış ve 37 °C 250 rpm'de inkübasyon sırasında 1'er saat aralıklarla örnek alınarak OD ölçümü yapılmıştır. Analiz 4 tekerrürlü, ölçümler ise 2 paralelli olarak yapılmıştır. Zamana karşı OD değerleri ile grafik oluşturularak büyüme eğrisi elde edilmiş, spesifik gelişme oranı (μ) ve ikiye katlanma süresi ortalama değer üzerinden hesaplanmıştır.

Spesifik gelişme oranı (büyüme hızı) (sa^{-1}): Ekspansiyel fazda birim zamanda hücre sayısındaki artış olarak tanımlanır.

$$\mu = \text{Ekspansiyel fazda } \ln(\text{OD}) \text{ ye karşı zaman grafiğinin eğimi} \quad (3.2)$$

İkiye katlanma süresi (t_d):

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (3.3)$$

3.2.10.3. Yanıt yüzey yöntemi

Yanıt yüzey yöntemi için kullanılan deneme deseni Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Yanıt yüzey yöntemi merkezi tümleşik (central composite) deneme deseni

Standart sıra	Uygulama sırası	PfType	Blok	Sıcaklık (°C)	pH	İnokulum oranı (%)
1	1	1	1	25.07	5.81	1.81
2	2	1	1	39.93	5.81	1.81
3	3	1	1	25.07	8.19	1.81
4	4	1	1	39.93	8.19	1.81
5	5	1	1	25.07	5.81	4.19
6	6	1	1	39.93	5.81	4.19
7	7	1	1	25.07	8.19	4.19
8	8	1	1	39.93	8.19	4.19
9	9	-1.682	1	20.00	7.00	3.00
10	10	1.682	1	45.00	7.00	3.00
11	11	-1	1	32.50	5.00	3.00
12	12	-1	1	32.50	9.00	3.00
13	13	-1	1	32.50	7.00	1.00
14	14	-1	1	32.50	7.00	5.00
15	15	0	1	32.50	7.00	3.00
16	16	0	1	32.50	7.00	3.00
17	17	0	1	32.50	7.00	3.00
18	18	0	1	32.50	7.00	3.00
19	19	0	1	32.50	7.00	3.00
20	20	0	1	32.50	7.00	3.00
21	21	1	2	25.07	5.81	1.81
22	22	1	2	39.93	5.81	1.81
23	23	1	2	25.07	8.19	1.81
24	24	1	2	39.93	8.19	1.81
25	25	1	2	25.07	5.81	4.19
26	26	1	2	39.93	5.81	4.19
27	27	1	2	25.07	8.19	4.19
28	28	1	2	39.93	8.19	4.19
29	29	-1.682	2	20.00	7.00	3.00
30	30	1.682	2	45.00	7.00	3.00
31	31	-1	2	32.50	5.00	3.00
32	32	-1	2	32.50	9.00	3.00
33	33	-1	2	32.50	7.00	1.00
34	34	-1	2	32.50	7.00	5.00
35	35	0	2	32.50	7.00	3.00
36	36	0	2	32.50	7.00	3.00
37	37	0	2	32.50	7.00	3.00
38	38	0	2	32.50	7.00	3.00
39	40	0	2	32.50	7.00	3.00
40	41	0	2	32.50	7.00	3.00

Yanıt yüzey yöntemi ile peptidaz üretiminin optimize edilmesi için merkezi tümleşik deneme deseninden (central composite-CCD) yararlanılmış; sıcaklık (20-45 °C), besiyeri başlangıç pH'sı (5-9) ve inokulum oranı (%1-5) faktör¹ olarak seçilmiştir. Seçilen faktörler ve seviyeleri kullanılarak Minitab (Version 17, Minitab Inc.) istatistik yazılım programı ile deneme deseni oluşturulmuştur. Fermantasyon denemeleri iki tekerrürlü ve üç paralelli yapılmış, tekerrürler deneme deseninde blok olarak değerlendirilmiş, her bir tekerrürde orta nokta 6'şar kez tekrarlanarak toplam 40 fermantasyon yapılmıştır. Deneme desenine göre gerçekleştirilen işlemler Ek 3'te verilmiştir.

3.2.11. Üretilen peptidazın saflaştırılması

3.2.11.1. Amonyum sülfatla çöktürme

Ham enzim çözeltisini konsantre etmek amacıyla bu çözeltiliye amonyum sülfat ilave edilerek proteinler çöktürülmüştür². Bunun için 20 ml ham enzim çözeltisi manyetik karıştırıcı üzerinde yavaşça karıştırılırken üzerine azar azar katı amonyum sülfat %80 doygunluğa erişinceye kadar ilave edilmiştir. Ardından 1 saat kadar daha karıştırılmaya devam edilmiş ve 20000g'de 20 dak. santrifüjlenmiştir. Supernatant ayrıldıktan sonra pellet üzerine 50 mM potasyum fosfat (pH 7.5) tamponundan 2 ml ilave edilerek pellet çözülmüştür. Proteinden amonyum sülfatın uzaklaştırılması için 5 ml'lik HiTrap desalting kolon (GE Healthcare, Sweden) kullanılmış, Äkta Prime (Amersham Biosciences, Sweden) protein saflaştırma cihazına bağlanan kolona 1.5 ml örnek yüklenmiş ve tampon çözelti olarak 50 mM potasyum fosfat (pH 7.5) kullanılarak 5 ml/dak akış hızı ile işlem gerçekleştirilmiştir.

3.2.11.2. Enzimin ultrafiltrasyon tüpleri ile konsantre edilmesi

Filtre edilmiş (0.45 µm) ham enzim çözeltisinden ultrafiltrasyon tüplerine (Vivaspin 20, 10000 MWCO, PES, Sartorius) 15 ml aktarılmış ve hacimsel olarak 10 katlık konsantrasyon sağlanıncaya kadar 8000g 4 °C'de santrifüjlenmiştir.

3.2.11.3. Afinite kromatografisi ile yapılan saflaştırma

Örnek ve çözeltilere uygulanan ön işlemler

Saflaştırma işlemlerinde kullanılacak tüm çözeltiler çift distile su ile hazırlanmış, ardından 0.22 µm'lik filtreden (PES) geçirilmiş ve degaz işlemi için ultrasonik su banyosunda (Bandelin Sonorex RK 255 H, Almanya) tutulmuştur.

Ham enzim çözeltisi de kolona yüklenmeden önce 0.45 µm'lik (PES, low protein binding) filtreden geçirilmiş ve 3.2.11.2'de anlatıldığı şekilde ultrafiltrasyon tüpleri ile konsantre edilmiştir. Ardından saflaştırma işleminde kullanılacak olan başlangıç tamponuna adapte etmek için ham enzim çözeltisi (1.5 ml), Äkta Prime

¹ Verilen faktör seviyeleri eksensel noktaları temsil etmektedir.

² Amonyum sülfatla çöktürme işlemi hem 4 °C hem de 20 °C'de yapılmıştır

protein saflaştırma cihazı kullanılarak 5 ml/dak hızla, jel filtrasyon prensibi ile çalışan HiTrap desalting kolona yüklenmiştir. Kolonun şartlandırılması ve asıl işlem pH'sı 7.0 olan 100 mM MOPS [3-(N-morfolino)propansülfonik asit] tamponu ile yapılmıştır. Bu işlem yapılırken cihazdan UV piki takip edilip, absorbansın sıfırlandığı noktaya kadar olan tüm fraksiyonlar (1'er ml'lik) toplanmıştır. Toplanan her bir fraksiyonda peptidaz aktivitesi ölçümü yapılmış (Bkz. 3.2.3.1) ve peptidaz aktivitesi gösteren fraksiyonlar birleştirilerek saflaştırmanın yapılacağı ana kolona yüklenmiştir.

Afinite kromatografisi ile peptidazın saflaştırılması

Kolon ve tampon çözelti seçimi Lauer vd (2000)'e göre yapılmıştır. Saflaştırma işlemi Äkta Prime protein saflaştırma cihazı kullanılarak 1 ml'lik HiTrap Blue HP (GE Healthcare, Sweden) kolon ile yapılmıştır. Bunun için öncelikle kolon başlangıç yani bağlayıcı (binding) tampon olan 100 mM MOPS (pH 7.0) ile şartlandırılmış ve kolona 1 ml/dak hız ile 5 ml örnek yüklenmiştir. Ardından yine 1 ml/dak hız ile kolondan 10 ml bağlayıcı tampon geçirilerek kolon yıkanmıştır. Kolona bağlanan peptidazı ayırmak için kolondan 25 ml elüsyon tamponu (100 mM MOPS, 1 M NaCl, pH 7.0) step gradient olarak geçirilmiş, yani tuz konsantrasyonu aşamalı olarak değil, bir anda 1 molar çıkarılmıştır. Kolona örneğin yüklendiği andan, elüsyon işleminin tamamlandığı ana kadar 1'er ml'lik fraksiyonlar toplanmıştır. Fraksiyon toplama işlemine sadece tuz konsantrasyonu yükseltilirken ara verilmiş (zaten bu sırada kolondan tampon çözelti geçmemektedir), konsantrasyon 1 M'a çıktıktan sonra tekrar fraksiyon toplanmıştır. Toplanan fraksiyonlardan peptidaz aktivitesi gösterenler sonraki analizlerde kullanılmıştır. Elüsyon sırasında toplanan fraksiyonlar, tuz arındırma işlemi (desalting) uygulandıktan sonra aktivite açısından test edilmiştir. Tuz arındırma işlemi HiTrap desalting kolon ile yapılmış ve tampon çözelti olarak 50 mM potasyum fosfat (pH 7.5) kullanılmıştır.

3.2.12. Üretilen peptidazın karakterize edilmesi

Üretilen enzimin karakterize edilmesi için yapılan tüm analizler hem ham enzim çözeltisi (supernatant=fermantasyon sıvısı) hem de HiTrap Blue kolondan geçirilerek kısmen saflaştırılan enzim çözeltisi için uygulanmıştır.

3.2.12.1. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Üretilen enzimin moleküler ağırlığının belirlenmesi ve saflığının kontrolü akrilamid oranı %5 olan yükleme ve %10 olan ayırma jeli kullanılarak SDS-PAGE ile (Laemmli 1970) yapılmıştır. Jeller stok çözeltiler kullanılarak hazırlanmış ve jel bileşenlerinin son konsantrasyonları Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Örneklerin hazırlanması: Protein örneğinden 19.5 µl alınarak 7.5 µl 4X SDS örnek tamponu (200 mM Tris-HCl pH 6.8, %8 SDS, %0.4 bromfenol mavisi, %40 gliserol) ve 3 µl 1 M DTT ile karıştırılmış, ardından 70 °C'de 10 dakika ısıtılmasına tabi tutularak denatüre edilmiştir.

Öncelikle ayırma jeli hazırlanmış, hemen cam plakalar arasına dökülüp polimerize olması için beklenmiştir. Polimerizasyonun ardından yükleme jeli dökülmüş

ve kuyucukların oluşması için elektroforez tarağı yerleştirilmiştir. Jeller, jel yürütme haznesine uygun şekilde yerleştirildikten sonra haznenin boşlukları TGS tamponu (25 mM Tris, 192 mM glisin, %0.1 SDS, pH 8.3) ile doldurulmuştur. Yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanan örnekler jele yüklenmiş ve 150 V akım altında 75 dakika boyunca elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir. Moleküler standart olarak 5 µl Page Ruler Unstained Protein Ladder (Pierce Biotechnology, ABD) kullanılmıştır.

Çizelge 3.3. SDS-PAGE’de kullanılan jellerin bileşimi

	Ayırma jeli	Yükleme jeli
Akrilamid	%10 (%9.7 akrilamid ve %0.3 N,N’-bis-metilen akrilamid karışımı)	%5 (%4.83 akrilamid ve %0.17 N,N’-bis-metilen akrilamid karışımı)
Tris-HCl tamponu	375 mM (pH 8.8)	125 mM (pH 6.8)
SDS	%0.1	%0.1
Amonyum persülfat (APS)	%0.1	%0.1
Tetra metil etilendiamin (TEMED)*	%0.04	%0.1

*TEMED karışıma en sonda ilave edilmiştir.

Elektroforez işleminden sonra jeller önce saf su içinde orbital çalkalayıcıda 15 dakika bekletilmiş, ardından Comassie mavisi çözeltisi ile 1 saat orbital çalkalayıcıda (VWR, STD 5000, ABD) bekletilerek boyanmıştır. Daha sonra birkaç kez boya giderici çözelti (%20 metanol, %10 asetik asit, %70 distile su) içinde yine orbital çalkalayıcıda bekletilerek boyanın yıkanması sağlanmış ve jeller görüntüleme sistemi (LiCor Odyssey, ABD) ile taranarak incelenmiştir.

3.2.12.2. Zimografi

Örnek içindeki peptidazın sayı ve boyut olarak görüntülenmesi için zimografi analizi, Fernández-Resca vd (1994) ile Leber ve Balkwill’in (1997) yöntemleri modifiye edilerek yapılmıştır. Zimografi jellerinin hazırlanması prensip olarak SDS-PAGE’de yapıldığı gibidir (Bkz. 3.2.12.1). Ancak jel bileşiminde bazı farklılıklar bulunmaktadır Çizelge 3.4’de zimografi jellerinin bileşimi verilmiştir.

Örneklerin hazırlanması: Protein örneğinden 21 µl alınarak 7 µl 4X SDS örnek tamponu ile karıştırılmıştır.

Jeller, jel yürütme haznesine uygun şekilde yerleştirildikten sonra haznenin boşlukları TGS tamponu (25 mM Tris, 192 mM glisin, %0.1 SDS pH 8.3) ile doldurulmuş, örnekler jele yüklenmiş ve 150 V akım altında 75 dakika elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir. Moleküler standart olarak 5 µl Page Ruler Unstained Protein Ladder (Pierce Biotechnology, ABD) kullanılmıştır.

Elektroforez işleminin tamamlanmasının ardından jeller, 30 dakika sonra tampon yenilenmek üzere 2 kez renatürasyon tamponu (%2.5 Triton X-100) içinde orbital çalkalayıcıda (VWR, STD 5000, ABD) 1 saat boyunca bekletilmiştir. Jeller daha sonra

geliştirme tamponuna (50 mM Tris, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, %0.02 NaN₃) aktarılıp yine orbital çalkalayıcıda 15 dak. bekletilmiştir. Süre sonunda tampon yenilenmiş ve buharlaşmayı önlemek için parafilm ile sarılarak 37 °C'de bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyonun bitiminde jellerin boyanması ve boyanın giderilmesi SDS-PAGE'de olduğu gibi yapılmış ve jeller görüntüleme sistemi (LiCor Odyssey, ABD) ile taranarak incelenmiştir.

Çizelge 3.4. Zimografide kullanılan jellerin bileşimi

	Ayrırma jeli	Yükleme jeli
Akrilamid	%10 (%9.7 akrilamid ve %0.3 N,N'-bis-metilen akrilamid karışımı)	%5 (%4.83 akrilamid ve %0.17 N,N'-bis-metilen akrilamid karışımı)
Tris-HCl tamponu	375 mM (pH 8.8)	125 mM (pH 6.8)
Kazein	%0.08	-
Amonyum persülfat (APS)	%0.1	%0.1
Tetra metil etilendiamin (TEMED)*	%0.04	%0.1

*TEMED karışıma en sonda ilave edilmiştir

3.2.12.3. Enzimin optimum pH değeri ve pH kararlılığının belirlenmesi

Enzimin optimum pH değerinin belirlenmesi için 50 mM'lık farklı tampon sistemleri içinde hazırlanmış, %0.65'lik (w/v) kazein çözeltisi kullanılarak 3.2.3.1'de anlatılan peptidaz aktivitesi testi uygulanmıştır. Tampon sistemleri olarak sodyum sitrat (pH 6), potasyum fosfat (pH 7.0 ve 7.5), Tris-HCl (pH 8.0, 8.5 ve 9.0), Glisin-NaOH (pH 10 ve 11) ve KCl-NaOH (pH 12 ve 13) kullanılmıştır. Optimum pH değeri tespit edildikten sonra karakterizasyon için yapılan tüm analizler, belirlenen pH değerinde yapılmıştır.

Enzimin pH kararlılığının belirlenmesi için enzim çözeltileri yukarıda belirtilen farklı pH'lardaki tamponlar ile eşit hacimlerde karıştırılmış ve 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan hemen önce ve inkübasyondan 2 ve 18 saat sonra 3.2.3.1'de anlatılan yöntemle peptidaz aktivitesi ölçülmüştür. İnkübasyondan önce farklı pH'lar için belirlenen aktivite değerleri %100 kabul edilmiş, inkübasyon sonrasında belirlenen aktivite değerleri ise kalan aktivite yüzdesi olarak hesaplanmıştır (Öztürk 2007).

3.2.12.4. Enzimin optimum sıcaklık değeri ve sıcaklık kararlılığının belirlenmesi

Enzimin optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi için 3.2.3.1'de anlatılan yöntemle göre 50 mM fosfat tamponu (pH 7.5) içinde hazırlanan %0.65'lik (w/v) kazein çözeltisi ile karıştırılan enzim örnekleri 37 °C yerine 4-70 °C arasındaki farklı sıcaklıklarda 10 dak. inkübe edilmiş ve aktivite değeri ölçülmüştür.

Enzimin sıcaklık kararlılığının belirlenmesi için enzim çözeltileri 4-70 °C arasındaki farklı sıcaklıklarda ön inkübasyona bırakılmış ve inkübasyonun 10, 30, 60,

90 ve 120. dakikalarında örnek alınarak aktivite değerleri, 3.2.3.1’de anlatılan yöntemle belirlenmiştir. Ön inkübasyona bırakılmayan enzim örneğinin aktivitesi %100 kabul edilerek, inkübasyon sonrası aktivite değerleri kalan aktivite %’si olarak ifade edilmiştir.

3.2.12.5. Enzim aktivitesi üzerine peptidaz inhibitörlerinin etkisinin belirlenmesi

Üretilmiş olan enzim çözeltisindeki peptidazın sınıfının belirlenebilmesi için enzim çözeltileri farklı konsantrasyonlardaki peptidaz inhibitörleri ile karıştırıldıktan sonra 37 °C’de 30 dakika inkübe edilmiştir. Ardından peptidaz aktivitesi (60 °C’de olmak üzere) 3.2.3.1’de anlatılan yöntemle belirlenmiştir. İnhibitör ilave edilmeyen, aynı şekilde inkübe edilen enzimin aktivitesi %100 kabul edilerek, inhibitör ilaveli enzim örneklerinin aktivitesi bağıl olarak hesaplanmıştır. Kullanılan inhibitörler ve enzim örneği ile karıştırıldıktan sonraki son konsantrasyonları Çizelge 3.5’te verilmiştir.

Çizelge 3.5. Çalışmada kullanılan peptidaz inhibitörleri

İnhibitör	İnhibe ettiği peptidaz	Son konsantrasyon
PEP-A	Aspartik peptidaz	5, 10, 20 µM
E-64	Sistein peptidaz	10, 20, 40 µM
PMSF	Serin peptidaz	1, 2, 4 mM
O-FEN	Metalo peptidaz	1, 2, 4 mM
EDTA	Metalo peptidaz	1, 2, 4 mM

PEP-A ve O-FEN metanol, PMSF etanol, E-64 ise etanol-su karışımı (1:1) ile çözülerek hazırlanmıştır.

3.2.12.6. Enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisinin belirlenmesi

Enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisini belirlemek için enzim örnekleri farklı metal iyonları (BaCl₂, CaCl₂, CoCl₂, CuCl₂, FeCl₂, FeCl₃, MgCl₂, HgCl₂, MnCl₂, ZnCl₂, NiCl₂, KCl, NaCl) ile metal iyonlarının son konsantrasyonları 0.5 mM, 2,0 mM ve 5 mM olacak şekilde, eşit hacimlerde karıştırılmış ve 37 °C’de 30 dak. inkübe edilmiştir. Ardından aktivite değerleri (60 °C’de olmak üzere) 3.2.3.1’de anlatılan yöntemle belirlenmiştir. Yarı yarıya seyreltilmiş, aynı şekilde inkübe edilmiş, metal iyonu içermeyen enzim örneğinin aktivitesi %100 kabul edilerek, diğer aktivite değerleri bağıl olarak hesaplanmıştır.

3.2.12.7. Enzim aktivitesi üzerine bazı organik çözücü, deterjan katkı maddeleri ve yüzey aktif maddelerin etkisinin belirlenmesi

Enzim aktivitesi üzerine olan etkilerini belirlemek için organik çözücü olarak etanol, aseton, asetonitril ve ksilen (%1, %5 ve %20; v/v); deterjan katkı maddeleri olarak Triton X-100 (v/v) ve SDS (w/v) (%0.1, %0.5, %1); yüzey aktif madde olarak ise Tween 20 ve Tween-80 (%0.1, %0.5, %1; v/v) kullanılmıştır. Bu maddeler (belirtilen oranlar karışım içindeki son konsantrasyon olmak üzere) enzim örnekleri ile karıştırılmış ve 37 °C’de 30 dak. inkübe edildikten sonra 3.2.3.1’de anlatılan yöntemle

aktivite belirlenmiştir. Söz konusu maddeleri içermeyen, aynı oranda seyreltilmiş ve inkübe edilmiş enzim örneğinin aktivitesi %100 kabul edilerek, diğer aktivite değerleri bağıl olarak hesaplanmıştır.

3.2.13. İstatistiksel değerlendirme

Peptidaz üretiminin optimizasyonu aşamasında yanıt yüzey yöntemine göre verilerin değerlendirilmesi Minitab (Version 17) yazılım programı ile yapılmıştır. Bunun dışında istatistiksel değerlendirmenin gerekli olduğu yerlerde SAS istatistik programı (SAS Institute Inc. SAS System 9.0) kullanılarak analiz edilen parametrelerin bu faktörlere ilişkin değişim ve etkileri varyans analizleriyle (ANOVA) test edilmiş, önemli bulunan varyasyon kaynaklarının etki düzeyleri ise Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile ortaya koyulmuştur.

3.2.14. Bazı suşların moleküler metotlarla tanılanması

K1, K10 ve N8 suşlarının tanılanması REFGEN (Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Ltd. Şti., Ankara) tarafından 16S mikrobiyal tanımlama yöntemi ile yapılmış, tanılama işleminde primer olarak 27F ve 1492R kullanılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Araştırma sonuçlarının net bir şekilde verilebilmesi için bu tez çalışması 6 aşama olarak ele alınmıştır:

- I. Mevcut *Bacillus* suşlarının toksin üretilip üretilmediğinin belirlenmesi
- II. Toksin üretmeyen suşlar arasından peptidaz aktivitesi en yüksek olan türlerin fermantasyon sıcaklığı baz alınarak seçilmesi
- III. Seçilen *Bacillus* suşları açısından en uygun kültür ve enzim üretim koşullarının belirlenmesi
- IV. Yanıt yüzey yöntemi ile seçilen suşun peptidaz üretiminin optimize edilmesi
- V. Optimum koşullarda üretilmiş olan peptidazın kısmi olarak saflaştırılması
- VI. Kısmi olarak saflaştırılan enzimin karakterize edilmesi

4.1. Toksin Tarama Sonuçları

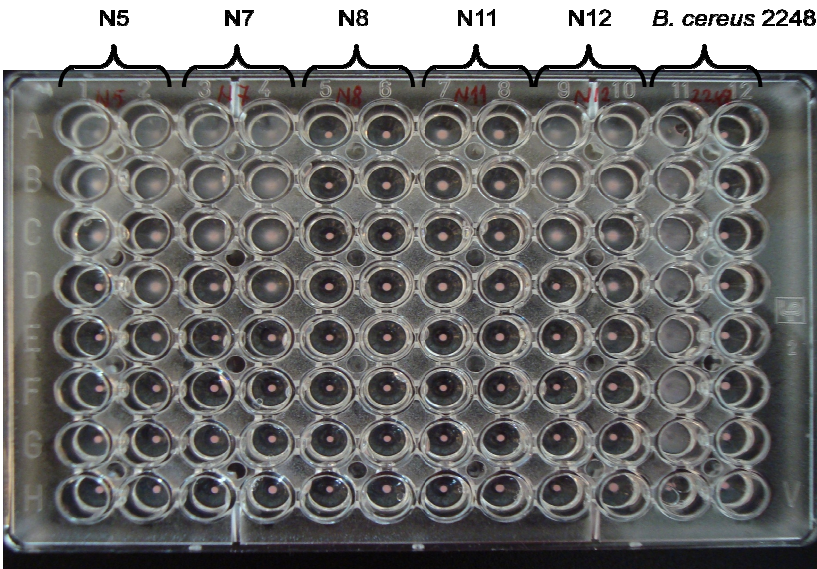
Bu çalışmada, peptidaz üretiminde kullanılacak olan suşların öncelikle toksin üretilip üretilmediğinin belirlenmesinin nedeni, enzim üretiminin başarılı şekilde gerçekleştirilebilmesi durumunda, üretilen peptidazın gıda endüstrisi başta olmak üzere çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanılabilirliğinin araştırılmasına olanak sağlayabilmektir. Enzimin endüstriyel uygulamalarda kullanılabilirliği ancak GRAS statüde suşlardan üretilmesi ile mümkün olmaktadır. Bu amaçla toksin üretme kapasitesinde olan suşların, enzim üretimine geçmeden önce elenmesi sağlanmıştır.

BCET-RPLA kiti Hbl alt birimlerinden L₂'yi, BDEVIA kiti ise Nhe alt birimlerinden NheA'yı tespit edebilmektedir. Her iki enterotoksin de üç alt birimden oluşmakta ve maksimum biyolojik aktivite için her üç alt birimin birden bulunması gerekmektedir (Lindbäck ve Granum 2006, Senesi ve Ghelardi 2010). Testlerle L₂ ve NheA'nın tespit edilmemesi durumunda toksinlerin üretilmediği sonucuna varılabilmektedir. Ancak söz konusu alt birimlerin varlıklarının belirlenmesi, kesin olarak aktif toksinin üretilebileceği anlamına gelmemektedir (Lindbäck ve Granum 2006). Dolayısıyla bu çalışmada kesin olarak bu toksinleri üretmeyecek olan suşların seçilmesi hedeflenmiş ve alt birimlerin tespit edilmediği suşlarla çalışmalara devam edilmiştir.

BCET-RPLA kiti sonuçları, mikro plakada çökme olup olmadığı gözlenerek değerlendirilmektedir. Suşun Hbl enterotoksini açısından pozitif olarak değerlendirilebilmesi için, normal koşullarda, duyarlı lateks içeren 1. sütündeki kuyucuklarda çökme olması, ancak kontrol lateksi içeren 2. sütündeki kuyucuklarda çökme olmaması gerekmektedir. Nitekim, pozitif kontrol suş olarak kullanılan enterotoksik suş *B. cereus* 2248 ve saf toksin için çökme durumu aynen bu şekilde sonuçlanmıştır. Suşun negatif olarak değerlendirilebilmesi için ise her iki sütündeki kuyucuklarda da çökme olmaması gerekmektedir. Bu çalışmada negatif suşların değerlendirilmesinde sorun yaşanmamış, her iki sütünde çökme gözlenmeyen suşlar Hbl enterotoksini üretilmesi bakımından negatif olarak kabul edilmiştir. Ancak bunların dışındaki suşlarda hem 1. hem de 2. sütündeki kuyucuklarda çökme olduğundan, bu suşların değerlendirilmesinde sıkıntılar yaşanmıştır. Toksin kitinin kullanma kılavuzunda bazen kontrol lateksde spesifik olmayan çökmeler gözlenebileceği, bu

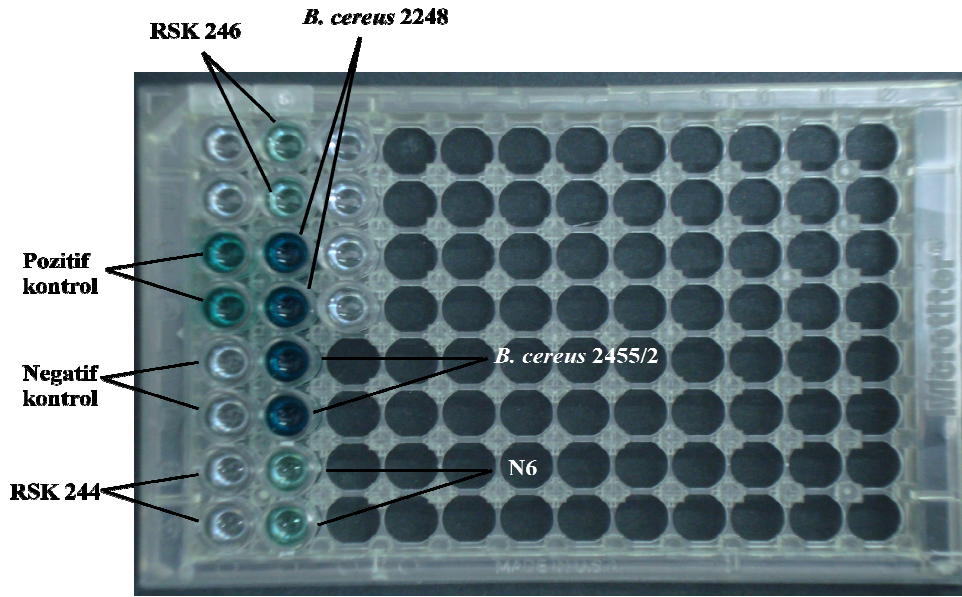
durumda; duyarlı lateksdeki çökmenin, kontrol latekse göre daha ileri seyreltme düzeylerinde olması şartıyla sonucun pozitif olarak kabul edilebileceği bildirilmiştir (Anonymous 2011a). Fakat bunun tam tersi olarak, genellikle, kontrol lateksdeki çökmenin duyarlı lateksdekine göre daha ileri seyreltme düzeylerinde olduğu gözlenmiştir. Dolayısıyla bu suşlar için elde edilen sonuçlar ne pozitiflik ne de negatiflik kurallarıyla uyum sağlamıştır. Bu suşların hiçbirindeki çökme, enterotoksin açısından pozitif kontrol suşu olan *B.cereus* 2248 veya saf toksinin çökme durumu ile benzerlik arz etmemesine rağmen, sonuçlar negatif olarak da değerlendirilemediği için, risk almamak adına bu suşların tamamının Hbl enterotoksini açısından muhtemel pozitif olarak kabul edilmesine karar verilmiştir. Çökme durumunun farklı şekilde gerçekleşmesinin *B. cereus* dışındaki suşların toksin yapısının farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Çökme durumunun nasıl olduğunun anlaşılması için bazı suşlara ait BCET-RPLA sonuçları Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Bazı *Bacillus* suşları için BCET-RPLA sonuçları

Nhe enterotoksininin tespiti (BDEVIA) Hbl enterotoksine göre daha rahat yapılmış, renk kartı ile yapılan değerlendirmenin, absorbans ölçümü ile desteklenmesi sonuçların yorumlanmasını kolaylaştırmıştır. Bazı suşlara ait test sonuçları Şekil 4.2’de gösterilmiştir. Emetik suş olan *B. cereus* 2455/2’nin Nhe enterotoksini açısından da pozitif olduğu Şekil 4.2’de görülmektedir. Bu sonuç, emetik toksin üreten *B. cereus* suşlarının nhe genini de taşıdıklarını ve genellikle Nhe enterotoksini de ürettiklerini belirleyen diğer araştırma sonuçları (Ehling-Schulz 2005, Ehling-Schulz 2006, Kim vd 2010) ile uyum sağlamaktadır. Dolayısıyla emetik toksin üreten suşlar da diyareye neden olabilmektedir. Ayrıca standart suş olarak kullanılan *Bacillus subtilis* RSK 246’nın da Nhe enterotoksini üretebildiği belirlenmiştir.



Şekil 4.2. Bazı *Bacillus* suşları için BDEVIA sonuçları

Yukarıda yapılan açıklamalar doğrultusunda, sünmüş ekmeklerden izole edilen suşlar ile kontrol suşları için BCET-RPLA ve BDEVIA kitleri kullanılarak yapılan enterotoksin analizi sonuçları Çizelge 4.1’de verilmiştir. Sünmüş ekmeklerden izole edilmiş olan suşlardan sadece bir tanesinin (N6) hem Hbl hem de Nhe enterotoksinlerini, 22 tanesinin sadece Hbl, 2 tanesinin de (N10, N13) sadece Nhe enterotoksinini üretebilme kapasitesinde oldukları tespit edilmiştir. Erem’in (2007) izole ettiği suşlar için biyokimyasal testler ve API CH test kiti ile yaptığı tanılama sonuçları Ek 2’de sunulmuştur. Her ne kadar moleküler yöntemlerle kesin tanılama işlemi yapılmamış olsa da Ek 2 ile karşılaştırma yapıldığında sadece Hbl enterotoksini ürettiği tespit edilen suşların çoğunlukla *B. subtilis* ve *B. megaterium* olarak tanılandığı, sadece Nhe enterotoksinini üreten suşlardan N13 kodlu suşun biyokimyasal testlerle *B. coagulans*, API test kitleri ile *B. licheniformis* olarak; N10’un ise her iki yöntemle *B. licheniformis* olarak tanılandığı görülmektedir. Her iki enterotoksini birden üreten N6 kodlu suş ise klasik testlerle *B. subtilis*, API test kiti ile *B. pumilus* olarak tanılanmıştır.

Beattie ve Williams (1999) yaptıkları bir çalışmada bakteri supernatantlarını BDEVIA ve BCET-RPLA kitleri ile test etmiş; *B. thuringiensis*, *B. circulans*, *B. licheniformis*, *B. lentus* ve *B. laterosporus/cereus*’un Nhe; *B. circulans*, *B. laterosporus/cereus*, *B. lentus*, *B. licheniformis*, *B. mycoides* ve *B. thuringiensis*’in Hbl enterotoksinini ürettiklerini belirlemiş, üretilen toksinlerin *B. cereus* toksinlerine benzer yapıda olduğunu savunmuşlardır. Phelps ve McKillip (2002) *B. amyloliquefaciens*, *B. circulans*, *B. lentimorbis*, *B. pasteurii* ve *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* gibi türlerin, Rowan vd (2001) ise *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. circulans* ve *B. megaterium*’un toksin üretme kapasitelerinin olduğunu belirlemişlerdir.

Özellikle *B. subtilis* ve *B. licheniformis* GRAS olarak bilindiklerinden birçok endüstriyel uygulamada yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak toksin üretebildiklerinin de göz ardı edilmemesi gerekmektedir.

Çizelge 4.1. *Bacillus* izolatlarının enterotoksin analizi sonuçları

İzolat	BCET-RPLA (Hbl) ^a	BDEVIA (Nhe)	İzolat	BCET-RPLA (Hbl) ^a	BDEVIA (Nhe)
N1	-	-	K3	-	-
N2	1:2	-	K4	1:4	-
N3	-	-	K5	1:4	-
N4	1:4	-	K6	-	-
N5	1:4	-	K7	-	-
N6	1:1	+	K8	1:4	-
N7	1:4	-	K9	-	-
N8	-	-	K10	-	-
N9	-	-	K11	1:2	-
N10	-	+	K12	1:4	-
N11	1:2	-	K13	1:4	-
N12	1:4	-	K14	1:2	-
N13	-	+	K16	1:4	-
N14	1:4	-	K17	-	-
N15	1:2	-	K18	1:4	-
N16	-	-	K19	1:8	-
N17	1:2	-	BK07	-	-
N19	-	-	<i>Bacillus subtilis</i> PY 22	-	-
N21	1:2	-	<i>Bacillus subtilis</i> RSK 244	-	-
N22	1:4	-	<i>Bacillus subtilis</i> RSK 246	-	+
K1	-	-	<i>Bacillus cereus</i> 2248	1:64	+
K2	1:4	-	<i>Bacillus cereus</i> 2455/2	-	+

^a : Çökme gözlenen en son kuyucuktaki seyreltme oranı verilmiştir.

+ : Pozitif; - : Negatif;

4.2. Peptidaz Aktivitesi En Fazla Olan *Bacillus* Suşunun Belirlenmesi

Toksin tarama testi sonrasında peptidaz üretimi için değerlendirilmeye karar verilen suşlar arasında aktivitesi en yüksek olan suşların seçimi, bu suşların dört farklı sıcaklıkta (30 °C, 37 °C, 50 °C ve 55 °C) fermantasyona tabi tutulması suretiyle yapılmıştır. Farklı sıcaklıkların denemeye dahil edilmesindeki amaç, mevcut suşların gelişebildikleri, daha da önemlisi peptidaz aktivitesi gösterebildikleri sıcaklık alt ve üst sınırlarını tespit edebilmektir. Bu şekilde aynı zamanda, peptidaz üretiminin optimizasyonu aşaması için yanıt yüzey yönteminde kullanılabilecek limit değerler de belirlenmiştir.

Fermantasyonlar yapılırken Erem'in (2007) izole ettiği suşlar dışında, standart olarak kabul edilebilecek suşlar da (PY22 olarak kodlanan *Bacillus subtilis* 168 ve RSK244 olarak kodlanan *Bacillus subtilis subtilis*) karşılaştırma kolaylığı sağlaması açısından denemeye dahil edilmiştir. Denemelerde kullanılan BK07 de Erem (2007) tarafından izole edilmiş ve *Bacillus subtilis* olduğu Karakaş (2009) tarafından bildirilmiştir.

Fermantasyon denemelerine öncelikle yüksek sıcaklıktan (55 °C) başlanmış, bu sıcaklıkta 72 saatlik fermantasyon süresince bakterilerin az da olsa gelişebildikleri

(Çizelge 4.2) ancak peptidaz aktivitesi gösteremedikleri tespit edilmiştir. Bunun üzerine daha yüksek sıcaklıklar denemeye dahil edilmemiş ve 50 °C’de fermantasyon gerçekleştirilmiştir. Bu sıcaklıkta elde edilen OD değerleri, 55 °C’de fermantasyon sırasında belirlenen OD değerlerine göre daha yüksek olmasına rağmen, bakterilerin bu sıcaklıkta da peptidaz aktivitesinin olmadığı görülmüştür. Daha sonra optimum mezofilik sıcaklık olan 37 °C ve bakterilerin iyi gelişebildikleri bilinen 30 °C’de fermantasyon gerçekleştirilmiştir. Her iki sıcaklıkta da bakterilerin peptidaz üretebildikleri tespit edilmiştir.

Peptidaz aktivitesi testine ait sonuçlar incelendiğinde, 37 °C’de en yüksek aktiviteye sahip türlerin K10 (51.602 ünite/ml) ve K1 (50.238 ünite/ml) olduğu Şekil 4.3a’dan görülmektedir. Fermantasyona her suş aynı OD değerinde (0.1) başlamış, ancak 72 saatlik süre zarfında suşların gelişme düzeyleri doğal olarak farklı olmuş ve farklı OD değerleri elde edilmiştir. Bu nedenle Şekil 4.3b’de her bir suş için birim OD’daki peptidaz aktivitesi değerleri verilmiştir. Bu açıdan bakıldığında N8 kodlu suş, aktivite açısından ön plana çıkmaktadır. N8’in optik yoğunluğu düşük olduğu için elde edilen aktivite/OD değeri yüksek olmaktadır. Enzim üretimi çalışmalarında, pratik olarak, birim OD ya da birim hücre tarafından üretilen enzimin aktivitesinden ziyade elde edilen toplam aktivite daha önemli olmaktadır. Ancak yapılacak ön işlemler (karbon kaynağı, azot kaynağı belirleme vs.) sırasında aktivitede herhangi bir değişim elde edilip edilemeyeceğinin görülebilmesi açısından, N8 kodlu suşun da denemeye dahil edilmesinin uygun olabileceği düşünülmüştür. Benzer şekilde, 30 °C’de gerçekleştirilen fermantasyona ait sonuçlar incelendiğinde (Şekil 4.4) en yüksek peptidaz aktivitesine K1 (82.641 ünite/ml) kodlu suşun sahip olduğu görülmektedir.

Peptidaz üretiminin optimizasyonu aşamasında yanıt yüzey yöntemi kullanılmıştır. Yanıt yüzey yönteminin merkezi tümleşik deneme deseninde, model dışından değerler de denemeye dahil edildiğinden bu aşamada 30 °C’den daha düşük sıcaklık derecelerinde fermantasyon yapılmamış, bu sıcaklıkların seçilen suşların optimizasyonu sırasında değerlendirilmesine karar verilmiştir.

Denemeye dahil edilen tüm sıcaklık derecelerine ait, elde edilen sonuçlar doğrultusunda çalışmanın bundan sonraki kısımlarına K1, K10 ve N8 ile devam edilmiştir. Standart suş olmaları bakımından PY22 ve RSK 244 kodlu suşların da peptidaz aktiviteleri tespit edilmiş ancak aktivitelerinin diğer suşlara nazaran çok düşük kalması sebebiyle (Bkz. Şekil 4.3 ve Şekil 4.4) bundan sonraki aşamalarda kullanılmalarına karar verilmiştir.

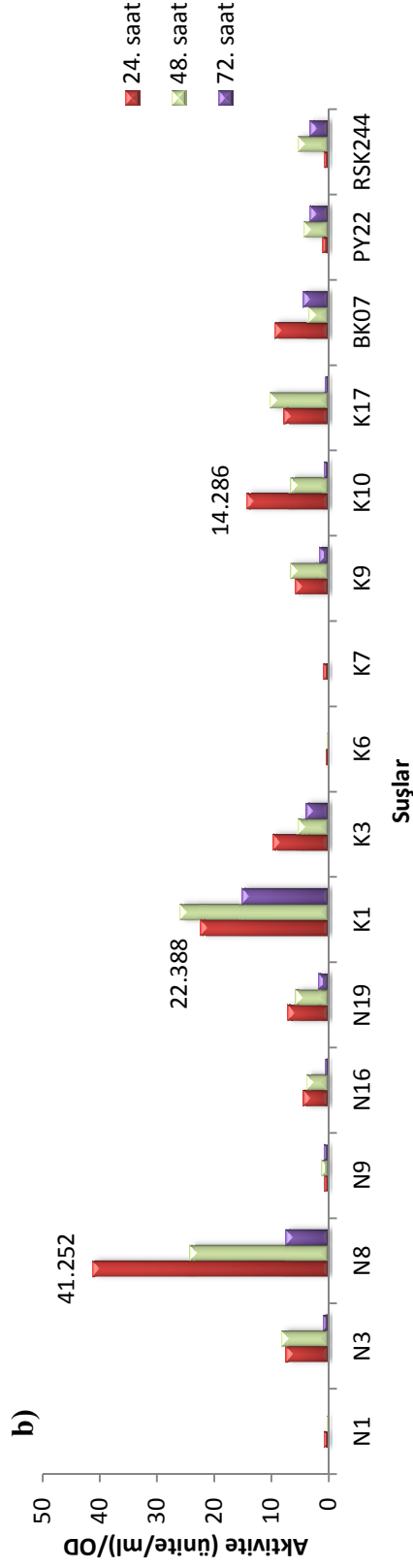
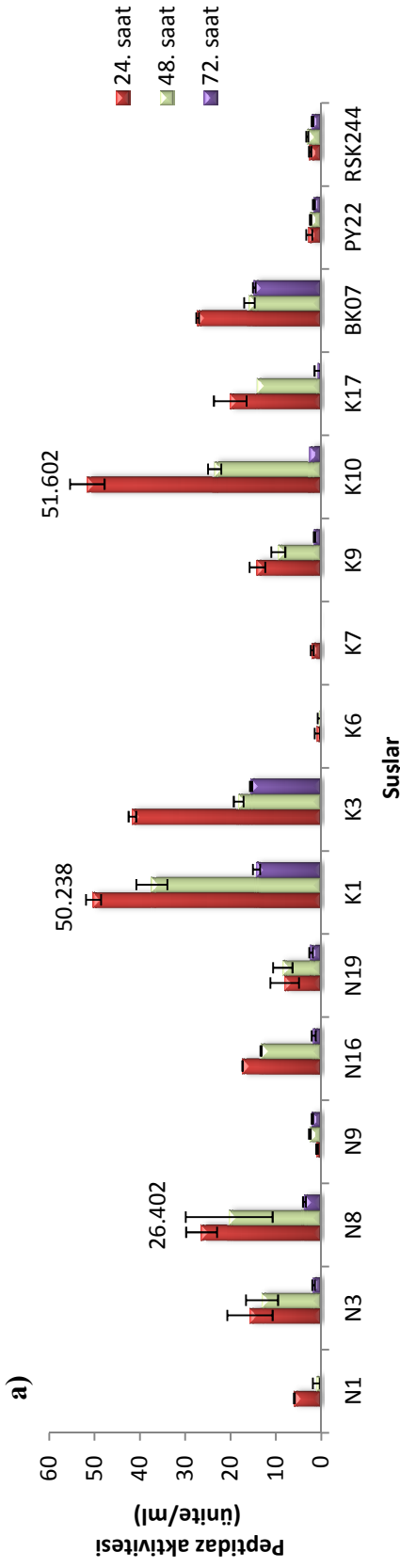
K1, K10 ve N8 suşları REFGEN’e (Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Ltd. Şti., Ankara) gönderilmiş 16S mikrobiyal tanımlama yöntemi ile yapılan analiz sonucunda K1 ve K10 suşlarının *Bacillus subtilis*, N8 suşunun ise *Bacillus methylotrophicus*¹ olduğu bildirilmiştir. N8 suşu metanol varlığında gelişmeyince, nükleotid dizimleri NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) üzerinden taranmış; K1 ve K10 *Bacillus amyloliquefaciens* (%99), N8 ise *B. subtilis* (%99) olarak belirlenmiştir. Bu suşlara ait nükleotid dizimleri Ek 4’te verilmiştir.

¹ Metanol varlığında gelişmesi gerekir.

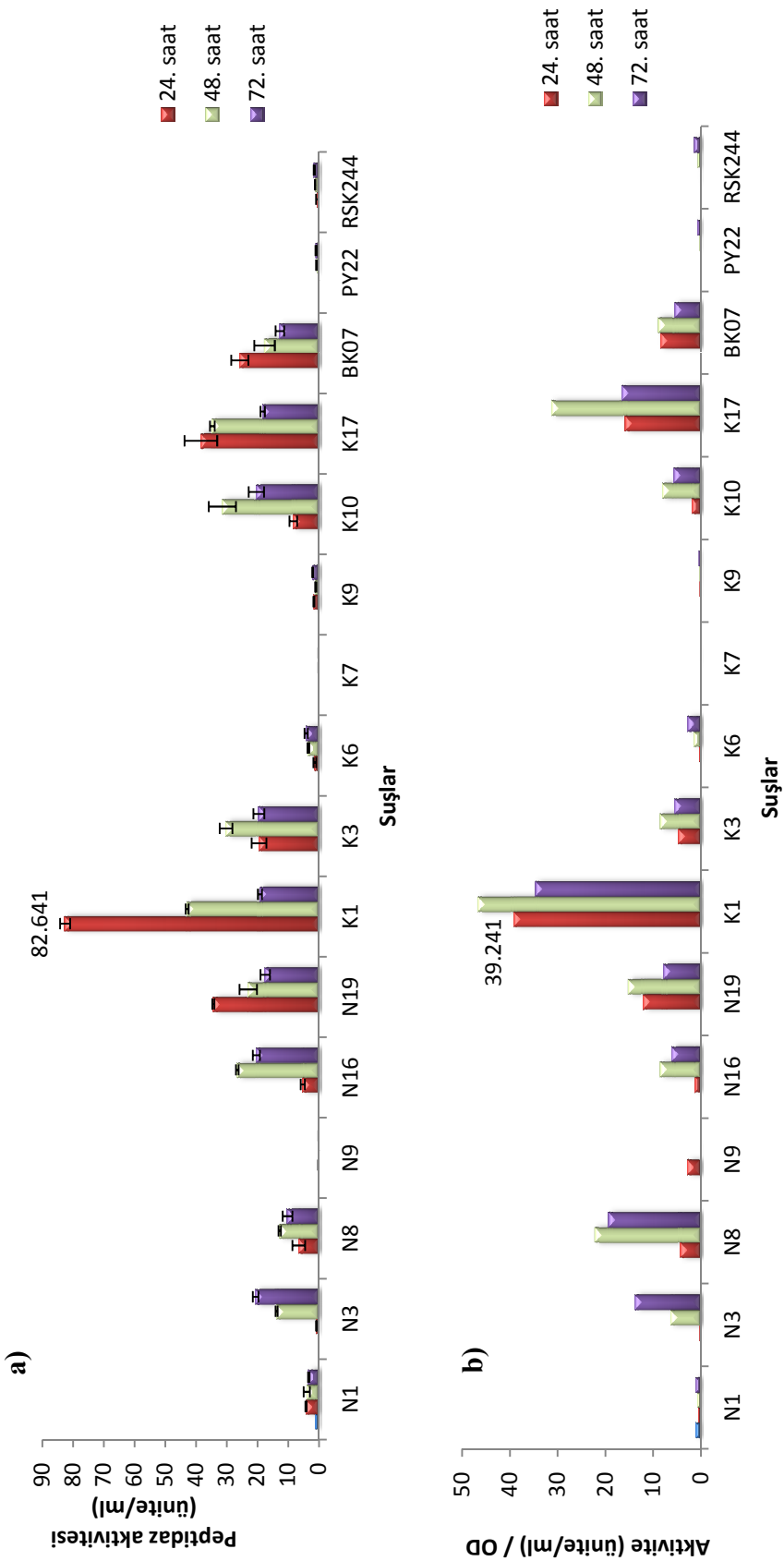
Çizelge 4.2. Farklı sıcaklıklarda fermantasyona bırakılan *Bacillus* izolatlarının optik yoğunluk değişimleri

Suşlar	30 °C			37 °C			50 °C			55 °C		
	24. saat	48. saat	72. saat	24. saat	48. saat	72. saat	24. saat	48. saat	72. saat	24. saat	48. saat	72. saat
N1	8.01 ± 0.10	5.44 ± 0.03	3.01 ± 0.11	7.23 ± 0.06	3.41 ± 0.17	2.88 ± 0.07	0.56 ± 0.02	0.52 ± 0.00	0.43 ± 0.00	0.16 ± 0.02	0.20 ± 0.00	0.11 ± 0.02
N3	4.01 ± 0.04	2.17 ± 0.02	1.49 ± 0.60	2.12 ± 0.04	1.60 ± 0.01	1.80 ± 0.03	1.22 ± 0.02	1.30 ± 0.02	0.46 ± 0.00	0.25 ± 0.04	0.87 ± 0.00	0.53 ± 0.01
N8	1.54 ± 0.03	0.58 ± 0.01	0.53 ± 0.01	0.64 ± 0.00	0.84 ± 0.06	0.50 ± 0.01	1.15 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.17 ± 0.00	0.75 ± 0.01	0.15 ± 0.00	0.15 ± 0.00
N9	2.31 ± 0.04	0.99 ± 0.00	1.46 ± 0.01	1.52 ± 0.10	2.08 ± 0.03	2.68 ± 0.01	1.61 ± 0.04	1.44 ± 0.02	1.43 ± 0.02	1.60 ± 0.02	0.47 ± 0.02	0.32 ± 0.00
N16	4.42 ± 0.05	3.12 ± 0.01	3.32 ± 0.00	3.96 ± 0.10	3.44 ± 0.10	3.45 ± 0.04	1.92 ± 0.06	1.05 ± 0.02	0.26 ± 0.00	0.19 ± 0.00	0.15 ± 0.08	0.04 ± 0.00
N19	2.85 ± 0.08	1.52 ± 0.05	2.24 ± 0.01	1.13 ± 0.03	1.48 ± 0.12	1.30 ± 0.01	1.76 ± 0.05	0.80 ± 0.00	0.21 ± 0.00	0.19 ± 0.00	0.09 ± 0.00	0.16 ± 0.00
K1	2.11 ± 0.03	0.92 ± 0.01	0.56 ± 0.02	2.18 ± 0.00	1.44 ± 0.17	0.95 ± 0.02	0.54 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.00	-	0.15 ± 0.00	0.09 ± 0.01
K3	4.10 ± 0.05	3.55 ± 0.04	3.56 ± 0.15	4.30 ± 0.05	3.41 ± 0.12	3.97 ± 0.08	2.10 ± 0.02	0.23 ± 0.00	0.23 ± 0.00	0.16 ± 0.05	0.19 ± 0.08	0.02 ± 0.00
K6	3.95 ± 0.04	2.37 ± 0.00	1.51 ± 0.03	2.35 ± 0.05	1.56 ± 0.06	1.03 ± 0.05	1.39 ± 0.04	0.65 ± 0.00	0.54 ± 0.01	1.46 ± 0.13	2.19 ± 0.14	0.94 ± 0.00
K7	3.72 ± 0.02	1.87 ± 0.01	1.48 ± 0.08	2.39 ± 0.07	1.56 ± 0.00	1.15 ± 0.01	1.56 ± 0.01	0.46 ± 0.02	0.37 ± 0.00	2.06 ± 0.18	0.80 ± 0.17	0.42 ± 0.01
K9	8.45 ± 0.00	4.94 ± 0.12	5.40 ± 0.40	2.44 ± 0.03	1.43 ± 0.07	0.92 ± 0.01	1.17 ± 0.01	0.65 ± 0.05	0.57 ± 0.00	0.24 ± 0.01	TE	0.03 ± 0.00
K10	4.48 ± 0.11	3.87 ± 0.07	3.61 ± 0.04	3.61 ± 0.10	3.53 ± 0.14	3.41 ± 0.06	1.86 ± 0.00	0.25 ± 0.00	0.23 ± 0.00	TE	TE	TE
K17	2.42 ± 0.07	1.11 ± 0.00	1.11 ± 0.01	2.58 ± 0.07	1.38 ± 0.02	1.15 ± 0.03	1.36 ± 0.01	0.57 ± 0.00	0.15 ± 0.00	0.26 ± 0.04	TE	0.04 ± 0.00
BK07	3.05 ± 0.07	1.99 ± 0.06	2.33 ± 0.10	2.89 ± 0.03	4.57 ± 0.05	3.34 ± 0.04	1.85 ± 0.02	0.80 ± 0.03	0.72 ± 0.00	0.23 ± 0.08	0.19 ± 0.02	0.06 ± 0.00
PY22	3.61 ± 0.09	2.40 ± 0.06	1.36 ± 0.05	2.69 ± 0.08	0.55 ± 0.12	0.50 ± 0.00	0.50 ± 0.00	0.19 ± 0.00	0.22 ± 0.00	1.41 ± 0.08	1.05 ± 0.01	0.58 ± 0.01
RSK244	3.51 ± 0.04	2.08 ± 0.02	1.14 ± 0.04	3.34 ± 0.07	0.58 ± 0.01	0.61 ± 0.01	0.45 ± 0.00	0.26 ± 0.00	0.17 ± 0.00	2.15 ± 0.25	1.90 ± 0.10	1.83 ± 0.05

TE: Tespit edilemedi



Şekil 4.3. 37 °C’de fermantasyona bırakılan suşların a) peptidaz aktivitesi (ünite/ml) b) peptidaz aktivitesi/OD sonuçları



Şekil 4.4. 30 °C’de fermantasyona bırakılan suşların a) peptidaz aktivitesi (ünite/ml) b) “peptidaz aktivitesi/OD” sonuçları

4.3. Seçilen *Bacillus* Türleri için Tespit Edilen Kültür ve Enzim Üretim Koşulları

4.3.1. Peptidaz aktivitesi üzerine farklı karbon kaynaklarının etkisi

Aynı tür bakteri grubu içinde her bir suşun besin isteği, fermantasyonla üretilmek istenen bileşene de bağlı olmak üzere farklılık arz etmektedir. Farklı *Bacillus* türleri ile peptidaz üretiminin yapıldığı bazı çalışmalarda denenilen kaynaklar arasında en yüksek peptidaz aktivitesine nişasta (Puri vd 2002), sakaroz (Sinha vd 2013), laktoz ve glukoz karışımı (Mabrouk vd 1999), fruktoz (Sangeetha vd 2008, Sevinç 2010), glukoz (Mehrotra vd 1999, D'Costa vd 2013), ksiloz (Suganthi vd 2013), arabinoz (Yang vd 2000, Akcan ve Uyar 2011) gibi farklı karbon kaynakları ile ulaşılmıştır. Çalışmalardan birinde enzim aktivitesini artıran bir karbon kaynağının diğer bir çalışmada enzim üretimini baskılayabildiği görülmüştür. Bu amaçla, bu tez çalışmasında peptidaz üretiminde kullanılan suşlar için 7 farklı karbon kaynağı değerlendirilerek bu kaynakların peptidaz aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir.

Farklı karbon kaynaklarının K1, K10 ve N8 suşlarının gelişimi ve peptidaz aktivitesi üzerine olan etkisi Şekil 4.5'te gösterilmiştir. Şekil incelendiğinde, genel olarak, aktivite değerlerinin 24. saatte daha yüksek olup 48. saatte azaldığı görülmektedir. Aksi durum sadece K1 için sakaroz kullanıldığında gerçekleşmiş, 48. saatte aktivite artmıştır. OD değerindeki değişim de K1 ve N8 için benzer şekilde gerçekleşerek 48. saatte azalmıştır. Ancak K10 için OD değeri genellikle 48. saatte artış göstermiştir.

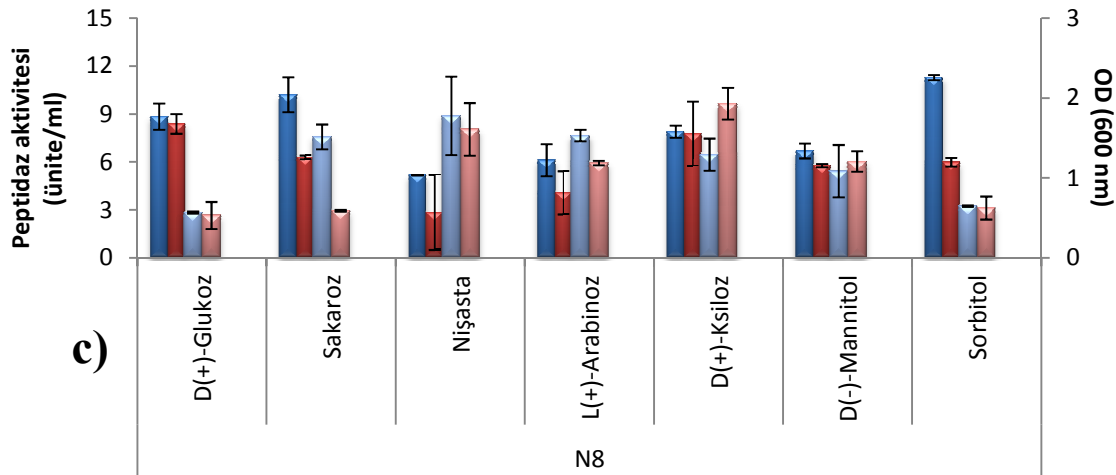
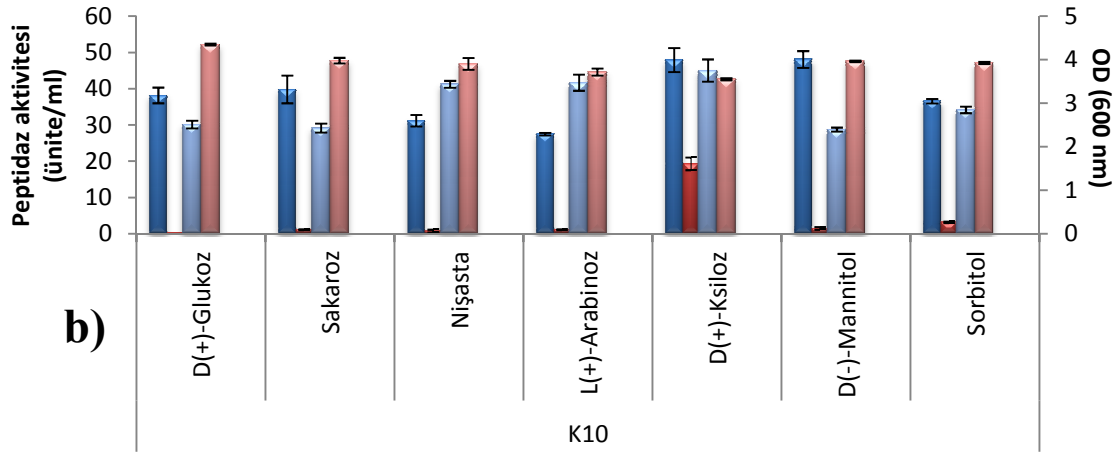
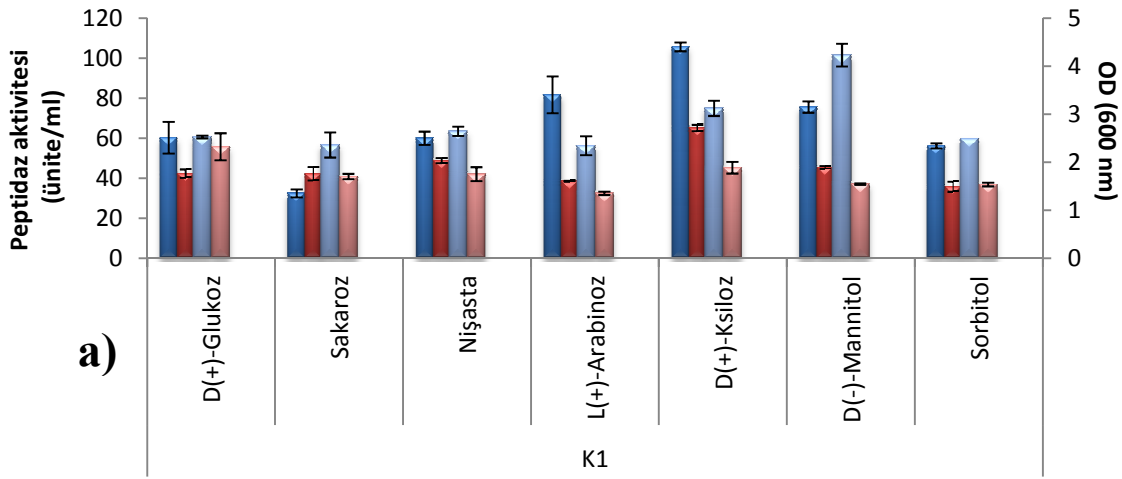
Bu çalışmada suşlar açısından genel bir profil elde etmek için farklı kaynakların taranması amaçlanmış, en yüksek peptidaz aktivitesine K1 için ksiloz (105.67±2.22 ünite/ml), K10 için mannitol (48.08±2.33 ünite/ml), N8 için ise sorbitol (11.29±0.16 ünite/ml) kullanıldığında ulaşılmıştır. Bu durumda, üretim için bu karbon kaynaklarının seçilmesi en yüksek aktivitenin elde edilmesi açısından mantıklı görünse de maliyet unsurunun da göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Çizelge 4.3'de hücre kültürü çalışmalarında kullanılacak, >%98 saflıktaki farklı karbon kaynakları için birim fiyatlar verilmiştir. Özellikle ksiloz peptidaz üretimi için, K1 başta olmak üzere, her üç suş için de iyi bir kaynak olmasına rağmen ekonomik açıdan olumsuzluk yaratmaktadır. Dolayısıyla diğer kaynaklar arasından seçim yapılması daha uygun görülmüştür.

Çizelge 4.3. Farklı karbon kaynakları için birim fiyat listesi

C kaynağı	(TL/kg)*
D(+)-Glukoz	97.70
Sakaroz	310.75
Nişasta**	477.66
L(+)-Arabinoz	2306.90
D(+)-Ksiloz	1248.58
D(-)-Mannitol	333.82
Sorbitol	175.32

*1 Euro=2.3 TL kabul edilerek fiyatlar yaklaşık olarak verilmiştir.

** Çözünür patates nişastası



■ Peptidaz aktivitesi (24. saat) ■ Peptidaz aktivitesi (48. saat)
 ■ Optik yoğunluk (24. saat) ■ Optik yoğunluk (48. saat)

Şekil 4.5. a) K1 b) K10 ve c) N8 suşlarının peptidaz aktivitesi değeri üzerine farklı karbon kaynaklarının etkisi ($X \pm \text{StdH}$)

Peptidaz üretiminde ekonomik karbon kaynağının seçimi için birim fiyatları diğer kaynaklara göre daha yüksek olan arabinoz ve ksiloz devre dışı bırakıldıktan sonra aktivite verilerine¹ varyans analizi (ANOVA) uygulanmış ve peptidaz aktivitesi açısından karbon kaynakları arasında istatistiksel olarak önemli ($p<0.05$) düzeyde farklılık bulunduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. K1, K10 ve N8 suşlarının karbon kaynaklarına bağlı peptidaz aktivitesi değerlerine ait varyans analizi sonuçları

	Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F değeri
K1	Karbon Kaynağı	4	484.71	13.87**
	Hata	5	34.96	
K10	Karbon Kaynağı	4	75.32	6.86*
	Hata	5	10.98	
N8	Karbon Kaynağı	4	12.55	14.74**
	Hata	5	0.85	

(*) $p<0.05$ seviyesinde farklılık ifade eder.

(**) $p<0.01$ seviyesinde farklılık ifade eder.

Çizelge 4.5’de Duncan Çoklu Karşılaştırma testi sonuçları verilmiştir. Buna göre K1 suşu için en düşük enzim aktivitesi değeri gösteren sakaroz çıkarıldıktan sonra diğer kaynaklar arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmamaktadır. Dolayısıyla bu suş için hem iyi bir aktivite değeri elde edilen hem de en ucuz kaynak olan glukozun tercih edilebileceği görülmektedir. Nişasta kullanıldığı zaman da benzer bir aktivite elde edilmiştir. Ayrıca çok daha ucuz fiyattan nişasta bulmak da mümkündür. Ancak nişastanın amilaz üretimini de teşvik edebileceği ve bu durumun üretimin optimizasyonundan sonra yapılacak saflaştırma işleminde sorun yaratabileceği düşünüldüğünden, glukozun kullanılmasına karar verilmiştir. K10 suşu için nişasta en düşük aktivite değerine neden olduğundan, mannitol de en yüksek aktiviteyi sağlamasına rağmen fiyatı nedeni ile tercih edilmemiştir. Glukoz ve sakaroz arasında da istatistiksel açıdan bir fark olmadığından, glukoz K10 için karbon kaynağı olarak seçilmiştir. N8 için de benzer nedenlerle glukozun tercih edilmesi uygun görülmüştür.

Çizelge 4.5. K1, K10 ve N8 suşlarının karbon kaynaklarına bağlı peptidaz aktivitesi ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları ($X\pm StdH$)

	K1**	K10*	N8**
D (+)-Glukoz	60.26 ^a ± 7.92	38.17 ^b ± 2.16	8.84 ^{abc} ± 0.83
Sakaroz	32.42 ^b ± 2.00	39.83 ^{ab} ± 3.81	10.21 ^{ab} ± 1.10
Nişasta	59.98 ^a ± 3.33	31.17 ^b ± 1.58	5.18 ^c ± 0.00
D (-)-Mannitol	75.58 ^a ± 2.82	48.08 ^a ± 2.33	6.69 ^{bc} ± 0.47
Sorbitol	56.21 ^{ab} ± 1.27	36.59 ^b ± 0.60	11.29 ^a ± 0.16

*Karşılaştırmalar $p<0.05$ seviyesinde yapılmıştır.

**Karşılaştırmalar $p<0.01$ seviyesinde yapılmıştır.

¹ Her üç suş için de 24. saat aktivite değerleri daha yüksek olduğundan istatistiksel hesaplamalar bu veriler için yapılmıştır.

4.3.2. Peptidaz aktivitesi üzerine farklı azot kaynaklarının etkisi

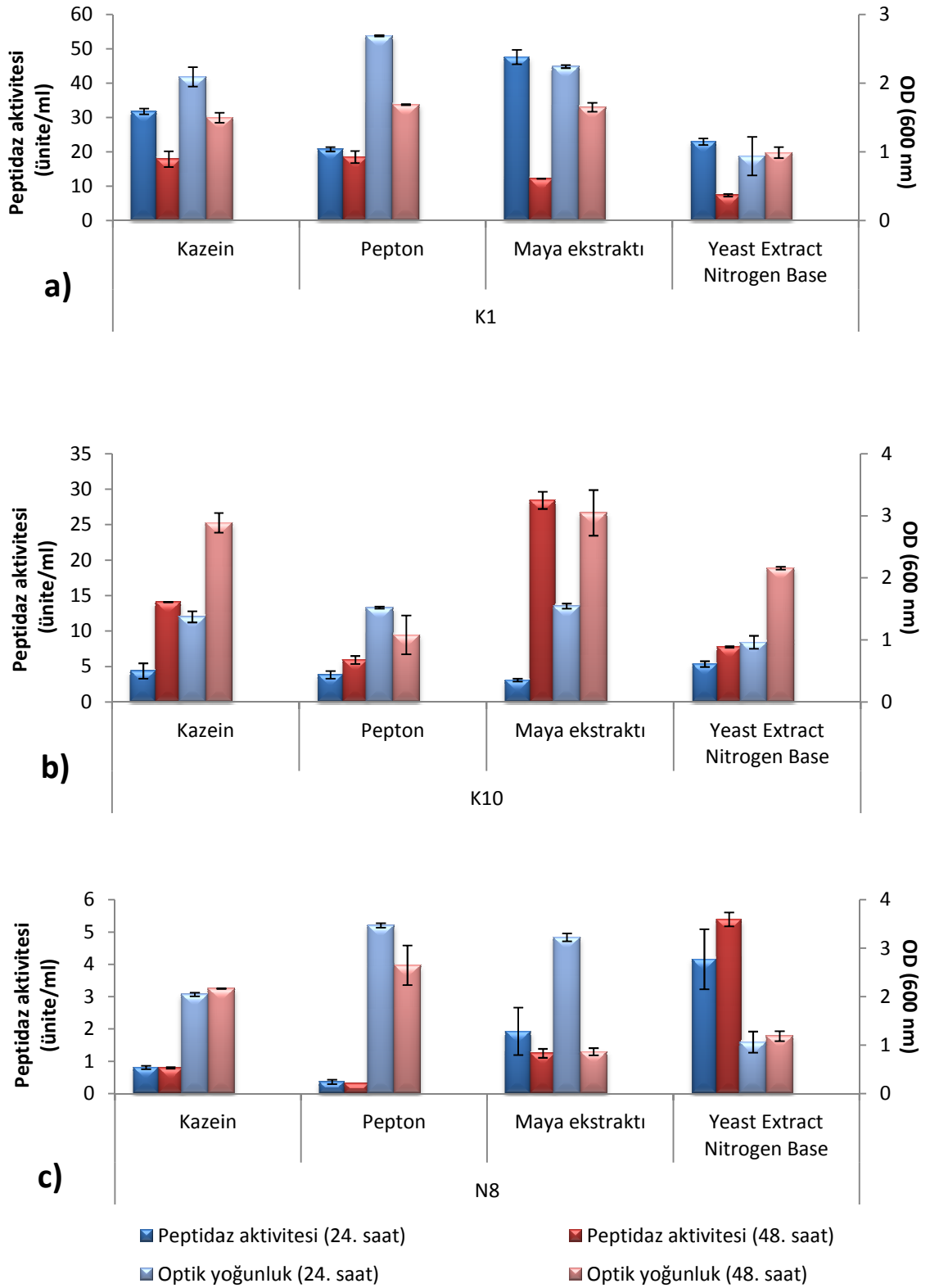
Bilindiği üzere farklı azot kaynaklarının bakterinin gelişimi ve ürün üretimi üzerine olan etkisi farklı olabilmektedir. Hatta aynı kaynak, aynı bakteri grubundaki farklı alt türleri bile farklı düzeylerde etkileyebilmektedir. *Bacillus* türleri kullanılarak peptidaz üretiminin gerçekleştirildiği bazı çalışmalarda en yüksek peptidaz aktivitesi değerlerine pepton (Puri vd 2002), sığır ekstraktı (Shafee vd 2005), soya küspesi (Chu 2007, Guangrong vd 2008, Hindhumathi vd 2011), kazamino asit (Patel vd 2005) gibi azot kaynakları ile ulaşılmıştır. Bu tez çalışmasında da 4 farklı azot kaynağı kullanılarak bu kaynakların peptidaz üretimi üzerine olan etkileri incelenmiştir (Şekil 4.6).

K1 suşu için 24. saat verileri incelendiğinde, pepton kullanıldığında en yüksek OD değerine ulaşıldığı ancak en düşük peptidaz aktivitesi (20.77 ± 0.62 ünite/ml) değerinin elde edildiği görülmektedir. En yüksek aktivite değerine ise diğer kaynaklara göre yaklaşık 2 kat fark ile maya ekstraktı (47.59 ± 2.10 ünite/ml) kullanıldığında ulaşılmıştır. Hem aktivite hem de OD değerleri genel olarak 48. saatte azalmış, yalnızca yeast ekstrakt nitrogen base kullanıldığında OD değerinde belirgin bir değişim gözlenmemiştir. Nitekim peptidaz üretimini teşvik eden kültür koşulları ile bakteri gelişimini teşvik eden kültür koşullarının birbirinden farklı olabileceği bildirilmiştir (Bhunia vd 2012).

Azot kaynaklarının K10 üzerine olan etkisi incelendiğinde (Şekil 4.6), pepton dışında, 48. saat OD ve peptidaz aktivitesi değerlerinin daha yüksek olduğu, maya ekstraktının yine en iyi aktivite değerini (28.430 ± 1.2 ünite/ml) sağlayan kaynak olduğu belirlenmiştir. Aynı sürede en düşük aktivite (5.9 ± 0.57 ünite/ml) değeri, K1 suşunda olduğu gibi pepton kullanıldığında tespit edilmiştir.

Şekil 4.6 N8 suşu açısından incelendiğinde bu suşun OD değerlerinin diğer iki suşla benzerlik arz ettiği ancak aktivite değerlerinin çok daha düşük olduğu görülmektedir. Yeast ekstrakt nitrogen base diğer iki suşun peptidaz aktivitesi değerini kazein ve pepton ile hemen hemen aynı seviyede etkilerken N8'in peptidaz aktivitesi değerinde belirgin bir artış sağlamıştır. N8'in aktivite değerinin, 48. saatte 5.39 ünite/ml'ye ulaştığı ve bu değer referans kaynak olan maya ekstraktına (1.2 ± 0.14 ünite /ml) göre 4 kat fazla olduğu belirlenmiştir. Yeast ekstrakt nitrogen base histidin, metiyonin ve triptofan gibi amino asitleri içermemekte ancak elzem tüm vitaminleri ve inorganik tuzları içermektedir. Bu kaynağın kullanılmasının nedeni amino asit içermeyen bir azot kaynağının peptidaz üretimini teşvik edip etmeyeceğinin belirlenmesidir. Ancak bu kaynağın, denemeye dahil edilen mevcut koşullar altında sadece N8 suşunun peptidaz üretimini artırabildiği görülmüştür.

Sonuçlar K1 ve K10 için en uygun azot kaynağının maya ekstraktı, N8 için ise yeast ekstrakt nitrogen base olduğunu göstermiştir. Ekonomik açıdan da bir değerlendirme yapmak için öncelikle kullanılan kaynakların birim fiyatları incelenmiş, en pahalı kaynağın yeast ekstrakt nitrogen base, en ucuz kaynağın ise pepton olduğu görülmüştür (Çizelge 4.6).



Şekil 4.6. a) K1 b) K10 ve c) N8 suşlarının peptidaz aktivitesi değeri üzerine farklı azot kaynaklarının etkisi

Çizelge 4.6. Farklı azot kaynakları için birim fiyat listesi

C kaynağı	(TL/kg)*
Kazein	211.22
Pepton	132.16
Yeast ekstrakt	165.20
YNB**	246.70

*1 Euro=2.3 TL kabul edilerek fiyatlar yaklaşık olarak verilmiştir.

** Yeast ekstrakt nitrogen base

Peptidaz üretimi için hem ekonomik hem de en uygun aktivite değerini sağlayan azot kaynağının seçilebilmesi için aktivite değerlerine varyans analizi uygulanmıştır. K1 için 24. saat, K10 için ise 48. saat verileri daha yüksek olmasına rağmen N8 için bazı kaynaklar 24. saatte bazı kaynaklar ise 48. saatte daha yüksek aktivite değeri sağlamıştır. Bu nedenle varyans analizi ve çoklu karşılaştırma testi her 3 suş için de fermantasyonun iki süresinde de yapılmıştır. Veri analizlerine göre azot kaynakları arasında peptidaz aktivitesi üzerine olan etkileri bakımından istatistiksel olarak önemli düzeyde ($p<0.01$) farklılık olduğu tespit edilmiş, varyans analizi sonuçları Çizelge 4.7’de verilmiştir.

Çizelge 4.7. K1, K10 ve N8 suşlarının azot kaynaklarına bağlı peptidaz aktivitesi değerlerine ait varyans analizi sonuçları

	Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F değeri
K1 (24. saat)	Azot Kaynağı	3	296.85	93.14**
	Hata	4	3.19	
K1 (48. saat)	Azot Kaynağı	3	55.01	13.09*
	Hata	4	4.20	
K10 (24. saat)	Azot Kaynağı	3	1.81	2.19
	Hata	4	0.83	
K10 (48. saat)	Azot Kaynağı	3	208.12	66.80**
	Hata	4	3.12	
N8 (24. saat)	Azot Kaynağı	3	4.95	7.02*
	Hata	4	0.71	
N8 (48. saat)	Azot Kaynağı	3	11.63	349.41**
	Hata	4	0.03	

(*) $p<0.05$ seviyesinde farklılık ifade eder.

(**) $p<0.01$ seviyesinde farklılık ifade eder.

Çizelge 4.8’de Duncan Çoklu Karşılaştırma testi sonuçları verilmiştir. K1 suşu için daha yüksek olan 24. saat verilerine bakıldığında maya ekstraktının en yüksek aktivite değerini sağladığı ve istatistiksel olarak da diğer kaynaklardan önemli derecede ($p<0.05$) farklılık gösterdiği görülmektedir. En ucuz kaynak olan peptona göre iki kattan fazla aktivite değeri sağlaması ve aralarında çok büyük bir fiyat farkı olmaması sebebiyle üretim çalışmalarında K1 için maya ekstraktının kullanılması uygun bulunmuştur. Benzer şekilde bir inceleme K10 suşu için daha yüksek aktivite değeri elde edilen 48. saat verileri için yapıldığında, maya ekstraktının en iyi kaynak olduğu görülmektedir. En ucuz kaynak olan pepton ile aralarındaki fiyat farkının fazla

olmaması ve peptona göre 5 kattan fazla aktivite değeri sağlaması sebebiyle azot kaynağı olarak maya ekstraktının kullanılmasına karar verilmiştir. N8 suşu için ise hem 24. hem de 48. saat verilerine göre yeast ekstrakt nitrogen base, diğer üç kaynağa göre istatistiksel olarak önemli ölçüde ($p<0.05$) farklı olmak üzere, daha yüksek aktivite sağlamaktadır.

Çizelge 4.8. K1, K10 ve N8 suşlarının azot kaynaklarına bağlı peptidaz aktivitesi ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları ($X \pm \text{StdH}$)

24. saat	K1*	K10**	N8**
Kazein	31.77 ^b ± 0.83	4.39 ^a ± 1.07	0.86 ^b ± 0.05
Pepton	20.77 ^c ± 0.62	3.83 ^a ± 0.54	0.79 ^b ± 0.07
Maya ekstraktı	47.60 ^a ± 2.10	3.09 ^a ± 0.20	1.93 ^{ab} ± 0.74
YNB***	22.95 ^c ± 0.94	5.35 ^a ± 0.41	4.16 ^a ± 0.93
48. saat	K1**	K10**	N8*
Kazein	17.90 ^{ab} ± 2.29	14.09 ^b ± 0.03	0.80 ^{bc} ± 0.03
Pepton	18.49 ^a ± 1.74	5.93 ^b ± 0.57	0.32 ^c ± 0.00
Maya ekstraktı	12.22 ^{bc} ± 0.02	28.43 ^a ± 1.21	1.25 ^b ± 0.14
YNB***	7.37 ^c ± 0.35	7.77 ^b ± 0.12	5.39 ^a ± 0.22

*Karşılaştırmalar $p<0.05$ seviyesinde yapılmıştır.

**Karşılaştırmalar $p<0.01$ seviyesinde yapılmıştır.

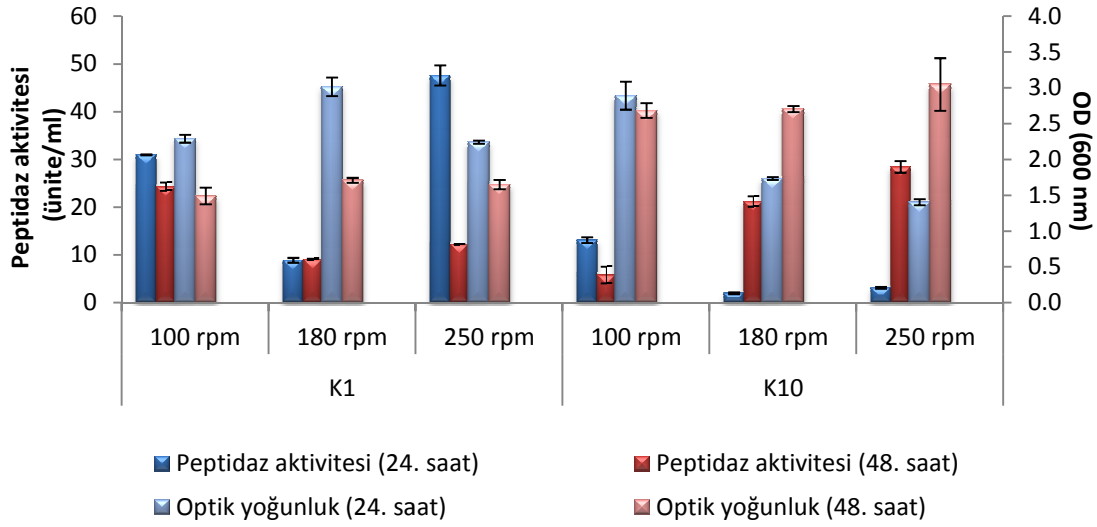
*** Yeast ekstrakt nitrogen base

Bölüm 4.2’de anlatıldığı üzere N8 suşunun çalışmalara dahil edilmesinin nedeni yapılacak ön işlemler sırasında bu suşun peptidaz aktivitesinde kayda değer bir artış olup olmayacağını ve dolayısıyla peptidaz üretimi için suşun uygunluğunu belirlemektir. Ancak karbon ve azot kaynakları ile yapılan çalışmalar sonucu N8 suşunun peptidaz aktivitesi değerinde önemli bir artış sağlanamadığı görülmüştür. Yeast ekstrakt nitrogen base sayesinde, suşun aktivitesi kendi içinde artmış olmasına rağmen diğer iki suşa göre hala çok düşüktür. Bu nedenle bundan sonraki aşamalarda N8 suşunun kullanılmamasına, çalışmalara K1 ve K10 suşu ile devam edilmesine karar verilmiştir.

4.3.3. Peptidaz aktivitesi üzerine çalkalama hızının etkisi

Aerobik fermentasyon proseslerinde, oksijen, organizmanın metabolik yolunu (metabolic pathway) etkileyerek ürün üretimi üzerinde önemli rol oynayan faktörlerden biridir (Çalık vd 1998). Oksijenin fermentasyon sıvısındaki çözünürlüğünün düşük olması ya da hızlı gelişen mikroorganizmaların oksijen alım oranlarının yüksek olması gibi nedenlerle, çözünmüş oksijen konsantrasyonu aerobik fermentasyonlar için sınırlayıcı bir parametredir (Thiry ve Cingolani 2002). Bu durumda mikroorganizmanın gelişme koşullarına bağlı olarak bazı proseslerde yüksek oksijen transferine ihtiyaç duyulurken, bazı proseslerde ise kontrollü bir oksijen transferinin sağlanması gerekmektedir (Çalık vd 1998). Oksijen transfer hızı, çalkalama hızı ve havalandırma oranına bağlı olmaktadır. Engelli erlenlerde çalkalamalı inkübasyon yoluyla yapılan fermentasyonlarda, mikroorganizmanın ihtiyaç duyduğu orandaki oksijeni sağlamanın en basit yolu doğru çalkalama hızını seçmektir. Bu şekilde aynı zamanda besin maddelerinin homojen karışması ve dolayısıyla besin transfer hızı da ayarlanmış olmaktadır (Nadeem vd 2009). Çalkalama hızı gereğinden fazla hızlı olduğu zaman da

hücrenin zarar görmesine ya da enzimin denatüre olmasına neden olduğundan (Shafee vd 2005) doğru çalkalama hızının seçilmesi önem arz etmektedir.



Şekil 4.7. K1 ve K10 suşlarının peptidaz aktivitesi değeri üzerine çalkalama hızının etkisi

Bu tez çalışmasında K1 ve K10 suşları farklı çalkalama hızlarına (100, 180 ve 250 rpm) maruz bırakılarak peptidaz üretimi için uygun çalkalama hızı seçilmiştir. Şekil 4.7’de K1 ve K10 suşları için fermantasyonun 24. ve 48. saatlerinde tespit edilen peptidaz aktivitesi ve OD değerlerinin çalkalama hızına bağlı olarak değişimi gösterilmiştir.

Daha önceki aşamalarda bir yandan en iyi peptidaz aktivitesi sağlarken diğer yandan ekonomik olan besin kaynağını seçebilmek için veriler istatistiksel değerlendirmeye tabi tutulmuş ve aralarında peptidaz aktivitesi açısından farklılık bulunmayan kaynaklardan en ekonomik olanı tercih edilmiştir. Bu aşamada ise çalkalama hızları arasındaki farklılık enerji açısından çok büyük ekonomik farklılık yaratmayacağından, peptidaz aktivitesi açısından istatistiksel bir değerlendirme yapılmamış, ham veriler göz önünde bulundurularak yüksek aktivite değerini sağlayan çalkalama hızının seçimi yoluna gidilmiştir.

Daha önceki analizler göz önünde bulundurulduğunda K1 suşunun 24., K10 suşunun ise 48. saatte daha yüksek peptidaz aktivitesi verdiği bilinmektedir. Şekil 4.7 incelendiğinde K1 için bu koşulun değişmediği, her üç çalkalama hızında da 24. saatte daha yüksek aktivite ve OD değeri elde edildiği görülmektedir. K10 için ise 100 rpm’de 24. saatte, 180 ve 250 rpm’de ise 48. saatte hem aktivite hem de OD değeri daha yüksek olmuştur.

Peptidaz üretimi ile bakteri gelişimi arasında pozitif yönlü bir ilişki olduğunu belirleyen araştırmacılar (Beheshti Maal vd 2011) olduğu gibi peptidaz üretiminin bakteri gelişiminden bağımsız olduğunu savunan araştırmacılar da (Razak vd 1997, Gençkal ve Tari 2006) bulunmaktadır. Şekil 4.7 bu açıdan incelendiğinde K1’in en

yüksek OD'ye 180 rpm'de ulaştığı ancak bu çalkalama hızında en düşük peptidaz aktivitesinin elde edildiği görülmektedir. Diğer iki çalkalama hızında OD değerleri çok benzer olmasına rağmen 250 rpm'de daha yüksek aktivite elde edilmiştir. Bu durumun farklı çalkalama hızında bakterinin oksijen alım ve besine ulaşma hızı farklı olacağından, aynı OD değerine ulaşmasına rağmen, gelişme eğrisinde farklı fazda olmasından da kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Nitekim literatürde peptidaz üretiminin logaritmik fazın sonunda ve durağan fazda daha fazla olduğunu bildiren kaynaklar bulunmaktadır (Gupta vd 2002a, Bhunia vd 2012). Bakteri gelişimini teşvik eden kültür koşullarıyla enzim üretimini teşvik eden koşulların birbirinden farklı olduğunu savunan araştırmacılar da mevcuttur (Oskouie vd 2007, Bhunia vd 2012). Dolayısıyla, duruma, peptidaz üretiminin bakteri gelişiminden bağımsız olmasından ziyade farklı kültür koşullarında gelişim eğrisinin daha farklı şekillenebileceği olgusuyla yaklaşmanın daha makul olabileceği düşünülmektedir. K10 suşu için de durumu K1 de olduğu gibi yorumlamak mümkündür.

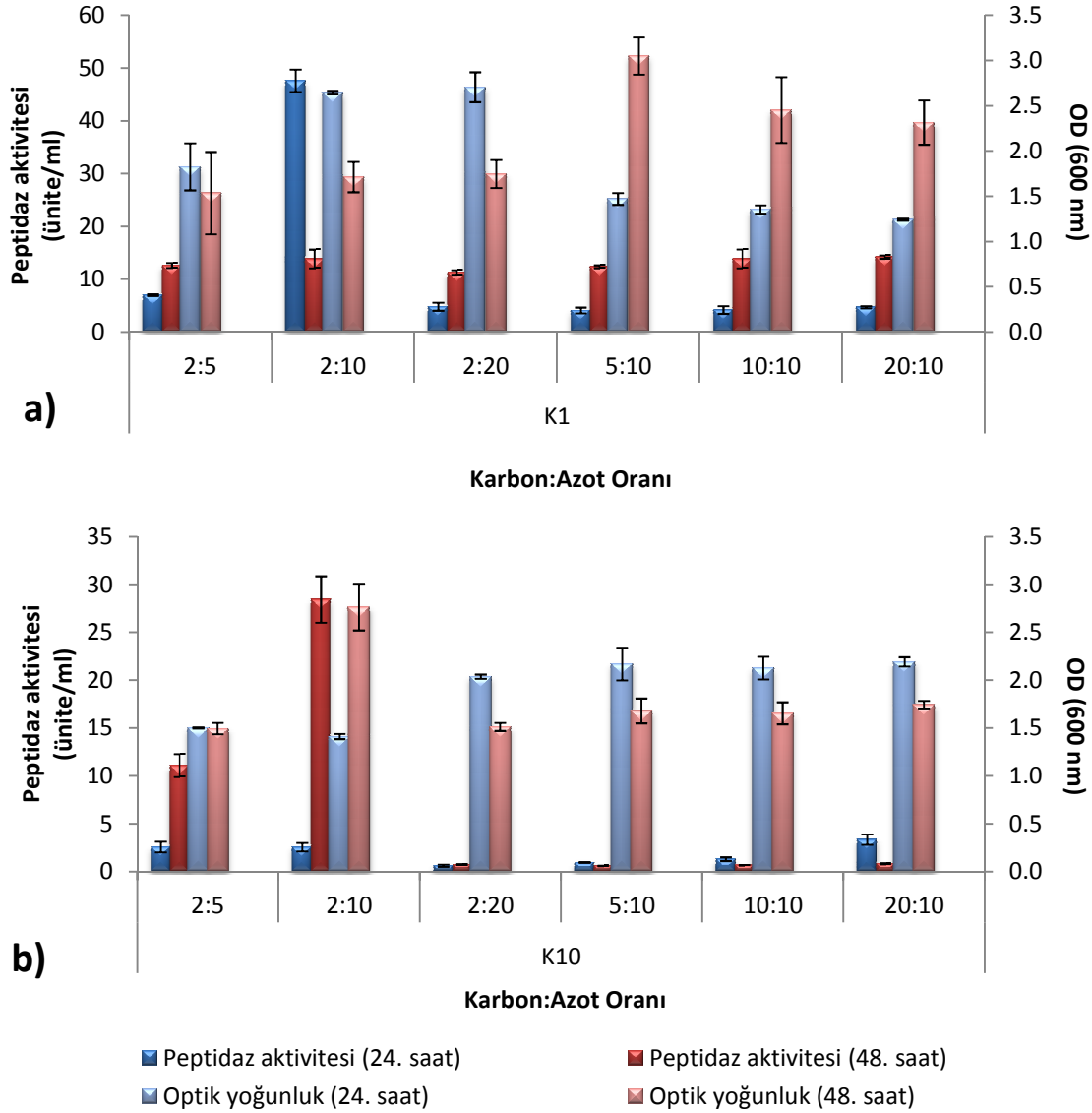
Her iki suş için de 250 rpm'lik çalkalama hızının, peptidaz aktivitesini artırma açısından, daha etkili olduğu gözlenmiş ve çalışmalara 250 rpm çalkalama hızı ile devam edilmesine karar verilmiştir.

4.3.4. Peptidaz aktivitesi üzerine karbon kaynağı/azot kaynağı oranının etkisi

Hücre dışı peptidaz üretiminin karbon/azot (C/N) oranı (w/w) değişiminden önemli ölçüde etkilendiği bilinmektedir (Gupta vd 2002a, Ibrahim ve Al-Salamah 2009). Her bir organizma ya da suşun gelişimi ve ürün üretimi için fizikokimyasal ve besinsel ihtiyacı farklı olabileceğinden (Ou ve Zhu 2012) her bir çalışmada kullanılan suşlar açısından C/N oranının da belirlenmesi ürün üretiminde en iyiye ulaşmak açısından fayda sağlamaktadır. Nitekim Beg vd (2003) *Bacillus mojavensis* ile alkali peptidaz üretimi gerçekleştirdikleri bir çalışmada 2 mg/ml glukoz karşılık 12 mg/ml kazamino asit kullanımının en iyi C/N oranı olduğunu, Wu vd (2013) ise *Bacillus* sp. B001 suşuyla peptidaz üretiminin optimizasyonunu yaptıkları çalışmada karbon ve azot kaynakları olarak 19.6 g/l mısır unu ile 6.2 g/l soya peptonu kullanımının ideal olduğunu tespit etmişlerdir. Dolayısıyla kullanılan kaynağa ve bakteri suşuna göre ideal C/N oranının değiştiği görülmektedir. Bu nedenle, bu tez çalışmasında yanıt yüzey yöntemi ile peptidaz üretiminin optimizasyonuna geçmeden önce K1 ve K10 suşları için uygun C/N oranı tespit edilmiştir.

K1 ve K10 suşlarının 24. ve 48. saatteki peptidaz üretimleri ve OD değerleri üzerine farklı C/N oranının etkisi Şekil 4.8.'de gösterilmiştir. Şekilde x-ekseninde verilen C/N oranları aynı zamanda fermantasyonun gerçekleştirildiği besiyerine (Bkz. Çizelge 3.1) ilave edilen karbon ve azot kaynağı miktarlarını (g/L cinsinden) gösterdiğinden, sadeleştirilmeden verilmiştir. Şekil bu açıdan incelendiğinde ilk üç oranda karbon kaynağı (glukoz) miktarının sabit tutulup azot kaynağı (maya ekstraktı) miktarının değiştirildiği, son üç oranda ise tam tersine azot kaynağı miktarı sabit tutulup karbon kaynağı miktarının değiştirildiği görülmektedir. Şekil 4.8'deki OD değerlerine bakıldığında K1 suşunun OD değerinin karbon miktarı sabitken 24. saatte, azot miktarı sabitken ise 48. saatte daha fazla olduğu gözlenmiştir. K10 suşunun OD değeri ise 2:5 oranında farklı fermantasyon sürelerinde sabitken; 2:10 oranında zamanla artmış, diğer

oranlarda ise zamanla azalmıştır. Ortamdaki besin miktarının değişmesi muhtemelen bakteri gelişiminin de farklı şekilde gerçekleşmesine yol açmıştır.



Şekil 4.8. a) K1 ve b) K10 suşlarının peptidaz aktivitesi değeri üzerine farklı karbon kaynağı / azot kaynağı (g/g) oranının etkisi

Şekil 4.8a'ya göre peptidaz üretimi açısından, K1 için karbon miktarı sabitken azot oranının 10 g/l'den daha az veya daha fazla olmasının 24. saat peptidaz aktivitesinde beş kattan fazla azalmaya neden olduğu gözlenmektedir. Maya ekstraktının 10 g/l'den az olması durumunda aktivitenin azalmasını, bakterinin zaten az olan azot kaynağını parçalayıp kullanabileceği besin formuna dönüştürmesi için daha az enzime ihtiyaç duyması şeklinde açıklamak mümkündür. Fazla miktardaki azotlu bileşenler de enzim aktivitesini baskılayabildiğinden (Prakasham 2005), 20 g/l maya ekstraktı kullanıldığı zaman peptidaz aktivitesinde azalma gözlenmiştir. Çünkü ortamda

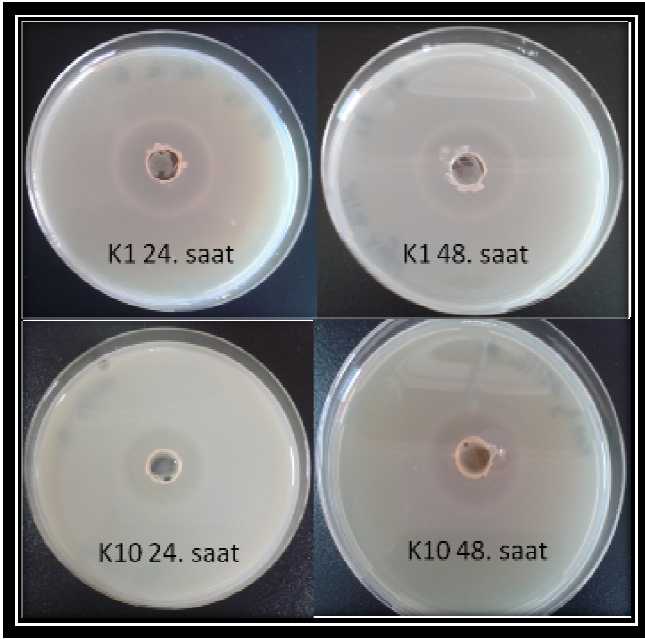
bakterinin kullanabileceği azotlu madde bulunduğundan, bakteri peptidaz üretmeye gerek duymamaktadır. Azot miktarı sabitken de besiyerine 2 g/l'den fazla karbon kaynağı ilavesi yine peptidaz aktivitesinde azalmaya neden olmuştur. Karbonhidrat konsantrasyonunun yüksek olması durumunda da enzim üretiminin baskılanabildiği bildirilmiştir (Ou ve Zhu 2012). Bu açıdan bakıldığında, besiyerine karbon kaynağı olarak glukozun ilave edilmiş olması katabolit represyonuna¹ yol açmış olabilir. Ortamda besin kaynağı olarak kolaylıkla metabolize edilebilir glukoz olması nedeniyle bakteri öncelikle glukozu kullanma yoluna gitmiş ve peptidaz üretimi bu nedenle baskılanmış olabilir. Şekil 4.8a'dan da görüldüğü gibi karbon kaynağı miktarı artırıldığı zaman (5:10, 10:10, 20:10), normalde 24. saatte daha yüksek aktivite veren K1 suşu, 48. saatte daha yüksek aktivite vermeye başlamıştır. Bu da zamanla glukozun tükenmesi nedeniyle artık azot kaynağını kullanmak için bakterinin peptidaz üretmeye başlaması ile açıklanabilir. Muhtemelen fermantasyon süresi uzatılırsa, peptidaz aktivitesinde artış gözlenebilirdi. Literatürde katabolit represyonunun genellikle α -amilaz, β -glukanaz, ksilanaz ve selüloz gibi sakkarolitik (şeker parçalayabilen) enzimlerle ilişkili olduğu vurgulanmasına rağmen, peptidaz üretimiyle de ilişkili olduğu yönünde kaynaklar da mevcuttur. Sunitha vd (1999) katabolit represyonuna karşı dayanıklı (glukoz kullanımı engellenmiş) *Thermoactinomyces* sp. E79'un mutant suşu ile yabani suşa göre iki kat fazla aktiviteye sahip alkali peptidaz üretimi sağlamışlardır. Duruma daha farklı bir bakış açısıyla yaklaşmak da mümkündür. *Bacillus* gibi sporlu bakterilerde peptidaz salgılanmasının, besin maddelerindeki azalmayla birlikte, vejetatif hücrelerin spor haline dönüşmesiyle ilgili olabileceği bildirilmiştir (Hanlon ve Hodges 1981; O'hara ve Hageman 1990). Katabolit represyonunun ise *Bacillus subtilis*'in şekerleri kullanımıyla ilgili olan enzimlerinin, trikarboksilik asit döngüsündeki ilk üç enzimin ve sporlaşmanın başlamasını sağlayan enzimlerin transkripsiyonu düzenlediği ve glukoz varlığında sporlaşmanın gerçekleşmesi için kilit rol oynayan ve ekstraselüler peptidaz üretiminin düzenlenmesiyle ilişkili olan Spo0A proteininin baskılanmasına neden olduğu ifade edilmektedir (Bierbaum vd 1994). Ancak literatürde, sporlaşma ve peptidaz üretiminin aynı anda olmasına rağmen, aralarında bir ilişki olmadığını ileri süren yayınlar da bulunmaktadır (Fleming vd 1995). Eğer sporlaşma ve peptidaz üretimi arasında ilişki olduğu kabul edilirse, fazla glukoz varlığında sporlaşma gerçekleşmeyeceği için peptidaz üretiminin de engellenebileceği düşünülebilir.

K10 için de sonuçların K1 ile benzerlik arz ettiği, besiyerinde 2 g/l glukoz karşılık 10 g/l maya ekstraktı kullanıldığı durumda en iyi peptidaz aktivitesi seviyesine ulaşıldığı Şekil 4.8b'de görülmektedir. Daha yüksek miktarda glukoz ve maya ekstraktı kullanımı aktivitenin neredeyse tamamen kaybolmasına neden olmuştur.

Çalışma sonuçları, denemeye dahil edilen oranlar arasından temel besi ortamında kullanılmış olan 2 g/l karbon kaynağına karşılık 10 g/L azot kaynağının, peptidaz üretimi açısından her iki suş için de en uygun C/N oranı olduğunu gösterdiğinden fermantasyon denemelerine bu oranda karbon ve azot kaynağı içeren besi ortamı ile devam edilmiştir.

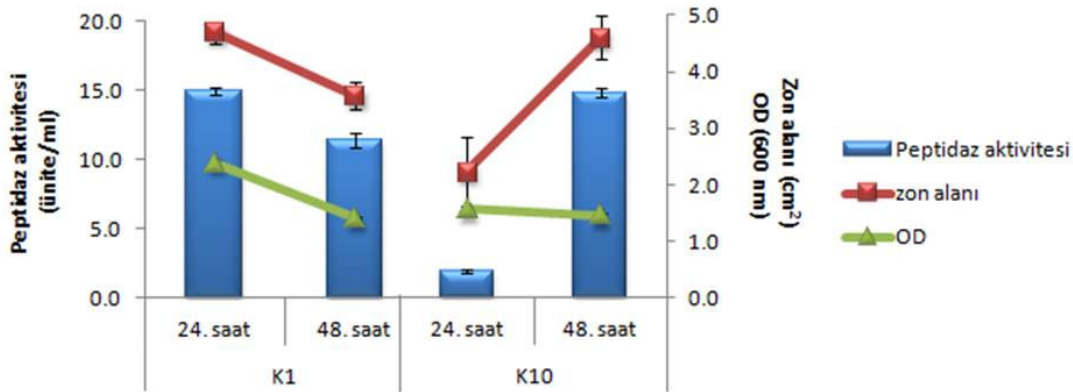
¹ Katabolit represyonu, basitçe, katabolit varlığında enzim sentezinin baskılanması olarak tanımlanmaktadır (Sunitha vd 1999).

K1 ve K10 suşlarının peptidaz aktivitelerinin göstergesi olan, katı besiyerinde (milk agar) kazeini parçalayarak oluşturdukları hidroliz zonu Şekil 4.9’da gösterilmiştir. İnkübasyondan sonra plakaya ilave edilen tannik asit, enzim tarafından hidrolize edilmemiş olan proteinleri çöktürerek enzimin etki ettiği ve etmediği substrat bölgeleri arasında farklı renk yoğunluklarının oluşmasını sağladığından (Saran vd 2007) hidroliz zonu kolaylıkla gözlenebilmektedir. K1 suşunun nutrient agardaki koloni yapısı ise Ek 5’te verilmiştir.



Şekil 4.9. Suşların kazeinli besiyerinde oluşturdukları hidroliz zonları

Şekil 4.10’da zon alanı ve ünite/ml cinsinden peptidaz aktivitelerinin karşılaştırılması gösterilmiştir. Şekil incelendiğinde bakterilerin oluşturdukları zon alanları (cm^2) ve ünite/ml cinsinden peptidaz aktivitesi değerleri arasında, yani kalitatif ve kantitatif aktivite ölçümleri arasında pozitif yönlü bir korelasyon olduğu görülmektedir.



Şekil 4.10. Suşların peptidaz aktivitelerinin ünite/ml ve zon alanı (cm^2) olarak karşılaştırılması

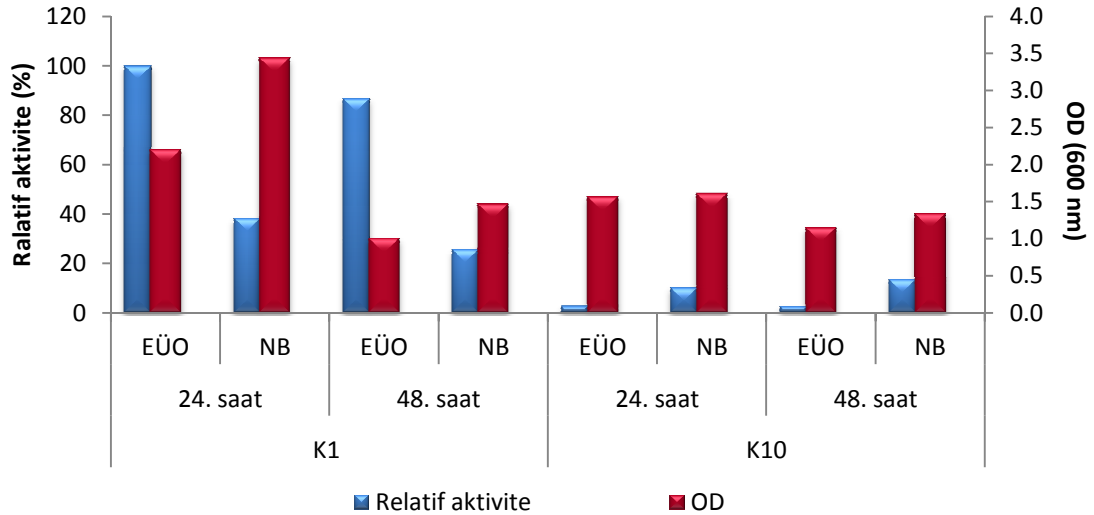
4.3.5. Peptidaz aktivitesi üzerine ön kültür hazırlamada kullanılan besiyerinin etkisi

Çalışmanın şu ana kadarki kısmında ön kültür sürekli nutrient broth (NB) ile hazırlanmış, inkübasyon sonunda, belirlenen bileşenleri içeren enzim üretim ortamına (EÜO) inokülasyon yapılmıştır. Ancak enzim üretim ortamı aynı zamanda ön kültür ortamı olarak kullanılırsa, asıl fermentasyon sırasında bakterinin zaten alışık olduğu ortama adaptasyon süresinin kısalabileceği, enzim üretimini daha erken ve kolay başlatabileceği düşünülmüş ve ön kültür besiyerinin peptidaz aktivitesi üzerine etkisi tespit edilmiştir.

Şekil 4.11’de iki farklı ön kültür ortamında çoğaltılmış K1 ve K10 suşlarının asıl fermentasyon ortamına aktarılmasından sonra elde edilen peptidaz aktivitesi ve OD değerleri gösterilmiştir. Şekilde peptidaz aktivitesi değeri relatif olarak verilmiş, bunun için K1 suşu için EÜO, ön kültür besiyeri olarak kullanıldığı zaman elde edilen aktivite değeri (19.64 ünite/ml) %100 kabul edilip diğer aktivite değerleri bağıl olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar, ön kültür besiyeri olarak EÜO kullanıldığında, peptidaz aktivitesi açısından K1 için artış, K10 için azalış olduğunu göstermiştir.

K1’in aktivite değerinde NB’ye göre 2 kattan fazla artış sağlamış olması nedeniyle, bundan sonraki aşamalarda K1 suşu için ön kültür besiyeri olarak EÜO kullanılmasına karar verilmiştir.

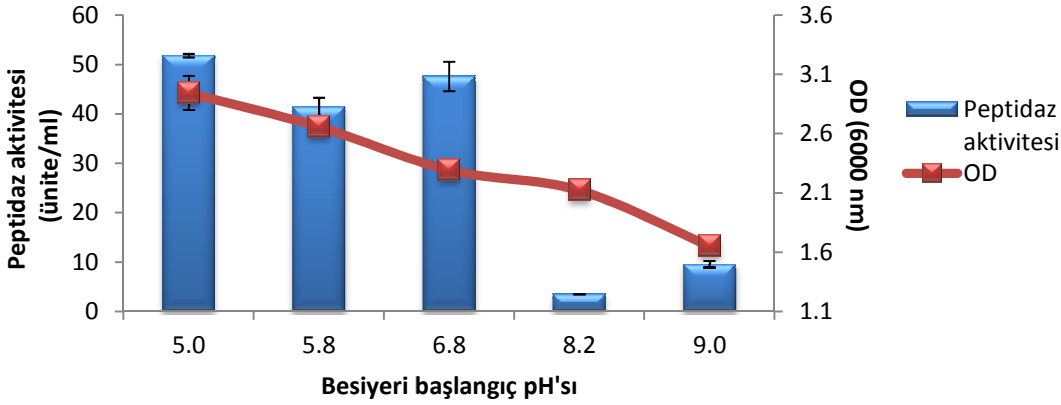
K10 suşunun aktivite değeri şu ana kadar hep K1’den daha düşük kalmış, ön kültür besiyeri olarak EÜO kullanıldığında da olumlu sonuç elde edilememiş, aksine aktivite değeri azalmıştır. Bu çalışmada amaç en yüksek aktivite değerini sağlamak olduğundan ve K10 suşunun optimizasyon çalışması sırasında da aktivitesinde K1’i geçebilecek kadar artış sağlayabileceği düşünülmendiğinden bundan sonra çalışmalara yalnız K1 suşu ile devam edilmiştir.



Şekil 4.11. Suşların peptidaz aktivitesi değeri üzerine ön kültür besiyerinin etkisi

4.3.6. Peptidaz aktivitesi üzerine besiyeri başlangıç pH'sının etkisi

Yanıt yüzey yöntemi ile optimizasyon işlemine geçmeden önce K1 suşunun peptidaz üretimini gerçekleştirebileceği besiyeri başlangıç pH değerleri belirlenmiştir. Bunun için pH 5-9 arasında deneme yapılmış, aktivite ve OD değerleri Şekil 4.12'de gösterilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi besiyeri başlangıç pH'sı düşük olduğu zaman daha yüksek aktivite elde edilmiştir. Bu durum muhtemelen pH değeri yükseldikçe, OD değerinin düşmesinden kaynaklanmaktadır. Alkali koşullarda bakteri gelişimi yavaşladığından enzim üretimi de daha az olmuştur.



Şekil 4.12. Besiyeri başlangıç pH'sının K1 suşunun peptidaz aktivitesi değeri üzerine etkisi

K1 suşu ile peptidaz üretimi için kültür koşullarının belirlenmesi için yapılan analizler, peptidaz üretimi için en uygun enzim üretim ortamının (karbon ve azot kaynakları ve miktarları açısından), çalışmanın en başında belirlenmiş olan temel besi ortamı (Bkz. Çizelge 3.1) olduğunu göstermiştir. Bunun dışında fermantasyon 250 rpm çalkalama hızında yapıldığında ve ön kültür, enzim üretim ortamı ile hazırlandığında daha yüksek aktivite elde edilmiştir.

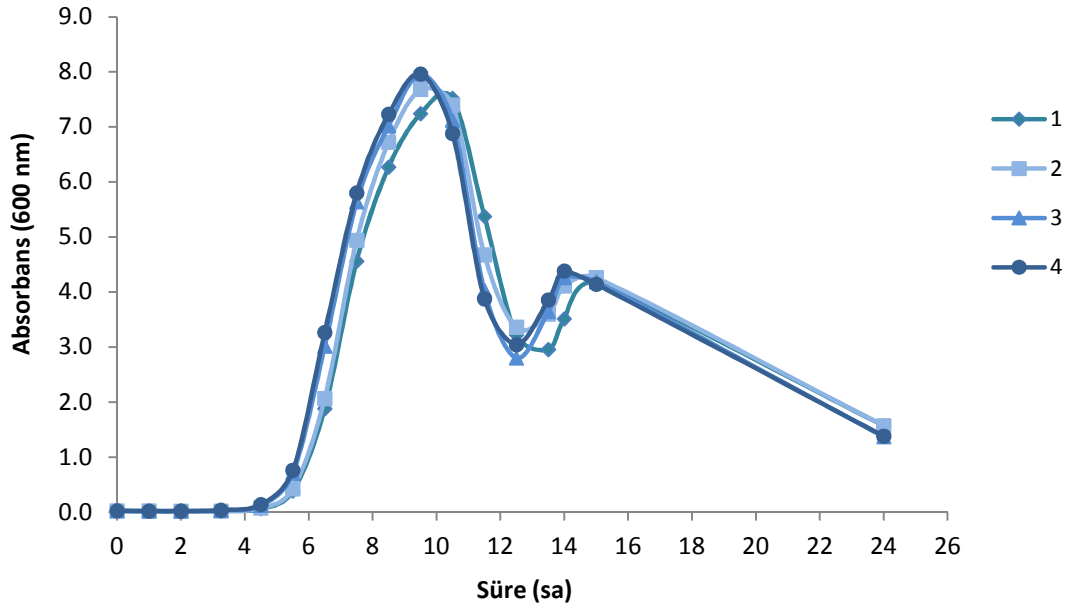
4.4. K1 Suşu ile Peptidaz Üretiminin Optimizasyonu

Yanıt yüzey yöntemi ile peptidaz üretiminin optimize edilmesi için merkezi tümleşik deneme deseninden (central composite-CCD) yararlanılmış; sıcaklık, besiyeri başlangıç pH'sı ve inokulum oranı faktör olarak seçilmiştir. Seçilen faktörlerin seviyeleri ise bakterinin peptidaz üretme kapasitesi (Bkz. 3.2.8) ve peptidaz üretimi için kültür koşullarının belirlenmesi (Bkz. 3.2.9) sırasında yapılan analizler göz önünde bulundurularak tespit edilmiştir. Sıcaklık derecesinin belirlenmesi için 30-55 °C arasında yapılan analizler, bakterinin 50 °C ve üzerindeki sıcaklıklarda peptidaz üretmediğini göstermiş, bu nedenle deneme deseninde kullanılacak sıcaklık aralığının 20-45 °C olmasına karar verilmiştir. Besiyeri başlangıç pH değeri seçilirken bakterilerin izole edildiği ortam göz önünde bulundurulmuştur. Bu tez çalışmasında kullanılan *Bacillus* suşlarının tamamı sünmüş ekmek içinden izole edilmiştir. Genel olarak ekmek pH'sı yaklaşık 5.5-6.0'dır. Düşük pH değerlerinde bakterinin gelişmeyeceği düşünüldüğünden minimum değer 5.0 olması uygun bulunmuştur. Alkali ortamda

bakteri gelişiminin ve peptidaz üretiminin ne şekilde olacağını görebilmek adına üst limit biraz yüksek tutulmuştur. Besiyeri başlangıç pH değerinin 5.0-9.0 arasında olmasına karar verilmiş ve ön denemelerde bu aralıklarda peptidaz üretiminin gerçekleşebildiği tespit edilmiştir. İnokulasyon oranı ise %1-5 arasında olacak şekilde seçilmiştir.

4.4.1. K1 suşunun gelişim eğrisi ve peptidaz aktivitesinin değişimi

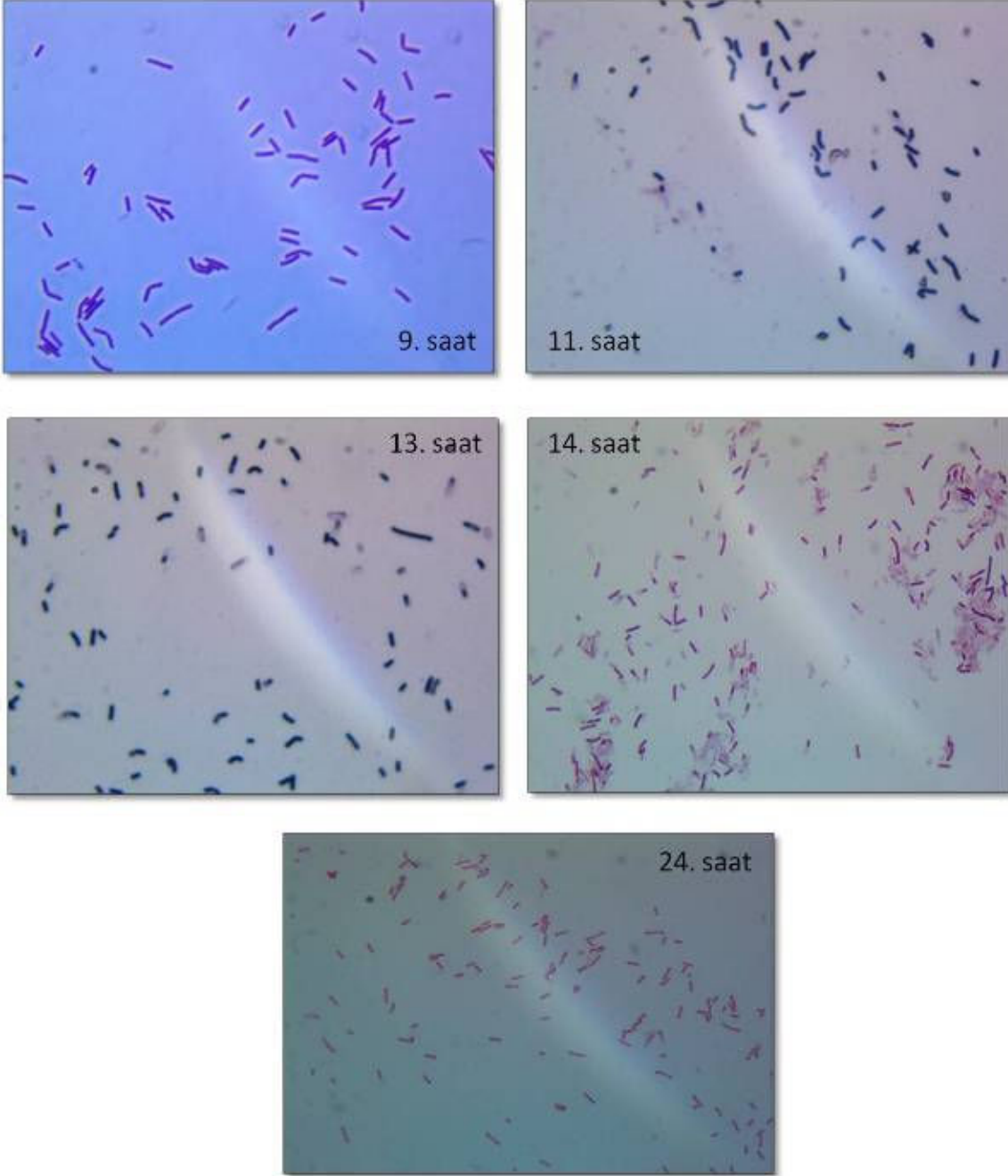
Doğrudan -80 °C'den alınan stok kültürün enzim üretim ortamı olarak belirlenmiş besiyerine aktarılmasından sonra tespit edilen gelişme eğrisi Şekil 4.13'de gösterilmiştir. Şekilde dört tekerrüre ait, ayrı ayrı verilen grafikler genel profilin aynı olduğunu göstermektedir. K1 suşu lag fazından sonra hızla gelişmiş ve yaklaşık 8.0 OD değerine ulaşmıştır. Ardından OD değeri hızla düşmüştür. Mevcut koşullar altında K1 suşu için logaritmik fazdan sonra durgun fazın oluşmadığı (ya da oldukça kısa bir süre için oluştuğu) ve bakteri ölümünün gerçekleştiği düşünülmektedir.



Şekil 4.13. K1 suşunun 37 °C'deki gelişme eğrisi

OD değerindeki ani düşüşün nedenini belirleyebilmek için ilk önce ortam pH'sı kontrol edilmiştir. Bilindiği gibi logaritmik fazın sonuna doğru üretilen metabolitler gelişimi engellemektedir (Tunail 2009). K1 suşunun da asit üreterek kendi gelişimini inhibe etmiş olabileceği düşünülmüştür. İnokulasyon yapılmadan önce, yani steril besiyerinin pH'sı 6.86'dır. OD'nin düşmeye başladığı noktalarda da pH ölçümü yapılmış ancak pH'nın nötr seviyelerde olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde metabolit olarak toksik maddeler de oluşmuş olabilir. Fakat bunun için bir tespit yapılamamıştır. Başka bir fikir olarak ortamda şekerin bitmesine bağlı olarak bakterinin ölüm fazına geçmiş olabileceği üzerinde durulmuştur. Ancak besiyerine ilave edilen glukoz miktarında azalma gözlenmesine rağmen tamamen bitmediği tespit edilmiştir. Bu durumda ya bakterinin spesifik bir besin kaynağına ihtiyacı olduğundan ya da bakterinin yüksek OD değerlerine ulaşması, yani canlı sayısının fazla olması nedeniyle

ortamdaki mevcut besin maddesi için bir rekabet ortamı olduğundan söz edilebilir. Dolayısıyla besine ulaşamayan hücrelerin hızla parçalanması (lysis) sonucu OD değerinin azaldığından söz edilebilir.



Şekil 4.14. K1 suşu için 37°C’de inkübasyon sırasındaki gram boyama sonuçlarına ait mikroskop görüntüleri

Hücre parçalanmasının kontrolü amacıyla, gelişme eğrisi oluşturulurken, özellikle OD düşmeye başladıktan sonra örnek alınarak gram boyama yapılmıştır. Gram boyama sonuçlarına ait mikroskop görüntüleri Şekil 4.14'de verilmiştir. Bilindiği gibi *Bacillus* türleri Gram pozitif çubuk şeklinde bakterilerdir (Sneath 1984). Dolayısıyla canlı hücrelerin mor renkli görünmesi gerekmektedir. Şekil 4.14'de 9. saat görüntüsünde hücreler mor renkli olmasına rağmen ışığın iyi ayarlanamaması nedeniyle daha açık renkli görünmektedir. 11. ve 13. saat görüntüleri incelendiğinde mor renk daha net olarak ayırtedilebilmektedir. Ancak zaman ilerledikçe yapılar da farklılaşmalar göze çarpmakta, örneğin; 13. saat görüntüsünde bazı hücrelerin sporlaştığı görülmektedir. Daha bariz bir farklılaşma 14. ve 24. saat görüntülerinde mevcuttur. Hücreler Gram negatif gibi pembe görünmektedir. Muhtemelen hücre içinde salgılanan peptidoglikan hidrolazları (otolizin)¹ aracılığı ile hücre duvarındaki peptidoglikan (murein) ağının, yani hücre duvarının kısmen ya da tamamen zarar görmesi sonucu (Vollmer vd 2008) hücreler ilk boyayı bünyesinde tutamadığından ikinci boyanın renginde (pembe) görünmektedir. Otolizin aracılığıyla hücre duvarının yıkımının ardından hücre parçalanması (lysis) işleminin gerçekleştiği bildirilmektedir (Rice ve Bayles 2008).

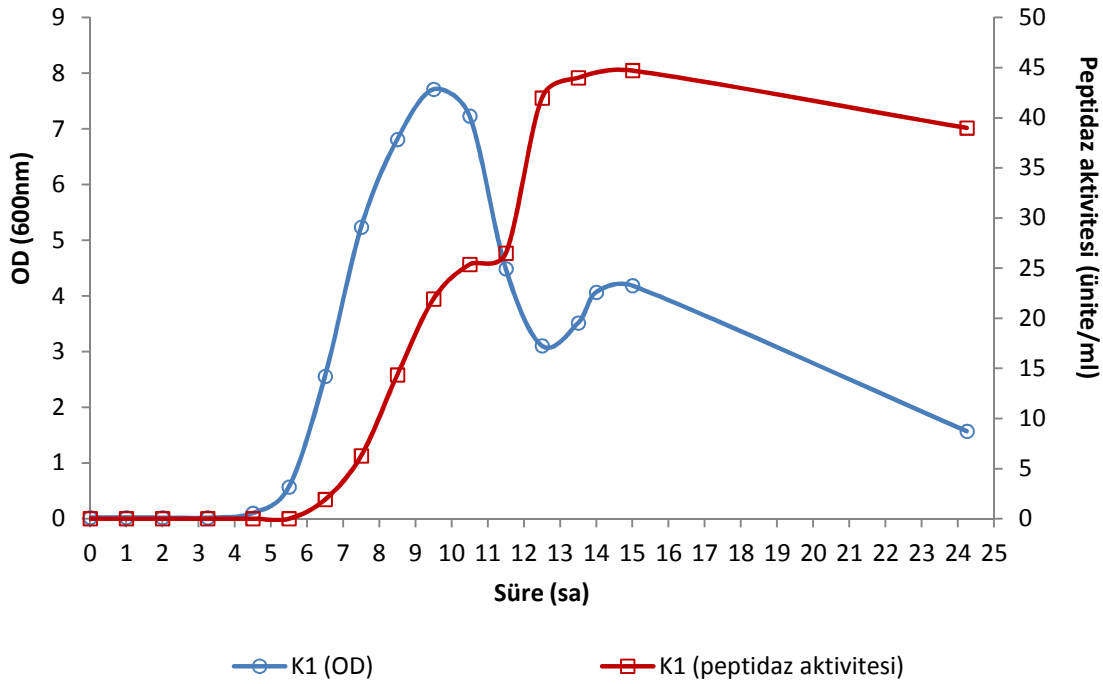
Gelişme eğrisinin mevcut koşullar altında bu şekilde olduğu tespit edildikten sonra K1 suşu için spesifik büyüme hızı ve ikiye katlanma süreleri hesaplanmıştır. Bu değerlere ait sonuçlar Çizelge 4.9'da verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde K1 için hesaplanan 0.817 sa⁻¹'lik spesifik büyüme hızının, Gençkal ve Tari'nin (2006) 37 °C'de üç *Bacillus* suşu için 0.49, 0.60 ve 0.70 sa⁻¹ olarak tespit ettikleri spesifik büyüme hızlarından yüksek olduğu görülmektedir. Logaritmik faz boyunca K1 suşunun yaklaşık 50 dakikada bir OD değerini iki katına çıkardığı anlaşılmaktadır.

Çizelge 4.9. K1 suşu için spesifik büyüme hızı ve ikiye katlanma süresi

	Logaritmik faz büyüme fonksiyonu	R ²	Spesifik büyüme hızı (μ, sa ⁻¹)	İkiye katlanma süresi (t _d , sa)
K1 (37 °C)	y= 0.8169x-4.7317	0.8952	0.8169	0.849

K1 suşunun büyüme eğrisindeki farklılığın tespitinden sonra yine stok kültür ile ön kültür hazırlanmış, OD'nin yanı sıra peptidaz aktivitesinin nasıl değiştiği izlenmiştir. Şekil 4.15.'de stok kültürün 37 °C'de inkübasyonu sırasında elde edilen OD ve peptidaz aktivitesi değerleri gösterilmiştir. OD değerleri ile birlikte gram boyama sonuçları da göz önünde bulundurulduğunda, hücre parçalanmasının gerçekleştiği düşünülen süreden sonra peptidaz aktivitesinde ani bir artış meydana geldiği Şekil 4.15'de görülmektedir. Bu durumda, hücre parçalanmasıyla birlikte hücre içi peptidazların da açığa çıktığından söz edilebilir.

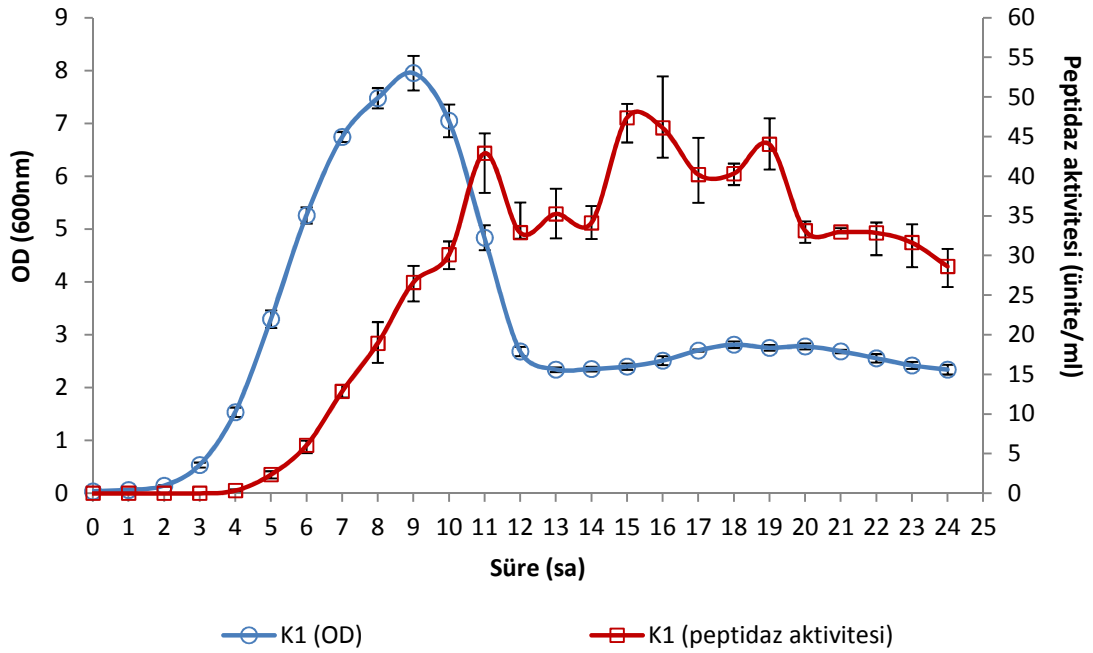
¹ Normal şartlarda hücrenin gelişmesi ve bölünmesi için gerekli olan enzimlerdir. Ancak fazla salgılanmaları durumunda hücre duvarına zarar verirler. Hücre içi asidik pH'da iken inaktif olan bu enzimler, hücre içi pH'sı arttığı zaman aktive olurlar (Rice ve Bayles 2008).



Şekil 4.15. K1 suşunun 37 °C'deki OD değeri ve peptidaz aktivitesi değişimi

Oskouie vd (2008) de *Bacillus clausii* ile alkali peptidaz üretimi için besiyeri optimizasyonunu yaptıkları bir çalışmada, bu tez çalışmasındaki ile aynı hacimde besiyeri ortamı kullanmış, benzer profilde gelişim ve peptidaz eğrileri elde etmişlerdir. OD değeri yaklaşık 9'a ulaştıktan bir süre sonra düşmeye başlamış ve 5 değerine düştüğünde de peptidaz aktivitesinde bariz bir artış gözlenmiştir. Ancak bu şekilde bir profil, 40 saatlik bir fermantasyon ile gerçekleşmiş, yaklaşık 15 saatlik bir durgun faz gözlendikten sonra OD azalmıştır. Ayrıca farklı olarak peptidaz üretimi logaritmik fazın başlarından itibaren değil, durgun fazla birlikte başlamıştır.

Gelişim eğrisi ve hücre parçalanması üzerine sıcaklığın etkisi olup olmadığını tespit etmek için stok kültür ile ön kültür hazırlanmış ve logaritmik fazdaki ön kültürden enzim üretim ortamına inokülasyon yapılarak 30 °C'de (daha önce K1 ile peptidaz üretimi için en iyi sıcaklık olduğu belirlenen – Bkz. Şekil 4.4) fermantasyona bırakılmıştır. Fermantasyona 24 saat devam edilmiş ve birer saat aralıklarla örnek alınıp OD ve peptidaz aktivitesi değerleri belirlenmiştir. OD ve peptidaz aktivitesi değişimi Şekil 4.16'da verilmiştir. Şekil incelendiğinde gelişim eğrisinin 37 °C'de elde edilen eğriyle benzer olduğu, yüksek OD'ye ulaştıktan sonra OD'nin azaldığı görülmektedir. OD belli bir seviyeye kadar azaldıktan sonra sabit kalmıştır. Peptidaz aktivitesi de yine 37 °C'deki ile benzer şekilde, OD değeri azalmasına rağmen, artış göstermektedir. Dolayısıyla ani hücre ölümünün sadece fermantasyon sıcaklığına da bağlanması söz konusu değildir.



Şekil 4.16. K1 suşunun 30 °C'de fermantasyonu sırasında OD değeri ve peptidaz aktivitesi değişimi

4.4.2. Yanıt yüzey yöntemi ile K1 suşunun optimum peptidaz üretim koşullarının tespit edilmesi

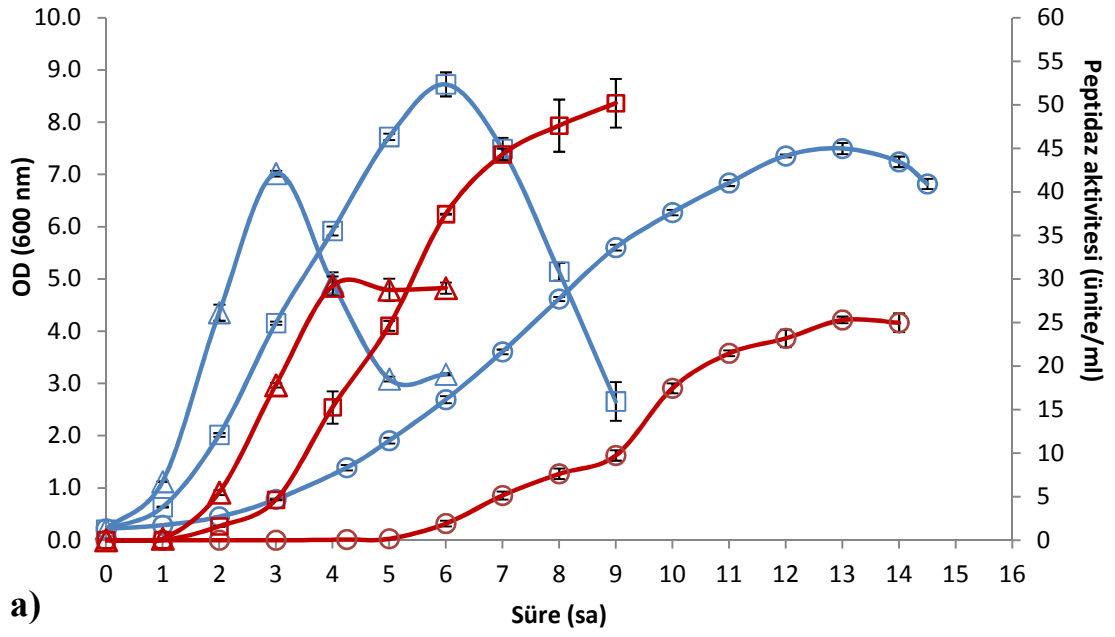
Çalışmanın daha önceki planı, yanıt yüzey yöntemine göre oluşturulmuş deneme desenine göre, üretimin gerçekleştirileceği koşullar altında gelişme eğrisinde özellikle logaritmik fazın son kısımları ve durgun fazda daha yoğun olmak üzere belirli aralıklarla örnek toplayarak peptidaz aktivitesinin maksimuma ulaştığı noktayı (süreyi) tespit etmek şeklindeydi. Ancak gelişme eğrisindeki öngörülemez farklılık planların değişmesine neden olmuştur. OD düşmeye başladıktan sonra peptidaz aktivitesindeki artışın hücre içi peptidazların da açığa çıkmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ancak bu tez çalışmasının konusu hücre dışı peptidazları tespit edip aktivite düzeyini optimize etmek olduğundan, yanıt yüzey yönteminde yanıt olarak, hücre parçalanmadan önce ulaşılan maksimum aktivite değerinin kullanılması gerektiği düşünülmüştür. Dolayısıyla, hücre parçalanması arzu edilmediği için maksimum OD değeri önem arz etmektedir. Ancak maksimum OD'ye ulaşma süresi de faktör seviyelerine göre farklılık arz etmektedir. Bunun için deneme desenindeki her bir koşul uygulanırken, ön kültürden asıl enzim üretim ortamına inokülasyon¹ yapıldıktan sonra birer saat aralıklarla örnek alınmış, OD ve peptidaz aktivitesi değerleri ile glukoz ve protein miktarları takip edilmiştir. Bu değerlere ait grafikler Şekil 4.17-4.23'de verilmiştir. Glukoz ve protein miktarları fermantasyon süresince ortamdaki besin miktarı hakkında fikir edinmek, özellikle de OD değerindeki ani değişim sırasında besin durumunun ne şekilde değiştiğini gözlemlemek için tespit edilmiştir.

¹Inokülasyon logaritmik fazın ortasına ulaşmış olan (7.5 sa) ön kültürden yapılmıştır.

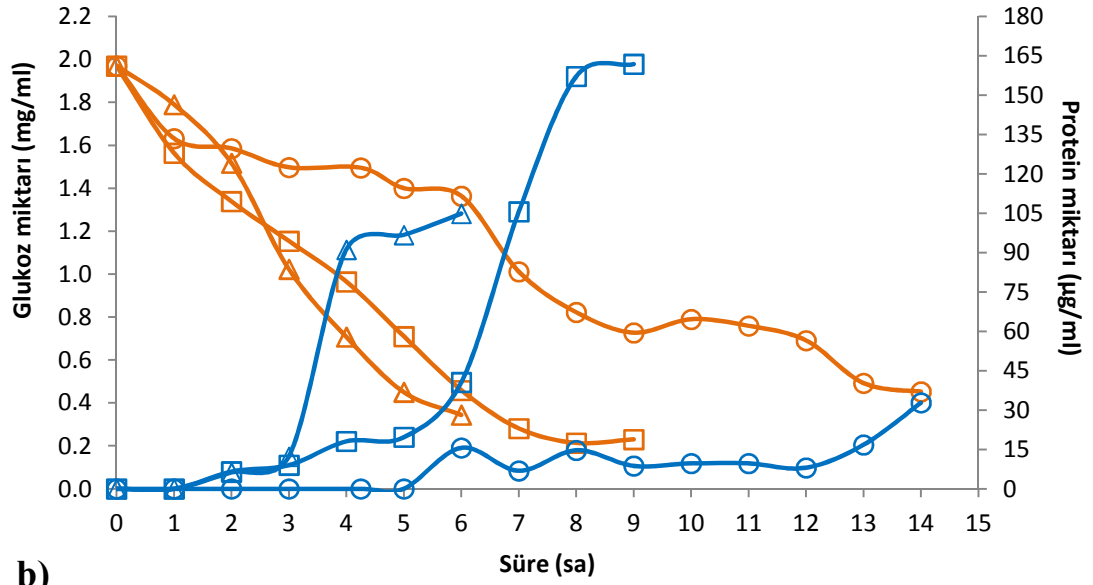
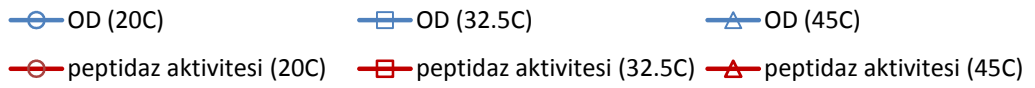
Farklı koşullar için elde edilmiş OD ve peptidaz aktivitesi değerlerine ait şekillerden (Şekil 4.17-4.23) görüldüğü üzere K1 suşu ile peptidaz üretimi, Razak vd (1997) ile Gençkal ve Tari'nin (2006) bildirdiğinin aksine, bakterinin gelişmesi ile yakından ilişkilidir. Farklı sıcaklık, pH, inokulum koşullarında dahi, peptidaz üretimi sürekli olarak logaritmik faz başladıktan kısa bir süre sonra başlamış ve gelişme arttıkça, peptidaz aktivitesi de artmıştır. Ancak yüksek hücre yoğunluğuna ulaştıktan sonra ani hücre ölümüyle birlikte hücre içi peptidazların da ortama salgılandığı düşünüldüğünden logaritmik fazdan sonra hücre gelişimi (OD) ve hücre dışı peptidaz aktivitesi arasındaki ilişkinin ne yönde olduğu belirlenmemiştir.

Şekil 4.17-4.23'de farklı fermantasyon koşullarındaki glukoz miktarları incelendiğinde fermantasyonun sonlandırıldığı noktada ortamda az da olsa şeker kaldığı, şekerin tamamen tüketilmediği görülmektedir. Özellikle 20 °C ve 25 °C gibi düşük sıcaklıklarda (Şekil 4.17b, Şekil 4.20b) bakterinin şeker tüketimi nispeten daha az olmuş, ortamda diğer fermantasyon koşullarına göre biraz daha fazla şeker kalmıştır. Aynı sıcaklık derecesinde farklı pH değerlerinde de şeker tüketimi farklı oranlarda olmuştur. Örneğin; 25 °C'de farklı pH koşullarındaki grafikler incelendiğinde (Şekil 4.20b, Şekil 4.21b) besiyeri başlangıç pH'sı yüksek (8.19) iken bakterinin daha fazla şeker tükettiği görülmektedir. Besiyeri başlangıç pH'sı 5.81 iken %1.81 ve %4.19 inokülasyon oranı uygulandığında, maksimum OD değerine ulaşıldığı anda harcanan glukoz miktarı sırasıyla 0.966 mg/ml (%50) ve 0.894 mg/ml (%47) olarak belirlenmiştir. Besiyeri başlangıç pH'sı 8.19 olarak ayarlandığında ise %1.81 ve %4.19 inokülasyon oranı uygulandığında, maksimum OD değerine ulaşıldığı anda harcanan glukoz miktarının sırasıyla 1.444 mg/ml (%84) ve 1.309 mg/ml (%77) olduğu tespit edilmiştir. İstatistiksel bir değerlendirme yapılmasa da değerlerden görüldüğü üzere inokülasyon oranı harcanan şeker miktarını çok fazla değiştirmemiştir. Benzer şekilde 32.5 °C'de inokülasyon oranı %3 iken besiyeri başlangıç pH'sı 5.0, 7.0 ve 9.0 olduğunda, maksimum OD'ye ulaşıldığı anda harcanan glukoz miktarları sırasıyla 1.047 mg/ml (%56), 1.511 mg/ml (%76) ve 1.463 mg/ml (%89) olarak belirlenmiştir (Farklı pH'larda otoklavda sterilizasyon sonrası başlangıç glukoz seviyeleri farklı olduğu için parantez içinde, başlangıç glukoz miktarının % kaçının harcandığı verilmiştir). Pantamas vd (2003) de *B. licheniformis* ve *B. coagulans*'ın yüksek alkali koşullarda düşük alkali koşullara göre daha fazla glukoz tükettiklerini tespit etmişlerdir.

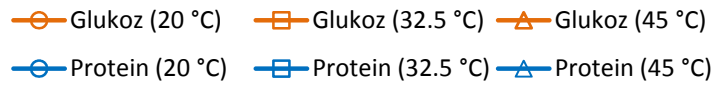
Şekil 4.17-4.23'deki protein miktarlarına bakıldığında ise maksimum OD değerine ulaşılmaya kadar protein miktarının çok düşük seviyelerde kaldığı, artış oranının da çok az olduğu görülmektedir. Bu aşamada ölçülen protein miktarının sadece bakteri tarafından hücre dışına salgılanan proteinlerden, özellikle de peptidazlardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Çünkü steril enzim üretim ortamında tespit edilebilir oranda protein bulunmamaktadır ve peptidaz aktivitesi analizi pozitif sonuç vermeye başladıktan sonra protein miktarı da belirlenebilmektedir. Ancak Şekil 4.17-4.23'deki genel olarak tüm grafiklerde maksimum OD değerine ulaşıldıktan hemen sonraki ölçümlerde protein miktarlarında ani artış olduğu görülmektedir. Bu durumun da yine hücre parçalanmasına bağlı olarak hücre içi proteinlerin ortama karışmış olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bir yandan parçalanmayan hücreler, enzimler başta olmak üzere hücre dışı protein salgılamaya devam ederken, diğer yandan parçalanmış hücreler nedeniyle hücre içi proteinlerin de hücre sıvısına karışması protein miktarının artmasına neden olmuştur.



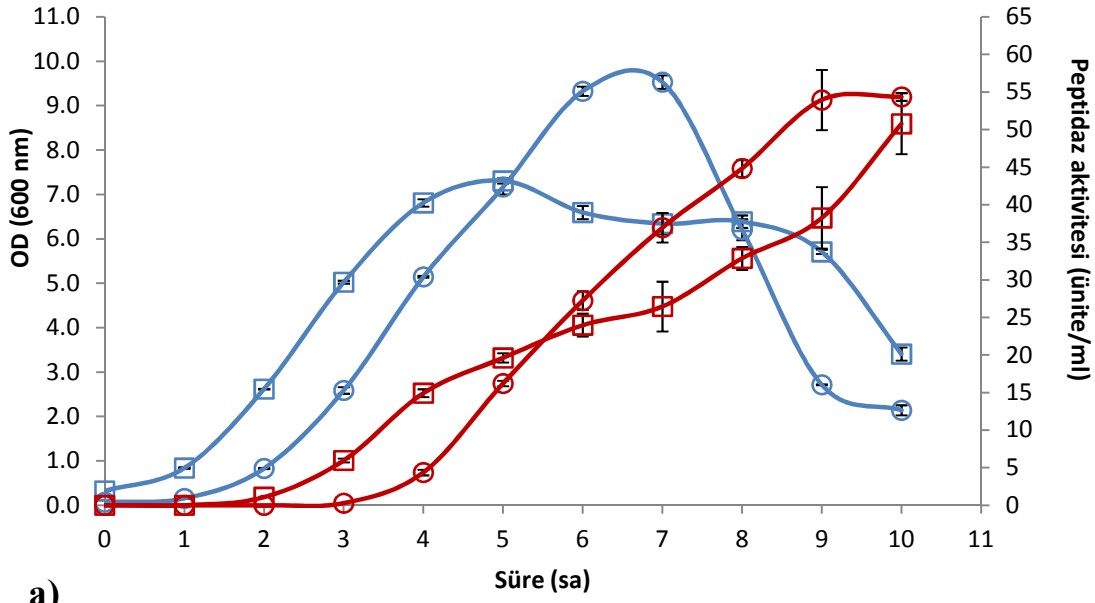
a)



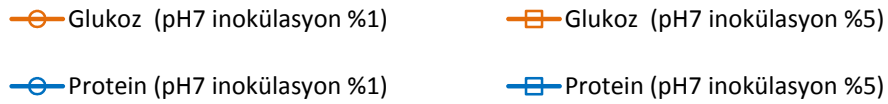
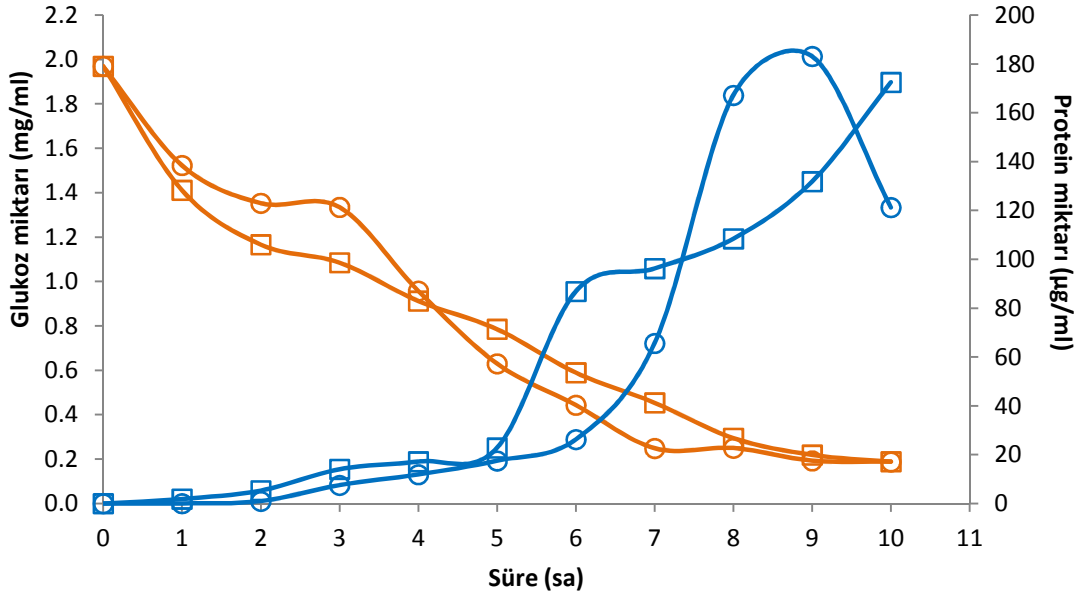
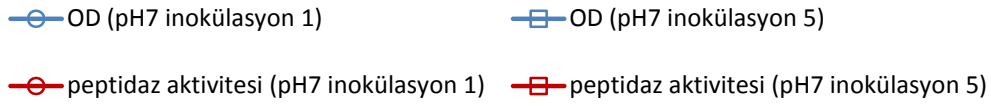
b)



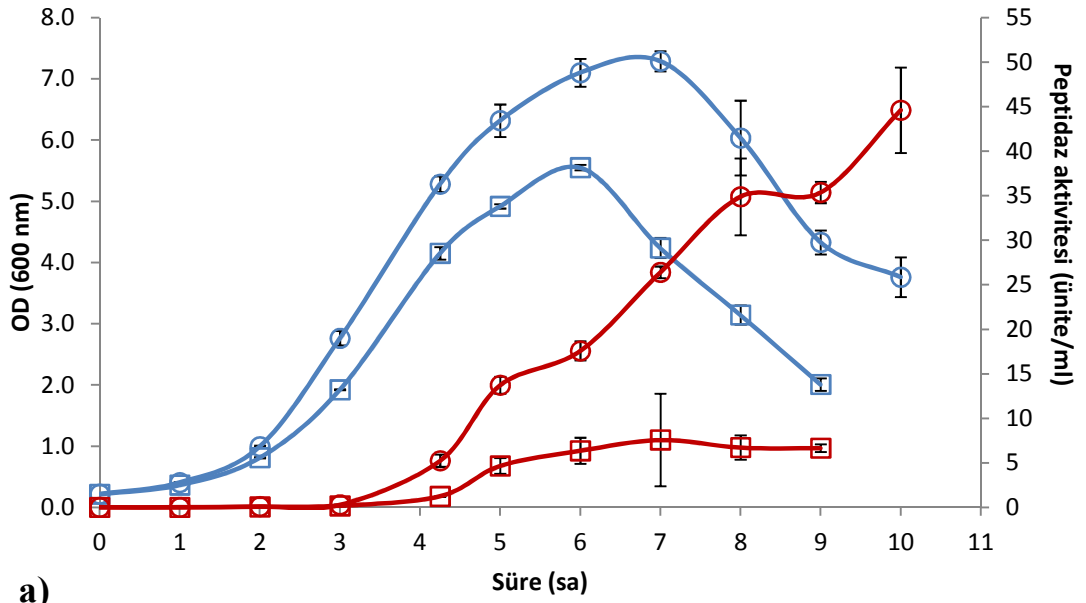
Şekil 4.17. K1 suşunun farklı sıcaklık derecelerinde pH 7 ve %3 inokülasyon oranındaki a) OD ve peptidaz aktivitesi ile b) glukoz ve protein miktarının değişimi



a)

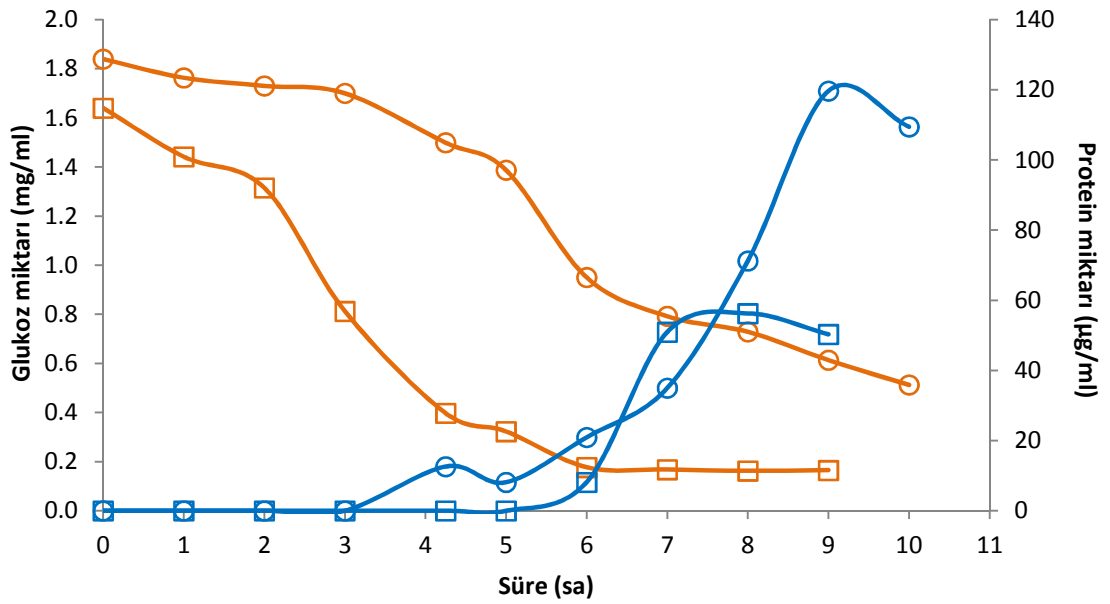


Şekil 4.18. K1 suşunun 32.5 °C'de pH 7'de farklı inokülasyon oranlarındaki a) OD ve peptidaz aktivitesi ile b) glukoz ve protein miktarının değişimi



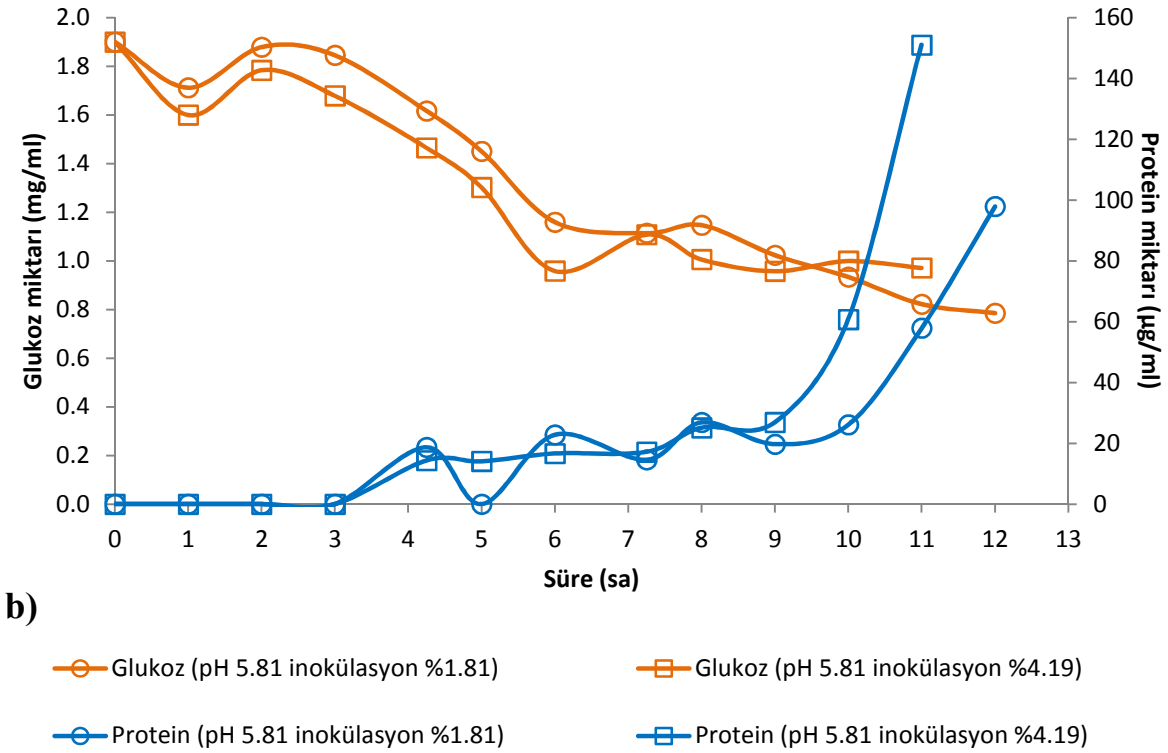
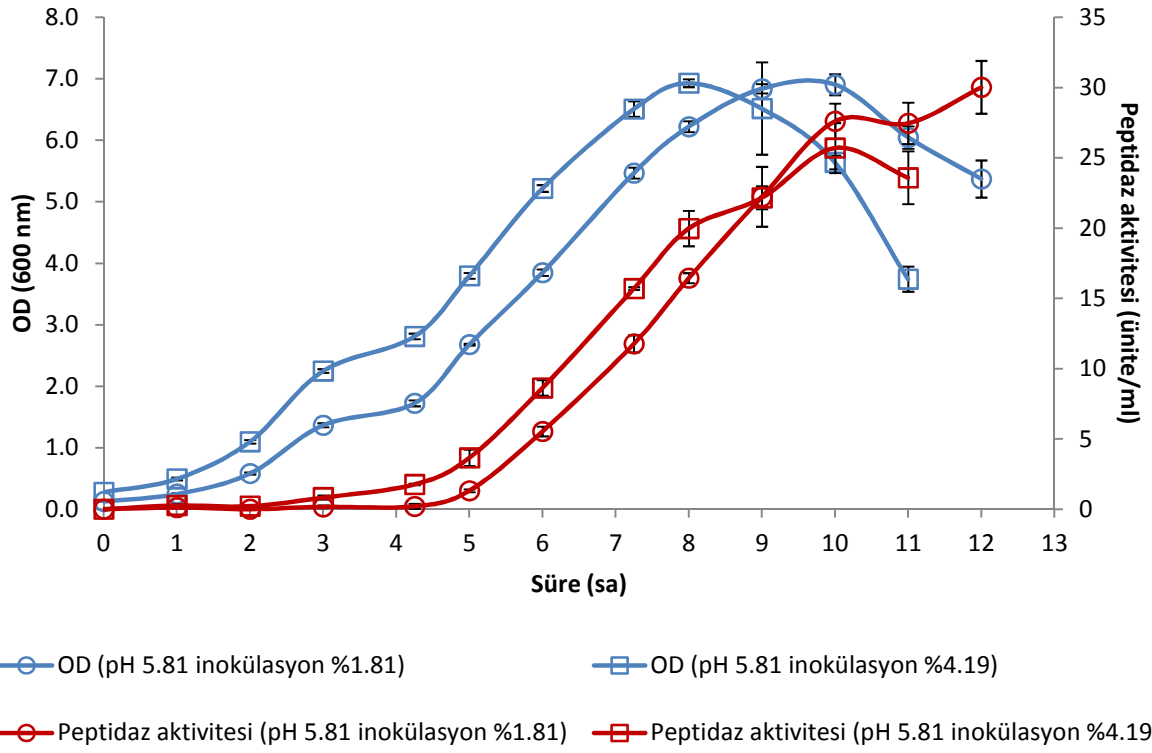
a)

○ OD (pH5 inokülasyon 3) □ OD (pH9 inokülasyon 3)
○ peptidaz aktivitesi (pH5 inokülasyon 3) □ peptidaz aktivitesi (pH9 inokülasyon 3)

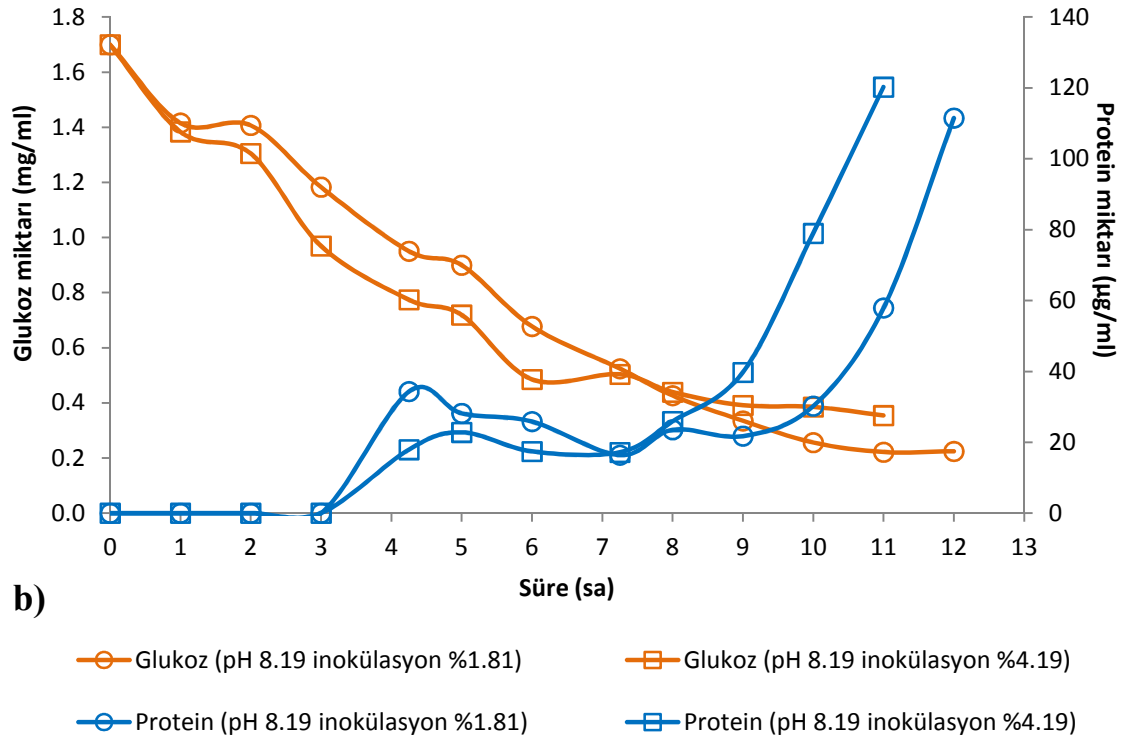
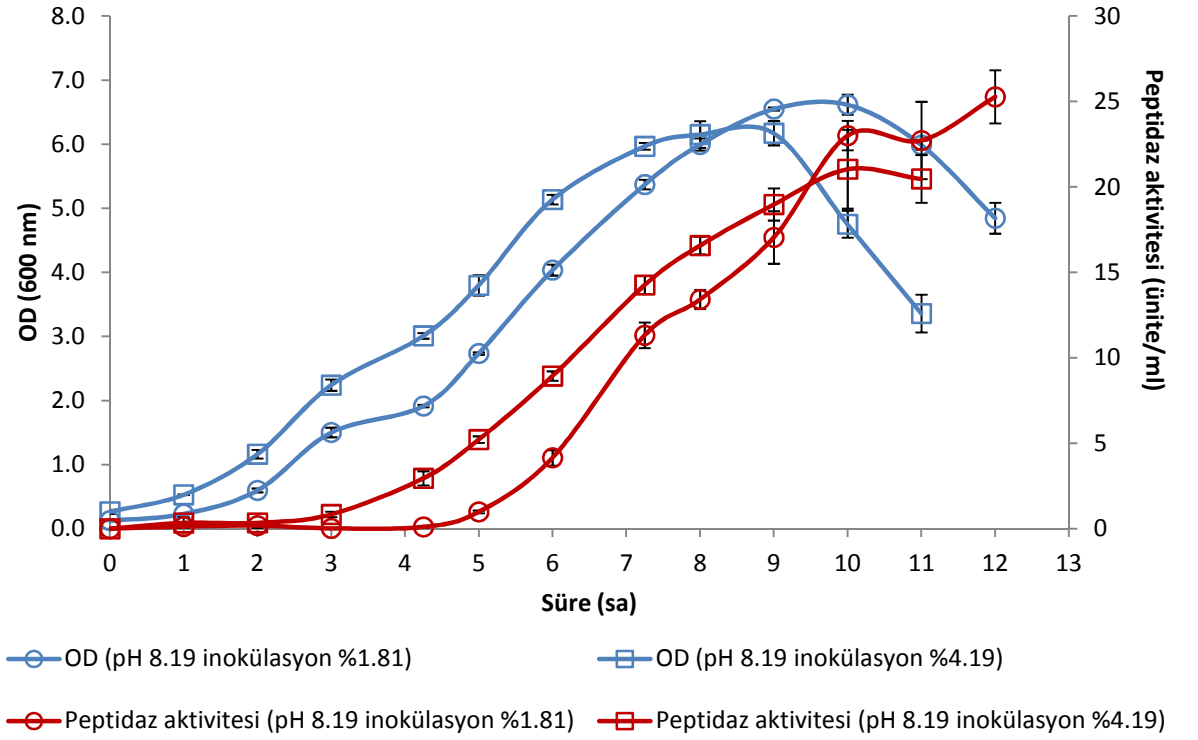


○ Glukoz (pH5 inokülasyon %3) □ Glukoz (pH9 inokülasyon %3)
○ Protein (pH5 inokülasyon %3) □ Protein (pH9 inokülasyon %3)

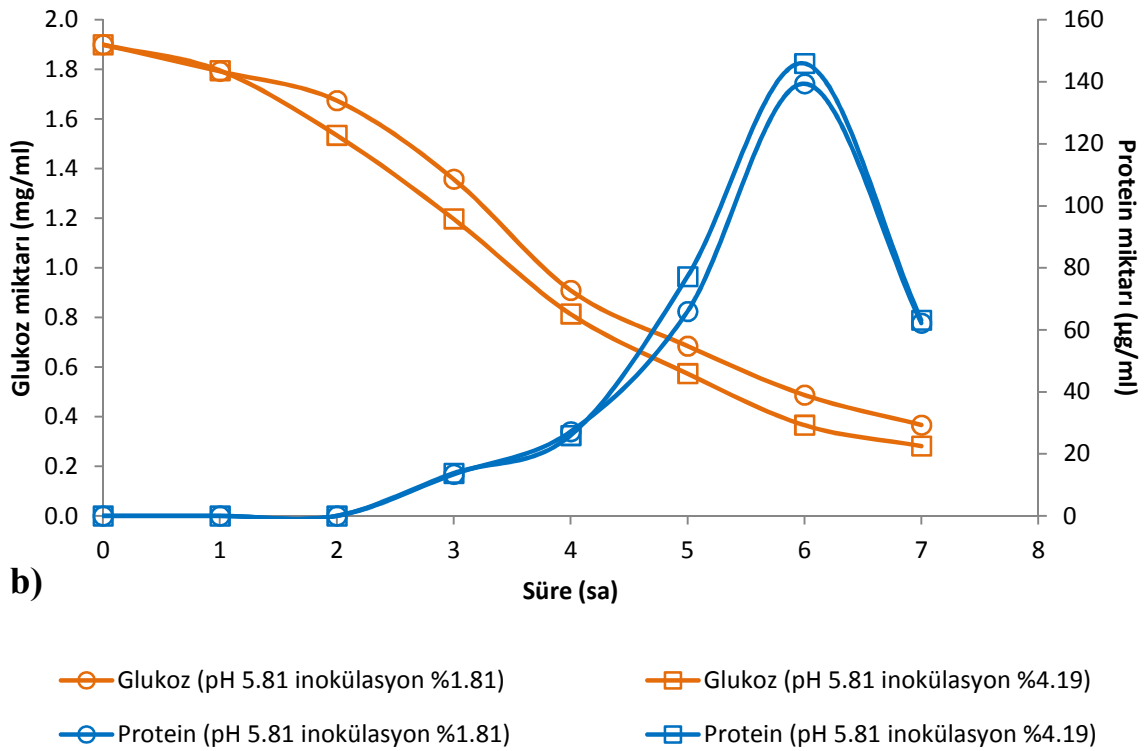
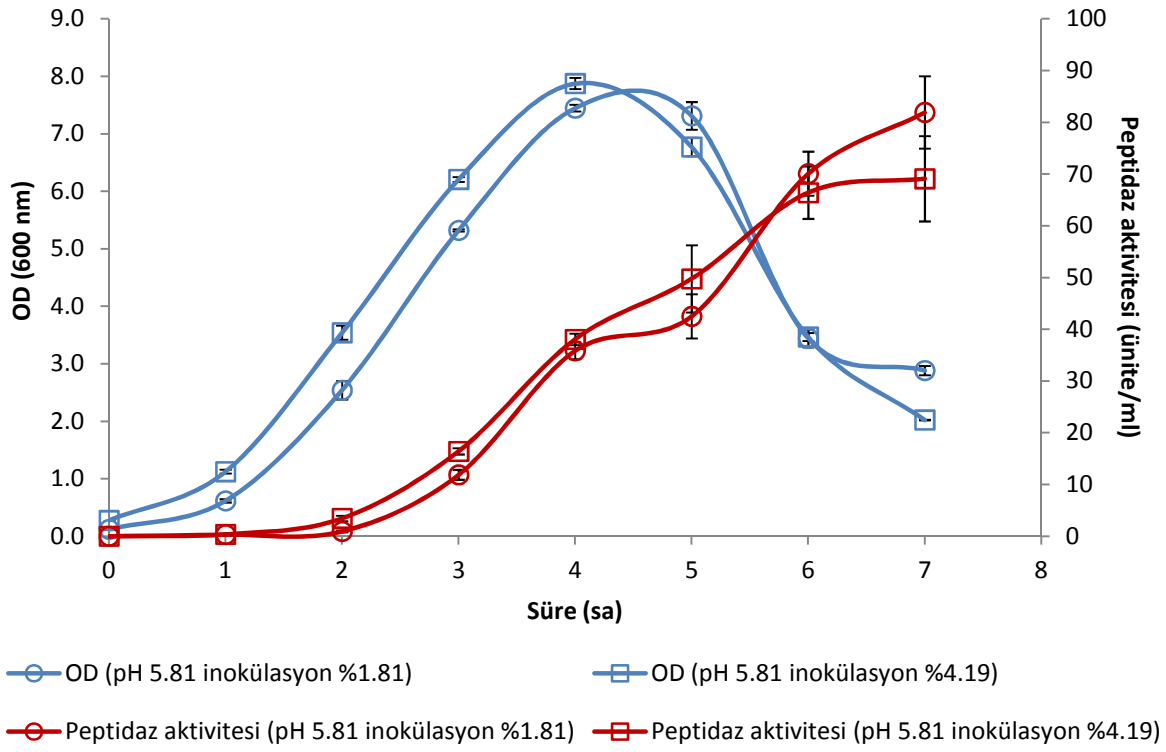
Şekil 4.19. K1 suşunun 32.5 °C'de farklı pH değerlerinde %3 inokülasyon oranındaki a) OD ve peptidaz aktivitesi ile b) glukoz ve protein miktarının değişimi



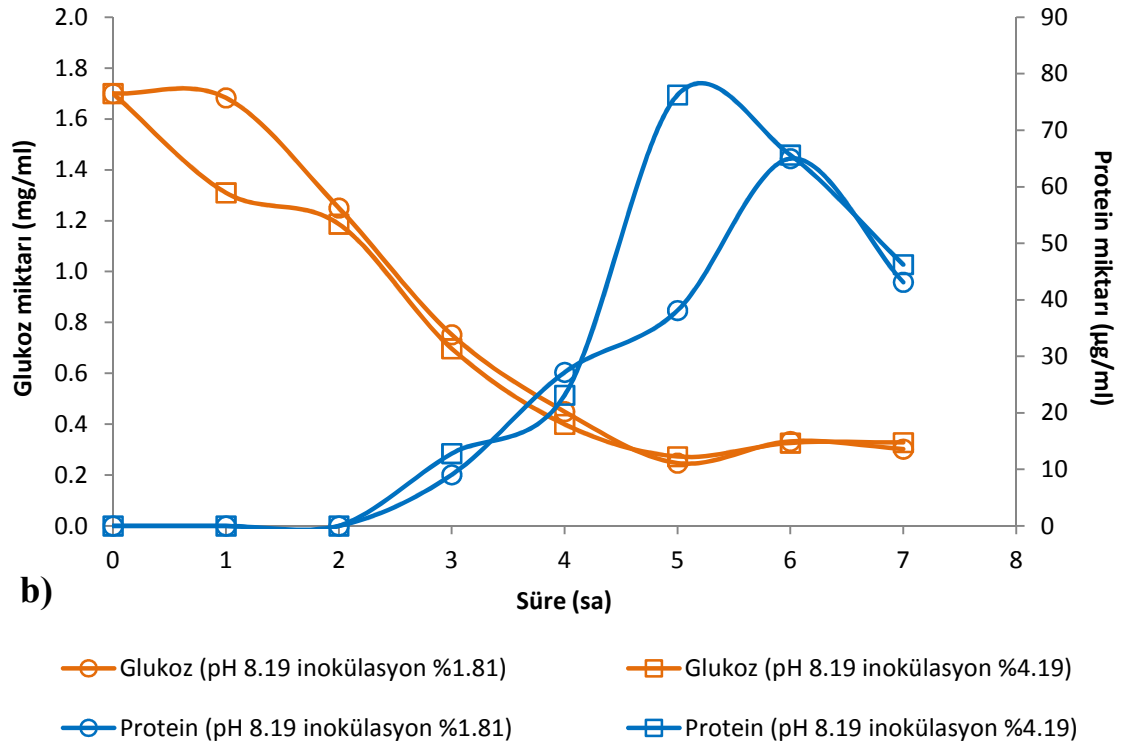
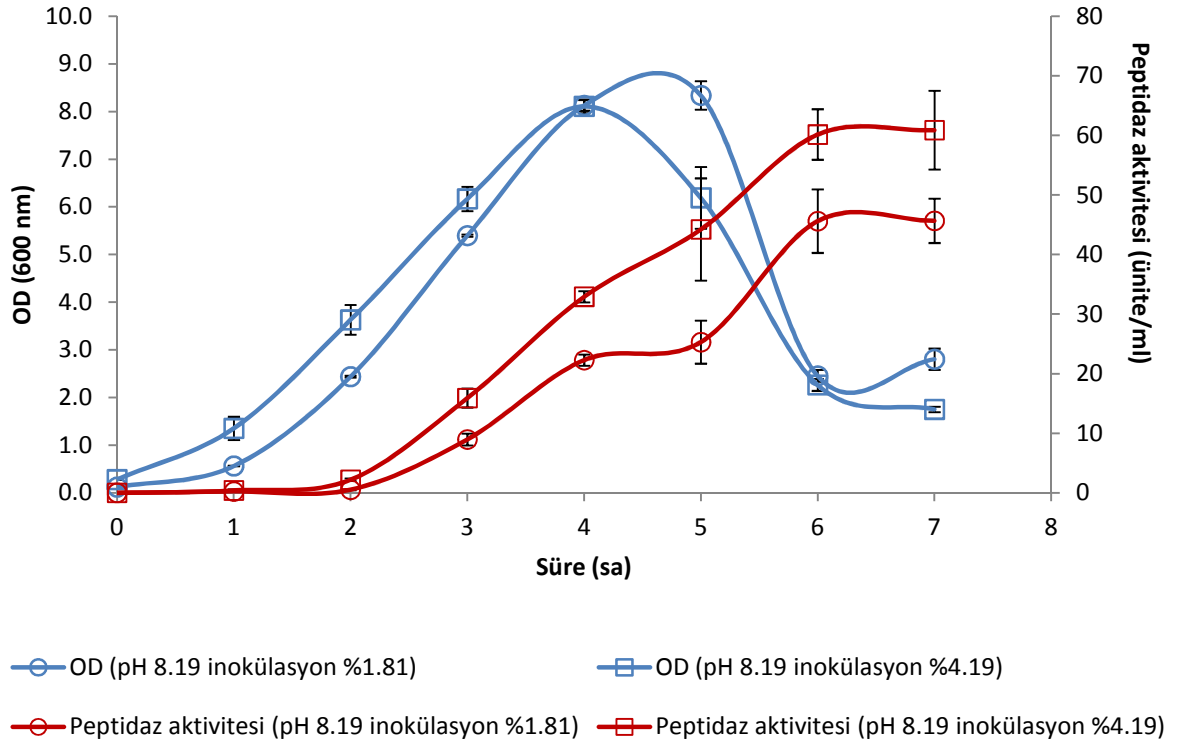
Şekil 4.20. K1 suşunun 25 °C'de pH 5.81'de farklı inokülasyon oranlarındaki a) OD ve peptidaz aktivitesi ile b) glukoz ve protein miktarının değişimi



Şekil 4.21. K1 suşunun 25 °C'de pH 8.19'da farklı inokülasyon oranlarındaki a) OD ve peptidaz aktivitesi ile b) glukoz ve protein miktarının değişimi



Şekil 4.22. K1 suşunun 39.9 °C'de pH 5.81'de farklı inokülasyon oranlarındaki a) OD ve peptidaz aktivitesi ile b) glukoz ve protein miktarının değişimi



Şekil 4.23. K1 suşunun 39.9 °C'de pH 8.19'da farklı inokülasyon oranlarındaki a) OD ve peptidaz aktivitesi ile b) glukoz ve protein miktarının değişimi

Bakteriler ya da hücreler birbirleriyle iletişim kurmak için kimyasal sinyal moleküller üretir. “Quorum sensing” olarak adlandırılan bu olayda, bakteri hücreleri ürettikleri sinyal moleküller aracılığıyla çevresel koşulların durumu hakkında diğer bakterilere (ya da hücrelere) bilgi vererek bunların davranışlarının değiştirilmesine olanak sağlar. Genetik indüklenme ya da baskılanma, diğer bir ifade ile sinyal moleküle tepki olarak verilen cevap sonucunda sayı ve/veya tür açısından bir değişim gerçekleşmektedir. Üretilerek hücre dışına salgılanan sinyal moleküller oto tetikleyici (autoinducer) olarak ifade edilmekte ve bunların konsantrasyonları hücre yoğunluğu ile paralel olarak artmaktadır. Düşük hücre yoğunluklarında fazla miktarda sinyal molekül üretilmediği için diğer hücreler de buna karşılık olarak cevap oluşturamaz. Ancak yüksek hücre yoğunluklarında sinyal molekülün konsantrasyonu artacağından, cevap olarak spesifik genlerin ekspresyonu aktive edilmekte ya da baskılanmaktadır (Dale ve Park 2004, Waters ve Bassler 2005). Bu tez çalışmasında K1 suşunun geliştirilmesi sırasında yüksek hücre yoğunluğuna ulaşılmıştır. Dolayısıyla belirgin bir durgun faz gözlenmeden hücre yoğunluğundaki hızlı azalışın quorum sensing sırasında üretilen bir sinyal peptidten kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Nitekim Kumar vd (2013) *Bacillus subtilis*'in quorum sensing sırasında sinyal molekül olarak hücre dışı ölüm faktörü (extracellular death factor, EDF) olarak isimlendirilen bir peptid ürettiğini tespit etmiş, bu peptidi *Escherichia coli*'nin gelişme ortamına aktardıklarında bakteri ölümüne aracılık ettiğini belirlemişlerdir. Ayrıca bu peptidin *B. subtilis*'in yüksek hücre yoğunluklu kültürlerinde de ölüme sebebiyet verdiğini ve hücre sayısında önemli bir azalış olduğunu belirlemişlerdir.

Bacillus subtilis gibi sporlu bakterilerde yüksek hücre yoğunluğu söz konusu ise sporlaşma da quorum sensing mekanizmasına bağlı olarak gerçekleşmektedir. Sinyal moleküle cevap olarak sporlaşmanın gerçekleşmesi çok fazla sayıda genin iştiraki ile oldukça kompleks bir mekanizma sonucunda olmaktadır (Lazazzera ve Grossman 1998, Miller ve Bassler 2001). *Bacillus* türlerinde spor oluşumunu tetikleyen temel faktör ortamdaki besin eksikliği olmasına rağmen, yüksek hücre yoğunluğu gibi fizyolojik sinyallerin de sporlaşma açısından uyarıcı olabileceği bildirilmiştir (Claverys ve Håvarstein 2007). Şekil 4.17-4.23'deki grafikler incelendiğinde tüm koşullar için maksimum OD değerine ulaşıldığı noktada ortamdaki şekerin tam olarak bitmesi de oldukça azaldığı ve her koşulda yüksek OD değerlerine ulaşıldığı görülmektedir. Dolayısıyla sporlaşma için uygun koşulların oluştuğundan söz etmek mümkündür. Bu durumda K1 suşu sporlaşma döngüsünü başlatmış olabilir. Ancak spor oluşumunun tamamlanması için yaklaşık 8-10 saatlik bir süre gerekmektedir (McKenney vd 2012). Ancak şu da bilinmektedir ki her canlı gibi bakteriler de yaşamlarını devam ettirmek istediklerinden, spor oluşturma kararından önce hayatta kalabilmek için alınabilecek her türlü önlemi almaya çalışır. Üstelik sporlaşma oldukça zaman ve enerji harcanmasına neden olan bir olaydır. Dolayısıyla bakteri en son çare olarak spor oluşturma kararını verir (Claverys ve Håvarstein 2007, Schultz vd 2009).

Daha önce de ifade edildiği gibi OD değerindeki hızlı azalışın bakteri hücrelerinin ölümünden kaynaklandığı düşünülmektedir. Gerçekten hücre ölümünün gerçekleştiği düşünülürse aslında normal şartlarda OD değerinin düşmemesi, en azından sabit kalması beklenir. Çünkü OD değerinin belirlenmesi ortamdaki bulanıklık düzeyinin ölçülmesine dayanan bir yöntemdir ve ölen yani parçalanan hücrelerden açığa çıkan maddeler de bulanıklığa neden olmaktadır. K1 suşunun OD değerindeki azalmanın,

özellikle *Bacillus subtilis* için geçerli olan, kanibalizm (yamyamlık) olayı ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. Kanibalizm olayı, en az iki farklı hücre tipi içeren suşlarda sporlaşmanın erken safhalarında gerçekleşmektedir. Hücrelerin bir kısmı, sporlaşma yeteneğinde olup hücre dışı ölüm faktörü olarak nitelendirilen antibakteriyel faktörleri (iki toksik madde) salgılamakta, diğer kısım hücrelerin ise sporlaşma yeteneği yoktur. Sporlaşabilen hücreler, kendi salgıladığı ölüm faktörüne karşı bağışıklık kazandığı için bu maddelerden zarar görmemekte ancak bu maddeler aracılığı ile kendi kardeş hücrelerinin ölümüne neden olmaktadır. Kardeş hücrenin ölümü ile açığa çıkan besinleri de kendi gelişimini devam ettirebilmek için kullanmaktadır. Bu nedenle, ölüm faktörü aracılığı ile kendi kardeş hücrelerini parçalayarak besin olarak kullanan bu tip hücrelere kanibalist yani yamyam hücreler adı verilmektedir. Aslında burada amaç besin oluşturarak sporlaşmanın gerçekleşmesini mümkün olduğunca geciktirmek, dormant hale geçmeyi engelleyebilmektir. (Claverys ve Havarstein 2007, Be'er vd 2009, González-Pastor 2011). K1 suşu için de besin azalması ve yüksek hücre yoğunluğuna ulaşılması sebebiyle sporlaşmanın başlamış olması kuvvetle muhtemeldir. Dolayısıyla OD değerindeki azalmayı da kanibalist hücre varlığı ile açıklamak mümkün görünmektedir.

Bacillus subtilis için sporlaşma döngüsü Ek 6'da verilmiştir. Asimetrik hücre bölünmesi sırasında septum oluşumu gerçekleşinceye kadar sporlaşma tam anlamıyla başlamaz. Bu safhada eğer hücre besine ulaşabilirse, gelişimini sürdürebilir. Ancak asimetrik hücre bölünmesi aşaması başlarsa, ortama besin ilave edilse bile hücre, spor oluşumu işlemini tamamlar. Dolayısıyla kanibalizm olayı da asimetrik hücre bölünmesi aşamasından önce gerçekleşmektedir (González-Pastor 2011).

Daha önce de ifade edildiği gibi maksimum OD değerinden sonra hücre parçalanmasının gerçekleştiği düşünüldüğünden, yanıt yüzey yönteminde maksimum OD değerine ulaşıncaya kadar elde edilen en yüksek peptidaz aktivitesinin yanıt olarak değerlendirilmesine karar verilmiştir. Fermantasyon ortamından alınan örneklerde yapılan analiz sonuçlarına göre tüm uygulamalar için maksimum aktivite değerinin maksimum OD'ye ulaşıldığı anda elde edildiği tespit edilmiştir. Bu nedenle yanıt yüzey yöntemi ile optimizasyon yapılırken OD değerinin maksimuma ulaştığı noktaya (süreye) karşılık gelen peptidaz aktivitesi değeri, yanıt olarak kullanılmıştır.

Çizelge 4.10'da maksimum OD değerine ulaşıldığı an ve 1 saat sonrasındaki spesifik aktivite değerleri gösterilmiştir. Çizelgedeki değerler incelendiğinde maksimum OD değerinden hemen sonra spesifik aktivite değerinde büyük oranda azalma olduğu görülmektedir. Bu durumun olası nedeni de hücre parçalanması ile açığa çıkan proteinlerdir. Hücre parçalanmasıyla birlikte peptidaz aktivitesi de artmaktadır ancak spesifik aktivitenin düşmesi, ortamda peptidaz dışındaki protein yapısında maddelerin daha fazla bulunduğunu göstermektedir. Dolayısıyla maksimum OD değerindeki peptidaz aktivitesinin yanıt olarak kullanılması ile spesifik aktivitesi daha yüksek enzim üretimi de sağlanmış olacaktır.

Çizelge 4.10. Deneme desenindeki fermantasyon koşullarına göre K1 suşu için maksimum OD değerine ulaşıldığı an ve sonrasındaki spesifik aktivite değerleri

Deneme desenine göre uygulama numarası	Faktör seviyeleri (sıcaklık, pH, inokulum oranı)	Spesifik aktivite (ünite/mg)*	Spesifik aktivite (ünite/mg)**
1	25.07 °C, pH 5.81, %1.81	1056.57	474.15
2	39.93 °C, pH 5.81, %1.81	1318.22	550.62
3	25.07 °C, pH 8.19, %1.81	760.96	392.21
4	39.93 °C, pH 8.19, %1.81	663.40	701.63
5	25.07 °C, pH 5.81, %4.19	795.53	823.70
6	39.93 °C, pH 5.81, %4.19	1466.99	644.38
7	25.07 °C, pH 8.19, %4.19	477.69	266.48
8	39.93 °C, pH 8.19, %4.19	1423.25	579.85
9	20.00 °C, pH 7.00, %3.00	1508.35	761.18
10	45.00 °C, pH 7.00, %3.00	1447.31	320.27
11	32.50 °C, pH 5.00, %3.00	754.18	489.61
12	32.50 °C, pH 9.00, %3.00	782.15	148.63
13	32.50 °C, pH 7.00, %1.00	563.02	268.09
14	32.50 °C, pH 7.00, %5.00	859.87	440.24
15	32.50 °C, pH 7.00, %3.00	921.70	419.36

*Maksimum OD değerindeki spesifik aktivite

**Maksimum OD değerine ulaşıldıktan 1 saat sonraki spesifik aktivite

Maksimum OD değerinde elde edilen peptidaz aktivitesine ait veriler Minitab 17 yazılım programı kullanılarak varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiş, regresyon katsayıları ve eşitliği belirlenmiştir. Regresyon analizi sonucu sıcaklık (t), besiyeri başlangıç pH'sı (p) ve inokülasyon oranı (i) faktörlerine bağlı olarak peptidaz aktivitesi (ünite/ml) için elde edilen ikinci dereceden polinom eşitlik, Denklem 4.1'de verilmiştir.

$$\text{Peptidaz aktivitesi} = -283.5 + 6.79 t + 63 p + 1.12 i - 0.0853 t^2 - 4.219 p^2 - 1.366 i^2 - 0.214 t*p + 0.148 t*i + 0.007 p*i \quad (4.1)$$

Çizelge 4.11'de yanıt yüzey deneme deseninde belirlenmiş olan koşullarda gerçekleştirilen fermantasyonlar sonucu ölçülen peptidaz aktivitesi değerleri ile elde edilen regresyon eşitliğine göre program tarafından tahmin edilen aktivite değerleri verilmiştir. Çizelgede süre başlığı altındaki sütunda, maksimum OD değerine ulaşılan süre verilmiştir. Yani yanıt olarak kullanılan peptidaz aktivitesinin kaç saatte elde edildiği gösterilmiştir.

Çizelge 4.11. Yanıt yüzey yöntemi deneme desenine göre K1 suşu için ölçülen ve tahmin edilen peptidaz aktivitesi değerleri

Uygulama sırası	Blok	Faktörler			Süre (sa)	Aktivite (ünite /ml)	
		Sıcaklık (°C)	pH	İnokulum oranı (%)		Tahmin edilen	Ölçülen
1	1	25.07	5.81	1.81	10	29.64	27.61 ± 1.25
2	1	39.93	5.81	1.81	4	33.66	35.84 ± 1.65
3	1	25.07	8.19	1.81	10	26.17	23.00 ± 0.87
4	1	39.93	8.19	1.81	5	22.62	25.29 ± 3.61
5	1	25.07	5.81	4.19	8	21.74	19.97 ± 1.26
6	1	39.93	5.81	4.19	4	31.00	38.05 ± 1.13
7	1	25.07	8.19	4.19	9	18.32	18.97 ± 0.94
8	1	39.93	8.19	4.19	4	20.01	32.91 ± 0.94
9	1	20.00	7.00	3.00	13	22.28	25.30 ± 0.38
10	1	45.00	7.00	3.00	3	27.08	17.79 ± 0.25
11	1	32.50	5.00	3.00	7	27.21	26.40 ± 0.66
12	1	32.50	9.00	3.00	6	15.05	6.36 ± 1.46
13	1	32.50	7.00	1.00	7	36.96	36.95 ± 1.96
14	1	32.50	7.00	5.00	5	28.12	19.62 ± 0.61
15	1	32.50	7.00	3.00	6	38.01	37.49 ± 0.08
16	1	32.50	7.00	3.00	6	38.01	37.40 ± 4.85
17	1	32.50	7.00	3.00	6	38.01	44.43 ± 4.92
18	1	32.50	7.00	3.00	6	38.01	43.53 ± 4.71
19	1	32.50	7.00	3.00	6	38.01	39.86 ± 0.11
20	1	32.50	7.00	3.00	6	38.01	38.12 ± 2.90
21	2	25.07	5.81	1.81	8	29.64	26.48 ± 0.72
22	2	39.93	5.81	1.81	4	33.66	35.44 ± 0.52
23	2	25.07	8.19	1.81	9	26.17	27.05 ± 1.05
24	2	39.93	8.19	1.81	5	22.62	30.37 ± 1.77
25	2	25.07	5.81	4.19	7	21.74	22.23 ± 0.24
26	2	39.93	5.81	4.19	4	31.00	35.38 ± 2.44
27	2	25.07	8.19	4.19	8	18.32	22.84 ± 0.33
28	2	39.93	8.19	4.19	4	20.01	21.43 ± 1.51
29	2	20.00	7.00	3.00	12	22.28	25.80 ± 0.26
30	2	45.00	7.00	3.00	3	27.08	16.91 ± 1.45
31	2	32.50	5.00	3.00	6	27.21	27.14 ± 0.65
32	2	32.50	9.00	3.00	7	15.05	11.71 ± 0.18
33	2	32.50	7.00	1.00	7	36.96	37.27 ± 4.03
34	2	32.50	7.00	5.00	6	28.12	23.41 ± 2.84
35	2	32.50	7.00	3.00	7	38.01	35.51 ± 0.37
36	2	32.50	7.00	3.00	7	38.01	35.83 ± 0.34
37	2	32.50	7.00	3.00	7	38.01	38.67 ± 0.99
38	2	32.50	7.00	3.00	7	38.01	34.35 ± 1.42
39	2	32.50	7.00	3.00	7	38.01	35.81 ± 1.87
40	2	32.50	7.00	3.00	7	38.01	37.29 ± 2.36

Peptidaz aktivitesi için program tarafından tahmin edilen regresyon katsayıları Çizelge 4.12’de verilmiştir. Çizelge incelendiğinde tüm faktör ve interaksyonlar için VIF değerinin 1 veya 1’e çok yakın olduğu görülmektedir. Regresyon analizinde VIF değerinin düşük olması faktörler arasında çoklu doğrusallık, yani faktörler arasında korelasyon olmadığını gösterdiğinden iyi bir sonuç elde edilmiştir¹. Faktörler arasında korelasyon olması, regresyon katsayılarının varyansının artmasına neden olmakta, sonuçları gereğinden fazla etkilemekte ve sonuçları yorumlamayı zorlaştırmaktadır.

Deneme düzenlerinde bütün uygulamalar için aynı koşulları sağlamak her zaman mümkün olmamaktadır. Bazı nedenlerden dolayı veriler homojen olmayabilir. Çalışmanın sağlıklı bir şekilde yapılabilmesi için bu etkinin giderilmesi gerekmektedir. Böyle durumlarda kullanılan teknik “blok” olarak adlandırılmaktadır. Başlangıçta etkisi olduğu bilinen fakat etkisiyle ilgilenilmeyen faktörler genellikle blok olarak kullanılmaktadır (Kul 2004). Çizelge 4.12’deki p değerine göre blok etkisinin istatistiksel olarak önemsiz olduğu anlaşılmaktadır. Bu çalışmada fermantasyon denemeleri iki tekerrürlü yapılmış olup bloklar farklı iki tekerrürü temsil etmektedir. Dolayısıyla blok etkisi ile tekerrürler arasında farklılık olup olmadığı belirlenmiştir. Tekerrürün blok olarak değerlendirilmesindeki amaç besiyerinden (enzim üretim ortamı) kaynaklanabilecek farklılıkların enzim aktivitesi üzerine etkisini tespit etmektir. Tüm diğer değişkenleri sabit tutmak mümkün olduğu halde (aynı inkübatörü kullanarak sıcaklık ve çalkalama hızını ayarlamak gibi) besiyerinin, farklı zamanlarda yeniden hazırlanması gerektiğinden, kontrolü daha zor olmaktadır. Besiyeri hazırlarken tartım, pH ayarlama, sterilizasyon gibi farklı aşamaların olması varyasyonu artırmaktadır. Her seferinde bileşenlerin aynı miktarda tartılabildiği varsayılsa bile kullanılan distile suyun saflık durumundaki veya pH değerindeki ufak bir değişim, farklı sonuçların elde edilmesine neden olabilmektedir. Ayrıca bu çalışmada besiyerinden kaynaklanabilecek farklılıkları en aza indirmek için besiyerini oluşturan bileşenler her seferinde aynı parti numaralı kimyasaldan hatta mümkünse aynı kutudan tartılmıştır. Blok etkisinin önemsiz olması, aynı fermantasyonun farklı zamanlarda yapılmasının peptidaz aktivitesi üzerine önemli bir etkisi olmadığını göstermektedir.

Çizelge 4.12 incelendiğinde peptidaz aktivitesi üzerine sıcaklığın (S) önemli derecede etkisi olmadığı ancak pH ve inokülasyon oranının (İO) peptidaz aktivitesini önemli derecede ($p < 0.05$) etkilediği görülmektedir. Yani peptidaz aktivitesi fermantasyon sıcaklığından bağımsız iken besiyeri başlangıç pH’sı ve uygulanan inokülasyon oranına bağlı olarak değişmektedir. Ayrıca S*S ve pH*pH interaksyonlarının peptidaz aktivitesini önemli derecede ($p < 0.05$) etkilediği ancak diğer tüm interaksyonların peptidaz aktivitesi üzerine etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Sıcaklık ve pH’nın kare şeklindeki interaksyonlarının istatistiksel olarak önemli ($p < 0.05$) olması, bu faktörlerle peptidaz aktivitesi arasında kuadratik bir ilişki olduğunu göstermektedir. S*pH, S*İO ve pH*İO interaksyonlarının önemsiz olması da bu faktörlerin peptidaz aktivitesini birbirlerinden bağımsız olarak etkilediğinin, aralarında interaksyon olmadığını göstergesidir. Bu sonuçlara göre sıcaklığın aktivite üzerine tek başına etkisi olmadığı gibi diğer faktörlerle etkileşiminin de bir etki yaratmadığı anlaşılmaktadır.

¹ Çoklu doğrusallık tespit edilmesi durumunda yapılması gereken işlem, istatistiksel olarak önemsiz olduğu belirlenen faktörlerin modelden çıkarılmasıdır.

Çizelge 4.12. K1 suşunun peptidaz aktivitesi için tahmin edilen regresyon katsayıları

Terim	Etki	Katsayı	SE katsayısı	T-değeri	P-değeri*	VIF
Sabit		38.01	1.57	24.26	0.000	
Blok		0.349	0.859	0.41	0.688	1.00
Sıcaklık (S)	2.85	1.43	1.04	1.37	0.180	1.00
pH	-7.23	-3.62	1.04	-3.48	0.002*	1.00
İnokülasyon oranı (İO)	-5.26	-2.63	1.04	-2.53	0.017*	1.00
S*S	-9.42	-4.71	1.01	-4.66	0.000*	1.02
pH*pH	-11.93	-5.97	1.01	-5.90	0.000*	1.02
İO*İO	-3.86	-1.93	1.01	-1.91	0.066	1.02
S*pH	-3.79	-1.89	1.36	-1.39	0.174	1.00
S*İO	2.62	1.31	1.36	0.96	0.343	1.00
pH*İO	0.02	0.01	1.36	0.01	0.994	1.00

*p<0.05 seviyesinde farklılık ifade eder.

SE: Standart hata katsayısı

VIF: Varyans yükseltme faktörü (VIF=1, çoklu doğrusallık yok; VIF >1, makul seviyede çoklu doğrusallık; 5<VIF<10, çoklu doğrusallık fazla)

Çizelge 4.13’de peptidaz aktivitesi değerlerine ait varyans analizi sonuçları verilmiştir. Model kısmının istatistiksel olarak önem seviyesi daha önce Çizelge 4.12 incelenirken açıklandığı için burada tekrar değinilmemiştir. Burada lack-of-fit değeri ve R^2 değeri önem arz etmektedir. Modelin matematiksel formunun uyumsuzluğundan kaynaklanan hataya lack-of-fit (model uyumsuzluğu) denilmektedir. İdeal olarak, istatistiksel açıdan lack-of-fit değerinin önemsiz olması gerekir (Koç ve Kaymak-Ertekin 2010). Lack-of-fit için Çizelge 4.13’deki p değerine bakıldığında istatistiksel olarak önemli seviyede ($p<0.05$) olduğu görülmektedir. Bu değer önemli olması, modelin peptidaz aktivitesindeki değişimi açıklamada yetersiz olduğunu göstermektedir. Modelin genel olarak tahminleme yeteneği, çoğunlukla belirleme katsayısı (R^2) ile açıklanmaktadır (Baş ve Boyacı 2007). Bu çalışmada, modelin peptidaz aktivitesindeki değişimi iyi temsil edemediği R^2 değerinin (%72.34) düşük olmasından da anlaşılmaktadır. R^2 değerine göre model, peptidaz aktivitesindeki varyasyonu ancak %72 oranında açıklayabilmektedir. Modelin iyi uyum sağlayabilmesi için R^2 değerinin en azından %75’den büyük olması gerektiği bildirilmiştir (Puri vd 2002). Değer %100’e ne kadar yaklaşırsa uyumun da o kadar iyi olduğundan bahsedilmektedir. Ancak her yüksek R^2 de modelin uygun olacağı anlamına gelmez. Çünkü terim sayısı arttıkça, terim istatistiksel açıdan önemli olsun ya da olmasın, R^2 değerini yapay olarak artırabilmektedir (Baş ve Boyacı 2007). İyi bir modelde R^2 , ayarlanmış R^2 ve tahmin edilen R^2 değerlerinin birbirine yakın olması gerekmektedir (Chauhan ve Gupta 2004). Peptidaz üretiminin istatistiksel metodlarla optimizasyonunun yapıldığı çalışmalarda, R^2 değerinin genel olarak %90’ın üzerinde olduğu ifade edilmiştir. İncelenen çalışmalar arasından, bu değeri %79 (Puri vd 2002) ve %84 (Guangrong vd 2008) olarak belirleyen çalışmalara da rastlanmıştır.

Çizelge 4.13. K1 suşunun peptidaz aktivitesi değerlerine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Adj SS	Adj MS	F-değeri	P-değeri*
Model	10	2238.35	223.84	7.58	0.000*
Blok	1	4.87	4.87	0.16	0.688
Lineer	3	601.43	200.48	6.79	0.001*
Kare	3	1547.28	515.76	17.48	0.000*
İnteraksiyon	3	84.78	28.26	0.96	0.426
Hata	29	855.85	29.51		
Lack-of-fit**	19	795.88	41.89	6.99	0.002*
Saf hata	10	59.96	6.00		
Toplam	39	3094.20			
Modelin özeti	S	R ²	R ² (adj)	R ² (pred)	
	5.43249	%72.34	%62.80	%38.85	

*p<0.05 seviyesinde farklılık ifade eder

**Model uyumsuzluğu

Modeli uyumlu hale getirebilmek için yapılması gereken işlemlerden biri, istatistiksel olarak önemsiz olduğu tespit edilen faktörleri modelden çıkararak yeni bir model oluşturmaktır. Bu şekilde denemeler yapılmış ancak yine uyumlu bir model elde edilememiştir. Uyumlu bir model elde edebilmek için diğer bir işlem olarak, verilere transformasyon uygulayıp verileri tekrar analiz ederek yeni bir model oluşturulabilir. Ancak transformasyonun tüm sistemlerde arzu edilen sonuçları vermesinin mümkün olmadığı da bildirilmiştir (Baş ve Boyacı 2007). Nitekim peptidaz aktivitesi değerleri transforme edilip yeniden analiz edilmiş fakat istenilen sonuç elde edilememiş, lack-of-fit değeri istatistiksel olarak hep önemli, R² değeri de küçük bulunmuştur.

Modelin uyumsuz olmasının en önemli nedeninin sıcaklık faktörünün istatistiksel olarak önemsiz olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Bkz. Çizelge 4.12). Fermantasyon sıcaklığının peptidaz aktivitesi açısından önemli bir faktör olduğu birçok çalışmada bildirilmiştir (Puri vd 2002, Chauhan ve Gupta 2004, Gorchach-Lira vd 2010). Bu çalışmada yanıt yüzey yöntemi ile optimizasyon sırasında sıcaklığın önemsiz olması, muhtemelen deneme desenindeki her bir koşul için maksimum OD değerine ulaşılan peptidaz aktivitesi değerinin yanıt olarak kullanılmasından kaynaklanmaktadır. Şekil 4.17'den Şekil 4.23'e kadar olan şekiller incelendiğinde fermantasyon süresini besiyeri başlangıç pH'sı ve inokulum oranından ziyade sıcaklığın etkilediği görülmektedir. Şöyle ki 32.5 °C'de pH 7 iken maksimum OD değerine %1 inokulasyon oranında 7, %5 inokulasyon oranında 5 saatte ulaşılmıştır. Yani diğer faktörler sabitken inokulasyon oranının 5 kat artması süreyi sadece 2 saat kısaltmıştır. Diğer taraftan besiyeri başlangıç pH'sı (7) ve inokulasyon oranı (%3) sabitken maksimum OD'ye ulaşma süresi 20 °C'de 13 sa, 45 °C'de 3 saat olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla sıcaklık fermantasyon süresini oldukça fazla etkilemekte yani bakterinin gelişimi açısından önemli bir faktör olmaktadır. Peptidaz aktivitesi de şekillerden görüldüğü gibi bakteri gelişimine bağlıdır. Optimizasyon sırasında maksimum OD değerindeki peptidaz aktivitesi değeri yanıt olarak seçildiği için süreler farklı olmasına rağmen aktivite değerleri birbirlerine çok yakın olmuş ve hatta 20 °C'deki aktivite değeri 45 °C'dekinden daha yüksek olarak saptanmıştır. Bu durumda da sıcaklık önemsiz bir

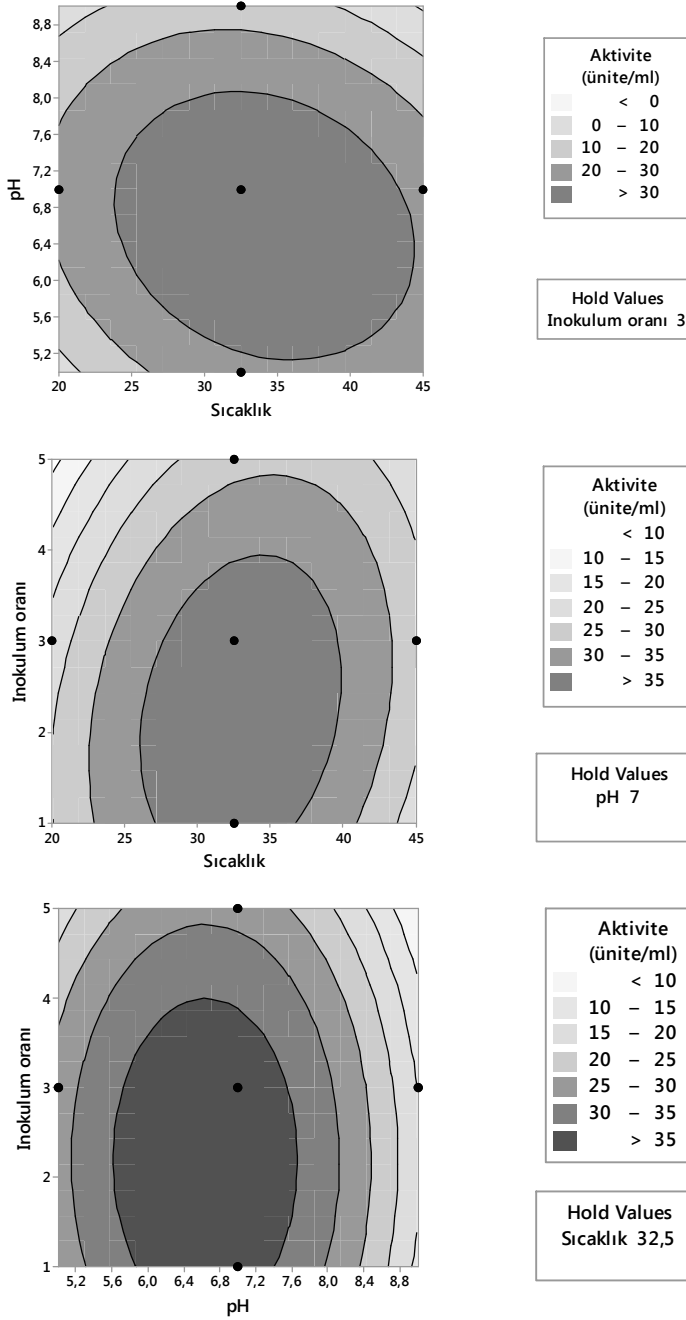
faktör olarak belirlenmiştir. Sabit bir fermentasyon süresi seçilip yanıt olarak bu sürede elde edilen peptidaz aktivitesi kullanılsaydı, sıcaklık kuvvetle muhtemel istatistiksel açıdan önemli bir faktör olarak belirlenirdi. Ancak hücre parçalanmasına bağlı olarak hücre içi peptidazların açığa çıkması bu şekilde bir prosedür uygulamaya engel teşkil etmiştir. Böyle bir uygulama ile hücre dışı peptidaz miktarını belirlemek yerine toplam peptidaz açısından bir optimizasyon yapmak mümkün olabilirdi. Fakat bu durumda da farklı tipteki peptidazların veya diğer enzimlerin salgılanma olasılığı artacağından optimizasyon işleminden sonra yapılacak saflaştırma işlemi çok daha karmaşık bir hal alabilirdi.

Modelin uyumsuz olarak tespit edilmesindeki diğer bir neden, Minitab yazılım programı ile yapılan veri analizi sonucunda 8, 10, 12 ve 30 numaralı uygulamaların (Bkz. Çizelge 4.11) program tarafından olağandışı gözlemler olarak belirlenmesidir. Ölçülen ve tahmin edilen aktivite değerleri karşılaştırıldığında büyük farklılıklar gözlenmektedir. Uygulamalardan 10 ve 30 numaralı olanlar fermentasyon koşulları (45 °C, pH 7, inokülasyon oranı %3) aynı olmak üzere farklı blokları yani tekerrürleri temsil etmektedir. Program tarafından bu koşullar için tahmin edilen aktivite değeri 27.08 ünite/ml'dir. Peptidaz aktivitesi için ölçülen değerler ise 10 ve 30 numaralı uygulamalar için sırasıyla, 17.79 ± 0.25 ve 16.91 ± 1.45 ünite/ml olarak tespit edilmiştir. Bu değerler, her bir uygulama için üç farklı erlenden alınan örneklerin iki paralelli olarak analiz edilmesi ile bulunmuştur. Farklı iki zamanda yapılmış analiz sonuçlarının birbirine bu kadar yakın olması, deneysel bir hatanın olmadığını göstermektedir. Ancak bu sonuçlar model tarafından olağandışı olarak kabul edildiğinden modelin uyumluluğu azalmaktadır. 8 ve 12. uygulamaların ikinci bloktaki karşılıklarına bakıldığında (28. ve 32. uygulamalar) ölçülen aktivite değerleri arasında farklılıklar mevcuttur. Bu iki uygulama için her bir tekerrürün kendi içindeki sapması düşük olsa da bloklar arası sapmanın fazla olması uyumluluğu azaltmıştır.

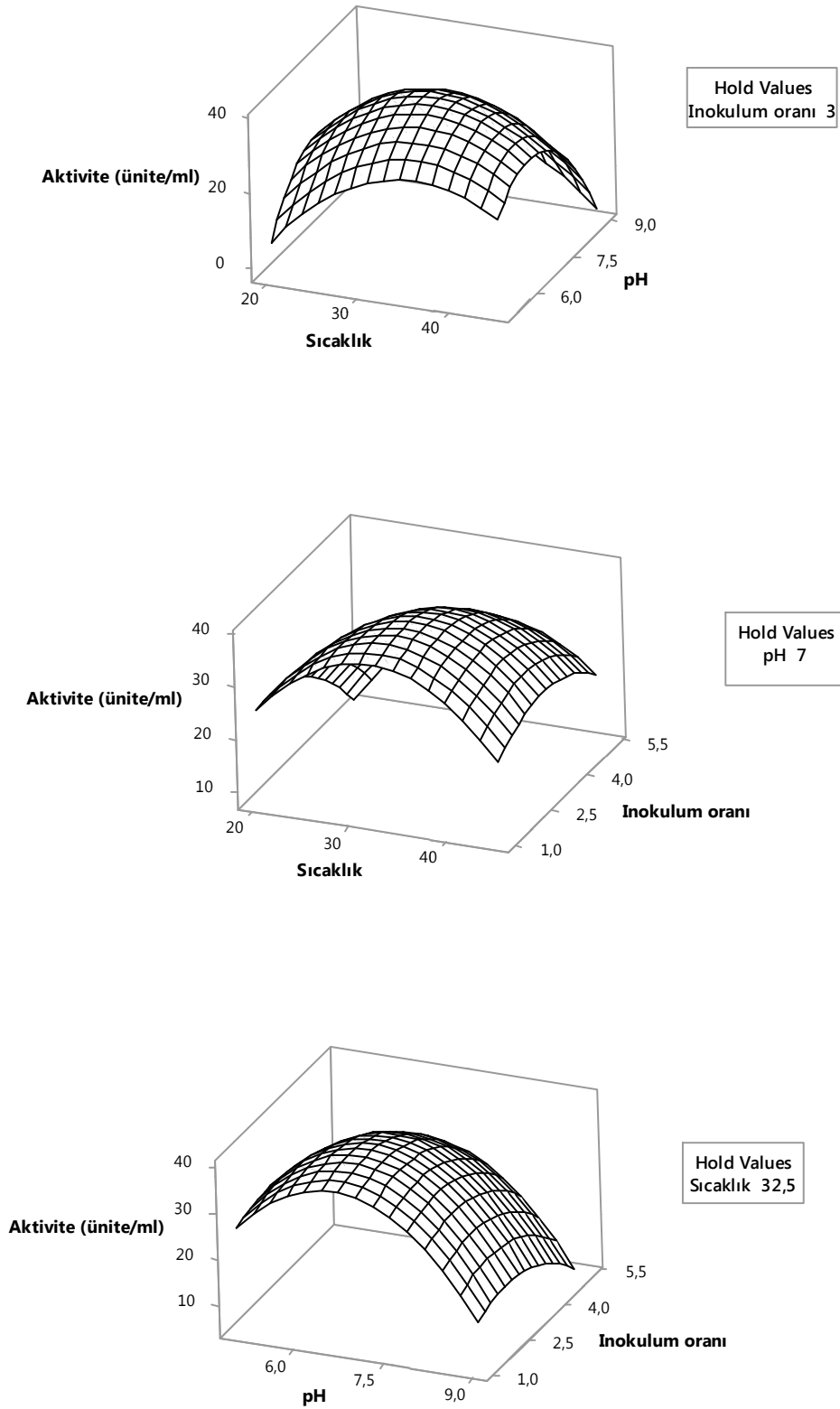
Model uyumsuzluğunun muhtemel nedenlerinden biri de elde edilen ham enzim çözeltilisinin kompozit bir yapıda olmasıdır. Ham enzim çözeltilisinin farklı enzimleri içermesi muhtemel olduğu gibi farklı tip peptidazları da içerebilir. Nitekim çalışmanın ileriki aşamalarında (enzim çözeltilisinin karakterizasyonu sırasında) yapılan bazı analizlerin sonuçlarına göre ham enzim çözeltilisinin birden fazla peptidaz türünü içerdiği düşünülmektedir. Dolayısıyla deneme desenine göre koşulların değişmesi, ön plana çıkan peptidaz türünün farklı olmasına neden olabilir. Yani bir koşulda aktif olan bir peptidaz türünün başka bir koşulda aktivitesi azalabilir ya da bu peptidaz türü aktivitesini kaybedebilir. Böyle bir durumda da program tarafından tahmin edilen peptidaz aktivitesi değerleri ile ölçülen aktivite değerleri arasında sapma olması olağandır.

Deneme desenine göre peptidaz aktivitesine bağlı kontur grafikleri Şekil 4.24'de yüzey grafikleri ise Şekil 4.25'de verilmiştir. Grafiklerde iki faktörün etkisi incelenemediğinden, üçüncü faktör merkez nokta seviyesinde sabitlenerek grafikler çizilmiştir. Kontur grafiklerinin şekli, yüzey grafiklerinin şekli (maksimum, minimum ya da eyer noktası) konusunda bilgi vermektedir. Dairesel kontur grafikleri değişkenler arasındaki etkileşimin ihmal edilebilir olduğunu, elips ya da eyer şeklindekiler ise iç etkileşimin önemli olduğunu gösterdiği bildirilmiştir (Koç ve Kaymaz-Ertekin 2010). Şekil 4.24'de kontur grafiklerinin dairesel ve eliptik şekillerde olması peptidaz aktivitesi

açısından maksimum noktaya ulaşıldığına işaret etmektedir ve bu durum Şekil 4.25'deki yüzey grafiklerinde de görülmektedir. Sıcaklık-pH kontur grafikleri dairesel, sıcaklık-inokulum oranı ve pH-inokulum oranı grafikleri ise elips şeklindedir. Bu durumda sıcaklık-inokulum oranı ve pH-inokulum oranı arasındaki etkileşimlerin istatistiksel açıdan önemli olması gerekmektedir. Ancak varyans analizi sonuçlarına göre (Bkz. Çizelge 4.12 ve Çizelge 4.13) tüm etkileşimlerin önemsiz olduğu tespit edilmiştir. Kontur ve yüzey grafikleri ölçülen değerlere göre değil, program tarafından tahmin edilen değerlere göre çizilmektedir (Baş ve Boyacı 2007). Dolayısıyla model uyumsuzluğu da göz önünde bulundurulduğunda farklı sonuçların çıkması olağandır.



Şekil 4.24. K1 suşunun peptidaz aktivitesine bağlı kontur grafikleri



Şekil 4.25. K1 suşunun peptidaz aktivitesine bağlı yüzey grafikleri

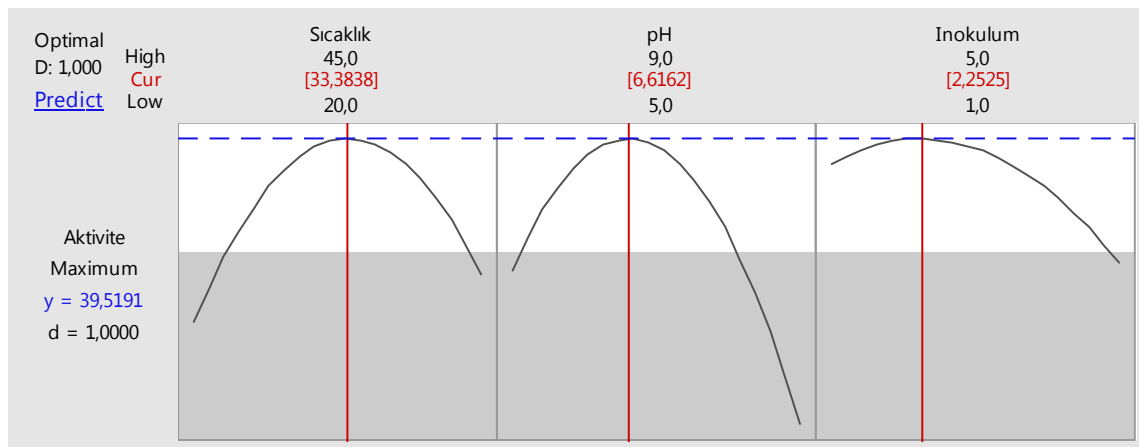
Elde edilen mevcut sonuçlar doğrultusunda yanıt yüzey yöntemi için seçilmiş olan faktörler (sıcaklık, besiyeri başlangıç pH'sı ve inokülasyon oranı) açısından da bir değerlendirme yapılmıştır.

Şekil 4.25'deki yüzey grafiklerine göre üç faktörün de ikili karşılaştırılmaları sonucu maksimum noktaya ulaşıldığı görülmektedir. Dolayısıyla uyumlu bir model elde edilmiş olsaydı, maksimum peptidaz aktivitesi değerine ulaşmak için faktör seviyeleri rahatlıkla belirlenebilecekti. Yüzey grafikleri incelendiğinde sıcaklık merkez noktaya (yaklaşık 30 °C) yakın iken maksimum aktivite değerine ulaşıldığı, daha düşük ve yüksek sıcaklıklarda aktivite değerinin azaldığı görülmektedir. Gençkal ve Tari (2006) peptidaz üretimini gerçekleştirdikleri çalışmalarında, farklı *Bacillus* sp. suşları için 30 °C veya 37 °C'nin hem bakteri gelişimi hem de enzim üretimi açısından optimum sıcaklık olduğunu tespit etmiş, özellikle 45 °C ve daha yüksek sıcaklıklarda aktivitede meydana gelen enzim aktivitesindeki azalmayı protein denatürasyonu ve üretilen enzimin proteolitik aktivitesine bağlı degradasyonla ilişkilendirmişlerdir. Jaswal vd (2008) peptidaz aktivitesi açısından optimum sıcaklık derecesini 25 °C, Rao vd (2007) 34.58 °C, Chauhan ve Gupta (2004) ise 37 °C olarak tespit etmişlerdir.

Besiyeri pH'sının enzimatik proseslerde ve hücre zarından besin maddelerinin taşınmasında önemli rol oynadığı ve buna bağlı olarak hücre gelişimi ve ürün üretimini de etkilediği bildirilmektedir (Bhunja vd 2012). Yüzey grafikleri besiyeri başlangıç pH'sı açısından incelendiğinde, pH yaklaşık 6.5-7.0 arasında olduğu zaman en yüksek aktivite değerinin elde edildiği, pH derecesi yükseldikçe aktivitenin de önemli ölçüde azaldığı görülmektedir. Optimizasyon işlemi öncesinde kültür koşulları belirlenirken yüksek pH'nın bakteri gelişimini olumsuz yönde etkilediğinden bahsedilmişti (Bkz. Şekil 4.12). Yüksek pH değerinde bakterinin gelişmemesi, doğal olarak, aktivite değerinin de düşmesine neden olmaktadır. K1 suşu zaten ekmekten izole edilmiş bir bakteri olduğu için yüksek pH derecelerinde iyi çalışmaması beklenen bir sonuçtur. Ancak aktivite değerinin ne şekilde değişeceğini belirlemek açısından deneme desenine yüksek pH değerleri de dahil edilmiştir. Fermantasyon denemeleri gerçekleştirilirken, fermantasyon sonunda pH değerleri de ölçülmüştür. Besiyeri başlangıç pH'sı ister düşük ister yüksek olsun, fermantasyon sonunda besiyeri pH'sı nötr koşullara yaklaşmıştır. Başlangıç pH'sına da bağlı olarak fermantasyon sonundaki pH değerinin 6.7-8.0 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Yani bakteri, kendi gelişimini sürdürebilmek için ortam koşullarına göre asidik ya da bazik metabolitler üreterek nötr ortam oluşturmuştur. Qadar vd (2009) de 7'ye ayarlanmış olan besiyeri pH'sının 7.5-8.0'e yükseldiğini tespit etmiş ve bunu metabolit birikimi ile açıklamışlardır. Ortam koşullarının bakteri faaliyeti ile nötre dönüşmesi nedeniyle, bu çalışmada üretilen peptidazın da büyük olasılıkla nötr karakterli olabileceği düşünülmektedir. Esasen ortamda farklı karakterde, yani birden fazla peptidaz türünün bulunması da mümkündür. Ancak mevcut koşullar, nötr karakterli peptidazın baskın olabileceğini göstermektedir. *Bacillus* peptidazları ile ilgili olarak yapılmış çalışmaların çok büyük bir kısmı alkali peptidazları konu edinmiştir. Bu nedenle de aktivite açısından belirlenen optimum pH'lar genellikle alkalidir. Peptidaz aktivitesi açısından optimum besiyeri pH'sını Jaswal vd (2008) 10.5; Qadar vd (2009) 7.0; Gorch-Lira vd (2010) ise 4.8 olarak tespit etmişlerdir.

Bu çalışmada inokulum oranı %1-5 arasında uygulanmış ve yaklaşık %2.5'lük inokulum oranının peptidaz aktivitesi açısından en uygun oran olabileceği tespit edilmiştir (Bkz. Şekil 4.24 ve Şekil 4.25). Prakasham vd (2006) de katı faz fermantasyonla peptidaz üretimi yaptıkları bir çalışmada inokulum oranını %1-5 arasında uygulamış ve enzim aktivitesi açısından en uygun oranı %3 olarak saptamışlardır. Puri vd (2002) *Bacillus* sp. ile yaptıkları bir çalışmada inokulum oranını %1-3 arasında uygulamış ve inokulum oranının peptidaz aktivitesi üzerine etkisinin olmadığını tespit etmişlerdir. Suganthi vd (2013) *Bacillus licheniformis* ile yaptıkları çalışmada peptidaz üretimi için %0.2-1.0 arasında değişen inokulum oranlarını denemiş ve en uygun oranı %1 olarak belirlemişlerdir. Düşük inokulum oranlarında enzim üretimi için bakteri sayısının yetersiz kaldığını; daha yüksek inokulum oranlarında ise çözülmüş oksijen miktarının azalabileceğini ve besine ulaşmak için rekabetin artabileceğini bildirmişlerdir. *Bacillus subtilis* ile yaptıkları bir çalışmada %1-6 arasındaki inokulasyon oranlarını deneyen Ahmed vd (2010) ise maksimum peptidaz aktivitesi sağlayan oranı %4 olarak tespit etmişlerdir. Bu oranın üzerindeki değerlerde aktivitenin azalışını spor sayısındaki aşırı artışla ilişkilendirmişlerdir.

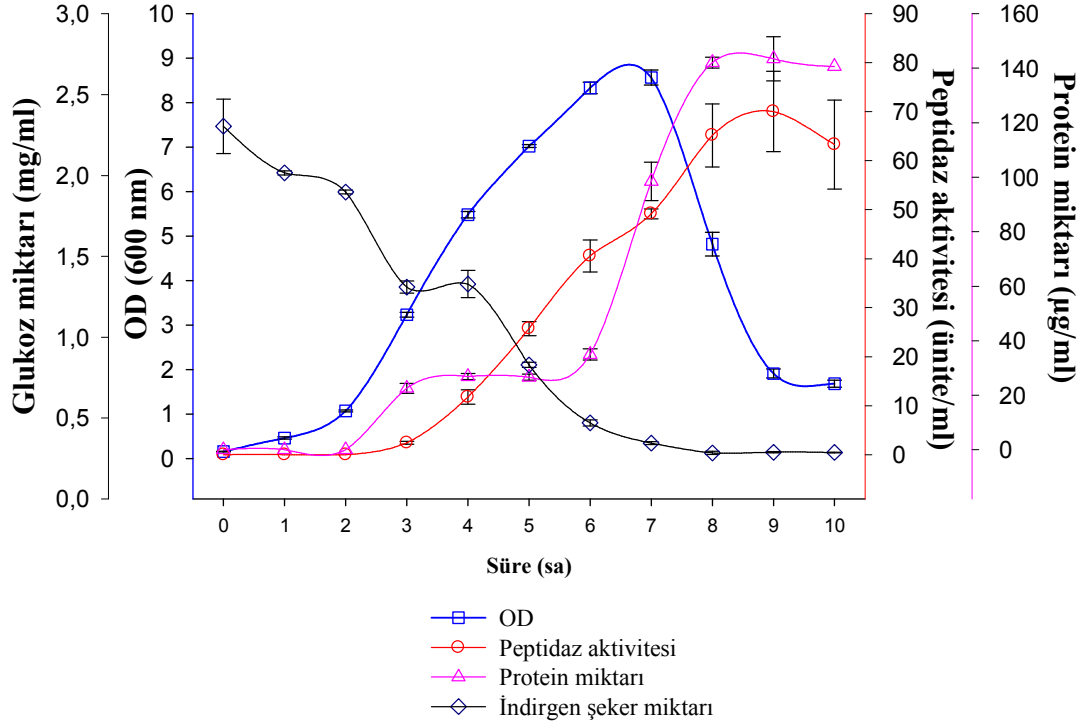
Esasen optimum koşulları belirlemek için uyumlu bir model elde edilmesi gerekmektedir. Çünkü optimizasyon grafiği de kontur ve yüzey grafikleri gibi program tarafından tahmin edilen yanıt değerlerine göre oluşturulmaktadır. Ancak program tarafından sunulan optimum koşulları görmek adına yanıt optimizasyonu yapılmıştır. Minitab 17 programı ile oluşturulmuş optimizasyon grafiği Şekil 4.26'da verilmiştir. Grafikteki kesikli mavi çizgi maksimum peptidaz aktivitesi değerini, dikey kırmızı çizgiler ise bu aktivite değerine ulaşmak için faktör seviyelerinin ne olması gerektiğini göstermektedir. Bu grafiğe göre maksimum aktivite değerine ($y=39.519$ ünite/ml) ulaşmak için sıcaklığın 33.4 °C, pH'nın 6.62 , inokulasyon oranının da %2.3 olarak ayarlanması gerektiği görülmektedir. İstenilen hedefe ulaşma indeksi olarak bilinen d değeri 0 ile 1 arasında değişmekte, 1 ideal koşulları, 0 ise yanıtın kabul edilebilir limitlerin dışında olduğunu göstermektedir. Bu değer 1'e ne kadar yaklaşırsa faktör kombinasyonunun yanıt açısından tanımlanan hedefi o kadar iyi karşıladığından söz edilmektedir (Koç ve Kaymak-Ertekin 2010). Dolayısıyla Şekil 4.26'daki d değerinin 1 olması maksimum peptidaz aktivitesi için en uygun sıcaklık, pH ve inokulum oranı değerlerinin bulunduğu göstermektedir.



Şekil 4.26. K1 suşunun peptidaz aktivitesi için Minitab 17 programı ile elde edilen optimizasyon grafiği

Optimizasyon işlemini doğrulamak için belirlenmiş olan sıcaklık, besiyeri başlangıç pH'sı ve inokulum oranı koşullarında üç tekerrürlü olarak fermantasyon yapılmıştır. Fermantasyon süresince OD ve peptidaz aktivitesi değerlerinin yanı sıra protein ve glukoz miktarları da takip edilmiştir. Bu verilere ait grafik Şekil 4.27'de gösterilmiştir. Şekilden de görüldüğü üzere maksimum OD değerine (8.606 ± 0.171) 7 saatlik fermantasyon sonunda ulaşılmıştır. Bu sürede elde edilen peptidaz aktivitesi değeri ise 49.172 ± 1.014 ünite/ml'dir. Yani optimum koşullarda elde edilmesi beklenen değerden (39.519 ünite/ml) 10 birim fazlalık söz konusudur. Çok yakın değerler elde edilememesinin en büyük nedeni modelin uyumsuz olmasıdır. Ancak durumu farklı bir açıdan değerlendirmek de mümkündür. Şöyle ki deneme deseninde süre faktörü olmadığından ya da tüm koşullar için sabit süreli fermantasyonlar gerçekleştirilmediğinden programın, optimum koşullarda yapılan fermantasyon süresini yani maksimum OD'ye ulaşma süresini tespit ya da tahmin etmesi mümkün değildir. Dolayısıyla deneme deseninde optimum koşullara en yakın şartlarda gerçekleşen fermantasyonların ne kadar sürdüğünün göz önünde bulundurulması gerektiği düşünülmektedir. Zaten program da optimum koşullarda elde edilebilecek maksimum aktivite değerini deneme desenindeki aktivite değerlerine göre belirlemektedir. Optimum koşulları sağlayan faktör seviyelerine bakıldığında, bu değerlerin deneme deseninde en yakın olduğu koşulların merkez nokta (sıcaklık 32.5 °C, pH 7, inokulum oranı %3) olduğu görülmektedir (Bkz. Çizelge 4.11). Fermantasyonlar merkez noktada gerçekleştirildiğinde maksimum OD'ye ulaşma süresi 1. tekerrürde 6 sa, 2. tekerrürde ise 7 saat olarak belirlenmiştir. Buna bağlı olarak optimum koşullardaki fermantasyon süresinin de 6 ya da 7 saat olarak kabul edilebileceği düşünülmektedir. Süre 6 sa olarak kabul edilirse, Şekil 4.27'de de görüldüğü gibi peptidaz aktivitesi 40.566 ünite/ml olur ve bu durumda program tarafından tahmin edilen aktivite değerine oldukça yakın bir değer elde edilmiş olur.

Şekil 4.27 incelendiğinde, bakterinin gelişimi ile birlikte glukoz miktarının aşamalı olarak azaldığı ve maksimum OD değerine ulaşılan 7. saatten sonra yaklaşık 0.3 mg/ml düzeyinde sabitlendiği görülmektedir. Protein üretiminin ise 2. saatten sonra başladığı, aşamalı olarak arttığı ve 8. saatten sonra sabitlendiği grafikten anlaşılmaktadır. Bakterinin ortama adaptasyon dönemi olan lag fazında henüz peptidaz üretimi başlamamışken protein üretimi de gerçekleşmemiş, buna karşın besin olarak glukozun kullanılması sonucu glukoz miktarında azalma gözlenmiştir. Logaritmik fazın başlamasıyla birlikte, bakteri sayısındaki artış ve besine olan ihtiyaç nedeniyle, glukoz miktarında ani bir azalma gerçekleşmiştir. Bu sırada aynı zamanda protein ve peptidaz üretimi de başlamıştır. Fermantasyonun 3. ile 5. saatleri arasında peptidaz miktarı hızla artarken protein miktarı sabit kalmıştır. Bu durum muhtemelen bakterinin ürettiği peptidaz aracılığı ile kendine besin oluşturmak için proteinleri parçalarken, üretilen enzimin de protein olarak tespit edilmesi dolayısıyla arada bir dengelenme olmasından kaynaklanmaktadır. Bu aşamadan sonra peptidaz ve protein eğrileri benzer profil sergilemiştir. Daha önceki fermantasyonlarda da açıklandığı gibi maksimum OD değerine ulaşıldıktan sonra hücre içi proteinlerin açığa çıkması nedeniyle, protein miktarında belirgin artış gözlenmiştir.



Şekil 4.27. K1 suşunun peptidaz aktivitesi açısından tespit edilen optimum koşullarda (33.4 °C, pH6.62, inokulasyon oranı %2.3) OD, peptidaz aktivitesi, protein miktarı ve glukoz miktarı değişimi

Çizelge 4.14’de tespit edilen optimum koşullarda üretilmiş olan enzim için spesifik aktivite değeri ve tüketilen mg glukoz başına üretilen peptidaz miktarı ünite/ml olarak verilmiştir. Çizelgedeki spesifik aktivite değerlerine bakıldığında, bu değer başlangıçta sürekli artıp 6. saatte en yüksek değerine ulaştıktan sonra azaldığı görülmektedir. Bu durum, 6. saate kadar protein miktarındaki artışın büyük oranla üretilen peptidazdan kaynaklandığını, ancak daha sonra başka proteinlerin de üretilmeye başladığının göstergesidir. Fermantasyonun 6. ve 7. saatlerindeki peptidaz aktivitesi ve protein değerleri de karşılaştırıldığında (Şekil 4.27) peptidaz aktivitesindeki çok az bir artışa karşılık protein miktarında ani bir yükseliş olduğu görülmektedir. *Bacillus* türlerinin farklı birçok enzimi sentezlediği bilinmektedir. Dolayısıyla bu aşamada, protein miktarındaki artışın salgılanan diğer enzimlerden kaynaklanması da kuvvetle muhtemeldir. Spesifik aktivite değerindeki azalmanın maksimum OD’ye ulaşma süresi olan 7. saatten sonra olmasının temel nedeninin, hücre parçalanmasının başlamasıyla birlikte hücre içi proteinlerin de kültür sıvısına karışması olduğu düşünülmektedir.

Çizelge 4.14’de görüldüğü üzere fermantasyon ilerledikçe tüketilen 1 mg glukozu karşı üretilen enzim miktarı artış göstermektedir. Hücre dışı peptidaz açısından maksimum ürün verimine (25.09 (ünite/ml)/ mg glukoz), bakteri maksimum OD’de iken ulaşılmıştır. Birim OD başına düşen enzim miktarı da fermantasyon ilerledikçe artmakta, OD’nin azalmaya başlamasıyla birlikte peptidaz/OD oranında ciddi bir artış gözlenmektedir.

Çizelge 4.14. K1 suşu ile optimum koşullarda üretilen enzim için spesifik aktivite değeri ve tüketilen glukozu karşı üretilen enzim miktarı

Zaman (sa)	Spesifik aktivite (ünite/mg)	Peptidaz (ünite/ml) / tüketilen glukoz (mg)	Peptidaz (ünite/ml) / OD
1	0.00	0.00	0.00
2	0.00	0.00	0.00
3	115.16	2.43	0.75
4	464.36	12.06	2.15
5	994.21	17.45	3.66
6	1209.84	22.12	4.87
7	504.77	25.09	5.74
8	478.75	32.26	13.52
9	519.56	34.76	36.63
10	478.32	31.38	37.57

Mevcut koşullar dikkate alındığında, bu çalışmada, ulaşılabilen maksimum peptidaz aktivitesi değeri 49.172 ünite/ml'dir. Literatür özeti kısmında verilen, *Bacillus* peptidazları ile ilgili olarak yapılmış bazı çalışmaları içeren özet çizelgedeki (Bkz. Çizelge 2.5) aktivite değerleri ile karşılaştırma yapıldığında çok kısa süreli bir fermantasyon yapılabildiği olmasına rağmen iyi bir aktivite elde edildiği görülmektedir. Şöyle ki bu çalışmada 1 ünite peptidaz aktivitesi, analiz koşullarında 1 dakikada 1 mg ml^{-1} tirozin açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Çizelge 2.5'te farklı çalışmalar için farklı aktivite tanımları verilmiştir. Bu nedenle net bir karşılaştırma sağlamak için farklı aktivite tanımlarına göre hesaplanmış değerler Çizelge 4.15'de verilmiştir. Literatürdeki çalışmaların çoğunda 1 ünite peptidaz aktivitesi, analiz koşullarında 1 dakikada $1 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ tirozin açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Dolayısıyla bu tez çalışmasında elde edilen aktivite değeri de bu şekilde ifade edildiğinde yaklaşık 1000 katlık bir artışla 45607 ünite/ml olacaktır. Çizelge 2.5'te tanım olarak $\mu\text{g ml}^{-1}$ tirozini kullanan çalışmalar arasındaki en yüksek aktivite değeri, Rao vd'nin (2007) *Bacillus circulans* ile yaptıkları çalışmada ulaştıkları 8320 ünite/ml'dir. Yani, bu çalışmaya göre yaklaşık 5.5 kat fazla aktivite değeri elde edilmiştir. Üstelik Rao vd (2007) 8320 ünite/ml değerine 24 saatlik fermantasyon sonucunda ulaşmışken, bu tez çalışmasındaki fermantasyon süresi 7 saattir. Aktivite tanımı olarak 1 dakikada $1 \text{ } \mu\text{mol}$ tirozin açığa çıkaran enzim miktarını kullanan çalışmalarla kıyaslandığında bu tez çalışmasındaki değer (0.272), düşük kalmaktadır. Nitekim Jaswal vd (2008) söz konusu tanım üzerinden aktivite değerini 808.68 ünite/ml olarak tespit etmişlerdir. Ancak fermantasyon süresi açısından bakıldığında, 101 saat gibi uzun bir süre söz konusudur.

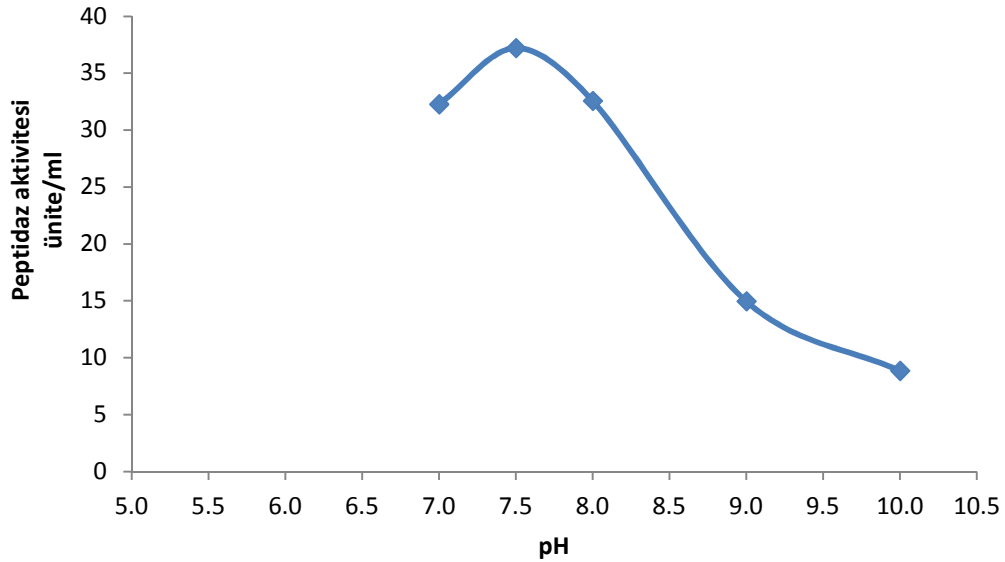
Çizelge 4.15. K1 suşu ile optimum koşullarda üretilmiş olan enzimin farklı ünite tanımlarına göre hesaplanmış aktivite değerleri

1 ünite peptidaz aktivitesi tanımı	K1 suşu aktivite değerleri
1 dakikada 1 mg ml^{-1} tirozin açığa çıkaran enzim miktarı	49.172
1 dakikada $1 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ tirozin açığa çıkaran enzim miktarı	45607.222
1 dakikada $1 \text{ } \mu\text{mol}$ tirozin açığa çıkaran enzim miktarı	0.272

4.5. K1 Suşu ile Üretilen Peptidazın Saflaştırılması

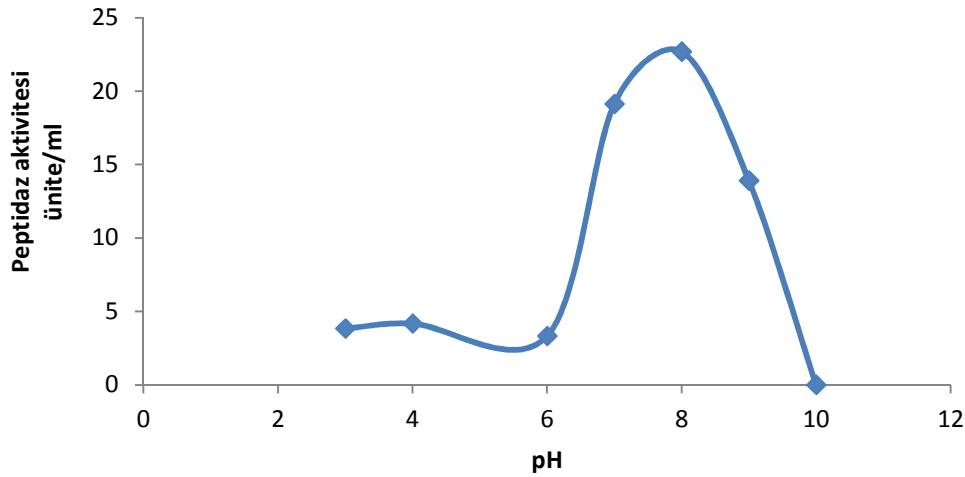
4.5.1. Ham enzim çözeltisinin en iyi aktivite gösterdiği pH değeri

Saflaştırma işlemi, K1 suşunun geliştirilmesiyle optimum koşullarda (33.4 °C, pH 6.62, inokulum oranı %2.3) elde edilmiş olan ham enzim çözeltisine uygulanmıştır. Ancak saflaştırma öncesinde ön bilgi olması açısından ham enzim çözeltisinin en iyi aktivite gösterdiği pH değeri belirlenmiştir. Şekil 4.28’de ham enzim çözeltisinin farklı pH değerlerindeki aktivite değişimi verilmiştir. Enzimin en yüksek aktiviteyi pH 7.5’da gösterdiği, alkali koşullarda aktivitenin büyük oranda azaldığı anlaşılmaktadır. Bu durumda ham enzim çözeltisinin baskın olarak nötr karakterli peptidazı içerdiğinden söz edilebilir. Düşük pH’lı tamponlarda, peptidaz aktivitesi analizinde substrat olarak kullanılan kazein çözünmeyip çökelti oluşturduğu için aktivite değerleri tespit edilememiştir.



Şekil 4.28. K1 suşu ile elde edilen ham enzim çözeltisinin substrat olarak kazein kullanıldığı zaman farklı pH’larda tespit edilen peptidaz aktivitesi değerleri

Düşük pH’larda da aktivite değerinin nasıl değiştiğini belirlemek için substrat olarak kazein yerine asidik ortamda da çözünebilir hemoglobin kullanılarak analiz tekrarlanmıştır. Şekil 4.29’da hemoglobin kullanılarak yapılan analiz sonuçları verilmiştir. Sonuçlar, asidik koşullarda da aktivitenin azaldığını, en yüksek aktivitenin nötr koşullarda elde edildiğini göstermektedir. Ancak şekilden de görüldüğü gibi kazein ile elde edilen aktivite değerlerine göre aktivite değerleri neredeyse yarı yarıya azalmıştır. Bu durum da enzimin substrat spesifikliğinden kaynaklanmaktadır. pH 6’dan daha asidik koşullarda aktivitenin tamamen kaybolmaması nedeniyle ham enzim çözeltisi içinde az da olsa aspartik peptidaz bulunabileceği de düşünülmektedir. Ancak aktivite çok düşük olduğundan çan eğrisi şeklindeki pik tam olarak gözlenememiş olabilir.



Şekil 4.29. K1 suşu ile elde edilen ham enzim çözeltisinin substrat olarak hemoglobini kullandığı zaman farklı pH'larda tespit edilen peptidaz aktivitesi değerleri

4.5.2. Ham enzim çözeltisinin konsantre edilmesi

Ham enzim çözeltisini konsantre etmek için öncelikle amonyum sülfatla çöktürme işlemi uygulanmıştır. Aktivite ölçümleri hem pellet hem de supernatantlarda uygulanmış, supernatantlarda hiç aktivite tespit edilememiştir. Dolayısıyla peptidazın tamamı %80 doygunluktaki amonyum sülfat ile çöktürülebilmmiştir. Pelletler 2 ml potasyum fosfat (pH 7.5) ile karıştırıldıktan sonra amonyum sülfatı uzaklaştırmak için Äkta Prime protein saflaştırma cihazı kullanılarak HiTrap desalting kolondan geçirilmiş ve sonuçta 5.4 ml fraksiyon toplanmıştır. Toplam 5.4 ml olan çözeltilerin peptidaz aktivitesi değerleri Çizelge 4.16'da verilmiştir. Çizelgeden de görüldüğü gibi farklı sıcaklıklarda çöktürme işlemi aktivite değerini değiştirmemiştir. Ancak konsantre etmek amaçlanırken, aktivite değeri ham enzim çözeltisindekinin neredeyse yarısına düşmüştür. Aslında aktivitedeki azalmanın nedeni amonyum sülfatın uzaklaştırılması sırasındaki seyrelmeden kaynaklanmaktadır. Seyreltme faktörleri göz önünde bulundurulduğunda başlangıçtaki 2 ml'lik çözeltinin aktivite değeri yaklaşık 96 ünite/ml olmakta ve ham enzim çözeltisine göre yaklaşık 3 katlık konsantrasyon sağlanmış olmaktadır. Ancak saflaştırma sırasında, yani bir sonraki aşamada, kolona seyreltik haldeki çözelti yükleneceği için başlangıç aktivite düzeyi düşük kalacağından konsantrasyon yöntemi olarak amonyum sülfatla çöktürme tercih edilmemiştir.

Çizelge 4.16. Amonyum sülfatla yapılan çöktürme sonrası aktivite değerleri

Çöktürme sıcaklığı (°C)	Aktivite değeri (ünite/ml)
4	19.962 ± 1.425
20	19.933 ± 1.411

*Ham enzim çözeltisinin aktivite değeri 32.433 ünite/ml'dir

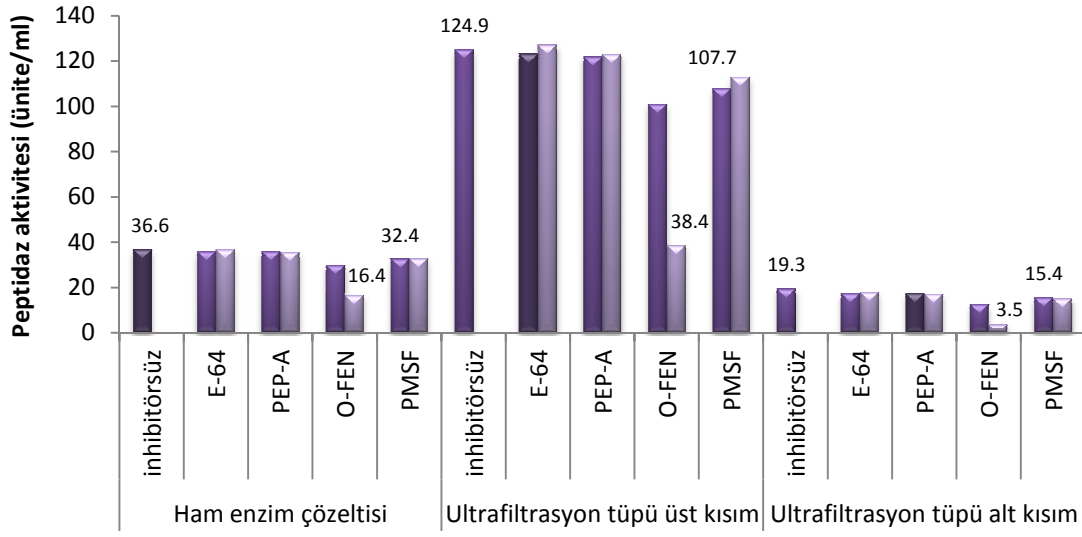
İkinci yöntem olarak, ham enzim çözeltisi 10 kDa ayırma sınırlı ultrafiltrasyon tüpleri ile konsantre edilmiştir. Bu yöntem ile yapılan denemede konsantrasyon işlemi ile aktivite değeri 36.62±0.31 ünite/ml'den 124.91±0.63 ünite/ml'ye yükseltilmiştir.

Ayrıca filtre altına geçen sıvıda da peptidaz aktivitesi (19.26 ± 0.51 ünite/ml) olduğu belirlenmiştir. Hacim bazında 10 katlık bir konsantrasyon işlemi yapılmasına rağmen aktivite değeri 10 kat artmamıştır. Ancak yine de aktivite değerinde hatırı sayılır (yaklaşık 3.5 kat) bir artış sağlandığından ve bu değer amonyum sülfatla çöktürme ile yapılan konsantrasyonda elde edilen değere göre çok yüksek olduğundan, saflaştırma işlemi öncesinde ultrafiltrasyon tüpü ile konsantrasyon yapılmasına karar verilmiştir. Şekil 4.30'da 20 katlık konsantrasyon işlemi öncesi ve sonrasındaki ultrafiltrasyon tüpleri gösterilmiştir.



Şekil 4.30. Ham enzim çözeltisinin konsantrasyon işlemi öncesi ve sonrasında ultrafiltrasyon tüpleri

Ham enzim çözeltisinde hangi tip peptidazların olduğunu belirlemek için enzim çözeltisi iki farklı konsantrasyondaki peptidaz inhibitörleri [E-64 (10 ve 20 μ M), PEP-A (10 ve 20 μ M), O-FEN (1 ve 2 mM), PMSF (1 ve 2 mM)] ile karıştırılıp oda sıcaklığında 30 dakika beklendikten sonra aktivite değerleri ölçülmüştür. Farklı tipte peptidazları içerip içermediklerini test etmek için aynı uygulama ultrafiltrasyon tüpünün üstünde kalan ve altına geçen sıvılara da uygulanmıştır. Aktivite değişimleri Şekil 4.31'de verilmiştir. Grafikte her bir inhibitör için ilk sütun düşük, 2. sütun ise yüksek inhibitör konsantrasyonuna ait aktivite değerleridir. Grafığe göre her üç sıvı için de aktivite, inhibitör olarak O-FEN kullanıldığı zaman azalmaktadır. İnhibitör konsantrasyonu arttıkça da azalma daha fazla olmaktadır. Dolayısıyla denenen inhibitör konsantrasyonlarına göre ham enzim çözeltisindeki baskın peptidaz metalopeptidaz olmaktadır. Filtrede kalan ve geçen sıvılarda da durum benzer şekilde gerçekleşmiş, O-FEN varlığında aktivitedeki azalma daha fazla olmuştur. Şekilde düşük konsantrasyonda PMSF varlığında ölçülen aktivite değerleri de gösterilmiştir. Her üç sıvı için de PMSF varlığında da bir miktar aktivite azalması gözlenmektedir. PMSF varlığında aktivitedeki azalma % olarak hesaplandığında; ham enzim çözeltisi, filtre üst ve alt sıvısı için sırasıyla, yaklaşık %11.5, %13.8 ve %20.2'dir. Bu durumda filtre altına geçen sıvıdaki serin peptidazı miktarının diğerlerine göre nispeten daha fazla olduğundan söz edilebilir.



Şekil 4.31. Peptidaz inhibitörleri varlığında K1 suşunun ham enzim çözeltisi ile ultrafiltrasyon tüpü üst ve alt sıvısında aktivite değerlerinin değişimi

Daha önce ham enzim çözeltisinin en iyi aktivite gösterdiği pH değeri açıklanırken (Bkz. Şekil 4.29) düşük pH derecelerinde aktivite devam ettiği için ham enzim çözeltisinin aspartik peptidaz da içerebileceğinin düşünüldüğü söylenmişti. Şekil 4.31 bu açıdan incelendiğinde aspartik peptidaz inhibitörü olan PEP-A varlığında aktivitenin azalması beklenebilir. Ancak inhibitör etkisi belirlenirken, peptidaz aktivitesinin pH 7.5’da ölçüldüğü göz önünde bulundurulmalıdır. Aspartik peptidaz için optimum pH’nın yaklaşık 5.5 olduğu (Fu vd 2008) dikkate alınırsa, zaten çok düşük olan aktivitenin pH 7.5’da tespit edilmesinin de mümkün olmayacağı düşünülmektedir.

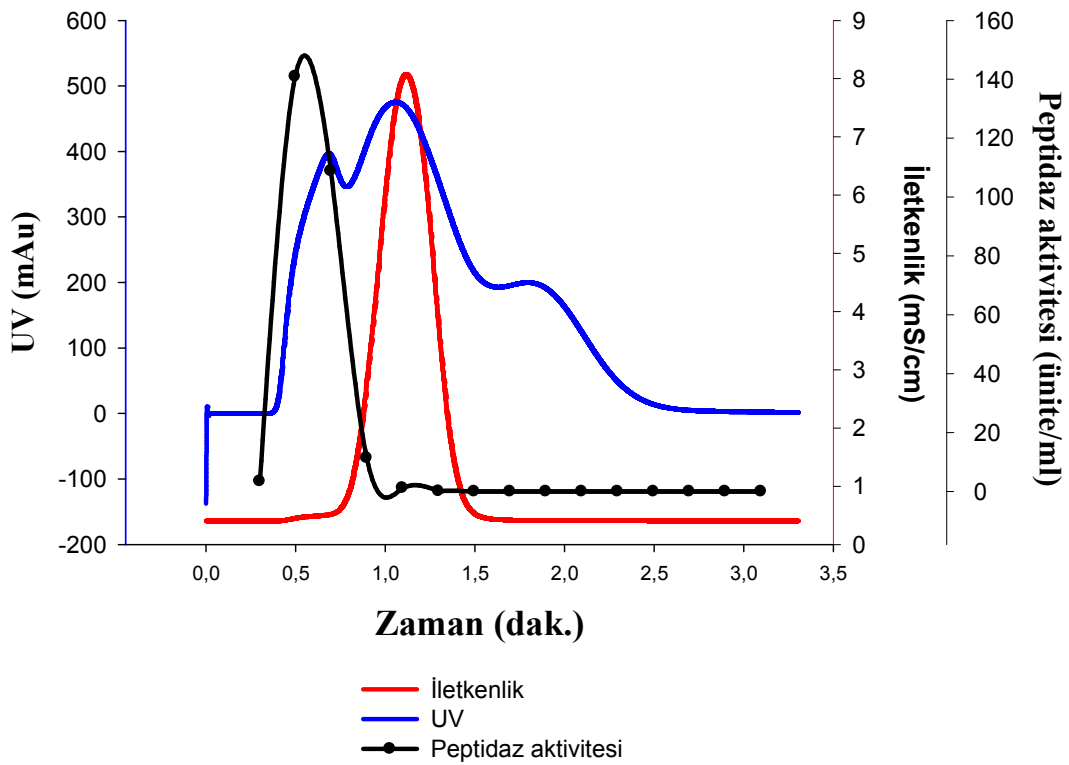
4.5.3. Konsantre enzim çözeltisinin afinite kromatografisi ile saflaştırılması

4.5.3.1. Konsantre enzim çözeltisinin afinite kromatografisinde kullanılan bağlayıcı tampon çözeltiye adaptasyonu

Asıl saflaştırma işleminden önce, konsantre ham enzim çözeltisi HiTrap desalting kolondan geçirilerek tampon çözeltinin değiştirilmesi, diğer bir deyişle enzim çözeltisinin afinite kromatografisi sırasında kullanılacak olan bağlayıcı tampona (100 mM MOPS, pH 7) adapte edilmesi sağlanmıştır. Bunun için kolon önce bağlayıcı tampon çözelti ile şartlandırılmış, ardından 1.5 ml konsantre ham enzim çözeltisi yüklenmiş ve kolondan yine aynı tampon çözelti geçirilmiştir. Bu işlem sırasında bilgisayar ekranında izlenen UV ve iletkenlik değerlerine ait görüntü Ek 7’de verilmiştir. Bunun yanı sıra, UV ve iletkenlik grafikleri ile toplanan fraksiyonlara ait peptidaz aktivitesi değerlerine ait grafiği aynı anda gösterebilmek için Akta Prime cihazı yazılım programı aracılığıyla UV ve iletkenlik verileri alınmış ve Şekil 4.32’deki grafik çizilmiştir.

HiTrap desalting kolondan örnek geçişi sırasında toplam 15 fraksiyon toplanmıştır. Fraksiyonların hangi zamanlarda toplandığı Şekil 4.32’deki peptidaz

aktivitesi eğrisinden görülebilmektedir. Esases UV piki, fraksiyonların hangi ana kadar toplanacağı konusunda da ipucu vermektedir. UV pikinin, yani absorbans (280 nm) değerlerinin sıfırdan farklı olması örnekte protein olduğunun göstergesidir. Dolayısıyla 12. fraksiyondan sonra aslında örnekte protein bulunmadığı söylenebilir. Ancak maksimum absorbans verdikleri dalga boyları çok az farklılık göstermekle birlikte aromatik aminoasitleri (triptofan, tirozin ve fenilalanin) içeren proteinlerin genellikle 280 nm’de tayin edilebildiği bilinmektedir (Cutler 2003). Bu durumda eğer enzim çözeltisi ya da fraksiyonu, aromatik amino asitleri (özellikle de triptofan ve tirozin) içermiyorsa enzim aktivitesi söz konusu olduğu halde 280 nm’de UV piki sıfır olarak görünebilir. Bu nedenle ilk etap için işlem süresince tüm fraksiyonlarda aktivite ölçümü yapılmıştır. Ancak şekilden de görüldüğü üzere bu fraksiyonlarda aktivite tespit edilmemiştir.



Şekil 4.32. K1 suşuna ait konsantre ham enzim çözeltisi HiTrap desalting kolondan geçerken absorbans, iletkenlik ve peptidaz aktivitesi değişimi

HiTrap desalting kolon jel filtrasyon sistemiyle çalışmakta, molekül büyüklüğüne göre bir ayırım sağlamaktadır. Büyük moleküller kolonu ilk başta terk ederken, küçük olan moleküller daha geç terk etmektedir (Hagel 2011). Şekil 4.32 bu açıdan incelendiğinde peptidazın kolondan ilk fraksiyonlarla birlikte ayrıldığı görülmektedir. Bu işlem ile örneği bağlayıcı tampona adapte etmek amaçlansa da aslında kısmi bir saflaştırma da sağlanmıştır. Çünkü peptidaz aktivitesinin olmadığı noktalarda (yaklaşık 1. dakikadan sonra) sistemde hala absorbans olduğu, hatta absorbansın daha da yükseldiği şekilden görülmektedir. Dolayısıyla konsantre ham

enzim çözeltisindeki peptidazın, bu işlem ile daha küçük moleküllü protein ya da peptidlerden ayrıldığını söylemek mümkündür.

Ham enzim çözeltisine uygulanan ön işlemler sırasındaki aktivite değerleri ile konsantre ham enzim çözeltisi kolondan (Hitrap desalting) geçerken toplanan fraksiyonların aktivite değerleri Çizelge 4.17’de verilmiştir. Enzimin 0.45 µm filtreden (PES) geçerken aktivitesinde değişim olmadığı söylenebilir. Konsantre edildiğinde ise daha önce açıklandığı gibi hacimsel olarak 10 katlık konsantrasyon işlemi aktivite değerini aynı oranda artıramamıştır. Tampon değişimi sırasında en yüksek peptidaz aktivitesini 2. ve 3. fraksiyonlar göstermekte, daha sonraki fraksiyonların aktivitesinde belirgin bir düşüş gözlenmektedir. Toplanan fraksiyonlardan en son 6. fraksiyonda aktivite tespit edilmiştir. Dolayısıyla asıl saflaştırma işlemi için HiTrap Blue kolona, bu 6 fraksiyonun birleştirilerek yüklenmesine karar verilmiştir. Aslında 6. fraksiyonun aktivite değeri oldukça düşüktür. Bu nedenle birleştirilen çözeltide bir miktar seyrelmeye neden olmaktadır. Ancak aktivite gösteren tüm fraksiyonları toplamak adına ilk 6 fraksiyon birleştirilmiştir.

Çizelge 4.17. Ham enzim çözeltisinin asıl saflaştırma öncesi hazırlık aşamalarında aktivite değerleri

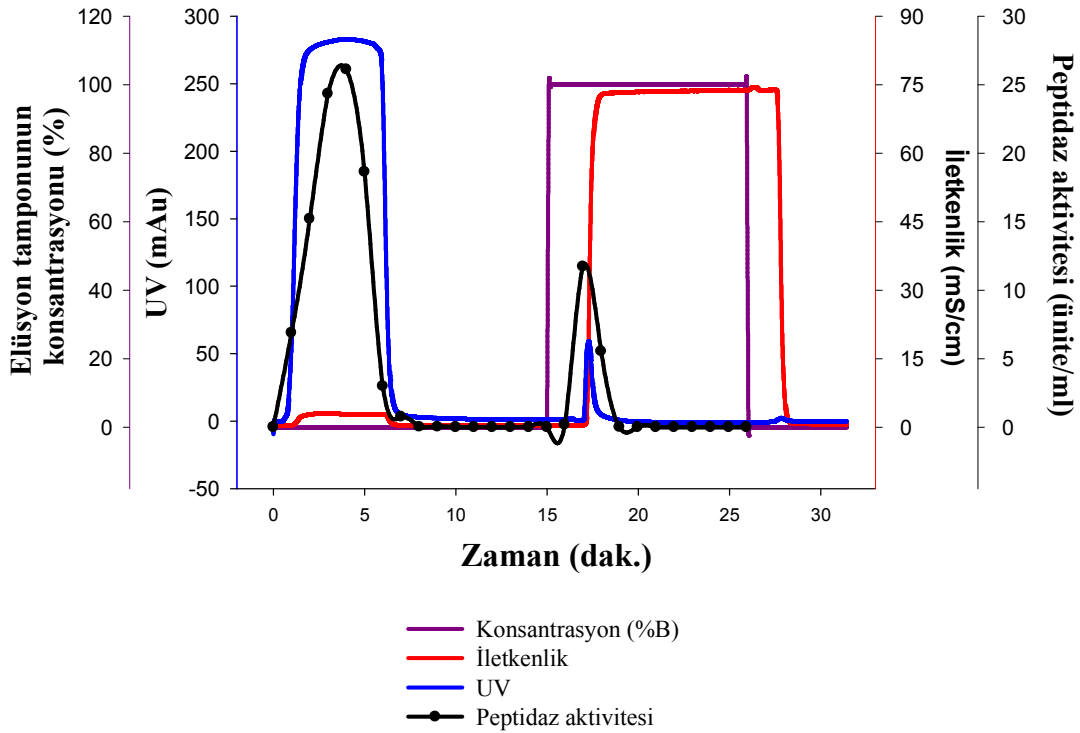
Hazırlık aşamaları	Peptidaz aktivitesi (ünite/ml)
Ham enzim çözeltisi	35.122 ± 0.157
Filtre edilmiş (0.45µm) ham enzim çözeltisi	34.289 ± 0.864
10 kat konsantre edilen ham enzim çözeltisi	201.833 ± 2.161
<u>Tampon değişimi sırasında toplanan fraksiyonlar:</u>	
1. fraksiyon	3.400 ± 0.079
2. fraksiyon	140.861 ± 2.357
3. fraksiyon	108.778 ± 2.946
4. fraksiyon	11.344 ± 0.314
5. fraksiyon	1.225 ± 0.000
6. fraksiyon	0.100 ± 0.020

Bundan sonra tampon çözelti değişimi yapılırken tüm fraksiyonların aktivite değeri tek tek ölçülmemiş, ilk 6 fraksiyon doğrudan birleştirilip, birleştirilen çözeltinin aktivite ölçümü yapılarak asıl saflaştırma kolonuna yükleme yapılmıştır.

4.5.3.2. Afinite kromatografisi ile (HiTap Blue kolon) enzimin kısmi olarak saflaştırılması

Önceki aşamada anlatıldığı gibi tampon çözeltisi değişimi sırasında toplanan ilk 6 fraksiyon birleştirilmiş ve HiTrap Blue kolona toplam 5 ml örnek yüklenmiştir. Yükleme öncesi kolonun şartlandırılması ve örnek yüklendikten sonra kolonun yıkanması işlemi pH’sı 7 olan 100 mM MOPS tamponu ile yapılmıştır. Saflaştırma amaçlı ilk yapılan deneme sırasında, değişimi izlenen parametrelere ve peptidaz aktivitesine ait grafik Şekil 4.33’de, doğrudan cihazdan elde edilen görüntü ise Ek 8’de verilmiştir. Şekil 4.33 incelendiğinde UV pikinin yani absorbans grafiğinin örneğin

kolondan geçişi esnasında ve kolona bağlanmayan maddelerin uzaklaştırılması için yapılan yıkama işleminin başında yüksek olduğu, yaklaşık 8-9. dakikada sıfır değerine düştüğü görülmektedir. Ancak elüsyon başladıktan çok kısa bir süre sonra 16-18. fraksiyonlar arasında absorbans yeniden yükselmiştir. Bu durum, kolona bağlanmış halde protein molekülü olduğunu ve elüsyon tamponu (100 mM MOPS, 1 M NaCl, pH 7) ile birlikte bu maddenin kolondan ayrılmasının sağlandığını göstermektedir. Elüsyon tamponunda bağlayıcı tampondan farklı olarak 1 M NaCl bulunmaktadır. Protein molekülünün kolondan ayrılması tuza bağlı olarak gerçekleşmiştir. Kolonun yıkama işleminin bitmesinin hemen ardından elüsyon tamponunun konsantrasyonu %100'e çıkarıldıktan sonra elüsyon işlemine başlanmıştır. Yani tuz konsantrasyonu aşamalı olarak değil, doğrudan 1 M'a çıkarılmıştır. Lauer vd (2000) bu tez çalışmasındaki ile aynı kolon ve tampon çözeltiyi kullandıkları bir çalışmada peptidaz ve amilazı ayırırken elüsyon tamponunu lineer gradient (doğrusal değişim derecesi) olarak kolondan geçirmiş ve peptidaz pikini yaklaşık 150 mM tuz konsantrasyonuna ulaştıklarında elde etmişlerdir. Bu çalışma göz önünde bulundurularak lineer gradient uygulanıp elüsyon tamponundaki tuz oranı aşamalı olarak artırılarak saflaştırma denemesi yapılmıştır. Tuz konsantrasyonu yaklaşık 300-400 mM arasında iken birbirinden tam olarak ayıramamış (bitişik) üç pik elde edilmiştir. Fraksiyonlar bu üç pike göre toplanmaya çalışılmış ve her üçünün de peptidaz aktivitesi olduğu saptanmıştır. Dolayısıyla tuz konsantrasyonunun aşamalı olarak artırılmasının peptidaz pikinin parçalanmasına neden olduğu düşünülmüştür. Bu nedenle tuz konsantrasyonu için lineer gradient uygulamamaya karar verilmiştir. Lineer gradient uygulansa bile aktivite gösteren fraksiyonlar toplanıp birleştirileceği için (özellikle miktarlarının çok az olması nedeniyle) lineer olmayan yani step gradient (basamaklı değişim derecesi) ile aynı sonuca ulaşılmış olacaktır.



Şekil 4.33. Saflaştırma sırasında bazı parametrelerin değişimi ve peptidaz açısından aktif fraksiyonlar

Safılaştırma işlemi boyunca toplam 26 fraksiyon toplanmış ve her birinde peptidaz aktivitesi ölçümü gerekleştirilmiştir. Şekil 4.33'den görüldüğü gibi absorbansın yüksek olduğu fraksiyonlar peptidaz aktivitesi göstermektedir. Çizelge 4.18'de ham ve konsantre enzim çözeltilerinin peptidaz aktivitesi ve spesifik aktivite değerleri ile safılaştırmada toplanan peptidazca aktif fraksiyonların aktivite ve spesifik aktivite değerleri verilmiştir.

Çizelge 4.18 incelendiğinde enzimin ok önemli bir kısmının kolona hi bağlanmayıp doğrudan getiğı, enjeksiyon sırasında muhtemelen yeterli akış sağlanamaması nedeniyle kolonda kalan enzim moleküllerinin de yıkama aşaması başlar başlamaz kolonu terk ederek ayrıldığı anlaşılmaktadır. Elüsyon sırasında toplanan fraksiyonların aktivite değerleri, enzimin ok az bir kısmının kolona bağlanabildiğini göstermektedir. Elüsyon sırasında toplanan peptidazca aktif fraksiyonlarda protein miktarının tespit edilemeyecek kadar düşük olması (özellikle de 16. fraksiyon için) aslında iyi bir safılaştırmaya işaret etmektedir. Çünkü protein miktarı ne kadar düşük olursa peptidazın toplam protein içindeki payı artacağından, saflık derecesi de artacaktır. Ancak kolon hacminin küçük olması nedeniyle ancak küçük hacimlerde alışılabilmış, buna bağlı olarak da tespit edilebilir oranda protein miktarı elde edilememiştir. Bu nedenle de kolona bağlanan peptidazın tam olarak ne kadar safılaştığı belirlenememiştir.

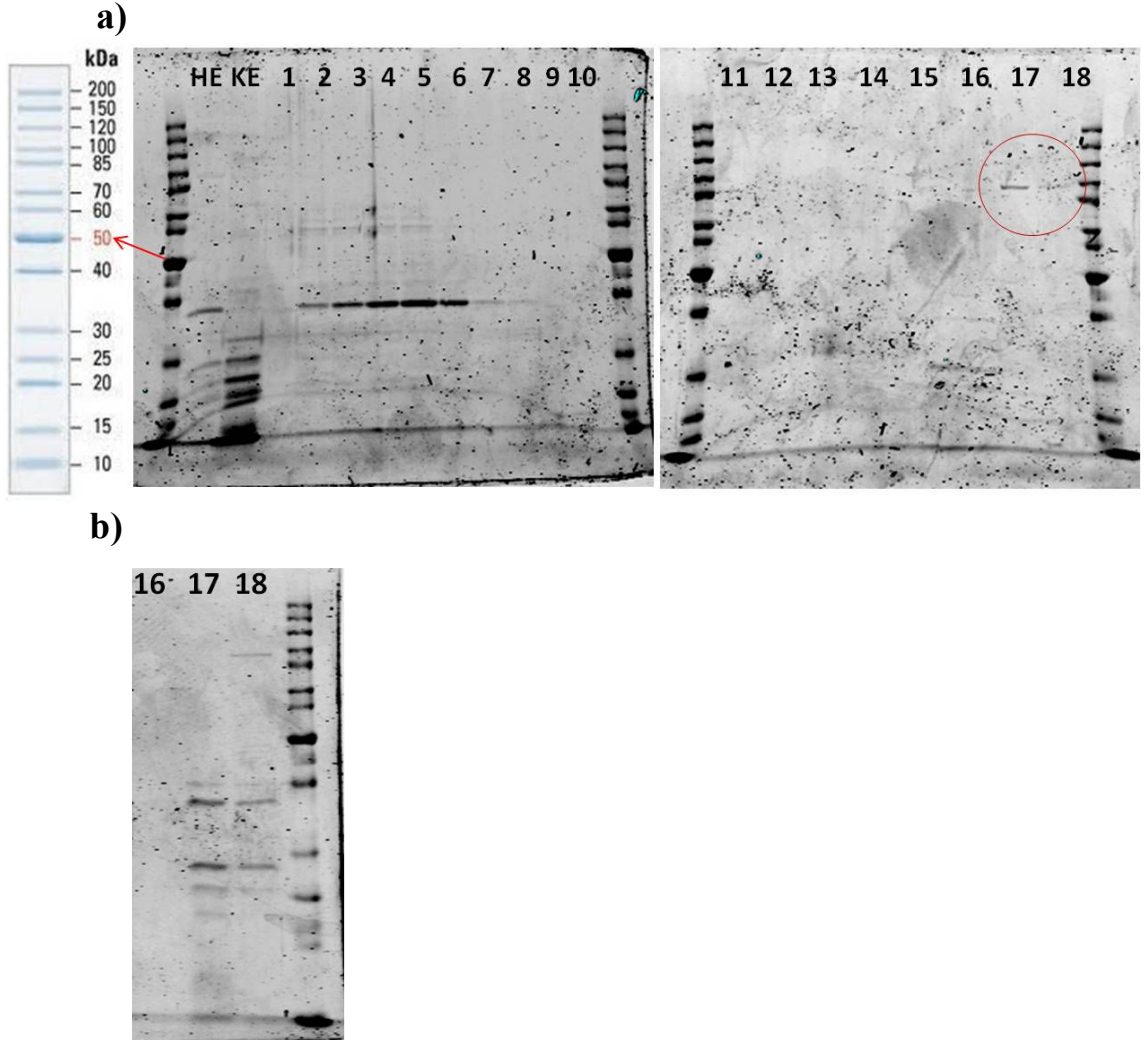
Çizelge 4.18. Safılaştırma kolonundan toplanan fraksiyonların aktivite değerleri

Fraksiyonlar	Peptidaz aktivitesi (ünite/ml)	Spesifik aktivite (ünite/mg)
Ham enzim çözeltisi	25.289 ± 0.236	842.967
Ultrafiltrasyon tüpü üst sıvısı (konsantre enzim)	158.083 ± 0.012	760.014
	2	6.892 ± 0.079
Kolona örnek enjeksiyonu sırasında toplanan fraksiyonlar	3	15.211 ± 0.059
	4	24.336 ± 0.000
	5	26.114 ± 0.275
		861.500
Kolonun bağlayıcı tamponla yıkaması sırasında toplanan fraksiyonlar	6	18.642 ± 0.079
	7	2.989 ± 0.059
	8	0.753 ± 0.039
Elüsyon sırasında toplanan fraksiyonlar	16	0.183 ± 0.020
	17	11.725 ± 0.118
	18	5.531 ± 0.000

Çizelgede sadece aktivite gözlenen fraksiyonlara yer verilmiştir.

*Protein miktarı ok düşük olduğundan tespit edilememiş, buna bağlı olarak spesifik aktivite değeri de hesaplanamamıştır.

Saflaştırma sırasında toplanan fraksiyonların SDS-PAGE görüntüleri Şekil 4.34a'da verilmiştir. Protein markırından sonraki ilk iki kuyucuğa sırasıyla ham (HE) ve konsantre enzim (KE) çözeltileri sonraki kuyucuklara da saflaştırma sırasında toplanan tüm fraksiyonlar sırasıyla yüklenmiştir. Jel üzerindeki numaralar fraksiyon numarasını göstermektedir. Jel görüntüsü incelendiğinde 40 kDa sınırının biraz altında (yaklaşık 36-37 kDa civarında) ham enzim çözeltisinden başlamak üzere fraksiyonlar ilerledikçe devam eden bantlar görülmektedir. Bantlar özellikle 2-6. fraksiyonlar arasında daha belirginken, 7 ve 8. fraksiyonlarda bantların yoğunlukları azalmıştır. Bantlar, Çizelge 4.18'deki aktivite değerleri ile karşılaştırıldığında bant yoğunluğu ile aktivite değerleri arasında korelasyon olduğu görülmektedir. Bu durumda 36 kDa civarındaki bantlar kuvvetle muhtemel peptidaza aittir. Peptidaz bantları tespit edilmesine rağmen yine de tam bir saflaştırma sağlanamamıştır. Nitekim şekilde farklı moleküler ağırlık sınırlarında da bantlar olduğu görülebilmektedir. Aktivitenin tespit edilmediği fraksiyonlar için SDS-PAGE'de de herhangi bir bant gözlenememiştir.

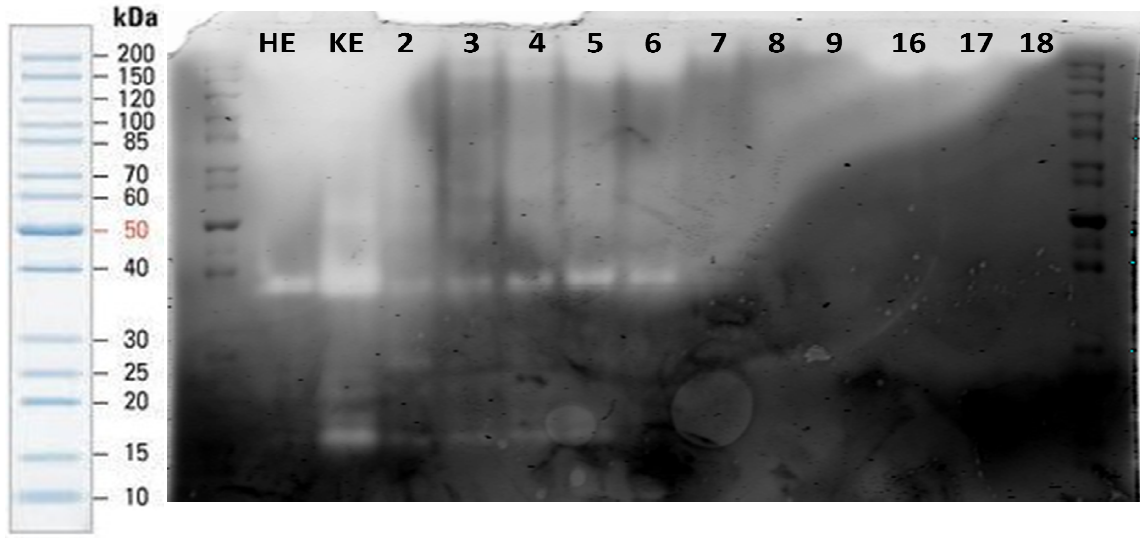


Şekil 4.34. Saflaştırma sırasında toplanan fraksiyonların SDS-PAGE görüntüleri (HE: Ham enzim çözeltisi; KE:Konsantre enzim çözeltisi; 1-18: Saflaştırma sırasında toplanan farklı fraksiyonlar)

Elüsyon sırasında toplanan fraksiyonlar için 36 kDa civarında bant tespit edilememiştir. Ama 17 ve 18. fraksiyonlar için 100 kDa sınırında bant olduğu Şekil 4.34a'da görülebilmektedir. Bu durumda ham enzim çözeltisinin kolona bağlanan ve bağlanmayan, farklı tipte peptidaz içerdiği düşünülebilir. Bu durumu kontrol etmek için elüsyonda toplanan fraksiyonlar için SDS-PAGE yeniden yapılmıştır. İlk yapılan SDS-PAGE'de elüsyonda toplanan fraksiyonlar, yüksek konsantrasyonda tuz içerdiği için tuz arındırma işleminden (desalting) sonra jellere yüklenmiştir. İkinci yapılan SDS-PAGE denemesinde ise fraksiyonlar tuz arındırma işlemi yapılmadan jelle yüklenmiştir. Tuz arındırma işlemi yapılmadan jelle yükleme yapıldığında 17 ve 18. fraksiyonlar da 36 kDa sınırında bant vermiştir (Şekil 4.34b). Bu durumun muhtemel nedeninin tuz arındırma işlemi sırasında gerçekleşen seyrelme olduğu düşünülmektedir. Tuz arındırma işlemi de tampon çözelti değişiminde olduğu gibi HiTrap desalting kolon ile yapılmış, kolondan toplanan fraksiyonların aktiviteleri ölçülmüştür. İlk 5 fraksiyonun aktivite göstermesi nedeniyle, bu 5 fraksiyon birleştirilmiş ve SDS-PAGE yapılmıştır. Dolayısıyla kolona 1.5 ml olarak yüklenen örnek 5.4 ml (ilk fraksiyon 1.4 ml olarak toplanıyor) olarak toplanmış ve 3.6 katlık bir seyrelme gerçekleşmiştir. Aslında örnekteki fazla tuz SDS'e bağlanacak protein miktarını değiştireceğinden, standart protein (markır) ile asıl örnek arasında SDS'e bağlanma açısından farklılık olur ve moleküler ağırlık yanlış belirlenebilir. Fakat 0.8 M'a kadar olan NaCl konsantrasyonunun SDS-PAGE'de sorun yaratmadığı da belirlenmiştir (See vd 1985). Şekil 4.34'de görüldüğü gibi 1 M tuz varlığında dahi bantlar, tuz arındırma işlemi uygulanmış olan örnekle aynı yerde bant vermiş, moleküler ağırlık açısından bir farklılık oluşmamıştır.

Peptidaz aktivitesinin tespitinde kullanılan zimogram jelinin görüntüsü Şekil 4.35'de verilmiştir. Şekil incelendiğinde 17. ve 18. fraksiyonlar için hem 36 kDa hem de 100 kDa sınırında bant olmadığı görülmektedir. Hatta jelin sağ tarafının neredeyse tamamen karanlık olması kazeinin parçalanmadığını, bu bölgede peptidaz aktivitesine bağlı hiç hidroliz gerçekleşmediğini göstermektedir. Ancak bu fraksiyonların (17 ve 18) aktivite gösterdiği bilinmektedir (Bkz. Çizelge 4.18). SDS-PAGE görüntüsüne göre peptidaz olduğu düşünülen, 36 kDa sınırındaki protein bantlarının Şekil 4.35'de de beyaz bant vererek, peptidaz aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir. Bant yoğunlukları yine aktivite değerleri ile orantılıdır. Konsantre enzim çözeltisi ham enzim çözeltisine göre oldukça büyük bir aktivite bandı vermiştir. Ünite/ml cinsinden aktivite değerinin en yüksek olduğu 4, 5 ve 6. fraksiyonlarda bantların da yoğunlukları daha fazladır. Zimogram jeline 36 kDa sınırının biraz daha altında da (yaklaşık 15 kDa) aktivite bandı gözlenmesi nedeniyle ham enzim çözeltisinin farklı peptidazları ya da izomerlerini içerebileceği düşünülmüştür.

Jel görüntüleri ile ilgili dikkat çeken bir konu da konsantre enzim çözeltisinin SDS-PAGE'de 36 kDa sınırında bant vermediği halde, zimogram jeline aynı bölgede aktivite değeri ile de orantılı olarak oldukça yoğun bir bant vermesidir. Bu durum ile ilgili herhangi bir sorun olup olmadığını test etmek için HiTrap blue kolon ile yapılan saflaştırma denemesiyle elde edilen ön bilgiler ışığında yeniden saflaştırma yapılmıştır. Saflaştırma yapılırken daha önce aktivite gösterdiği tespit edilen bazı fraksiyonlar birleştirildikten sonra bunların aktivitesi ölçülmüştür. Bu işlem sırasında farklı fraksiyonlar için tespit edilen peptidaz aktivitesi ve spesifik aktivite değerleri Çizelge 4.19'da verilmiştir.



Şekil 4.35. Saflaştırma sırasında toplanan fraksiyonların zimogram görüntüleri (HE: Ham enzim çözeltisi; KE:Konsantre enzim çözeltisi; 2-18: Saflaştırma sırasında toplanan farklı fraksiyonlar)

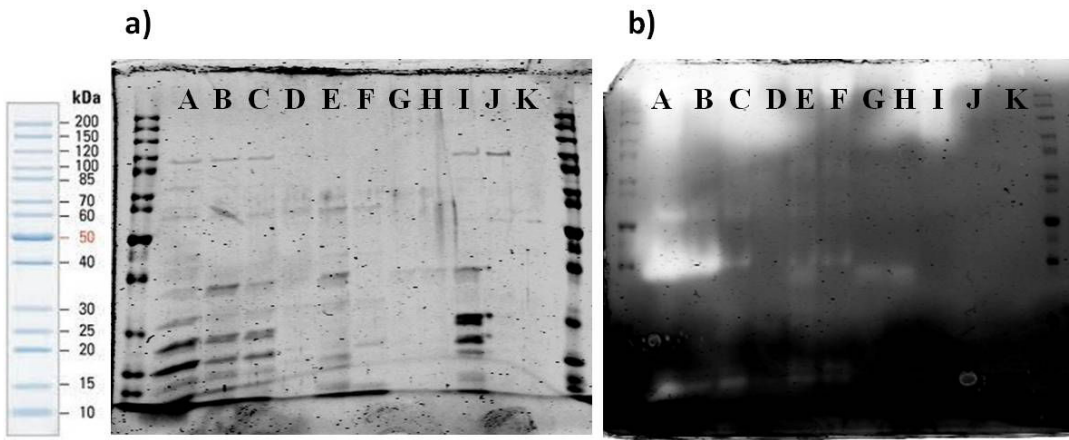
Çizelge 4.19’da görüldüğü gibi 3-8 arasındaki fraksiyonlar aktivite açısından en iyi olanlardır. Ancak 6-8 arasındaki fraksiyonların spesifik aktivitesinin daha yüksek olması saflaştırmanın da bu fraksiyonlar için daha iyi olduğuna işaret etmektedir. Elüsyon sırasında elde edilen 17-18. fraksiyonların da aktiviteleri iyi düzeydedir. Fakat protein miktarı yine tespit edilememiştir.

Çizelge 4.19. Saflaştırma kolonundan toplanarak birleştirilen fraksiyonların aktivite değerleri

Fraksiyonlar		Peptidaz aktivitesi (ünite/ml)	Spesifik aktivite (ünite/mg)
Ham enzim çözeltisi		46.963 ± 0.655	582.556
Ultrafiltrasyon tüpü üst sıvısı (konsantre enzim)		248.083 ± 15.321	1717.297
Tampon çözelti değişimi birleştirilen fraksiyonlar (1-6)	sırasında	60.789 ± 0.157	682.431
Kolona örnek enjeksiyonu sırasında toplanan fraksiyonlar	1-2 3-4-5	- 23.767 ± 0.570	- 488.099
Kolonun bağlayıcı tamponla yıkınması sırasında toplanan fraksiyonlar	6-7-8 9-15	25.378 ± 0.923 1.739 ± 0.020	649.431 *
Elüsyon sırasında toplanan fraksiyonlar	16 17-18	- 19.081 ± 0.059	- *

*Protein miktarı çok düşük olduğundan tespit edilememiş, buna bağlı olarak spesifik aktivite değeri de hesaplanamamıştır.

Birleştirilmiş fraksiyonlara ait SDS-PAGE ve zimogram jel görüntüleri Şekil 4.36'da verilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi ham enzim çözeltisinde (B) 36 kDa sınırında görülen bant konsantre enzim çözeltisinde (A) kaybolmaktadır. Ancak konsantre enzim çözeltisi tampon değişimi için HiTrap desalting kolondan geçirilip toplanan fraksiyonlar birleştirilince (C) bant yeniden görülebilmektedir. Aynı moleküler ağırlık sınırında zimogram jeline bakıldığında her üç çözeltinin de peptidaz açısından aktif olduğu görülmektedir. Konsantre enzim çözeltisinin SDS-PAGE'de bant vermediği halde zimogramda bant vermesinin muhtemel nedeni, SDS-PAGE için örnek hazırlarken örnekler uygulanan ısıtma işlemi sırasında, protein konsantrasyonunun fazla olmasına bağlı olarak, proteinin konformasyonel yapısının değişerek proteinin hasar görmesi olabilir. Zimografi için örnek hazırlarken ısıtma uygulanmadığından proteinde yapısal bir değişim gerçekleşmemiş ve bant gözlenebilmiştir.



- A: Ultrafiltrasyon tüpü ile konsantre edilmiş enzim
 B: Ham enzim çözeltisi
 C: Tampon değişimi sırasında birleştirilen fraksiyonlar (1-6)
 D: 1-2
 E: 3-5
 F: 6-8
 G: 9-15
 H: 16
 I: 17-18
 J: 19-21
 K: 22-25
- Enjeksiyon
 Yıkama
 Elüsyon

Şekil 4.36. Saflaştırma sırasında birleştirilmiş fraksiyonlara ait a) SDS-PAGE ve b) zimogram görüntüleri

Şekil 4.36a'da 6-8 fraksiyonları için peptidaz olduğu düşünülen 36 kDa sınırında bant gözlenememiştir. Bu üç fraksiyon jele ayrı ayrı yüklendiğinde (Bkz. Şekil 4.34a) her biri için bant gözlenmektedir. Aktivite değerlerine de bakıldığında (Bkz. Çizelge 4.18) 6. fraksiyonun en yüksek aktiviteye sahip olduğu görülmektedir. Dolayısıyla 6-8 fraksiyonları birleştirildiğinde muhtemelen seyrelme etkisi nedeniyle SDS-PAGE'de bant tespit edilememiştir. Ancak Şekil 4.36b'de 6-8 fraksiyonları için

aynı bölgede aktivite bandı gözlenmektedir. Zaten aktivite açısından bakıldığında 3-5 ve 6-8 fraksiyonlarının değerleri birbirine çok yakındır (Bkz. Çizelge 4.19). Ayrıca 6-8 fraksiyonunun spesifik aktivitesinin 3-5 fraksiyonuna göre daha yüksek olması protein oranının daha düşük olduğunu göstermektedir. Bu nedenle de 6-8 fraksiyonu için SDS-PAGE’de bant gözlenememiş olabilir.

Şekil 4.36’da görüldüğü gibi hiçbir fraksiyonda tek bant elde edilememiş, yani tam bir saflaştırma sağlanamamıştır. Zimogram jelinde de farklı moleküler ağırlıklarda bantlar gözleendiği için bu bantların farklı tipte peptidaza mı ait olduğu yoksa farklı alt birimler mi olduğunu belirlemek amacıyla her bir fraksiyona peptidaz inhibitörleri¹ ilave edilerek aktivite ölçümü tekrar yapılmıştır. İnhibitör ilaveli aktivite sonuçları inhibitörsüz aktivite sonuçlarına göre (Bkz. Çizelge 4.19) bağıl olarak hesaplanarak kalan aktivite cinsinden (%) Çizelge 4.20’de verilmiştir. Çizelge incelendiğinde O-FEN varlığında aktivitede çok büyük oranda azalma olduğu, ham enzim çözeltisinden başlamak üzere saflaştırmanın sonuna kadar aktivitesi ölçülen tüm fraksiyonlarda baskın peptidazın metalopeptidaz olduğu anlaşılmaktadır. Zimogram jelinin (Bkz. Şekil 4.36b) A, B ve C sıralarında, yaklaşık 55, 36 ve 15 kDa civarında, 3 bant görünmektedir. Literatürde *Bacillus* türleri ile üretilen metalopeptidazlar için 19 kDa (Sabirova vd 2010), 28 kDa (Rufo vd 1990), 30 kDa (Matta ve Punj 1998), 36 kDa (Manni vd 2008), 38 kDa (Lauer vd 2000), 45 kDa (Sousa vd 2007), 134 kDa (Lee vd 2002), 210 ve 215 kDa (D’Costa vd 2013) gibi farklı moleküler ağırlıklar tespit edilmiştir. *Bacillus thermoproteolyticus* tarafından üretilen, metalopeptidaz olan termolisin molekül ağırlığı da 34.6 kDa’dur (Titani vd 1972). Bu tez çalışmasında baskın peptidaz metalopeptidaz olarak tespit edildiğinden, zimogram jelinde 36 kDa sınırındaki bandın metalopeptidaza ait olabileceği düşünülmektedir. PMSF varlığında da aktivite de azalma olduğundan ham enzim çözeltisinde serin peptidaz varlığından da bahsetmek mümkündür.

Çizelge 4.20. Saflaştırma öncesi ve sonrasında inhibitör ilavesi sonucu K1 suşuna ait kalan peptidaz aktivitesinin % olarak değerleri

	PEP-A (20 µM)	E-64 (40 µM)	O-FEN (4 mM)	PMSF (4 mM)
Ham enzim çözeltisi	86.40	73.19	13.02	63.60
Konsantre enzim çözeltisi	84.72	90.03	22.88	30.42
Tampon değişimi sırasında birleştirilen fraksiyonlar (1-6)	100.64	92.23	12.90	71.43
Saflaştırma sırasında toplanan fraksiyonlar:				
3-5	98.36	101.17	0.25	89.19
6-8	102.68	91.35	0.78	91.30
9-15	94.40	96.00	0.00	58.46
17-18	94.17	88.35	25.85	47.59

İnhibitörsüz aktivite değerleri %100 kabul edilerek hesaplama yapılmıştır.

Verilen inhibitör konsantrasyonları, enzim çözeltisi ile karıştırıldıktan sonra ulaşılan son konsantrasyondur.

¹ Enzim çözeltisi ile inhibitör karıştırılıp oda sıcaklığında 30 dak. beklendikten sonra aktivite ölçülmüştür.

Çizelge 4.20 incelendiğinde 3-5, 6-8 ve 9-15 fraksiyonlarında O-FEN varlığında aktivitenin neredeyse tamamen kaybolduğu görülmektedir. Metalopeptidazın yoğun olması nedeniyle karakterizasyon çalışmalarında bu fraksiyonların birleştirilerek kullanılmasına karar verilmiştir. Ancak 9-15 fraksiyonunun ünite/ml cinsinden aktivite değeri çok düşük olduğundan seyrelmeye neden olmamak için analizlerde 3-8 fraksiyonları kullanılmıştır. Elüsyon sırasında aktivite gösteren fraksiyonlar da olmasına rağmen, bunlar karakterizasyon çalışmalarında değerlendirilmemiştir. Çünkü bunlar için hem zimogramda bant tespit edilememiş hem de protein miktarları belirlenemediğinden spesifik aktivite değerleri hesaplanamamıştır. Spesifik aktivite değeri bilinmediği için de saflık düzeyini belirlemek mümkün değildir. Bu nedenlerden dolayı karakterizasyon çalışmalarında birleştirilen 3-8 fraksiyonlarının kullanılması daha uygun görülmüştür. Ham enzim çözeltisinden 3-8 fraksiyonuna kadar olan aşama için oluşturulan saflaştırma tablosu Çizelge 4.21’de verilmiştir. Çizelgeden görüldüğü üzere saflaştırma basamakları ilerledikçe verim sürekli azalmıştır. Saflaştırma katsayısının düşüklüğü (1.53) çok iyi bir saflaştırma yapılamadığına işaret etmektedir.

Çizelge 4.21. K1 suşunun (*Bacillus amyloliquefaciens*) ürettiği peptidazın saflaştırma profili

	Hacim (ml)	Peptidaz aktivitesi (Ünite/ml)	Protein (mg/ml)	Spesifik aktivite (ünite/mg)	Toplam aktivite (Ünite)	Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Ham enzim çözeltisi	50.00	40.13	0.15	265.10	2006.57	100.00	1.00
Konsantre enzim çözeltisi	5.00	251.25	0.99	253.35	1256.23	62.61	0.96
Tampon değişimi sırasında birleştirilen fraksiyonlar (1-6)	21.33	49.06	0.13	365.90	1046.59	52.16	1.38
Saflaştırma sırasında toplanan fraksiyonlar (3-8)	25.06	20.26	0.05	405.14	518.58	25.84	1.53

Sousa vd (2007) daha sonra karakterizasyon aşamasında metalopeptidaz olduğunu belirledikleri *Bacillus cereus* peptidazını üç kromatografik aşama ile saflaştırmış ve son aşamada saflaştırma verimini %2.16, saflaştırma katsayısını ise 57.6 olarak tespit etmişlerdir. Saflaştırma verimi bu tez çalışmasında elde edilene göre düşük olmasına rağmen, oldukça yüksek oranda saflaştırma sağlamışlardır. Manni vd (2008) ise *Bacillus cereus* SV1 metalopeptidazının saflaştırılması için ultrafiltrasyonun ardından üç kromatografik aşama uygulamış ve bu tez çalışmasındaki ile benzer bir

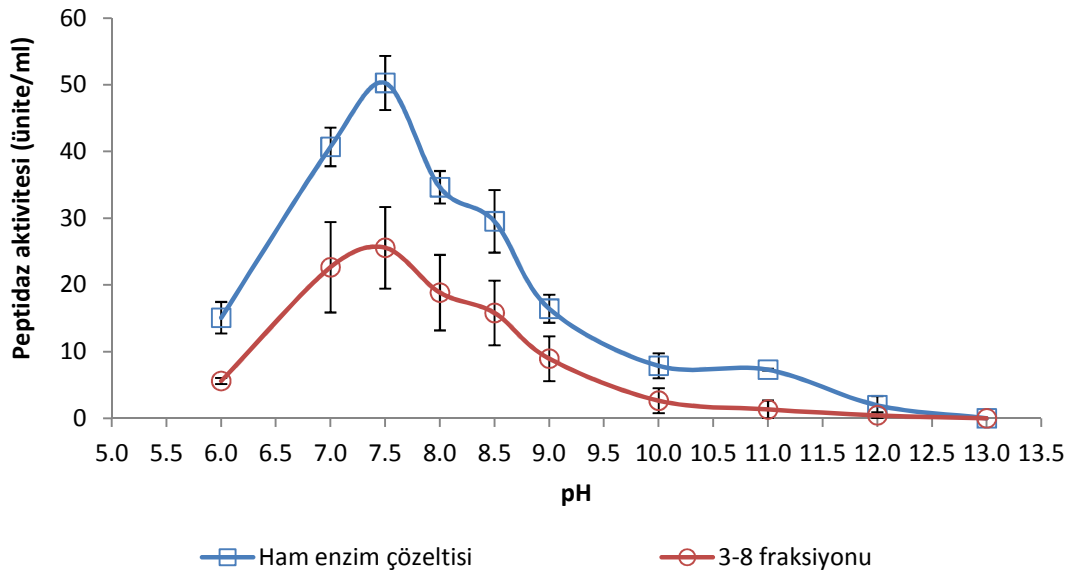
verim (%27.74) elde etmişlerdir. Ancak 6.09 katlık bir saflaştırma oranı elde etmişlerdir.

4.6. K1 Suşu ile Üretilen Peptidazın Karakterize Edilmesi

Üretilen peptidazda tam bir saflaştırma sağlanamadığı için karakterizasyon çalışmaları hem ham enzim çözeltisi hem de afinite kromatografisi sırasında toplanarak birleştirilen 3-8 fraksiyonları ile yapılarak karşılaştırma sağlanmıştır.

4.6.1. Üretilen peptidazın optimum pH değeri ile pH kararlılığı

Farklı pH değerlerinde (6.0-13.0)¹ ham enzim çözeltisi ve 3-8 fraksiyonları için ölçülen peptidaz aktivitesi sonuçları Şekil 4.37’de gösterilmiştir. Şekil incelendiğinde kısmi saflaştırma sonucunda enzim aktivitesinde kayıp meydana gelse de ham enzim çözeltisi ile kısmi olarak saflaştırılmış enzim çözeltisinin aktivite açısından farklı pH değerleri için sergilediği profilin aynı olduğu anlaşılmaktadır. Peptidaz çözeltileri en iyi aktiviteyi pH 7.5’de (ham enzim 50.28 ünite/ml, kısmi saf enzim 25.57 ünite/ml) göstermekte, daha yüksek ve düşük pH’larda aktiviteleri azalmaktadır. Daha önce de ifade edildiği gibi bu tez çalışmasında elde edilen peptidaz çözeltileri baskın olarak metalopeptidaz içermektedir. Nitekim diğer peptidazlarla karşılaştırıldığında metalopeptidazların aralarında en kararsız peptidaz grubu olduğu, pH 6.0’ın altında ve pH 9.0’un üzerinde hızla otoliz olduğu bildirilmektedir (Salleh vd 2006). Optimum pH değerine en yakın değer olan pH 7.0 ve pH 8.0’de ham enzim çözeltisi aktivitesinin, sırasıyla, %80.9 ve %68.9’unu koruyabilirken; aynı pH değerleri için kısmi saflaştırılmış enzim, aktivitesinin %88.6 ve %73.7’sini korumuştur.



Şekil 4.37. K1 suşu ile üretilen peptidazın farklı pH değerlerindeki aktivite sonuçları

¹ Kazeinin çözünürlüğünü kaybetmesi nedeniyle 6.0’den daha düşük pH değerlerinde aktivite ölçümü yapılamamıştır.

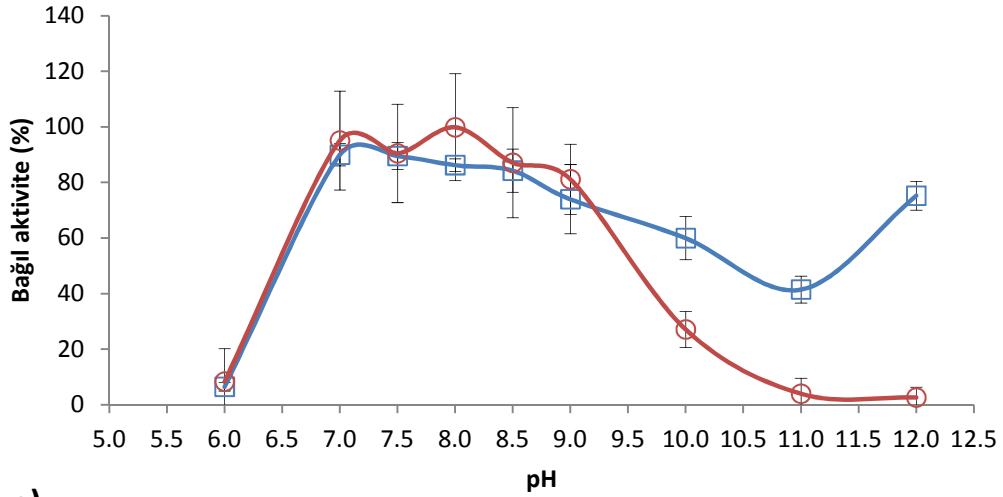
Genel olarak metalopeptidazların nötr karakterli olduğu ve optimum aktiviteyi pH 7.0-8.0 arasında gösterdiği bildirilmektedir (Rao vd 1998, Salleh vd 2006). *Bacillus cereus*'dan elde ettikleri metalopeptidaz için optimum pH değerini Sousa vd (2007) pH 7.0, Manni vd (2008) ise pH 8.0 olarak tespit etmişlerdir. Matta ve Punj (1998) *Bacillus polymyxa* B-17'den elde ettikleri metalopeptidaz için optimum pH değerini 7.5 olarak belirlemişlerdir. Bu tez çalışmasında elde edilen, baskın olarak metalopeptidaz içeren, enzim çözeltileri de optimum pH 7.5 değeri ile nötr karakterlidir.

Üretilen peptidazın farklı pH değerlerindeki kararlılığı kalan aktivite¹ %'si olarak Şekil 4.38'de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre peptidaz 37 °C'de 2 saatlik inkübasyon sonunda pH 7.0-9.0 arasında aktivitesini büyük ölçüde korumaktadır. Fakat özellikle pH 9.0'dan sonra aktivitesinde belirgin bir azalış göze çarpmaktadır. İnkübasyon süresi uzadığında ise ham enzim çözeltisi pH 7.0 ile 8.0 arasında aktivitesini yaklaşık %75-80 oranında koruyarak kararlılık göstermiştir. Ancak kısmi saflaştırılmış enzim, aktivitesini sadece pH 7.0'de %27, pH 8.0'de ise %63 oranında koruyabilmiştir. Kısmi saflaştırılmış enzimin optimum pH'sı 7.5 olmasına karşın, aktivitesini en iyi koruduğu pH değeri 8.0'dir. Alkali pH değerlerinde, özellikle de inkübasyon süresi uzadıkça enzimin dayanıklılığı azalmaktadır. Ancak farklı karakterde peptidazları içermesi olasılığı nedeniyle, ham enzim çözeltisinin dayanıklılığı kısmi saflaştırılmış peptidaza göre daha fazladır.

Manni vd (2008) 30 °C'de 15 dakikalık inkübasyon sonunda metalopeptidazın pH 7.5-9.0 arasında aktivitesinin neredeyse tamamını koruduğunu tespit etmişlerdir. Ghorbel vd (2003) *Bacillus cereus* ile ürettikleri ham peptidaz çözeltisinde metalopeptidaz bulunduğunu ve optimum pH'nın 8.0 olduğunu belirlemiş; enzimin, pH 6.0-9.0 arasında 50 °C'de yapılan 1 ve 3 saatlik inkübasyonlar sonunda, aktivitesini %95'den fazla koruduğunu tespit etmişlerdir. Sözü geçen çalışmalarla karşılaştırıldığında, bu tez çalışmasında elde edilen ham enzim çözeltisinin 18 saat gibi uzun bir inkübasyon sonunda bile aktivitesini %75-80 oranında koruyabilmesi, pH kararlılığı açısından iyi bir sonuç olarak değerlendirilebilir.

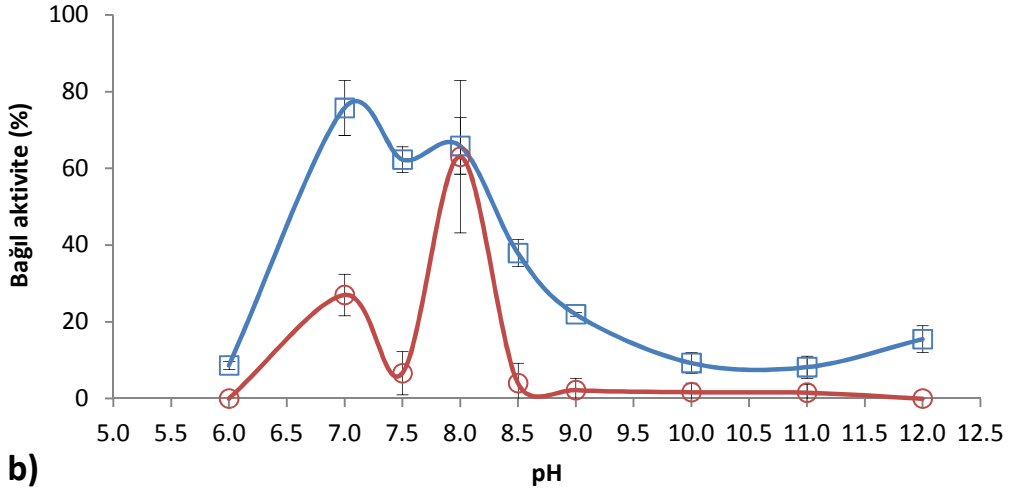
pH kararlılığı testinde şaşırtıcı olan, ham enzim çözeltisinin pH 12'deki aktivitesi oldukça düşük olmasına rağmen, bu pH değerinde özellikle 2 saatlik inkübasyon sonunda aktivitesini %75.26 gibi yüksek bir oranla korumuş olmasıdır. Bu durumun da ham enzim çözeltisinde serin peptidaz bulunma olasılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ham enzim çözeltisinde serin peptidazı inhibitörü olan PMSF varlığında kalan aktivitenin yaklaşık %64 olduğu belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.20). Serin peptidazlar alkali karakterlidir ve eğer ham enzim çözeltisindeki serin peptidazının optimum noktası da pH 12 ise aktivitesini kısmen koruyabilmesi olağandır. Aynı koşullarda kısmen saflaştırılmış enzimin ise aktivitesi neredeyse tamamen kaybolmuştur.

¹ Kalan aktivite ölçümü optimum pH olan 7.5'da yapılmıştır.



a)

—□— Ham enzim çözeltisi —○— 3-8 fraksiyon



b)

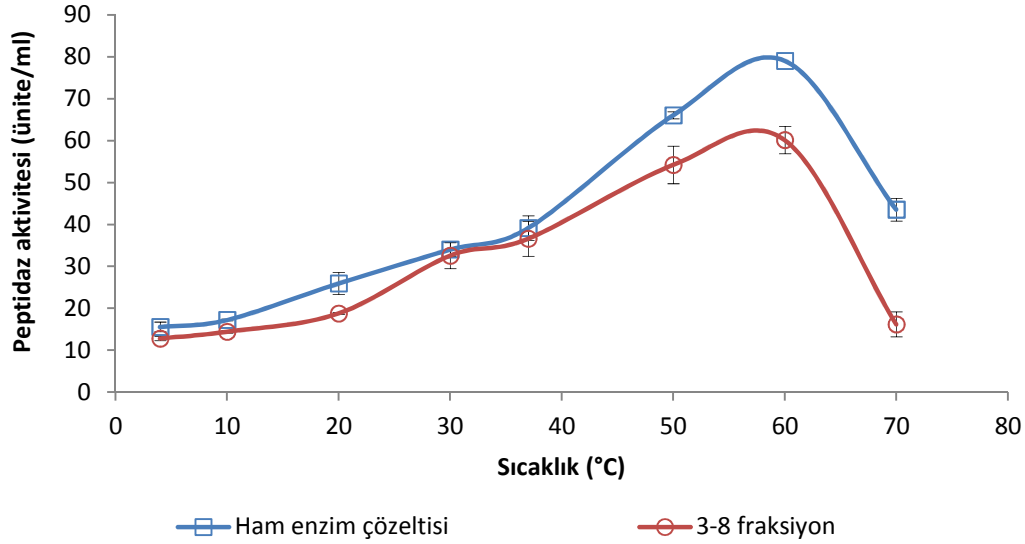
—□— Ham enzim çözeltisi —○— 3-8 fraksiyon

Şekil 4.38. K1 suşu ile üretilen peptidazın farklı pH değerlerinde a) 2 saat b)18 saat inkübasyon sonundaki pH kararlılığı

4.6.2. Üretilen peptidazın optimum sıcaklık değeri ile sıcaklık kararlılığı

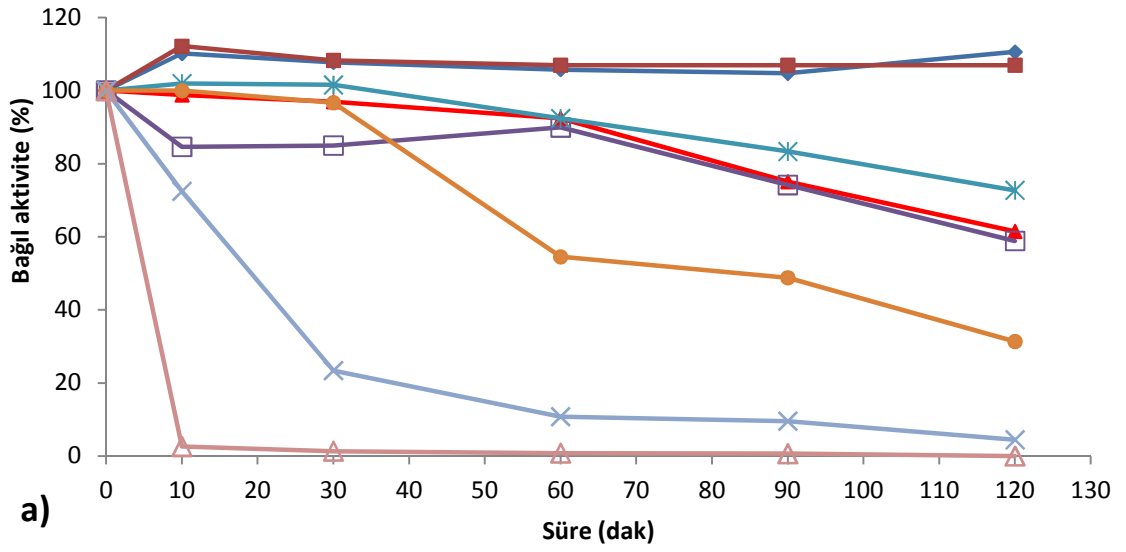
Farklı sıcaklıklarda (4-70 °C) ham enzim çözeltisi ve 3-8 fraksiyonları için ölçülen peptidaz aktivitesi sonuçları Şekil 4.37’de gösterilmiştir. Peptidaz aktivitesi ölçümü, bir önceki aşamada belirlenmiş olan optimum pH değerinde (pH 7.5) gerçekleştirilmiştir. K1 suşundan (*Bacillus amyloliquefaciens*) elde edilen peptidaz çözeltileri, en iyi aktivite değerini 58-60 °C’de göstermiş, bu sıcaklık dercesinden sonra aktivitede belirgin bir azalma gözlenmiştir. *Bacillus cereus* kullanılarak üretilen metalopeptidaz için optimum sıcaklık değerini D’Costa vd (2013) 37 °C, Sousa vd (2007) 45 °C, Manni vd (2008) 55 °C olarak tespit etmişlerdir. *Bacillus* sp. SCB-3 ile üretilen keratinolitik metalopeptidazın optimum aktivite gösterdiği maksimum sıcaklık değeri ise 40 °C olarak belirlenmiştir (Lee 2002). *Bacillus subtilis* metalopeptidazının

optimum sıcaklık derecesi 55 °C (Lauer vd 2000), *Bacillus polymyxa* B-17'ninki ise 50 °C olarak saptanmıştır. *Bacillus* metalopeptidazları için farklı optimum sıcaklıkların tespit edilmiş olması, aynı türe ait farklı suşların ürettiği metalopeptidazın bile farklı karakterli olabileceğini göstermektedir.

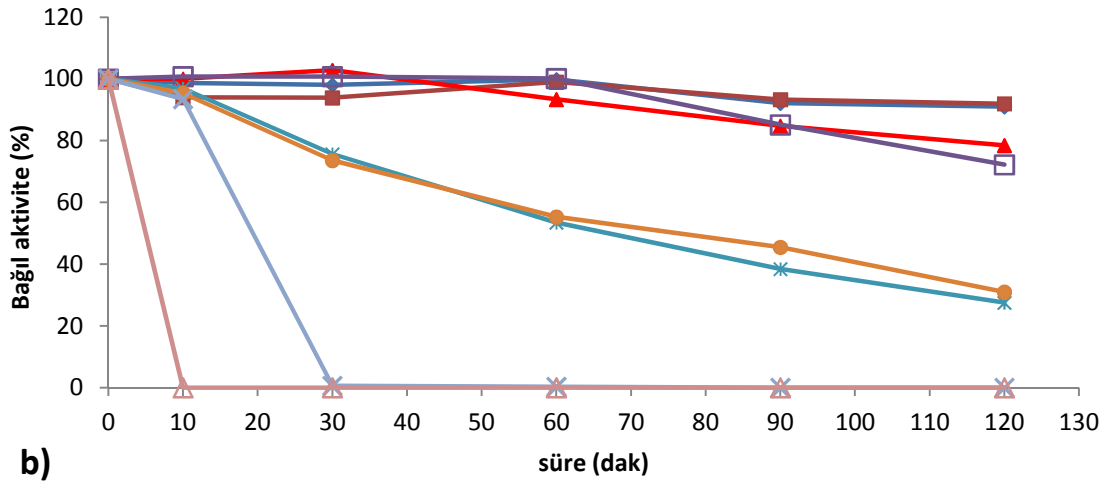


Şekil 4.39. K1 suşu ile üretilen peptidazın farklı sıcaklıklarda gösterdiği aktivite değerleri

Üretilen peptidazın farklı sıcaklık derecelerindeki kararlılıklarını belirlemek için enzim çözeltileri, bu sıcaklık derecelerinde farklı sürelerde inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda aktiviteleri kalan aktivite %'si olarak hesaplanmıştır. Aktivite ölçümü pH 7.5'de ve 37 °C'de yapılmıştır. Farklı sıcaklık derecelerinde inkübasyon öncesinde ham enzim çözeltisi ile 3-8 fraksiyonunun aktivite değerleri sırasıyla 37.05 ünite/ml ve 33.64 ünite/ml'dir. Enzimin sıcaklık kararlılığı sonuçları Şekil 4.40'da gösterilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi hem ham enzim çözeltisi hem de kısmen saflaştırılmış enzim çözeltisi 10 °C ve 20 °C'de 2 saat boyunca aktivitesini neredeyse tamamen korumuştur. Enzim çözeltilerinin kararlılığı 30 °C ve 37 °C'de farklılık arz etmemiştir. Her iki sıcaklık derecesinde 2 saatlik inkübasyon sonunda ham enzim çözeltisinin aktivitesi başlangıçtaki yaklaşık %60'ı kadarken, kısmen saflaştırılmış enzimin aktivitesi ise %75 dolaylarındadır. Ham enzim çözeltisi, 45 °C'de aktivitesini 1 saat sonunda %92 oranında korurken; 50 °C'de aktivitesini yarım saat boyunca tamamen, 1.5 saat sonunda da yaklaşık %50 oranında korumuştur. Kısmi saflaştırılmış enzim ise aktivitesini daha çabuk yitirmeye başlamıştır. Ancak 45 °C ve 50 °C'de 1 saat inkübasyon sonunda başlangıçtaki yaklaşık %55'i kadar aktivitesi vardır. Enzim aktivitesi açısından optimum sıcaklık olarak belirlenen 60 °C'de her iki enzim çözeltisinin de dayanımı iyi değildir. Ham enzim çözeltisi aktivitesini 30 dakika inkübasyon sonunda %23 oranında korurken, aynı sıcaklık ve inkübasyon süresinde 3-8 fraksiyonu aktivitesini tamamen kaybetmiştir. Denenen en yüksek sıcaklık olan 70 °C'de ise her iki enzim çözeltisi de hiç kararlılık gösteremeyip inaktive olmuştur. Genel olarak sıcaklık yükseldikçe enzim çözeltilerinin kararlılığı azalmıştır. Ancak sıcaklık karşısında ham enzim çözeltisinin dayanımının biraz daha fazla olduğu anlaşılmaktadır.



a)



b)

◆ 10 °C ■ 20 °C ▲ 30 °C □ 37 °C * 45 °C ● 50 °C × 60 °C ▲ 70 °C

Şekil 4.40. Farklı sıcaklık derecelerinde K1 suşuna ait a) ham enzim çözeltisi ve b) kısmi saflaştırılmış enzimin kararlılığı

Manni vd (2008) metalopeptidaz için 50 °C'de 1 saat inkübasyon sonunda aktivitenin %60 oranında korunduğunu, Sousa vd (2007) ise aynı sıcaklıkta 2 saat inkübasyon sonunda enzim aktivitesinin %55 oranında olduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışmalarındaki sonuçlar, tez çalışmasındaki sonuçlarla benzerlik arz etmektedir. *Aspergillus fumigatus* metalopeptidazının optimum aktivite gösterdiği sıcaklığın 50 °C olduğu ve bu sıcaklıkta 30 dakika inkübasyon sonunda aktivitesini %40 oranında koruyabildiği saptanmıştır (Silva vd 2013). K1 suşu ile üretilen bakteriyel metalopeptidazın ısıl kararlılığının Silva vd'nin (2013) yaptığı çalışmadaki küf kaynaklı metalopeptidaza göre daha iyi olduğu anlaşılmaktadır.

Üretilen peptidazın optimum aktivite gösterdiği sıcaklık derecesi 60 °C olmasına rağmen, aktivitesini en uzun süre koruyabildiği maksimum sıcaklık 50 °C olarak tespit

edilmiştir. Ham enzim çözeltisinin 50 °C'deki yarı ömrü 86.5 dakika iken, kısmen saflaştırılan enzimin aynı sıcaklıktaki yarı ömrü ise 80.70 dakikadır. Kaplıcadan izole ettikleri *Bacillus stearothermophilus* TSL33 suşu aracılığıyla ürettikleri üç farklı metalopeptidaz için optimum sıcaklığı 70, 85 ve 90 °C olarak belirleyen Sookheo vd (2000), bu üç peptidazın yarı ömürlerini 72, 78 ve 90 °C'de 30 dakika olarak tespit etmişlerdir.

K1 suşunun 30 °C ve 37 °C'de çok iyi geliştiği ancak 50 °C'de gelişemediği daha önce bildirilmişti (Bkz. Bölüm 4.2 ve Çizelge 4.2). Dolayısıyla K1 suşunun mezofilik karakterli olduğundan söz etmek mümkündür. Ancak bu suş yüksek sıcaklıkta gelişip enzim üretilmediği halde, düşük sıcaklıklarda ürettiği peptidazın optimum aktivite gösterdiği sıcaklık 58-60 °C olarak belirlenmiştir. Ayrıca üretilen peptidazın 45° C ve 50 °C'de belli bir ölçüye kadar ısı kararlılığının olduğu da tespit edilmiştir. Nitekim, literatürde benzer şekilde, mezofilik bir suş olan *Bacillus thuringiensis*'den üretilen serin peptidazının termostabil olduğu bildirilmektedir (Zamost vd 1991).

4.6.3. Peptidaz aktivitesi üzerine inhibitörlerin etkisi

Peptidaz inhibitörlerinin K1 suşunun peptidaz aktivitesi üzerine olan etkisi daha önce farklı aşamalarda belirlenmişti. Bu aşamada karakterizasyon çalışmalarında kullanılmasına karar verilen, 3-8 fraksiyonu olan kısmi saflaştırılmış enzim çözeltisinde farklı konsantrasyonlardaki inhibitörlerin etkisini görmek amaçlanmıştır. Ayrıca karşılaştırma sağlamak için analiz, ham enzim çözeltisinde de tekrarlanmıştır. Aktivite analizleri enzim için tespit edilen optimum pH (7.5) ve sıcaklıkta (60 °C) gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.22'de farklı inhibitör konsantrasyonlarında peptidaz aktivitesinin değişimi inhibitör içermeyen enzim çözeltisine göre bağıl olarak verilmiştir. Çizelge incelendiğinde metalopeptidaz inhibitörü olarak kullanılan O-FEN ve EDTA varlığında ham enzim çözeltisinin aktivitesinin büyük oranda azaldığı, kısmen saflaştırılan enzimin ise inhibe olduğu anlaşılmaktadır. Her iki enzim çözeltisi için de aktivite azalışı O-FEN konsantrasyonuna bağıl olarak gerçekleşmiş, konsantrasyon arttıkça aktivite daha fazla azalmıştır. Daha yüksek konsantrasyondaki O-FEN (>4 mM) ile aktivitenin tamamen inhibe olabileceği düşünülmektedir. EDTA kullanıldığında ise en düşük konsantrasyon bile 3-8 fraksiyonunun aktivitesini tamamen inhibe ederken, ham enzim çözeltisindeki aktivite azalışı EDTA konsantrasyonundan bağımsız olarak gerçekleşmiştir. Muhtemelen EDTA varlığında en düşük dozda bile ham enzim çözeltisindeki tüm metalopeptidazlar inhibe olmuş, bu nedenle de inhibitör konsantrasyonundaki artış, aktiviteyi daha fazla azaltmamıştır. Geriye kalan yaklaşık %12'lik aktivite de muhtemelen başka bir tür peptidazdan kaynaklanmaktadır.

EDTA ve O-FEN metalleri çelatlayarak peptidaz aktivitesini geri dönüşümlü olarak inhibe etmektedir. Her ikisi de metalopeptidaz inhibitörü olarak kullanılmaktadır. Ancak EDTA'nın sadece metalopeptidaza spesifik olmadığını, kalsiyum ile aktive ya da stabilize olan (serin peptidaz gibi) peptidazları da inhibe edebileceğinin göz önünde bulundurulması gerekmektedir. O-FEN'nin ise kalsiyumu çelatlayamadığı ve özellikle çinko içeren metalopeptidazların tanımlanması için uygun bir inhibitör olduğu bildirilmektedir. Ancak yine de yeni metalopeptidazlar tanımlanırken, bunların EDTA

ve O-FEN ile inhibe olmalarının yanı sıra diğer grup peptidazların inhibitörlerine karşı duyarsız olduklarının da belirlenmesi gerekmektedir (Dunn 2001, Salvase ve Nagase 2001). Çizelge 4.22 bu bağlamda incelendiğinde enzim çözeltilerinin baskın olarak metalopeptidazdan oluştuğu ancak diğer peptidazları da içerdiği anlaşılmaktadır. Çünkü diğer peptidaz inhibitörleri kullanıldığında da aktivite tamamen korunmayıp azalış göstermiştir. Diğer peptidazların aktivitesindeki azalış, inhibitör konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak gerçekleşmemiştir. Bu durumun, diğer peptidazların miktarca düşük olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. EDTA ve O-FEN varlığında kısmen saflaştırılan enzimin ham enzim çözeltisine göre daha fazla inaktive olması, saflaştırma ile diğer peptidazlar açısından bir azalma sağlandığını ve metalopeptidazın daha baskın hale geldiğini göstermektedir. Ayrıca kısmen saflaştırılan enzimin O-FEN varlığında aktivitesinin %1'e kadar düşmesi, metalopeptidazın aktif bölgesinde çinko içerebileceğini göstermektedir.

Çizelge 4.22. Farklı konsantrasyonlardaki peptidaz inhibitörlerinin K1 suşunun enzim aktivitesi üzerine etkisi

Inhibitörler	Ham enzim çözeltisi	Kısmi saflaştırılmış enzim (3-8 fraksiyonu)
<u>PEP-A</u>		
5 µM	91.28	88.92
10 µM	88.33	81.53
20 µM	89.97	85.01
<u>E-64</u>		
10 µM	90.41	88.48
20 µM	89.10	75.45
40 µM	95.42	77.62
<u>PMSF</u>		
1 mM	76.01	88.27
2 mM	79.39	74.58
4 mM	86.15	87.40
<u>O-FEN</u>		
1 mM	38.21	33.38
2 mM	26.51	8.12
4 mM	17.16	1.93
<u>EDTA</u>		
1 mM	12.04	0.00
2 mM	12.22	0.00
4 mM	13.41	0.00

Inhibitör içermeyen ham enzim çözeltisinin aktivitesi 81.23 ünite/ml, kısmi saflaştırılmış enzimin aktivitesi 40.76 ünite/ml'dir.

Manni vd (2008) 20 mM EDTA varlığında ürettikleri peptidazın tamamen inhibe olmasına bağlı olarak enzimin metalopeptidaz olduğunu belirtmişlerdir. Ancak artan PMSF konsantrasyonu ile birlikte de aktivitenin azalmasını, enzimin aktif bölgesi yakınlarında serin grubu içermesine bağlamışlardır. Sabirova vd (2010) kalan aktivite %'sini 10 mM EDTA ve O-FEN varlığında sırasıyla %3.9 ve %0.1 olarak tespit etmişlerdir. Söz konusu çalışmada, EDTA ve O-FEN'in etkisi Çizelge 4.22'dekine göre

ters yönde olmuştur. Sookkheo vd (2000) ise saflaştırdıkları enzimin metalopeptidaz olduğunu 1 mM ve 10 mM EDTA ile O-FEN kullanarak tespit etmişlerdir.

4.6.4. Peptidaz aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi

Farklı metal iyonlarının peptidaz aktivitesi üzerine olan etkisi Çizelge 4.23'de gösterilmiştir. Çizelgede metal iyonu içermeyen kontrol enzim örneğine göre bağlı olarak hesaplanan değerler verilmiştir, aktivite ölçümleri optimum sıcaklık ve pH değerinde yapılmıştır. Çizelgeden görüldüğü üzere Hg^{+2} enzim aktivitesini tamamen inhibe etmiştir. Nitekim iz miktardaki ağır metallerin bile birçok peptidazı inaktive ettiği, Hg^{+2} 'nin bir metalopeptidaz olan termolisini için inhibitör olduğu bildirilmektedir (Bankus ve Bond 2001). Ağır metaller disüfit bağlarını etkileyerek proteinin tersiyer yapısının bozulmasına ve buna bağlı olarak da enzimin aktif bölgesinin değişmesine neden olmaktadır. Ağır metaller ayrıca metal iyonu bağlı olan proteinlerde mevcut metal iyonu ile yer değiştirerek de inhibisyon sağlayabilmektedir. Ağır metallerin inhibisyon mekanizmalarından bir diğeri ise amino asit yan zincirlerindeki oksidasyon reaksiyonunu katalizlemeleridir (Tamás vd 2014). Çizelge incelendiğinde Cu^{+2} , Ni^{+2} ve Fe^{+2} 'nin de aktivitede büyük oranda azalmaya neden olan metal iyonları olduğu anlaşılmaktadır. Kısmi saflaştırılan enzimin aktivitesi 5 mM Fe^{+3} varlığında neredeyse tamamen inaktive olmuştur. Metalokarboksiptidazlar için Fe^{+3} 'ün inhibitör olduğu bildirilmektedir (Bankus ve Bond 2001). Bu durum, özellikle kısmi saflaştırılan enzim çözeltisinin metalopeptidazca daha zengin olduğu fikrini destekler niteliktedir.

Enzim çözeltileri Ba^{+2} ile karıştırıldığında bulanıklık gözlenmiş, inkübasyonla birlikte bulanıklık da artmıştır. Aktivite açısından sağlıklı sonuçlar elde edilemediğinden bu metal iyonuna ait değerler Çizelge 4.23'de gösterilmemiştir. Bunun yanı sıra bazı metal iyonlarının enzim çözeltisi ile karıştırıldığı zamanki konsantrasyonu 5 mM'a çıktığında çökme olduğu tespit edilmiş ve bunlar çizelgede belirtilmiştir.

Bazı çalışmalarda, Ca^{+2} iyonu varlığında metalopeptidaz aktivitesinde %7 (D'Costa vd 2013), %17 (Sousa vd 2007) ve %94 (Manni vd 2008) ve hatta %200 oranında (Manni vd 2010) artış olduğu tespit edilmiş, Ca^{+2} iyonunun enzimin moleküler yapısını stabilize ederek, konformasyonel yapısının değişmesini engellediği bildirilmiştir. Kalsiyum iyonunun en iyi karakterize edilmiş metalopeptidaz olan termolisini stabilize ederek otolize karşı koruduğu da bildirilmektedir (Wu ve Chen 2011). Ancak bu tez çalışmasında kalsiyumun etkisi tam tersi yönde gerçekleşerek aktivitede bir miktar azalmaya neden olmuştur. Ayrıca kalsiyum konsantrasyonu arttığında çökme gözlemlendiği Çizelge 4.23'ten anlaşılmaktadır.

Peptidaz aktivitesi üzerine en olumlu etkiyi yapan metal iyonları Mn^{+2} ve K^{+1} 'dir. Kısmen saflaştırılan enzim çözeltisinin aktivitesinde Mn^{+2} iyonunun yaklaşık %8, K^{+1} iyonunun ise %4'lük bir artış sağladığı belirlenmiştir. Sousa vd (2007) metalopeptidaz aktivitesinde Mn^{+2} iyonunun yaklaşık %5'lik artış sağladığını, Manni vd (2008) ise %17'lik azalmaya neden olduğunu tespit etmişlerdir.

O-FEN, özellikle çinko bağlı metalopeptidazları inaktive eden bir inhibitör olduğundan K1 suşu ile üretilen enzim çözeltisindeki metalopeptidaz aktif bölgesinde kuvvetle muhtemel çinko içermektedir. Ancak Çizelge 4.23'deki sonuçlara göre enzim

çözeltilerine ilave çinkonun olumlu bir etkisinin olmadığı anlaşılmaktadır. Sookkheo vd (2000) *Bacillus stearothermophilus*'dan elde ettikleri oldukça yüksek termostabilitesi olan üç metalopeptidaz üzerine metal iyonu etkisini belirlemede farklı bir yöntem uygulayıp önce enzimi apoenzim haline getirmiş yani mevcut metali ayırmışlardır. Daha sonra farklı metal iyonları ilave ettiklerinde sadece Zn^{+2} varlığında aktivitenin önemli düzeyde arttığını tespit etmişlerdir.

Sodyum iyonu da kısmen saflaştırılan enzim çözeltisinin aktivitesinde belirgin bir değişime neden olmadığı halde, 5 mM konsantrasyonda kullanıldığında ham enzim çözeltisinin aktivitesinde %12.63'lük bir artış sağlamıştır.

Çizelge 4.23. Metal iyonlarının K1 suşunun peptidaz aktivitesi üzerine etkisi (%)

Metal iyonları	Ham enzim çözeltisi			Kısmi saflaştırılmış enzim (3-8 fraksiyonu)		
	0.5 mM	2 mM	5 mM	0.5 mM	2 mM	5 mM
Ca^{+2}	81.48	86.39	*	87.63	93.00	87.36
Co^{+2}	71.71	73.72	*	96.22	80.02	81.53
Cu^{+2}	77.37	44.13	45.27	58.95	56.61	41.75
Fe^{+2}	80.28	69.31	*	72.69	25.96	53.96
Fe^{+3}	70.51	72.57	*	81.45	19.55	0.19
Mg^{+2}	87.66	95.16	93.46	96.57	86.22	93.46
Hg^{+2}	4.32	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Mn^{+2}	86.28	92.91	*	92.96	104.26	107.78
Zn^{+2}	68.79	80.85	*	90.90	91.01	80.69
Ni^{+2}	81.83	29.10	22.81	65.65	28.88	14.30
K^{+1}	112.18	92.54	95.37	102.92	100.34	104.42
Na^{+1}	89.71	94.73	112.63	94.85	96.09	98.10

* Enzim çözeltisi ile karıştırıldığı zaman (özellikle inkübasyon sonrasında) çökme gözlenmiştir.

4.6.5. Peptidaz aktivitesi üzerine bazı organik çözücü, deterjan katkı maddeleri ve yüzey aktif maddelerin etkisi

Enzimler genellikle organik çözücüler varlığında inaktive ya da denatüre olmaktadır. Fakat enzimin organik çözücülere dayanıklı olması onların sentez reaksiyonlarında kullanılmasını mümkün kılar. Peptidazlar sulu ortamda peptid bağlarını hidrolize ederken, susuz ya da az sulu ortamlarda peptid bağını sentezler. Dolayısıyla organik çözücülere dayanıklı peptidazlardan gıda, ilaç, kozmetik gibi birçok endüstriyel alanda yararlanılabilmektedir (Gupta 1992, Rahman vd 2007). Deterjan endüstrisinde kullanılacak peptidazların da deterjan katkı maddelerine dirençli olması gerekmektedir (Kumar ve Takagi 1999).

Çizelge 4.24. Bazı organik çözücü, deterjan katkı maddeleri ve yüzey aktif maddelerin K1 suşunun enzim aktivitesi üzerine etkisi

Madde grubu	Madde	Konsantrasyon (%)	Ham enzim çözeltisi	Kısmi saflaştırılmış enzim
Organik çözücü	Ksilen	1	86.25	88.91
		5	100.94	97.88
		20	102.81	106.96
	Aseton	1	110.62	92.92
		5	94.27	93.04
		20	103.02	93.15
	Etanol	1	95.73	86.78
		5	111.46	87.13
		20	113.96	85.72
	Asetonitril	1	122.60	114.28
		5	126.66	105.31
		20	62.09	84.30
Deterjan katkı maddesi	SDS	0.1	14.86	0.03
		0.5	6.86	0.00
		1.0	5.64	0.00
	Triton X-100	0.1	108.55	82.31
		0.5	84.98	67.07
		1.0	81.66	75.74
Yüzey aktif madde	Tween 20	0.1	98.19	79.28
		0.5	116.63	92.00
		1.0	125.00	100.67
	Tween 80	0.1	122.62	97.56
		0.5	127.85	106.74
		1.0	129.08	104.89

K1 suşu ile elde edilen peptidaz çözeltilerinin bazı organik çözücü ve deterjan katkı maddeleri varlığında aktivitesindeki değişim tespit edilmiş ve sonuçlar Çizelge 4.24'de gösterilmiştir. Çizelgede bu maddeleri içermeyen kontrol örneğinin aktivite değerine göre bağıl olarak hesaplanan kalan aktivite %'leri verilmiştir. Sonuçlar, enzim çözeltilerinin organik çözücülere karşı dirençli olduğunu, bu maddeler varlığında aktivitelerinde önemli bir kayıp meydana gelmediğini göstermektedir. Hatta ham enzim çözeltisi için denenen tüm organik çözücüler aktivitede artış sağlamıştır. Ksilen ve etanol yüksek, aseton ve asetonitril ise düşük konsantrasyonda kullanıldığı

zaman aktiviteyi artırma açısından daha etkili olmuşlardır. Kısmi olarak saflaştırılan enzim çözeltisinin aktivitesi ise sadece ksilen ve asetonitril varlığında artış göstermiştir.

Kazamino asit gibi hidrolize proteinlerin enzimatik prosesle üretiminde eğer optimum sıcaklığı 40-50 °C olan peptidazlar kullanılıyorsa, mikrobiyal bulaşmayı engellemek için ortama etanol ya da toluen gibi maddelerin ilave edilmesi gerekmektedir (Zamost vd 1991). Ancak ilave edilen maddeler de enzimin aktivitesini olumsuz etkilememelidir. K1 suşunun ürettiği peptidazın etanol varlığında aktivitesini büyük oranda koruyabilmesi bu açıdan avantaj sağlamaktadır.

Çizelge 4.24'e göre kısmen saflaştırılan enzim çözeltisinin aktivitesi, %1 asetonitril varlığında %14 artış göstermiştir. Sousa vd (2007) ise aynı inkübasyon sıcaklığı ve süresinde, aynı oranda asetonitril kullandıklarında peptidaz aktivitesinde %3'lük bir artış olduğunu, asetonitril konsantrasyonu arttıkça da bu tez çalışmasındaki ile benzer şekilde aktivitenin düştüğünü tespit etmişlerdir. Etanol ve aseton varlığında kısmi olarak saflaştırılan enzim çözeltisinin aktivitesi azalmıştır. Fakat 37 °C'de 30 dakikalık inkübasyon sonunda aktivitenin %85'den fazla korunması iyi bir sonuç olarak değerlendirilebilir. Wang vd'nin (2006) *Bacillus* sp. TKU004'dan elde ettikleri metalopeptidaz etanol ve aseton dahil bazı organik solventlere karşı daha dayanıklıdır. Nitekim 4 ve 25 °C'de 10 gün inkübasyon sonunda aktivitenin yaklaşık %65 oranında korunduğunu tespit etmişlerdir. Ancak aktivitedeki yüksek tolerans, organik solventlerin etkisini ham enzim çözeltisi üzerinde test etmelerinden kaynaklanabilir. Doddapaneni vd (2009) de *Bacillus cereus* metalopeptidazını benzen, toluen, aseton, ksilen ve izopropanol ile 60 °C'de 4 saat inkübe etmiş ve aktivitenin %80 oranında korunduğunu belirlemişlerdir.

Çizelge 4.24 deterjan katkı maddeleri açısından incelendiğinde, ham enzim çözeltisinin bu maddelere karşı direncinin kısmen saflaştırılan ürüne göre daha fazla olduğu görülmektedir. Sonuçlar SDS'e karşı her iki enzim çözeltisinin de dayanıklı olmadığını göstermektedir. SDS ile inkübasyon sonucunda ham enzim çözeltisinin aktivitesi SDS konsantrasyonuna bağlı olarak %5'e kadar düşerken, kısmen saflaştırılan peptidaz çözeltisi tamamen inaktive olmuştur. Triton X-100 varlığında, inkübasyon sonunda, peptidaz çözeltilerinde aktivite yaklaşık %80 oranında korunmuştur. Triton X-100'ün konsantrasyonu %0.1 iken ham enzim çözeltisinin aktivitesinde %8 artış gözlenmiş, fakat konsantrasyonun artmasıyla birlikte aktivite azalmıştır. Çizelgede Tween 20 ve Tween 80'in enzim aktivitesini olumlu yönde etkilediği görülmektedir. Tween 20 ve Tween 80 %1 oranında kullanıldığında ham enzim çözeltisinin aktivitesi kontrol örneğine oranla, sırasıyla, %25 ve %29 artmıştır. Kısmi olarak saflaştırılan enzim çözeltisinin ise %0.1 Tween 20 varlığında aktivitesi %79'a düşmüş, fakat konsantrasyon artışıyla birlikte aktivitede stabilizasyon sağlanmıştır. Tween 80 ilavesi de aktivitenin korunmasını, hatta %6 oranında artmasını sağlamıştır. Aynı inkübasyon sıcaklık ve süresini (37 °C'de 30 dak.) kullanan Sousa vd (2007) de *Bacillus cereus* metalopeptidazı için SDS ve Triton X-100 ile benzer sonuçlar elde etmişlerdir. SDS ile enzimin inhibe olduğunu ancak Triton X-100 varlığında, konsantrasyona da bağlı olarak aktivitenin büyük oranda korunduğunu tespit etmişlerdir. Manni vd'nin (2010) *Bacillus cereus* SV1'den elde ettikleri metalopeptidaz ise aktivitesini %0.1 SDS varlığında %90, %1 SDS varlığında ise %35 oranında korumuştur. Araştırmacılar, hem %1 hem de %5 oranında Triton X-100 ve Tween 80 ile aktivitenin tamamen korunduğunu, Tween 20

ile de aktivitede %23 artış olduğunu tespit etmişlerdir. Bu maddelerin etkilerini ham enzim çözeltisi üzerinde test etmiş, aktivite ölçümünden önce 40 °C'de 1 saat inkübasyon yapmışlardır. Dolayısıyla ham enzim çözeltisi açısından karşılaştırıldığında, bu araştırmacıların elde ettiği peptidazın, SDS dışındaki diğer deterjan katkı maddelerine karşı direncinin, bu tez çalışmasında elde edilen enzim çözeltisindeki peptidazdan daha fazla olduğu söylenebilir. Doddapaneni vd (2009) ise *Bacillus cereus*'dan elde ettikleri metalopeptidazın deterjan katkı maddelerine karşı oldukça toleranslı olduğunu tespit etmişlerdir. Peptidazı %0.1 ve %0.5 oranındaki SDS, Triton X-100 ve Tween 80 ile 60 °C'de 1 saat inkübe etmiş ve inkübasyon sonunda aktivitenin SDS varlığında tamamen korunduğunu, %0.5 Triton X-100 ve Tween 80 varlığında ise sırasıyla %120 ve %60 oranında arttığını belirlemişlerdir.

5. SONUÇ

Bu çalışmada, öncelikle, daha önceki bir çalışmada (Erem 2007) sünme (rope) hastalığı oluşmuş ekmek içinden izole edilmiş olan 39 adet *Bacillus* suşu hemolitik (Hbl) ve hemolitik olmayan (Nhe) enterotoksin üretimi açısından incelenmiştir. Bu 39 adet suştan sadece bir tanesinin hem Hbl hem de Nhe enterotoksinlerini, 22 tanesinin sadece Hbl, 2 tanesinin de sadece Nhe enterotoksinini üretebilme kapasitesinde oldukları, geriye kalan 14 suşun ise her iki enterotoksini de üretmedikleri tespit edilmiştir. Enterotoksin analizleri için pozitif kontrol suşu olarak her iki enterotoksini de ürettiği bilinen *Bacillus cereus* 2248 kullanılmıştır. Toksin analizleri, standart suşlar olan *Bacillus subtilis* PY22, *B. subtilis* RSK 244 ve *B. subtilis* RSK 246 için de yapılmış, aralarından sadece *B. subtilis* RSK 246'nın Nhe enterotoksinini ürettiği belirlenmiştir. Ayrıca emetik toksin ürettiği bilinen *Bacillus cereus* 2455/2 suşu da Nhe enterotoksini açısından pozitif sonuç vermiştir.

Daha sonra her iki enterotoksini de üretmediği tespit edilen 14 *Bacillus* suşu ile *B. subtilis* PY22 ve *B. subtilis* RSK 244, hücre dışı peptidaz üretimi açısından değerlendirilmiştir. Farklı sıcaklık derecelerinde (30 °C, 37 °C, 50 °C ve 55 °C) 72 saat süresince çalkalamalı inkübatörde yapılan fermentasyonlarda 24 saatte bir OD ve peptidaz aktiviteleri ölçülmüştür. Sonuçlar 50 °C ve 55 °C'de bakterilerin çok az geliştiğini ancak enzim üretmediklerini göstermiştir. Farklı sıcaklıklarda en yüksek peptidaz aktivitesi sergileyen suşların K1 ve K10 olduğu belirlenmiştir. K1 suşu için 30 °C'de fermentasyon sonucu 82.64 ünite/ml, K10 suşu için 37 °C'de fermentasyon sonucu 50.24 ünite/ml peptidaz aktivitesi değerlerine ulaşılmıştır. Ayrıca birim OD için peptidaz aktivitesi değeri hesaplandığında, N8 suşunun 41.25 ünite/ml/OD ile en yüksek değeri verdiği bulunmuştur. Aktivite analizleri sonucunda farklı sıcaklıklarda en yüksek peptidaz aktivitesine sahip K1 ve K10 suşları ile birim OD başına en yüksek aktiviteyi sağlayan N8 suşu daha sonraki analizlerde kullanılmak üzere seçilmiştir. REFGEN tarafından 16S mikrobiyal tanımlama yöntemiyle yapılan analiz sonucunda K1 ve K10 suşlarının, *Bacillus amyloliquefaciens*, N8 suşunun ise *Bacillus subtilis* olduğu belirlenmiştir.

K1, K10 ve N8 suşlarının peptidaz üretimini optimize etmek için bir kerede bir faktör yaklaşımı kullanılarak öncelikle besiyerine ilave edilecek karbon ve azot kaynaklarının belirlenmesi sağlanmıştır. Bu işlem yapılırken maliyet unsuru da göz önünde bulundurulmuş, aktivite açısından istatistiksel olarak aynı etkiyi gösteren kaynaklar arasından birim fiyatı en düşük olan kaynak, üretimde kullanılmak üzere seçilmiştir. Bu bağlamda K1, K10 ve N8 suşları ile peptidaz üretimi için en uygun karbon kaynağı glukoz, azot kaynağı ise maya ekstraktı olarak belirlenmiştir. Daha sonra enzim aktivitesini artırması açısından çalkalama hızının 250 rpm, karbon/azot kaynağı oranının da 1:5 olması gerektiği saptanmıştır. K10 ve N8 suşlarının peptidaz aktivitesinin sürekli olarak K1 suşuna göre çok düşük kalmasından dolayı çalışmanın geri kalan kısmına sadece K1 suşu kullanılarak devam edilmiştir.

Yanıt yüzey yöntemi ile fermentasyon sıcaklığı, besiyeri başlangıç pH'sı ve inokülasyon oranı açısından K1 suşunun peptidaz üretimi optimize edilirken her bir fermentasyonun bitiş noktası (süresi) suşun maksimum OD değerine ulaştığı süre olarak belirlenmiştir. Çünkü maksimum OD değerinden sonra OD'nin hızla düştüğü tespit

edilmiş ve gram boyama sonucunda da hücre parçalanmasının (lysis) olduğu gözlenmiştir. Bu durumda maksimum OD değerinden sonra ortama hücre içi peptidazların da salgılandığı düşünülmektedir. Yanıt yüzey yöntemi ile optimizasyon sırasında peptidaz üretimi için uygun bir model elde edilememiştir. Ancak yine de mevcut koşullar altında, Minitab programı ile optimum koşullar (sıcaklık 33.4 °C, besiyeri başlangıç pH'sı 6.62, inokülasyon oranı %2.3) belirlenmiştir. Program tarafından belirlenen optimum koşullarda fermantasyon 7 saat sürmüş ve peptidaz aktivitesi 49.17 ünite/ml olarak ölçülmüştür. Fermantasyon süresi kısa olmasına rağmen, literatürde *Bacillus* ile peptidaz üretiminin yapıldığı diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında oldukça iyi olarak nitelendirilebilecek bir aktivite değerine ulaşılmıştır.

Tespit edilen optimum koşullarda üretilen enzimin saflaştırılması, ham enzim çözeltisinin 10 kDa ayırma sınırlı ultrafiltrasyon tüpleri ile konsantre edilmesinin ardından afinite kromatografisi yöntemi ile yapılmıştır. Saflaştırmanın etkinliği SDS-PAGE analizi ile test edilmiş ancak iyi bir saflaştırmanın göstergesi olan tek protein bandı elde edilememiştir. Saflaştırma kısmi olarak gerçekleştirilebilmiş; verim %25.84, saflaştırma katsayısı ise 1.53 olarak belirlenmiştir. Zimogram analizinde de farklı molekül ağırlığında aktivite bantları gözlenmiştir. Bu durumda enzim çözeltisinin farklı türde peptidazları içermesi de mümkün görünmektedir. Ancak zimografi ve SDS-PAGE analizlerinin karşılıklı olarak değerlendirilmesi sonucu enzim çözeltisindeki baskın peptidazın molekül ağırlığının 36 kDa civarında olduğu sonucuna varılmıştır.

Kısmen saflaştırılan peptidaz çözeltisi için optimum pH değeri 7.5 olarak belirlenmiş ve nötral koşullarda (pH 7.0-8.5) enzimin aktivitesini 37 °C'de 2 saat inkübasyon süresince %90'dan fazla koruyabildiği saptanmıştır. Aynı koşullarda 18 saat inkübasyon yapıldığında ise enzimin aktivitesini en iyi koruyabildiği (yaklaşık %60) pH değerinin 8.0 olduğu belirlenmiştir. Alkali ve asidik koşullarda enzimin hem aktivitesi hem de kararlılığı oldukça düşüktür.

Kısmen saflaştırılan enzim çözeltisinin optimum aktiviteyi 60 °C'de gösterdiği ancak bu sıcaklıktaki kararlılığının düşük olduğu belirlenmiştir. Bu enzim çözeltisinin 60 °C'de 30 dakika inkübasyon sonunda aktivitesini tamamen kaybettiği tespit edilmiştir. Enzim çözeltisi 50 °C'de inkübe edildiğinde ise aktivitesini 1 saat sonunda yaklaşık %60, 2 saat sonunda ise yaklaşık %40 oranında koruyabilmiştir. K1 suşu mezofilik karakterli olduğu halde ürettiği peptidazın yüksek sıcaklıklarda da aktivite gösterebilmesi, üretilen peptidazın yüksek sıcaklık gerektiren çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanılmasına olanak tanımaktadır.

Farklı peptidaz inhibitörleri ile yapılan analizlerle kısmen saflaştırılan peptidazın O-FEN ve EDTA varlığında aktivitesini kaybettiği belirlenmiş ve kısmen saflaştırılan enzim çözeltisinin metalopeptidaz içerdiği sonucuna varılmıştır. Ancak diğer inhibitörler varlığında da aktivitede çok az bir miktar kayıp olması nedeniyle baskın enzim metalopeptidaz olmak üzere, farklı peptidaz türlerini içeren bir peptidaz karışımı elde edildiğinden söz etmek mümkündür.

Farklı metal iyonları varlığında 37 °C'de 30 dakika inkübasyon sonunda peptidaz aktivitesinin ne şekilde değiştiği incelendiğinde, 5 mM K⁺ ve Mn²⁺ iyonu

varlığında, kısmen saflaştırılan enzim çözeltisinin peptidaz aktivitesinin sırasıyla yaklaşık %4 ve %8 oranında arttığı tespit edilmiştir. Yine 5 mM Mg⁺² ve Na⁺¹ varlığında ise aktivitenin %93 ve %98 oranında korunduğu, peptidazların bu metal iyonlarından olumsuz etkilenmediği saptanmıştır. Kısmen saflaştırılan peptidazlar için Hg⁺² tam anlamıyla inhibitör görevi görüp enzimi inaktive ederken, Fe⁺³'ün inhibisyon gücü konsantrasyonuna bağlı olarak artmış, 5 mM konsantrasyonda tam bir inaktivasyon sağlamıştır. Cu⁺², Fe⁺² ve Ni⁺² iyonları da konsantrasyonlarıyla bağlantılı olarak aktivitede azalmaya neden olmuşlardır. Co⁺² ve Zn⁺² varlığında da aktivitede yaklaşık %20 kayıp gözlenmiştir. Birçok peptidazın aktivitesinde artış sağladığı bilinen Ca⁺² iyonu ise konsantrasyonuna bağlı olarak aktivitede %7-13 oranında kayba neden olmuştur.

Kısmen saflaştırılan enzim çözeltisindeki peptidazların 37 °C'de 30 dakika inkübasyon sonunda deterjan katkı maddelerinden olan SDS ile tamamen inaktive olduğu, %0.1 Triton X-100 ile ise aktivitesini %82 oranında koruyabildiği belirlenmiştir. Yüzey aktif maddeler olan Tween 20, %1 oranında kullanıldığında aktiviteyi tamamen korumuş ancak daha düşük konsantrasyonlarda aktivitede bir miktar azalmaya neden olmuştur. Tween 80 ise %0.5 oranında kullanıldığında aktiviteyi %6 artırmıştır. Aktivite üzerine organik çözücülerin etkisi de aynı şekilde 37 °C'de 30 dakika inkübasyon sonunda test edilmiş, peptidaz aktivitesini %20 ksilenin %6 oranında, %1 asetonitrilin ise %14 oranında artırdığı belirlenmiştir. Etanol ve aseton varlığında ise aktivite büyük ölçüde (yaklaşık %75-80) korunmuştur. Üretilen enzim çözeltisinin organik çözücüler varlığında aktivitesini koruyabilmesinin, enzimin özellikle sentez reaksiyonlarında kullanılabilmesine olanak tanıyabileceği düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında farklı karbon ve azot kaynaklarının K1, K10 ve N8 suşlarının peptidaz aktivitesi üzerine olan etkileri araştırılırken, hücre kültürü çalışmaları için uygun olan, >%98 saflıktaki kaynaklar kullanılmıştır. Ancak ticari olarak satılan glukoz şurubu, fruktoz şurubu, melas, nişasta veya çeşitli gıda atıkları gibi daha ucuz kaynakların da değerlendirilmesi, ticari enzim üretimi açısından faydalı olabilecektir. Ayrıca peptidaz aktivitesi açısından en uygun karbon kaynağı seçilirken amilaz üretimini teşvik etmemek, sadece peptidaz üretimini sağlayabilmek adına kaynak olarak nişasta tercih edilmemiştir. Ancak özellikle deterjan sanayinde hem amilaz hem de peptidaz kullanıldığı göz önünde bulundurulursa, deterjan sanayinde kullanmak üzere saf bir peptidaz çözeltisi yerine amilaz ve peptidazdandan oluşan karışımın kullanılması avantaj sağlayabilecektir. Bu nedenle ileride yapılacak çalışmalarda nişastanın da kaynak olarak kullanılarak, hem amilaz hem de peptidaz aktivitesi ölçümleri ile deterjan sanayi için uygun bir karışımın elde edilip edilemeyeceği değerlendirilebilir.

K1 suşunun yüksek hücre yoğunluğuna ulaştıktan sonra aniden parçalanmasına neden olan koşulların ortadan kaldırılıp durağan fazın uzatılmasına yönelik çalışmalar yapılabilirse, K1 suşu ile daha yüksek aktiviteye sahip hücre dışı peptidaz eldesinin mümkün olabileceği düşünülmektedir. Son 10 yıl içinde *Bacillus subtilis* ile yapılan bazı çalışmalar, bu bakterilerin iki tip hücre (sporlaşabilen ve sporlaşamayan) oluşturabildiğini göstermiştir. Özellikle ortamda besin eksikliği durumunda, sporlaşabilen hücrelerin ölüm faktörü adı verilen bir madde salgılayarak kendi kardeş

hücrelerini parçaladığı ve açığa çıkan maddeleri de kendisi için besin olarak kullanarak spor fazına geçmeyi engelleyebildikleri ifade edilmektedir. K1 suşu da, gelişimi esnasında yüksek hücre yoğunluklarına ulaştığından ortamdaki besini çok kısa sürede tüketmektedir. Ortamda besinin tükenmesi, sporlaşma döngüsünün başlaması için en önemli faktör olduğundan K1 suşu da bu döngüyü geciktirmek için alternatif yollar aramakta ve muhtemelen de bu amaçla kendi kardeş hücrelerini parçalayarak kendisine besin oluşturmaktadır. Dolayısıyla suşun ani ölümüne de ortamdaki besin miktarının azlığının sebep olabileceği düşünüldüğünden sürekli besleme yöntemi (fermentör ortamı) uygulanarak hücrelerin aç kalmasının önlenmesi sağlanırsa, hücre ölümünün de engellenebileceği düşünülmektedir.

Saflaştırma işleminde daha büyük hacimli kolon kullanımı denenerek ölçek büyütme sağlanabilirse, toplam protein miktarı artacağından özellikle kolona bağlanan peptidazlar için de spesifik aktivite hesabı yapılabilecek ve bu fraksiyonlar daha yüksek hacimde elde edilebileceğinden bunların da karakterize edilmesi sağlanabilecektir. Ayrıca daha etkin bir saflaştırma işlemi ile tek tip peptidaz üretiminin sağlanabilmesi durumunda, enzim için daha net endüstriyel kullanım alanı belirlemek mümkün olabilecektir.

6. KAYNAKLAR

- ABDULRAHMAN, A.S.M. and YASSER, M.S. 2004. Production and some properties of protease produced by *Bacillus licheniformis* isolated from Tihamet Aseer, Suudi Arabia. *Pak. J. Biol. Sci.*, 7 (9): 1631-1635.
- ABUSHAM, R.A., RAHMAN, R.N.Z.R.A., SALLEH, A.B and BASRI, M. 2009. Optimization of physical factors affecting the production of thermo-stable organic solvent-tolerant protease from a newly isolated halo tolerant *Bacillus subtilis* strain Rand. *Microb Cell Fact*, 8:20.
- ADRIO, J.L. and DEMAİN, A.L. 2005. Microbial cells and enzymes: a century of progress. In: J. L. Barredo (Editor), *Microbial Enzymes and Biotransformations*, Humana Press, pp 1-28. Totowa, New Jersey.
- AEHLE, W. 2004. *Enzymes in Industry-Production and Applications*. Wiley-VCH, Weinheim, 484 p.
- AGATA, N., OHTA, M., ARAKAWA, Y., and MORI, M. 1995. The bceT gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxic protein. *Microbiology*, 141: 938-988.
- AHMED, I., IRDAN, M., NADEEM, M. ZIA, M.A., AHMAD, B.M. and IQBAL, H.M.N. 2010. Optimization of media and environmental conditions for alkaline protease production using *Bacillus subtilis* in submerged fermentation process. *International Journal for Agro Veterinary and Medical Sciences*, 4 (4): 105-113.
- AKBALIK, G., GUNES, H., YAVUZ, E., YASA, I., HARSA, S., ELMACI, Z.S. and YENIDUNYA, A.F. 2004. Identification of extracellular enzyme producing alkalophilic bacilli from Izmir province by 16S-ITS rDNA RFLP. *J Appl Microbiol*, 97:766-773.
- AKCAN, N. and UCAR, F. 2011. Production of extracellular alkaline protease from *Bacillus subtilis* RSKK96 with solid state fermentation. *Eurasian J Biosci*, 5: 64-72.
- ANONİM 2014a. Orba Biyokimya. <http://www.orba.com.tr/?lang=tr> (Erişim tarihi: 04.05.2014).
- ANONİM 2014b. Belice Kimya. <http://www.belicekimya.com/enzimler.html> (Erişim tarihi: 04.05.2014).
- ANONİM 2014c. ABP Mühlenchemie. <http://www.abpmuhlenchemie.com.tr/> (Erişim tarihi: 04.05.2014).
- ANONİM 2014d. http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1046
- ANONYMOUS 2011a. BCET-RPLA Enterotoxin Kit Manufacturer's Instruction.
- ANONYMOUS 2011b. BDEVIA Enterotoxin Kit Manufacturer's Instruction.

- ANONYMOUS 2013. Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit Manufacturer's Instruction.
- ANONYMOUS 2014a. Enzyme Nomenclature EC 3. Introduction. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/intro.html#EC34> (Erişim tarihi: 04.05.2014)
- ANONYMOUS 2014b. Classification: three orthogonal approaches. <http://merops.sanger.ac.uk/about/classification.shtml> (Erişim tarihi: 04.05.2014)
- ANONYMOUS 2014c. <http://www.mathworks.com/help/stats/response-surface-designs.html> (Erişim tarihi: 24.04.2014).
- ANONYMOUS 2014d. Response surface designs. <http://www.mathworks.com/help/stats/response-surface-designs.html> (Erişim tarihi: 03.05.2014).
- ANONYMOUS 2014e. Gel filtration. <http://www.mikeblaber.org/oldwine/bch5425/lect31/lect31.htm> (Erişim tarihi: 02.05.2014).
- ANONYMOUS 2014f. Affinity Chromatography. <http://www.bio.davidson.edu/courses/molbio/molstudents/01grnoland/affinchr.html> (Erişim tarihi: 01.05.2014).
- ANSON, M.L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J Gen Physiol*, 22: 79-89.
- ASANO, S.I., NUKUMIZU, Y., BANDO, H., IIZUKA, T. and YAMAMOTO, T. 1997. Cloning of novel enterotoxin genes from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microb*, 63 (3): 1054-1057.
- AULD D. S. 2013. Catalytic mechanism for metallopeptidases. In: N.D. Rawlings, G.Y. Salvesen (Editors), *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Academic Press, pp 19-27, USA.
- BANKUS, J.M. and BOND, J.S. 2001. Appendix II- Some commercially available proteases. In: B. Reynon, J.S. Bond (Editors), *Proteolytic Enzymes*, Oxford University Press, p 295-316. New York.
- BARRETT, A. 1999. Peptidases: a view of classification and nomenclature. In: V. Turk (Editor), *Proteases: New Perspectives*, Springer Basel AG, p 1-12. Basel.
- BARRETT, A. 2001. *Proteolytic Enzymes: nomenclature and classification*. In: B. Reynon, J.S. Bond (Editors), *Proteolytic Enzymes*, Oxford University Press, p 1-22. New York.
- BARRETT, A. and RAWLINGS, N.D. 2007. Species of peptidases. *Biol Chem*, 388: 1151-1157.

- BAŞ, D. and BOYACI, İ.H. 2007. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *J Food Eng*, 78: 836-845.
- BEATTIE, S.H. and WILLIAMS, A.G. 1999. Detection of toxigenic strains of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. with an improved cytotoxicity assay. *Lett Appl Microbiol*, 28: 221-225.
- BE'ER, A., ZHANG, H.P., FLORIN, E.L., PAYNE, S.M., BEN-JACOB, E. and SWINNEY, H.L. 2009. Deadly competition between sibling bacterial colonies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106 (2): 428-433.
- BEG, Q.K. and GUPTA, R. 2003. Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavenensis*. *Enzyme Microb Tech*, 32: 294-304.
- BEG, Q.K., SAXENA, R.K. and GUPTA, R. 2002. De-repression and subsequent induction of protease synthesis by *Bacillus mojavenensis* under fed-batch operations. *Process Biochem*, 37: 1103-1109.
- BEG, Q.K., SAHAI, V. and GUPTA, R. 2003. Statistical media optimization and alkaline protease production from *Bacillus mojavenensis* in a bioreactor. *Process Biochem*, 39: 203-209.
- BEHESHTI MAAL, K., EMTIAZI, G. and NAHVI, I. 2011. Increasing the alkaline protease activity of *Bacillus cereus* and *Bacillus polymyxa* simultaneously with the start of sporulation phase as a defense mechanism. *Afr J Biotechnol*, 10 (19): 3894-3901.
- BHUNIA, B., BASAK, B. and DEY, A. 2012. A review on production of serine alkali protease by *Bacillus* spp. *J Biochem Tech*, 3 (4): 448-457.
- BIERBAUM, G., KARUTZ, M., WEUSTER-BOTZ, D. and WANDREY, C. 1994. Production of protease with *Bacillus licheniformis* mutants insensitive to repression of exoenzyme biosynthesis. *Appl Microbiol Biot*, 40 (5): 611-617.
- BOMBARA, N., AÑÓN, M.C. and PILOSO, A.M.R. 1997. Functional properties of protease modified wheat flours. *Food Sci Technol*, 30: 441-447.
- BRADFORD, M.M. 1976. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248-254.
- BUCHHOLZ, K., KASCHE, V. and BORNSCHEUER, U.T. 2005. Biocatalysts and Enzyme Technology. Wiley-VCH, Weinheim, 626 p.
- CHAUHAN, B. and GUPTA, R. 2004. Application of statistical experimental design for optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. RGR-14. *Process Biochem*, 39:2115-2122.

- CHOMA, C. and GRANUM, P.E. 2002. The enterotoxin T (BcET) from *Bacillus cereus* can probably not contribute to food poisoning. *FEMS Microbiol Lett*, 217 (1): 115-119.
- CHU, W.H. 2007. Optimization of extracellular alkaline protease production from species of *Bacillus*. *J Ind Microbiol Biot*, 34: 241-245.
- CLAVERYS, J.P. and HÅVARSTEIN, L.S. 2007. Cannibalism and fratricide: mechanisms and raisons d'être. *Nat Rev*, 5: 219-229.
- COPELAND, R.A. 2000. Enzymes: A practical introduction to structure, mechanism, and data analysis. Wiley-VCH, New York, 390 p.
- CUPP-ENYARD, C. 2008. Sigma's non-specific protease activity assay-casein as a substrate. *J Vis Exp*, 19.
- CUTLER, P. 2003. Size-Exclusion Chromatography. In: P. Cutler (Editor), *Methods in Molecular Biology Protein Purification Protocols*, Humana Press, p 239-252, Totowa.
- ÇALIK, P., BİLİR, E., ÇALIK, GÜZİDE and ÖZDAMAR, T.H. 2002. Influence of pH conditions on metabolic regulations in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis*. *Enzyme Microb Tech*, 31: 685-697.
- ÇALIK, P., ÇALIK, GÜZİDE and ÖZDAMAR, T.H. 1998. Oxygen transfer effects in serine alkaline protease fermentation by *Bacillus licheniformis*: Use of citric acid as the carbon source. *Enzyme Microb Tech*, 23: 451-461.
- DAHL, M.K. 1999. *Bacillus*. In: R.K. Robinson (Editor-in-chief), *Encyclopedia of Food Microbiology*, Elsevier Inc., Academic Press, p 1113-1119, UK.
- DALE, J.W. and PARK, S.F. 2004. *Molecular Genetics of Bacteria*. Wiley, p 346, England.
- DANCER, B.N., and MANDELSTAM, J. 1975. Production and possible function of serine protease during sporulation of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 121 (2): 406-410.
- D' COSTA, B., KHANOLKAR, D. and DUBEY, S.K. 2013. Partial purification and characterization of metalloprotease of halotolerant alkaliphilic bacterium *Bacillus cereus* from coastal sediment of Goa, India. *Afr J Biotechnol*, 12 (31): 4905-4914.
- DENIZCI, A.A., KAZAN, D., ABELN, E.C.A., ERARSLAN, A. 2004. Newly isolated *Bacillus clausii* GMBAE 42: an alkaline protease producer capable to grow under highly alkaline conditions. *J Appl Microbiol*, 96: 320-327.
- DEWAN, S.S. 2012. Global markets for enzymes in industrial applications. Report code: BIO030G. Business Communications Company, Inc.

(<http://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/enzymes-industrial-applications-markets-bio030g.html>) Erişim tarihi: 20.05.2014.

- DODDAPANENI, K.K., TATINENI, R., VELLANKI, R.N., RACHCHA, S., ANABROLU, N., NARAKUTI, V. and MANGAMOORI, L.N. 2009. Purification and characterization of a solvent and detergent-stable novel protease from *Bacillus cereus*. *Microbiol Res*, 164: 383-390.
- DUNN, B.M. 2001. Determination of protease mechanism. In: B. Reynon, J.S. Bond (Editors), *Proteolytic Enzymes*, Oxford University Press, p 77-104. New York.
- DURÁN, N. and DURÁN, M. 2000. Enzyme applications in the textile industry. *Rev. Prog. Coloration*, 30: 41-44.
- EHLING-SCHULZ, M., GUINEBRETIERE, M.H., MONTHÁN, A., BERGE, O., FRICKER, M. and SVENSSON, B. 2006. Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett*, 260: 232-240.
- EHLING-SCHULZ, M., FRICKER, M. and SCHERER, S. 2004. Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay. *FEMS Microbiol Lett*, 232:189-195.
- EHLING-SCHULZ, M. et al. 2005. Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. *Microbiology*, 151: 183-197.
- EL-BENDARY, M.A., EL-OLA, S.M.A. and MOHARAM, M.E. 2012. Enzymatic surface hydrolysis of polyamide fabric by protease enzyme and its production. *Indian J Fibre Text Res*, 37: 273-279.
- EREM, F. 2007. Normal ve kepekli ekmeklerde sünme etmeni *Bacillus* türlerinin belirlenmesi ve sünme üzerine kinetik çalışmalar. Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Antalya, 181 ss.
- ERRINGTON, J. 2003. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nat Rev Microbiol*. 1: 117-126.
- FERNÁNDEZ-RESA, P., MIRA, E. and QUESADA, R. 1994. Enhanced detection of casein zymography of matrix metalloproteinases. *Anal Biochem*, 224: 434-435.
- FLEMING, A.B., TANGNEY, M., JORGENSEN, P.L., DIDERICHSEN, B. and PRIEST, F.G. 1995. Extracellular enzyme synthesis in a sporulation-deficient strain of *Bacillus licheniformis*. *Appl Environ Microb*, 61 (11): 3775-3780.
- FRITZE, D. 2004. Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: The aerobic endospore-forming bacteria. *Phytopathology*, 94:1245-1248.
- FROM, C., PUKALL, R., SCHUMANN, P., HORMAZÁBAL, V., GRANUM, P.E. 2005. Toxin-producing ability among *Bacillus* spp. outside the *Bacillus cereus* group. *Appl Environ Microb*, 71 (3): 1178-1183.

- FU, X.T., YOU, S.G. and KIM, S.M. 2008. Characterization of a salt-tolerant acid protease produced by *Bacillus megaterium* KLP-98 and its potential as a fermentation starter for the manufacture of fish sauce. *J Food Biochem*, 32: 279-298.
- GENCKAL, H. and TARI, C. 2006. Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus* sp. isolated from natural habitats. *Enzyme Microb Tech*, 39:703-710.
- GERZE, A., Omay, D. and GUVENILIR, Y. 2005. Partial purification and characterization of protease enzyme from *Bacillus subtilis megatherium*. *Appl Biochem Biotech*, 121-124-335-346.
- GHORBEL, B., SELLAMI-KAMOUN, A. and NASRI, M. 2003. Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. *Enzyme Microb Tech*, 32: 513-518.
- GONZÁLEZ-PASTOR, J.E. 2011. Cannibalism: a social behavior in sporulating *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Rev*, 35: 415-424.
- GORLACH-LIRA, K., PEDROZA, M.L.V., BURDZIEJ-POKOJSKA, A., ROZYCKI, H. and DAHM, H. 2010. Response surface analysis on the effect of temperature and pH on growth and proteolytic activity of thermophilic *Bacillus* sp. *Braz Arch Biol Techn*, 53 (5): 1067-1072.
- GRANUM, P.E., BRYNESTAD, S., O'SULLIVAN, K., and NISSEN, H. 1993. Enterotoxin from *Bacillus cereus*: production and biochemical characterization. *Neth Milk Dairy J*, 47: 63-70.
- GRANUM, P.E. and LUND, T. 1997. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Lett*, 157: 223-228.
- GRZONKA, Z., KASPRZYKOWSKI, F. and WICZK, W. 2007. Cysteine Proteases. In: J. Polaina, A.P. MacCabe (Editors), *Industrial Enzymes-Structure Function and Applications*. Springer, pp. 181-196, The Netherlands.
- GUANGRONG, H., DEHUI, D., WEILIAN, H., JIAXIN, J. 2008. Optimization of medium composition for thermostable protease production by *Bacillus* sp. HS08 with a statistical method. *Afr J Biotechnol*, 7 (8): 1115-1122.
- GUPTA, M.N. 1992. Enzyme function in organic solvents. *Eur. J. Biochem*. 203: 25-32.
- GUPTA, R., BEG, Q.K., KHAN, S. and CHAUHAN, B. 2002a. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Appl Microbiol Biot*, 60: 381-395.
- GUPTA, R., BEG, Q.K., LORENZ, P. 2002b. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl Microbiol Biot*, 59: 15-32.
- GUPTA, R, GUPTA, K., SAXENA, R.K. and KHAN, S. 1999. Bleach-stable, alkaline protease from *Bacillus* sp. *Biotechnol Lett*, 21: 135-138.

- GÜNGÖR, N. 2011. *Bacillus* suşlarından elde edilen proteaz enziminin optimizasyonu ve saflaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş, 65 ss.
- GÜMÜŞEL, F. 2010. Biyoteknoloji, Genetik ve Sağlık. Kocaeli Sanayii için Teknolojik Uzgörü Raporu. <http://www.veribaz.com/viewdoc.html?biyoteknoloji,-genetik-ve-saglik-sektoru-440892.html>.
- HAGE, D.S. and RUHN, P.F. 2006. An Introduction to Affinity Chromatography. In: D.S. Hage (Editor), Handbook of Affinity Chromatography, CRC Press, p 3-13, Boca Raton.
- HAGE D.S. 2006. Handbook of Affinity Chromatography, CRC Press, p 856, Boca Raton.
- HAGEL, L. 2011. Gel filtration: Size exclusion chromatography. In: J.C. Janson (Editor), Protein purification: principles, high resolution, methods and applications, Wiley, pp 51-91.
- HAMOEN, L.W., VENEMA, G. and KUIPERS, O.P. 2003. Controlling competence in *Bacillus subtilis*: shared use of regulators. *Microbiology*, 149: 9-17.
- HANLON, G.W. and HODGES, N.A. 1981. Bacitracin and protease production in relation to sporulation during exponential growth of *Bacillus licheniformis* on poorly utilized carbon and nitrogen sources. *J Bacteriol*, 147 (2): 427-431.
- HANSEN, B.M., HØIBY, P.E., JENSEN, G.B. and HENDRIKSEN, N.B. 2003. The *Bacillus cereus* bceT enterotoxin sequence reappraised. *FEMS Microbiol Lett*, 223:21-24.
- HARMAN, A. 2000. Tepki Yüzeyleri ve Tasarımları. Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır, 85 ss.
- HARWOOD, C.R. and CRANENBURGH, R. 2008. *Bacillus* protein secretion: an unfolding story. *Trends Microbiol*, 16 (2): 73-79.
- HE, H., CHEN, X., LI, J., ZHANG, Y. and GAO, P. 2004. Taste improvement of refrigerated meat treated with cold-adapted protease. *Food Chem*, 84: 307-311.
- HINDHUMATHI, M., VIJAYALAKSHMI, S. and THANKAMANI, V. 2011. Optimization and cultural characterization of alkalophilic protease producing *Bacillus* sp. GPA4. *Research in Biotechnology*, 2 (4): 13-19.
- IBRAHIM, A.S.S. and AL-SALAMAH, A.A. 2009. Optimization of media and cultivation conditions for alkaline protease production by alkaliphilic *Bacillus halodurans*. *Res J Microbiol*, 4 (7): 251-259.
- ILLANES, A. 2008. Enzyme Production. In: A. Illanes (Editor), Enzyme Biocatalysis Principles and Applications, Springer, p 57-106, Netherlands.

- ITO, S., KOBAYASHI, T., HATADA, T. and HORIKOSHI, K. 2005. Enzymes in Modern Detergents. In: J.L. Barredo (Editor), Microbial Enzymes and Biotransformations, Humana Press, p 151-164, Totowa.
- JAMES, W. and MANDELSTAM, J. 1985. Protease production during sporulation of germination mutants of *Bacillus subtilis* and the cloning of a functional *gevE* gene. *J Gen Microbiol*, 131: 2421-2430.
- JASWAL, R.K., KOCHER, G.S. and VIRK, M.S. 2008. Production of alkaline protease by *Bacillus circulans* using agricultural residues: A statistical approach. *Indian J Biotechnol*, 7: 356-360.
- JISHA, V.N., SMITHA, R.B., PRADEEP, S., SREEDEVI, S., UNNI, K.N., SAJITH, S., PRIJI, P., JOSH, M.S. and BENJAMIN, S. 2013. Versatility of microbial proteases. *Advances in Enzyme Research*, 1 (3): 39-51.
- JOHNVESLY, B. and NAIK, G.R. 2001. Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. *Process Biochem*, 37: 139-144.
- KARA, M., SIVRİ, D. and KÖKSEL, H. 2005. Effects of high-protease activity flours and commercial proteases on cookie quality. *Food Res Int*, 38: 479-486.
- KARAKAŞ, B. 2009. *Bacillus subtilis*'den α -amilaz geninin klonlanması ve *Pichia pastoris* mayasında ekspresyonu. Doktora Tezi, Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Antalya, 140 ss.
- KARIGAR, C.S. and RAO, S.S. 2011. Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: a review. *Enzyme Res*, In press, doi:10.4061/2011/805187
- KAWAMURA, F. and DOI, R.H. 1984. Construction of a *Bacillus subtilis* double mutant deficient in extracellular alkaline and neutral proteases. *J Bacteriol*, 160 (1): 442-444.
- KERİMAK ÖNER, M.N. 2008. Zorunlu alkalifilik *Bacillus marmariensis* GMBE 72 soyundan izole edilen alkalin proteaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu. Doktora Tezi, Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 228 ss.
- KHAN, F. 2013. New microbial proteases in leather and detergent industries. *Innovative Research in Chemistry*, 1 (1): 1-6.
- KIRAN, Ö.E., ÇÖMLEKÇİOĞLU, U., DOSTBİL, N. 2006. Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları. *KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9 (1): 12-19.
- KIM, H.S. and HAGE, D.S. 2006. Immobilization methods for affinity chromatography. In: D.S. Hage (Editor), Handbook of Affinity Chromatography, CRC Pres, p 36-78, Boca Raton.

- KIM, J.B., KIM, J.M., KIM, S.Y., KIM, J.H., PARK, Y.B., CHOI, N.J. and OH, D.H. 2010. Comparison of enterotoxin production and phenotypic characteristics between emetic and enterotoxic *Bacillus cereus*. *J Food Protect*, 73 (7): 1219-1224.
- KOÇ, B. and KAYMAK-ERTEKİN, F. 2010. Yanıt yüzey yöntemi ve gıda işleme uygulamaları. *Gıda*, 35 (1):63-70.
- KONDO, M.Y., OKAMOTO, D.N., SANTOS, J.A.N., JULIANO, M.A., ODA, K., PILLAI, B., JAMES, M.N.G., JULIANO, L. and GOUVEA, I.E. 2010. Studies on the catalytic mechanism of a glutamic peptidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 285 (28): 21437-21445.
- KUL, S. 2004. Cevap Yüzeyi Yöntemleri. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mersin, 89 ss.
- KUMAR, C.G. and TAKAGI, H. 1999. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnol Adv*, 17: 561-594.
- KUMAR, C.G., TIWARI, M.P., JANY, K.D. 1999. Novel alkaline serine proteases from alkalophilic *Bacillus* spp.: purification and some properties. *Process Biochem*, 34: 441-449.
- KUMAR, S., KOLODKIN-GAL, I. and ENGELBERG-KULKA, H. 2013. Novel quorum-sensing peptides mediating interspecies bacterial cell death. *Mbio*, 4 (3): 1-12.
- LAUER, I., BONNEWITZ, B., MEUNIER, A. and BEVERINI, M. 2000. New approach for separating *Bacillus subtilis* metalloprotease and α -amilase by affinity chromatography and for purifying neutral protease by hydrophobic chromatography. *J Chromatogr B*, 737: 277-284.
- LAZAZZERA, B.A. and GROSSMAN, A.D. 1998. The ins and outs of peptide signaling. *Trends Microbiol*, 6 (7): 288-294.
- LAZIM, H., MANKAI, H., SLAMA, N., BARKALLAH, I., LIMAM, F. 2009. Production and optimization of thermophilic alkaline protease in solid-state fermentation by *Streptomyces* sp. CN902. *J Ind Microbiol Biot*, 36: 531-537.
- LEBER, T.M. and BALKWILL, F.R. 1997. Zymography: A single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. *Anal Biochem*, 249: 24-28.
- LEE, H., SUH, D.B., HWANG, J.H. and SUH, H.J. 2002. Characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Bacillus* sp. *Appl Biochem Biot*, 97: 123-133.
- LEISOLA, M., JOKELA, J., PASTINEN, O., TURUNEN, O. 2010. Industrial Use of Enzymes. http://www.tkk.fi/Units/BioprocessEngineering/Kem-70.415/INDUSTRIAL_USE_OF_ENZYMES.DOC

- LINDBÄCK, T. and GRANUM, P.E. 2006. Detection and purification of *Bacillus cereus* enterotoxins. In: C.C. Adley (Editor), Food Borne Pathogens: Methods and Protocols, Humana Press, p 15-26, Totowa.
- LIU, S., FANG, Y., LV, M., WANG, S. and CHEN, L. 2010. Optimization of the production of organic solvent-stable protease by *Bacillus sphaericus* DS11 with response surface methodology. *Bioresource Technol*, 101: 7924-7929.
- LOPEZ, M. and EDENS, L. 2005. Effective prevention of chill-haze in beer using an acid proline-specific endoprotease from *Aspergillus niger*. *J Agr Food Chem*, 53: 7944-7949.
- MABROUK, S.S., HASHEM, A.M., EL-SHAYEB, N.M.A., ISMAIL, A.M.S. and ABDEL-FATTAH, A.F. 1999. Optimization of alkaline protease productivity by *Bacillus licheniformis* ATCC 21415. *Bioresource Technol*, 69: 155-159.
- MADHAVI, J., SRILAKSHMI, J., RAO, M.V.R. and RAO, K.R.S.S. 2011. Efficient leather dehairing by bacterial thermostable protease. *International Journal of Bio-Science and Bio-Technology*, 3 (4): 11-26.
- MADIGAN, M.T. and MARTINKO, J.M. 2006. Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi. (Çev. Ed. C. Çökmüş 2010), Palme Yayıncılık, ss 992, Ankara.
- MAHTO, R.B. and BOSE, J.C. 2012. Production of alkaline protease from *Bacillus subtilis* by different entrapment techniques. *J Biochem Technol*, 4 (1): 498-501.
- MANNI, L., JELLOULI, K., AGREBI, R., BAYOUDH, A. and NASRI, M. 2008. Biochemical and molecular characterization of a novel calcium-dependent metalloprotease from *Bacillus cereus* SV1. *Process Biochem*, 43: 522-530.
- MANNI, L. M., JELLOULI, K., GHORBEL-BELLAAJ, O., AGREBI, R., SELLAMI-KAMOUN, A. and NASRI, M. 2010. An oxidant- and solvent-stable protease produced by *Bacillus cereus* SV1: application in the deproteinization of shrimp wastes and as a laundry detergent additive. *Appl Biochem Biotechnol*, 160: 2308-2321.
- MATTA, H. and PUNJ, V. 1998. Isolation and partial characterization of a thermostable extracellular protease of *Bacillus polymyxa* B-17. *Int J Food Microbiol*, 42: 139-145.
- MAZORRA-MANZANO, M.A., MORENO-HERNÁNDEZ, J.M., RAMÍREZ-SUAREZ, J.C., TORRES-LLANEZ, M.D.J., GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A.F., and VALLEJO-CÓRDOBA, B. 2013. Sour orange *Citrus aurantium* L. flowers: A new vegetable source of milk-clotting proteases. *LWT-Food Sci Technol*, 54(2): 325-330.
- MCKENNEY, P.T., DRIKS, A. and EICHENBERGER, P. 2013. The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nat Rev Microbiol*, 11: 33-44.

- MCKILLIP, J.L. 2000. Prevalence and expression of enterotoxins in *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp., a literature review. *Anton Leeuw*, 77: 393-399.
- MEHROTRA, S., PANDEY, P.K., GAUR, R. and DARMWAL, N.S. 1999. The production of alkaline protease by a *Bacillus* species isolate. *Bioresource Technol*, 67: 201-203.
- MELLADO, E., SÁNCHEZ-PORRO, C. and VENTOSA, A. 2005. Proteases produced by halophilic bacteria and archaea. In: J.L. Barredo (Editor), *Microbial Enzymes and Biotransformations*, Humana Press, p 181-190, Totowa.
- MIKKOLA, R., SARIS, N.E.L., GRIGORIEV, P.A., ANDERSSON, M.A., SALKINOJA-SALONEN, M.S. 1999. Ionophoretic properties and mitochondrial effects of cereulide. *Eur J Biochem*, 263: 112-117.
- MILLER, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*, 31 (3): 426-428.
- MILLER, J. M. 2005. *Chromatography: Concepts and Contrasts*. A Wiley-Interscience Publication, New York, p 154.
- MILLER, M.B. and BASSLER, B.L. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol*, 55: 165-199.
- MOIR, A. 2003. Bacterial spore germination and protein mobility. *Trends Microbiol*, 11: 452-454.
- MOLVA, C., SUDAGIDAN, M. and OKUKLU, B. 2009. Extracellular enzyme production and enterotoxigenic gene profiles of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains isolated from cheese in Turkey. *Food Control*, 20: 839-834.
- MUDERRISZADE, A., ENSARİ, N.Y., AGULOGLU, S. and OTLUDIL, B. 2001. Purification and characterization of alkaline proteinase from alkalophilic *Bacillus* sp. *Appl Biochem Microbiol*, 37 (6): 574-577.
- NADEEM, M., QAZI, J.I., SYED, Q.A. and BAIG, S. 2008. Optimization of process parameters for alkaline protease production by *Bacillus licheniformis* N-2 and kinetics studies in batch fermentation. *Turkish J Biol*, 32: 243-251.
- NADEEM, M., QAZI, J.I. and BAIG, S. 2009. Effect of aeration and agitation rates on alkaline protease production by *Bacillus licheniformis* UV-9 mutant. *Turk J Bioch*, 34 (2): 89-96.
- NAIDU, K.S.B. and DEVI, K.L. 2005. Optimization of thermostable alkaline protease production from species of *Bacillus* using rice bran. *Afr J Biotechnol*, 4 (7): 724-726.
- NAIR, A.J. 2008. *Introduction to Biotechnology and Genetic Engineering*. Infinity Science Press, Hingham, 798.

- NASCIMENTO, W.C.A. and MARTINS, M.L.L. 2004. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. *Braz J Microbiol*, 35: 91-96.
- NICHOLSON, W.L., MUNAKATA, N., HORNECK, G., MELOSH, H.J. and SETLOW, P. 2000. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol Mol Biol R*, 64 (3): 548-572.
- NIJLAND, R. and KUIPERS, O.P. 2008. Optimization of protein secretion by *Bacillus subtilis*. *Recent Pat Biotechnol*, 2 (2): xx-xx (In press).
- NIKEREL, I. E., ATEŞ, Ö. and ÖNER, E.T. 2008. Effect of bioprocess conditions on growth and alkaline protease production by halotolerant *Bacillus licheniformis* BA17. *Appl Biochem Microbiol*, 44 (5): 487-492.
- ODA, K. 2012. New families of carboxyl peptidases: serine-carboxyl peptidases and glutamic peptidases. *J Biochem*, 151 (1): 13-25.
- OBEROI, R., BEG, Q.K., PURI, S., SAXENA, R.K. and GUPTA, R. 2001. Characterization and wash performance analysis of an SDS-stable alkaline protease from a *Bacillus* sp. *World J Microb Biot*, 17: 493-497.
- O'HARA, M.B. and HAGEMAN, J.H. 1990. Energy and calcium ion dependence of proteolysis during sporulation of *Bacillus subtilis* cells. *J Bacteriol*, 172 (8): 4161-4170.
- ORHAN, E., OMAÏ, D. and GUVENILIR, Y. 2005. Partial purification and characterization of protease enzyme from *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus*. *Appl Biochem Biotech*, 121-124:183-194.
- OSKOUÏE, S.F.G., TABANDEH, F., YAKHCHALI, B., EFTEKHAR, F. 2007. Enhancement of alkaline protease production by *Bacillus clausii* using Taguchi experimental design. *Afr J Biotechnol*, 6 (22): 2559-2564.
- OSKOUÏE, S.F.G., TABANDEH, F., YAKHCHALI, B., EFTEKHAR, F. 2008. Response surface optimization of medium composition for alkaline protease production by *Bacillus clausii*. *Biochem Eng J*, 39: 37-42.
- OU, J.F. and ZHU, M.J. 2012. An overview of current and novel approaches for microbial neutral protease improvement. *Int J Modern Biol Med*, 2 (1): 1-31.
- OUTTRUP, H. and JØRGENSEN, S.T. 2002. The importance of *Bacillus* species in the production of industrial enzymes. In: R. Berkeley, M. Heyndrickx, N. Logan, P. De Vos (Editors), *Applications and Systematics of Bacillus and Relatives*, Blackwell Publishing, pp 206-218, USA.
- ÖZTÜRK, S. 2007. Ülkemizden izole edilen *Bacillus licheniformis* BA17'den elde edilen alkalen proteaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 76 ss.

- OZTURK, S., OZEREN-MORGAN, M., DILGIMEN, A.S., DENIZCI, A.A., ARIKAN, B. and KAZAN, D. 2009. Alkaline serine protease from halotolerant *Bacillus licheniformis* BA17. *Ann Microbiol*, 59 (1): 83-90.
- PAGE, M.J. and CERA, E.D. 2008. Serine peptidases: Classification, structure and function. *Cell Mol Life Sci*, 65: 1220-1236.
- PANTAMAS, P., CHAIPRASERT, P. and TANTICHAROEN, M. 2003. Anaerobic digestion of glucose by *Bacillus licheniformis* and *Bacillus coagulans* at low and high alkalinity. *Asian J. Energy Environ*, 4(1-2): 1-17.
- PATEL, R.K., DODIA, M.S., JOSHI, R.H. and SINGH, S.P. 2006. Purification and characterization of alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp. *Process Biochem*, 41: 2002-2009.
- PATEL, R., DODIA, M. and SINGH, S.P. 2005. Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp.: production and optimization. *Process Biochem*, 40: 3569-3575.
- PAZARLIOĞLU, N. 1997. Enzim Üretimi ve Saflaştırılması. In: A. Telefoncu (Editor), *Enzimoloji*, ss 139-176, Aydın.
- PHELPS, R.J. and MCKILLIP, J.L. 2002. Enterotoxin production in natural isolates of *Bacillaceae* outside the *Bacillus cereus* group. *Appl Environ Microb*, 68 (6): 3147-3151.
- POLAINA, J. and MACCABE, A.P. 2007. Industrial Enzymes in the 21st Century. In: J. Polaina, A.P. MacCabe (Editors), *Industrial Enzymes-Structure Function and Applications*. Springer, pp. ix-x, The Netherlands.
- POLGÁR, L. 2005. The catalytic triad of serine peptidases. *Cell Mol Life Sci*, 62: 2161-2172.
- PRAKASHAM, R.S., RAO, C.S., RAO, R.S. and SARMA, P.N. 2005. Alkaline Protease Production by an Isolated *Bacillus circulans* under Solid-State Fermentation Using Agroindustrial Waste: Process Parameters Optimization. *Biotechnol Progr*, 21 (5): 1380-1388.
- PRAKASHAM, R.S., RAO, C.S. and SARMA, P.N. 2006. Green gram husk-an inexpensive substrat for alkaline protease production by *Bacillus* sp. in solid-state fermentation. *Bioresource Technol*, 97:1449-1454.
- PRASANTHI, V., NIKKU, M.Y., VUDDARAJU, S.P., NALLA, K.K., RAJU, C.A.I. and DONTIREDDY, S.R.R. 2008. Optimization of the fermentation media using statistical approach and artificial neural Networks for the production of an alkaline protease from *Bacillus subtilis*. *Int J Nat Eng Sci*, 2 (3): 51-56.
- PRESTIDGE, L., GAGE, V. and SPIZIZEN, J. 1971. Protease activities during the course of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 107 (3): 815-823.

- PURI, S., BEG, Q.K. and GUPTA, R. 2002. Optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. by response surface methodology. *Curr Microbiol*, 44: 286-290.
- QADAR, S.A.U., SHIREEN, E., IQBAL, S. and ANWAR, A. 2009. Optimization of protease production from newly isolated strain of *Bacillus* sp. PCSIR EA-3. *Indian Journal of Biotechnology*, 8: 286-290.
- RAHMAN, R.N.Z.R.A., MAHAMAD, S., SALLEH, A.B. and BASRI, M. 2007. A new organic solvent tolerant protease from *Bacillus pumilus* 115b. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 34: 509-517.
- RAO, C.S., SATHISH, T., MAHALAXMI, M., LAXMI, G.S., RAO, R.S. and PRAKASHAM, R.S. 2007. Modelling and optimization of fermentation factors for enhancement of alkaline protease production by isolated *Bacillus circulans* using feed-forward neural network and genetic algorithm. *J Appl Microbiol*, 104: 889-898.
- RAO, M.B., TANKSALE, A.M., GHATGE, M.S. and DESHPANDE, V.V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol R*, 62 (3): 597-635.
- RAVISHANKAR, K., KUMAR, M.A. and SARAVANAN, K. 2012. Isolation of alkaline protease from *Bacillus subtilis* AKRS3. *Afr J Biotechnol*, 11 (69): 13415-13427.
- RAWLINGS, N.D. 2013. Protease Families, Evolution and Mechanism of Action. In: K. Brix, W. Stöcker (Editors), *Proteases: Structure and Function*, Springer, pp 1-36.
- RAWLINGS, N.D., BARRETT, A.J. and BATEMAN, A. 2011. Asparagine peptide lyases: A seventh catalytic type of proteolytic enzymes. *J Biol Chem*, 286 (44): 38321-38328.
- RAWLINGS, N.D., BARRETT, A.J. and BATEMAN, A. 2012. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res*, 40: D343-D350.
- RAWLINGS, N.D., MORTON, F.R. and BARRETT, A.J. 2007. An introduction to peptidases and the Merops database. In: J. Polaina, A. P. MacCabe (Editors), *Industrial Enzymes-Structure, Function and Applications*, Springer, pp 161-179, The Netherlands.
- RAZAK, C.N.A., TANG, S.W., BASRI, M. and SALLEH, A. B. 1997. Preliminary study on the production of extracellular protease from a newly isolated *Bacillus* sp. (No.1) and the physical factors affecting its production. *Pertanika J Sci Technol*, 5 (2): 169-177.
- REDDY, L.V.A., WEE, Y.J., YUN, J.S. and RYU, H.W. 2008. Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus* sp. RKY3 through Plackett-

- Burman and response surface methodological approaches. *Bioresource Technol*, 99: 2242-2249.
- RENZETTI, S. and ARENDT, E.K. 2009. Effect of protease treatment on the baking quality of Brown rice bread: from textural and rheological properties to biochemistry and microstructure. *J Cereal Sci*, 50: 22-28.
- RICE, K.C. and BAYLES, K.W. 2008. Molecular control of bacterial death and lysis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*, 72 (1): 85-109.
- ROE, S. 1994. Separation based on structure. In: E.L.V. Harris, S. Angal (Editors), Protein purification methods-a practical approach, IRL press, p 175-244, Oxford.
- ROSENBERG, I.A. 2005. Protein Analysis and Purification-Benchtop Techniques., p 520, Birkhäuser, Boston.
- ROWAN, N.J., DEANS, K., ANDERSON, J.G., GEMMELL, C.G., HUNTER, I.S. and CHAITHONG, T. 2001. Putative virulence factor expression by clinical and food isolates of *Bacillus* spp. after growth in reconstituted infant milk formulae. *Appl Environ Microbiol*, 67 (9): 3873-3881.
- RUFO, G.A., SULLIVAN, B.J., SLOMA, A. and PERO, J. 1990. Isolation and characterization of a novel extracellular metalloprotease from *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 172 (2): 1019-1023.
- SABIROVA, A.R., RUDAKOVA, N.L., BALABAN, N.P., ILYINSKAYA, O.P., DEMIDYUK, I.V., KOSTROV, S.V., RUDENSKAYA, G.N. and SHARIPOVA, M.R. 2010. A novel secreted metzincin metalloproteinase from *Bacillus intermedius*. *FEBS Lett*, 584: 4419-4425.
- SALLEH, A.B., RAZAK, C.N.A., RAHMAN, R.N.Z.R.A. and BASRI, M. 2006. Chapter 2, Protease: introduction. In: A.B. Salleh, C.N.A. Razak, M. Basri (Editors), New Lipases and Proteases, Nova Science Publishers, pp 23-39, New York.
- SALKINOJA-SALONEN, M.S., VUORIO, R., ANDERSSON, M.A., KÄMPFER, P., ANDERSSON, M.C., HONKANEN-BUZALSKI, T. and SCOGING, A.C. 1999. Toxigenic strains of *Bacillus licheniformis* related to food poisoning. *Appl Environ Microbiol*, 65 (10): 4637-4645.
- SALVASEN, G.Y. and NAGASE, H. 2001. Inhibition of proteolytic enzymes. In: B. Reynon, J.S. Bond (Editors), Proteolytic Enzymes, Oxford University Press, p 105-130, New York.
- SANDHYA, C., NAMPOOTHIRI, K.M. and PANDEY, A. 2005. Microbial proteases. In: J.L. Barredo (Editor), Microbial Enzymes and Biotransformations, Humana Press, p 165-179, Totowa.

- SANGEETHA, R., GEETHA, A. and ARULPANDI, I. 2008. Optimization of protease and lipase production by *Bacillus pumilus* SG 2 isolated from an industrial effluent. *Internet J Microbiol*, Volume 5 Number 2.
- SARAN, S., ISAR, J. and SAXENA, R.K. 2007. A modified method for the detection of microbial proteases on agar plates using tannic acid. *J Biochem Bioph Meth*, 70: 697-699.
- SCHALLMEY, M., SINGH, A. and WARD, O.P. 2004. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can J Microbiol*, 50: 1-17.
- SCHOENI, J.L. and WONG, A.C.L. 2005. *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. *J Food Protect*, 68 (3): 636-648.
- SCHULTZ, D., WOLYNES, P.G., JACOB, E.B. and ONUCHIC, J.N. 2009. Deciding fate in adverse times: sporulation and competence in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106 (50): 21027-21034.
- SEE, Y.P., OLLEY, P.M. and JACKOWSKI, D.G. 1985. The effects of high salt concentrations in the samples on molecular weight determination in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 6 (8): 382-387.
- SENESI, S. and GHELARDI, E. 2010. Production, secretion and biological activity of *Bacillus cereus* enterotoxins. *Toxins*, 2:1690-1703.
- SETLOW, P. 2003. Spore germination. *Curr Opin Microbiol*, 6: 550-556.
- SHAFEE, N., ARIS, S.N., RAHMAN, R.N.Z.A., BASRI, M. and SALLEH, A.B. 2005. Optimization of environmental and nutritional conditions for the production of alkaline protease by a newly isolated bacterium *Bacillus cereus* strain 146. *J Appl Sci Res*, 1(1): 1-8.
- SIMONEN, M. and PALVA, I. 1993. Protein secretion in *Bacillus* species. *Microbiol Rev*, 57 (1): 109-137.
- SINGH, J., BATRA, N. and SOBTI, R. C. 2001. Serine alkali protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1. *Process Biochem*, 36: 781-785.
- SINHA, P., SINGH, R.K., SRIVASTVA, R., SHARMA, R. and TIWARI, S.P. 2013. Characterization and optimization of alkaline protease enzyme produced by soil borne bacteria. *Trends in Life Sciences*, 2 (2): 38-46.
- SLEPECKY, A.S. and HEMPHILL, H.E. 2006. The genus *Bacillus*-Nonmedical. In: M, Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer, E. Stackebrandt (Editors), *The Prokaryotes*, Springer, pp 526-558, USA.
- SEN, S., VENKATA DASU, V., MANDAL, B., and RAJENDRAN, K. 2014. Enzymatic removal of burnt-on protein residues from solid surface: A potential food equipment cleanser. *Food Control*, 40: 314-319.

- SEVİNÇ, N. 2010. Türkiye topraklarından izole edilen *Bacillus* sp. suşlarından proteaz üretimi, kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa, 101 ss.
- SEVİNÇ, N. and DEMİRKAN, E. 2011. Production of protease by *Bacillus* sp. N-40 isolated from soil and its enzymatic properties. *J Biol Environ Sci*, 5 (4): 95-103.
- SILVA, R.R., CABRAL, T.P.F., RODRIGUES, A. and CABRAL, H. 2013. Production and partial characterization of serine and metallo peptidases secreted by *Aspergillus fumigatus* Fresenius in submerged and solid state fermentation. *Braz J Microbiol*, 44 (1): 235-243.
- SMITH, J.E. 2004. Biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge, 271.
- SMITH, J.P., DAFIAS, D.P., EL-KHOURY, W., KOUKOUTSIS, J. and EL-KHOURY, A. 2004. Shelf life and safety concerns of bakery products – a review. *Crit Rev Food Sci*. 44: 19-55.
- SNEATH, P.H.A. (1984). Endospore forming Gram-Positive Rods and Cocci. In: P.H.A Sneath (Editor), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2*. Williams&Wilkins, p 1104-1139, Baltimore, ABD.
- SOOKKHEO, B., SINCHAIKUL, S., PHUTRAKUL, S. and CHEN, S.T. 2000. Purification and characterization of the highly thermostable proteases from *Bacillus stearothermophilus* TLS33. *Protein Expres Purif*, 20: 142-151.
- SOROKULOVA, I.B., REVA, O.N., SMIRNOV, V.V., LAPA, S.V. and URDACI, M.C. 2003. Genetic diversity and involvement in bread spoilage of *Bacillus* strains isolated from flour and ropy bread. *Lett Appl Microbiol*. 37: 169-173.
- SOUSA, F., JUS, S., ERBEL, A., KOKOL, V., CAVCO-PAULO, A. and GUBITZ, G.M. 2007. A novel metalloprotease from *Bacillus cereus* for protein fibre processing. *Enzyme Microb Tech*, 40: 1772-1781.
- STANBURY, P.F., WHITAKER, A. and HALL, S.J. 1995. The recovery and purification of fermentation products. In: *Principles of Fermentation Technology*, Butterwort Heinemann, p 277-312, Oxford.
- STEPHENS, C. 1998. Bacterial sporulation: A question of commitment? *Curr Biol*, 8: R45-R48.
- SUGANTHI, C., MAGESWARI, A., KARTHIKEYAN, S., ANBALAGAN, M., SIVAKUMAR, A. and GOTHANDAM, K.M. 2013. Screening and optimization of protease production from a halotolerant *Bacillus licheniformis* isolated from saltern sediments. *Genet Eng Biotechnol*, 11: 47-52.
- SUMANTHA, A., LARROCHE, C. and PANDEY, A. 2006. Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. *Food Technol Biotech*, 44 (2): 211-220.

- SUNITHA, K., PARK, Y.S., OH, T.K., LEE, J.K. 1999. Synthesis of alkaline protease by catabolite repression-resistant *Thermoactinomyces* sp. E79 mutant. *Biotechnol Lett*, 21: 155-158.
- SUOMINEN, I., ANDERSSON, M.A., ANDERSSON, M.C., HALLAKSELA, A., KÄMPFER, P., RAINEY, F.A., SALKINOJA-SALONEN, M. 2001. Toxic *Bacillus pumilus* from indoor air, recycled paper pulp, Norway spruce, food poisoning outbreaks and clinical samples. *Syst Appl Microbiol*, 24: 267-276.
- TAMÁS, M.J., SHARMA, S.K., IBSTEDT, S., JACOBSON, T. and CHRISTEN, P. 2014. Heavy metals and metalloids as a cause for protein misfolding and aggregation. *Biomolecules*, 4: 252-267.
- TARI, C., GENCKAL, H. and TOKATLI, F. 2006. Optimization of a growth medium using a statistical approach for the production of an alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. L21. *Process Biochem*, 41: 659-665.
- TAVANO, O.L. 2013. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *J Mol Catal B-Enzym*, 90: 1-11.
- TEKİN, N., ÇÖLERİ CİHAN, A., TAKAÇ, Z.S., YAĞCI TÜZÜN, C., TUNÇ, K. and ÇÖKMÜŞ, C. 2012. Alkaline protease production of *Bacillus cohnii* APT5. *Turkish J Biol*, 36:430-440.
- TEKİNDAL, M.A. 2009. Yanıt Yüzeyi Metodu ve Bir Uygulama. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 106 ss.
- TEMİZ, A. 1998. Enzimler. In: İ. Saldamlı (Editors), Gıda Kimyası, ss 259-336, Ankara.
- THAKORE, Y.B. 2008. Enzymes for industrial applications. Report code: BIO030E. Business Communications Company, Inc. (<http://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/enzymes-industrial-applications-bio030e.html>). Erişim tarihi: Mayıs 2014.
- THIRY, M. and CINGOLANI, D. 2002. Optimizing scale-up fermentation process. *Trends Biotechnol*, 20 (3): 103-105.
- TIMÓN, M.L., BRONCANO, J.M., ANDRÉS, A.I. and PETRÓN, M.J. 2014. Prevention of rancidity and discolouration of Iberian dry cured sausage using proteases. *LWT- Food Sci Technol*, 58: 293-398.
- TITANI, K., HERMODSON, M.A., ERICSSON, L.H., WALSH, K. and NEURATH, H. 1972. Amino-acid sequence of thermolysin. *Nature-New Biol*, 238 (12): 35-37.
- TUNAİL, N. 2009. Mikrobiyoloji. Pelin Ofset, s.448, Ankara.

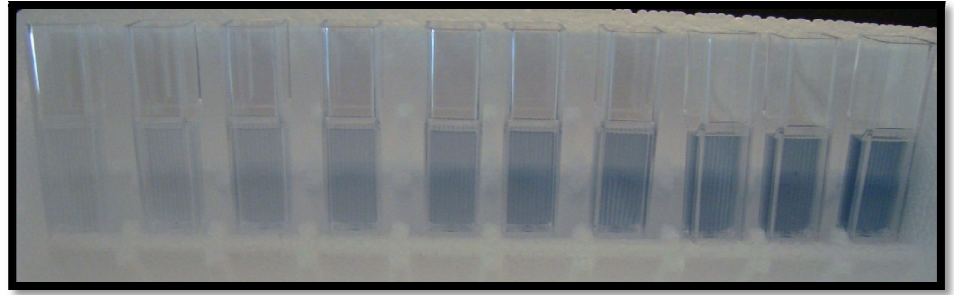
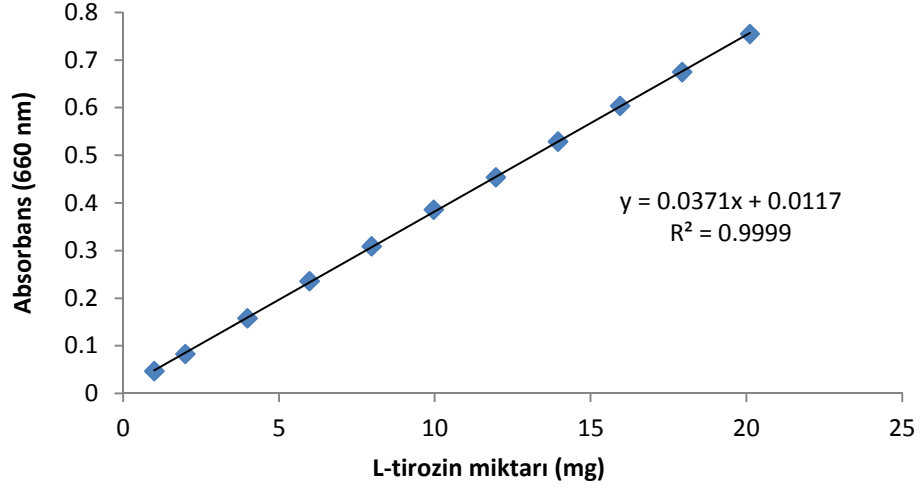
- UYAR, F. and BAYSAL, Z. 2004. Production and optimization of process parameters for alkaline protease production by a newly isolated *Bacillus* sp. Under solid state fermentation. *Process Biochem*, 39: 1893-1898.
- YANG, J.K., SHIH, I.L., TZENG, Y.M. and WANG, S.L. 2000. Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. *Enzyme Microb Tech*, 26: 406-413.
- Van DIJL, J.M. and HECKER, M. 2013. *Bacillus subtilis*: from soil bacterium to super-secreting cell factory. *Microb Cell Fact*, 12 (3): doi:10.1186/1475-2859-12-3
- VOLAVSEK, P.J.A., KIRSCHNER, L.A.M. and von HOLY, A. 1992. Accelerated methods to predict the rope-inducing potential of bread raw materials. *S Afr J Sci*, 88: 99-102.
- VOLLMER, W., JORIS, B., CHARLIER, P. and FOSTER, S. 2008. Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol Rev*, 32: 259-286.
- WAITES, M.J., MORGAN, N.L., ROCKEY, J.S. and HIGTON, G. 2001. Industrial microbiology: an introduction. Blackwell Science, p 288, London.
- WANG, S.L., KAO, T.Y., WANG, C.L., YEN, Y.H., CHERN, M.K. and CHEN, Y.H. 2006. A solvent stable metalloprotease produced by *Bacillus* sp. TKU004 and its application in the deproteinization of squid pen for β -chitin preparation. *Enzyme Microb Tech*, 39: 724-731.
- WATERS, J.M. and BASSLER, B.L. 2005. Quorum sensing: cell to cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*, 21:319-346.
- WESTERS, L., WESTERS, H., and QUAX, W.J. 2004. *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. *Biochim Biophys Acta*, 1694: 299-310.
- WLODAVER, A., GUSTCHINA, A., and JAMES, M.N.G. 2013. Catalytic pathways of aspartic peptidases. In: N.D. Rawlings, G.Y. Salvesen (Editors), Handbook of Proteolytic Enzymes, Academic Press, pp 19-27, USA.
- WU, J., DENG, A., SHI, N., LIU, S., LIANG, Y. and WEN, T. 2013. A salt, detergent, and solvent tolerant protease from *Bacillus* sp. B001: Low-cost, easy-purified, and enhanced production by raw material based culture strategy. *Adv Biosci Biotechnol*, 4: 1039:1048.
- WU, J.W. and CHEN, X.L. 2011. Extracellular metalloproteases from bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*, 92: 253-262.
- ZAMOST, B.L., NIELSEN, H.K. and STARNES, R.L. 1991. Thermostable enzymes for industrial applications. *J Ind Microbiol*, 8: 71-82.

ZİHNİOĞLU, F. 2007. Protein saflaştırılması, karakterizasyonu ve proteom analizi. In: A. Telefoncu, M.K. Erbil, F. Zihnioğlu, A. Kılınç (Editörler), Biyokimya ve moleküler biyolojide modern teknikler, Ege Üniversitesi Basımevi, ss. 327-366, İzmir.

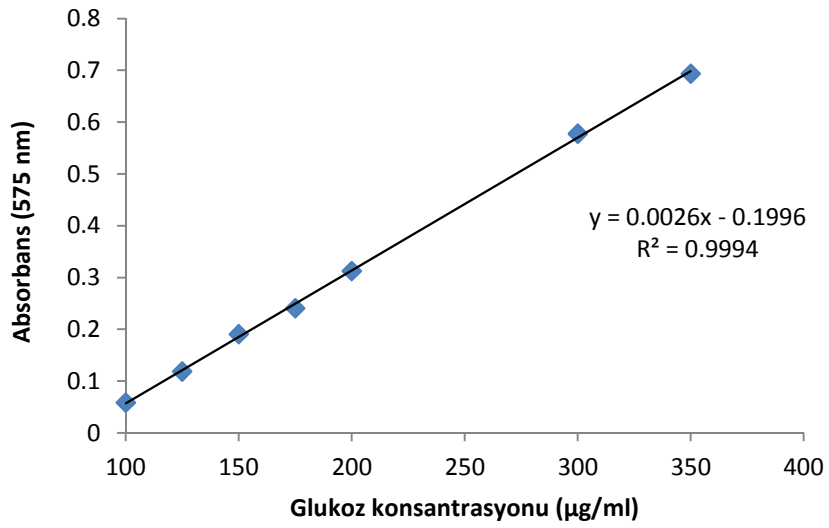
7. EKLER

Ek 1. Kalibrasyon eğrileri

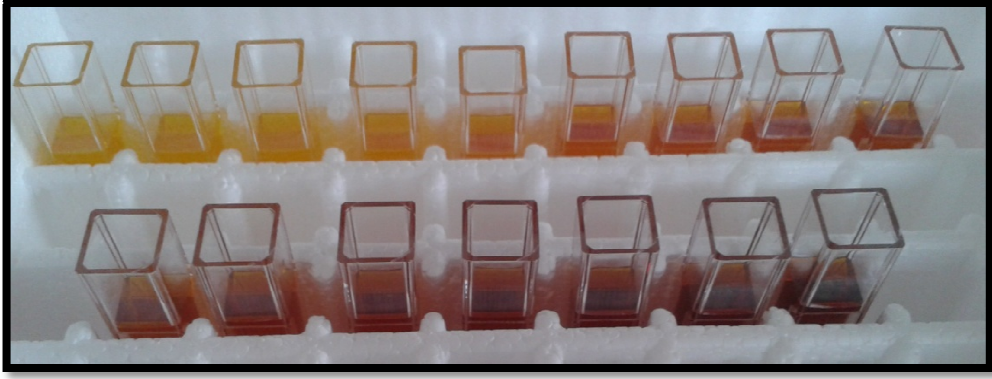
- L-tirozin kalibrasyon eğrisi



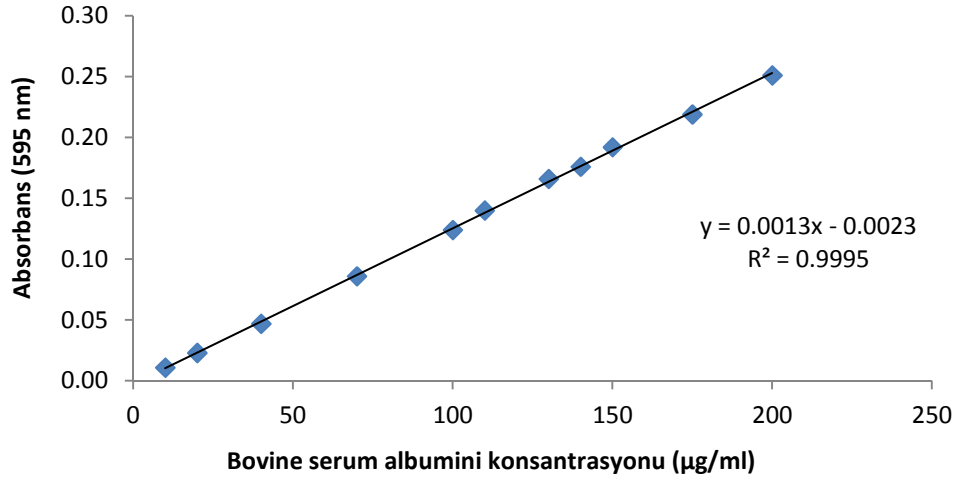
- Glukoz kalibrasyon eğrisi*



* 100 µg/ml'nin altındaki konsantrasyonlarda doğrusallık bozulmaktadır.



- Albumin kalibrasyon eğrisi

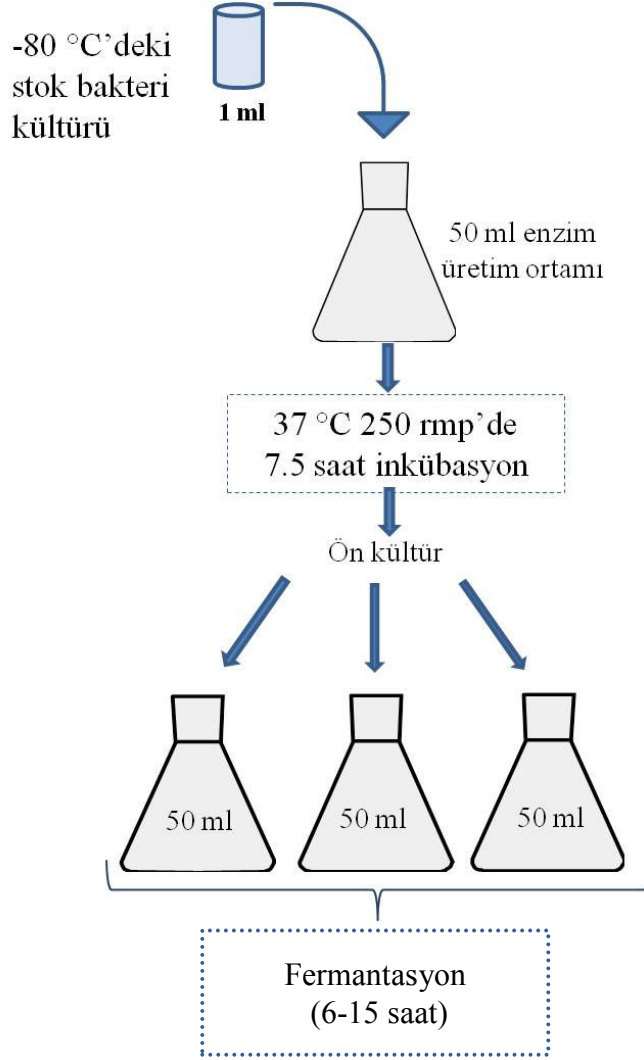


Ek 2. Sünmüş ekmekten izole edilen suşlara ait tanılama sonuçları

İzolatlar	Biyokimyasal testler	API CH
N1	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
N2	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i>
N3	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus pumilus</i>
N4	<i>Bacillus subtilis</i>	Tanılanamadı
N5	<i>Bacillus megaterium</i>	Tanılanamadı
N6	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus pumilus</i>
N7	<i>Bacillus megaterium</i>	Muhtemelen <i>Bacillus megaterium</i>
N8	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
N9	<i>Bacillus coagulans</i>	Tanılanamadı
N10	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
N11	<i>Bacillus subtilis</i>	Tanılanamadı
N12	<i>Bacillus subtilis</i>	Tanılanamadı
N13	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
N14	<i>Bacillus subtilis</i>	Tanılanamadı
N15	<i>Bacillus subtilis</i>	Tanılanamadı
N16	<i>Bacillus subtilis</i>	Tanılanamadı
N17	<i>Bacillus megaterium</i>	Tanılanamadı
N18	<i>Bacillus megaterium</i>	Tanılanamadı
N19	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
N20	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus pumilus</i>
N21	<i>Bacillus subtilis</i>	Tanılanamadı
N22	<i>Bacillus subtilis</i>	Tanılanamadı
K1	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus sp.</i>
K2	Tanılanamadı	<i>Bacillus licheniformis</i>
K3	Tanılanamadı	Tanılanamadı
K4	<i>Bacillus subtilis</i>	Tanılanamadı
K5	<i>Bacillus subtilis</i>	Tanılanamadı
K6	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i>
K7	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus sp.</i>
K8	<i>Bacillus megaterium</i>	Muhtemelen <i>Bacillus megaterium</i>
K9	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
K10	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
K11	<i>Bacillus megaterium</i>	Muhtemelen <i>Bacillus megaterium</i>
K12	<i>Bacillus megaterium</i>	Muhtemelen <i>Bacillus megaterium</i>
K13	<i>Bacillus megaterium</i>	Tanılanamadı
K14	<i>Bacillus megaterium</i>	Tanılanamadı
K15	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i>
K16	<i>Bacillus subtilis</i>	Muhtemelen <i>Bacillus thuringiensis</i>
K17	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
K18	<i>Bacillus subtilis</i>	Tanılanamadı
K19	<i>Bacillus megaterium</i>	Tanılanamadı

*Tanılama sonuçları Erem'den (2007) alınmıştır.

Ek 3. Yanıt yüzey yöntemi ile peptidaz üretiminin optimizasyonu sırasında her fermantasyon koşulu için gerçekleştirilen işlemler



İnkübasyon sonunda deneme desenindeki her bir koşul için paralelli olarak 3 erlene (engelli) ön kültürden inokulasyon yapılmış ve fermantasyon boyunca bu üç erlenden 1'er saat aralıklarla örnek alınarak analizler* yapılmıştır

Yanıt yüzey yöntemine göre oluşturulan deneme desenindeki koşullara bağlı olmak üzere fermantasyon süreleri farklılık arz etmiştir.



***Analizler**

- Optik yoğunluk ölçümü
- Toplam protein miktarı
- Peptidaz aktivitesi
- Glukoz miktarı

Ek 4. K1, K10 ve N8 suşlarının nükleotid dizilimleri

K1

1 GTCGGCTGGC GCGTGCTAT ACTGCAGTCG AGCGGACAGA TGGGAGCTTG CTCCTGATG
61 TTAGCGGCGG ACGGGTGAGT AACACGTGGG TAACCTGCCT GTAAGACTGG GATAACTCCG
121 GGAAACCGGG GCTAATACCG GATGCTTGTT TGAACCGCAT GGTTCAAACA TAAAAGGTGG
181 CTTGCGCTAC CACTTACAGA TGGACCCGCG GCGCATTAGC TAGTTGGTGA GGTAACGGCT
241 CACCAAGGCG ACGATGCGTA GCCGACCTGA GAGGGTGATC GGCCACACTG GGAAGTGA
301 ACGGCCAGAGA CTCCTACGGG AGGCAGCAGT AGGGAATCTT CCGCAATGGA CGAAAGTCTG
361 ACGGAGCAAC GCCGCGTGAG TGATGAAGGT TTTCCGATCG TAAAGCTCTG TTGTTAGGGA
421 AGAACAAGTG CCGTTCAAAT AGGGCGGCAC CTTGACGGTA CCTAACCAGA AAGCCACGGC
481 TAACTACGTG CCAGCAGCCG CGGTAATACG TAGGTGGCAA GCGTTGTCCG GAATTATTGG
541 GCGTAAAGGG CTCGCAGGCG GTTTCTTAAG TCTGATGTGA AAGCCCCCG CTCAACCGGG
601 GAGGGTCATT GGAAACTGGG GAACTTGAGT GCAGAAGAGG AGAGTGGAAT TCCACGTGTA
661 GCGGTGAAAT GCGTAGAGAT GTGGAGGAAC ACCAGTGGCG AAGGCGACTC TCTGGTCTGT
721 AACTGACGCT GAGGAGCGAA AGCGTGGGGA GCGAACAGGA TTAGATACCC TGGTAGTCCA
781 CGCCGTAAC GATGAGTGCT AAGTGTTAGG GGGTTTCCGC CCCTTAGTGC TGCAGCTAAC
841 GCATTAAGCA CTCGCCTGG GGAGTACGGT CGCAAGACTG AACTCAAAG GAATTGACGG
901 GGGCCCGCAC AAGCGGTGGA GCATGTGGTT TAATTCGAAG CAACGCGAAG AACCTTACCA
961 GGTCTTGACA TCCTTGACA ATCCTAGAGA TAGGACGTCC CCTTCGGGGG CAGAGTGACA
1021 GGTGGTGCAT GGTGTGCGTC AGCTCGTGTG GTGAGATGTT GGGTTAAGTC CCGCAACGAG
1081 CGCAACCCTT GATCTTAGTT GCCAGCATTG AGTTGGGCAC TCTAAGGTGA CTGCCGGTGA
1141 CAAACCGGAG GAAGGTGGGG ATGACGTCAA ATCATCATGC CCCTTAGTGC CTGGGCTACA
1201 CACGTGCTAC AATGGGCAGA ACAAAGGGCA GCGAAACCGC GAGGTTAAGC CAATCCCACA
1261 AATCTGTTCT CAGTTCGGAT CGCAGTCTGC AACTCGACTG CGTGAAGCTG GAATCGCTAG
1321 TAATCGCGGA TCAGCATGCC GCGGTGAATA CGTCCCGGG CCTTGACAC ACCGCCCGTC
1381 ACACCACGAG AGTTTGTAAC ACCCGAAGTC GGTGAGGTAA CCTTTGGAGC CAGCCGCCGA
1441 AGGTGGACAG AGATTGG

K10

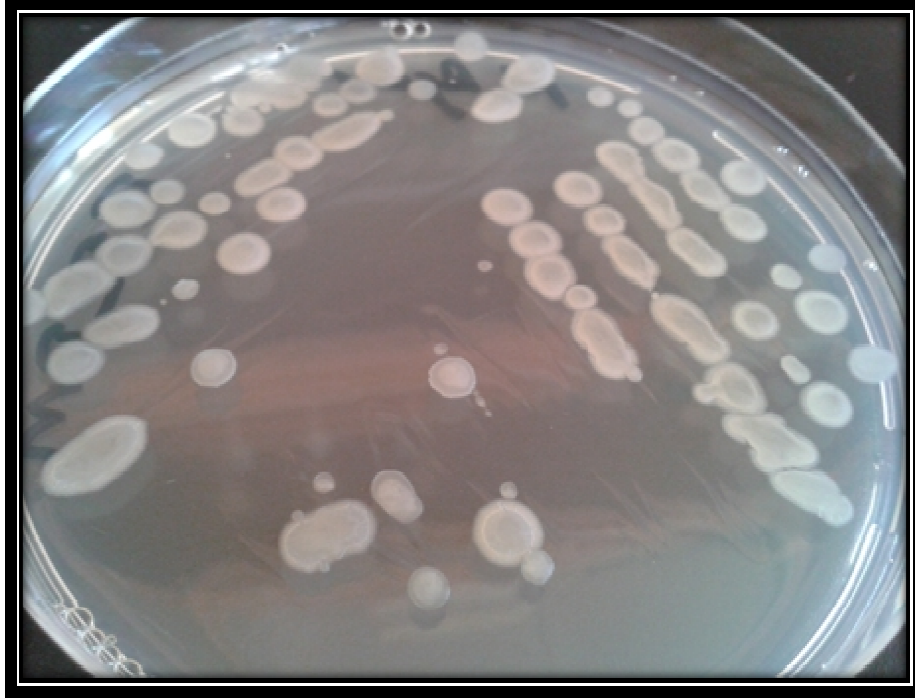
1 CGCGGCTGGC GCGTGCTAT ACTGCAGTCG AGCGGACAGA TGGGAGCTTG CTCCTGATG
61 TTAGCGGCGG ACGGGTGAGT AACACGTGGG TAACCTGCCT GTAAGACTGG GATAACTCCG
121 GGAAACCGGG GCTAATACCG GATGCTTGTT TGAACCGCAT GGTTGAGACA TAAAAGGTGG
181 CTTGCGCTAC CACTTACAGA TGGACCCGCG GCGCATTAGC TAGTTGGTGA GGTAACGGCT
241 CACCAAGGCA ACGATGCGTA GCCGACCTGA GAGGGTGATC GGCCACACTG GGAAGTGA
301 ACGGCCAGAGA CTCCTACGGG AGGCAGCAGT AGGGAATCTT CCGCAATGGA CGAAAGTCTG
361 ACGGAGCAAC GCCGCGTGAG TGATGAAGGT TTTCCGATCG TAAAGCTCTG TTGTTAGGGA
421 AGAACAAGTG CCGTTCAAAT AGGGCGGCAC CTTGACGGTA CCTAACCAGA AAGCCACGGC
481 TAACTACGTG CCAGCAGCCG CGGTAATACG TAGGTGGCAA GCGTTGTCCG GAATTATTGG
541 GCGTAAAGGG CTCGCAGGCG GTTTCTTAAG TCTGATGTGA AAGCCCCCG CTCAACCGGG
601 GAGGGTCATT GGAAACTGGG GAACTTGAGT GCAGAAGAGG AGAGTGGAAT TCCACGTGTA
661 GCGGTGAAAT GCGTAGAGAT GTGGAGGAAC ACCAGTGGCG AAGGCGACTC TCTGGTCTGT
721 AACTGACGCT GAGGAGCGAA AGCGTGGGGA GCGAACAGGA TTAGATACCC TGGTAGTCCA
781 CGCCGTAAC GATGAGTGCT AAGTGTTAGG GGGTTTCCGC CCCTTAGTGC TGCAGCTAAC
841 GCATTAAGCA CTCGCCTGG GGAGTACGGT CGCAAGACTG AACTCAAAG GAATTGACGG
901 GGGCCCGCAC AAGCGGTGGA GCATGTGGTT TAATTCGAAG CAACGCGAAR AACCTTACCA
961 GGTCTTGACA TCCTTGACA ATCCTAGAGA TAGGACGTCC CCTTCGGGGG CAGAGTGACA
1021 GGTGGTGCAT GGTGTGCGTC AGCTCGTGTG GTGAGATGTT GGGTTAAGTC CCGCAACGAG
1081 CGCAACCCTT GATCTTAGTT GCCAGCATTG AGTTGGGCAC TCTAAGGTGA CTGCCGGTGA
1141 CAAACCGGAG GAAGGTGGGG ATGACGTCAA ATCATCATGC CCCTTAGTGC CTGGGCTACA
1201 CACGTGCTAC AATGGGCAGA ACAAAGGGCA GCGAAACCGC GAGGTTAAGC CAATCCCACA

1261 AATCTGTTCT CAGTTCGGAT CGCAGTCTGC AACTCGACTG CGTGAAGCTG GAATCGCTAG
1321 TAATCGCGGA TCAGCATGCC GCGGTGAATA CGTTCCCGGG CCTTGTACAC ACCGCCCGTC
1381 ACACCACGAG AGTTTGTAAAC ACCCGAAGTC GGTGAGGTAA CCTTAGGAGC CAGCCGCCGA
1441 AGGTGTACAG AGATTGG

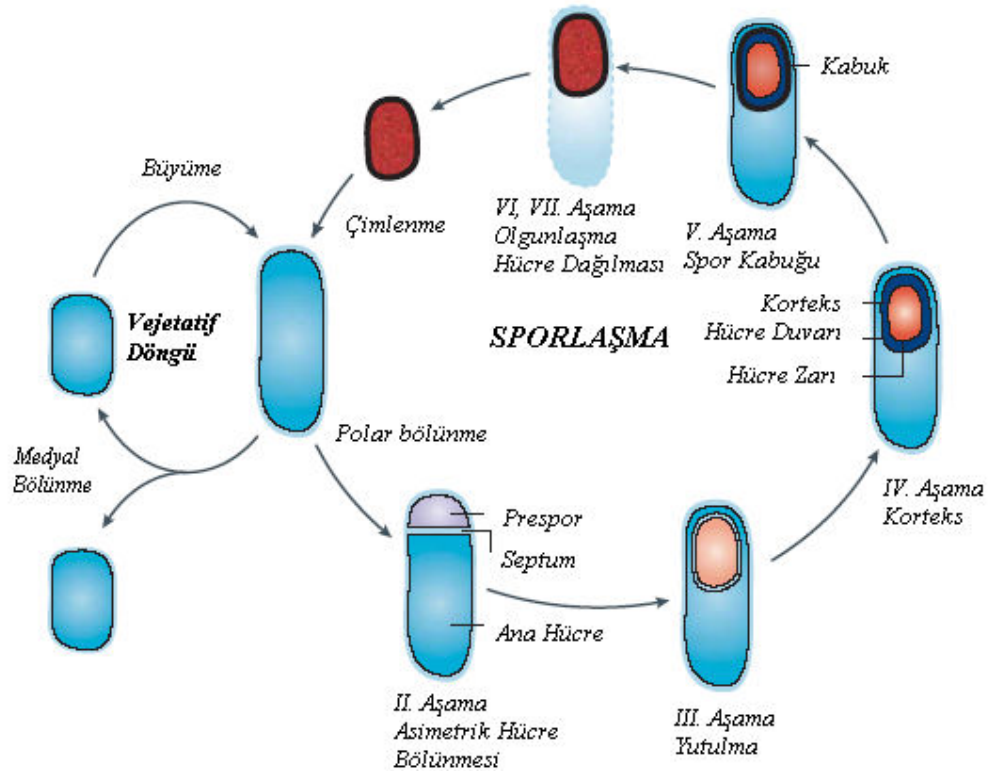
N8

1 GGA CTGGCGG CGTGCTATAC TGCAGTCGAG CGGACAGATG GGAGCTTGCT CCCTGATGTT
61 AGCGGCGGAC GGGTGAGTAA CACGTGGGTA ACCTGCCTGT AAGACTGGGA TAACTCCGGG
121 AAACCGGGGC TAATACCGGA TGGTTGTTT AACC GCATGG TTCAAACATA AAAGGTGGCT
181 TCGGCTACCA CTTACAGATG GACCCGCGGC GCATTAGCTA GTTGGTGAGG TAACGGCTCA
241 CCAAGGCAAC GATGCGTAGC GCACCTGAGA GGGTGATCGG CCACACTGGG ACTGAGACAC
301 GGCCAGACT CCTACGGGAG GCAGCAGTAG GGAATCTTCC GCAATGGACG AAAGTCTGAC
361 GGAGCAACGC CGCGTGAGTG ATGAAGGTTT TCGGATCGTA AAGCTCTGTT GTTAGGGAG
421 AACAAGTACC GTTCAATAG GCGGTACCT TGACGGTACC TAACCAGAAA GCCACGGCTA
481 ACTACGTGCC AGCAGCCGCG GTAATACGTA GGTGGCAAGC GTTGTCCGGA ATTATTGGGC
541 GTAAAGGGCT CGCAGGCGGT TTCTTAAGTC TGATGTGAAA GCCCCGGCT CAACCGGGGA
601 GGGTCATTGG AAAGTGGGGA ACTTGAGTGC AGAAGAGGAG AGTGGAATTC CACGTGTAGC
661 GGTGAAATGC GTAGAGATGT GGAGGAACAC CAGTGGCGAA GGCGACTCTC TGGTCTGTAA
721 CTGACGCTGA GGAGCGAAAG CGTGGGGAGC GAACAGGATT AGATACCCTG GTAGTCCACG
781 CCGTAAACGA TGAGTGCTAA GTGTTAGGGG GTTCCGCC CTTAGTGCTG CAGCTAACGC
841 ATTAAGCACT CCGCCTGGGG AGTACGGTCG CAAGACTGAA ACTCAAAGGA ATTGACGGGG
901 GCCCGCACAA GCGGTGGAGC ATGTGGTTTA ATTCGAAGCA ACGCGAAGAA CCTTACCAGG
961 TCTTGACATC CTCTGACAAT CCTAGAGATA GGACGTCCCC TTCGGGGGCA GAGTGACAGG
1021 TGGTGCATGG TTGTCGTCAG CTCGTGTCGT GAGATGTTGG GTTAAGTCCC GCAACGAGCG
1081 CAACCCTTGA TCTTAGTTGC CAGCATTAG TTGGGCACTC TAAGGTGACT GCCGGTGACA
1141 AACC GGAGGA AGGTGGGGAT GACGTCAAAT CATCATGCC CTTATGACCT GGGCTACACA
1201 CGTGCTACAA TGGACAGAAC AAAGGGCAGC GAAACCGCGA GGTTAAGCCA ATCCCACAAA
1261 TCTGTTCTCA GTTCGGATCG CAGTCTGCAA CTCGACTGCG TGAAGCTGGA ATCGCTAGTA
1321 ATCGCGGATC AGCATGCCGC GGTGAATACG TTCCCGGGCC TTGTACACAC CGCCCGTCAC
1381 ACCACGAGAG TTTGTAAAC CCGAAGTCGG TGAGGTAACC TTAGGAGCCA GCCGCCGAAG
1441 GTGACAGAGA TGGG

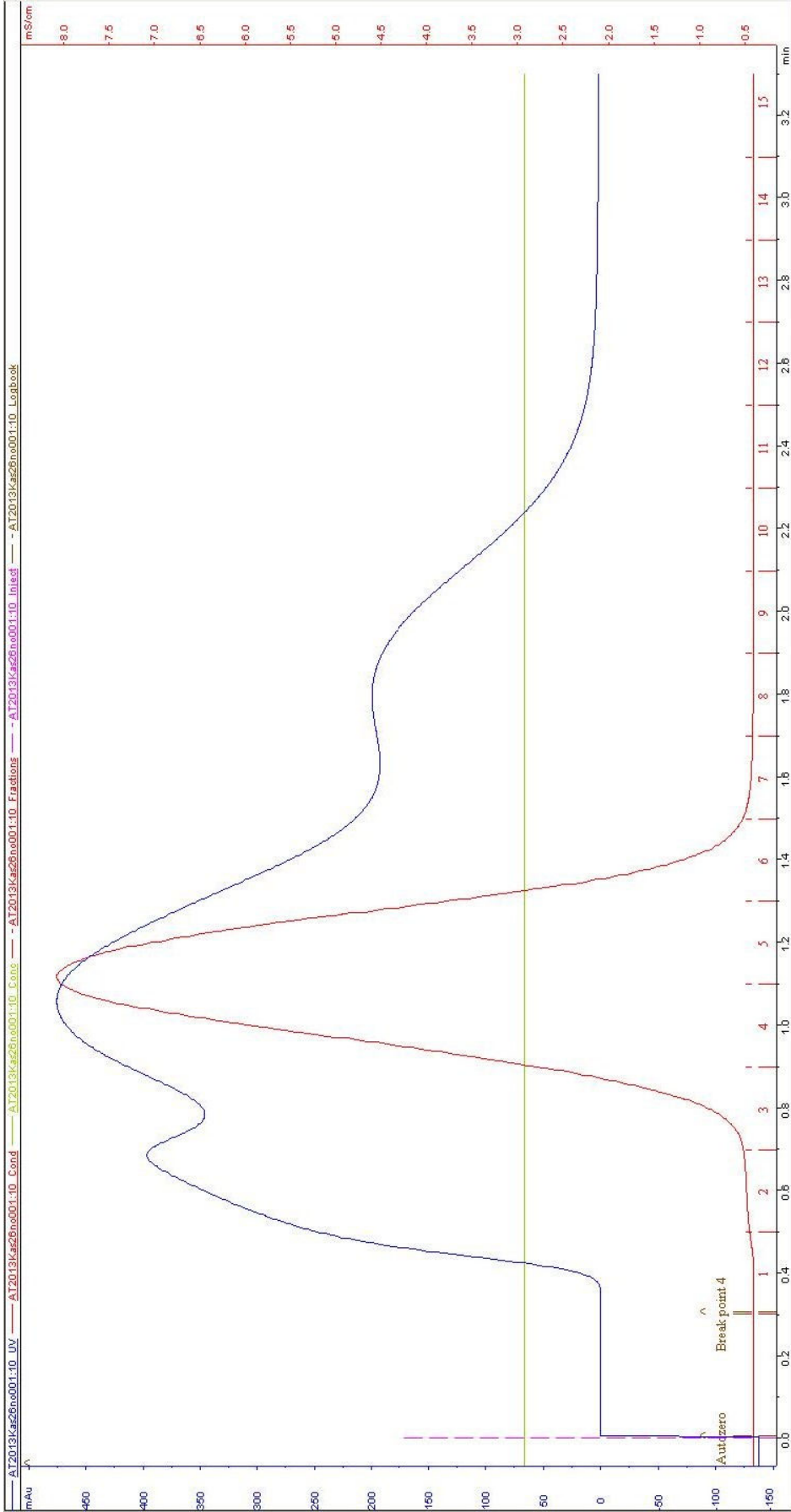
Ek 5. K1 suşunun nutrient agardaki koloni yapısı



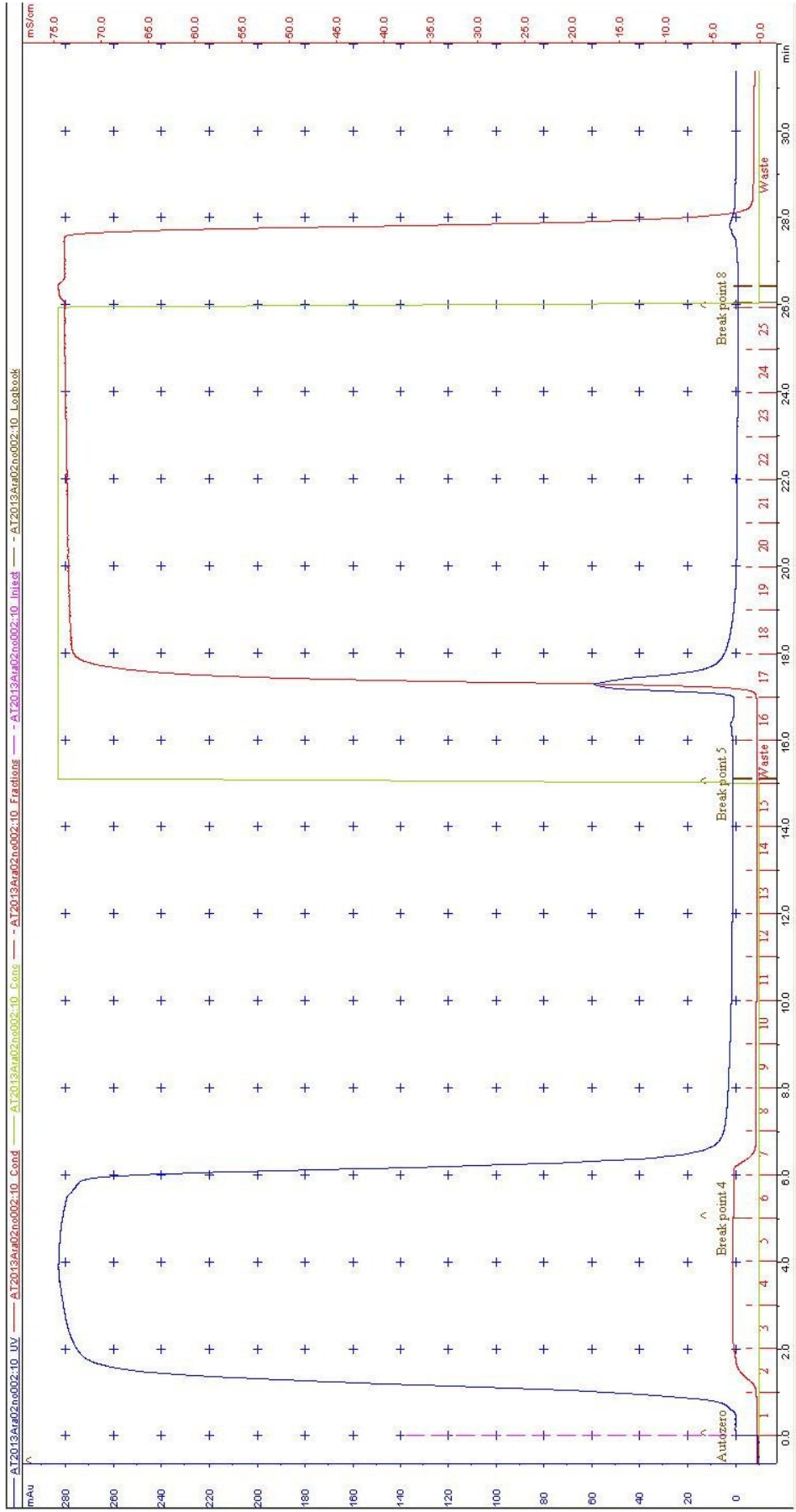
Ek 6. *Bacillus subtilis*'in sporlaşma döngüsü (Errington 2003)



Ek 7. Konsantr enzim çözeltilisinin afinite kromatografisinde kullanılan bağlayıcı tampon çözeltiliye adaptasyonu sırasındaki ekran görüntüsü



Ek 8. Afinite kromatografisi ile saflaştırma esasındaki ekran görüntüsü



ÖZGEÇMİŞ

Fundagül EREM 1982 yılında Bitlis'in Ahlat ilçesinde doğdu. İlkokulu Bitlis'in Tatvan ilçesinde, Mehmetçik İlköğretim Okulu'nda tamamladı. Ardından 1993 yılında Tatvan Anadolu Lisesi'ndeki eğitimine başladı, 1996 yılında Antalya Anadolu Lisesi'ne geçiş yaparak 2000 yılında bu okuldan mezun oldu. Daha sonra Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'ne giriş yaptı; 2004 yılında, fakülte birincisi ve yüksek onur öğrencisi olarak, Gıda Mühendisi ünvanı ile bu bölümden mezun oldu. Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda 2004-2007 yılları arasında yüksek lisans eğitimi aldıktan sonra 2008 yılında doktora eğitimine başladı. Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde 2005 yılının Ekim ayından itibaren Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.