



# Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi

Araştırma Makalesi

## Kilis Topraklarından İzole Edilen *Bacillus* B10 Suşunun Üreaz Üretimini İstatistiksel Optimizasyonu

 Hatice Aysun MERCİMEK TAKCI<sup>a,\*</sup>,  Pemra BAKIRHAN<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Fen Edebiyat Fakültesi, Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Kilis, TÜRKİYE

<sup>b</sup> Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Kilis, TÜRKİYE

\* Sorumlu yazarın e-posta adresi: mersimek@hotmail.com

DOI: 10.29130/dubited.912503

### ÖZ

Bu çalışmada Kilis ili toprak örneklerinden üreaz üretici *Bacillus* spp. suşları izole edilmiştir. B10 ve B11 olarak isimlendirilen suşlardan saflaştırılan intraselüler üreazın spesifik aktiviteleri  $1.38 \pm 0.07$  ve  $1.22 \pm 0.02$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 'dir. B10 suşunun üreaz üretimini arttırabilmek için "Design Expert statistical software" (Design Expert 8.0.7)'in kullanıldığı Box Behnken deneme planı uygulanmıştır. Maksimum üreaz üretimi %5.00 üre, %3.00 sükröz ve %2.00 et özütü içeren besi ortamında gözlenmiş ve optimum koşullardaki en yüksek spesifik aktivite  $1.498 \pm 0.05$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  olarak hesaplanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *Bacillus* spp., Box Behnken, Üreaz, Yüzey Yanıt Metodolojisi

## Statistical Optimization of Urease Production by *Bacillus* B10 Strain Isolated From Kilis Soils

### ABSTRACT

In this study, urease producer *Bacillus* spp. strains were isolated from Kilis soil samples. The specific activities of intracellular urease purified from strains named as B10 and B11 were  $1.38 \pm 0.07$  and  $1.22 \pm 0.02$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ . Box Behnken design using "Design Expert statistical software" (Design Expert 8.0.7) was applied to increase the urease production of B10 strain. Maximum urease production was observed in a medium containing 5.00% urea, 3.00% sucrose and 2.00% meat extract and the highest specific activity under optimum conditions was calculated as  $1.498 \pm 0.05$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ .

**Keywords:** *Bacillus* spp., Box Behnken, Urease, Surface Response Methodology

# I. GİRİŞ

Üreaz enzimi (üre amidohidrolaz E.C. 3.5.1.5), üreyi hidrolize ederek amonyak ve karbonik asit oluşturan bir enzimdir. Uluslararası Biyokimya Birliği (International Union Biochemistry) 1961 yılında aldığı karar ve 1972 yılında yaptığı revizyon ile üreaz enzimini E.C.3.5.1.5 şeklinde tanımlamıştır [1]. Üreaz enzimi ilk kez 1926 yılında James B. Sumner tarafından fasülye (*Canavalia ensiformis*) tohumundan kristalize edilmiştir [2]. Enzimin topraktaki varlığı ise ilk olarak 1935 yılında Rotini tarafından rapor edilmiştir. Bu süreyle birlikte ürenin gübreleme işlemi ve bitkilerdeki azot arzının düzenlenmesindeki önemli rolünden dolayı sürekli incelenen bir enzim olmuştur [3].

Ürenin hidrolizi normal şartlarda oldukça yavaş bir reaksiyon olup katalizörsüz tepkimeler sonucu oluşan ürünler amonyak ve siyanürik asittir. Ortamda katalizör sonucu oluşan ürünler ise amonyak ve karbonik asittir. Reaksiyonun son evresinde karbonik asit kendiliğinden parçalanarak karbondioksit ve amonyaka dönüşmektedir [4]. Aynı zamanda ürenin üreaz tarafından hidrolizi sonucunda karbamat ( $H_2CO_3$ )<sup>2</sup> oluşmaktadır. Oluşan karbamat kendiliğinden ayrışarak başka bir amonyak ve karbonik asit molekülünü üretir. İki amonyak molekülü ve karbonik asit daha sonra sudaki protonu giderilmiş ve protonlanmış formlarıyla dengelenir, bu da kalsiyumun kristaller halinde çökmesine neden olan pH'da bir artışla sonuçlanır [5].

Üreaz enzimi ilk kristalleşen enzim ve nikel iyonlarının varlığının saptandığı ilk enzimatik proteindir. Ayrıca enzimin uzun süreli hastalıklar dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarda gerekli olan bir virülans faktör olabileceği de gösterilmiştir [6]. Üreaz enziminin üç boyutlu yapısı 1930'lu yıllarda X ışını kristalografisi ile belirlenmiş olsa bile bu yapının aydınlatılması 1967 yıllarında bilgisayar teknolojisinin gelişmesiyle mümkün olmuştur [7]. Bakteriyel üreazlarda büyük alt birim olan  $\alpha$  alt birimi 60-70 kDa ve iki küçük alt birim olarak ifade edilen  $\beta$  ve  $\gamma$  alt birimlerinin moleküler ağırlıkları sırasıyla 8-21 kDa ve 6-14 kDa ağırlığındadır [8].

Üreaz enziminin, gıda numunelerinde, endüstriyel atık sularda, yer altı sularında ve çevresel ağır metal iyonlarının saptanmasında model enzim olarak [9], üreyi meyve sularından, yiyeceklerden uzaklaştırmak amaçlı [7], şaraptan üreyi uzaklaştırarak etil karbamat oluşumunu önlemek için [10], kemoterapötiklerin alımını arttırmak [10], immünoglobulin tepkisini uyarabilen bir antijen olarak [10] ve son yirmi yılda ise biyoçimento yapımında ürolitik aktivite gösteren mikroorganizmaların kullanımı olmak üzere pek çok farklı endüstriyel kullanımı mevcuttur [11].

Endüstriyel açıdan önemli suşlar içeren, kolay izole edilebilen ve az sayıda patojen suş içeren *Bacillus* türleri biyoteknolojik ve moleküler biyoloji çalışmalarında tercih edilen suşlar arasında geniş yer tutmaktadır. Bu sebeple çalışmamızda ürolitik aktiviteye sahip *Bacillus* spp. suşlarının Kilis 7 Aralık Üniversitesi toprağından izole edilmesi, bu suşlardan üreazın kısmi saflaştırılması, aktivite tayininin araştırılması ve üreaz üretim ortamının istatistiksel optimizasyonu amaçlanmıştır.

## II. MATERYAL VE YÖNTEM

### **A. YÖNTEM**

#### **A. 1. *Bacillus* spp. Suşlarının İzolasyonu ve Stoklanması**

Kilis ili topraklarından alınan örnekler sporların aktifleşmesi için 65°C'de 30 dak su banyosunda inkübe edilmiştir. Seri sulandırma yapılarak 100 µL örnek alınıp Nutrient Agar içeren plaklara yayma preparasyon şeklinde inoküle edilmiştir. 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılan petri plaklarından tek düşmüş koloniler seçilmiştir. Seçilen kolonilerin gram boyanma ve spor oluşturma karakterleri incelenmiştir. *Bacillus* spp. olduğu belirlenen suşların üreaz sentezinin belirlenmesi açısından Christensen Üre Agara çizgi ekim şeklinde inoküle edilip 37°C'de 24-48 saat inkübasyona

birakılmıştır. İnkübasyon süresi boyunca kontrol edilen kültürlerde pembe renk oluşumu takip edilmiştir. Gram boyanma karakterlerine göre test edilen üreaz üretici suşların 37°C’de geliştirilmiş bir gecelik Luria-Bertani broth kültürlerine toplam hacmin %20’si steril gliserol olacak şekilde eklenmiş ve steril eppendorf tüplerindeki bu karışım -20°C’de saklanmıştır. Ayrıca suşlar her 6 ayda bir pasajlama yapılmak üzere Nutrient Agar içeren eğik kültürlere inoküle edilmiştir.

## A. 2. İntraselüler Üreazın Kısmi Saflaştırılması

5 mL Luria-Bertani Broth içeren tüplerdeki suşların bir gecelik ön üretimi sonrasında kültürlerin yoğunluğu Mac Farland 0.5 bulanıklığına ayarlanmıştır. İçerisinde 45 mL enzim fermentasyon (1 g/L et peptonu; 2 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1 g/L glukoz; 5 g/L NaCl; 100 mM/L üre, pH 6.8±0.2) ortamı bulunan 250 mL’lik burgulu kapaklı şişelere aktarılarak 37°C’de 180 rpm çalkalama hızında 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben saflaştırma basamakları uygulanmıştır. 50 mL’lik steril falkonlara alınan kültürler 5500 rpm 20 dakika +4°C’de santrifüj edilmiştir. Ve besiyerinden uzaklaştırılan hücreler enzim saflaştırılması için lizozim çözeltisi ile 5 dakikalık total periyotta parçalanmıştır. Hücreler 30 saniye de bir sonikatör ve akabinde 30 saniye buz üzerinde bekletilerek süreç tamamlanmıştır. Falkon tüplerindeki örnekler 5500 rpm’de 20 dakika +4°C’de santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra süpernatantlar ayrı eppendorflara alınıp sonraki analizler için +4°C’de saklanmıştır.

## A. 3. Üreaz Aktivite Tayini

Üreaz aktivitesi Berthelot yöntemine göre uygulanmıştır [12]. 1.95 mL üre çözeltisine 50 µL enzim eklenerek 5 dak oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası karışıma 500 µL fenol reaktifi (eşit hacimde karıştırılmış %10 fenol (w/v); %0.05 sodyumnitroprussid (w/v)) ve 500 µL alkali hipoklorid (eşit hacimde karıştırılmış %5 NaOH (w/v); %2.6 NaOCl (v/v)) eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Tüpler 55°C’de 5 dak su banyosunda bekletilerek üreaz aktivitesini işaret eden mavi renk oluşumu kontrol edilmiştir. Reaksiyon tüpleri 630 nm dalga boyunda UV-Visible spektrofotometrede köre karşı okutulmuştur. Kör olarak enzim bulundurmayan saf su içeren tüpler kullanılmıştır. Tüm aktivite tayinleri 3 tekrarlı yürütülmüştür [7]. Standart çalışma grafiğinin hazırlanması için 0-0.5 µmol/mL konsantrasyonlarda amonyum sülfat çözeltileri kullanılmıştır. Yukarıda verilen üreaz aktivite tayin metodu uygulanarak 630 nm’de absorbans değerleri okunmuştur. Üreaz aktivitesi, reaksiyon sonunda ortaya çıkan ürün miktarı cinsinden çizdirilen eğriden elde edilen eğim değerine göre hesaplanmıştır. Üreaz aktivitesinin bir ünitesi 37°C’de dakikada 1 µmol üre hidrolizasyonu için gerekli enzim miktarıdır. Total protein miktarı Lowry ve ark. (1951) tarafından bildirilen metoda göre belirlenmiştir [13]. Enzimin spesifik aktivitesi 1 miligram toplam proteindeki aktivite olarak hesaplanmıştır.

## A. 4. Üreaz Fermantasyon Ortamının Optimizasyonu

Box Behnken deneysel tasarım modeli ile en yüksek enzim aktivitesi gösteren suş için fermantasyon ortamının optimizasyon çalışması sürdürülmüştür. Box Behnken deneysel modelinde kullanılan bağımsız değişkenler Tablo 1’de verilmiştir.

*Tablo 1. Modelde incelenen parametrelerin seviye değerleri*

Seviye No	Üre (%)	Sükroz (%)	Et özütü (%)
-1	2.00	1.00	1.00
0	3.50	2.00	2.00
1	5.00	3.00	3.00

Box-Behnken, 2 seviyeli 3 faktöriyellik tasarımda tüm değişkenlerin (X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> ve X<sub>3</sub>) orta değerlerinin alındığı merkez noktada toplamda 15 adet deney noktası içermektedir. 3 adet bağımsız değişkenin belirlendiği modelde tüm analizler 3 tekrarlı yürütülmüştür (Tablo 2).

**Tablo 2.** Üç bağımsız değişken için Box-Behnken deneme planı, 3 merkez noktalı (1, 10 ve 13) 15 deney

Deney No	X <sub>1</sub> (üre)	X <sub>2</sub> (sükroz)	X <sub>3</sub> (et özütü)
1	0	0	0
2	1	0	-1
3	-1	-1	0
4	1	1	0
5	-1	0	1
6	-1	1	0
7	-1	0	-1
8	1	0	1
9	0	1	-1
10	0	0	0
11	0	-1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	1	-1	0
15	0	-1	-1

Daha yüksek enzim aktivitesi elde etmek amacıyla fermantasyon ortamına modele uygun konsantrasyonda değişkenler eklenerek enzim saflaştırılma ve aktivite çalışmaları sürdürülmüştür.

## B. İSTATİKSEL ANALİZLER

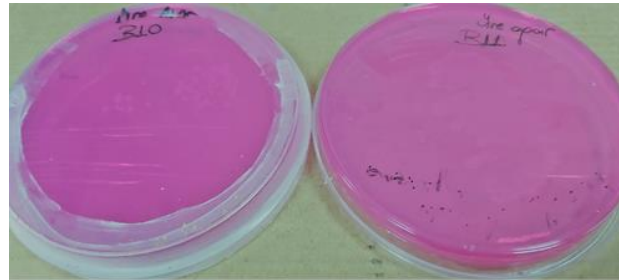
Tablo 2’de verilen deney planına göre üç bağımsız değişkenin incelendiği 2 dereceden yanıt yüzey modelinde polinomal denklem kullanılarak her bir faktör değerlendirilmiştir. Modele ilişkin eşitlik aşağıda verilmiştir.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^N \beta_i \times X_i + \sum_{i=1}^N \beta_{ii} \times X_i^2 + \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=i+1}^N \beta_{ij} \times X_{ij}$$

Buna göre Y sistemin cevabı, N değişken sayısı (N=3), X<sub>i</sub> ve X<sub>ij</sub> bağımsız değişken, β<sub>0</sub>, β<sub>i</sub>, β<sub>ii</sub> ve β<sub>ij</sub> sabit ve modelin regresyon katsayısını ifade etmektedir. Veri analizleri için “Design Expert statistical software” (Design Expert 8.0.7) kullanılmıştır. Modelin uyumluluğu kuadratik model varyans analizi (ANOVA) ile test edilmiştir.

## III. BULGULAR VE TARTIŞMA

Christensen Üre Agara inoküle edilen izolatlar tarafından sentezlenen üreaz enzimi besi ortamındaki üreyi NH<sub>3</sub> ve CO<sub>2</sub>’e hidrolize etmektedir. NH<sub>3</sub> meydana gelmesi besi ortamının pH’sının yükselmesi ile birlikte indikatörün renginin değişmesine neden olmaktadır. Fenol kırmızısının düşük pH’daki sarı renginin bazik ortamda pembeye dönüşmesi besi ortamında üreaz varlığına işaret etmektedir. Gr (+) karakterli ve sporlu olduğu belirlenen 20 adet *Bacillus* spp. izolatlarından 2 tanesinin üreaz üreticisi olduğu belirlenmiştir (Şekil 1).



**Şekil 1.** B10 ve B11 izolatlarının Christensen Üre Agardaki aktivitesi

Ekim çizgileri etrafında pembe rengin gözleendiği iki izolat B10 ve B11 olarak isimlendirilmiş ve enzim üretim çalışmalarında kullanılmak üzere stoklanmıştır. Mols ve Abee (2008) klinik, çevre, gıda kökenli ve standart suşları içeren 49 *Bacillus cereus* izolatında ürolitik aktiviteleri incelemiş ve suşların 9'unda sarı rengin pembeye dönüşümüne ilişkin üreaz aktivitesi belirlemiştir [14]. Benzer bir çalışmada, Kore soya temelli fermantasyon gıdalarından izole edilen 90 *Bacillus licheniformis* suşunda Christensen Üre Agardaki renk değişimi araştırılmış ve fenotipik olarak üreaz aktiviteleri test edilmiştir [15]. İntraselüler üreaz enzim örneklerinin total ve spesifik aktiviteleri Tablo 3'te gösterilmiştir.

**Tablo 3. İntraselüler üreaz örneklerinin total ve spesifik aktivitesi**

<b>Enzim örnek</b>	<b>Total Aktivite (EU/mL/min)</b>	<b>Total Protein miktarı (mg/mL)</b>	<b>Spesifik aktivite (µmol/min/mg)</b>
<b>B10</b>	2.26±0.11	1.64±0.00	1.38±0.07
<b>B11</b>	1.53±0.02	1.25±0.01	1.22±0.02

Bu aktivite sonuçlarına göre B10 izolatından elde edilen üreaz enziminin aktivitesi 2.26±0.11 EU/mL/min olup, B11 örneğinde hesaplanan (1.53±0.02 EU/mL/min) aktiviteden daha yüksektir. Örneklerin total protein miktarlarında belirgin bir farklılık olmamakla birlikte, B11 örneğinden elde edilen protein miktarı 1.25±0.01 mg/mL'dir. B10 üreaz preparatının total protein miktarı (1.64±0.00 mg/mL) bu değerden yüksektir. Spesifik aktivite analiz sonuçları değerlendirildiğinde, B10 üreaz örneği için hesaplanan spesifik aktivite (1.38±0.07 µmol/min/mg), protein miktarının yüksek olmasına bağlı olarak B11 için elde edilen aktiviteden (1.22±0.02 µmol/min/mg) yüksektir. Aktivite analiz sonuçlarına dayanarak üreaz üretim ortamının optimizasyonu çalışmalarına B10 izolatı ile devam edilmiştir.

Tepe ve ark. (2019) Deniz'inin kalkerli topraklarından izole ettikleri *Bacillus amyloliquefaciens* U17 izolatını üre eklenmiş Luria-Bertani besiyeri ve kalsiyum mineralizasyon besi ortamında geliştirerek üreaz üretim kapasitesini ve aktivitesini test etmişlerdir [16]. Üre eklenmiş Luria-Bertani besiyerinde gelişimi takiben saflaştırılan üreaz enziminin spesifik aktivitesi 1.315±0.021 µmol/min/mg olarak kaydedilmiştir. Belirtilen bu değer B10 izolatı için hesaplanan spesifik aktivite değerinden 1.38±0.07 µmol/min/mg) düşük, ancak B11 suşunun aktivitesinden (1.22±0.02 µmol/min/mg) yüksektir. Fonksiyonel üreaz aktivitesi gösteren *B. subtilis* SF10 hücrelerinin minimal besi ortamında geliştirilmesi sonucu elde edilen en düşük spesifik aktivite 0.113±0.006 U/mg olarak belirlenmiştir. Kültüre 100 µM NiCl<sub>2</sub> eklenerek üreaz aktivitesi arttırılmaya çalışılmış ancak hesaplanan spesifik aktivite 0.107±0.016 U/mg ile sınırlı kalmıştır.

Kim ve ark. (2015) tarafından yapılan bu çalışmada kazanılan aktivite, optimizasyon çalışmaları öncesinde hesaplanan spesifik aktivite (1.22±0.02 ve 1.38±0.07 µmol/min/mg) değerlerimizden oldukça düşüktür [17]. Bozbeğolu ve ark. (2019) tarafından İsrail nehrinden (Denizli) izole edilen *Bacillus aerius* U2 suşunun üreaz aktivitesi araştırılmış ve üre eklenmiş Luria-Bertani besiyerinde gelişimi takiben 1.52±0.1 µmol/min/mg spesifik aktivite kaydedilmiştir [18]. Kalsiyum presipitasyon besiyerinde belirlenen spesifik aktivite 0.44±0.02 µmol/min/mg'dır. Üre eklenmiş Luria-Bertani besiyerinde kazanılan spesifik aktivite çalışmamızda her iki suş için kaydedilen aktiviteden (1.22±0.02 ve 1.38±0.07 µmol/min/mg) yüksektir.

*Bacillus* spp. türleri ile yapılan diğer bir çalışmada ise, Shoolini Üniversitesi (Hindistan) toprak örneklerinden izole edilen suşlar arasındaki total üreaz aktivitesi 0.192-0.88 U/mL olarak kaydedilmiştir. Bu aktivite değerleri çalışmamızda her iki suş için gözlenen aktivite aralıklarından oldukça düşüktür [8].

*Bacillus*, *Klebsiella* ve *Streptomyces* spp. suşlarının kullanıldığı diğer bir çalışmada, bakteriyel üreazın saflaştırılması çalışmaları sürdürülmüştür. 16 bakteriyel izolat arasında 3 *Streptomyces* spp. suşunun üreaz üreticisi olduğu belirlenmiş ve saflaştırılan üreazların total aktivitesi 0.138, 0.127 ve 0.121 U/mL olarak belirtilmiştir [19]. Çalışmamızda B10 ve B11 üreaz moleküllerinden elde edilen aktivite

2.26±0.11 ve 1.53±0.02 EU/mL/min olup, *Streptomyces* spp. türleri için belirlenen aktiviteden yüksektir.

B10 suşunun üreaz üretimini arttırabilmek için üre, süzkroz ve et özütü gibi bazı önemli faktörlerin etkisi “Design Expert statistical software” (Design Expert 8.0.7) kullanıldığı Box Behnken deneme planı uygulanarak incelenmiştir. Modelin hesaplanan korelasyon katsayısı ( $R^2$  0.9828) söz konusu modelin, deneysel verileri ile tahmin edilen verilerinin tutarlı olduğunu göstermektedir. Her bir bağımsız değişkenin üreaz ekspresyonu üzerindeki etkisi ANOVA varyans analizi ile belirlenmiş olup, her bir katsayının önemini gösteren P ve F değerleri Tablo 4’te gösterilmiştir.

**Tablo 4.** Enzim üretiminin kuadratik polinomal modeli için varyans analizi (ANOVA)

ANOVA for Response Surface Quadratic Model						
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]						
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	0.56	9	0.063	31.77	0.0007	significant
A-üre	0.54	1	0.54	275.65	< 0.0001	
B-sükroz	3.280E-003	1	3.280E-003	1.66	0.2535	
C-et özütü	3.612E-005	1	3.612E-005	0.018	0.8976	
AB	4.032E-003	1	4.032E-003	2.05	0.2121	
AC	1.369E-003	1	1.369E-003	0.69	0.4426	
BC	3.906E-003	1	3.906E-003	1.98	0.2183	
A <sup>2</sup>	2.464E-003	1	2.464E-003	1.25	0.3144	
B <sup>2</sup>	2.054E-003	1	2.054E-003	1.04	0.3542	
C <sup>2</sup>	4.227E-003	1	4.227E-003	2.14	0.2030	

Prob>F değerinin 0.05’ten küçük olan etkiler önemli olarak değerlendirilmiştir. 31.77 F değerli modelin p değeri 0.0007’dir. Buna göre önerilen modelin, bağımsız değişkenler ile üreaz üretimi arasındaki ilişkinin anlamlı olduğunu göstermektedir. Tablo 4’teki p değerlerine bakıldığında, sadece X<sub>1</sub> faktörünün yani besi ortamına eklenen üre konsantrasyonundaki artışın (<0.0001) üreaz ekspresyon seviyesi üzerinde etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir. Modelde test edilen diğer bağımsız değişkenlerin enzim üretim kapasitesi üzerinde etkisi önemli bulunmamıştır.

Optimizasyon çalışmaları sonucunda spesifik aktivite ve üç bağımsız değişken arasındaki ilişkiyi ortaya koyan regresyon eşitliği aşağıda verilmiştir.

$$\text{Üreaz enzimi} = +1.26 + 0.26X_1 + 0.020X_2 - 2.125E-003X_3 + 0.032X_1 * X_2 + 0.018X_1 * X_3 - 0.031X_2 * X_3 - 0.026X_1^2 - 0.024X_2^2 - 0.034X_3^2$$

Regresyon eşitliğine göre,  $\beta_i$  (+0.26) katsayısının pozitif değeri besi ortamındaki üre konsantrasyonunun %2’den %5’e artışının üreazın ekspresyon seviyesini arttırdığını ifade etmektedir. Besi ortamına eklenen süzkroz konsantrasyonu artışının pozitif  $\beta_{ii}$  (+0.018) katsayısı enzim üretimini arttırdığını göstermektedir. Ancak bu etkinin p değerinin (0.2535) 0.05’ten büyük olması istatistiksel olarak anlamlı olmadığını göstermektedir. Benzer şekilde et özütü içeriğinin katsayısının  $\beta_{ij}$  (-2.125E-003) negatif değeri besi ortamındaki konsantrasyon artışının (%1’den %3’e) B10 suşunun üreaz üretimini azalttığını ancak modele göre bu etki anlamsız (p değeri 0.8976) bulunmuştur. Üreazın

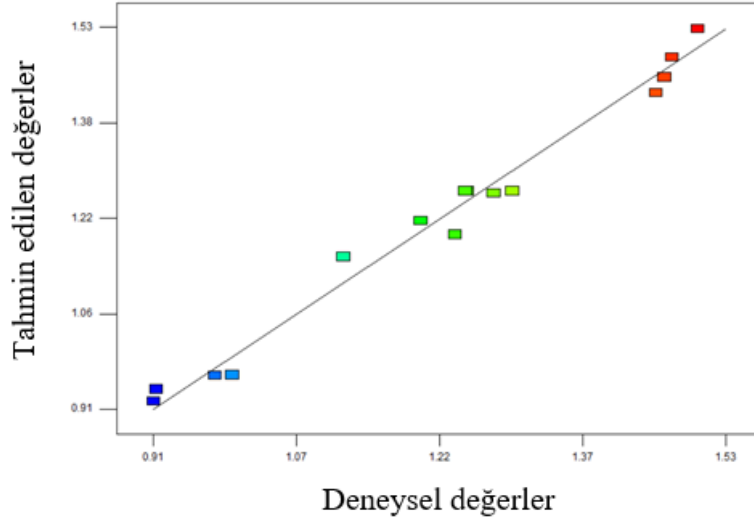
ekspresyon seviyesi üzerinde anlamlı etki gösteren tek bağımsız değişken üre konsantrasyonudur ( $\beta_1$  (+0.26)).

Üre, sükröz ve et özütünün farklı konsantrasyonlarını içeren 15 deneysel besi ortamından saflaştırılan üreaz enziminin spesifik aktivitesine ilişkin deneysel ve tahmin edilen değerler Tablo 5'te verilmiştir.

*Tablo 5. B10 suşunun üreaz üretimi için deneysel ve tahmin edilen spesifik aktivite değerleri*

Deneme no	Üre (%)	Sükröz (%)	Et özütü (%)	Spesifik aktivite ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ )	
	X1	X2	X3	Deneysel	Tahmin Edilen
1	3.50	2.00	2.00	1.249	1.26
2	5.00	2.00	1.00	1.462	1.45
3	2.00	1.00	2.00	0.996	0.95
<b>4</b>	<b>5.00</b>	<b>3.00</b>	<b>2.00</b>	<b>1.498</b>	<b>1.51</b>
5	2.00	2.00	3.00	0.911	0.93
6	2.00	3.00	2.00	0.914	0.95
7	2.00	2.00	1.00	0.977	0.96
8	5.00	2.00	3.00	1.470	1.48
9	3.50	3.00	1.00	1.278	1.26
10	3.50	2.00	2.00	1.247	1.26
11	3.50	1.00	3.00	1.199	1.22
12	3.50	3.00	3.00	1.236	1.21
13	3.50	2.00	2.00	1.298	1.26
14	5.00	1.00	2.00	1.453	1.44
15	3.50	1.00	1.00	1.116	1.17

Tahmin edilen ve deneysel değerler arasındaki ilişki Şekil 2’de verilmiştir.

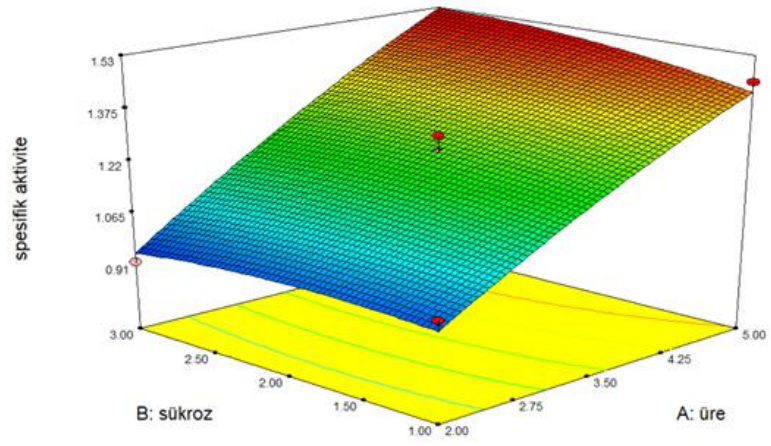


*Şekil 2. Spesifik aktivite için deneysel ve tahmin edilen değerlerin uyumluluk grafiği*

Üreaz üretimi için çizdirilen üç boyutlu yanıt yüzey grafikleri Şekil 3’te verilmiştir.

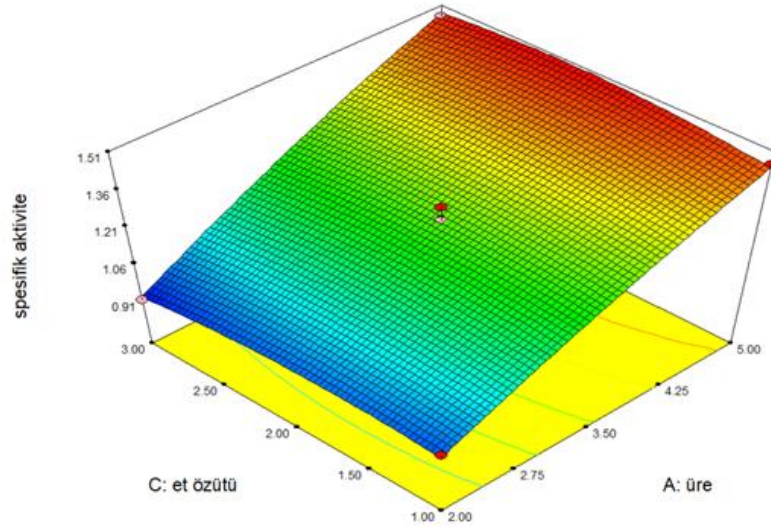
spesifik aktivite  
1.498  
0.911  
X1 = A: üre  
X2 = B: sükröz  
Actual Factor  
C: et özütü = 2.00

A



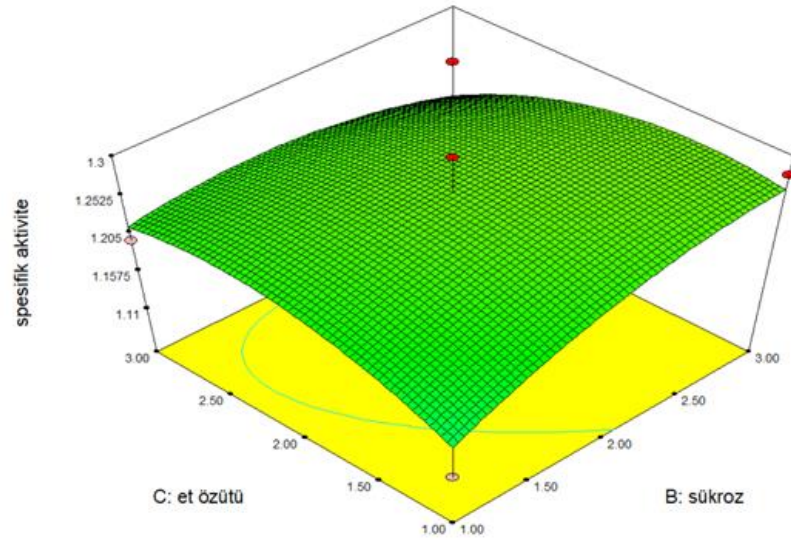
Design-Expert® Software  
spesifik aktivite  
1.498  
0.911  
X1 = A: üre  
X2 = C: et özütü  
Actual Factor  
B: sükröz = 2.00

B



Design-Expert® Software  
spesifik aktivite  
1.498  
0.911  
X1 = B: sükröz  
X2 = C: et özütü  
Actual Factor  
A: üre = 3.50

C



Şekil 3. B10 suşunun üreaz enzimi üretimi üzerinde üre, sükröz ve et özütü konsantrasyonlarının kombine etkilerinin yüzey yanıt grafiği



Bu model kullanılarak maksimum üreaz üretimi %5.00 üre, %3.00 sükröz ve %2.00 et özütü içeren besi ortamında gözlenmiştir. Ekspresyon artışı için belirlenen optimum koşullardaki tahmin edilen spesifik aktivite 1.51  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 'dir. Belirlenen değer 1.498 $\pm$ 0.05  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  olup enzim üretimi için modele uygundur. Bu değer B10 suşunun optimizasyon çalışmaları öncesinde belirlenen spesifik aktivite değerinden (1.38 $\pm$ 0.07  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ) yüksektir.

Omoregie ve ark. (2017) üreaz aktivitesi üzerinde kültür koşullarının etkisini 25-30°C, pH 6.5-8.0, 24 saat inkübasyon ve %6-8 (w/v) üre konsantrasyon ortamında sürdürülen optimizasyon çalışmalarında incelemişlerdir. NB33 izolatu için en yüksek spesifik üreaz aktivitesini %8 (w/v) üreaz içeren ortamda 30°C ve pH 6.5'da inkübasyon sonunda elde etmişlerdir [20]. Çalışmamıza benzer şekilde üreaz konsantrasyonundaki artışın enzim aktivitesini artırdığı belirlenmiştir. *Bacillus halodurans* PO15 suşu ile sürdürülen üreaz ortamının Box-Behnken deneysel modeli temelli istatistiksel optimizasyonu çalışmalarında, 28 U/mL başlangıç enzim aktivitesinin yaklaşık 10 kat arttırıldığı rapor edilmiştir [21]. *Bacillus megaterium* tara26 suşu üzerinde sürdürülen ve çalışmamıza benzer değişkenlerin test edildiği analizde ise, üre (0.8 M), et özütü (%0.1) ve ksiloz (%0.2) içeren optimize besi ortamında en yüksek üreaz aktivitesi 0.48 U/mL olarak kaydedilmiştir [22]. Enzim üretimi sıcaklık, pH, besinler, inokülasyon miktarı, indükleyici konsantrasyonu ve inkübasyon süresi gibi çeşitli proses değişkenlerine bağlıdır.

Klasik besiyeri optimizasyon çalışmaları tüm değişkenlerin sabit bırakılarak sadece bir bağımsız parametrenin değiştirilmesini içermektedir. Oysaki tek faktörlü optimizasyon denemeleri son derece zaman alıcı, fazla değişken sayısı için pahalı ve genellikle yanlış sonuçlar veren yöntemlerdir. Bu sebeple yanıt yüzey metodolojisi (RSM) gibi istatistiksel temelli yaklaşımlar, tek faktörlü optimizasyon sürecinin sınırlamalarının ortadan kaldırmaktadır. Ayrıca, daha az deneme gerektiren bu proses çok sayıda değişkeni ve aralarındaki etkileşimlerin incelenmesine olanak vermektedir.

## **IV. SONUÇ**

Bu çalışma, üreolitik aktivite gösteren Kilis izolatu *Bacillus* spp.'den üreaz üretiminin istatistiksel optimizasyonuna ilişkin ilk rapordur. %5.00 üre, %3.00 sükröz ve %2.00 et özütü içeren besi ortamında başlangıç spesifik enzim aktivitesinin 1.498 $\pm$ 0.05  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 'a kadar arttığı belirlenmiştir. Box-Behnken deneysel modeline göre enzim üretimi üzerindeki en önemli faktörün üre miktarı olduğu tespit edilmiştir. İleri ki çalışmalarımızda optimize edilmiş koşullarda geliştirilen *Bacillus* spp. suşunun pekçok çevre mühendisliği alanında uygulanan mikrobiyolojik kalsiyum karbonat çökeltmesi analizleri test edilecektir.

**TEŞEKKÜR:** Çalışmamızda Kilis 7 Aralık Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tarafından onaylanan "Üreaz Üreticisi *Bacillus* spp. Mineralizasyonu ile CaCO<sub>3</sub>'ün Presipitasyonu ve Karakterizasyonu" konulu tezin verilerinden yararlanılmıştır. Bu sebeple Kilis 7 Aralık Üniversitesi'ne teşekkürlerimizi sunarız.

## **V. KAYNAKLAR**

[1] F. Kara, G. Demirel and H. Tümtürk, "Immobilization of Urease b Using Chitosan–Alginate and Poly (Acrylamide-Co-Acrylic Acid)/K-Carrageenan Supports," *Bioprocess and Biosystems Engineering*, vol. 29, no. 3, pp. 207-211, 2006.

[2] N. Güleşçi, "Üreaz enziminin magnetik nanopartiküllere farklı ara kollar üzerinden immobilizasyonu ve karakterizasyonu," Doktora Tezi, Kimya, Çukurova Üniversitesi, Adana, Türkiye, 2013.

- [3] S. Ciurli, C. Marzadori, S. Benini, S. Deiana and C. Gessa, "Urease from the Soil Bacterium *Bacillus pasteurii*: Immobilization on Ca-polygalacturonate," *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 28, no. 6, pp. 811-817, 1996.
- [4] R.L. Blakeley and B. Zerner, "Jack Bean Urease: The First Nickel Enzyme," *Journal of Molecular Catalysis*, vol. 23, no. 3, pp. 263-292, 1984.
- [5] V. Anitha, K. Abinaya, S. Prakash, A. Seshagiri Rao and B. Vanavil, "*Bacillus cereus* KLUVAA Mediated Bio cement Production Using Hard Water and Urea," *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, vol. 32, no. 2, pp. 257-266, 2018.
- [6] I. Konieczna, P. Zarnowiec, M. Kwinkowski, B. Kolesinska, J. Fraczyk, Z. Kaminski and W. Kaca, "Bacterial urease and its role in long-lasting human diseases," *Current Protein and Peptide Science*, vol. 13, no. 8, pp. 789-806, 2012.
- [7] D. Örnek Acar, "Üreaz enziminin Ca-alginat üzerine immobilizasyon koşullarının incelenmesi," Yüksek Lisans Tezi, Kimya, Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın, Türkiye, 2009.
- [8] A. Agarwal, S. Banerje and K. Dev, "Comparative Characterization of Urease Secreting Bacterial and Fungal Isolates from Soil Sample of Farm Fields," *International Journal of Advanced Scientific and Technical Research*, vol. 4, no. 5, pp. 138-150, 2015.
- [9] R. Ramesh, M. Aarthy, M.K. Gowthaman, K. Gabrovska, T. Godjevargova and N.R. Kamini, "Screening and production of a potent extracellular *Arthrobacter creatinolyticus* urease for determination of heavy metal ions," *Journal of Basic Microbiology*, vol. 54, no. 4, pp. 285-295, 2014.
- [10] B. Sujoy and A. Aparna, "Enzymology, immobilization and applications of urease enzyme," *International Research Journal of Biological Sciences*, vol. 2, no. 6, pp. 51-56, 2013.
- [11] V. Achal, A. Mukherjee and M.S. Reddy, "Characterization of Two Urease-Producing and Calcifying *Bacillus* spp. Isolated from Cement," *Journal Of Microbiology And Biotechnology*, vol. 20, no. 11, pp. 1571-1576, 2010.
- [12] M.P.E. Berthelot, "Berthelot's reaction mechanism," *Report de Chimie Applique*, 2884, 1859.
- [13] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, N.J. Farra and R.J. Randall, "Protein measurements with the folin phenol reagent," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 193, no. 1, pp. 265-275, 1951.
- [14] M. Mols and T. Abee, "Role of Ureolytic Activity in *Bacillus cereus* Nitrogen Metabolism and Acid Survival," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 74, no. 8, pp. 2370-2378, 2008.
- [15] D.W. Jeong, B. Lee, H. Lee, K. Jeong, M. Jang, and J.H. Lee, "Urease Characteristics and Phylogenetic Status of *Bacillus paralicheniformis*," *Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 28, no. 12, pp. 1992-1998, 2018.
- [16] M. Tepe, S. Arslan, T. Koralay, and N. Mercan Dogan, "Precipitation and Characterization of CaCO<sub>3</sub> of *Bacillus amyloliquefaciens* U17 Strain Producing Urease and Carbonic Anhydrase," *Turkish Journal of Biology*, vol. 43, no. 3, pp. 198-208, 2019.
- [17] J.K. Kim, S.B. Mulrooney and R.P. Hausinge, "Biosynthesis of active *Bacillus subtilis* urease in the absence of known urease accessory proteins," *Journal Bacteriology*, vol. 187, no. 20, pp. 7150-7154, 2015.
- [18] N.N. Bozbeyoğlu, T.Ş. Candoğan, Ş. Arslan, B. Kabalay, O. Bozkaya, E. Akyol ve N.M. Doğan, "Üreaz ve Karbonik Anhidraz Pozitif Bakteriler Tarafından Kalsiyum Karbonat Çökelimi,"

*Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, c. 26, s. 3, ss. 513-518, 2020.

[19] T. Azarno, “Mikrobiyal biyoçimento üretimine yönelik üreaz enzimi üretiminin optimizasyonu,” Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik, Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye, 2013.

[20] A.I. Omoregie, G. Khoshdelnezamihaa, N. Seniana, D.Ek. L. Ong and P.M. Nissom, “Experimental Optimisation of Various Cultural Conditions on Urease Activity for Isolated *Sporosarcina pasteurii* Strains and Evaluation of Their Biocement Potentials,” *Ecological Engineering*, vol. 109, no. 2017, pp. 65-75, 2017.

[21] V.K. Nathan, J. Vijayan and A. Parvathi, “Optimization of Urease Production by *Bacillus halodurans* PO15: A Mangrove Bacterium from *Poovar mangroves*, India,” *Marine Life Science and Technology*, vol. 2, pp. 194-202, 2020.

[22] T. Patil, A. Pendse and K. Aruna, “Optimization of Urease Production by *Bacillus megaterium* Tara26 Isolated from Marble Quarry Sample and Its Application in Reduction of Water Hardness,” *Indian Journal of Applied Research*, vol. 10, no. 4, pp. 50-57, 2020.