



**GIDA ATIKLARINDAN TERMOFİLİK *Bacillus*
licheniformis SO7 İLE ÜRETİLEN ALKALİN
PROTEAZIN MANYETİK ALAN DESTEKLİ ÜÇ FAZLI
AYIRMA SİSTEMİ İLE SAFLAŞTIRILMASI VE
BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU**

Göksen GÖREN

**Yüksek Lisans Tezi
Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU
Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı
2023**

(Her hakkı saklıdır.)

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

**GIDA ATIKLARINDAN TERMOFİLİK *Bacillus licheniformis* SO7 İLE ÜRETİLEN
ALKALİN PROTEAZIN MANYETİK ALAN DESTEKLİ ÜÇ FAZLI AYIRMA
SİSTEMİ İLE SAFLAŞTIRILMASI VE BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU**

(Purification and Biochemical Characterization of Alkaline Protease Produced by
Thermophilic *Bacillus licheniformis* SO7 from Food Waste Using Magnetic Field-Assisted
Three Phase Partitioning)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Göksen GÖREN

Danışman: Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

Erzurum
Temmuz, 2023

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Göksen GÖREN tarafından hazırlanan “Gıda atıklarından termofilik *Bacillus licheniformis* SO7 ile üretilen alkalın proteazın manyetik alan destekli üç fazlı ayırma sistemi ile saflaştırılması ve biyokimyasal karakterizasyonu” başlıklı çalışması 03 / 08 / 2023 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı, Biyoteknoloji Bilim Dalında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Doç. Dr. Yeliz DEMİR <i>Ardahan Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır

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

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Enstitü Müdürü

Aslı Islak İmzalıdır

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

ETİK VE BİLDİRİM VE BEYAN FORMU SAYFASI

Yüksek lisans Tezi olarak Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU danışmanlığında sunulan “Gıda Atıklarından Termofilik Bacillus licheniformis SO7 İle Üretilen Alkalın Proteazın Manyetik Alan Destekli Üç Fazlı Ayırma Sistemi İle Saflaştırılması ve Biyokimyasal Karakterizasyonu” başlıklı çalışmanın tarafımdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	5	30
Kuramsal Temeller	4	30
Materyal ve Yöntem	28	35
Araştırma Bulguları ve Tartışma	10	20
Sonuçlar ve Öneriler	8	20
Tezin Geneli	14	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

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

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Göksen GÖREN	Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU
İmza: Aslı Islak İmzalıdır	İmza: Aslı Islak İmzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ'de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans öğrenim süresince sağladıkları burs imkanından dolayı Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu-Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (TÜBİTAK-BİDEB) başta olmak üzere,

Yüksek lisansa başladığım günden itibaren her aşamada değerli fikirlerini, deneyimlerini paylaşan ve yanında bulunduğum her vakitte samimiyeti, güler yüzü ve motivasyon konuşmaları ile bu zorlu süreci en basite indirgememi sağlayan saygıdeğer Danışmanım Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU'na,

Yüksek Lisans öğrenimim süresince tez çalışmalarımı gerçekleştirdiğim Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Araştırma Laboratuvarı için birçok imkanı oluşturan Sayın Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e,

Tez çalışmalarım süresince bilgi birikimini ve yardımlarını esirgemeyip, özgün fikirleriyle çalışmalarına kattığı zenginlikten dolayı Esra AYGÜN'e,

Öğrenme aşkı ve araştırmacı ruhuyla tanıdığım, çalışmalarımı sonuçlandırma sürecimde sabırla yanımda olan Rahime ALTINTAS'a,

Laboratuvara alışma sürecimden itibaren enerjisiyle, güler yüzüyle ve nezaketiyle her daim yanımda olan ve bana yardımcı olan sevgili dostum Şeyma ARAS'a

Son olarak tüm hayatım boyunca sağladıkları maddi ve manevi tüm zenginliklerden dolayı ve özellikle akademik kariyerim için beni her daim yüreklendiren babam Ahmet Tayfun GÖREN'e, annem Ayşe GÖREN'e, ablam Gizem ALEMDAROĞLU'na ve abim Mehmet Emin GÖREN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Göksen GÖREN

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GIDA ATIKLARINDAN TERMOFİLİK *Bacillus licheniformis* SO7 İLE ÜRETİLEN ALKALİN PROTEAZIN MANYETİK ALAN DESTEKLİ ÜÇ FAZLI AYIRMA SİSTEMİ İLE SAFLAŞTIRILMASI VE BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU

Göksen GÖREN

Danışman: Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

Amaç: Günümüzde çevresel ve ekonomik açılardan hala önemli bir sorun teşkil etmekte olan gıda atıkları, mikrobiyal süreçler sonucunda biyoteknoloji ve endüstri açısından değerli bazı ürünlerin (biyoyakıtlar, biyopolimerler, biyosüpfaktanlar ve enzimler gibi) elde edilmesinde substrat olarak kullanılabilir. Bu tez çalışmasında; bazı gıda atıklarından *Bacillus licheniformis* SO7 suşu ile üretilen alkalın proteaz enziminin Üç Fazlı Ayırma (TPP) yöntemi ve yeni bir modifikasyonu olan Manyetik Alan Destekli TPP (MFTPP) ile tek adımda hızlı ve basit olarak saflaştırılması ile birlikte biyokimyasal karakterizasyon çalışmaları yapılarak uygulanabilirliğinin gösterilmesi hedeflenmiştir.

Yöntem: İlk olarak, *Bacillus licheniformis* SO7 (GenBank No: MG076977) suşu kullanılarak belirlenen bazı gıda atıklarından alkalın proteazın üretimi gerçekleştirildi ve en iyi üretim besiyeri seçilerek diğer çalışmalara devam edildi. Daha sonra üretilen alkalın proteazın klasik TPP ve manyetik alan destekli TPP yöntemleri ile kısmi olarak saflaştırılması gerçekleştirilerek geri kazanım üzerine etkileri karşılaştırmalı olarak incelendi. Saflaştırılan alkalın proteazın biyokimyasal karakterizasyon çalışmaları yapılarak, sığır serum albümini (BSA) hidroliz etme potansiyeli araştırıldı.

Bulgular: Alkalın proteaz enzimi için en iyi sıvı üretim besiyerinin barbunya alt suyu olduğu belirlendi. Üretilen alkalın proteaz, klasik TPP ile kısmi saflaştırılması için yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda; oda sıcaklığında (25°C), pH 10, 1.0:0.5 ham enzim çözeltisi: t-bütanol oranı, %70 amonyum sülfat doygunluğunda 30 dakikada %147 verimle 3,23 kat saflaştırıldı. Daha sonra yeni bir yöntem olan MFTPP uygulamasında manyetik alan gücü, görev döngüsü ve manyetik alan süresi parametrelerinin optimizasyonu sonucunda sırasıyla 40 W'da, %30 görev döngüsüyle 6 dk'da, %181 verimle 4 kat saflaştırma gerçekleştirildi. SDS-PAGE ile enzimin molekül ağırlığı ~55,0 kDa olarak hesaplandı. Alkalın proteaz enzimi için optimum pH 7,5 ve optimum sıcaklık 40°C olarak belirlendi. Enzimin 0-90°C sıcaklık aralığında bütün değerlerde 12 saate kadar aktiviteyi %90 üzerinde koruduğu tespit edildi. %1 ve %5'lik konsantrasyonlardaki yüzey aktif maddelerin varlığında enzimin yüksek oranda stabil kaldığı, %15 ve %50'lik konsantrasyonlarda kullanılan organik çözücülerin aktiviteyi artırdığı ve 1 mM, 5mM ve 10 mM'lik metal iyonlarının varlığında enzim aktivitesinin yüksek oranda arttığı belirlendi. *B. licheniformis* SO7 enziminin kazein substratı için K_m , V_{max} , K_{cat} , ve K_{cat}/K_m değerleri sırasıyla 0,240 mg/mL, 96,15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{dk}^{-1}$, $1,7\cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ve $0,071 \text{ s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$ olarak hesaplandı. Ayrıca saflaştırılan alkalın proteazın BSA üzerinde potansiyel hidroliz etkisi test edildi ve BSA'ni yüksek oranda parçaladığı gözlemlendi.

Sonuç: Biyomoleküllerin ekonomik olarak yüksek orandaki üretimi ile birlikte kısa zamanda basit şekilde saflaştırılması endüstri açısından büyük bir önem arz etmektedir. Gelişmiş ayırma tekniklerinin kullanımı ile etkili bir saflaştırma prosesi, üretimin en önemli adımlarından birisi olup toplam üretim maliyetlerinin önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. Sonuç olarak bu tez kapsamında, manyetik alan destekli TPP'nin, alkalın proteazı klasik TPP'ye oranla yüksek verim ve saflaştırma oranı ile çok daha kısa sürede kısmi saflaştırılması için etkili ve yeni bir yöntem olduğu gösterildi. Ayrıca, *B. licheniformis* SO7 alkalın proteazın geniş bir sıcaklık ve pH aralığındaki aktivitesi ve kararlılığı, çeşitli metal iyonları, organik çözücüler ve yüzey aktif maddeleri varlığındaki nispeten yüksek kararlılığı ile bu enzimin endüstriyel uygulamalar için ekonomik ve uygun bir aday olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Proteaz, *Bacillus licheniformis*, atık gıda, TPP, manyetik alan, BSA

Temmuz 2023, 120 sayfa

ABSTRACT

MASTER'S THESIS

PURIFICATION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF ALKALINE PROTEASE PRODUCED BY THERMOPHILIC *Bacillus licheniformis* SO7 FROM FOOD WASTE USING MAGNETIC FIELD-ASSISTED THREE PHASE PARTITIONING

Göksen GÖREN

Supervisor: Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

Purpose: Food wastes, which still pose a significant environmental and economic problem today, can be used as substrates to obtain some valuable products (such as biofuels, biopolymers, biosurfactants, and enzymes) for biotechnology and industry as a result of microbial processes. In this thesis, it was aimed to demonstrate the rapid and simple purification of alkaline protease enzyme produced from some food wastes with *Bacillus licheniformis* SO7 strain by Three Phase Separation (TPP) method and its new modification Magnetic Field-Assisted TPP (MFTPP) in one step and to demonstrate its applicability by performing biochemical characterization studies.

Method: Firstly, alkaline protease was produced from some food wastes using *Bacillus licheniformis* SO7 strain (GenBank No: MG076977) and the studies were continued by selecting the best production medium. Then, partial purification of the produced alkaline protease was carried out by TPP and magnetic field-assisted TPP methods and their effects on recovery were comparatively investigated. Biochemical characterization studies of the purified alkaline protease were carried out and its applicability on Bovine Serum Albumin (BSA) was demonstrated.

Findings: The best liquid production medium for alkaline protease enzyme was determined to be kidney bean broth. As a result of optimization studies for partial purification of the produced alkaline protease by conventional TPP; 3.23-fold purification with 147% efficiency in 30 minutes at room temperature (25°C), pH 10, 1.0:0.5 crude enzyme solution: t-butanol ratio, 70% ammonium sulfate saturation. Then, as a result of the optimization of the magnetic field power, duty cycle, and magnetic field duration parameters in the MFTPP application, which is a new method, 4-fold purification was achieved with 181% efficiency at 40 W, 30% duty cycle, and 6 min, respectively. The molecular weight of the enzyme was calculated as ~55.0 kDa by SDS-PAGE. The optimum pH for the alkaline protease enzyme was 7.5 and the optimum temperature was 40°C. It was determined that the enzyme retained over 90% activity for up to 12 h at all values in the temperature range of 0-90°C. It was determined that the enzyme remained highly stable in the presence of surfactants at concentrations of 1% and 5%, organic solvents used at concentrations of 15% and 50% increased the activity, and the enzyme activity was highly increased in the presence of metal ions at 1 mM, 5 mM, and 10 mM. K_m , V_{max} , K_{cat} , and K_{cat}/K_m values of *B. licheniformis* SO7 enzyme for casein substrate were calculated as 0.240 mg/mL, 96.15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{dk}^{-1}$, $1.7\cdot 10^{-2}\text{ s}^{-1}$ ve $0.071\text{ s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$ respectively. In addition, the potential hydrolysis effect of the purified alkaline protease on BSA was tested and it was observed that it degraded BSA at a high rate.

Conclusion: The simple purification of biomolecules in a short time with economically high production rates is of great importance for the industry. An efficient purification process with the use of advanced separation techniques is one of the most important steps in production and accounts for a significant portion of total production costs. As a result, in this thesis, magnetic field-assisted TPP was shown to be an effective and novel method for partial purification of alkaline protease in a much shorter time with a high yield and purification rate compared to classical TPP. Furthermore, the activity and stability of *B. licheniformis* SO7 alkaline protease over a wide range of temperatures and pH, and its relatively high stability in the presence of various metal ions, organic solvents, and surfactants indicate that this enzyme is an economical and suitable candidate for industrial applications.

Keywords: Protease, *Bacillus licheniformis*, food waste, TPP, magnetic field, BSA

July 2023, 120 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK VE BİLDİRİM VE BEYAN FORMU SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	xiii
GİRİŞ.....	1
Enzimler	1
Enzimlerin üretim kaynakları.....	1
Enzimlerin sınıflandırılması.....	2
Enzimlerin endüstride yeri ve önemi	2
Termotolerant Bakteriler	3
<i>Bacillus</i> cinsi	4
<i>Bacillus licheniformis</i>	4
<i>Bacillus</i> proteazları.....	5
Proteazların Sınıflandırılması.....	6
Proteazların Üretimi	8
<i>Bacillus</i> cinsi bakterilerden proteaz üretimi.....	9
Proteazların endüstriyel üretimi	9
Fermantasyon Yöntemleri.....	10
<i>Bacillus</i> proteazlarının potansiyel uygulama alanları	12
Deterjan endüstrisi	13
Gıda endüstrisi	13
Deri endüstrisi	13
Farmasötik endüstri.....	14
Terapötik kullanım	14
Atık işleme	14
Mikrobiyal Enzimlerin Saflaştırılması	15

Çöktürme tekniği.....	15
Üç fazlı ayırma (TPP) yöntemi	16
Faz oluşum süreci.....	16
TPP yöntemini etkileyen faktörler	17
Tuz konsantrasyonu	17
Organik çözücü oranı	18
pH değişimi	18
Sıcaklık değişimi	18
Yöntemin Avantajları.....	19
Yöntemin Dezavantajları	20
TPP Çeşitleri	20
KURAMSAL TEMELLER.....	23
Tezin Amacı.....	27
MATERYAL VE METOD	29
Materyal	29
Kullanılan organizma	29
Tez çalışmasında kullanılan araç-gereç ve cihazlar	29
Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar	30
Tez Çalışmasında Kullanılan Besiyerleri.....	30
Enzim Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler	33
Protein Tayininde Kullanılan Çözelti ve Tamponlar	33
SDS-PAGE Analizinde Kullanılan Çözelti ve Tamponlar	33
Gümüş Boyama İçin Kullanılan Çözeltiler.....	34
Karakterizasyon Çalışmalarında Kullanılan Tampon ve Metal İyon Çözeltileri.....	34
Yöntem.....	35
Proteaz üreten bakteri izolatlarının katı besiyerinde belirlenmesi ve seçimi	35
Sıvı besiyerine bakteri inokülasyonu	36
Atık gıda sıvı üretim besiyeri kullanılarak proteaz üretimi	36
Response Surface Methodology (RSM) ile enzim üretimi istatistiksel optimizasyonu..	36
Proteaz enzim aktivitesinin belirlenmesi	37
Protein tayini	38
Tirozin Standart Grafiği	38
Karbhidrat Standart Grafiği.....	39
Alkali proteazın saflaştırılması	39
Üç fazlı ayırma (TPP) yöntemi	40

Amonyum Sülfat Doygunluğunun ve t-bütanol'ün TPP yöntemi ile Alkalın Proteaz saflaştırılması üzerine etkisi	40
pH'nın TPP yöntemi ile Alkalın Proteaz saflaştırılması üzerine etkisi.....	40
Sıcaklığın TPP yöntemi ile Alkalın Proteaz saflaştırılması üzerine etkisi.....	41
İnkübasyon süresinin TPP yöntemi ile Alkali Proteaz saflaştırılması üzerine etkisi.....	41
Manyetik alan destekli üç fazlı ayırma (MFTPP) yöntemi	41
Manyetik alan uygulama süresinin MFTPP üzerindeki etkisi	42
Görev döngüsünün MFTPP üzerindeki etkisi	42
Manyetik Alan Gücünün MFTPP üzerindeki etkisi.....	42
Response Surface Methodology (RSM) ile enzim saflaştırma istatistiksel optimizasyonu	43
Diyaliz	44
<i>B. licheniformis</i> SO7 Alkalın Proteazın Biyokimyasal Karakterizasyonu.....	44
Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile alkalın proteaz enziminin molekül ağırlığının belirlenmesi	44
Alkalın proteazın zimogram analizi	45
pH'nın alkalın proteazın aktivite ve stabilitesi üzerine etkisinin belirlenmesi	45
Sıcaklığın alkalın proteazın aktivite ve stabilitesi üzerindeki etkisinin belirlenmesi	46
Bazı metal iyonlarının alkalın proteaz aktivitesi üzerindeki etkisinin belirlenmesi	46
Bazı organik çözücülerin alkalın proteaz enzim aktivitesi üzerindeki etkisinin belirlenmesi	47
Bazı yüzey aktif maddelerin alkalın proteaz enzim aktivitesi üzerindeki etkisinin belirlenmesi	47
Bazı inhibitörlerin alkalın proteaz enzim aktivitesi üzerindeki etkisinin belirlenmesi...	47
Alkalın proteaz enziminin substrat spesifitesinin belirlenmesi.....	48
Alkalın proteazın kinetik parametrelerinin belirlenmesi.....	48
Alkalın proteaz hidroliz uygulaması	48
İstatistiksel Analiz.....	49
ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	50
Katı Besiyerinde Alkalın Proteaz Enzimi Üreten Bakterilerin Belirlenmesi ve Seçimi .	50
Atık gıda sıvı üretim besiyerlerine bakteri inokülasyonu ve en iyi sıvı üretim besiyeri seçimi	50
Enzim üretim besiyeri istatistiksel optimizasyon sonuçları	58
Protein tayini için kullanılan standart grafik	61
Tirozin standart grafiği.....	61

Karbohidrat standart grafiği	62
Alkalın Proteazın Üç Fazlı Ayırma (TPP) yöntemi ile kısmi olarak saflaştırılması.....	62
TPP yönteminde pH etkisi	66
TPP yönteminde sıcaklığın etkisi.....	67
TPP yönteminde inkübasyon süresinin etkisi	67
Alkalın proteazın manyetik alan destekli üç fazlı ayırma (MFTPP) yöntemi ile kısmi saflaştırılması	69
Enzim saflaştırma istatistiksel optimizasyon sonuçları.....	71
<i>B. licheniformis</i> SO7 ile Saflaştırılan Alkalın Proteazın saflaştırma sonuçları	72
SDS-PAGE yöntemi ile alkalın proteazın molekül ağırlığının belirlenmesi ve zimogram analizi	75
Alkalın Proteazın aktivitesi ve stabilitesi üzerine pH'nın etkisi	76
Alkalın proteazın aktivitesi ve stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisi	78
Bazı metal iyonlarının alkalın proteaz aktivitesi üzerindeki etkisi	79
Bazı yüzey aktif madde ve inhibitörlerin alkalın proteaz aktivitesi üzerine etkisi	81
Bazı organik çözücülerin alkalın proteazın aktivitesi üzerine etkisi.....	83
Substrat Spesifitesi	85
Alkalın proteazın kinetik parametrelerinin belirlenmesi.....	85
Alkalın Proteazın Hidroliz Deney Sonucu	86
SONUÇ ve ÖNERİLER	88
KAYNAKÇA	88
EKLER	101
EK 1. Klasik TPP % Verim İçin Box–Behnken Planda Bağımsız Değişkenlerin Varyans Analizi	101
EK 2. Klasik TPP Saflaştırma Katsayısı İçin Box–Behnken Planda Bağımsız Değişkenlerin Varyans Analizi	102
EK 3. Manyetik Alan Destekli TPP %Verim İçin Box–Behnken Planda Bağımsız Değişkenlerin Varyans Analizi	103
EK 4. Manyetik Alan Destekli TPP Saflaştırma Katsayısı İçin Box–Behnken Planda Bağımsız Değişkenlerin Varyans Analizi	104
ÖZGEÇMİŞ.....	105

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. <i>Bacillus</i> Türlerinden Elde Edilen Ticari Proteazlar.....	9
Tablo 2. SmF ve SSF Fermantasyon Tekniklerinin Karşılaştırması.....	11
Tablo 3. Mikrobiyal Proteaz Üretim Kaynakları: Örnekler ve Uygulama Alanları	12
Tablo 4. Tez Çalışmasında Kullanılan Araç-Gereç ve Cihazlar / Marka-Model	29
Tablo 5. Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasallar / Markaları	30
Tablo 6. LB Broth Kombinasyonlu Atık Gıda (ticari konserve ve evsel atık) Sıvı Üretim Besiyerlerinin Hazırlanışı	31
Tablo 7. Box-Behnken Tasarım İle Test Edilen Faktörlerin Düzeyleri (Besiyeri Optimizasyon)	37
Tablo 8. Standart Tirozin Çözeltilerinin Hazırlanması.....	39
Tablo 9. Standart Karbohidrat Çözeltilerinin Hazırlanışı	39
Tablo 10. Box-Behnken Tasarım İle Test Edilen Faktörlerin Düzeyleri (Saflaştırma).....	43
Tablo 11. Evsel Barbunya Altı İçerik Tayini.....	58
Tablo 12. Proteaz Üretiminin Optimizasyonu İçin Box-Behnken Tasarımı İle Deneysel ve Tahmin Edilen Proteaz Aktiviteleri	58
Tablo 13. Box–Behnken Planda Bağımsız Değişkenlerin Varyans Analizi.....	59
Tablo 14. <i>B. licheniformis</i> SO7 ile saflaştırılan Alkalın Proteazın Saflaştırma Tablosu.....	73
Tablo 15. Klasik TPP ve MFTPP Yöntemlerinin Optimize Koşullar Altında % Geri Kazanım ve Saflaştırma Katsayısı Karşılaştırması	73
Tablo 16. Yüzey Aktif Maddelerin ve İnhibitörün Alkalın Proteaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	82
Tablo 17. Bazı Organik Maddelerin Alkalın Proteaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	84
Tablo 18. <i>B. licheniformis</i> SO7 Alkalın Proteaz Substratları - % Bağıl Aktivite Değerleri ...	85

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Enzimlerin sınıflandırılması.....	2
Şekil 2. Enzimlerin endüstride potansiyel kullanımları	3
Şekil 3. Proteaz yıkım mekanizması	5
Şekil 4. Proteinlerin yıkımı (3D).....	6
Şekil 5. Proteazların sınıflandırılması	6
Şekil 6. TPP sistemi ve faz ayrımı	17
Şekil 7. Manyetik Hipertermi cihazı	42
Şekil 8. Petride SO7 bakteri suşuna ait zon görüntüsü	50
Şekil 9. LB Broth kombinasyonlu süt ürünü gıda atıkları 7 günlük aktivite tayini	51
Şekil 10. LB Broth kombinasyonlu evsel gıda atıkları 7 günlük aktivite tayini	52
Şekil 11. LB Broth kombinasyonlu konserve gıda atıkları 7 günlük aktivite tayini	53
Şekil 12. LB Broth kombinasyonlu en iyi sonuç veren gıda atıkları 7 günlük aktivite tayini	54
Şekil 13. LB Broth'suz en iyi sonuç veren gıda atıkları 7 günlük aktivite tayini	55
Şekil 14. Evsel barbunya altı suyu 7 günlük hücre yoğunluğu ve aktivite tayini	56
Şekil 15. Evsel barbunya altı liyofilizasyon ürünü.....	57
Şekil 16. Proteaz aktivitesi üzerine üç değişkenin kombine etkilerine ait 3D grafikler	60
Şekil 17. Protein standart grafiği.....	61
Şekil 18. Tirozin standart grafiği.....	62
Şekil 19. Karbohidrat standart grafiği	62
Şekil 20. TPP sisteminde, %20 amonyum sülfat doyumluğunda farklı t-bütanol oranlarının (ham enzim çözeltisi:t-bütanol; 1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5, 1.0:2.0) etkisi	63
Şekil 21. TPP sisteminde, %30 amonyum sülfat doyumluğunda farklı t-bütanol oranlarının (ham enzim çözeltisi:t-bütanol; 1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5, 1.0:2.0) etkisi	63
Şekil 22. TPP sisteminde, %40 amonyum sülfat doyumluğunda farklı t-bütanol oranlarının (ham enzim çözeltisi:t-bütanol; 1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5, 1.0:2.0) etkisi	64
Şekil 23. TPP sisteminde, %50 amonyum sülfat doyumluğunda farklı t-bütanol oranlarının (ham enzim çözeltisi:t-bütanol; 1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5, 1.0:2.0) etkisi	64
Şekil 24. TPP sisteminde, %60 amonyum sülfat doyumluğunda farklı t-bütanol oranlarının (ham enzim çözeltisi:t-bütanol; 1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5, 1.0:2.0) etkisi	65
Şekil 25. TPP sisteminde, %70 amonyum sülfat doyumluğunda farklı t-bütanol oranlarının (ham enzim çözeltisi:t-bütanol; 1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5, 1.0:2.0) etkisi	65

Şekil 26. TPP sisteminde, %80 amonyum sülfat doyunluğunda farklı t-bütanol oranlarının (ham enzim çözeltisi:t-bütanol; 1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5, 1.0:2.0) etkisi	66
Şekil 27. TPP yönteminde pH etkisi	66
Şekil 28. TPP yönteminde sıcaklığın etkisi	67
Şekil 29. TPP yönteminde inkübasyon süresinin etkisi	68
Şekil 30. Manyetik alan süresinin ve görev döngüsünün (%20) alkalın proteazın %verim ve saflaştırma katsayısına etkisi	69
Şekil 31. Manyetik alan süresinin ve görev döngüsünün (%40) alkalın proteazın %verim ve saflaştırma katsayısına etkisi	69
Şekil 32. Manyetik alan süresinin ve görev döngüsünün (%60) alkalın proteazın %verim ve saflaştırma katsayısına etkisi	70
Şekil 33. Manyetik alan süresinin ve görev döngüsünün (%80) alkalın proteazın %verim ve saflaştırma katsayısına etkisi	70
Şekil 34. Manyetik alan süresinin ve görev döngüsünün (%100) alkalın proteazın %verim ve saflaştırma katsayısına etkisi	71
Şekil 35. Manyetik alan gücünün alkalın proteazın %verim ve saflaştırma katsayısına etkisi	71
Şekil 36. Klasik TPP’de alkalın proteaz aktivitesi üzerine üç değişkenin kombine etkilerine ait 3D grafik görüntüleri	72
Şekil 37. MFTPP’de alkalın proteaz aktivitesi üzerine üç değişkenin kombine etkilerine ait 3D grafik görüntüleri	72
Şekil 38. Log MK-Rf grafiği	75
Şekil 39. <i>B. licheniformis</i> SO7’den TPP ve MFTPP yöntemiyle saflaştırılan alkalın proteaz enziminin SDS-PAGE ve zimogram görüntüsü	76
Şekil 40. Alkalın proteaz için optimum pH grafiği	77
Şekil 41. Alkalın proteaz için stabil pH grafiği	77
Şekil 42. Alkalın proteaz için optimum sıcaklık grafiği	78
Şekil 43. Alkalın proteaz için stabil sıcaklık grafiği	78
Şekil 44. 1 mM, 5 mM ve 10 mM konsantrasyonlarda hazırlanan metal iyonlarının alkalın proteaz aktivesi üzerine etkisi	80
Şekil 45. Kazein substratı için K_m ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik Lineweaver-Burk grafiği	85
Şekil 46. Alkalın proteazın BSA hidrolizi SDS-PAGE görüntüsü	86

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

μL	:Mikrolitre
AA	:Akrilamid
BSA	:Bovin Serum Albumin
CaCl_2	:Kalsiyum Klorür
Dk	:Dakika
DNS	:Dinitrosalisilik Asit
EtOH	:Etil Alkol
EU	:Enzim Ünitesi
g	:Gram
HCl	:Hidroklorik Asit
K_m	:Michaelis-Menten Hız Sabiti (mM)
L	:Litre
M	:Molar
mg	:Miligram
mL	:Mililitre
mM	:Milimolar
NaOH	:Sodyum Hidroksit
nm	:Nanometre
$^{\circ}\text{C}$	:Santigrat Derece
OD	:Optik Dansite
rpm	:Revolutions Per Minutes (Dakikada Dönüş Sayısı)
SDS	:Sodyum Dodesil Sülfat
sn	:Saniye
Tris-HCl	:Trizma Tamponu
TSA	:Tryptone Soy Agar
TSB	:Tryptone Soy Broth
$V_{\max}$	:Maksimum Hız ($\mu\text{mol/dak}$)
W	:Volt

GİRİŞ

Biyoteknoloji, canlı organizmaları veya bunların ürünlerini kullanarak diğer birçok bilim dalı ile birlikte insan hayatına fayda sağlamak, çeşitli problemleri çözmek veya iyileştirmek amacıyla tasarlanıp teknoloji ile birleştirilerek üretim ve hizmet sanayilerinde kullanılan multidisipliner bir alandır. Hızla artan dünya nüfusu ve küresel talebin yükselmesiyle birlikte, ekonomik, kolay üretilen, çevre dostu ve kolay parçalanabilen biyoteknolojik ürünlere olan ilgi de önemli ölçüde artmıştır. Bu ürünlerin arasında bulunan enzimler, çeşitli ortam koşullarındaki yüksek aktiviteleri, özgüllükleri ve katalitik verimliliklerinin yanı sıra hücre içi veya hücre dışı ortamlarda aynı şekilde davranabilmesi gibi özellikleriyle ön plana çıkmaktadır (Aehle, 2004).

Enzimler

Yunanca'da "maya" anlamına gelen enzim kelimesi ilk olarak 1878 yılında Kühna tarafından kullanılmıştır. Enzimler, organizmalarda biyokimyasal reaksiyonları hızlandıran biyolojik katalizörler olarak işlev görür. Mikroorganizmaların çok düşük miktarlarda atık üreterek ekonomik koşullarda enzim üretebilmesi ve dolayısıyla çevre kirliliğinin az olması gibi avantajları, endüstriyel alanda enzimlerin kullanımını oldukça cazip hale getirmektedir. Enzimlerin katalitik aktivitesi, mevcut enzim ve substrat miktarı, reaksiyon ortamının pH'sı ve sıcaklık değerleri gibi fiziksel faktörlerden etkilenmektedir (Demirel & Gürbüz, 1999; Aehle, 2004; Robinson, 2015).

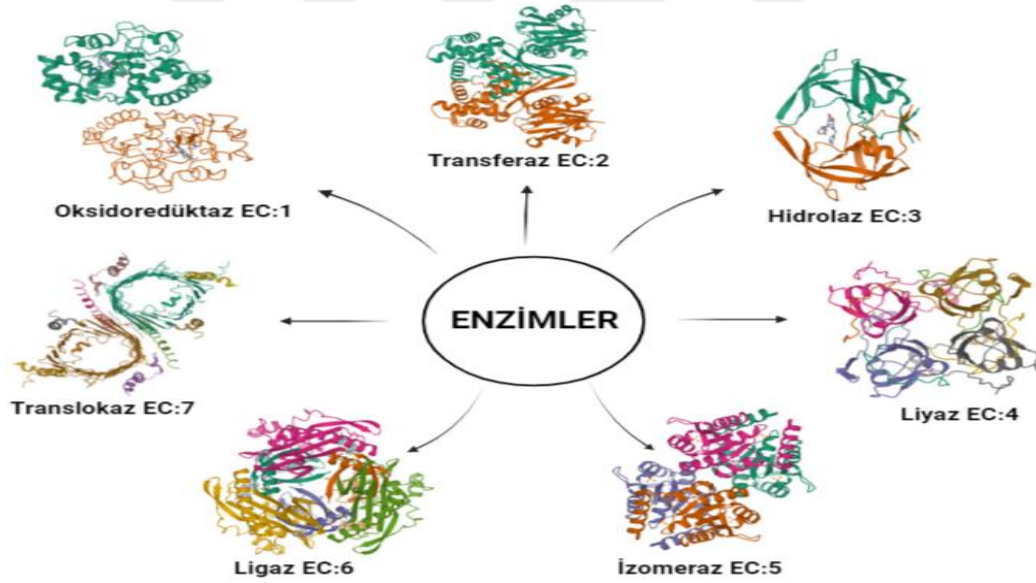
Enzimlerin üretim kaynakları

Enzimler, bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal olmak üzere üç ana grup kaynaktan üretilmektedir. Bitkisel veya hayvansal kökenli enzimlere kıyasla mikrobiyal enzimler, yüksek katalitik aktivite, daha kolay ve hızlı üretim, yüksek dayanıklılık, düşük üretim maliyetleri ve büyük miktarlarda üretim potansiyeli gibi avantajları içermektedir (Wiseman, 1987; Bhatia *et al.* 2021). Mikroorganizmaların bulunduğu çeşitli ortamlar nedeniyle, arzu edilen özelliklere sahip enzimler üreten mikropları elde etmek de mümkündür (Putatunda *et al.* 2019). Ayrıca, daha kısa üretim süresi ve nispeten daha basit genetik yapısı nedeniyle, mikroorganizmaların genetik manipülasyonu çok daha kolaydır. Bu da, istenen özelliklere sahip 'spesifik' enzimler tasarlamak için daha fazla ufuk açmaktadır (Ali *et al.* 2016; Silva *et al.* 2017).

Mikrobiyal enzimler, gıda, tekstil, ilaç ve biyoyakıt gibi endüstriyel biyoteknolojide geniş uygulama alanlarına sahiptir (Sevinç, 2010). Mikrobiyal enzim üretiminde termofilik mikroorganizmalar, yüksek sıcaklıklarda yaşayabilme yetenekleri sayesinde çeşitli avantajlara sahiptir. Bu avantajlar arasında, ekstrem koşullarda yüksek enzim aktivitesi, süreç verimliliğinde artma, daha yüksek enzim kararlılığı, ürün kalitesini iyileştirme, enerji maliyetlerini düşürme ve kontaminasyon riskini azaltma gibi özellikler sayılabilir (Johnson *et al.* 2018). Bu doğrultuda termofilik mikroorganizmalardan elde edilen enzimler, endüstride geniş bir kullanım alanı içerisinde kendini göstermektedir (Brown *et al.* 2019).

Enzimlerin sınıflandırılması

Enzimler, katalizledikleri reaksiyon tiplerine göre Enzim Komisyonu tarafından yedi farklı sınıfa ayrılmıştır (Şekil 1). Her bir enzim özelliklerine göre kodlanmış dört rakamlı bir kimlik numarasına sahiptir. Bu kod “EC” kısaltmasının yanına 4 farklı rakamın gelmesiyle oluşmaktadır. 1. rakam enzimin sınıfını, 2. rakam alt sınıfını, 3. rakam grubunu, 4. rakam ise kendine özgü sıra numarasını temsil etmektedir. Örneğin, tripeptit aminopeptidaz enziminin kodu "EC 3.4.11.4" şeklindedir.



Şekil 1. Enzimlerin sınıflandırılması

Enzimlerin endüstride yeri ve önemi

Mikrobiyal kaynaklı enzimler, doğada çok geniş bir biyoçeşitlilik göstermekte olup dünya genelinde üretilen ticari enzimlerin %80'ini oluşturmaktadır (Thapa *et al.* 2019). Doğal kaynaklardan elde edilen yaklaşık 4000 farklı enzim türü bulunmaktadır ve bunların yaklaşık 200'ü endüstriyel amaçlarla kullanılmaktadır (Şekil 2). Endüstriyel önemi yüksek olan enzimlerin büyük bir kısmı (%75'e yakın) mikroorganizmalardan elde edilen hidrolazlardan

oluşmaktadır. Bu enzimler, yüksek molekül ağırlığına sahip substratları kolaylıkla ürüne dönüştürebilme yetenekleri ile bilinmektedir. Hidrolazlar (proteaz, lipaz ve karbohidralazlar gibi) geniş substrat spesifite özelliği sayesinde farklı molekül tiplerine etki edebilme kapasiteleri ile de ön plana çıkmaktadır (Sharma *et al.* 2001).



Şekil 2. Enzimlerin endüstride potansiyel kullanımları

Günümüzde endüstride ticari olarak daha kullanışlı enzimlerin üretimi hedeflenmiş olup, üretim süresi ve maliyetleri, ürün kalitesi ve performansı dikkate alınarak dış etkenlerden bağımsız olarak, farklı sıcaklıklarda ve pH aralıklarında aktivite gösterebilen enzimlerin kaynağı olan mikroorganizmaların tanımlanması ve geliştirilmesi de oldukça önem arz etmektedir. Böylece daha düşük maliyetlerde, daha yüksek verimlilik ve daha yüksek kalitede ürünler elde etmek için mikroorganizmaların daha kapsamlı ve ayrıntılı olarak incelenmesi, ticari olarak kullanılacak daha verimli enzimlerin keşfi ve üretimi için önemlidir (Oberoi *et al.* 2001).

Termotolerant Bakteriler

45°C'nin üzerindeki yüksek sıcaklıktaki ortamlardan izole edilen termotolerant mikroorganizmalar, bazı genetik ve çevresel değişiklikler sonucu bu yetenekleri kazanmışlardır. Bu transformasyonun anahtar bileşeni, DNA topoizomeras enzimlerinden biri olan ters girazdır (reverse gyrase) ve DNA çift sarmalında bir kesik oluşturup bir DNA ipliğini

etrafında (diğer iplik üzerine geçmeden) döndürür. Bu dönme hareketiyle birlikte DNA iplikleri yeniden birleşir ve kesik kısmın onarımı gerçekleşir ve DNA üzerindeki gerilmeyi azaltarak negatif süper sarmal oluşumunu destekler. Negatif süper sarmal, DNA sarmalının daha gevşek hale gelmesini sağlayarak erime sıcaklığını artırır ve sonuçta, DNA molekülünün stabilitesi artar. Bu sayede mikroorganizmalar yüksek sıcaklıklara dayanabilirler. Ayrıca, mikroorganizmaların yüksek sayıda disülfid bağına sahip olmaları da termostabiliteyi sağlayan etkenlerden biridir (Wang *et al.* 2015; Chandraprakash *et al.* 2021).

Bacillus cinsi

Bacillus cinsi, *Bacillaceae* ailesindeki belki de en eski ve çeşitli cinslerden biridir. *Bacillus* türleri gram-pozitif, çubuk şekilli, endospor oluşturan ve fakültatif anaerob veya aerob olan ve 3,35 ile 5,5 Mb'den fazla olan genom boyutlarına sahip, çok yüksek bir çeşitlilikle karakterize edilen bakterilerdir (Alcaraz *et al.* 2008).

Bacillus'lar, diğer mikroorganizmalara kıyasla genetik olarak daha kolay izole edilebilmektedir. Büyümesi ve çoğalması için gereken maksimum sıcaklık aralığı 25 ile 75°C arasında değişirken, minimum sıcaklık aralığı -5'ten 45°C'ye kadar değişebilmekte olup optimum pH aralığı ise 7,5-8'den 2'ye kadar değişiklik gösterebilmektedir (Kalender, 1999).

Endüstriyel alanda önemli metabolik özellikleriyle öne çıkan *Bacillus* cinsi, antibiyotik, enzim ve toksin üretmesi yanı sıra kolay üretilebilir olması gibi özelliklere sahip olması nedeniyle çokça tercih edilmektedir (Rosovitz *et al.* 1998). *Bacillus*'ların özellikle nütrofilik ve alkalofilik türleri, yüksek oranlarda alkalın proteaz üreticisi olmaları nedeniyle dikkat çekmektedir. Yüksek katalitik aktiviteleri, substrat özgüllükleri ve artan ürün kapasiteleri sayesinde bu enzimler geniş bir uygulama alanına sahip olmaktadır (Rao *et al.* 1998; Kumar & Takagi, 1999; Gurung *et al.* 2013).

Bacillus licheniformis

Bacillus licheniformis, toprak ve bitki örneklerinden kolayca izole edilebilen, endospor oluşturabilen bir gram-pozitif mikroorganizmadır. Doğada yaygın olarak bulunurlar ancak tam olarak sayıları bilinmemektedir. Toprakta gram başına düşen *B. licheniformis* bakteri sayısı 106-107 olarak tahmin edilmektedir (Muras *et al.* 2021).

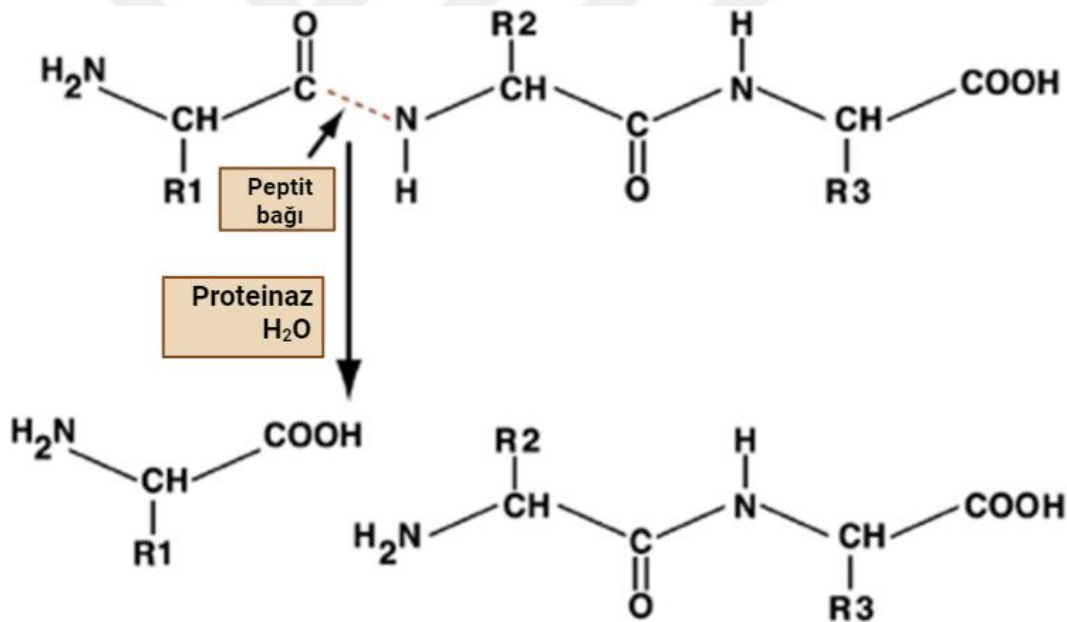
Bu bakteriler, 55°C'de optimum büyüme göstermelerine rağmen çok daha yüksek sıcaklıklarda dahi hayatta kalabilirler. Ticari açıdan yaygın olarak kullanılmalarının sebeplerinden biri de yüksek miktarda protein (20-25 g/L) üretmeleridir. Enzim üretimi için ise optimum 37°C sıcaklığa ihtiyaç duyarlar (Espoui *et al.* 2022).

***Bacillus* proteazları**

Alkali proteazlar çok çeşitli kaynaklardan (bakteri, küf, maya gibi) elde edilebilse de biyoteknoloji alanında en çok tercih edilen üretici mikroorganizma, alkalifilik *Bacillus*'dur (Singh *et al.* 2000). *Bacillus*, çeşitli ortamlardan kolayca izole edilebilmekte olup kompleks ortamlarda da gelişebilmektedir. Termofilik ve alkalifilik *Bacillus*'lar tarafından üretilen alkali proteazlar yüksek sıcaklık ve pH'lara dayanıklılık göstermektedir (Aunstrup, 1981; Johnvesly & Naik, 2001). *Bacillus*'lar çoğunlukla hücre dışı proteaz üreticisi olup durgunluk fazlarında da hücre dışı proteaz üretme özelliğine sahiptirler ancak hücre içi proteaz üreten örnek çalışmaları da bulunmaktadır (Mabrouk *et al.* 1998; Setyorini *et al.* 2006).

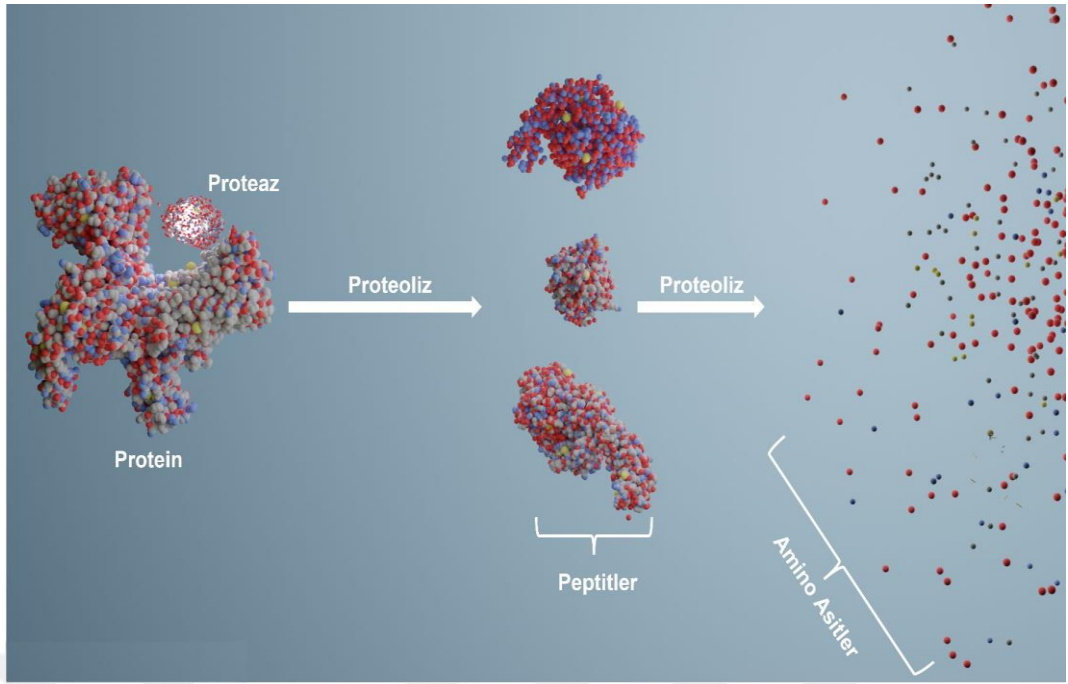
Proteazlar

Proteazlar, bir polipeptit zincirinde amino asit kalıntıları arasında yer alan peptit bağlarının bir su molekülü aracılığıyla yıkımını katalizleyen hidrolaz (EC 3.4.21) grubu enzim türlerinden biridir.



Şekil 3. Proteaz yıkım mekanizması (Donohue *et al.* 2003)

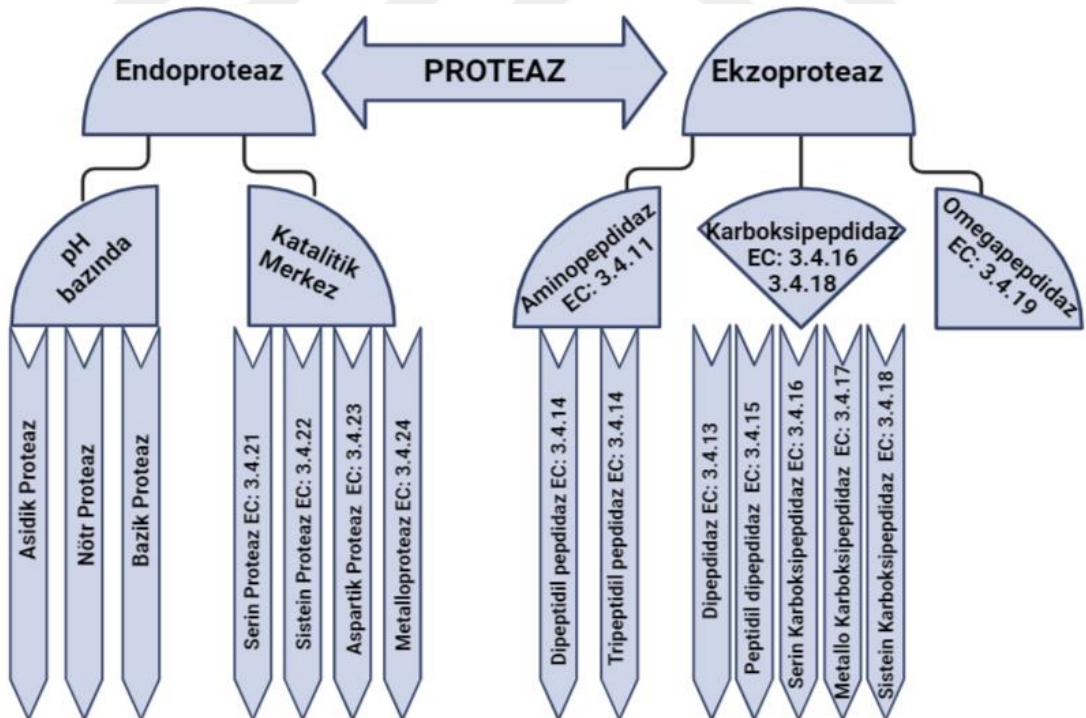
Bu enzimler, substrat proteinlerin polipeptit zincirlerindeki peptid bağlarını tanırlar ve özellikle spesifik amino asit dizilerine bağlanırlar. Bu bağlanma, enzimlerin aktif bölgesindeki belirli amino asit kalıntıların katkısıyla gerçekleşir ve sonuçta, proteaz enzimleri, amino asitler serbest kaldığında peptid bağlarını hidroliz ederek substrat proteinleri parçalar (Shankar *et al.* 2011; Ibrahim *et al.* 2015). Proteaz enzimlerinin özgünlüğü, işlevsel grupların özelliklerine, substrat molekülünün boyutuna, amino asitlerinin konfigürasyonuna ve molekülün uç atomlarının özelliklerine bağlıdır. Bu nedenle bir protein molekülündeki tüm peptid bağları tek bir enzim tarafından parçalanamayabilir (Aran, 2014).



Şekil 4. Proteinlerin yıkımı (3D)

Proteazların Sınıflandırılması

Proteazlar, katalitik aktivitelerine ve substrat üzerindeki katalitik bölgelerine (reaksiyonun gerçekleştiği yer) göre başlıca 2 ana grupta sınıflandırılırlar (Adetunji, 2017).



Şekil 5. Proteazların sınıflandırılması

Substrat üzerindeki katalitik bölgeye dayanarak temelde endoproteazlar ve ekzoproteazlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar.

Endoproteazlar, polipeptid zincirinin orta (iç) kısımlarında aktivite göstermekte olup, pH bazında ve katalitik merkez olmak üzere 2 alt sınıfa ayrılır.

- ◆ pH bazında: Asidik proteazlar (pH 2-6 aralığında aktif), nötr proteazlar (zayıf alkali, nötr ve zayıf asidik pH'larda aktif olan) ve bazik proteazlar (pH 8-12 aralığında aktif olan) olmak üzere 3'e ayrılırlar (Rao & Narasu, 2007).
- ◆ Katalitik merkez: Endoproteazlar, katalitik merkezlerine göre; serin, sistein, aspartik ve metallo proteazlar olmak üzere 4 alt sınıfa ayrılırlar.

- 1- Serin proteazlar (EC: 3.4.21), aktif bölgelerinde bir serin grubu (-OH) içeren, pH 7-11 arasında aktivite gösteren ve genellikle fenil metil sülfonil florür (PMSF) tarafından geri dönüşümsüz olarak inhibe edilebilir özellikte olan proteaz sınıfıdır (Hamza, 2017; Zeren, 2020).
- 2- Sistein proteazlar (EC: 3.4.22), aktif bölgelerinde tam bir -SH grubunun varlığında aktiflik göstermekte olup, iyodoasetik asit, iyodoasetamid ve pCMB gibi ağır metaller varlığında inhibe olurlar (Duschak & Couto 2009).
- 3- Aspartik proteazlar (EC: 3.4.23), aktif bölgelerinde bir veya daha fazla yan zincir karboksil grubu içeren, diazoketon, pepstatin, 1,2-epoksi-3-(p-nitrofenoksi) propan ve diazoasetil-DL-norlösün metil ester varlığında inhibisyona uğrayan asit proteazlardır (Singh *et al.* 2016).
- 4- Metaloproteazlar (EC: 3.4.24), aktivitesi daha az sıkı bağlanmış iki değerlikli katyonların varlığına bağlı, pH 5-9 aralığında optimum özellikte olup, EDTA gibi şelatlama maddelerinin varlığında inhibisyona uğran endoproteazlardır (Ellaiah *et al.* 2002; Demir, 2020).

Ekzoproteazlar, polipeptit zincirinin sonunda etki göstermekte olup, polipeptit substratının serbest N-terminalinde ve polipeptit zincirinin serbest C-terminalinde sırasıyla hareket eder. Aminopeptidazlar, karboksipeptidazlar ve omega peptidazlar olmak üzere üç alt sınıfa ayrılır (Hamza, 2017).

- ◆ Aminopeptidazlar (EC: 3.4.11): Polipeptit zincirinin serbest N-terminalinde aminoasit koparılmasının katalizini sağlamaktadır. (Luan & Xu 2007). Peptid zincirinin serbest amino terminalinden bir dipeptidin hidrolizini sağlayan dipeptidil-peptidazlar (EC: 3.4.14) ve serbest amino terminalinden bir tripeptidin hidrolizini sağlayan tripeptidil-peptidazlar (EC: 3.4.14) olmak üzere 2 alt grubu içermektedir (Rockel *et al.* 2012; Ruffell *et al.* 2013).

- ◆ Karboksipeptidazlar (EC: 3.4.16-18): Polipeptit zincirinde C-terminali üzerinde etki göstererek, tek amino asit ya da dipeptidi ayırır. Aktif bölgelerindeki amino asit kalıntısı yapılarına göre; serin karboksipeptidaz, sistein karboksipeptidaz, metalokarboksipeptidaz, peptidil dipeptidaz ve dipeptidaz olmak üzere beş alt gruba ayrılabilir (Duran *et al.* 2007).
- ◆ Omega peptidazlar (EC: 3.4.19): Polipeptit zincirinde genellikle terminal (uç) bölgelere yakın yerde aktivite gösteren omega peptidazlar, substratlarının serbest amino veya karboksil terminal taşımasına gerek duymamakta olup, endopeptidaz ve ekzopeptidaz arasında bir geçiş formu niteliği taşımaktadır (Polaina & MacCabe, 2007). Substratının serbest amino veya karboksil terminali içermemesi yönüyle endopeptidaza; karboksil veya amino ucundaki bir veya birkaç aminoasitin hidrolizini gerçekleştirmesi özelliğiyle ise ekzopeptidaza benzerlik gösterir.

Proteazların Üretimi

Proteazlar kaynağına göre, bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal (bakteri, mantar, virüs) olmak üzere üç farklı grupta incelenirler (Çelik, 2006). Bitkilerden izole edilerek hali hazırda biyoteknolojik uygulamalarda sıklıkla kullanılan proteazların en iyi bilinen örnekleri arasında papain (papaya, *Carica papaya*), bromelain (ananas, *Ananas comosus*) ve fisin (incir, *Ficus sp.*) sayılabilir (Arshad & Amid, 2014; Tavano *et al.* 2018).Günümüze kadar birçok hayvanın (balık, sucul omurgasızlar, geviş getiren hayvanlar gibi) çeşitli organları proteaz kaynağı olarak incelenmiş olup en iyi bilinen örnekleri arasında pankreastan salgılanan tripsin ve kimotripsininin yanı sıra, mideden salgılanan pepsin ve rennin olduğu bildirilmektedir (Işık, 2014; Yanar, 2015).

Mikroorganizmalardan elde edilen mikrobiyal enzimler, memeli ve bitki hücrelerinden daha kolay ve daha hızlı olarak üretilmekte olup, enzim üretimi iklim koşullarından, mevsimsel değişikliklerden, hayvan kesimi, ağaç kesimi veya bitki kesimi ile ilgili yasal veya etik sorunlardan etkilenmemektedir (Tufvesson *et al.* 2011; Puvanakrishnan *et al.* 2012). Ayrıca, alt akım işlemlerini (downstream proses) basitleştirmesi ve maliyeti daha da düşürerek hücre dışı olarak enzim üretebilmesi gibi avantajları barındırması mikrobiyal enzimlerin sıklıkla tercih edilmesine sebep olmaktadır. Mikroorganizmaların muazzam biyoçeşitliliği, onların biyoteknolojik önemini artırmakta ve yeni proteaz arayışlarını haklı çıkarmaktadır. Birçok mikroorganizmanın (arke, maya, küf, virüs) proteaz üretebildiği bildirilmiş olmakla birlikte, bakteriler en önemli proteaz üretici gruplarından birisi olarak kabul edilmektedir (Belmessikh *et al.* 2013, Contesini *et al.* 2018).

Bacillus cinsi bakterilerden proteaz üretimi

Bacillus türleri, hızlı çoğalmaları, yüksek oranda (20-25 g/L) hücre dışı enzim üretebilme ve salgılama yetenekleri, çevresel değişikliklere yüksek adaptasyon göstermeleri, kısa fermantasyon süreleri sağlayarak, GRAS (genellikle güvenli olarak kabul edilen) statüsü ve bu türler hakkında geniş bir bilgi birikimi bulunması gibi avantajları sebebiyle mikrobiyal fermantasyon uygulamalarında en önemli ve en sık tercih edilen mikroorganizmalardan olmuştur (Schallmeyer *et al.* 2004). Sahip olduğu bu avantajlarından dolayı, *Bacillus* cinsinden proteazlar iyi bir pazar alanına sahiptir ve çok sayıda patent/ ticari proteaz bulunmaktadır (Tablo 1).

Tablo 1. *Bacillus* Türlerinden Elde Edilen Ticari Proteazlar (Contesini *et al.* 2018)

Ürün	Spesifite	Organizma
Dispase I®	Proteaz	<i>B. polymyxa</i>
Dispase II®	Proteaz	<i>B. polymyxa</i>
Proteinase®	Subtilisin A	<i>B. licheniformis</i>
Neutrase®	Metalloproteaz	<i>B. amyloliquefaciens</i>
Esperase®	Serin endopeptidaz (temelde Subtilisin A)	<i>Bacillus sp.</i>
Everlase®	Subtilisin A	<i>Bacillus sp.</i>
Protamex®	Proteaz	<i>Bacillus sp.</i>
Savinase®	Serin endopeptidaz (temelde Subtilisin A)	<i>Bacillus sp.</i>
Alcalase®	Serin endopeptidaz (temelde Subtilisin A)	<i>B. licheniformis</i>
Optimase PR®	Serin endopeptidaz	<i>B. subtilis</i>
Genencor® Protease 899	Metallo nötral endopeptidaz	<i>B. subtilis</i>
Protex® 6L	Subtilisin, bakteriyel serin endopeptidaz	<i>B. licheniformis</i>
Multifect® Neutral	Serin endopeptidaz	<i>B. amyloliquefaciens</i>

Dünya genelinde büyük ilgi gören *Bacillus* türleri tarafından üretilen amilaz ve proteaz enzimlerinin ekonomik olarak uygun bir şekilde üretiminin, optimize edilmiş fermantasyon koşulları kullanılarak düşük maliyetle gerçekleştirilmesi de büyük bir önem taşımaktadır (Blanco *et al.* 2016).

Proteazların endüstriyel üretimi

Proteazlar, akademik ve endüstriyel olarak en önemli enzim gruplarından birini oluşturmakta olup bitkiler, hayvanlar, mantarlar ve mikroorganizmalar dahil olmak üzere dünya üzerindeki yaşam formlarının temel bileşenlerindendir (Subba *et al.* 2009; Akcan, 2012).

Proteazlar başta deterjan ve süt endüstrisinde yaygın kullanımlarının yanı sıra gıda, ilaç, çevre, kimyasallar, deri, kağıt, hamur ve ipek endüstrilerinde geniş çapta uygulamalara sahip olduklarından endüstriyel açıdan enzimlerin önemli bir grubunu temsil eder (Krik *et al.* 2002; Mukherjee *et al.* 2008). Artmakta olan ekonomik önemi, araştırmacıları proteazların üretimi için verimli enzim üretimini en üst düzeye çıkarmak için çeşitli fermantasyon parametrelerinin optimize edilmesine yöneltmiştir (Prakasham *et al.* 2007; Subba *et al.* 2008).

Ortamı oluşturan bileşim, mikroorganizmalar tarafından enzim üretimi için önemlidir. Örneğin, ortamdaki azot kaynakları ve metal iyonları, Karbon/Azot oranındaki değişiklikler, kolayca metabolize edilebilen şekerlerin varlığı gibi faktörler, mikroorganizmalar tarafından hücre dışı proteaz üretimini etkileyebilir. Bunlara ek olarak, ortamı etkileyen fiziksel faktörler de (sıcaklık, pH havalandırma, inkübasyon süresi ve inokulum yoğunluğu gibi) proteaz üretim miktarını değiştirebilmektedir (Lakshmi & Hemalatha, 2016).

Fermantasyon yöntemleri kullanılarak kısa sürede büyük miktarlarda kültüre edilebilen mikrobiyal proteazlar, istenilen ürünün bol ve düzenli bir tedarikini ekonomik olarak sağlamaktadır (Gupta *et al.* 2002).

Fermantasyon Yöntemleri

Endüstriyel mikrobiyal ürünlerin üretimi için sıklıkla kullanılan fermantasyon süreçleri Katı Faz fermantasyonu (SSF) ve Derin Kültür Fermantasyonu (SmF) olmak üzere 2 gruba ayrılır.

SSF, düşük serbest su içeren veya tamamen serbest su içermeyen bir ortamda gerçekleştirilen fermantasyon işlemidir (Soccol *et al.* 2017). Mantarlar ve bazı bakteriler aracılığıyla yüksek katma değerli ürünler üretmek için en yaygın olarak bilinen bir teknolojidir. SSF'nin başarısı, mikroorganizmaların doğal yaşam alanlarına benzer bir ortamda yetiştirilebilmesinden kaynaklanmaktadır (Abu *et al.* 2015). Ancak, tarımsal-endüstriyel atıkları kullanarak mikrobiyal ürünlerin üretimini iyileştirmek için en iyi koşulların belirlenmesi gerekmektedir. Atığın parçacık boyutu, inokulum boyutu, pH ve nem içeriği, anahtar parametrelerden bazıları olup nem içeriği, mikrobiyal büyümenin doğrudan sınırlandırıcı bir faktörü olduğu için özellikle önem arz etmektedir (Chen *et al.* 2021).

SmF, serbest su içeren bir ortamda gerçekleştirilen ve kolaylıkla kontrol edilebilen kültür parametreleri sayesinde kısa üretim süreleri sunan bir teknolojidir (Singhania *et al.* 2010). Sıvı kültürün kullanıldığı bu süreçte, büyüme için gerekli olan besinleri içeren bir sıvı kültür kullanılır. Substrat içeren fermentör sürekli olarak çalıştırılır ve ürün biyokütlesi, farklı teknikler kullanılarak sürekli olarak fermentörden hasat edilir, ardından ürün filtre edilir veya

santrifüjlenir ve kurutulur. Derin kültür fermentasyon, enzimler ve diğer reaktif bileşiklerin alkol, yağ veya besinli bir çözelti gibi bir sıvı kültür içerisinde biyomoleküllerin imalatında kullanılan bir yöntemdir (Singh *et al.* 2021). Sıvı Fermentasyonu (LF) olarak da bilinen SmF’de, akışkan substratlar kullanır. Substratlar oldukça hızlı tüketildiğinden, sürekli olarak besin maddeleriyle değiştirilmesi/güçlendirilmesi gerekmektedir. Daha sonra biyoaktif bileşikler fermentasyon sıvısına salgılanır. Bu fermentasyon tekniği, yüksek nem gerektiren bakteri gibi mikroorganizmalar için en uygun olanıdır ve ürünlerin saflaştırılmasının daha kolay olması gibi ek bir avantaja sahiptir (Hölker & Lenz, 2005).

Enzim miktarı, türden türe ve kültür ortamına bağlı olarak değişir. Hali hazırda, *Bacillus*'tan endüstriyel proteaz üretiminde bu iki ana fermentasyon süreci de kullanılmaktadır.

Tablo 2. SmF ve SSF Fermentasyon Tekniklerinin Karşılaştırması (Manpreet *et al.* 2005)

Faktörler	Derin Kültür Fermentasyonu (SmF)	Katı Faz Fermentasyonu (SSF)
Beslenme Ortamı	Sıvı ortamda besin maddeleri kullanılır.	Katı ortamda besin maddesi kullanılır (genellikle tahıl, pirinç kepeği veya buğday kepeği gibi)
Nem İçeriği	Yüksek nem gerektirir	Düşük nem gerektirir
Mikroorganizma Yetiştirme	Mikroorganizmalar sıvı besin maddesi içinde yetiştirilir.	Mikroorganizmalar katı besin maddesi üzerinde yetiştirilir.
Kontrol Edilebilme	Büyüme kontrol edilebilir.	Büyüme kontrol edilemez.
Ürün Elde Etme	Ürün, sıvı besin maddesi içinde yetiştirilen mikroorganizmaların filtrasyon veya santrifüj işlemi ile ayrılması sonrasında elde edilir.	Ürün, katı besin maddesi üzerinde yetiştirilen mikroorganizmaların ezilmesi veya ekstraksiyonu sonrasında elde edilir.
Kontaminasyon Sorunu	Sıvı ortam nedeniyle kontaminasyon riski daha yüksektir.	Katı ortam nedeniyle kontaminasyon riski daha düşüktür.
Karıştırma İhtiyacı	Karıştırma işlemi gerektirir.	Karıştırma işlemi gerektirmez.
Ekipman Maliyeti	Ekipman maliyeti yüksektir.	Ekipman maliyeti düşüktür.
Ürün Saflığı	Daha düşük ürün saflığı sağlar.	Daha yüksek ürün saflığı sağlar.
Ürün Verimliliği	Daha yüksek ürün verimliliği sağlar.	Daha düşük ürün verimliliği sağlar.

Fermentasyon ortamından enzimlerin hasat edilmesinde, mikrobiyal hücreler gibi çözünmeyen ürünlerin uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu genellikle santrifüjleme yoluyla yapılır. Çoğu endüstriyel enzim ekstrasellülerdir (hücreler tarafından dış ortama salınır), bu nedenle biyokütle uzaklaştırıldıktan sonra fermentasyon sıvısında kalırlar. Kalan sıvı içindeki

enzimler, kullanılacakları alanda amaçlarına bağlı olarak buharlaştırma, membran filtrasyonu veya kristalleşme yoluyla konsantre edilir. Saf enzim preparasyonları gerektiğinde, genellikle jel veya iyon değişim kromatografisi yoluyla izole edilirler (Astudillo *et al.* 2023).

***Bacillus* proteazlarının potansiyel uygulama alanları**

Mikrobiyal proteaz enzimleri, genetik mühendislik ve biyoteknolojik yöntemlerle optimize edilebilir ve farklı substratlara özel olarak uyarlanabilir özellikte olmalarının avantajı ile endüstriyel uygulamalarda önemli bir rol oynar (Chen *et al.* 2017). Alkaline serin proteazların özellikleri, çeşitli ticari uygulamalarda proteinlerin hidrolizinde ucuz bir seçenek haline gelmelerini sağlamaktadır. Deterjan ve gıda endüstrilerinde uzun süredir kullanılmaktadırlar ve son 20 yılda diğer endüstrilerdeki kullanımları da hızla artmıştır (Pandey *et al.* 2018).

Tablo 3. Mikrobiyal Proteaz Üretim Kaynakları: Örnekler ve Uygulama Alanları

Proteaz Kaynakları	Üretim	Enzimler	Uygulama Alanları	Referanslar
<i>Bacillus</i> Türleri		Alkalın Serin Proteazlar (Subtilisinler)	*Deterjan Formülasyonları *Gıda İşleme *Atık Yönetimi	Ward, 2011 Ward <i>et al.</i> 2009
<i>Bacillus</i> Türleri		Nötr Proteazlar (Çinko Metaloproteazlar)	*Bira Üretimi, *Tahıl İşleme, *Et Yumuşatma *Genel Gıda İşleme	Ward, 2011
<i>Aspergillus</i> Türleri		Kimosin	*Gıda Uygulamaları (Peynir Üretimi, Soya Sosu İmalatı, Bira Üretimi)	Ward, 2011 Yu <i>et al.</i> 2017
Ananas (<i>Bromeliaceae</i> familyası)		Bromelain	*Farmasötik *Gıda Endüstrileri (Et Yumuşatma)	Ward, 2011 Coelho <i>et al.</i> 2013
Papaya (<i>Carica papaya</i>)		Papain	*Bira Üretimi, *Et Yumuşatma, *Yara Temizleme *Hayvan Derilerinin Yumuşatılması	Ward, 2011 Walsh, 2014
Yeni Doğan Buzağı ve Kuzuların Midesi		Kimosin	*Peynir Üretimi	Ward, 2011 Mistry, 2012

Deterjan endüstrisi

1913 yılında, tripsin ve kimotripsin proteinleri lekelerin parçalanması için çamaşır deterjanlarında aktif bir bileşen olarak tanıtılmıştır. Proteazların deterjanlardaki mükemmel performansı, izoelektrik noktasına (pI) bağlıdır, bu pH değerinin deterjan çözeltisiyle uyumlu olması gerekmektedir. Ayrıca, oksitleyici veya şelatlayıcı ajanlar gibi deterjan bileşenlerinin varlığında yüksek aktivite ve stabilitenin yanında farklı tipte lekelerin çıkarılması için geniş bir substrat özelliği de gerekmektedir (Contesini *et al.* 2018).

Gıda endüstrisi

Mikrobiyal proteazlar, uzun bir süredir süt, fırıncılık ve gıda işleme endüstrilerinde kullanılmaktadır. Alkali serin proteazlar, yüksek besin değerine sahip hidrolizatların hazırlanması için protein hidrolizinde başlıca rol oynar (Matkawala *et al.* 2021). Endüstride kullanılan kimyasal süreçler, alkali veya asit hidrolizini içerir ve modifiye amino asitlere sahip ürünlerin elde edilmesi zorlu ve kontrol edilmesi güç olabilir. Enzimatik hidroliz, kimyasal süreçlerde gereken aşırı ortamdan kaçınılarak basit koşullar altında gerçekleştirilebilir (Aguilar & Sato, 2017). Ayrıca, ticari alkali serin proteazlar, bitki ve hayvan proteinlerini hidroliz etmek için kullanılmış olup oluşturulan protein hidrolizatları, bebek yiyecek formülasyonlarının güçlendirilmesinde, diyet ürünlerinde ve işlenmiş gıdalarda yaygın olarak kullanılırken, takviye besinlerde biyoaktif bileşikler olarak da kullanılmaktadır (Contesini *et al.* 2018).

Deri endüstrisi

Hayvansal postlar, birkaç kez işlenerek "Deri" adı verilen daha elegan ve pahalı bir malzeme haline getirilir. Geleneksel deri işleme yöntemi, büyük miktarda su, alkali ve sodyum sülfür gibi kimyasalların kullanımını içerir, bu nedenle deri üretim endüstrileri işlem optimizasyonu ve çevresel kirliliği azaltma konusunda yüksek taleplerle karşı karşıyadır. Deri işleminde kullanılan alkaline serin proteazlar, ıslatma, yün alma ve tüysüzleştirme gibi süreçlerde geleneksel yöntemlere göre deri endüstrisinde daha çevreci bir alternatif olarak hizmet vermektedir (Hammami *et al.* 2018).

Proteaz, kuru derilerin su emilimini artırır, kabukları temizler, istenmeyen proteinleri uzaklaştırır ve şişmiş derilerin büyüklüğünü azaltır. Ayrıca, elastolitik ve keratinolitik özelliklere sahip ham proteaz preparasyonları, istenen dayanıklılık, yumuşaklık ve dokuda kısa sürede daha kaliteli deri üretebilmektedir. Sonuçta, deri daha temiz görünür ve leke oluşumu daha az olduğu için boyaların daha kolay emilmesine olanak tanır (Matkawala *et al.* 2019b).

Farmasötik endüstri

Peptit sentezi alanında sıklıkla kullanılan organik sentetik yöntemler, büyük ölçekli üretimde yüksek verim elde etme avantajına sahiptir. Bu kimyasal yöntemler, fazla miktarda bağlama ajanı-çözücü gerektirmesi ve amino asit yan zincirlerinin korunması gibi dezavantajlara sahiptir (Contesini *et al.* 2018). Ayrıca, rasemat karışımlarının oluşması nedeniyle çözünürlük işlemleri gerekmektedir. Mikrobiyal proteazlar ve lipazlar gibi enzimlerin kullanımı, bu enzimlerin yüksek özgülüğü nedeniyle daha basit reaksiyon koşulları ve azaltılmış reaksiyon adımları gibi avantajlara sahiptir. Proteazlar bileşiklerin sentezlenmesini sağlayabilir (Lopez-Iglesias *et al.* 2011; Wang *et al.* 2011) ve proteaz kullanılan reaksiyonlar, sentez yerine hidroliz için tercih edilen organik sistemlerde sıklıkla gerçekleştirilir. Ayrıca, proteaz uygulaması, basit saflaştırma prosedürlerine, organik çözücülerle minimuma indirgenen kontaminasyon ve yüksek substrat çözünürlüğü gibi avantajlara da sahiptir. (Poppe, 1992).

Terapötik kullanım

FDA, farklı klinik koşulların tedavisinde doğal proteazların çeşitli formlarını onaylamış ve birçok proteaz terapisi şu anda klinik araştırmalar altındadır. İmmobilize edilmiş subtilisinler, yanıklar ve yaraların tedavisinde kullanılmak üzere jel tabanlı formüller, merhemler, gazlı bezler ve bandaj malzemeleri olarak geliştirilmiştir. Kollajenaz aktivitesine sahip alkalın proteaz, Dupuytren hastalığı, Peyronie hastalığı, yara iyileşmesi, yanıklar, glokom, intervertebral disk herniasyonu, debridman, keloid, vitrektomi ve selülit gibi durumların tedavisinde kullanılmaktadır (Gurumallesh *et al.* 2019). Diğer birçok özel alkalın serin proteaz da tromboliz (ürokinaz, fibrinolitik), hemofili (faktör VIIa), sepsis (aktif protein C), kas spazmları (botulinum toksin A ve B), lenfositik lösemi (asparaginaz), irinli yaralar ve apselerin (elastaz) tedavisinde de kullanılmaktadır (Matkawala *et al.* 2021).

Atık işleme

Alkalın serin proteazlar, çeşitli gıda işleme endüstrilerinin yanında evsel atıkların yönetiminde de kullanılmaktadır. Bu enzimler, protein bazlı atıkların çözünmesine yardımcı olarak su sistemlerinin biyolojik oksijen talebini düşürmektedirler.

Dünya genelinde kümes hayvanları işleme endüstrileri tarafından milyonlarca ton tüy atığı oluşmaktadır. Alkalın serin proteazların kullanımıyla tüylerin hidrolizi, değerli ürünlerin ucuz ve hafif reaksiyon koşullarında üretimine olanak sağlamakta olup bu ürünler yem ve gübre katkı maddesi olarak kullanılabilir (Singh & Bajaj, 2017).

Başka bir örnek ise, saç içeren tortularla tıkanmış boruları temizlemek için Genex adlı proteolitik enzimlerin bir formülasyonunun kullanılmasıdır. Mikrobiyal keratinazlar, keratin içeren atıkların parçalanmasında kullanılmaktadır (Verma *et al.* 2017).

Mikrobiyal Enzimlerin Saflaştırılması

Mikroorganizmalar tarafından üretilen mikrobiyal enzimler, çeşitli endüstriyel uygulamalarda yaygın olarak kullanılmakta olup, bu enzimlerin saflaştırılması, enzim etkinliğini ve stabilitesini artırmak, yan ürünleri veya zararlı bileşenleri uzaklaştırmak, ürünün kalitesini ve saflığını sağlamak amacıyla önem arz etmektedir. Saf enzimler, yüksek reaktivlik, spesifiklik ve stabilite özellikleri sunar. Bunlar, endüstriyel süreçlerde daha verimli ve kontrol edilebilir katalizörler olarak kullanılabilir. Saflaştırma aynı zamanda enzim üretim sürecini optimize etmek için gereklidir. Mikroorganizmalar tarafından üretilen enzimler genellikle diğer hücre bileşenleriyle birlikte bulunurlar ve bu durum enzimin etkinliğini azaltabilir veya yan ürün oluşumunu tetikleyebilir. Saflaştırma işlemi, enzimi hedeflenen reaksiyonlarda daha etkin ve istikrarlı hale getirerek bu sorunları ortadan kaldırmaktadır (Yusree *et al.* 2021).

Downstream prosesler, biyoteknolojik üretim sürecinin bir aşaması olup, üretilen biyokimyasal ürünleri, hedeflenen bileşenlerden arındırmayı ve saflaştırmayı içerir. Bu prosesler, mikroorganizmalar veya hücre kültürleri tarafından üretilen enzimlerin, ilaçların, biyoplastiklerin ve diğer biyolojik ürünlerin saflaştırılmasını ve arıtılmasını hedefler (Zayed & Ulber, 2022). Üretim sürecindeki enzimler, mikroorganizmalar veya hücreler tarafından bir ortamda genellikle diğer bileşenlerle birlikte bulunurlar. Bu nedenle, enzim saflaştırmasında downstream prosesler büyük bir öneme sahip olup enzimi diğer bileşenlerden ayırmayı sağlar. Sonuçta, bir dizi aşamayı içeren downstream prosesler, enzimin fiziksel, kimyasal veya biyokimyasal özelliklerine dayalı olarak farklı yöntemler (çöktürme, filtrasyon, kromatografi, membran ayırma teknikleri ve ultrasonikasyon gibi) ve bunların kombinasyonları kullanılarak enzimlerin yüksek saflıkta ve etkinlikte elde edilmesinde önemli bir rol oynar (Gimenes *et al.* 2021).

Geleneksel yöntemlerle enzimlerin saflaştırılması, zahmetli, maliyetli ve zaman alıcı birkaç adımdan oluşmaktadır. Bu dezavantajları aşmak için alternatif geri kazanım teknikleri geliştirilmiştir. Bu teknikler arasında sulu iki fazlı sistem (ATPS), ısıyla ayırma (TMP) ve üç fazlı bölümlleme (TPP) gibi yöntemler yer almaktadır (Aras, 2023).

Çöktürme tekniği

Çöktürme, downstream proseslerde en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir. Tahmin edilen üretim ve saflaştırma yöntemlerinin %80'den fazlasında bu teknik kullanılmaktadır. Katı

bir fazın oluşumunu içeren çöktürme işlemi, sulu bir çözeltinin özelliklerini değiştirerek, (pH, sıcaklık değişiklikleri, tuzlar, organik çözücüler veya polimerler ekleyerek) katı faz oluşumunu indüklemektedir (Pessôa *et al.* 2011).

Tüm çöktürme teknikleri temelde iki işlem içerir: 1- ilgilenilen biyomolekülün konsantrasyonunun artırılması 2- saflaştırılması.

Hacim, daha sonraki aşamalar için azaltılır ve belirli bir derecede saflaştırma elde edilir. Bu yöntem genellikle ayırma ve saflaştırma prosedürlerinin başlangıcında uygulanır ve tek bir işlem olarak kullanılabilir. Yüksek düzeyde saflık gerektirmeyen hücre dışı enzimlerin ayrılması ve uygulamalar için de kullanışlıdır (Golunski *et al.* 2011; Soares *et al.* 2012). Çöktürme, az enerji gerektiren ve basit ekipmana ihtiyaç duyan basit bir teknik olup, ölçeklendirilmesi kolaydır işlem süresinde kullanılan bazı malzemeler (etanol ve amonyum sülfat gibi) malzemeler geri dönüştürülebilmektedir (Gimenes *et al.* 2021).

Üç fazlı ayırma (TPP) yöntemi

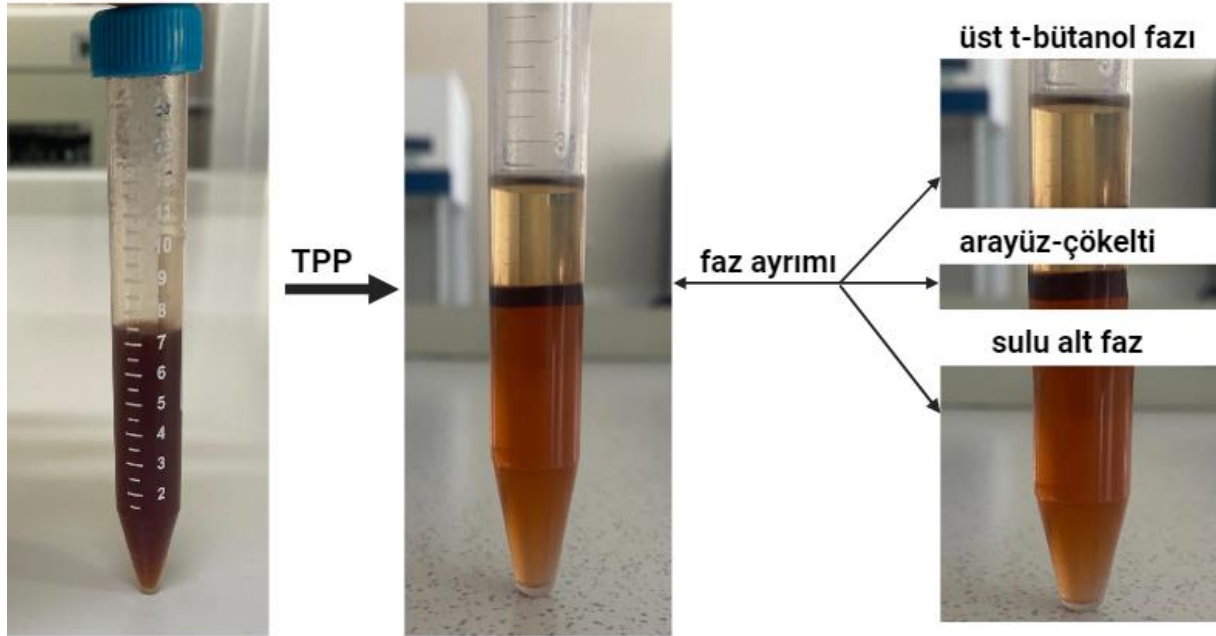
Geleneksel yöntemlere alternatif olarak ilk defa Lovrien ve arkadaşları tarafından düşünülmüş olan TPP sistemi, özellikle çok bileşenli sistemlerden başta enzim ve proteinlerin izolasyonu olmak üzere geliştirilmiş olan basit, tek adımlı, düşük maliyetli ve etkili yeni bir biyoseparasyon tekniğidir (Gagaoua & Hafid, 2016).

Osmotik stres, iyonik şiddet, kosmotropi, yığılma etkileşimleri ve ara yüzey gerilimi gibi çeşitli faktörlerin etkilediği kompleks bir yapı sergileyen TPP, fizikokimya esaslı bir tekniktir. TPP sisteminde proteinler, pl'lerine, kaynaklarına, moleküler ağırlıklarına ve sıcaklıklarına bağlı olarak farklı davranışlar gösterirler (Dennison & Lovrein, 1997; Saxena *et al.* 2010). Başlangıçta bir "upstream (üst akım işlemleri)" tekniği olarak geliştirilmiş olsa da sıklıkla mililitre hacim ölçeğinde izolasyon işlemi için "downstream" yöntemi olarak kullanılmaktadır (Ketnawa *et al.* 2017).

Faz oluşum süreci

TPP sistemi, elde edilmiş ham enzim çözeltisi ortamına organik bir çözücü (C4 alkoller, genellikle tert-bütanol) eklenmesiyle bir organik faz ve farklı doygunluklarda bir tuz (sülfat tuzları, genellikle amonyum sülfat (NH₄)₂SO₄ eklenmesiyle bir sulu faz olmak üzere iki sıvı fazın oluşum temeline dayanır (Dennison & Lovrein, 1997). Sülfat iyonları, sulu faza eklenildiğinde dehidrasyon etkisini artırır. Bu nedenle, büyük iyonlar bir araya geldiğinde proteinler su fazından çökeltildikten sonra ayrıştırılır. Kulkarni ve Rathod (2015) etanol veya metanol gibi çözücülerin üç fazlı bir sistem oluşturamadığını belirlemiş ve t-bütanol kullanılmasını önermiştir. Bu nedenle, üç faz oluşturma yeteneğine sahip olduğu için

uygulamada çözücü olarak genellikle t-bütanol kullanılır. Ayrıca, t-bütanol, çöken proteine bağlanarak onun batma kabiliyetini artırır, böylece daha yoğun olan sulu tuz tabakasının üzerinde yüzer (Rajeeva & Lele, 2011). Yaklaşık bir saat içinde üç faz oluşur. Organik çözügen (t-bütanol) içeriği zengin üst faz (non-polar bileşikler içerir), sulu alt faz (polar bileşikler içerir) ve protein çökeltisi tarafından oluşan bir ara yüzey fazı oluşur (Roy *et al.* 2005).



Şekil 6. TPP sistemi ve faz ayrımı

TPP yöntemini etkileyen faktörler

Hedef enzimleri sistemden ayırmak için hidrofobisite, yük, moleküler ağırlık, biyoözümlü bağlanma ve konformasyon gibi önemli enzim özellikleri kullanılır. Ayrıca, TPP sisteminde çoklu faktörler dikkate alınmalıdır ki bunlar; tuz türleri ve konsantrasyonu, organik çözücü türü ve oranı, sistem pH değeri, sıcaklık ve süre gibi faktörlerdir. Bu faktörler enzim verimi (%V), saflaştırma kat sayısı (PF) ve enzim geri kazanımı (RE) gibi parametreleri etkileyebilir (Ketnawa *et al.* 2017).

Tuz konsantrasyonu

Tuz konsantrasyonu, TPP'de proteinlerin çözünürlüğünü önemli ölçüde etkilemektedir. Düşük konsantrasyonlarındaki tuzlar, protein moleküllerinden çeşitli yüklenmiş gruplar tarafından çözeltiye çekilir, bu da proteini çözelti içinde daha kolay bir şekilde çözünür hale getirir. Ancak, daha fazla tuz eklenmesi sonunda doyma seviyesine ulaşacak ve maksimum protein çözünürlüğü sağlanacaktır. Tuz konsantrasyonundaki fazla artış, proteinlerin çözünmesi için kullanılabilir çözücünün azalmasına neden olacak ve proteinler çökecektir (Zhang, 2012).

TPP'de en yaygın olarak kullanılan tuzlardan biri amonyum sülfattır. Basit bir $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çözeltisinde, yoğunluk tuz konsantrasyonu arttıkça doğrusal olarak artar. Sülfat anyonu, hem tuzun hem de t-bütanolün sinerjistik etkisini kullanarak proteindeki katyonik bölgelere bağlanır ve bu da geleneksel salting-out işlemlerine kıyasla tuz tüketimini azaltır (Dennison & Lovrien, 1997). Sonuç olarak, tuz konsantrasyonu, kullanım amacına göre biyomoleküllerin maksimum verimlilikle geri kazanılması için optimize edilebilir özelliktedir.

Organik çözücü oranı

TPP sistemi için n-propanol, n-bütanol, izobütanol, n-pentanol ve n-heksan ve t-bütanol gibi farklı alkol kullanımları protein geri kazanım verimini etkileyecektir. T-bütanolün, proteinlere kolayca bağlanabilmesi ve protein moleküllerinin boyutu dikkate alındığında proteinlere nüfuz edemediği gibi denatürasyona da yol açmadığı kabul edilir ve bu nedenle TPP için en iyi çözücü olarak bilinmektedir (Özer *et al.* 2010; Duman & Kaya, 2013). Böylece proteinlerin çökmesini artırır ve proteinlerin sulu tuz tabakasına doğru yüzmelerine yardımcı olur. Daha fazla alkol kullanılması, proteinlerin çökmesini ve arayüzdeki stabilitesini artırarak, daha fazla çökmüş proteinin istenen üst tabakaya yükselmesine yardımcı olur. Ancak, bazı durumlarda yüksek t-bütanol konsantrasyonlarında protein çökmesini önleme olasılığı da göz ardı edilmemelidir (Narayan *et al.* 2008; Yan *et al.* 2018).

pH değişimi

TPP sisteminde pH'nın değişmesi, proteinlerde bulunan amino asitlerin iyonlaşmasına neden olur (Wati *et al.* 2009; Gagaoua *et al.* 2014). Bu parametre, TPP'de önemli kabul edilir çünkü proteinlerin dağılımı ve bölünmesi, fazlar arasındaki elektrostatik etkileşimlerden dolayı pH'dan önemli ölçüde etkilenir (Gagaoua *et al.* 2014). TPP sistemleri genellikle proteinlerin izoelektrik noktasına (pI) yakın bölgelerde keskin bir şekilde değişir ve bu da pH'ya bağlıdır. Proteinler, en kolay şekilde izoelektrik noktalarında çöker. pH değeri pI değerinin üzerinde olduğu zaman protein üzerinde bulunan negatif yüklü amino asit kalıntıları proteini negatif yüklü hale getirir ve sonuçta protein sulu fazda kalır. Bunun tersine pH, pI değerinin altında ise proteinler pozitif yüklü hale gelip çöken proteinler ara yüzeyde toplanıp zenginleşecektir (Dennison & Lovrein, 1997). Sonuçta pH'deki değişiklik, hedeflenen proteinin net yükünde değişikliklere yol açmaktadır ve bu da proteinin ayrımını etkilemektedir.

Sıcaklık değişimi

Enzimlerin reaksiyon hızı sıcaklık arttıkça artar, ancak bu teori belirli bir sıcaklığa kadar geçerlidir. Yüksek sıcaklıklarda (60°C üzeri), aktivite radikal bir şekilde azalır çünkü denatürasyon meydana gelir (Gagaoua *et al.* 2014; Hashim *et al.* 2011; Kumar *et al.* 2012).

Proteinlerin minimum denatürasyonunu korumak için, TPP sırasında genellikle düşük sıcaklıklar kullanılır ve ısı daha hızlı bir şekilde dağıtılır. TPP'de yüksek verim elde etmek için optimum sıcaklık aralığı genellikle 20 ila 40°C arasında yani oda sıcaklığının ideal olduğu bilinmekte olup kaynaklarına ve inkübasyon süresine bağlı olarak değişmektedir. Yapılan bazı termal stabilite testlerine göre, sıcaklık 55°C'ye yükseltildiğinde enzimlerin göreceli aktivitesinin keskin bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir ve bu da TPP ile saflaştırma işleminin yüksek sıcaklıklarda etkili olmadığını göstermektedir (Şen *et al.* 2011). Dolayısıyla, termal deaktivasyon mekanizmasını açıklamak ve yüksek sıcaklıklarda enzim verimliliğini artırmak ve için yeni stratejiler geliştirilmektedir.

Yöntemin Avantajları

- ✓ Ekonomik olarak uygun maliyetle ve minimum adımlarla istenen saflığı elde etme hedefi doğrultusunda non-kromatografik yöntemlerden birisi olan TPP tekniği, küçük veya büyük üretim süreçlerinde hedef proteinleri ayrıştırıp saflaştırmak ve konsantre etmek için çok daha ucuz ve kolay ölçeklenebilir bir yöntem olup aynı zamanda oda sıcaklığında çalışan ve direkt olarak ham enzim çözeltisi üzerine uygulanabilir bir işlemdir (Sen *et al.* 2011; Harde *et al.* 2012).
- ✓ Çoğu durumda, TPP çeşitli enzimlerin aktivitesini artırarak hedef enzimlerin veya proteinlerin organik ve sulu fazlar arasındaki orta tabakada çökelti olarak çıkmasına bağlı olarak görünür bir şekilde daha yüksek verimler (>100%) elde edilmesini sağlamaktadır (Dennison & Lovrein, 1997; Singh *et al.* 2001).
- ✓ Ayrıca, TPP ham süspansiyonlardan proteinlerin, enzimlerin ve inhibitörlerin eşzamanlı olarak ayrıştırılması ve saflaştırılması için kapsamlı bir şekilde değerlendirilmiştir (Vidhate & Singhal, 2013; Rawdkuen *et al.* 2010). Bu nedenle, TPP'nin yeniliği, geleneksel konsantrasyon yöntemlerinden daha yüksek saflaştırmayla proteinleri konsantre etme yeteneğinde yatmaktadır (Rajeeva & Lele, 2011).
- ✓ TPP, tersinir şekilde denatüre olmuş proteinleri yeniden katlama yeteneğine de sahiptir ve aktif proteinleri karmaşık yapı içeriğinden çıkarabilir. Bu, t-bütanolün mikrobiyal hücrelerden proteinleri seçici olarak boyuta dayalı olarak çıkarabilme yeteneğiyle (Raghava & Gupta, 2009) birleştirildiğinde, TPP'nin genetik mühendislik çalışmalarında bir araç olarak potansiyel uygulamasını düşündürmektedir (Raghava *et al.* 2008; Sardar *et al.* 2007).

- ✓ Buna ek olarak, TPP'nin proteinleri yeniden katlama yeteneği, keşfedilen daha yüksek özgül aktivitenin kısmen denatüre olmuş proteinlerin yeniden yapılandırılmasına bağlanabileceğini göstermektedir.

Yöntemin Dezavantajları

- ✗ Belirlenen tuz konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerinde bir azalmaya sebep olmaması için diyaliz işlemi ile tuzun ortamdan uzaklaştırılması gerekir ki bu da yönteme ek bir basamak eklemektedir.
- ✗ Protein miktarının az olması durumunda TPP sistemi saflaştırma için uygun bir yöntem olmayabilir.
- ✗ Bununla birlikte, fazla miktarda t-bütanol kullanımıyla biyomoleküllerin denatürasyonu da dezavantajları arasında sayılabilir.

TPP Çeşitleri

Enzimlerin saflığını ve geri kazanımını artırmak için TPP süresinin minimuma indirilerek çeşitli varyantlarının modifiye edildiği yöntemler geliştirilmiştir. Bu varyantlar arasında ultrason destekli TPP, mikrodalga destekli TPP, makroaffiniteli TPP ve iyonik sıvı TPP bulunmaktadır.

1- Ultrason Destekli Üç Fazlı Ayırma (UATPP) Yöntemi

Ultrason destekli üç fazlı ayırma (UATPP) sistemi, ultrason dalgalarının kullanımıyla kütle transfer direnci azaltılarak daha kısa işlem süresiyle yüksek saflıkta ve yüksek geri kazanımla ekstraksiyon sağlayan bir yöntemdir (Dey & Rathod, 2013; Ketnawa *et al.* 2017). UATPP'nin temel prensibi, ultrason dalgalarının etkisiyle ortamda oluşan küçük kabarcıkların çökerek çevrelerinde çok dalgaları ve mekanik kuvvetler oluşturmasıdır. Bu etkiyle farklı fazlar arasında daha hızlı bir kütle transferi sağlanır. Ayrıca, düşük ultrason frekansları kullanılarak daha verimli bir ekstraksiyon elde edilebilir. Ultrasonik destekli üç fazlı ayırma yöntemi, geleneksel yöntemlere kıyasla daha etkili ve verimli bir saflaştırma potansiyeli taşımaktadır (Kulkarni & Rathod, 2014; Pakhale & Bhagwat, 2016).

2- Mikrodalga Destekli Üç Fazlı Ayırma (MWTPP) Yöntemi

Mikrodalga destekli ekstraksiyon, mikrodalga enerjisinin katı örneklerle temas halindeki polar çözücülerini ısıtmak için kullanılan nispeten yeni bir yöntemdir. Çözücünün polaritesi ve sıcaklığına bağli olarak, ısıtma sonucunda artan sıcaklık ve basınç koşulları, bitki/mikroorganizma hücrelerinden değerli bileşiklerin salınımını hızlandırır. Bu durum, istenen bileşiklerin örnek ve çözücü arasında daha hızlı bir şekilde bölünmesine olanak sağlar,

bu da ekstraksiyon süresinin ve çözücü tüketiminin azalmasına yol açar (Dahmoune *et al.* 2015; Rahath *et al.* 2013). Yüksek performans etkinliğine bağlı olarak, çoğunlukla bitkiler üzerinden saflaştırma çalışmalarında sıklıkla tercih edilen bir yöntem haline gelmiştir.

3- Makroafinite Ligand-Kolaylaştırılmış Üç Fazlı Ayırma (MLFTPP) Yöntemi

Geleneksel TPP tekniğinden geliştirilen daha ileri bir yöntem olan Makroafinite Ligand-Kolaylaştırılmış Üç Fazlı Ayırma (MLFTPP) yöntemi, proteinlerin saflaştırılması için ham ekstraktların içine akıllı polimerlerin eklenmesini içerir (Sharma & Gupta, 2002). Bu teknik, ham süspansiyonların doğrudan işlenmesine olanak sağlayan akıllı bir affiniteli makro ligandın bölünmesi temeline dayanır. Akıllı affiniteli makro ligand, amonyum sülfat (NH₄)₂SO₄ ve t-bütanol eklenmesiyle çökerek, t-bütanol zengin üst faz ve alttaki sulu faz arasında bir arayüz çökelti oluşur. Makro ligand hedef proteine seçici olarak bağlanırken, affiniteli kompleks bir arayüz çökelti olarak elde edilir. Karışım daha sonra t-bütanol tabakası ve tuzlu fazda çözülmüş çökeltinin ayrı bölümlerine ayrılır. Geri kazanım için çökelti çözeltisi elüe edilir (Mondal & Gupta, 2006; Mondal *et al.* 2003). Yaygın olarak kullanılan makroaffiniteli ligand türleri aljinat ve ester bileşenleridir (Sharma *et al.* 2003; Mondal *et al.* 2003). MLFTPP'deki akıllı polimerlerin kullanımı, basit TPP'ye kıyasla daha doğal yapıya, daha yakın konformasyonlara sahip proteinleri başarıyla saflaştırmıştır. Ayrıca, MLFTPP, agregasyona eğilimli ve seyreltme veya kromatografik yöntemlerle yeniden katlanamayan proteinlerin yeniden katlanmasında da kullanılabilir (Raghava *et al.* 2008; Gautam *et al.* 2012). MLFTPP, düşük işletme maliyetli ve yüksek seçicilik özelliklerinin yanı sıra kolay ölçeklenebilir olması ve ham ekstraktın herhangi bir ön-temizlik adımını gerektirmemesi gibi önemli avantajları da barındıran bir kısmi saflaştırma tekniğidir (Sharma *et al.* 2004).

4- İyonik Sıvı Üç Fazlı Ayırma (ILTPP) Yöntemi

İyonik sıvı üç fazlı ayırma (ILTPP), TPP ve ILATPS (iyonik sıvı sulu iki fazlı sistem)'nin avantajlarını birleştirerek etkili bir yöntem sunar. İstenilen proteinler ara fazda birikir ve geri kazanımda ek adımlar gerektirmemektedir. Ancak, pahalı iyonik sıvının her döngü sonrası geri kazanılabilme yeteneği, ekstraksiyon sürecinin verimliliği açısından önemlidir (Alvarez-Guerra & Irabien, 2014). ILTPP'de iyonik sıvının geri kazanımı için tuzlu fazın vakum buharlaştırma ile yoğunlaştırılması yöntemi kullanılmaktadır. Bu işlem oda sıcaklığında gerçekleştirilebilir ve iyonik sıvı ile proteinin tuzlu fazda bozulmasını engeller. Bu teknik, neredeyse tüm işletme koşullarında IL (iyonik likit) ve tuzu %100 geri kazanabilmiş ve reaktif tüketimini azaltmak için ILTPP'de umut verici bir yaklaşım olmuştur (Alvarez-Guerra & Irabien, 2015). Sonuçta, ekstraksiyon işleminin verimini IL'nin geri kazanılabilirliği ve yeniden kullanılabilirliği belirlemektedir (Lee *et al.* 2017).

5-Yeni Bir yöntem: Manyetik Alan Destekli Üç Fazlı Ayırma (MFTPP)

Enzimlerin kısmi saflaştırılmasında manyetik alan ile desteklenerek modifiye edilmiş TPP sistemlerinden bir diğeri de yeni bir yöntem olarak grubumuz tarafından geliştirilen MFTPP olarak karşımıza çıkmaktadır (Aras, 2023). Klasik TPP’de kullanılan amonyum sülfat doygunluğu, t-bütanol oranı ve pH kullanılarak oluşturulan ham enzim çözeltisi çözeltisi manyetik alan gücüne maruz bırakılarak faz ayrımı gerçekleştirilir. MFTPP’de, manyetik alan gücü, uygulama süresi ve görev döngüsü parametreleri optimize edilerek uygulama gerçekleştirilir. İlk kez α -amilazın kısmi saflaştırılmasında kullanılmış olan bu yöntemin işleyiş mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte yapılan bu çalışma sonucunda klasik TPP’ye oranla çok kısa bir sürede, daha yüksek bir verim ve yüksek saflaştırma kat sayısı beraberinde saflaştırma gerçekleştirilmiştir. Yöntemin başarısı arkasındaki nedenlerin enzim molekülünün artan esnekliği, inhibitörlerin enzim preparatlarından uzaklaştırılması, yapısal değişiklikler ve konformasyonel sıkışma olabileceği düşünülmektedir (Aras, 2023).

KURAMSAL TEMELLER

Enzimler ve proteinler, biyoteknolojik ve endüstriyel uygulamalarda kullanılmadan önce genellikle saflaştırılması gereken biyolojik moleküllerdir. Bu süreç, enzimlerin ve proteinlerin istenen saflıkta elde edilerek daha sonrasında kullanılacakları uygulamalarda etkili ve güvenilir bir performans göstermesini sağlamaktadır. Hedeflenen protein ve enzimleri saflaştırmanın önemi, yüksek saflıkta ve özgül aktiviteye sahip olma gereksiniminde yatar, bu da doğru karakterizasyon ve güvenilir deneysel sonuçlar için önemlidir. Saflaştırma ayrıca, hedef protein ve enzimin fonksiyonel ve yapısal analizine müdahale edebilecek istenmeyen kontaminantların (diğer proteinler, nükleik asitler, lipidler ve küçük moleküller gibi) ortamdan uzaklaştırılmasına da olanak tanır (Laxman *et al.* 2015). Ancak, saflaştırma işlemi süreç içinde çeşitli zorluklar barındırmaktadır. Bunlar arasında, biyolojik örneklerin karmaşık doğası ve benzer özelliklere sahip birden fazla protein ve enzimin varlığı, hedef protein ve enzimin düşük miktarda oluşu ve süreç boyunca biyolojik aktivitelerinin korunma gerekliliği gibi çeşitli faktörler sayılabilir. Ek olarak, geleneksel saflaştırma yöntemlerinin kullanılması zaman alıcı olup yoğun iş gücü, pahalı kimyasal ve ekipmanların kullanılmasını gerektirmektedir. Endüstride birçok alanda enzim kullanımının artması ile birlikte enzimlerin daha hızlı, etkili ve verimli bir şekilde saflaştırılması konusu odak noktası haline gelmiş olup alternatif olarak yeni yaklaşımlar geliştirmek bilim dünyasında daha da önem kazanmıştır (Chew *et al.* 2019).

Günümüze kadar farklı kaynaklardan, farklı yöntemlerle proteaz enziminin saflaştırıldığı ve karakterize edildiği birçok çalışma yapılmıştır. Bununla birlikte, geleneksel TPP ve özellikle TPP'nin modifikasyonu ile geliştirilen farklı tekniklerin biyomoleküllerin saflaştırılması için kullanımı diğer geleneksel yöntemlerle karşılaştırıldığında oldukça yenidir ve yüksek verim, hız, düşük maliyet avantajlarıyla uygulamaya ve geliştirilmeye oldukça uygun olduğu literatürde vurgulanmaktadır.

Moringa oleifera bitkisinin yapraklarından TPP yöntemi ile proteazların saflaştırılıp potansiyel antibakteriyel aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada; TPP parametreleri optimize edilmiş olup pH 7'de, %35 (NH₄)₂SO₄ doygunluğunda ve 1.0:0.75 ham ekstrakt/t-bütanol oranında %96,20 verim ve 4.94 oranında geri kazanımı ile ara yüzeyde hedef proteazlar elde edilmiştir. (Abdoulaye *et al.* 2023).

Gul *et al.* (2022) tarafından yapılan çalışma, ananasın taç atığından bromelainin arındırılması ve geri kazanılması için TPP'nin etkili bir şekilde uygulanması konusu, bir ilk

olması bakımından önem arz etmektedir. Elde edilen sonuçlara göre, optimize edilmiş TPP koşulları altında, pH 7'de %70 (NH₄)₂SO₄ doygunluğunda ve 1.0:0.5 ham ekstrakt/t-bütanol oranında bromelain, %244 verimle 3.4 kata kadar başarıyla saflaştırılmıştır.

Pereira *et al.* (2022) çalışmalarında, ILTPP yöntemi kullanılarak baldan proteinlerin çıkarılması ve saflaştırılması çalışılmış ve bal içerisindeki proteinler yüksek geri kazanım verimleriyle (%82,8–97,3) ve saflık seviyeleriyle (%80–90) ara yüzeyde çöktürülmüştür. ILTPP sistemlerinin; proteinlerin, antioksidanların ve karbonhidratların bal içerisinde tek adımda ayrılmasına olanak sağladığı ve buna ek olarak tek bir adımda antioksidanların ve karbohidratların farklı sıvı fazlara ayrıldığı da bildirilmiştir.

Başka bir çalışma ise çevresel etkiyi en aza indirmek ve atık biyokütleyi değerlendirmek için protein açısından zengin atık biyokütleden keratinin verimli bir şekilde izole edilmesini konu edinmiştir. Çalışmada atık hayvan yünü, insan saç ve tavuk tüyü gibi protein açısından zengin atık biyokütlenin tamamen değerlendirilmesi için yeni bir yaklaşım gösterilmiştir. Atık biyokütle öncelikle tetrametilamonyum hidroksit içeren bir sulu çözelti içinde çözündürülmüş ve ardından keratin izole edilmiştir. Sonuçta, atık hayvan yünü, insan saç ve tavuk tüyünden sırasıyla yaklaşık olarak %19-20, %35-37 ve %69-74 oranında ham keratin izole edilmiştir. Keratin izolasyonu sonrası elde edilen solvent, toprak ve çamur mikroorganizmalarıyla uyumlu olduğu için yeşil mercimek (*Vigna radiata*) tohum uygulamasında kullanılmıştır. Uygulama sonrası bitkilerin boyunda (%4-12) ve ağırlığında (%9-58) önemli bir artış gözlemlenmiştir (Maity *et al.* 2022).

Clerici *et al.* (2021) tarafından yapılan çalışmada, tüy unu (FM), tatlı peynir altı suyu (LW), liyofilize peynir altı suyu (WL) ve kasava küspesi (CB) gibi tarımsal-endüstriyel yan ürünler substrat olarak kullanılarak bakteriyel proteaz üretilmiş ve antioksidan hidrolizat üretimi için kullanımı incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, FM (30 g/L), değerli ürünler elde etmek için protein açısından zengin ve ekonomik biyokütle olarak kullanılabilir olduğu ve LW veya CB (5 ve 10 g/L)'nin eklenmesi sonucu proteaz aktivitesinin arttığı gözlemlenmiştir. Kültür ortamlarındaki FM konsantrasyonlarının artmasıyla (40 g/L'ye kadar) protein hidrolizatlarında artış görülmüş; ancak FM ortamının WL veya CB ile desteklenmesinin hidrolizatların antioksidan aktiviteleri üzerinde belirgin etkileri (olumlu veya olumsuz) gözlenmemiş olup, FM artı LW kullanımı proteaz üretimini azaltırken, kültür süpernatantındaki antioksidan aktivitelerin artışını geciktirdiği de bildirilmiştir.

Bir başka çalışmada, *Carica papaya* bitkisinden Lateks papain maddesinin saflaştırılması, optimize edilmiş TPP koşulları altında (%40 (NH₄)₂SO₄, ham ekstrakt/t-BuOH oranı 1.0:0.75, pH 6 ve 25°C) gerçekleştirilmiştir. Sonuçta, sulu fazda lateks-papaini 11,45 kat

saflaştırma oranı ve %134 geri kazanım ile elde edilmiş olup süt pıhtılaştırmada ve et yumuşatma uygulamalarında umut verici sonuçları bildirilmiştir (Hafid *et al.* 2020).

Salvi *et al.* (2020) çalışmalarında, TPP metodu ilk kez soya fasulyesi (*Glycine max*)'nden çözünür epoksit hidrolazın saflaştırılması ve konsantre edilmesi için kullanılması sonucu, epoksit hidrolazın çökelti olarak ara fazda toplandığını gözlemlemişlerdir. TPP'de, organik çözücü olarak dimetil karbonat ve tuz olarak amonyum sülfat kullanılmış, ayrıca epoksit hidrolaz mikrodalga destekli TPP (MWTPP) tekniği kullanılarak kısmi olarak saflaştırılmış ve bu iki yöntem karşılaştırılmıştır. Optimize edilmiş koşullar altında (%40 amonyum sülfat doygunluğu, 1.0:1.5 (ham ekstrakt/solvent oranı, 45°C), TPP'den elde edilen geri kazanım ve saflaştırma kat sayısı sırasıyla $121,2 \pm 1,6$ ve $2,14 \pm 0,03$ olarak bulunmuştur. Aynı koşullar altında, mikrodalga ışınlama altında çalıştırılan sistem ile inkübasyon süresi 1 saat yerine 20 W mikrodalga gücü ve %50 görev döngüsü ile 8 dakikaya indirilerek geri kazanım $142,6 \pm 1,9$ ve saflaştırma kat sayısı $2,38 \pm 0,02$ olarak elde edilmiştir. Sonuçta, mikrodalga destekli TPP kullanımıyla geri kazanımın %1,17 kat arttırıldığı ve MWTPP'in yüksek verim ve saflıkla enzim ve proteinlerin ekstraksiyonu için basit bir yöntem olduğu gösterilmiştir.

Bir başka çalışmada, *Bacillus sp.* ICTF2 suşundan endüstriyel olarak önemli bir alkalın proteazın düşük maliyetle saflaştırılması için optimize edilmiş TPP tekniği kullanılarak %147,9 verim ve 12 kat saflıkla kısmi olarak saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan enzim, 40°C'de, 2 saat inkübasyondan sonra bile %96 aktivitesini korumuş olup, bunun yanında ticari deterjanlarla son derece uyumlu ve stabil bir şekilde çalışmakta olduğu ve tüm deterjanların varlığında %75 oranında aktivitesini koruduğu rapor edilmiştir (Kaur *et al.* 2019).

Chew *et al.* (2019), mikrodalga destekli üç fazlı ayırma tekniğini (MWTPP) kullanarak mikroalglerden (*Chlorella vulgaris*) proteinlerin ekstraksiyonunu gerçekleştirmişlerdir. Amonyum sülfat konsantrasyonu (%30 w/w), karışım/çözücü oranı (1.0:1.0), mikrodalga ışınlama süresi (120 saniye), görev döngüsü (%80), mikrodalga gücü (100 W) ve mikroalg biyokütlesi konsantrasyonu (%0,5 w/w) gibi MWTPP için optimize edilmiş koşullar altında elde edilen verilere göre protein veriminin geleneksel TPP işlemine göre yaklaşık 2,54 kat arttığı ve verimin %24,9'dan %63,2'ye çıktığı bildirilmiştir. Ek olarak, mikrodalga entegrasyonunun, mikroalglerin hücre parçalanmasına büyük katkıda bulunarak değerli protein ve diğer biyomoleküllerin salınımını sağladığı, hızlı bir şekilde ekstraksiyon ve saflaştırma gerçekleştirmede yüksek potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir.

Başka bir araştırmada, *Wrightia tinctoria* R. Br. bitkisinden süt pıhtılaştırma proteazlarının (IP) saflaştırılması çalışılmıştır. Yöntem olarak TPP kullanılarak IP, %60 amonyum sülfat ve

1.0:1.0 ham ekstrakt/t-bütanol oranında ara yüzey fazında elde edilmiştir. Elde edilen proteazın karakterizasyon çalışmaları sonucunda IP fraksiyonu, peynir yapımı için uygun süt pıhtılaşma aktivitesi oluşturmuş ve bu çalışma, *W. tinctoria* proteazlarının peynir yapma potansiyeline sahip olarak süt pıhtılaşmasında kullanılabilirliğini raporlayan ilk çalışma olarak literatürde yer almıştır (Rajagopalan & Sukumaran, 2018).

Gagaoua *et al.* (2017) tarafından yapılan çalışmada, Akdeniz *F. carica* lateksinden ficin'in saflaştırılması ve geri kazanılması için TPP yöntemi etkili bir şekilde uygulanmıştır. Sonuçta ficin enzimi, 6,04 kat saflaştırılmış ve %167 verimle elde edilmiştir. Bu teknik kullanılarak, enzim konvansiyonel yöntemlerde kullanılan farklı kromatografik adımlardan kaynaklanan otolizden korunmakla birlikte, TPP'nin hızlı, basit, ölçeklenebilir ve ekonomik bir yöntem olduğu vurgulanmıştır.

Başka bir çalışmada ise, atık patates kabuklarından polifenol oksidaz enziminin (PPO) ultrason destekli üç fazlı ayırma (UATPP) yöntemi ile elde edildiği gösterilmiştir. Çalışma sonucunda, optimize edilmiş UATPP'nin, geleneksel TPP sistemine kıyasla daha yüksek bir saflaştırma oranı olan 19,7 ve %98,3 verimle elde edildiği bildirilmiştir. UATPP'de, döngü sayısı, süre, frekans, güç ve pH gibi parametrelerin optimizasyonunun PPO enziminin saflaştırılmasında büyük etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Böylece, geleneksel TPP'ye göre artan saflaştırma oranı ve geri kazanım sağlanmış ve işlem süresinin 40 dakikadan 5 dakikaya kadar indirildiği de sonuçlar arasında belirtilmiştir (Nipadkar & Rathod, 2015).

Yine ultrason destekli üç fazlı ayırma yöntemi kullanılarak başarılı sonuçlar elde edilen başka bir çalışmada, *S. marcescens* NRRL B23112'den serratiopeptidazın saflaştırılması çalışılmıştır. UATPP için optimal koşullar altında (amonyum sülfat konsantrasyonu (%30 w/v), ham enzim çözeltisi:t-bütanol oranı (1.0:1.0), pH 7, ultrason yoğunluğu 0.05 W/cm², ultrason frekansı 25 kHz, süre 5 dakika ve çalışma döngüsü %20) geleneksel TPP'ye kıyasla, geri kazanım oranının %83'ten %96'ya yükseldiği, işlem süresinin 60 dakikadan 5 dakikaya düştüğü gösterilmiştir (Pakhale & Bhagwat, 2016).

Ketnawa *et al.* (2014) çalışmalarında, balık iç organlarından alkalın proteazların TPP yöntemi ile saflaştırılması ve biyokimyasal karakterizasyonu yapılmıştır. Ayrıca protein hidroliz modelleri de incelenmiştir. Optimize koşullar altında (sodyum sitrat (%50 w/v), karışım/organik çözücü 1.0:0.5 (v/v) oranında, pH 8 ve 25°C inkübasyon sıcaklığında) TPP işlemi yapıldığında maksimum %220 verimle 6 kat saflaştırma elde edilmiştir. Elde edilen enzimin, ticari tripsinle karşılaştırıldığında protein hidrolizatları üretiminde yüksek etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir.

Fischer *et al.* (2013) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, proteinlerin saflaştırılmasını hedefleyen yeni bir teknik sunulmuştur. Bu yeni teknik, manyetik nanopartiküllerin kullanıldığı ve 25°C sıcaklıkta faz ayrımının gerçekleştirildiği sulu ikili fazlı bir sistemdir. Araştırmacılar tarafından, bu sistemde farklı boyutlardaki nanopartiküller kullanılarak yüksek verim elde edilebileceği gösterilmiştir. Çalışmada, *Escherichia coli* periplazmasında bulunan A33 Fab adlı bir antikor parçasının manyetik ekstraksiyon yöntemiyle saflaştırılması gerçekleştirilmiş ve sonuçta, A33 Fab'ın neredeyse %70'i, manyetik parçacık içermeyen alt faz eluatında %98'in üzerinde saflıkta ve 2 kat konsantre formda geri kazanıldığı bunun da 6,3 kat saflaştırma faktörüne karşılık geldiğini bildirmişlerdir.

Tezin Amacı

Gıda üretim zincirleri tarafından muazzam miktarlarda üretilen atıklar, ekonomik ve çevresel açıdan hala önemli bir sorun teşkil etmektedir. Ancak onların kullanımını ve değerlendirilmesini amaçlayan teknolojik yaklaşımlar bu senaryoyu değiştirmektedir. Gıda atıklarını farklı ürünlere dönüştürmede kullanılan stratejilerden birisi de mikrobiyal süreçlerdir. Bu prosesler ile atıklardan biyoyakıtlar, biyopolimerler, biyosüpfaktanlar ve enzimler gibi değerli ürünler elde edilebilmektedir. Endüstride ve biyoteknolojideki potansiyel kullanımıyla büyük bir öneme sahip olan proteolitik enzimlerin üretimi de, çoğu enzimde olduğu gibi üstesinden gelinmesi gereken bazı dezavantajları barındırmaktadır. En önemli dezavantajlarından birisi de enzimin büyük ölçekli üretiminde yüksek maliyet ve düşük verim gibi karşılaşılan problemlerdir. Yaygın olarak bulunan düşük maliyetli gıda atıkları ve yan ürünlerinin mikrobiyal kültürasyon için substrat olarak kullanımı, mikrobiyal proteazları elde etmek için günümüzde araştırmaların odak noktası olmuştur. Bu konudaki araştırmalar da, upstream proseslerin temel bir parçasını oluşturmaktadır.

Enzim üretiminde aşılması gereken problemlerden bir diğeri de üretilen enzimlerin uygun yöntemlerle ayrıştırılması ve saflaştırılmasıdır. Biyomoleküllerin izolasyonu ve saflaştırılması, biyoteknolojik süreçlerin verimliliğini belirleyen kritik aşamalardır. Downstream prosesler, toplam üretim maliyetlerinin %70'inden fazlasını oluşturmaktadır ve geleneksel protein saflaştırma teknikleri (ultrafiltrasyon, iyon değişim kromatografisi, afinite kromatografisi veya amonyum sülfat çöktürmesi, membran ayırma gibi) zaman alıcı ve maliyeti yüksek yöntemler olmakla birlikte çok basamaklı olarak gerçekleşen bu teknikler hedef üründe önemli kayıplar meydana getirebilmektedir. Sonuçta, enzimlerin ve proteinlerin büyük ölçekli saflaştırılmasını gerçekleştirebilmek için etkili downstream proses yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Günümüzde, geleneksel kromatografik tekniklere alternatif olarak ham ekstraktta direkt uygulanabilen, hızlı, yüksek verimli ve maliyeti düşük TPP gibi non-

kromatografik yöntemlerin kullanımı popüler hale gelmiştir. Bununla birlikte, enzimlerin ekstraksiyon verimini ve saflaştırma oranını artırmak amacıyla modifiye edilmiş TPP varyantları da (ultrason destekli TPP, mikrodalga destekli TPP, makro afinite ligand-kolaylaştırılmış TPP ve iyonik likit TPP gibi) halihazırda kullanılmakta ve geliştirilmektedir. Bu gibi modifiye edilmiş yöntemlerin uygulama sonuçlarının umut verici olduğu literatürde vurgulanmakta olup daha fazla biyomolekül örneğinin ayrımı ve saflaştırılması konusunda TPP sisteminin işlem gücünü artıracak da öngörülmektedir.

Bu tez çalışmasında, ilk olarak Nevşehir-Kozaklı kaplıcası sıcak su kaynağından alınan örneklerden izolasyonu ve identifikasyonu önceden yapılmış olan termofilik *B. licheniformis* SO7 bakterisi kullanılarak bazı gıda atıklarından alkalın proteaz enziminin üretiminin gerçekleştirilmesi, üretilen alkalın proteazın klasik TPP yöntemi ve TPP'nin yeni bir modifikasyonu olan manyetik alan destekli TPP (MFTPP) ile ilk kez bu çalışmada kısmi olarak saflaştırılması, biyokimyasal karakterizasyonu ve saflaştırılan alkalın proteazın biyoteknolojik uygulanabilirliğinin araştırılması hedeflenmiştir.

MATERYAL VE METOD

Materyal

Kullanılan organizma

Bu tez çalışması kapsamında kullanılan mikroorganizmalar, Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU danışmanlığında Sultan ÖLMEZ' in hazırlamış olduğu Yüksek Lisans tezinde, izolasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiş olan bakteriler arasından seçilmiştir (Ölmez, 2017).

Tez çalışmasında kullanılan araç-gereç ve cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan araç-gereç ve cihazlar aşağıda Tablo 4' te gösterilmiştir.

Tablo 4. Tez Çalışmasında Kullanılan Araç-Gereç ve Cihazlar / Marka-Model

Araç-Gereç ve Cihazlar	Marka-Model
Agaroz Jel Elektroforez Cihazı	Thermo EC
Buzdolabı (+4/-20°C)	Vestel
Çalkalamalı İnkübatör	Zhicheng
Çeker ocak	TÜV-SÜD
Dondurucu (-86°C)	Glacier Ultralow Freezer
Etüv	Redline by-BINDER
Falkon Tüpler	Eppendorf
Hassas Terazî	Ohaus Pioneer
Isı Bloğu	Lab-Line
Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	Heidolph
Jel Görüntüleme Cihazı	Quantum Vilber Courma
Kar Makinesi	Angelantoni
Kuvarz Küvetler	Merck
Mini Santrifüj	Hangzhou Allheng
Manyetik Hipertermi	MSI Automation Hyper-5
Otoklav	Hmc Hiramaya
Mikropipet Takımı	Thermo Scientific ve Eppendorf
Parafilm	Isolab
pH Metre	Mettler Toledo FiveEasy Plus
Saf Su Cihazı	Mp Minipure
Santrifüj Cihazı	Hettich Zentrifugen Mikro
SDS-PAGE Elektroforez Cihazı	Bio-rad
Steril Kabin	Telstar Bio-II-A

Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar

Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar ve markaları aşağıda Tablo 5’ te gösterilmiştir.

Tablo 5. Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasallar / Markaları

Kimyasallar	Marka
Amonyum sülfat	Sigma
Coomassie Brilliant Blue G-250	Fluka
3, 4 Dikloroizokumarin	Sigma
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Sigma
Distile su	Thermo
Etil Alkol	Sigma
Etilendiamintetraasetikasit (EDTA)	Sigma
Fosforik Asit	Sigma
Gliserol	Sigma
Hidroklorik Asit (HCl)	Sigma
Indol-3-asetik asit (IAA)	Sigma
İzopropanol	Sigma
Kalsiyum Klorür (CaCl ₂)	Sigma
Lizozim	Sigma
Magnezyum Klorür (MgCl ₂)	İnvitrogen
N,N,N'',N''-Tetrametilendiamin (TEMED)	Sigma
Sodyum Fosfat	Sigma
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Sigma
t-bütanol	Ensure
Tris (hidroksimetil) aminometan	Sigma
TSA	Lab M
LB Broth	Sigma

Tez Çalışmasında Kullanılan Besiyerleri

Tryptone Soy Agar (TSA): 3 g TSA tartılarak, 100 mL didistile su içerisinde çözöldü ve 1 atm basınç altında 121°C’de 15 dakika otoklavlandı.

Tryptone Soy Broth (TSB): 3 g TSB tartılarak, 100 mL didistile su içerisinde çözöldü ve 1 atm basınç altında 121°C’de 15 dk otoklavlandı.

Luria Bertani (LB Broth): 2 g LB Broth tartılarak, 100 mL didistile su içerisinde çözöldü ve 1 atm basınç altında 121°C’de 15 dk otoklavlandı.

Proteaz Katı Besiyeri: 0,05 g/L MgSO₄·7H₂O, 0,5 g/L KCl, 1 g/L K₂HPO₄, 30 g/L TSA tartılarak 500 mL distile su içerisinde çözüldü ve 15 dakika otoklavlandı (121°C). Skim Milk Powder ayrı olarak, 48 g/L tartılıp, 500 mL distile su içerisine eklendi ve manyetik karıştırıcıda çözdürüldü. 1 atm basınç altında 121°C’de 5 dk otoklavlanarak hazırlandı ve steril SMP çözeltisi kuru hava sterilizatöründe steril agar besiyerine eklenerek petrilere döküldü.

Gıda Atıklarından Oluşturulan Sıvı Üretim Besiyerleri: Konserve atık, evsel atık ve süt ürünleri atığı olmak üzere seçilen 3 gruptan oluşan atık gıdalar, ticari Luria Bertani (LB Broth) sıvı besiyeri ile kombine olarak kullanıldı. Daha sonra 3 grup içinden en iyi sonuç veren örnekler seçilerek LB Broth ile kombineli ve hiçbir kimyasal eklenmeden yalnız atık formunda kullanıldığı çeşitli sıvı üretim besiyerleri hazırlandı. Besiyeri örnekleri (pH 7,5) 1 atm basınç altında 121°C’de otoklavlandı. Gıda atıkları ile oluşturulan sıvı üretim besiyerlerinin hazırlanışı aşağıda Tablo 6’ da gösterilmiştir.

Tablo 6. LB Broth Kombinasyonlu Atık Gıda (ticari konserve ve evsel atık) Sıvı Üretim Besiyerlerinin Hazırlanışı

Ticari Konserve Gıda Atıkları	Hazırlanışı	Evsel Gıda Atıkları	Hazırlanışı	Süt Ürünleri Evsel Atıkları	Hazırlanışı
Barbunya altı suyu	90 mL barbunya altı suyuna 2 g LB Broth tartılarak eklendi. 7,5 pH’da örnek ile son hacim 100 mL’ye tamamlandı.	Barbunya altı suyu	90 mL barbunya altı suyuna 2 g LB Broth tartılarak eklendi. 7,5 pH’da örnek ile son hacim 100 mL’ye tamamlandı.	Yoğurt altı suyu	90 mL yoğurt altı suyuna 2 g LB Broth tartılarak eklendi. 7,5 pH’da örnek ile son hacim 100 mL’ye tamamlandı.
Bezelye altı suyu	90 mL bezelye altı suyuna 2 g LB Broth tartılarak eklendi. 7,5 pH’da örnek ile son hacim 100 mL’ye tamamlandı.	Bezelye altı suyu	90 mL bezelye altı suyuna 2 g LB Broth tartılarak eklendi. 7,5 pH’da örnek ile son hacim 100 mL’ye tamamlandı.	Peynir altı suyu	90 mL peynir altı suyuna 2 g LB Broth tartılarak eklendi. 7,5 pH’da örnek ile son hacim 100 mL’ye tamamlandı.

Tablo 6. (devamı)

Fasulye altı suyu	90 mL fasulye altı suyuna 2 g LB Broth tartılarak eklendi. 7,5 pH'da örnek ile son hacim 100 mL'ye tamamlandı.	Fasulye altı suyu	90 mL fasulye altı suyuna 2 g LB Broth tartılarak eklendi. 7,5 pH'da örnek ile son hacim 100 mL'ye tamamlandı.	Yağlı Peynir altı suyu	90 mL yağlı peynir altı suyuna 2 g LB Broth tartılarak eklendi. 7,5 pH'da örnek ile son hacim 100 mL'ye tamamlandı.
Mısır altı suyu	90 mL mısır altı suyuna 2 g LB Broth tartılarak eklendi. 7,5 pH'da örnek ile son hacim 100 mL'ye tamamlandı.	Mısır altı suyu	90 mL mısır altı suyuna 2 g LB Broth tartılarak eklendi. 7,5 pH'da örnek ile son hacim 100 mL'ye tamamlandı.	Yağlı Peynir altı suyu	90 mL yağlı peynir altı suyuna 2 g LB Broth tartılarak eklendi. 7,5 pH'da örnek ile son hacim 100 mL'ye tamamlandı.
Nohut altı suyu	90 mL nohut altı suyuna 2 g LB Broth tartılarak eklendi. 7,5 pH'da örnek ile son hacim 100 mL'ye tamamlandı.	Nohut altı suyu	90 mL nohut altı suyuna 2 g LB Broth tartılarak eklendi. 7,5 pH'da örnek ile son hacim 100 mL'ye tamamlandı.	Kaynatılmamış peynir altı suyu	90 mL peynir altı suyuna 2 g LB Broth tartılarak eklendi. 7,5 pH'da örnek ile son hacim 100 mL'ye tamamlandı.
Garnitür altı suyu	90 mL garnitür altı suyuna 2 g LB Broth tartılarak eklendi. 7,5 pH'da örnek ile son hacim 100 mL'ye tamamlandı.	Yeşil mercimek altı suyu	90 mL yeşil mercimek altı suyuna 2 g LB Broth tartılarak eklendi. 7,5 pH'da örnek ile son hacim 100 mL'ye tamamlandı.		
Bamya altı suyu	90 mL bamya altı suyuna 2 g LB Broth tartılarak eklendi. 7,5 pH'da örnek ile son hacim 100 mL'ye tamamlandı.	Bulgur altı suyu	90 mL bulgur altı suyuna 2 g LB Broth tartılarak eklendi. 7,5 pH'da örnek ile son hacim 100 mL'ye tamamlandı.		

Enzim Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Tris – HCl Tampon Çözeltisi (100 mM pH 8,5): 1,21 g Tris, 90 mL didistile su içerisinde çözüldü. pH 8,5 olacak şekilde 10 M HCl damla damla eklendi. Son hacim 100 mL olacak şekilde distile su ile tamamlandı.

Kazein Çözeltisi (%0,65 w/v): 0,65 g kazein tartılarak, 90 mL Tris-HCl tampon çözeltisine (100 mM, pH 8,5) eklendi. Isıtmalı manyetik karıştırıcıda düşük ısıda (30-50°C), kazein tam olarak çözünene kadar karıştırıldı. pH dengesi korunarak damla damla HCl ve NaOH eklenerek son pH 8,5 ve son hacim 100 mL olacak şekilde tamamlandı.

Triklorik Asit (TCA) Çözeltisi (110 mM): 1,79 g TCA tartılarak, 100 mL distile su içerisine çözüldü.

Sodyum Karbonat Çözeltisi (0.5 M Na₂CO₃): 5,29 g Na₂CO₃ tartılarak, 100 mL distile su içerisinde çözüldü.

Folin-Ciocalteu (Folin Reaktifi 0,5 M): 12,5 mL Folin reaktifi üzerine son hacim 50 mL olacak şekilde distile su ilave edildi.

Protein Tayininde Kullanılan Çözelti ve Tamponlar

Bradford Çözeltisi: 0,1 g Coomassie Brilliant Blue G-250 tartılarak, 50 mL %95'lik EtOH içerisinde çözüldü ve üzerine fosforik asitten (%95'lik) 100 mL ilave edildi. Çözeltinin son hacmi 1000 mL olacak şekilde distile su ile tamamlandı ve kullanılıncaya kadar oda sıcaklığında karanlık ortamda muhafaza edildi.

Standart Serum Albumin Çözeltisi (1 mg/mL): Standart serum albümininden 1 mg tartılıp, 1 mL distile su içerisinde çözülerek hazırlandı.

SDS-PAGE Analizinde Kullanılan Çözelti ve Tamponlar

Tris-HCl (1 M, pH 8,8): 27,23 g Tris, tartılarak, 90 mL distile su içerisinde çözüldü, 10 M HCl ile pH 8,8'e ayarlandı. Son hacim 100 mL olacak şekilde distile su ile tamamlandı.

Tris-HCl (1 M, pH 6,8): 6 g Tris tartılarak, 90 mL distile su içerisinde çözüldü ve 10 M HCl ile pH 6,8'e ayarlandı. Son hacim 100 mL olacak şekilde distile su ile tamamlandı.

%30'luk Akrilamid-Bisakrilamid Çözeltisi: 6 g akrilamid ve 0,16 g bisakrilamid tartılarak, 13,84 mL distile su içerisinde çözülerek hazırlandı.

%10'luk SDS Çözeltisi: 4,5 mL saf su içerisinde 1 g SDS çözüldü. Son hacim 10 mL olacak şekilde distile su ile tamamlandı.

%10'luk PER Çözeltisi: 1 g amonyum persülfat tartılarak, 4,5 mL distile su içerisinde çözüldü ve son hacim 10 mL olacak şekilde distile su ile tamamlandı.

Numune Tamponu: 1 mL gliserin, 1 mL SDS (%10), 0,65 mL Tris-HCl (1M, pH 8,8), 0,03 mL %1'lik brom timol mavisi üzerine distile su eklenerek son hacim 10 mL'ye tamamlandı. Kullanımdan hemen önce, hazırlanan tampon üzerine 500 µl β-merkaptoetanol eklendi.

Yürütme Tamponu (10X SDS-PAGE): 14,4 g glisin, 3 g Tris ve 10 mL %10'luk SDS karıştırılarak son hacim distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

Ayırma Jeli: 4,4 mL akrilamid (%30) - bisakrilamid (%0,8), 0,2 mL SDS (%10'luk), 5 mL Tris-HCl (1 M, pH 8,8), 0,13 mL TEMED (%5'lik), 0,1 mL PER (%1,5'lik) 3,15 mL distile su ile hazırlandı.

Yığma Jeli: 0,44 mL akrilamid (%30) - bisakrilamid (%0,8), 0,03 mL SDS (%10'luk), 0,41 mL Tris-HCl (1 M, pH 6,8), 0,03 mL TEMED (%5'lik), 0,1 mL PER (%1,5'lik) 2,450 mL distile su ile hazırlandı.

Gümüş Boyama İçin Kullanılan Çözeltiler

Tespit Çözeltisi: 30 mL etanol (%90'lık), 10 mL asetik asit ve 60 mL distile su ve karıştırılarak hazırlandı.

Redüksiyon Çözeltisi: 4,8 g sodyum asetat tartılarak 45 mL etanol ve 80 mL distile su ile karıştırıldı. CH₃COOH ile pH 6'ya ayarlandı. Üzerine 150 mg sodyum tiyosülfat ve 3 mL gluteraldehit eklenerek hazırlandı.

Gümüş Nitrat Çözeltisi: 150 mg AgNO₃ ve 3 µl formaldehit 150 mL saf su ile karıştırılarak boyamadan hemen önce hazırlandı.

Yıkama 1 Çözeltisi: 3,75 g Na₂CO₃ ve 120 µl formaldehit 270 mL saf su ile karıştırılarak hazırlandı.

Yıkama 2 Çözeltisi: 1 mL gliserin ve 12,5 mL asetik asit karıştırılarak son hacim distile su ile 250 mL'ye tamamlandı.

Karakterizasyon Çalışmalarında Kullanılan Tampon ve Metal İyon Çözeltileri

Glisin-NaOH Tamponu (0,1 M): 0,75 g glisin tartılarak, 90 mL distile suda çözüldü. Daha sonra istenilen pH değerine (HCl ve NaOH ile) ayarlandı. Son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

Tris-HCl Tamponu (0,1 M): 1,21 g Tris tartılarak, 90 mL distile su içerisinde çözöldü. İstenilen pH değeri ayarlandıktan sonra Son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

Sodyum Fosfat Tamponu (10 mM): 1,15 g sodyum fosfat tartılarak, 90 mL distile su içerisinde çözöldü. İstenilen pH değeri ayarlandıktan sonra Son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı

CaCl₂ (10 mM): 0,0147 g CaCl₂ tartılarak, 10 mL Tris-HCl (100 mM, pH 8,5) tamponunda çözöldü.

FeSO₄ (10 mM): 0,0278 g FeSO₄.7H₂O tartılarak, 10 mL Tris-HCl (100 mM, pH 8,5) tamponunda çözöldü.

KCl (10 mM): 0,0075 gr KCl tartılarak, 10 mL Tris-HCl (100 mM, pH 8,5) tamponunda çözöldü.

MgCl₂ (10 mM): 0,0203 g MgCl₂.6H₂O tartılarak, 10 mL Tris-HCl (100 mM, pH 8,5) tamponunda çözöldü.

MnCl₂ (10 mM): 0,0162 g MnCl₂.2H₂O tartılarak, 10 mL Tris-HCl (100 mM, pH 8,5) tamponunda çözöldü.

NiCl₂ (10 mM): 0,0238 g NiCl₂.6H₂O tartılarak, 10 mL Tris-HCl (100 mM, pH 8,5) tamponunda çözöldü.

ZnCl₂ (10 mM): 0,0136 g ZnCl₂ tartılarak, 10 mL Tris-HCl (100 mM, pH 8,5) tamponunda çözöldü.

Diyaliz İşlemi İçin Kullanılan Tampon

Sodyum Fosfat (pH 8): 2,4 g sodyum fosfat tartılarak 900 mL distile su içinde çözöldü. pH 8'e ayarlanarak son hacim 1000 mL olacak şekilde distile su ile tamamlandı.

Yöntem

Proteaz üreten bakteri izolatlarının katı besiyerinde belirlenmesi ve seçimi

Daha önce izolasyon ve identifikasyonu yapılmış olan termofilik *B. licheniformis* bakteri suşlarının TSA katı besiyeri ortamına çizgi ekimi yapılarak, ekilen petriler 55°C etüvde 24 saat inkübe edildi. Elde edilen saf kolloniler steril öze yardımı ile toplanıp, Skim Milk agar besiyeri ortamına çizgi ekim tekniği ile tekrar ekildi. 55°C etüvde 24-48 saat süreyle inkübe edildikten sonra bakteri izolatları tarafından üretilen proteazın petride oluşturduğu zon görüntüleri incelendi. Her bir petrideki koloni çevresinde oluşan zon çapları ölçölerek en iyi

proteaz üreten bakteri suşu belirlendi ve tez çalışması boyunca yapılan tüm çalışmalarda kullanıldı.

Sıvı besiyerine bakteri inokülasyonu

TSA katı besiyerine *B. licheniformis* SO7 suşu ekimi yapıldı ve 55°C etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı. Elde edilen saf kolonilerden biri seçilerek TSB sıvı besiyerine steril öze yardımı ile alındı ve 55°C çalkamalı inkübasyonda 24 saat boyunca inkübe edildi. Süre sonunda büyümüş ve çoğalmış olan bakterilerin hücre yoğunluğunu belirlemek için spektrofototrede (600 nm) ölçümü yapıldı. Ölçülen değer, 1/OD hesabına göre hesaplandı ve 100 mL üretim besiyerine inoküle edildi.

Atık gıda sıvı üretim besiyeri kullanılarak proteaz üretimi

Protein içerikleri nispi olarak bilinen çeşitli gıdaların alt suları, mikrobiyal alkali proteaz üretimi amacıyla bakteri sıvı üretim besiyeri olarak kullanıldı. Süt ürünü, konserve ve evsel atık olmak üzere 3 grup için ayrı ayrı denemeler yapıldı. Ticari olarak satın alınan konserve gıdaları arasından; bamya, barbunya, bezelye, fasulye, garnitür, mısır ve nohut alt suları seçildi. Evsel olarak üretilmiş olan yoğurt ve peynir altı süt ürünlerinin yanı sıra; barbunya, bezelye, bulgur, fasulye, mısır, nohut, yeşil mercimek gibi gıda alt su örnekleri seçildi. Her bir atık örneği 2 g ticari LB Broth ile kombinasyonlu olarak hazırlandı ve kontrol besiyeri olarak LB Broth sıvı yeri kullanıldı.

Bakteri inokülasyonu sonrasında 7 gün boyunca her bir örnek için bakteri hücre yoğunluğu (OD) ölçüldü ve aktivite tayini yapıldı. Aktivite tayini sonucunda her bir grup içerisinde en yüksek aktivite gösteren besiyeri örnekleri seçildi. Bu besiyeri örnekleri, proteaz üretme potansiyellerinin belirlenmesi amacıyla tekrar ticari LB Broth ile kombinasyonlu şekilde ve LB Broth olmaksızın sade şekilde hazırlandı. 7 gün süresince hücre yoğunlukları ve aktivite tayinleri yapıldı. En iyi sonucu veren üretim besiyeri için optimizasyon çalışmaları (pH, sıcaklık, süre) yapılarak tez çalışması boyunca sıvı üretim besiyeri olarak kullanıldı. Ayrıca, elde edilen veriler doğrultusunda, en iyi sıvı üretim besiyeri belirlendikten sonra bu gıda atığı liyofilize edilerek, liyofilize ürünün proteaz üretimi üzerindeki etkileri incelendi. Liyofilizasyon işlemi, Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji ve Araştırma Merkezi'nde (DAYTAM) yapıldı.

Response Surface Methodology (RSM) ile enzim üretimi istatistiksel optimizasyonu

Bu çalışmada, Box-Behnken deneysel tasarım yöntemi (BBD) proteaz üretimi üzerine bazı fermentasyon parametrelerinin etkisinin belirlenmesi ve maksimum proteaz aktivitesi ve

spesifik aktivitesi sağlayan parametrelerinin kombinasyonun belirlenmesi için kullanılmıştır. BBD ile 3 farklı faktörün -1, 0 ve +1 seviyelerinde yanıt yüzey tasarımı oluşturulmuş ve araştırılan her bir faktörün seviyeleri ve kodlanmış değerleri Tablo 7’de verilmiştir. Proteaz üretimi için önemli fermantasyon parametrelerinden olan başlangıç pH, inkübasyon sıcaklığı, ve inkübasyon süresi bağımsız değişkenler olarak belirlenirken proteaz aktivitesi bağımlı değişkendir. Bu tasarıma göre, deneysel tasarım yönteminde toplam 29 deney oluşturulmuş ve tekrarlanabilirliğini test etmek için merkez noktası beş kez tekrarlanmıştır. Tüm deneyler üç tekerrür halinde gerçekleştirilmiş. Deneysel tasarımın gerçekleştirilmesi, katsayıların belirlenmesi, veri analizi ve grafiklerin çizilmesi için minitab deneme sürümü kullanılmıştır.

Modele ait eşitlik aşağıdaki gibidir:

$$Y = -\beta_0 + \beta_1A + \beta_2B + \beta_3C - \beta_{11}A^2 - \beta_{22}B^2 - \beta_{33}C^2 - \beta_{12}AB + \beta_{13}AC - \beta_{23}BC$$

Eşitlikte Y tahmin edilen yanıt yüzey fonksiyonu (aktivite), β_0 bütün bağımsız değişkenlerin etkilerinin sıfır olması durumunda Y’nin aldığı değeri, A, B v C bağımsız değişkenleri göstermektedir;

Tablo 7. Box-Behnken Tasarım İle Test Edilen Faktörlerin Düzeyleri (Besiyeri Optimizasyon)

Sembol	Bağımsız değişkenler	Unit	Derecelerin kodlanmamış değerleri		
			-1	0	1
A	pH		6	7,5	9
B	İnkübasyon sıcaklığı	°C	45	55	65
C	İnkübasyon süresi	Gün	1	3	5

Proteaz enzim aktivitesinin belirlenmesi

- Takami *et al.* (1989) tarafından, substrat olarak kazeinin kullanıldığı yöntem, modifiye edilerek alkali proteaz aktivitesi belirlendi.
- 500 μ l ham enzim çözeltisi üzerine 2,5 mL kazein (%0,65’lik) çözeltisinden eklendi ve 10 dk 37°C su banyosunda inkübe edildi. Kör olarak 500 μ l Tris-HCl tampon (100 mM pH 8,5) çözeltisi içeren reaksiyon karışımı kullanıldı.
- İnkübasyon sonunda, reaksiyonu sonlandırmak için 2,5 mL TCA (110 mM) çözeltisinden reaksiyon karışımları üzerine eklendi ve 30 dk boyunca 37°C su banyosunda inkübasyona bırakıldı.
- Süre sonunda örnekler, 6000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi.
- Süpernatanttan 1 mL alınarak örnekler etiketli tüplere aktarıldı. Üzerine 2,5 mL Na₂CO₃ (0,5 M) çözeltisi ve 0,5 mL Folin-Ciocalteu (0,5 M) reaktifi eklenerek, tüpler 37°C su banyosunda 30 dakika kadar bekletildi.

- İnkübasyon sonunda, spektrofotometrede köre karşı 660 nm' de absorbans ölçüldü.

Bir ünite (U) proteaz enzim aktivitesi, dakikada 1 µg tirozin açığa çıkaran enzim miktarı olarak ifade edildi. Bu hesaplama tirozin standart grafiğinin eğimi kullanılarak aşağıdaki formüle göre yapıldı.

$$\text{Proteaz Aktivitesi} \left(\frac{\text{EU}}{\text{mL}} \right) = \frac{\frac{\text{OD660}}{\text{Eğim}} \times \text{Toplam Hacim (mL)}}{\text{Enzim Hacmi} \times \text{İnkübasyon süresi (dk)}} \times \text{Seyreltme Faktörü}$$

Protein tayini

Tez çalışma boyunca saflaştırmanın her aşamasında, Bradford yöntemi (Bradford, 1976) kullanılarak protein tayini gerçekleştirilmiştir. Yöntemin esası, farklı konsantrasyonlardaki proteinlere Coomasie brilliant blue G-250 boyasının bağlanmasıyla ortaya çıkan mavi renkli çözeltilerin renk şiddetindeki değişikliklere dayanmaktadır. Sonuçta boyaya bağlanmış protein 595 nm dalga boyunda maksimum absorbans verir. Yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır.

Protein miktarını belirleyebilmek amacıyla, öncelikli olarak standart grafik aşağıdaki gibi hazırlandı:

- 1 mg /mL standart BSA çözeltisinden 10 ayrı tüpe sırayla 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL alınarak, tüplerin son hacim distile su ile 100 µl'ye tamamlandı.
- Her tüpün üzerine 4900 µl Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasından eklenerek vortekslendi ve oda sıcaklığında 10 dk boyunca inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda 595 nm'de köre karşı absorbans değeri ölçüldü. Kör olarak 100 µL distile su ile 4900 µl boyadan oluşan karışım kullanıldı. Okunan absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri kullanılarak standart grafik elde edildi.

Protein tayini yapılan örneklerden 100 µl alındı ve üzerine 4900 µl boya eklenerek 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 595 nm'de spektrofotometrede köre karşı absorbans değeri okundu. Oluşturulan standart grafiğin doğru denkleminde yararlanılarak protein miktarı belirlendi.

Tirozin Standart Grafiği

Proteaz aktivitesinin hesaplanmasında kullanılmak üzere tirozin standart grafiği oluşturuldu. Bunun için, 1 mg/mL konsantrasyonda tirozin stok çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan çözeltilerden Tablo 8'de gösterildiği gibi farklı oranlarda Tris-HCl (100mM pH 8,5) ile

seyreltme yapıldı. Proteaz aktivite tayininde olduğu gibi hazırlanan örneklerden 500 µl alınarak üzerlerine 2,5 mL NaCO₃ ve 500 µl Folin reaktifi eklenerek 30 dk 37°C su banyosunda inkübe edildi. Süre sonunda 660nm’de spektrofotometrik olarak ölçüm yapıldı. Absorbans değerlerine karşı tirozin standart grafiği çizildi ve elde edilen doğru denklemden yararlanılarak enzim aktiviteleri (U/mL) hesaplandı.

Tablo 8. Standart Tirozin Çözeltilerinin Hazırlanması

	Kör	1	2	3	4	5
Tirozin (1 mg/mL)	-	10 µl	20 µl	30 µl	40 µl	50 µl
Tris-HCl	500 µl	490 µl	480 µl	470 µl	460 µl	450 µl

Karbohidrat Standart Grafiği

Alkalın proteazın üretim besiyerinin karbohidrat içeriği tayini için karbohidrat standart grafiği oluşturuldu. Bunun için öncelikle 1 mg/mL glukoz stok çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan 1 mg/mL glukoz çözeltisinden tüplere 10-100 µL olacak şekilde eklendi ve distile su kullanılarak son hacim 100 µL’ye tamamlandı. Ve her örneğin üzerine 1 mL fenol (%0,6) ve 5 ml sülfirik asit eklenerek 90 °C’de 5 dk bekletildi. Spektrofotometrede 490 nm’de köre karşı absorbans ölçümü yapılarak standart grafik elde edildi. Oluşturulan standart grafiğin doğru denklemden yararlanılarak karbohidrat miktarı belirlendi.

Tablo 9. Standart Karbohidrat Çözeltilerinin Hazırlanışı

	Kör	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Glukoz (mg/mL)	-	10 µL	20 µL	30 µL	40 µL	50 µL	60 µL	70 µL	80 µL	90 µL	100 µL
dH ₂ O	100 µL	90 µL	80 µL	70 µL	60 µL	50 µL	40 µL	30 µL	20 µL	10 µL	-

Alkali proteazın saflaştırılması

İlk aşamada, *B. licheniformis* SO7 bakterisinin optimize koşullar altında hazırlanan besiyerinde inkübasyonu sonrası enzimi içeren ham enzim çözeltisi elde edilerek tüplere aktarıldı. Tüpler, 6000 rpm’ de 20 dk santrifüj edildi ve süpernatant kısmı alındı. Elde edilen ham enzim çözeltisi, çalışma boyunca tüm deneylerde enzim kaynağı olarak kullanıldı.

Bu tez çalışması kapsamında, alkali proteazın atık besiyerinde üretimi sonrası tek adımda kısmi olarak saflaştırılması amacıyla TPP’nin farklı ve yeni bir modifikasyonu olan MFTPP yöntemi kullanıldı.

Üç fazlı ayırma (TPP) yöntemi

Alkali proteazın saflaştırılmasında ilk olarak geleneksel TPP yöntemi uygulanarak optimizasyon çalışmaları yapıldı. Bu yöntem, ham enzim çözeltisine sırasıyla uygun tuz ve uygun organik çözücü eklendikten sonra belirli bir süre inkübasyona bırakılarak üç faz oluşması esasına dayanır. Bu uygulamada, literatürde yaygın olarak tercih edilen amonyum sülfat tuzu ve t-bütanol organik çözücüsü kullanıldı.

Amonyum Sülfat Doygunluğunun ve t-bütanol'ün TPP yöntemi ile Alkalın Proteaz saflaştırılması üzerine etkisi

TPP ile kısmi saflaştırma yönteminde en yüksek verimi elde edebilmek için öncelikli olarak, ortama eklenen amonyum sülfat tuzu ve t-bütanol organik çözgeninin miktarı optimize edildi.

Aşağıdaki formül baz alınarak, %20, %30, %40, %50, %60, %70, %80 olmak üzere 7 farklı amonyum sülfat oranı ve (1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5, 1.0:2.0) olacak şekilde 4 farklı ham enzim çözeltisi:t-bütanol oranı kullanılarak optimizasyon çalışması yapıldı. Her bir oranın denenmesi işleminde oluşan alt ve ara fazlar özenle ayrılarak aktivite ve protein miktar tayini yapıldı. Elde edilen verilerle saflaştırma katsayısına karşı, % verim grafikleri oluşturularak en iyi yüzde tuz konsantrasyonu ile en iyi organik çözgen oranı belirlendi (Alçiçek, 2017).

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

V: Enzim çözeltisi hacmi

S₁: 1'in kesri olarak çözeltide bulunan (NH₄)₂SO₄ konsantrasyonu

S₂: 1'in kesri olarak çözeltide bulunan (NH₄)₂SO₄ konsantrasyonu

pH'nın TPP yöntemi ile Alkalın Proteaz saflaştırılması üzerine etkisi

İlk optimizasyonda belirlenmiş olan yüzde tuz konsantrasyonu ve organik çözücü oranı kullanılarak uygun pH değeri belirlendi. 2 mL ham enzim çözeltisi üzerine %70 oranında (NH₄)₂SO₄ eklendi ve çözünene kadar vortekslendi. Karışım üzerine 1.0:0.5 oranında t-bütanol eklenerek tüpler alt üst edildi. Daha sonra, oluşan karışımın pH'sı (4-11) 8 farklı değerde ayarlandı. Tüm örnekler oda sıcaklığında 1 saat inkübasyon sonunda 6000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen alt faz örneklerine aktivite ve protein tayini yapıldı. Çıkan değerlere göre saflaştırma katsayısına karşı, % verim grafikleri oluşturularak uygun pH değeri belirlendi.

Sıcaklığın TPP yöntemi ile Alkalın Proteaz saflaştırılması üzerine etkisi

Sırasıyla en iyi tuz, organik çözücü miktarı ve pH olarak belirlenen değerlerde TPP sistemi için en iyi sıcaklık değerini belirleyebilmek amacıyla farklı sıcaklık aralıklarında optimizasyon yapıldı. 2 mL ham enzim çözeltisi üzerine %70 oranında $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eklendi ve çözünene kadar vortekslendi. Karışım üzerine 1.0:0.5 oranında t-bütanol eklenerek tüpler alt üst edildi. Daha sonrasında oluşan karışımın pH'sı 10'a ayarlanarak karışım alt üst edildi ve (4, 25, 30, 40, 50, 60°C) aralığındaki 6 farklı sıcaklık değerinde 1 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonunda 5 dk 6000 rpm'de santrifüj edilerek elde edilen alt faz örneklerine aktivite ve protein tayini yapıldı. Çıkan değerler ile saflaştırma katsayısına karşı, % verim grafikleri oluşturularak en iyi sıcaklık değeri belirlendi.

İnkübasyon süresinin TPP yöntemi ile Alkali Proteaz saflaştırılması üzerine etkisi

Optimizasyon çalışmaları ile belirlenmiş olan değerler kullanılarak farklı inkübasyon sürelerinde deney tekrarı yapıldı. 2 mL ham enzim çözeltisi üzerine %70 oranında $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eklendi ve çözünene kadar vortekslendi. Karışım üzerine 1.0:0.5 oranında t-bütanol eklenerek tüpler alt üst edildi. Oluşan karışımın pH'sı 10'a ayarlanarak karışım alt üst edildi ve oda sıcaklığında 00-60 dk aralığındaki 7 farklı süre boyunca inkübasyona bırakıldı. Her inkübasyon sonrası örnekler 6000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek elde edilen alt fazlar aktivite ve protein tayini yapıldı. Çıkan değerlere göre saflaştırma katsayısına karşı, % verim grafikleri oluşturuldu ve sistem için en iyi inkübasyon süresi belirlendi.

Manyetik alan destekli üç fazlı ayırma (MFTPP) yöntemi

MFTPP uygulaması, Aras (2023) tarafından kullanılan modifiye edilmiş TPP tekniğine göre gerçekleştirildi. Tüm deneyler, Şekil 4'te gösterilen MSI Automation Hyper-5 cihazı kullanılarak, klasik TPP optimizasyonunda belirlenmiş olan ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ doyumluğu, ham enzim çözeltisi:t-bütanol oranı ve pH) koşullar altında gerçekleştirildi. 2 mL ham enzim çözeltisi üzerine 0,873 g (%70 w/v) amonyum sülfat eklenerek vortekslendi ve üzerine 1 mL (1.0:0.5) t-bütanol ilave edilerek uygun pH'a ayarlandı. Karışım belirli bir süre manyetik alana maruz bırakıldı ve üç faz oluştuktan sonra 6000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen ara faz ve sulu alt faz için enzim aktivitesi ve protein tayini yapıldı.



Şekil 7. Manyetik Hipertermi cihazı

Bu yöntemin optimum şartlarını belirlemek amacıyla aynı şekilde deney düzenekleri oluşturularak MFTTP sistem parametreleri (manyetik alan uygulama süresi, görev döngüsü ve manyetik güç) optimize edildi (Aras, 2023).

Manyetik alan uygulama süresinin MFTTP üzerindeki etkisi

2 mL ham enzim çözeltisi üzerine 0,873 g (%70 w/v) amonyum sülfat eklenerek vortekslendi ve üzerine 1 mL (1.0:0.5) t-bütanol ilave edilerek, uygun pH ayarlanması sonrası çözelti karışımı elde edildi. Karışım, ortalama bir manyetik güç (50 W) değerine maruz bırakılarak, 2, 4, 6, 8, 10 dk olmak üzere 5 farklı süre denemesine tabii tutuldu. Uygulama süreleri sonunda karışım 6000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen alt ve ara fazlar için aktivite ve protein tayini yapıldı.

Görev döngüsünün MFTTP üzerindeki etkisi

MFTTP parametrelerinden bir diğeri olan görev döngüsü, uygulanan manyetik alan süresi açma-kapama (on-off) süresi ile değiştirilerek optimize edildi (Patil & Yadav, 2018). Geleneksel TPP’de kullanılan koşullar altında aynı çözelti karışımı (%70 (NH₄)₂SO₄ ve 1.0:0.5 t-bütanol) hazırlandı. Belirlenen en iyi süre dahilinde manyetik alana (50 W) maruz bırakılan karışım için %20, 40, 60, 80, 100 olmak üzere 5 farklı görev döngüsü denemesi yapıldı. Deney sonunda karışım 6000 rpm’de 5 dk santrifüj işlemi sonrası elde edilen alt ve ara fazlar için aktivite ve protein tayini yapıldı.

Manyetik Alan Gücünün MFTTP üzerindeki etkisi

Hazırlanan çözelti karışımı (%70 (NH₄)₂SO₄ ve 1.0:0.5 t-bütanol) önceki aşamalarda belirlenen süre ve görev döngüsü dahilinde manyetik güç uygulamasına tabii tutuldu. 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 W olmak üzere 7 farklı manyetik güç değeri denemesi yapıldı. Uygulama

sonunda karışım 6000 rpm’de 5 dk santrifüj işlemi sonrası elde edilen alt ve ara fazlar için aktivite ve protein tayini yapıldı.

Response Surface Methodology (RSM) ile enzim saflaştırma istatistiksel optimizasyonu

Tez çalışmasında, Box-Behnken deneysel tasarım yöntemi (BBD) proteaz aktivitesi üzerine bazı TPP parametrelerinin etkisinin ve maksimum proteaz aktivitesi sağlayan parametrelerinin kombinasyonun belirlenmesi için kullanılmıştır. BBD ile 3 farklı faktörün -1, 0 ve +1 seviyelerinde yanıt yüzey tasarımı oluşturulmuş ve araştırılan her bir faktörün seviyeleri ve kodlanmış değerleri Tablo 10’da verilmiştir. Proteaz aktivitesi için önemli TPP parametlerinden olan tuz oranı, ham enzim çözeltisi:t-bütanol oranı ve inkübasyon sıcaklığı bağımsız değişkenleri; manyetik TPP için ise güç, süre ve görev döngüsü değişkenleri olarak belirlenirken proteaz aktivitesi bağımlı değişkendir. Tasarımda toplam 15 deney oluşturuldu ve tekrarlanabilirliğini test etmek için merkez noktası birkaç kez tekrarlanmıştır. Tüm deneyler üç tekrar halinde gerçekleştirilmiştir. Deneysel tasarımda, katsayıların belirlenmesinde, veri analizi ve grafiklerin çizilmesinde minitab 18 deneme sürümü kullanılmıştır. Modele ait eşitlik aşağıdaki gibidir:

$$Y = \beta_0 - \beta_1A - \beta_2B - \beta_3C + \beta_{11}A^2 + \beta_{22}B^2 + \beta_{33}C^2 + \beta_{12}A*B + \beta_{13}A*C$$

Eşitlikte verilen Y değeri, tahmin edilen yanıt yüzey fonksiyonu (aktivite), β_0 değeri, bütün bağımsız değişkenlerin etkilerinin sıfır olması durumunda Y’nin aldığı değeri, A, B ve C bağımsız değişkenleri göstermektedir; β_1 , β_2 ve β_3 doğrusal katsayılarıdır ve β_{11} , β_{22} ve β_{33} ikinci dereceden katsayılarıdır.

Tablo 10. Box-Behnken Tasarım İle Test Edilen Faktörlerin Düzeyleri (Saflaştırma)

Sembol	Bağımsız değişkenler (TPP)	Unit	Derecelerin kodlanmamış değerleri		
			-1	0	1
A	Tuz	%	70	50	20
B	t-bütanol		2	1	0,5
C	Sıcaklık	°C	40	30	25

Sembol	Bağımsız değişkenler (MFTPP)	Unit	Derecelerin kodlanmamış değerleri		
			-1	0	1
A	Güç	%	100	60	40
B	Süre		10	8	6
C	Görev döngü süresi	°C	100	60	40

Diyaliz

TPP ve MFTPP teknikleri ile saflaştırma sonucu elde edilen enzim çözeltilerine diyaliz işlemi uygulandı. Enzim çözeltileri ayrı ayrı diyaliz torbasına yerleştirilerek, sodyum fosfat (pH 8) tamponu içerisinde manyetik karıştırıcıda (+4°C'de) 2 saat süreyle diyaliz yapıldı (Rao *et al.* 2009; Satpute *et al.* 2010).

B. licheniformis SO7 Alkalın Proteazın Biyokimyasal Karakterizasyonu

Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile alkalın proteaz enziminin molekül ağırlığının belirlenmesi

TPP ve MFTPP yöntemleriyle saflaştırılan alkalın proteaz enziminin sulu alt faz ve ara yüzey örnekleri kullanılarak, enzim saflığını kontrol etmek ve yaklaşık molekül ağırlığını belirlemek amacıyla SDS-PAGE analizi yapıldı (Laemmli, 1970). Yürütme jeli için %10'luk, yığma jeli için %4'lük akrilamid jel hazırlanarak, protein bantlarının gözlenmesi için gümüş boyama metodu kullanıldı.

- ◆ İlk olarak elektroforez plakaları sırasıyla su ve alkol ile yıkandı. Aralarında jel için boşluk olacak şekilde iki cam plaka sabitlendi ve sızdırmazlığı kontrol edilerek jel hazırlama kabinine konuldu.
- ◆ Hazırlanan ayırma jeli hızlıca cam plakalar arasına dikkatlice eklendi ve jelin düzgün polimerleşmesi için üzerine izopropanol eklenerek bir süre bekletildi.
- ◆ Jel donduktan sonra üst kısımdaki izopropanol peçete yardımı ile uzaklaştırıldı. Ayırma jeli üzerine, hazırlanmış olan yığma jeli pipet yardımı ile eklendi ve kuyucukların doğru şekilde oluşması için taraklar dikkatlice yerleştirildi. Jelin polimerize olması için +4°C'de bir süre bekletildi.
- ◆ Eppendorf tüpler içerisine 10'ar µl numune tamponu eklendi. Üzerlerine saflaştırılan alt faz, ara faz ve ham enzim çözeltisi örnekleri eklenerek vortekslendi.
- ◆ Daha sonra örnekler denatürasyon işlemi için 95°C'de 5 dk bekletildi.
- ◆ Elektroforez tankı SDS-PAGE yürütme tamponu (1X) ile doldurularak jel kasetleri tanka yerleştirildi.
- ◆ İlk kuyucuğa standart olarak seçilen markerdan 2,5 µl ve diğer kuyucuklara sırayla denatüre edilmiş örneklerden 15'er µl yüklendi.
- ◆ Elektroforez tankı kapatıldı ve alt tarafın anota (+), üst tarafın ise katoda (-) gelecek şekilde yerleştirilmesine dikkat edildi.
- ◆ Başlangıçta 80 voltta 30 dk yürütülen jel, sonrasında 120 voltta 90 dk yürütme işlemi gerçekleştirildi.

- ◆ Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel dikkatlice alındı ve sırasıyla tespit çözeltisi, redüksiyon çözeltisi, gümüş boyama çözeltisi ile muamele edildi. Yıkama 1 ve yıkama 2 solüsyonları ile sabitlenen jel görüntüsü alındı.
- ◆ İşlem sonrası jel üzerinde standart proteinlerin ve enzimin yürümüş oldukları mesafeler R_f değerini hesaplamak için ölçüldü. Hesaplanan R_f değerlerine karşı standart proteinlerin Log M_K değerleri ile bir grafik oluşturularak alkali proteazın molekül ağırlığı hesaplandı.

Alkalın proteazın zimogram analizi

- ◆ SDS-PAGE jel elektroforezi kullanılarak, *B. licheniformis* SO7 suşu ile üretilen alkalın proteaz enziminin zimogram analizi yapıldı.
- ◆ Elektroforez tankına hazırlanan yığma ve ayırma jeli döküldü. SDS-PAGE işleminden farklı olarak zimogram analizinde, numune çözeltisine β -merkaptoetanol eklenmedi.
- ◆ Eppendorf tüpleri içerisinde örnekler hazırlanırken (1:1:1) oranında olacak şekilde 20 μ l numune çözeltisi üzerine, 20 μ l %0,65'lik kazein çözeltisinden ve daha sonra 20 μ l örneklerden eklendi. Denatürasyon işlemi olmaksızın örnekler kuyucuklara yüklendi.
- ◆ Önce 80 voltta 30 dk, ardından 120 voltta 1 saat süreyle örneklerin yürütme işlemi gerçekleştirildi.
- ◆ Numune tamponuna katılan brom timol mavisi yardımı ile örnekler kolayca takip edildi.
- ◆ İşlem sonunda akım kesildi ve jel dikkatlice çıkarıldı. Jel bir kaba alınarak SDS'nin uzaklaştırılması amacıyla %2'lik Triton-X-100 çözeltisi içerisinde 37°C'lik çalkalamalı inkübatörde (150 rpm) 30 dk bekletildi.
- ◆ Süre sonunda çözelti uzaklaştırıldıktan sonra jel 37°C çalkalamalı inkübatörde (150 rpm) Tris-HCl (100 mM pH 8,5) tamponunda 20 dk; %0,65'lik kazein çözeltisi içerisinde de 30 dk boyunca inkübe edildi ve jelin süre sonunda gümüş boyaması yapılarak fotoğrafı çekildi (Kazan *et al.* 2005).

pH'nın alkalın proteazın aktivite ve stabilitesi üzerine etkisinin belirlenmesi

Elde edilen alkalın proteazın optimum pH'sını belirlemek amacıyla 500 μ l enzim çözeltisi farklı pH değerlerindeki sodyum fosfat (0,1 M, pH 6-7,5) ve Tris-HCl (0,1 M, pH 8-9) tampon çözeltilerine eklendi. Daha sonra üzerine 2,5mL %0,65'lik kazein çözeltisi eklenerek

karışım hazırlandı. Aktivite tayini sonucu en yüksek aktivite veren pH değeri 100 olarak kabul edildi. Buna bağlı olarak diğer değerler (%) bağlı aktivite olarak hesaplandı (Alçıçek, 2017).

Alkalın proteazın stabil olduğu pH değerlerini belirleyebilmek için sodyum fosfat (0,1 M, pH 6-7) ve Tris-HCl (0,1 M, pH 8-9) ve Glisin-NaOH (0,1 M, pH 10-12) tamponları kullanıldı. Farklı pH'lardaki tampon çözeltilerden 2 mL alınarak üzerine 2 mL enzim çözeltisi ilave edildi ve 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon öncesi ve sonrasında olmak üzere aktivite tayini yapıldı. İnkübasyon öncesi proteaz aktivite değeri 100 olarak kabul edildi ve inkübasyon sonrası ölçülen değerler kalan aktivite yüzdesi (%) olarak belirtildi (Rahman *et al.* 2006).

Sıcaklığın alkalın proteazın aktivite ve stabilitesi üzerindeki etkisinin belirlenmesi

Alkalın proteaz enziminin optimum sıcaklığını belirleyebilmek adına 500 µl enzim çözeltisi üzerine 2,5 mL %0,65'lik kazein çözeltisi eklenerek elde edilen karışım, 0°C ile 90°C sıcaklık aralığındaki 11 farklı sıcaklık değerinde 10 dk inkübasyona bırakıldı. Daha sonra her bir örnek için aktivite tayini yapıldı. Enzimin optimum sıcaklık grafiğini oluştururken en yüksek aktivite değeri 100 olarak kabul edildi ve diğer değerler buna göre (%) bağlı aktivite olarak hesaplandı.

Enzimin farklı sıcaklıklardaki stabilitesinin belirlenebilmesi için; 1,5 mL enzim çözeltisi alınarak 0°C'den 90°C'ye kadar olan 11 farklı sıcaklık değerinde, her bir sıcaklık için 30, 60, 90, 120 dk ve 3, 5, 12 saat olmak üzere inkübasyona bırakıldı. Enzimin stabilite grafiği çizilirken, inkübasyon öncesi aktivite değerleri 100 olarak kabul edildi ve buna göre inkübasyon sonrası elde edilen değerler kalan aktivite yüzdesi (%) olarak gösterildi.

Bazı metal iyonlarının alkalın proteaz aktivitesi üzerindeki etkisinin belirlenmesi

Alkalın proteazın aktivitesine Ca^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} gibi bazı +2 değerlikli ve Li^+ , K^+ gibi +1 değerlikli metal iyonlarının (Cl⁻ sulu çözeltisi ile) etkisini incelemek amacıyla, Tris-HCl (100 mM, pH 8,5) tamponu içerisinde 1 mM, 5 mM ve 10 mM konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlandı. 50 µl enzim çözeltisi üzerine hazırlanan metal iyon çözeltilerinden 450 µl eklenerek örnekler oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi. Daha sonra aktivite tayini yapıldı. Metal iyonu içermeyen enzim çözeltisinin aktivitesi 100 olarak kabul edildi ve kontrol olarak kullanıldı. Diğer örneklerin aktivitesi kalan aktivite yüzdesi (%) olarak hesaplandı (Özden, 2010).

Bazı organik çözücülerin alkalın proteaz enzim aktivitesi üzerindeki etkisinin belirlenmesi

Bazı organik çözücülerin proteaz enzim aktivitesi üzerindeki etkisini gözlemlemek amacıyla; aseton, etanol, izopropanol, t-bütanol, metanol ve DMSO gibi organik çözücülerin %15 ve %50'lik konsantrasyonlardaki çözeltileri Tris-HCl (100 mM, pH 8,5) tamponu kullanılarak hazırlandı. Her birinden 450 µl alınarak, 50 µl enzim çözeltisi üzerine eklendi. Örnekler, 1 saat ve 24 saat olmak üzere iki farklı inkübasyon süresine tabii tutuldu. 50 µl enzim çözeltisi üzerine 450 µL Tris-HCl (100 mM pH 8,5) tamponu eklenerek aynı şartlarda inkübasyona bırakılıp kontrol olarak kullanıldı. Inkübasyon sonunda aktivite tayini yapıldı. Organik çözücü içermeyen enzim çözeltisinin aktivite değeri 100 olarak kabul edildi ve organik çözücü içeren örneklerin aktivitesi kalan aktivite yüzdesi (%) olarak hesaplandı (Yıldırım, 2014).

Bazı yüzey aktif maddelerin alkalın proteaz enzim aktivitesi üzerindeki etkisinin belirlenmesi

Bazı kimyasalların alkalın proteazın aktivitesi üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla; Tween-20, Tween-80, Triton X-100, SDS gibi yüzey aktif maddelerinin ve H₂O₂'nin %1 ve %5 konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlandı. 50 µl enzim çözeltisi üzerine 450 µL belirlenen konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltiler eklenerek, 37°C çalkalayıcı inkübatörde (180 rpm) 30 dk boyunca inkübasyona bırakıldı. Kontrol olarak, 50 µL enzim çözeltisine 450 µL Tris-HCl (100 mM, pH 8,5) tamponu eklendi ve aynı koşullar altında inkübe edildi. Inkübasyon sonrası aktivite tayini yapıldı. Kontrol olarak hazırlanan çözeltinin aktivite değeri 100 olarak kabul edildi ve diğer örneklerden elde edilen sonuçlar buna göre kalan aktivite yüzdesi (%) olarak hesaplandı (Shah *et al.* 2010; Alçiçek, 2017).

Bazı inhibitörlerin alkalın proteaz enzim aktivitesi üzerindeki etkisinin belirlenmesi

Enzimin aktif bölgesinde hangi grubun yer aldığını belirleyebilmek amacıyla; serin proteaz inhibitörü olan PMSF ve 3,4-Dikloroizokumarin, metalloproteaz inhibitörü olan EDTA, sistein proteaz inhibitörü olan DTNB, β-mekaptoetonal ve IAA olmak üzere 6 farklı inhibitör kullanıldı. Tüm inhibitörler Tris-HCl (100 mM, pH 8,5) tamponu içerisinde hazırlanırken, PMSF %96'lık etanol çözeltisi içerisinde hazırlandı. β-merkaptoetanol %1 ve %5 olmak üzere diğer inhibitörler 2 mM ve 5 mM konsantrasyonlarda olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerden 450 µl alınarak 50 µl enzim çözeltisi üzerine eklendi. Kontrol grubu, 50 µl enzim çözeltisine 450 µl Tris-HCl (100 mM, pH 8,5) tamponu eklenerek oluşturuldu. Örnekler 37°C'lik çalkalayıcıda (180 rpm) 30 dk boyunca

inkübe edildikten sonra aktivite tayinine tabii tutuldu. Kontrol çözeltinin aktivitesi 100 olarak kabul edildi ve inhibitör içeren diğer örneklerin aktivitesi kalan aktivite yüzdesi (%) olarak ifade edildi (Kalwasńska *et al.* 2018).

Alkalın proteaz enziminin substrat spesifitesinin belirlenmesi

Hemoglobin, azokazein, kazein, jelatin ve sığır serum albümini (BSA) gibi substratlar kullanılarak, enzimin doğal substratlara olan özgülüğü belirlendi. Tris-HCl (100 mM, pH 8,5) tamponu içerisinde substratların %0,65'lik çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan çözeltiler substrat olarak aktivite tayininde kullanıldı. Sonuçta, en yüksek aktivite gösteren substrat değeri 100 olarak kabul edildi ve diğer sonuçlar ona göre (%) bağlı aktivite olarak hesaplandı (Johnvesly & Naik 2001).

Alkalın proteazın kinetik parametrelerinin belirlenmesi

Enzimin K_m ve V_{max} değerlerini belirlemek amacıyla, Tris-HCl (100 mM, pH 8,5) tamponu içerisinde, %0,02-0,8 aralığında 7 farklı konsantrasyonda hazırlanmış kazein çözeltilerinden 2,5 mL alınarak, 500 µl enzim çözeltisi ile karıştırıldı. Aktivite tayini sonucunda elde edilen değerlerle Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanılarak alkalın proteaz enzimi için K_m , V_{max} , K_{cat} ve katalitik etkinlik (K_{cat}/K_m) değerleri hesaplandı (Laemmli, 1970; Rao *et al.* 2009).

Alkalın proteaz hidroliz uygulaması

Evsel barbunya alt suyundan *Bacillus licheniformis* SO7 suşu ile üretilen ve kısmi saflaştırılması gerçekleştirilen alkalın proteazın BSA (Bovine Serum Albümin) proteini üzerindeki yıkım etkisi SDS-PAGE analizi ile test edildi.

- ◆ Öncelikle 1 mg/mL stok BSA çözeltisi hazırlandı.
- ◆ Eppendorf tüplere hazırlanan stok BSA, ham enzim çözeltisi ve BSA proteini-alkalın proteaz enzim kombinasyonu konularak üzerlerine boya (1:2)eklendi.
- ◆ Ön hazırlıkları tamlanan SDS jeli kuyucuklarına sırasıyla standart marker (2,5 µl), BSA proteini (15 µl) ve 1:1 oranında alkalın proteaz ile muamele edilmiş BSA (15 µl) yüklendi.
- ◆ Elektroforez tankı kapatılarak alt tarafı anota (+), üst tarafı ise katoda (-) gelecek şekilde yerleştirildi.
- ◆ Başlangıçta 80 voltta 30 dk yürütülen jel, sonrasında 120 voltta 90 dk yürütüldü.

- Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel dikkatlice alındı ve sırasıyla tespit çözeltisi, redüksiyon çözeltisi, gümüş boyama çözeltisi ile muamele edildi. Yıkama 1 ve yıkama 2 solüsyonları ile sabitlenen jel görüntüsü alındı.

İstatistiksel Analiz

Tez çalışması boyunca tüm deneyler üç tekrar şeklinde yapıldı. Birbirinden bağımsız olarak yapılan üç deney tekrarının ortalaması ($\pm$) ve standart sapması (SD) olarak ifade edildi. GraphPad Prism® (versiyon 9.0, GraphPad Software, San Diego, CA) istatistik programı kullanıldı. Bunun yanında bazı grafiklerin çizimi OriginPro® (the ultimate software for graphing & analysis, versiyon 2022, USA) kullanılarak gerçekleştirildi. Response Surface Methodology (RSM) yöntemiyle ise deneme planı oluşturuldu ve Minitab 18 yazılımı kullanıldı.

ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Katı Besiyerinde Alkalın Proteaz Enzimi Üreten Bakterilerin Belirlenmesi ve Seçimi

Önceden izolasyon ve identifikasyonu yapılmış olan stoktaki termofilik *B. licheniformis* bakteri suşlarından, EA1-EA5 ve SO1-SO15 olmak üzere toplam 20 adet bakteri izolatu skim milk powder içeren proteaz katı besiyerine çizgi ekim tekniğiyle ekildi. Petriler, 55°C’de 24-48 saat inkübe edildikten sonra proteaz pozitif olan bakteri suşları etrafında şeffaf zon oluşumu gözlemlendi. Ölçülen zon çapları değerlendirildi ve en uygun bakteri izolatının SO7 olduğu sonucuna varıldı.



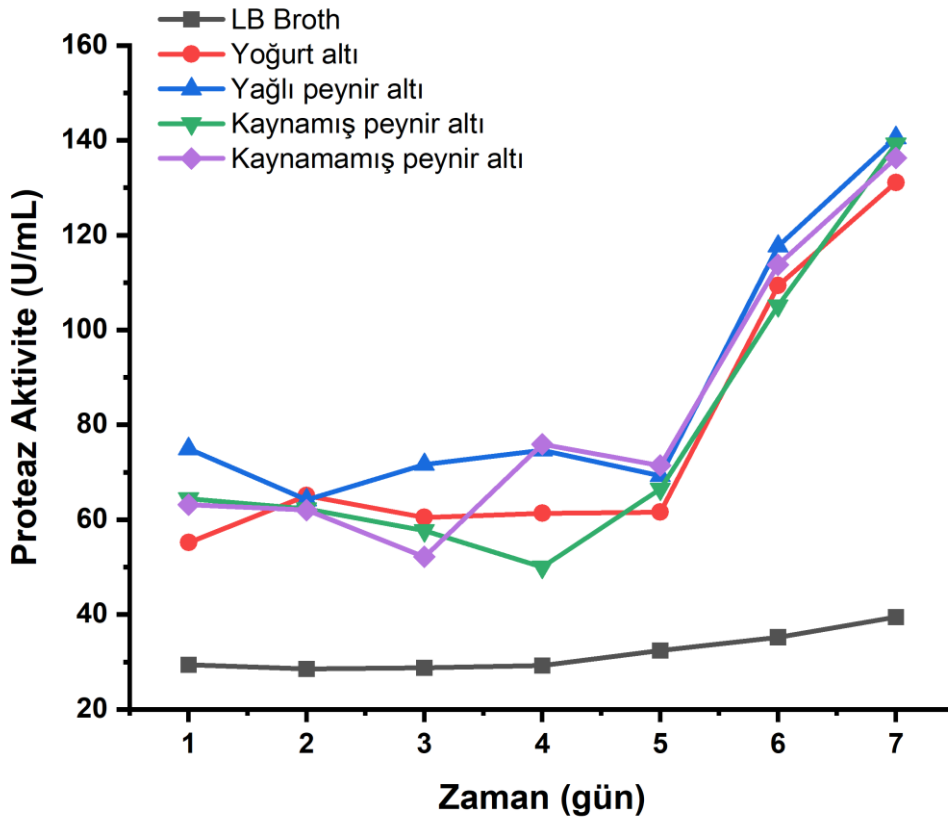
Şekil 8. Petride SO7 bakteri suşuna ait zon görüntüsü

Atık gıda sıvı üretim besiyerlerine bakteri inokülasyonu ve en iyi sıvı üretim besiyeri seçimi

En yüksek alkalın proteaz aktivitesine sahip olan bakteri suşu belirlendikten sonra, LB Broth içeren gıda alt sularından oluşan sıvı üretim besiyerlerine bakteri ekimi yapıldı. Her bir

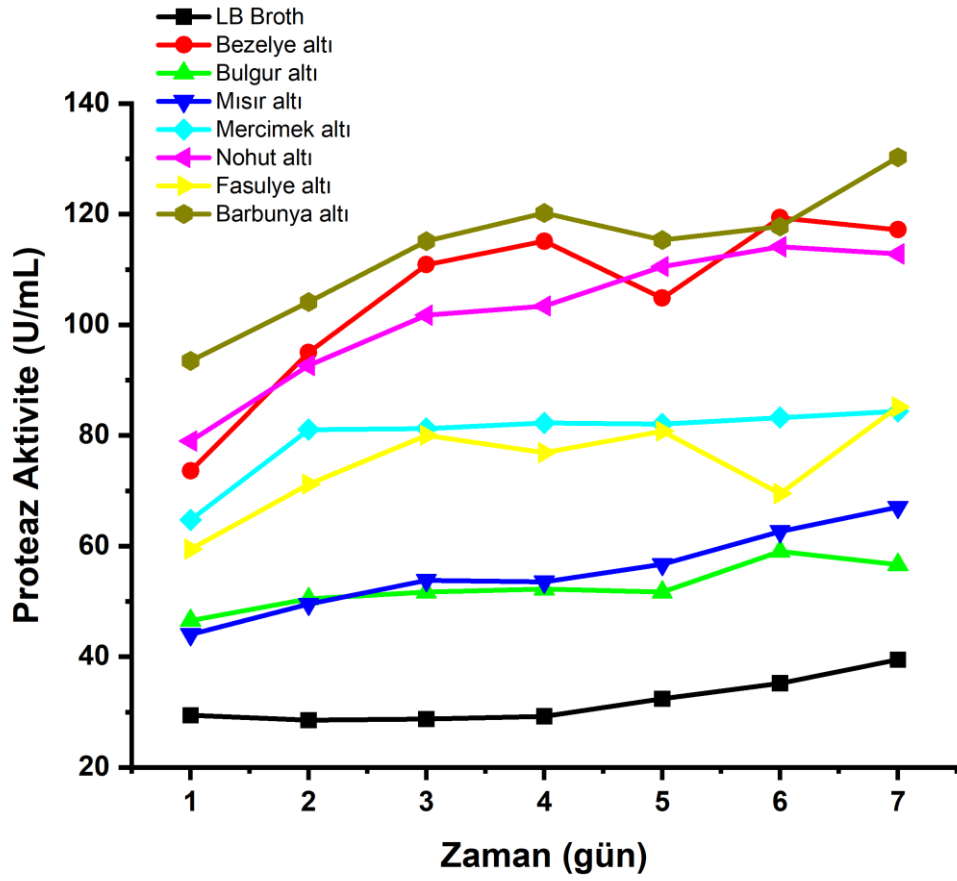
besiyeri grubu için 7 gün boyunca bakteri yoğunluğu ölçüldü ve aktivite tayini yapıldı. En iyi aktivite gösteren örnekler (süt ürünleri-evsel yağlı peynir altı, konserve-bezelye altı, evsel barbunya altı) ve ekstra dışardan eklenmiş olan endüstriyel peynir altı ile kendi aralarında tekrar LB Broth kombinasyonlu olarak 7 günlük hücre yoğunluğu ve aktivite tayini yapıldı. Buna ek olarak, alkalın proteaz üretme potansiyelini gözlemleyebilmek adına, LB ilavesiz (sadece atık gıda) haliyle 7 gün boyunca hücre yoğunluğu ve aktivite tayinine bakıldı *B. licheniformis* SO7 alkali proteazın maksimum aktivite gösterdiği sıvı üretim besiyeri belirlendi (Şekil 9-13). En kısa inkübasyon süresi de göz önünde bulundurulduğunda en yüksek proteaz aktivitesi veren gıda atığının evsel barbunya altı suyu olduğu grafiklerden görülmektedir.

Seçilen barbunya altı sıvı üretim besiyerinin ve 80,6 g olarak elde edilen liyofilize ürünü için (100 mL’de 1 g, 5 g, 10 g, 15 g) 7 günlük hücre yoğunluğu ve aktivite tayinine bakılmıştır (Şekil 14-15). Ayrıca, yaklaşık olarak içerik bilgisine erişebilmek adına karbohidrat ve protein miktar tayinine tabii tutulmuştur (Tablo 10).



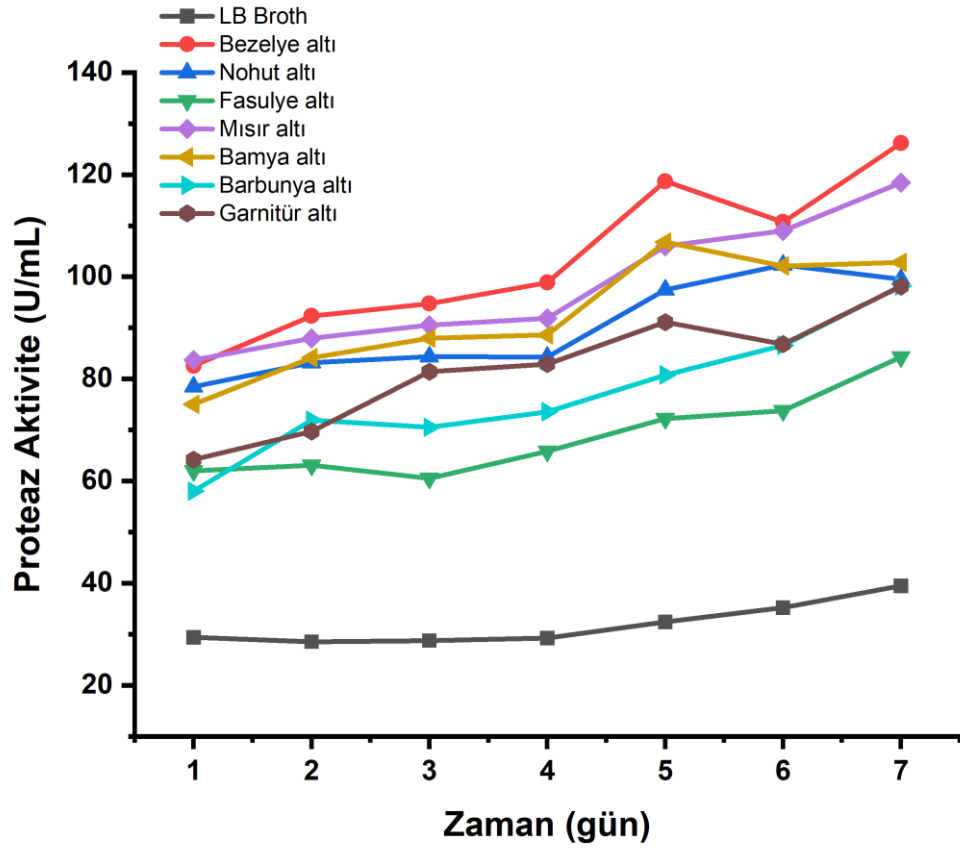
Şekil 9. LB Broth kombinasyonlu süt ürünü gıda atıkları 7 günlük aktivite tayini

Şekil 9’da görüldüğü üzere yağlı peynir altı suyunun ilk günden en iyi aktivite değeri (75 U/mL) ile başlayarak 7. gün sonunda (140,5 U/mL) 2 kat artışla en yüksek aktiviteye sahip olduğu gözlemlenmiştir.



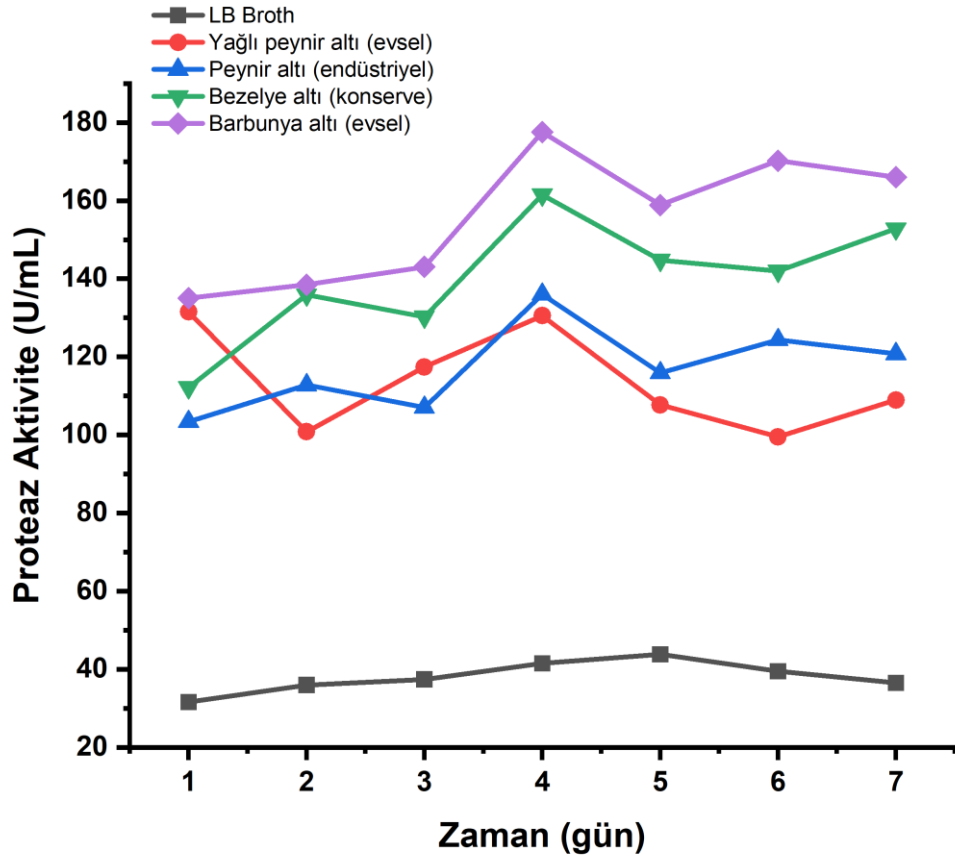
Şekil 10. LB Broth kombinasyonlu evsel gıda atıkları 7 günlük aktivite tayini

Şekil 10'daki grafiğe bakıldığında, 1. günden (93,5 U/mL) itibaren barbunya altı suyu besiyeri örneğinin son güne (130,2 U/mL) kadar diğer tüm örneklere oranla en yüksek aktivite ile proteaz ürettiği görülmektedir.



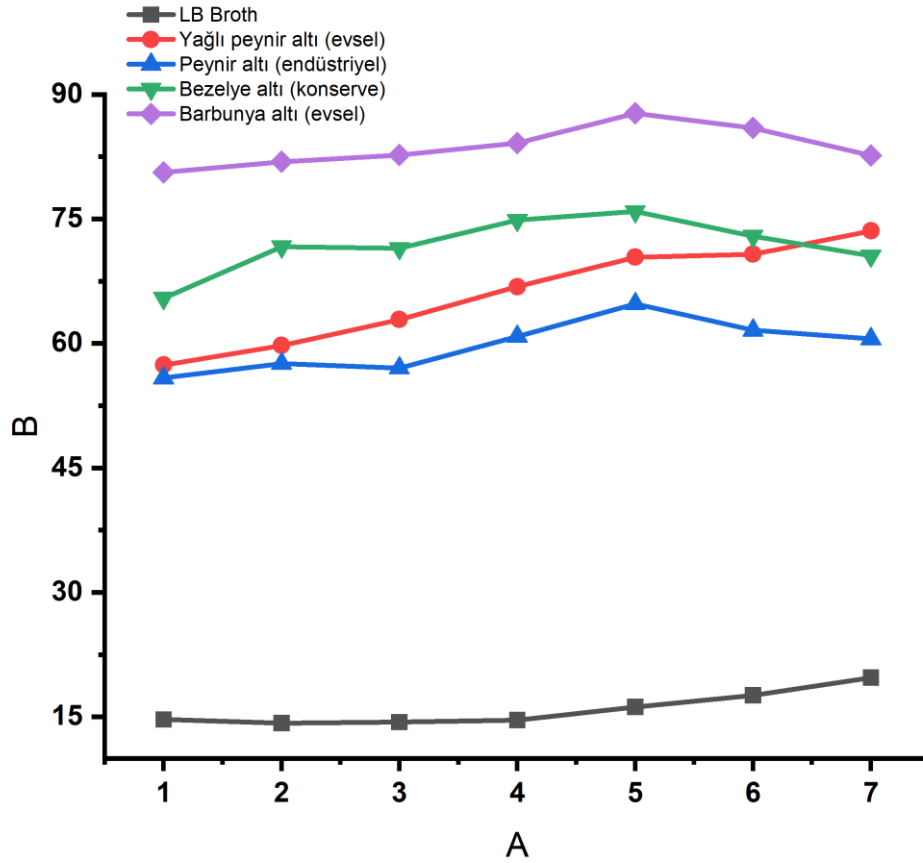
Şekil 11. LB Broth kombinasyonlu konserve gıda atıkları 7 günlük aktivite tayini

Şekil 11’de gösterilen konserve gıda atıklarından mısır altı suyu (83,7 U/mL) ile bezelye altı suyu (82,6 U/mL) örnekleri ile en yüksek aktivitede proteaz üretimine başladığı görülmektedir. Ancak takip eden günlerde bariz bir fark ile bezelye altı suyunun 7. gün sonuna kadar (126 U/mL) en iyi aktivite değeri ile proteaz üretiminde öne çıktığı görülmektedir.



Şekil 12. LB Broth kombinasyonlu en iyi sonuç veren gıda atıkları 7 günlük aktivite tayini

Şekil 12’de her grup için seçilen en iyi örnekler ile proteaz üretiminde, ilk günden (135 U/mL) itibaren takip eden günler boyunca diğer örneklerle göre barbunya altı suyunun en iyi proteaz aktivitesine sahip olduğu ve 4. günde en yüksek aktivite değerine (177,5 U/mL) ulaştığı belirlendi.



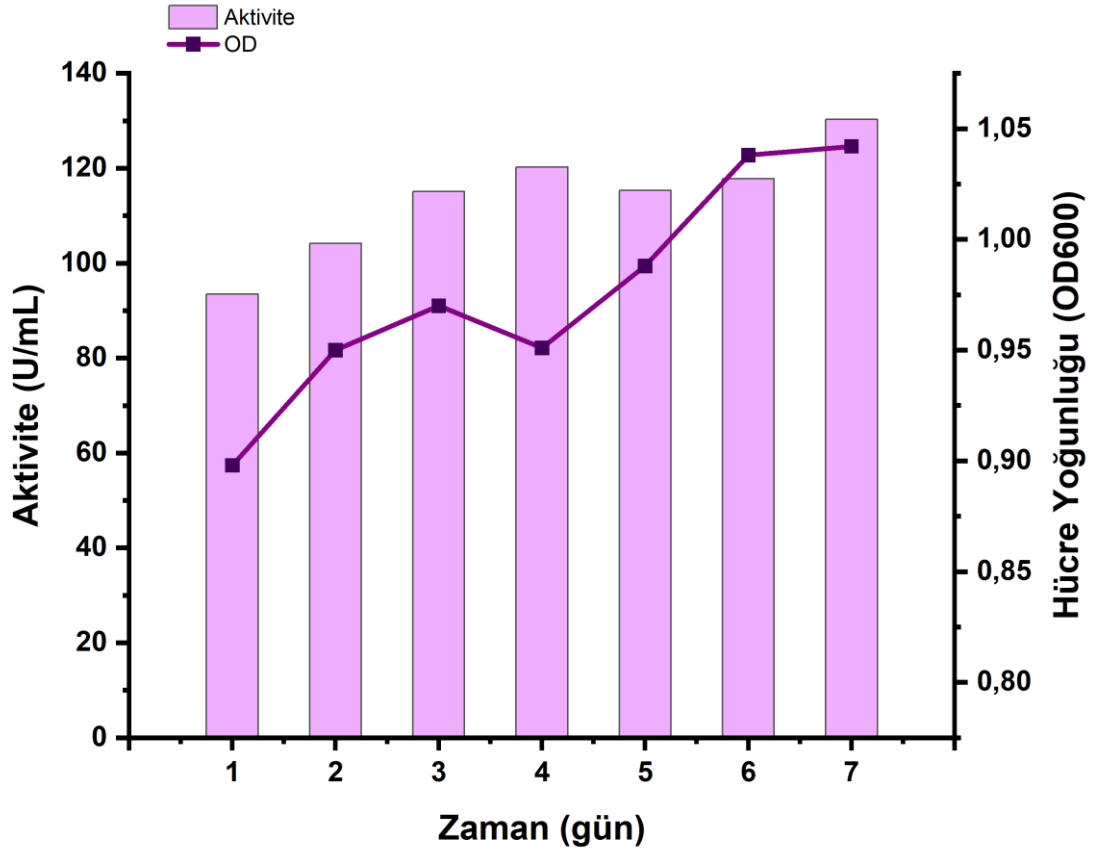
Şekil 13. LB Broth'suz en iyi sonuç veren gıda atıkları 7 günlük aktivite tayini

Şekil 13'te her gruptan en iyi aktivite gösteren örnekleri ile LB Broth kombinasyonu olmaksızın tekrar proteaz üretimi sonucunda, barbunya altı suyunun ilk 5 gün boyunca artan aktivitesi ile en iyi sonuçları verdiği (80-85 U/mL) görülmektedir.

Atık gıdaların proteaz besiyeri olarak kullanımı çalışmasında, minimal içeriğinden dolayı LB Broth (Trypton 10 g/L, maya ekstraktı 5 g/L, NaCl 5 g/L) kontrol besiyeri olarak kullanılmıştır. Atık gıda örnekleri LB ile kombinasyonlu olarak proteaz üretiminde kullanılmış ve aktivite tayini sonuçlarına göre en iyi örnekler seçilmiştir. Seçilen atık gıda örnekleri, proteaz üretim potansiyellerinin gösterimi amacıyla LB içermeksizin sade haliyle de kullanılmıştır. Sonuçta LB Broth proteaz üretimini desteklemiş olup üretimde artışa neden olmuş olsa dahi, atık gıda örneklerinden barbunya altı suyu sade haliyle arada büyük bir fark olmaksızın yüksek oranda proteaz üretimi gerçekleştirdiği gösterilmiştir (Şekil 13) ve çalışmalara seçilen barbunya altı suyu ile devam edilmiştir.

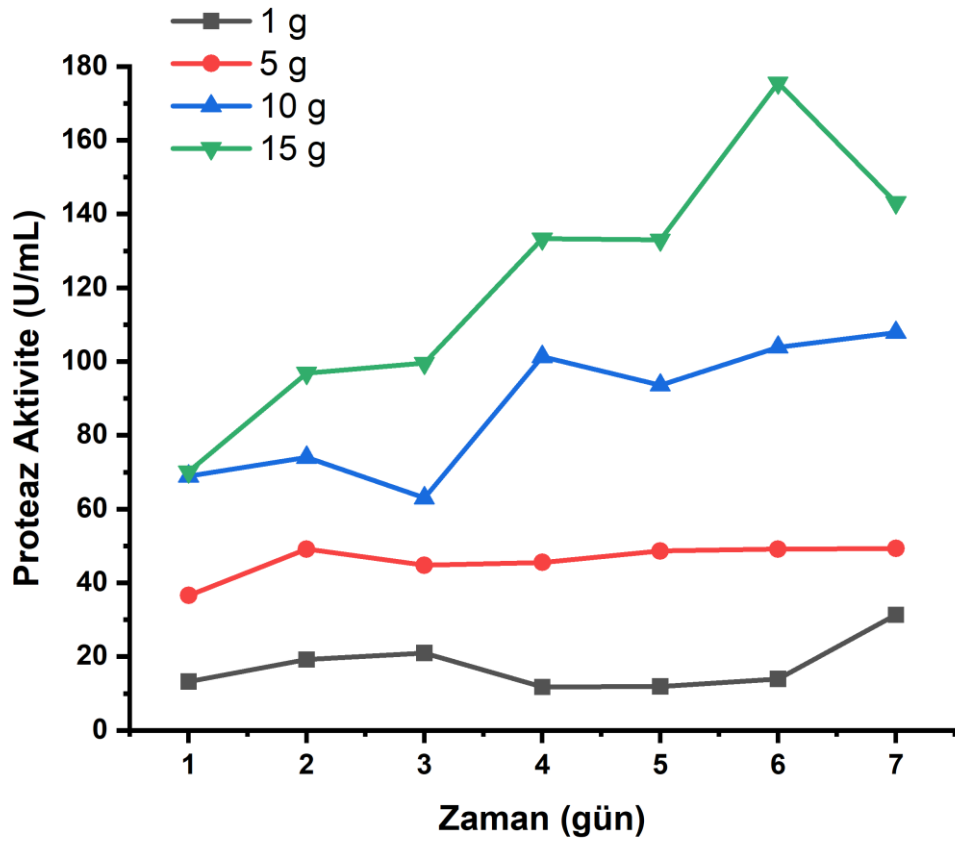
Literatürdeki benzer bir çalışma göstermiştir ki; *Geobacillus* SBS-4S bakterisi ile proteaz üretimini en iyi seviyede elde edebilmek için LB besiyerine buğday kepeği, pirinç kepeği ve melas gibi çeşitli karbon kaynakları (%1-6) ile maya ekstraktı, pepton ve tripton gibi azot kaynakları (%1-3) eklenerek optimizasyon denemeleri yapılmıştır. LB besiyerindeki

mikrobiyal suş, 10,6 U/mL proteaz üretebilmekteyken, ortama (%1, %2, %3, %4, %5 ve %6) buğday kepeği, pirinç kepeği ve melas eklenmesi ile maksimum üretimin sırasıyla 34,5, 21 ve 20,25 U/mL olarak %5'lik buğday ve pirinç kepeği, %4 melas eklenmesiyle elde edildiği gösterilmiştir. Daha sonrasında LB besiyeri, seçilen azot kaynaklarından maya ekstraktı, pepton, tripton (%0,5, %1, %1,5, %2, %2,5 ve %3) ile takviye edilmiş olup en iyi proteaz üretiminin %2 maya ekstraktı (24,4 U/mL), %1,5 pepton (22 U/mL) ve %1,5 tripton (17,45 U/mL) eklenmesi sonucu elde edildiği rapor edilmiştir (Ahmad *et al.* 2020).



Şekil 14. Eysel barbunya altı suyu 7 günlük hücre yoğunluğu ve aktivite tayini

Şekil 14'te hücre yoğunluğundaki değişim eğrisiyle birlikte verilen barbunya alt suyunun 7 günlük proteaz aktivitesinin, ilk günden (90 U/mL) yüksek bir aktivite ile başlayıp 4 gün boyunca arttığı ve 7. günün sonunda 130 U/mL ile en yüksek aktivite değerine ulaştığı görülmektedir.



Şekil 15. Evsel barbunya altı liyofilizasyon ürünü

Şekil 15'te liyofilize haldeki barbunya altının görüntüsü ve farklı konsantrasyonlardaki proteaz aktivite değerleri görülmektedir. Grafikten anlaşıldığı üzere 10 ve 15 g'lık (100 mL için) konsantrasyonlarda ilk gün 70 U/mL aktivite ile başlamış olup, 6. günde 15 g konsantrasyonunda en yüksek aktivite değeri olan 175,5 U/mL'ye ulaşmıştır. Bu sonuçlara göre, barbunya altı sıvı üretim besiyerinin liyofilize ürünü, daha yüksek aktivitelerde proteaz üretimi ve oda koşullarında toz halde uzun süre saklanabilmesi gibi avantajlarıyla endüstride büyük ölçekli üretim proseslerinde kullanılabilir olduğunu göstermektedir.

Tablo 11. Evsel Barbunya Altı İçerik Tayini

İçindekiler	Miktar (mg/mL)
Karbohidrat	326,5
Protein	88,68

Enzim üretim besiyeri istatistiksel optimizasyon sonuçları

Çalışmada, BBD maksimum alkalın proteaz üretimi sağlanan optimum parametre seviyelerini tanımlamak ve bu parametreler ile enzim aktiviteleri arasındaki ilişkileri anlamak için kullanılmıştır. Alkalın proteaz üretiminin istatistiksel optimizasyonu için inkübasyon süresi, sıcaklık ve pH parametreleri bağımsız değişkenler olarak seçilmiştir. BBD planı ile elde edilen deneysel enzim aktivite ve tahmin edilen enzim aktiviteleri Tablo 10'da verilmiştir.

Bir modelin uygunluğunu gösteren önemli bir faktör, uyum eksiklik değerinin olmamasıdır. Anlamlı olmayan ($p>0.05$) bir model uyum değerinin bulunmaması, hatanın önemsiz olduğunu ve tepkilerin regresyon denklemi ile açıklanabileceğini gösterir. Bu bağlamda model uyumu açısından uyumsuzluğun istatistiksel olarak anlamlı olmaması gerekir ($0,05$ 'ten büyük olmalı) olmalıdır. Çalışmamızda elde edilen veriler sonucunda uyumsuzluk değerinin anlamsız olduğu ($p>0,05$) bulunmuş ve modelin uygunluğu doğrulanmıştır.

Tablo 12. Proteaz Üretiminin Optimizasyonu İçin Box-Behnken Tasarımı İle Deneysel ve Tahmin Edilen Proteaz Aktiviteleri

Gün	Sıcaklık	pH	Deneysel	Tahminlenen
1	65	7,5	165,88	166,83375
3	55	7,5	248,71	250,41175
1	55	9	200,07	201,4165
1	55	6	208,25	207,8695
3	65	6	156,96	157,7895
5	65	7,5	145,33	146,32375
5	55	6	189,85	189,4475
3	55	7,5	250,1	250,41175
5	55	9	185,24	186,5705
3	65	9	146,07	145,1805
5	45	7,5	187,2	187,19375
3	45	9	190	190,1185
3	55	7,5	251	250,41175
3	45	6	185	186,8395
1	45	7,5	200	199,95175

$P<0.05$

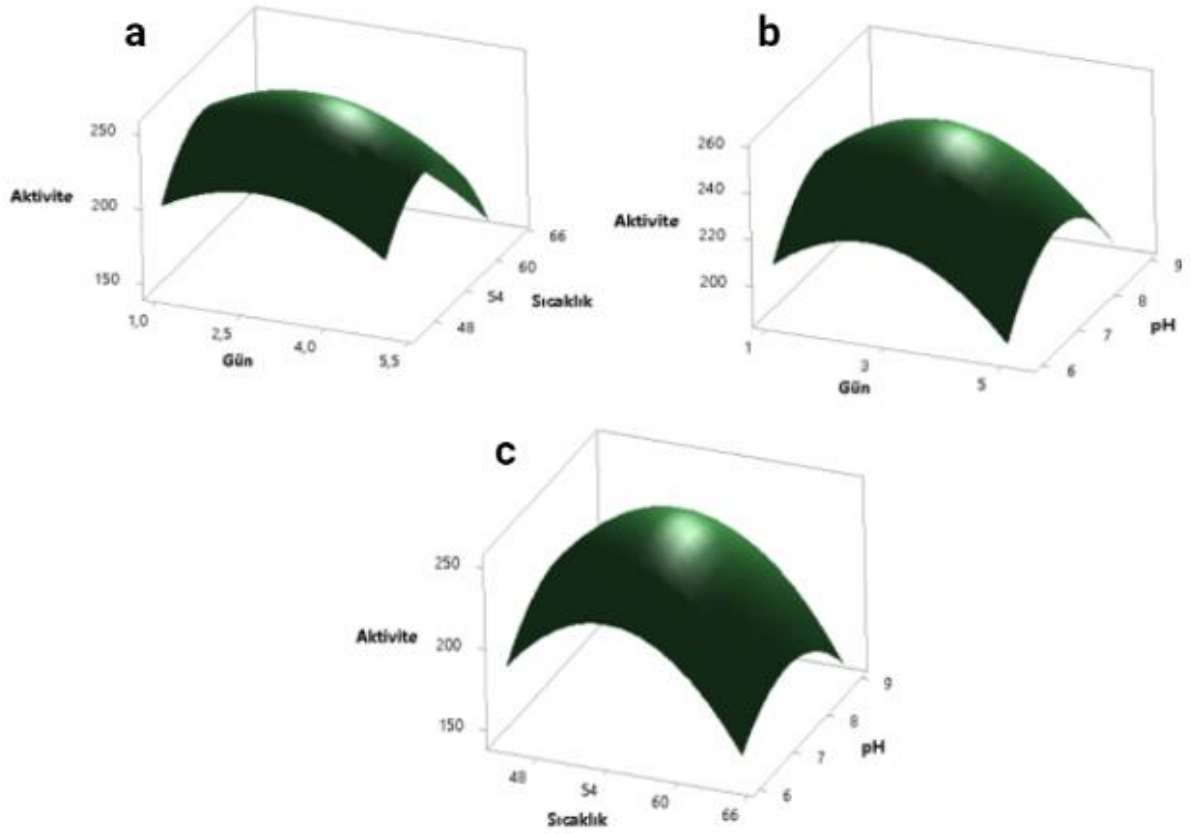
Ayrıca, çalışmada modelin uygunluğu R^2 (regresyon katsayısı), $Adj-R^2$ (düzeltilmiş regresyon katsayısı), öngörülen çoklu belirleme katsayısı ($Pre-R^2$) kullanılarak değerlendirilmiştir. Alkalın proteaz aktivitesi için $Pre-R^2$ (0.99) ve $Adj-R^2$ (0.99) değerleri, R^2 (0.99) ile makul bir uyum içindedir. İdeal olarak $Adj-R^2$, R^2 değerine yakın olmalıdır. R^2 değerinin 1'e yakın olması modelin uygunluğunu yani deneysel ve tahmin edilen değerler arasında korelasyon olduğunu göstermektedir. Bu da deneylerin yüksek oranda güvenilir olduğu anlamına gelir (Garai & Kumar, 2013). Optimizasyon çalışmasında elde edilen R^2 değeri oldukça yüksek bulunmuştur bu değer buraya yazılabilir. Bu yüksek R^2 değeri deneysel sonuçlar ile seçilen model tahminlerinin oldukça uyumlu olduğunu göstermektedir.

Alkalın proteaz üretiminin optimizasyonu ile ilgili kuadratik model varyans analizi sonuçları tablo 11'de verilmiştir. İstatistiksel analiz test edilen değişkenlerin alkalın proteaz aktivitesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Tablo 13. Box–Behnken Planda Bağımsız Değişkenlerin Varyans Analizi

Varyans kaynağı	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	9	16720,6	1857,85	873,44	0,000
Linear	3	3334,3	1111,42	522,52	0,000
A-Gün	1	554,1	554,11	260,51	0,000
B-Sıcaklık	1	2736,5	2736,52	1286,54	0,000
C-pH	1	43,6	43,62	20,51	0,006
A^2	1	2215,3	2215,33	1041,51	0,000
B^2	1	9543,4	9543,37	4486,71	0,000
C^2	1	3232,8	3232,78	1519,85	0,000
B	1	15,0	15,02	7,06	0,045
AC	1	3,2	3,19	1,50	0,276
BC	1	63,1	63,12	29,68	0,003
Hata	5	10,6	2,13		
Lack-of-Fit (uyum eksikliği)	3	8,0	2,66	2,00	0,351
Toplam	14	16731,2			

Maksimum proteaz aktivitesi için iki değişkenin etkileşimini ve her değişkenin optimum seviyesini göstermek için üç boyutlu (3D) yanıt yüzey grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 16). Fermantasyon ortamının sıcaklığı pH ve günün proteaz üretimi için önemli ölçüde etkilendiği bulunmuştur ($p < 0.0001$).



Şekil 16. Proteaz aktivitesi üzerine üç değişkenin kombine etkilerine ait 3D grafikler

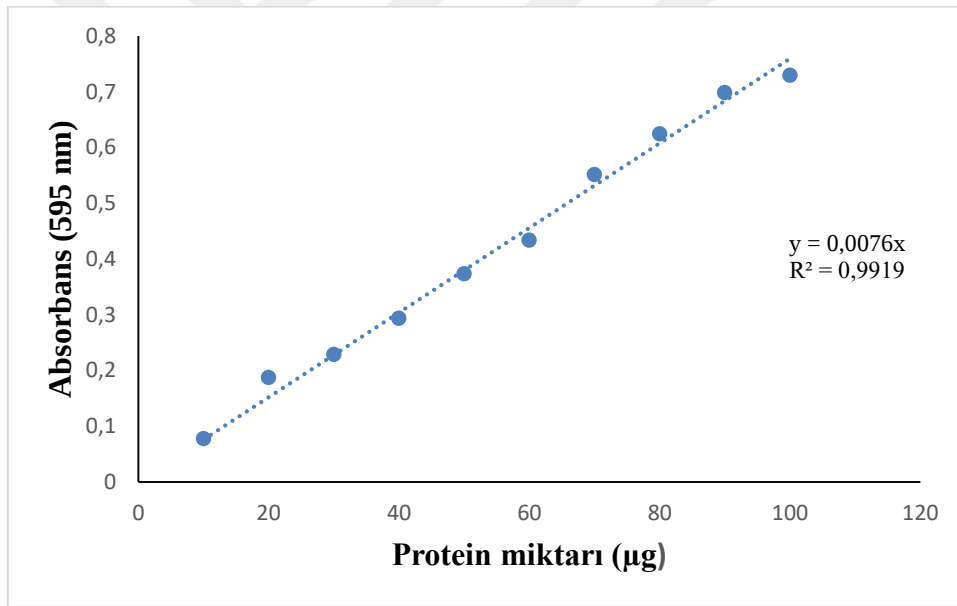
Şekil 16, proteaz üretimi için üç değişken arasındaki etkileşimleri göstermektedir. Şekil a, b ve c'de görüldüğü gibi, en iyi proteaz aktivitesi, 55°C inkübasyon sıcaklığı, 7,5 pH ve 3. günde 69,7 U/mL olarak elde edilmiştir. Ayrıca, pH ve inkübasyon süresi (A*C) arasındaki etkileşimin önemli olduğu ($p < 0.05$) ve inkübasyon sıcaklığı (B*C) pH ile aralarındaki etkileşimin önemli olduğu bulunmuştur ($p < 0.05$).

Literatürde çeşitli atık biyokütleler kullanılarak endüstride önemli yeri olan biyomoleküllerin elde edilmesini amaçlayan benzer çalışmalar bulunmaktadır. Maity *et al.* (2022) tarafından yapılan çalışmada, protein içeren biyokütle atıkları arasında en önemli yenilenebilir keratin kaynaklarından atık hayvan yünü, kümes hayvanı tüyü ve insan saçından keratinin izolasyonu yapılmıştır. Tetrametilamonyum hidroksit olarak bilinen kuaterner amonyum hidroksitin (suda %25 w/w TMAOH) sulu çözeltisi bu protein atıklarını çözünür hale getirmek için kullanılmış ve sonuçta hayvan yününden %19-20, insan saçından %35-37 ve tavuk tüyünden %69-74 oranında ham keratin izole edilmiştir. *Bacillus sp.* CL33A ile hücre dışı proteazlar ve biyoaktif hidrolizatlar elde etmek için tüy unu (FM), tatlı peynir altı suyu (LW), liyofilize peynir altı suyu (WL) ve manyok küspesi (CB) substrat olarak kullanılmış ve başlangıçta tek bir substrat olarak FM'nin (10 g/L), LW, WL (5, 10, 15 g/L) veya CB (5, 10, 15 g/L artı 1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ile karşılaştırıldığında daha yüksek proteaz üretimi gösterdiği, FM'nin 30 g/L'ye çıkarılmasının proteaz üretimini 6 kat artırdığı gözlenmiştir. Daha sonrasında substratların kombinasyonlu

halleri denenmiş ve 30 g/L FM'nin, 5 g/L WL ile takviyesinin 4 gün sonra proteaz verimini 1,8 kat artırdığı, sadece FM içeren ortama kıyasla 3 kat artışa karşılık geldiği, 30 g/L FM'ye CB (5 ve 10 g/L) eklenmesinin, proteaz üretimini %110-130 oranında artırmış olduğu tespit edilmiştir (Clerici *et al.* 2021). *Bacillus subtilis*'den alkalın proteaz ve biyosüpfektan üretiminde sıvı üretim besiyerinde karbon kaynağı olarak %1 ekmek tozu, azot kaynağı olarak %1 kazein kullanılarak alkalın proteazın üretimi gerçekleştirilmiştir. Besiyeri optimizasyonu sonucu 72. saatte en fazla proteaz üretiminin 134,64 U/mL olduğu ve başlangıca göre alkalın proteaz aktivitesinde 20,87 kat artış olduğu tespit edilmiştir (Sümengen *et al.* 2016).

Protein tayini için kullanılan standart grafik

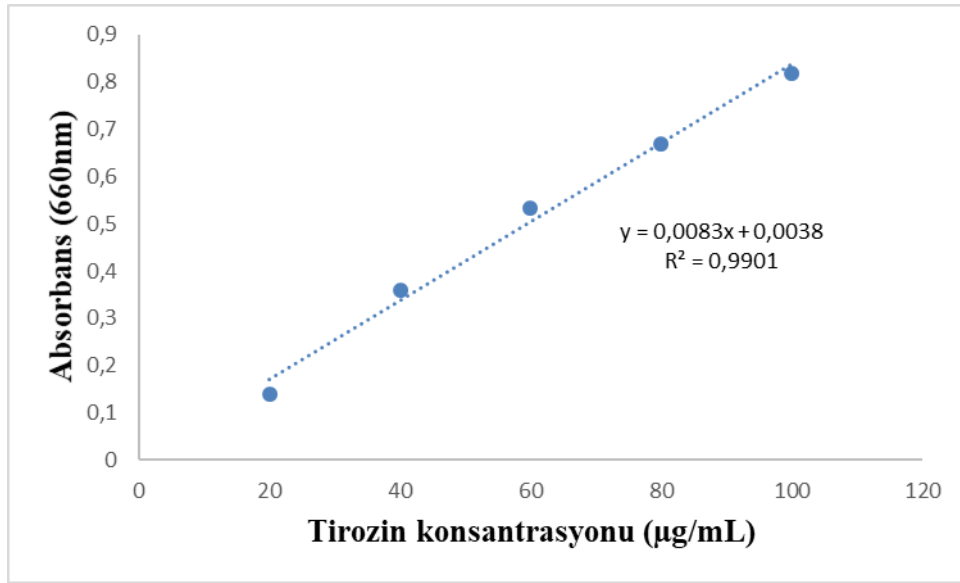
Tez çalışması boyunca alkalın proteazın kısmi saflaştırılmasında kullanılan örneklerin kantitatif protein tayini Bradford metodu kullanılarak gerçekleştirildi. Bunun için ilk olarak standart grafiğı oluşturuldu ve protein miktarları Şekil 17'de gösterilen standart grafikte bulunan denklem kullanılarak belirlendi.



Şekil 17. Protein standart grafiğı

Tirozin standart grafiğı

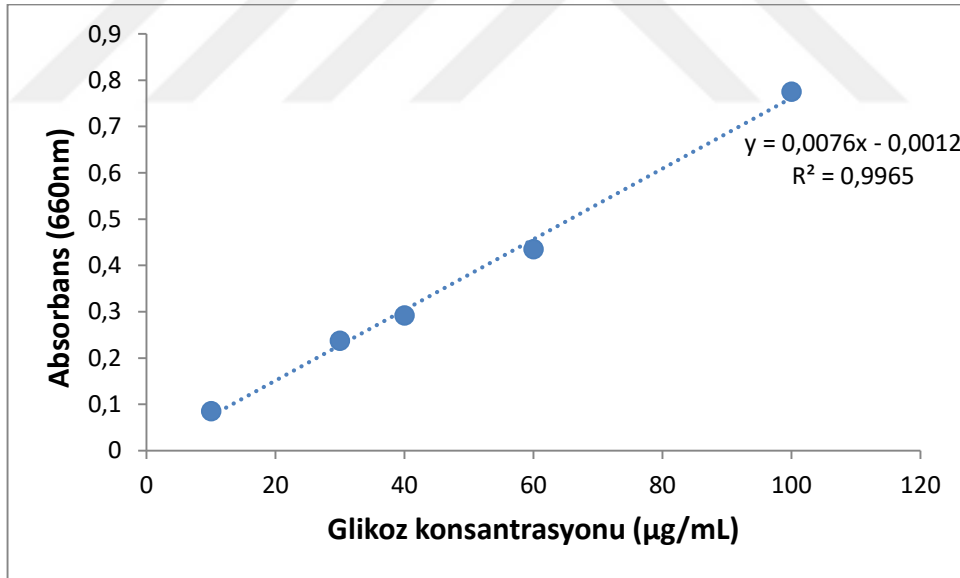
Tirozin standart grafiğı 1 mg/mL konsantrasyonda stok tirozin çözeltisi kullanılarak hazırlandı. Enzim aktivite hesaplamalarında kullanılmak üzere oluşturulan konsantrasyona karşı absorbans grafiğı çizildi (Şekil 18).



Şekil 18. Tirozin standart grafiği

Karbohidrat standart grafiği

Karbohidrat standart grafiği 1 mg/mL konsantrasyonda stok glikoz çözeltisi kullanılarak hazırlandı. Karbohidrat miktar tayinin hesaplamasında kullanılmak üzere oluşturulan konsantrasyona karşı absorbans grafiği çizildi (Şekil 19).

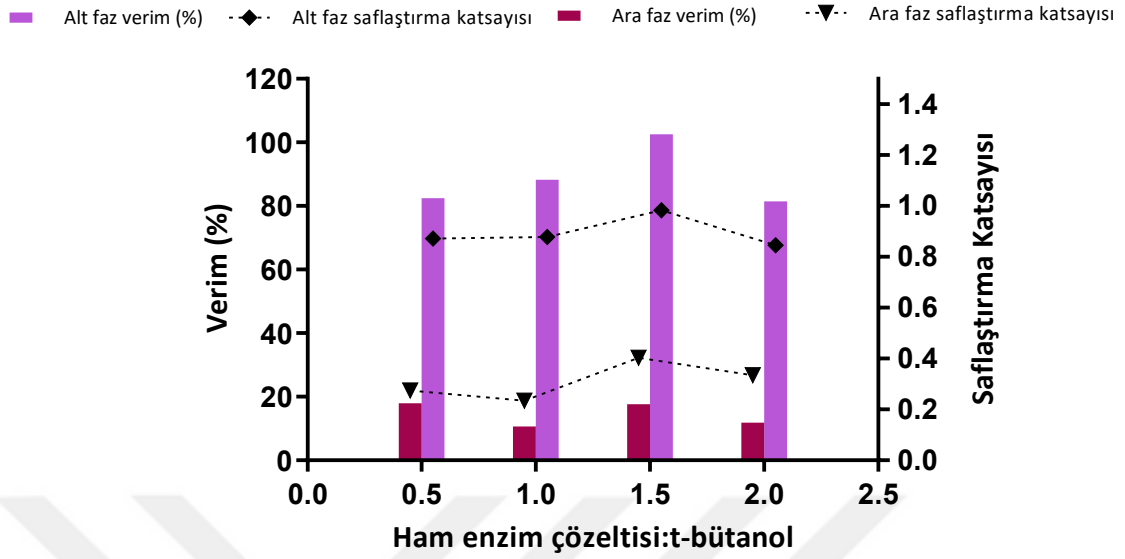


Şekil 19. Karbohidrat standart grafiği

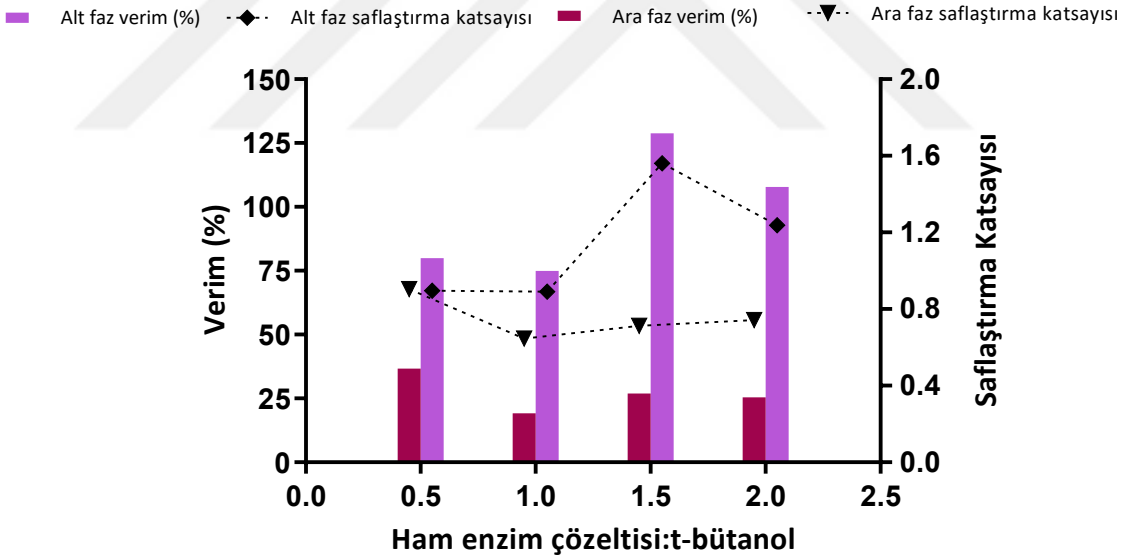
Alkalın Proteazın Üç Fazlı Ayırma (TPP) yöntemi ile kısmi olarak saflaştırılması

Alkalın proteazın klasik TPP yöntemi ile kısmi saflaştırılmasında, ilk olarak proteazın en yüksek verime ve saflaştırma katsayısına sahip olduğu uygun aralığı belirlemek için, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ doygunluğu ve ham enzim çözeltisi:t-bütanol oranı gibi farklı TPP proses parametrelerinin optimizasyonu yapıldı. Sonuçta, *B. licheniformis* SO7 suşundan alkali proteaz TPP ile 2 mL ham enzim çözeltisi (47,4 U/mL) için, %70 tuz doygunluğunda ve 1.0:0.5 alkol

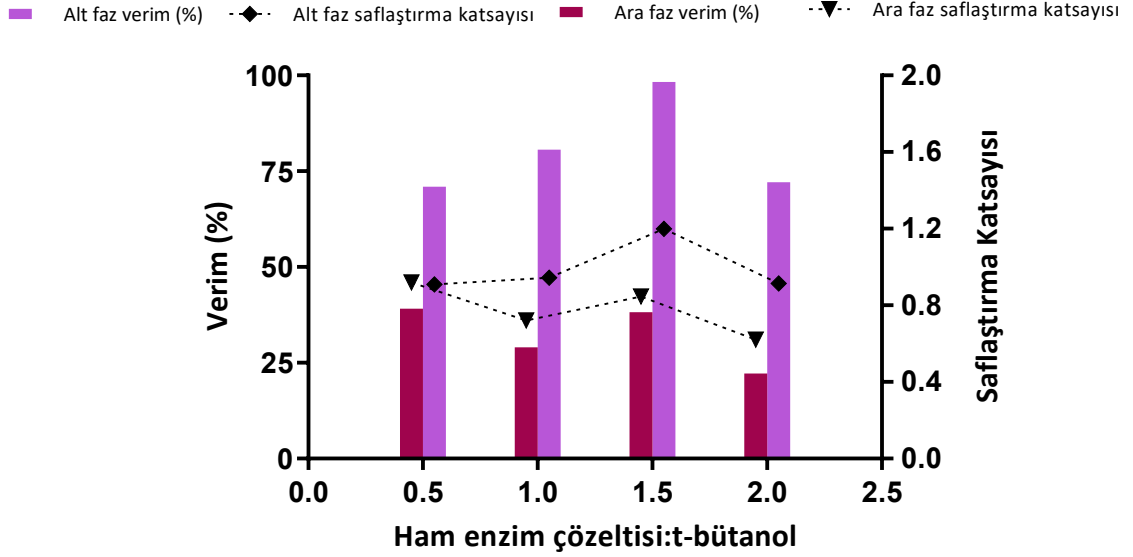
oranında kısmi olarak alt fazda saflaştırıldığı belirlendi. Elde edilen sonuçlar Şekil 20-26'da gösterildi.



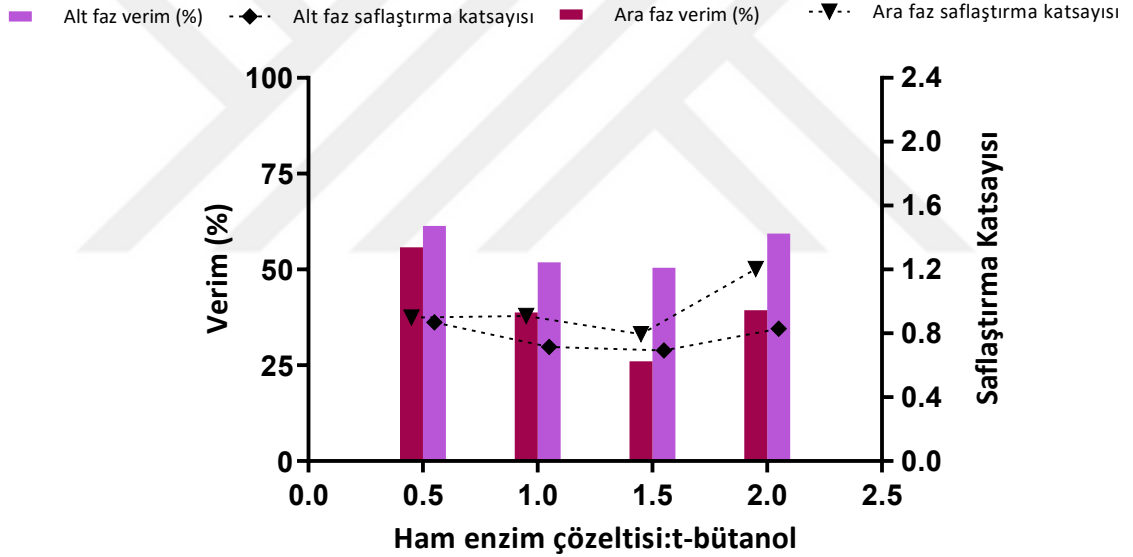
Şekil 20. TPP sisteminde, %20 amonyum sülfat doygunluğunda farklı t-bütanol oranlarının (ham enzim çözeltisi:t-bütanol; 1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5, 1.0:2.0) etkisi



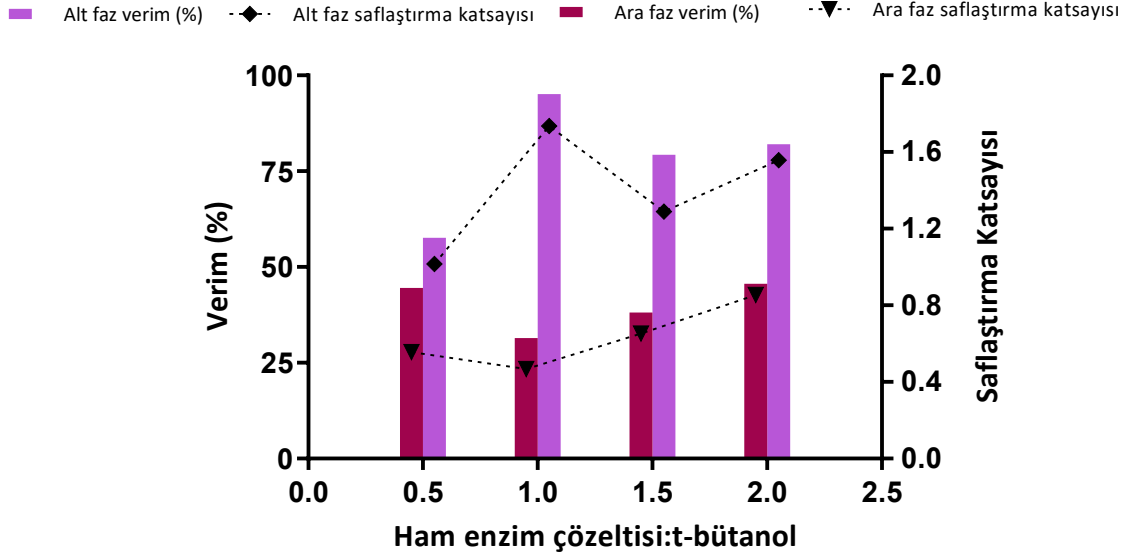
Şekil 21. TPP sisteminde, %30 amonyum sülfat doygunluğunda farklı t-bütanol oranlarının (ham enzim çözeltisi:t-bütanol; 1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5, 1.0:2.0) etkisi



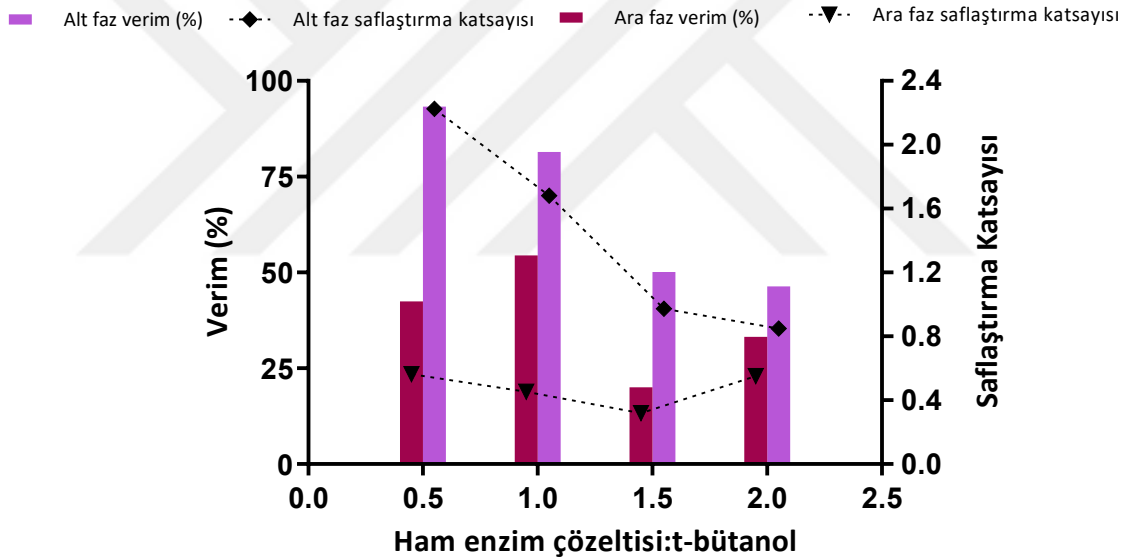
Şekil 22. TPP sisteminde, %40 amonyum sülfat doygunluğunda farklı t-bütanol oranlarının (ham enzim çözeltisi:t-bütanol; 1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5, 1.0:2.0) etkisi



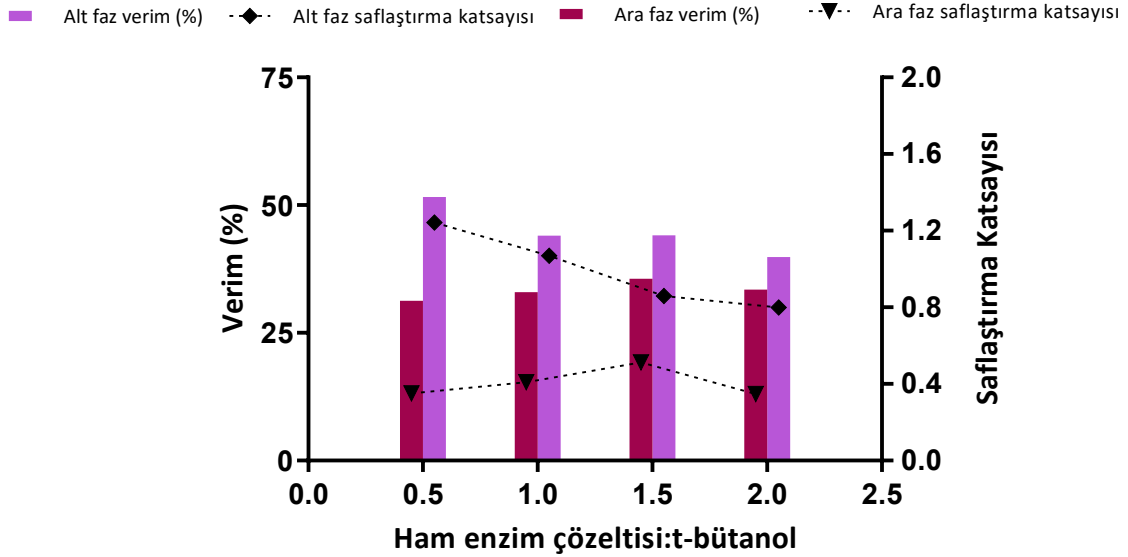
Şekil 23. TPP sisteminde, %50 amonyum sülfat doygunluğunda farklı t-bütanol oranlarının (ham enzim çözeltisi:t-bütanol; 1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5, 1.0:2.0) etkisi



Şekil 24. TPP sisteminde, %60 amonyum sülfat doygunluğunda farklı t-bütanol oranlarının (ham enzim çözeltisi:t-bütanol; 1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5, 1.0:2.0) etkisi



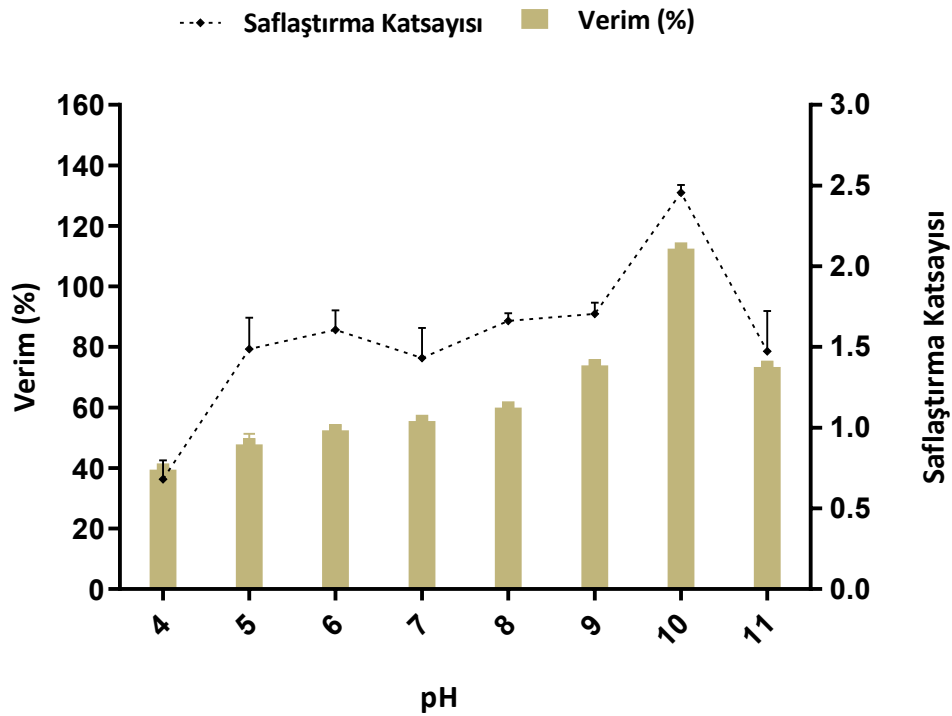
Şekil 25. TPP sisteminde, %70 amonyum sülfat doygunluğunda farklı t-bütanol oranlarının (ham enzim çözeltisi:t-bütanol; 1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5, 1.0:2.0) etkisi



Şekil 26. TPP sisteminde, %80 amonyum sülfat doygunluğunda farklı t-bütanol oranlarının (ham enzim çözeltisi:t-bütanol; 1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5, 1.0:2.0) etkisi

TPP yönteminde pH etkisi

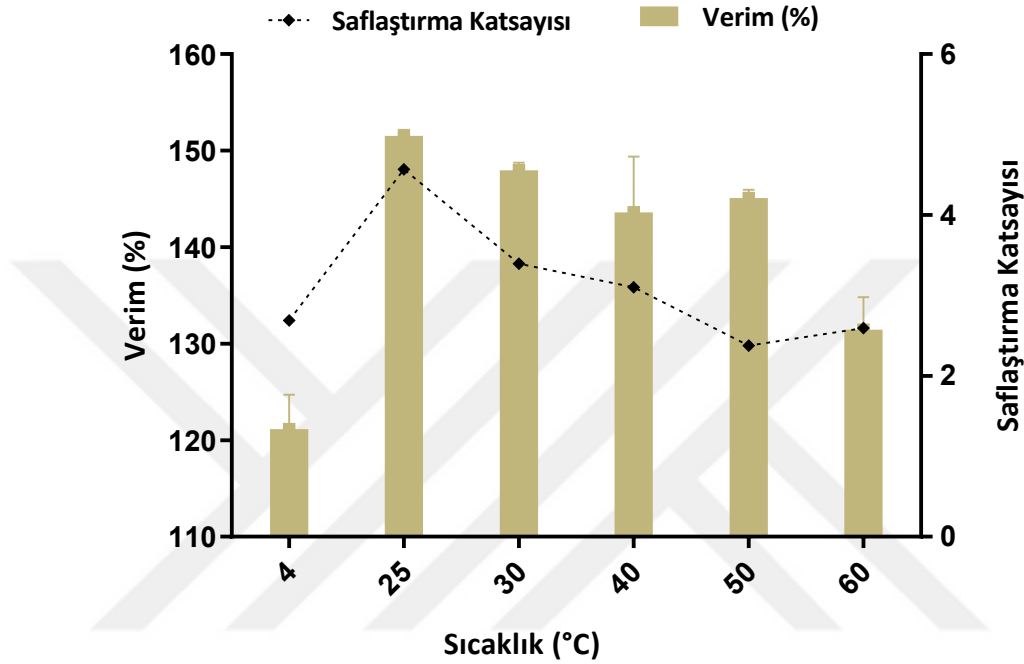
TPP ile kısmi saflaştırma işleminde, en iyi tuz doygunluğu ve alkol oranı belirlendikten sonra sistem optimizasyonunu gerçekleştirmek amacıyla farklı pH değerleri (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11) için, 2 mL ham enzim çözeltisi için (43,68 U/mL) saflaştırma işlemleri tekrarlandı. Şekil 27’de elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde en uygun değer pH değerinin pH 10 olduğu belirlendi.



Şekil 27. TPP yönteminde pH etkisi

TPP yönteminde sıcaklığın etkisi

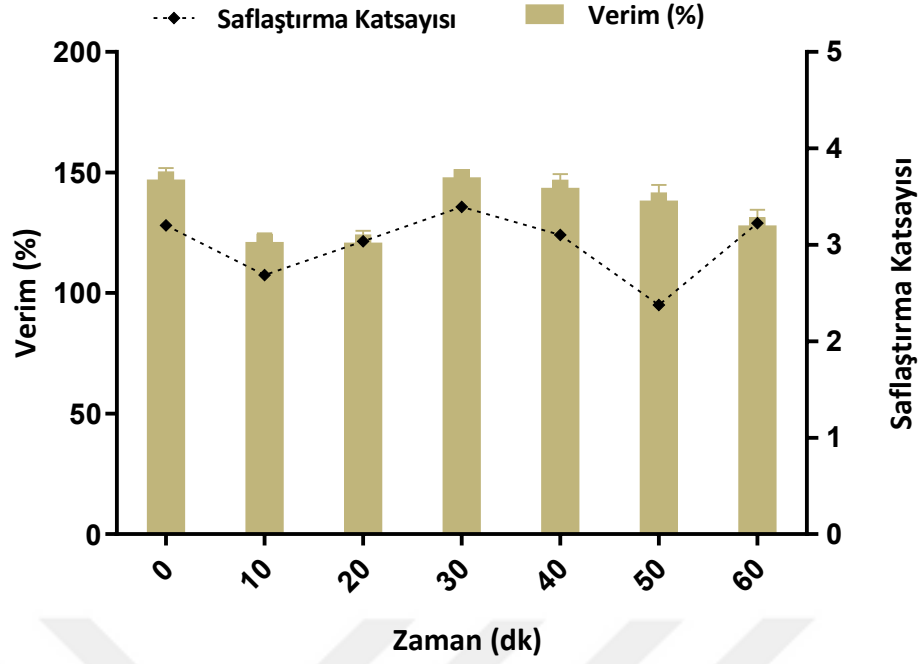
TPP sisteminde, en iyi tuz doygunluğu, alkol oranı ve pH değeri belirlendikten sonra sıcaklık optimizasyonunu gerçekleştirmek amacıyla 2 mL ham enzim çözeltisi (55,2 U/mL) ile farklı sıcaklık (4, 25, 30, 40, 50, 60°C) değerlerinde saflaştırma işlemleri tekrarlandı. Şekil 28’de elde edilen sonuçlara göre en uygun sıcaklık değerinin 25°C (oda sıcaklığı) olduğu belirlendi.



Şekil 28. TPP yönteminde sıcaklığın etkisi

TPP yönteminde inkübasyon süresinin etkisi

TPP sisteminde, en iyi tuz doygunluğu, alkol oranı ve pH ve sıcaklık değeri belirlendikten sonra süre optimizasyonunu gerçekleştirmek amacıyla 2 mL ham enzim çözeltisi (49,2 U/mL) ile farklı sürelerde (0, 10, 25, 30, 40, 50, 60 dk) saflaştırma işlemleri tekrarlandı. Şekil 29’da elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde en uygun inkübasyon süresinin 30 dk olduğu sonucuna varıldı.



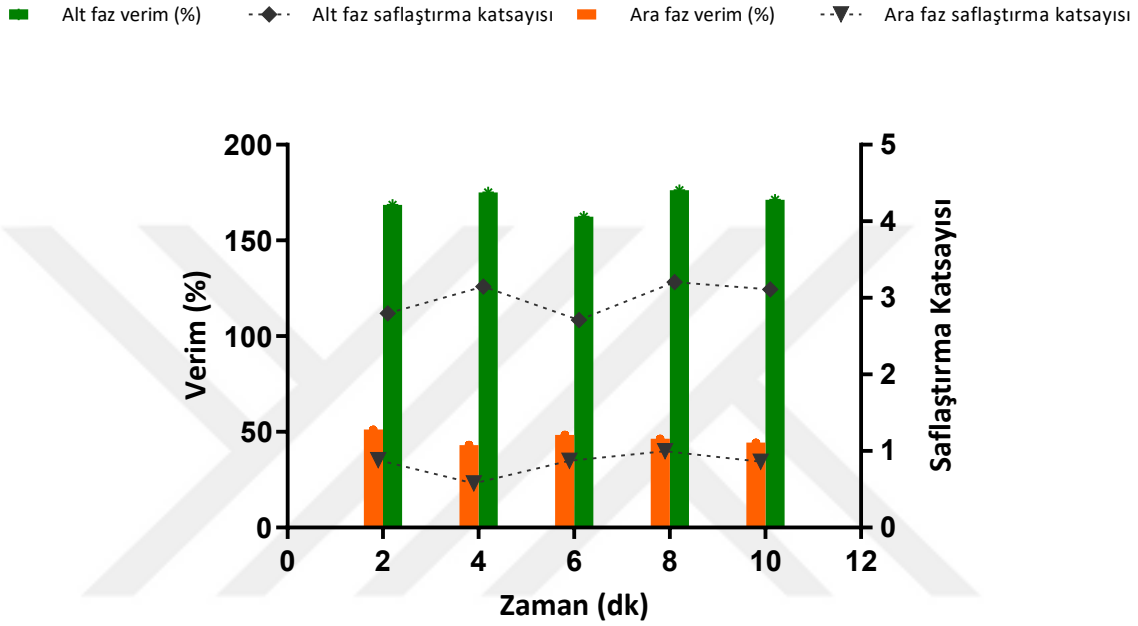
Şekil 29. TPP yönteminde inkübasyon süresinin etkisi

B. licheniformis SO7'den izole edilen alkalın proteaz enzimi pH 10'da, oda sıcaklığında (25 °C), 30 dk'da, 1.0:0.5 (ham enzim çözeltisi:t-bütanol oranı) ve %70 doygun amonyum sülfat kullanılarak uygulanan TPP sistemi ile %147 verimle 3,23 kat safaştırılmıştır.

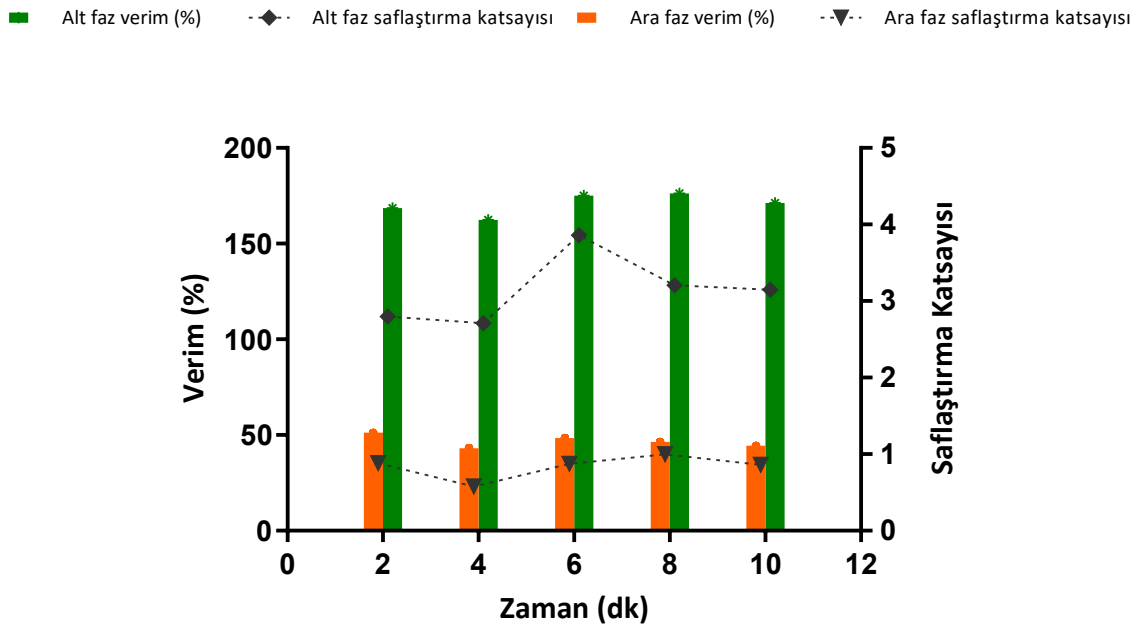
Literatür çalışmaları incelendiğinde optimize koşullar altında TPP yöntemi ile yapılan safaştırma örnekleri şu şekildedir; *Moringa oleifera*'dan proteaz oda sıcaklığında, pH 7'de 1 saatlik TPP (%35 amonyum sülfat, 1.0:0.75 ham ekstrakt:t-bütanol) uygulaması sonucu 4,94 kat safaştırma oranı ve %96,08 verim ile (Abdoulaye *et al.* 2023), *Maclura pomifera* proteazlarını safaştırmak için oda sıcaklığında pH 6'da 1 saatlik TPP (40% (w/v) amonyum sülfat, 1:1 (v/v) ham ekstrakt:t-bütanol) uygulaması sonucu %86 verim ve 2,85 safaştırma oranı ile geri kazanımı (Başlar *et al.* 2021), ananas tacından bromelainin TPP (%70 amonyum sülfat, 1.0:0.5 ham ekstrakt:t-bütanol) ile kısmi safaştırılması oda sıcaklığında pH 7'de 1 saatlik uygulama sonucu %244'lük bir geri kazanım ve 3,4'lük safaştırma katıyla (Gul *et al.* 2022), *Carica papaya* bitkisinden %134 verimle 11,45 safaştırma oranında Lateks papain maddesi (Hafid *et al.* 2020), *Bacillus sp.* ICTF2 alkalın proteazı %147,9 verimle 12 kat (Kaur *et al.* 2019) elde edilmiştir. Literatür ile karşılaştırma yapıldığında *B. licheniformis* SO7 suşundan safaştırılan proteazın TPP tekniği kullanılarak yüksek verimle elde edildiği görülmektedir.

Alkalın proteazın manyetik alan destekli üç fazlı ayırma (MFTPP) yöntemi ile kısmi saflaştırılması

MFTPP ile kısmi saflaştırma işleminde optimum şartları belirlemek amacıyla manyetik alan uygulama süresi, görev döngüsü ve manyetik alan gücü gibi parametreler değiştirilerek 2 mL ham enzim çözeltisi (52,8 U/mL) için saflaştırma işlemleri uygulanmıştır. Uygulanan işlemler sonrası en iyi değerler sırasıyla 6 dk uygulama süresi, %40 görev döngüsü ve 40 W manyetik alan gücü olarak belirlendi. Elde edilen tüm sonuçlar Şekil 30-35'te gösterildi.

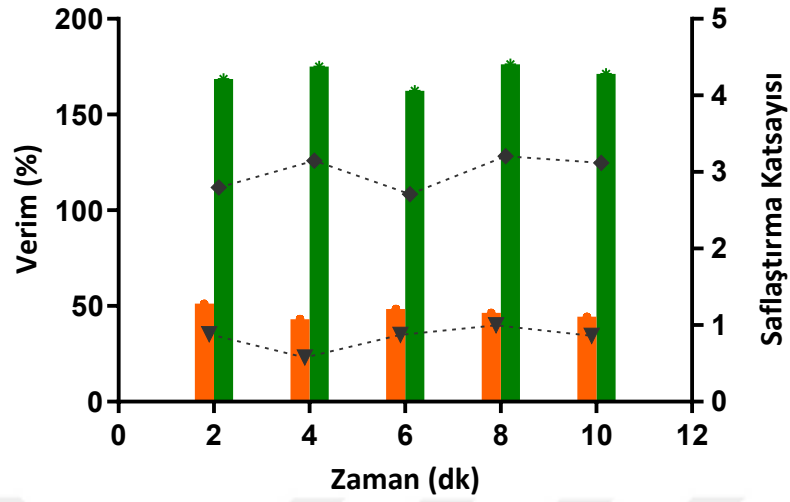


Şekil 30. Manyetik alan süresinin ve görev döngüsünün (%20) alkalın proteazın %verim ve saflaştırma katsayısına etkisi



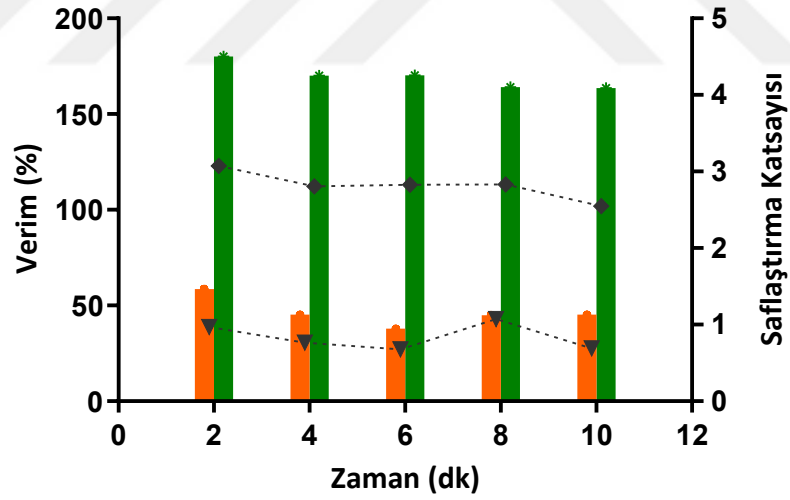
Şekil 31. Manyetik alan süresinin ve görev döngüsünün (%40) alkalın proteazın %verim ve saflaştırma katsayısına etkisi

■ Alt faz verim (%) -◆- Alt faz saflaştırma katsayısı ■ Ara faz verim (%) -▼- Ara faz saflaştırma katsayısı

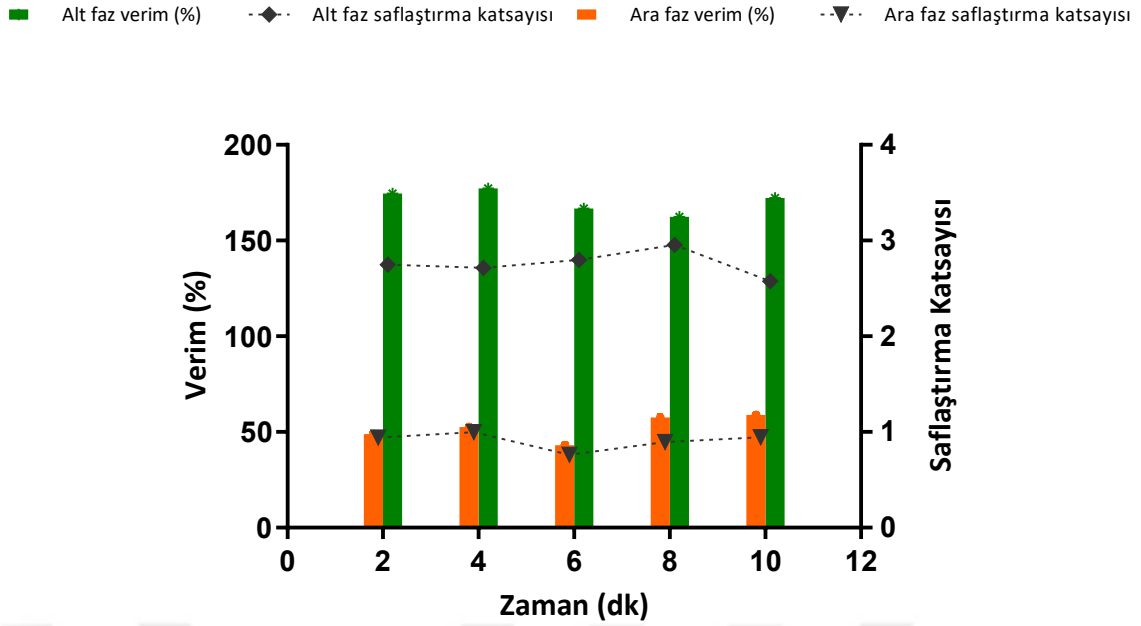


Şekil 32. Manyetik alan süresinin ve görev döngüsünün (%60) alkalın proteazın %verim ve saflaştırma katsayısına etkisi

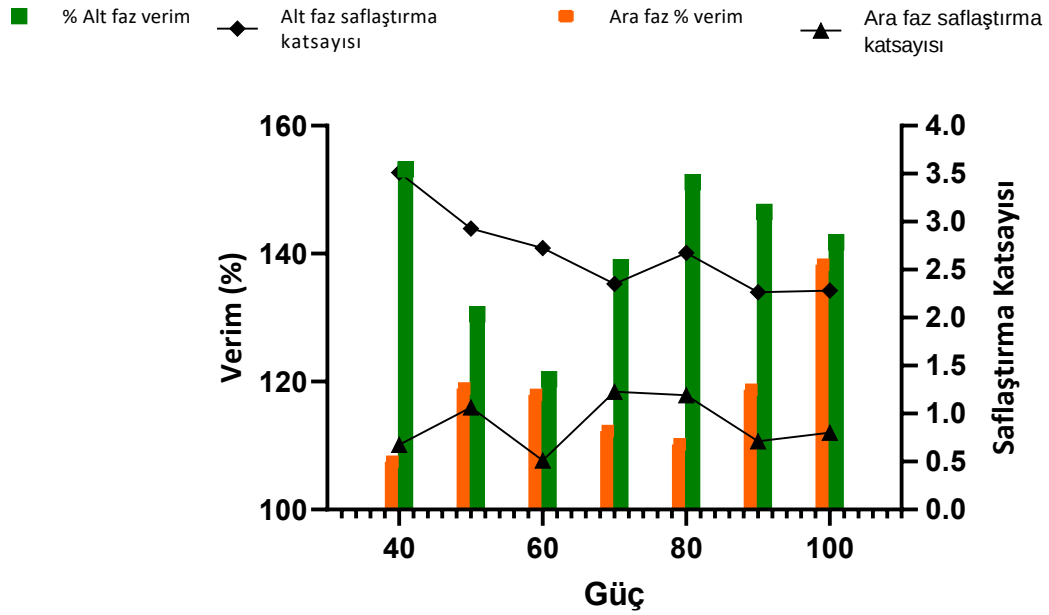
■ Alt faz verim (%) -◆- Alt faz saflaştırma katsayısı ■ Ara faz verim (%) -▼- Ara faz saflaştırma katsayısı



Şekil 33. Manyetik alan süresinin ve görev döngüsünün (%80) alkalın proteazın %verim ve saflaştırma katsayısına etkisi



Şekil 34. Manyetik alan süresinin ve görev döngüsünün (%100) alkalın proteazın %verim ve saflaştırma katsayısına etkisi

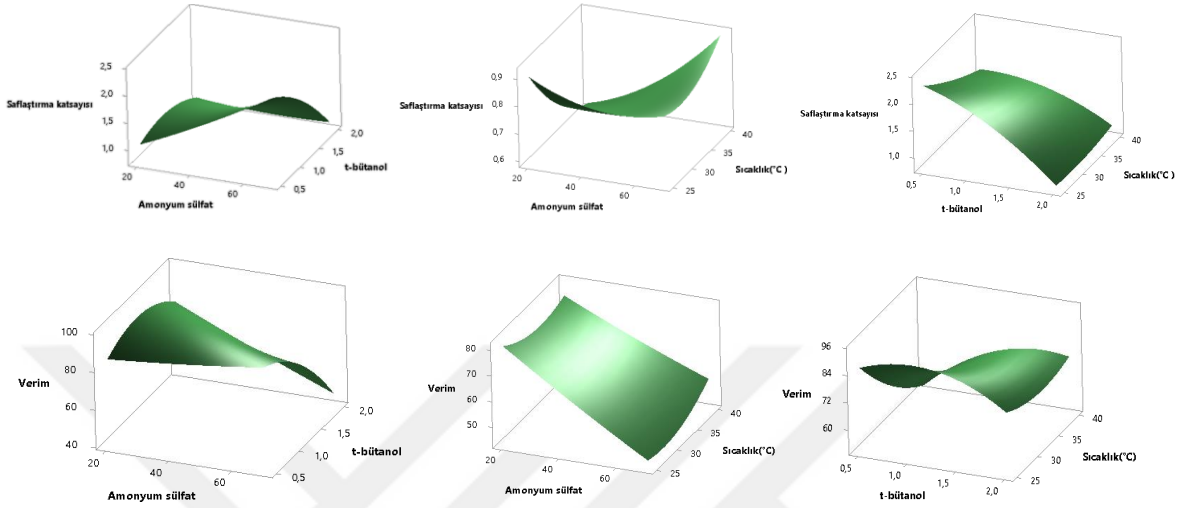


Şekil 35. Manyetik alan gücünün alkalın proteazın %verim ve saflaştırma katsayısına etkisi (manyetik alan süresi: 6 dk, görev döngüsü: %40, ham enzim çözeltisi: 52,8 U/mL)

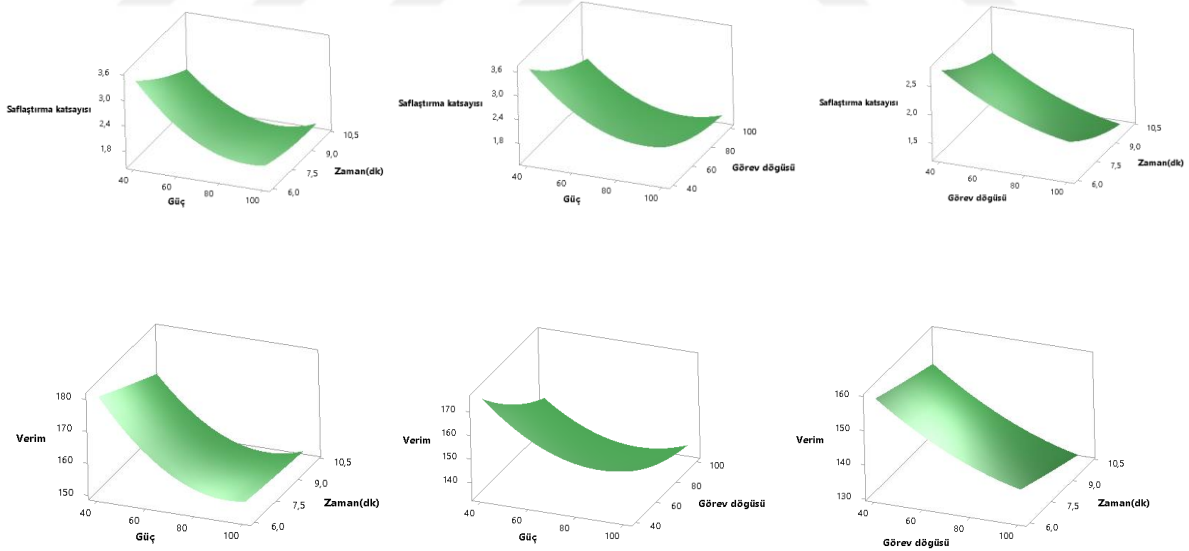
Enzim saflaştırma istatistiksel optimizasyon sonuçları

Çalışmamızda deneysel sonuçlar ile oluşturulmuş grafilere ek olarak yüzey yanıt yöntemi (RSM) ile sonuçlar desteklenmiştir. Klasik TPP’de tuz, sıcaklık ve t-bütanol ve MFTPP’de ise süre, güç ve sıcaklık parametrelerinin enzim verimi ve saflaştırma katsayısı üzerinde önemli derecede etkili olduğu gözlenmiştir ($P < 0,05$). Klasik TPP’de tuz (%70) t-bütanol (1.0:0.5) ve oda sıcaklığında çok iyi bir verim elde edilmiştir. Enzim verimi ve

saflaştırma katsayısı deneysel ve tahminen yapılan işlemde birbirini desteklemektedir. Şekil 36 ve 37’de gösterildiği üzere yanıt yüzey yöntemi %95 güven aralığında gerçekleştirilen model seçiminde doğrusal ve karesel modelin P-değeri anlamlı bulunmuştur ($P < 0,05$). Çalışmada alkalın proteazın saflaştırılması ile ilgili kuadritik model varyans analizi sonuçları Ek 1-4’te gösterilmiştir.



Şekil 36. Klasik TPP’de alkalın proteaz aktivitesi üzerine üç değişkenin kombine etkilerine ait 3D grafik görüntüleri



Şekil 37. MFTPP’de alkalın proteaz aktivitesi üzerine üç değişkenin kombine etkilerine ait 3D grafik görüntüleri

B. licheniformis SO7 ile Saflaştırılan Alkalın Proteazın saflaştırma sonuçları

B. licheniformis SO7’den proteaz enzimi TPP optimizasyonu ile belirlenen parametreler kullanılarak 2 mL ham enzim çözeltisi (47,4 U/mL) için %70 (w/v) amonyum sülfat

doğunluğu, 1.0:0.5 (v/v) ham enzim çözeltisi:t-bütanol oranı ve pH 10,0'da %147 verimle 3,23 kat; MFTPP ile belirlenen parametreler kullanılarak %40 görev döngüsü, 6 dk manyetik alan süresi ve 40 W manyetik alan gücünde %181 verimle 4 kat alt fazda kısmi olarak saflaştırıldı (Tablo 14).

Tablo 14. *B. licheniformis* SO7 ile saflaştırılan Alkalın Proteazın Saflaştırma Tablosu

Basamak	Total Hacim (mL)	Aktivite (U/mL)	Protein (mg/mL)	Total Aktivite (U/mL)	Total Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Saflaştırma Katsayısı	% Verim
Ham Enzim Çözeltisi	2	67,5	97,3	135	194,6	0,69	1	100
TPP Alt Faz	3	66,5	29,6	199,5	88,8	2,24	3,23	147
TPP Ara Faz	1	42,7	102,5	42,7	102,5	0,41	0,59	31
MFTPP Alt Faz	3	81,6	29,2	244,8	87,6	2,79	4	181
MFTPP Ara Faz	1	21	115,7	21	115,7	0,18	0,26	15

TPP ile yapılan saflaştırma çalışmalarında toplam enzim aktivitesinde artış gözlenmektedir. Bunun sonucu olarak enzimlerin spesifik aktivitesindeki artışın arkasındaki mekanizma hala tam olarak açıklanamamış olsa da, bunun başlıca nedenleri arasında enzim molekülünün artan esnekliği, inhibitörlerin enzim preparatlarından uzaklaştırılması, yapısal değişiklikler ve konformasyonel sıkılaşma olabileceği düşünülmektedir (Bayraktar & Önal, 2013; Aras, 2023).

Bu tez çalışmasında alkalın proteazın saflaştırılması için ilk olarak klasik TPP yapılmış olup, sonrasında verim ve saflaştırma kat sayısını artırmak amacıyla TPP yöntemi modifiye edilerek literatürde yeni bir yöntem olan manyetik alan destekli TPP gerçekleştirildi. Tablo 15’de TPP ve MFTPP sisteminin karşılaştırılması özetlenmiştir. Klasik TPP’de elde edilen %147 verimle 3,23 kat saflaştırma sonucu, MFTPP’de %181 verim ve 4 kat saflaştırma oranına yükselerek başarılı bir sonuç elde edildi. Klasik TPP’de uygulanan 60 dk’lık sürenin optimizasyon sonucu 30 dakikaya ve ayrıca MFTPP’de 6 dk’ya düştüğü görülmektedir.

Tablo 15. Klasik TPP ve MFTPP Yöntemlerinin Optimize Koşullar Altında % Geri Kazanım ve Saflaştırma Katsayısı Karşılaştırması

Sistem	Optimum Koşullar	% Verim	Saflaştırma Katı	İşlem Süresi (dk)
TPP	%70 (w/v) (NH ₄) ₂ SO ₄ , 1.0:0.5 t-bütanol, 25°C,	%147	3,23	30

pH 10				
MFTPP	%70 (w/v) (NH ₄) ₂ SO ₄ , 1.0:0.5 t-bütanol, 25°C, pH 10, görev döngüsü %40, manyetik alan gücü 40 W	%181	4	6

Literatürde bulunan çalışmalara bakıldığında modifiye edilmiş TPP yöntemleri ile yapılan saflaştırmalar şu şekildedir; mikrodalga destekli üç fazlı ayırma tekniğini (MWTPP) kullanarak mikroalglerden (*Chlorella vulgaris*) proteinlerin ekstraksiyonunu 120 saniye mikrodalga ısıtım süresi, %80 görev döngüsü, 100 W mikrodalga gücü ve mikroalg biyokütlesi konsantrasyonu (%0,5 w/w) sonucu %63,2 verimle 2,54 kat saflaştırma derecesi elde edilmiştir (Chew et al. 2019). Atık patates kabuklarından polifenol oksidaz enziminin (PPO) ultrason destekli üç fazlı ayırma (UATPP) yöntemi kullanılarak 5 dk, 25 kHz, %40 görev döngüsü ve 150 W nominal güç ile %98,3 verimle 19,7 kat geri kazanım sağlanmıştır (Niphadkar & Rathod, 2015). İlk kez *B. licheniformis* SO5 suşundan α -amilazın kısmi saflaştırılmasında kullanılan MFTPP ile %30 görev döngüsü ve 70 W manyetik alan gücü ile 10 dk'da %195 verimle 3,07 kat saflaştırılarak klasik TPP'ye göre daha kısa sürede yüksek verim ve saflaştırma oranı gözlenmiştir (Aras, 2023).

MFTPP'de yer alan işlemin görev döngüsü, belirli bir süre manyetik güce maruz bırakılan örneğin, toplam uygulama süresinin belirli yüzde değerleri hesaplanması (örneğin %20 görev döngüsü 12 sn on, 48 sn off şeklinde) sonucu manyetik alan uygulama ve durdurma sürelerinin belirlenmesi olarak tanımlanabilir. Bu durumda güç, aralıklı (darbe modu) olarak uygulanır. Sürekli modda sağlanan manyetik alan kesintisiz moleküler sürtünmeye yol açabilir. Bu, sistemin genel sıcaklığını artırarak enzimlerin denatürasyonuna yol açabilir. Bu nedenle kesintili manyetik alana tabii tutularak, sürekli moda kıyasla enzimin daha az denatürasyonu sağlanabilir. Darbe modunda çalıştırma ayrıca enerji tüketimini azaltır ve sistemdeki solventlerin buharlaşmasını azaltır. Bu sebepler doğrultusunda, mikrodalga veya ultrason destekli TPP'de kesintili/darbe modunda uygulama yapılmaktadır (Salvi et al. 2020; Ketnawa et al. 2017). Bu nedenle, manyetik alan uygulaması da benzer şekilde gerçekleştirilmiştir.

Literatürde manyetik alanın yüklü parçacıklar üzerinde uyguladığı Lorentz kuvveti ile hareketli yükler üzerinde bir sapma etkisine sebep olabileceği belirtilmektedir (Gao et al. 2019). Elektromanyetik ayırma tekniği ile proteinlerin saflaştırılmasının yapıldığı bir çalışmada, yüksek elektrik alan gücünün partikül yörüngesinin sapmasını ve agregatlar arasında ayrılmayı sağlayarak protein saflaştırma verimini önemli ölçüde artırdığı ve aynı şekilde verimi daha da artırmak için manyetik alan uygulanabileceği ifade edilmektedir (Zhu et al. 2021). Bu

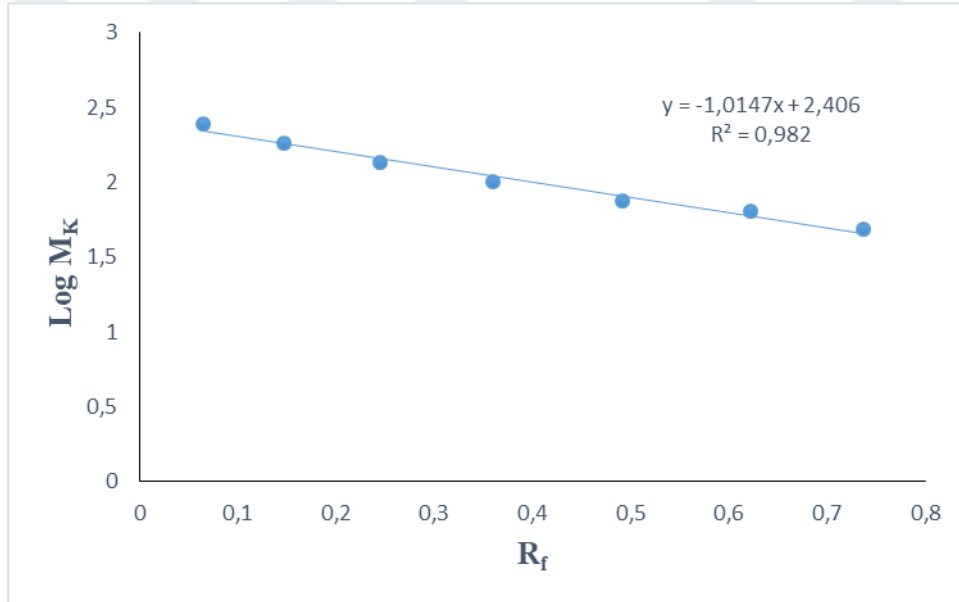
çalışmada kullanılan MFTPP yönteminde de, uygulanan manyetik alanın benzer şekilde yüklü parçacıklar üzerinde sapma etkisine sebep olduğu, bunda faz ayrılma oranını ve hedef proteinin difüzyonunu artırabileceği yönünde bir mekanizma olduğu düşünülmektedir (Gao *et al.* 2019; Aras, 2023).

***B. licheniformis* SO7 Alkalın Proteazın Biyokimyasal Karakterizasyonu Sonuçları**

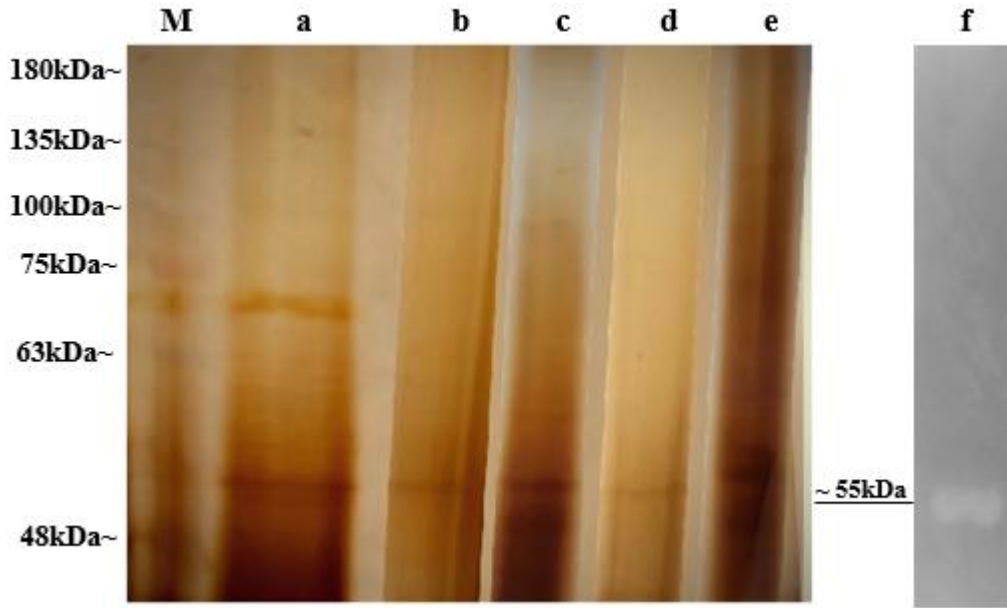
SDS-PAGE yöntemi ile alkalın proteazın molekül ağırlığının belirlenmesi ve zimogram analizi

TPP/MFTPP tekniğiyle *B. licheniformis* SO7 suşundan kısmi olarak saflaştırılan alkalın proteazın saflığının kontrolü ve molekül ağırlığının belirlenmesi için SDS-PAGE yöntemi kullanıldı (Şekil 39). Log MK-R_f grafiğini elde etmek için standart proteinin ve enzimlerin jel üzerinde yürümüş oldukları mesafeler ölçüldü. Şekil 38’de çizilen grafikten yararlanılarak elde edilen alkalın proteazın molekül ağırlığı ~55 kDa olarak hesaplandı.

Ek olarak, alkalın proteaz enzimi SDS-PAGE sisteminde yürütülerek zimogram analizi yapıldı. Yapılan analiz sonucunda Şekil 39’da görülen proteaz enziminin bulunduğu noktada şeffaf bir bant verdiği görülmektedir. Enzimin kazeini parçalamasından dolayı jelde diğer bölgelere göre daha açık renkte bulunan şeffaf renkteki görüntü proteaz enziminin varlığını doğrulamaktadır.



Şekil 38. Log MK-R_f grafiği

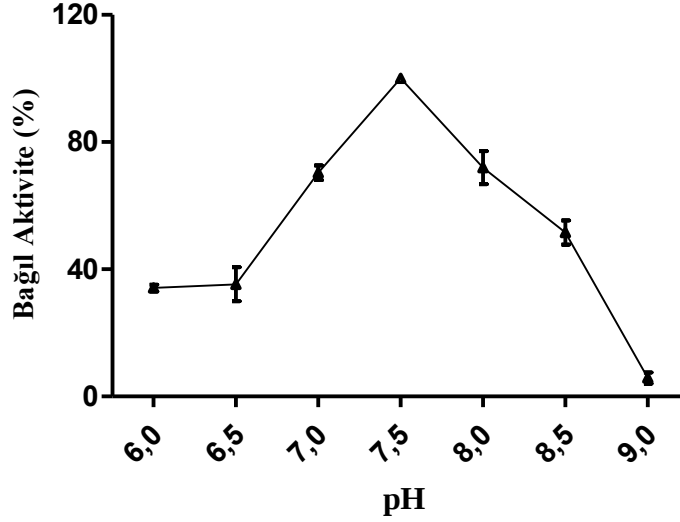


Şekil 39. *B. licheniformis* SO7'den TPP ve MFTPP yöntemiyle saflaştırılan alkalın proteaz enziminin SDS-PAGE ve zimogram görüntüsü, **M-**) Marker **a-)** Ham enzim çözeltisi **b-)** TPP alt faz **c-)** TPP ara faz **d-)** MFTPP alt faz **e-)** MFTPP ara faz **f-)** Zimogram analizi

B. licheniformis SO7 suşu kullanılarak alt fazdan saflaştırılan alkalın proteazın molekül kütlesi ~55 kDa olarak belirlendi. Literatürde *Bacillus* sp. Mar64 proteazı ~28 kDa (Kotb *et al.* 2023), *Bacillus* sp. tarafından üretilen keratinolitik proteaz 25-28 kDa (Lemes *et al.* 2023), *B. cereus*'tan ekstrakte edilen alkalın proteaz 35 kDa (Ullah *et al.* 2022), *B. subtilis* S1 proteazı için 17 kDa ve *B. amyloliquefaciens* KSM12 proteazı için 65 kDa (Hashmi *et al.* 2022) molekül kütlesine sahip olduğu bildirilmiştir.

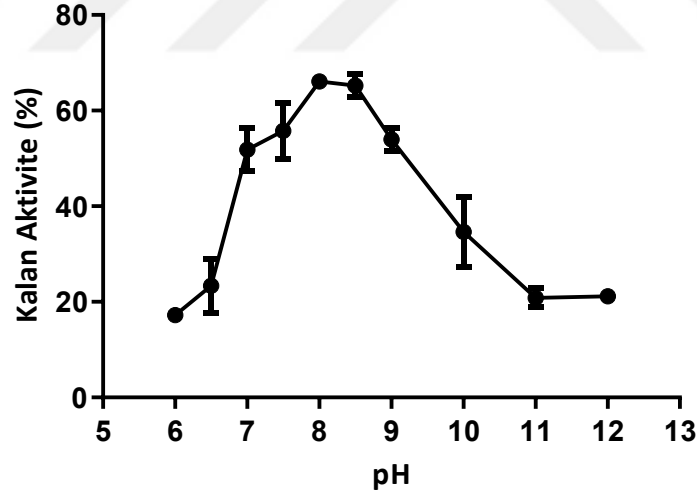
Alkalın Proteazın aktivitesi ve stabilitesi üzerine pH'nın etkisi

Saflaştırılan alkalın proteazın optimum pH'sını belirlemek amacıyla 3 farklı tamponla hazırlanan 7 farklı pH değerinden elde edilen aktivite sonuçlarına göre grafik oluşturuldu (Şekil 40). Grafiğe göre alkalın proteazın pH 7,5'ta en yüksek aktiviteye sahip olduğu gözlenmektedir. pH 6, 6,5 ve 9 dışında *B.licheniformis* SO7 suşundan elde edilen proteazın %40'ın üzerinde aktivite gösterdiği belirlenmiştir. pH değeri yükseldikçe aktivitenin yükseldiği ancak pH 7,5'tan sonra aktivitenin düşmeye başladığı grafikten gözlenmektedir.



Şekil 40. Alkalın proteaz için optimum pH grafiği

Alkalın proteazın asidik ve bazik ortamlarda stabilitesini belirlemek amacıyla 12 saate kadar pH 6 ve pH 12 aralığındaki değerlerde enzim aktivitesi ölçüldü. Elde edilen aktivite sonuçlarına göre Şekil 41'de gösterilen grafik çizildi. 12 saatin sonunda tüm pH değerlerinde SO7 alkalın proteazın aktivitesini özellikle pH 7-9 aralığında %50'nin üzerinde stabilitesini koruduğu gözlemlendi (Şekil 41).



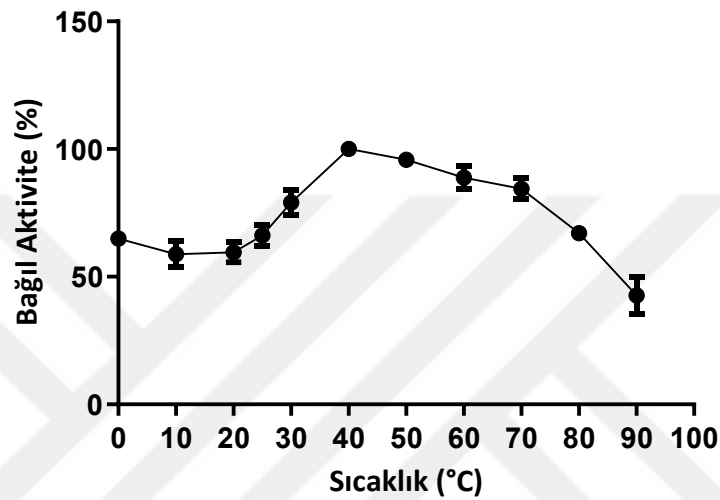
Şekil 41. Alkalın proteaz için stabil pH grafiği

Literatürde bulunan benzer çalışmalar incelendiğinde; *Maclura pomifera*'dan saflaştırılan proteazın optimum pH değeri 6,5 ve 2 saatlik inkübasyon sonucu pH 5-9 aralığında %80'in üzerinde stabilitesini koruduğu (Başlar *et al.* 2021), soya fasulyesinden *B. subtilis* DC27 fibrinolitik enziminin optimum pH'sı 7 olup pH 6-10 aralığında stabilitesini %70'in üzerinde koruduğu (Hu *et al.* 2019), *Carica papaya*'dan elde edilen papainin optimum pH'sı 6 ve 1 saatlik inkübasyon sonrasında pH 6-7,5 aralığında stabilitesini %80 koruduğu (Hafid *et al.* 2020), *Bacillus sp.* ile elde edilen alkalın proteazın optimum pH'sının 10 olduğu ve 10 dakikaya

kadar inkübasyon süresi sonucu denenmiş olan pH 6, 9, 10 ve 11 için 30 dk'ya kadar stabilitenin %80 korunduğu sonrasında ise her birinin düşüşe geçtiği (Yu *et al.* 2019) bildirilmiştir.

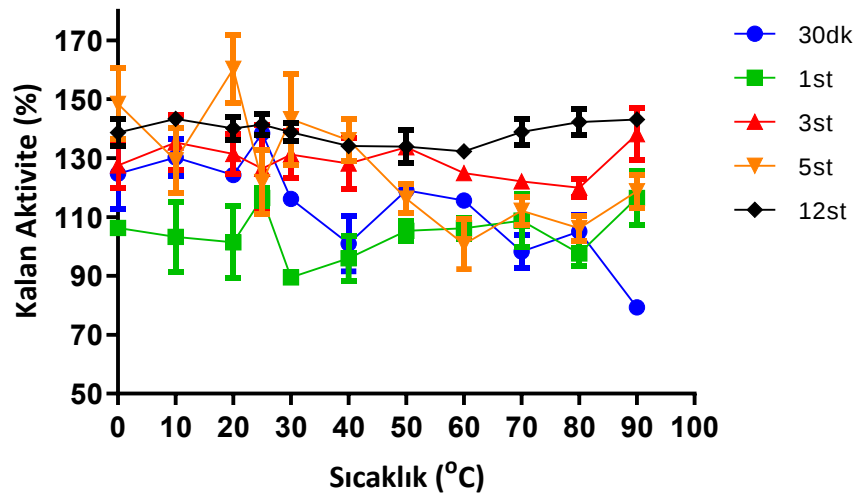
Alkalın proteazın aktivitesi ve stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisi

SO7'den saflaştırılan alkalın proteazın 0-90°C'ye kadar olan sıcaklık aralığında aktivite ölçümü yapıldı. Farklı sıcaklıklarda çalışılan alkalın proteazın aktivite tayini sonuçlarına göre çizilen grafikte gösterildiği gibi optimum sıcaklık 40°C olarak belirlendi. Elde edilen veriler Şekil 42'de gösterildi.



Şekil 42. Alkalın proteaz için optimum sıcaklık grafiği

Alkalın proteazın 0-90°C aralığında 12 saatlik süre boyunca aktivite ölçümü yapıldı. Şekil 43'te gösterildiği gibi *B. licheniformis* SO7'den saflaştırılan alkalın proteazın farklı sıcaklıklarda 90°C hariç bütün değerlerde aktivitesini %90'ın üzerinde koruduğu; çoğu değer %100 ile %160 arasında kalan aktiviteye sahip olduğu gözlemlendi (Şekil 43).

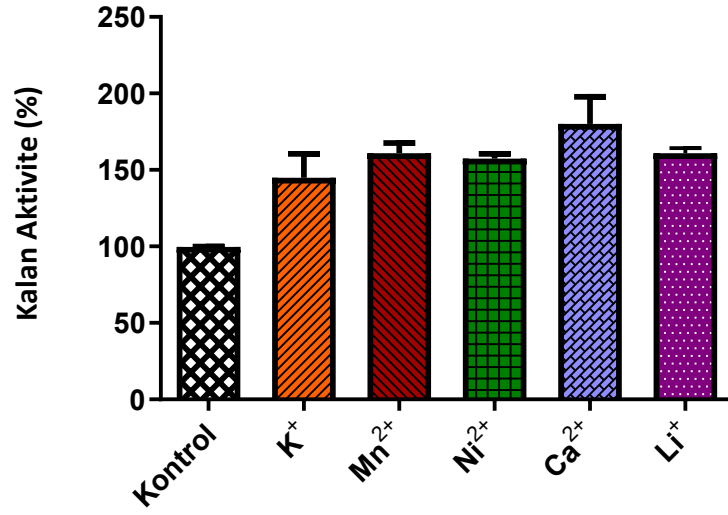


Şekil 43. Alkalın proteaz için stabil sıcaklık grafiği

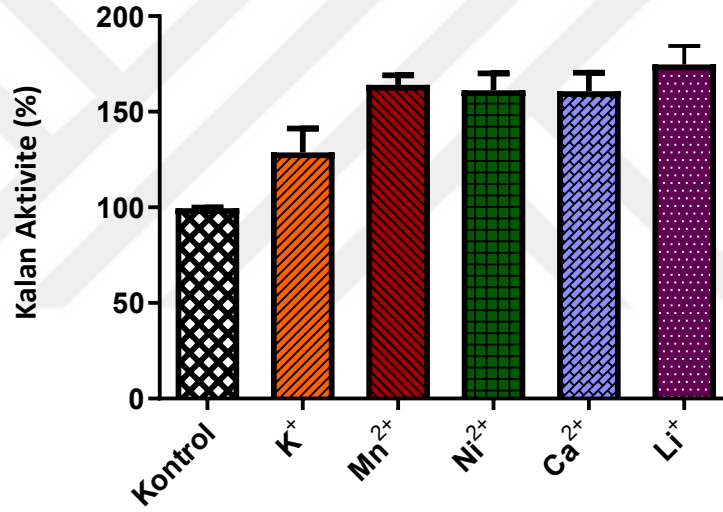
Literatürde; *Bacillus luteus* H11 suşundan elde edilen alkali ve halofilik proteazın 30 dakika sonunda optimum sıcaklığı 45°C ve 90 dk inkübasyon sonrası 45°C ve 55°C’de sırasıyla %85 ve %70’e kadar kararlılığını koruduğu (Kalwasińska *et al.* 2018), *Maclura pomifera* proteazlarının maksimum sıcaklığının 30 dakika inkübasyonu sonucu 65°C olduğu ve 25-65°C aralığında %50’nin üzerinde kararlılık gösterdiği (Başlar *et al.* 2021), *B. safensis* RH12 serin proteazının 60°C’de optimum aktivite sergilediği ve geniş bir sıcaklık aralığında stabilitesini koruduğu özelliğe 1 saatlik inkübasyon sonrası 50°C’de aktivitesinin %85’ini koruduğu (Rekik *et al.* 2019) bildirilmiştir.

Bazı metal iyonlarının alkalın proteaz aktivitesi üzerindeki etkisi

Alkalın proteaz aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisini incelenmek amacıyla 1 mM, 5 mM ve 10mM’lık konsantrasyonlardaki Li⁺, K⁺, Ca²⁺, Mn²⁺ ve Ni²⁺ metal iyonları kullanıldı. K⁺ tüm konsantrasyonlarda alkalın proteaz aktivitesini aynı oranda (%45) artırmıştır. Diğer metal iyonlarının (Mn²⁺, Ni²⁺, Ca²⁺, Li⁺, K⁺) ise %50’nin üzerinde enzim aktivitesinde artışa neden olduğu tespit edildi. Metal iyonlarının varlığında enzim aktivitesinin etkisi Şekil 44’te gösterilmiştir.

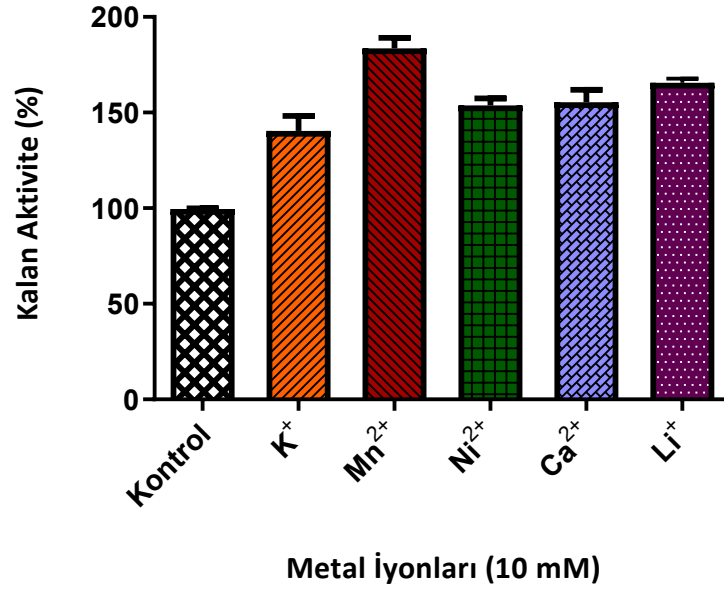


Metal iyonları (1 mM)



Metal iyonları (5 mM)

Şekil 44. 1 mM, 5 mM ve 10 mM konsantrasyonlarda hazırlanan metal iyonlarının alkalın proteaz aktivesi üzerine etkisi



Şekil 44. 1 mM, 5 mM ve 10 mM konsantrasyonlarda hazırlanan metal iyonlarının alkalın proteaz aktivitesi üzerine etkisi (devamı)

Literatür çalışmalarında metal iyonlarının proteaz aktivitesi üzerine etkileri incelendiğinde; *Bacillus sp.*'den elde edilen alkalın proteazın (H₂O₂'ye toleranslı) 10 mM'lık konsantrasyondaki Fe²⁺ tarafından inhibe edilirken, 1 mM'lık düşük bir konsantrasyonda aktivite üzerinde hafif bir artış olduğu ve Fe³⁺'ün alkalın proteazın aktivitesi üzerinde konsantrasyona bağlı bir inhibitör etkiye sahip olduğu, buna karşın 10 mM Mn²⁺ varlığında %21 oranında artan aktiviteye sahip olduğu gözlemlenmiştir (Yu *et al.* 2019), *Neurospora crassa*'dan ekstrakte edilen alkalın proteazın 5 ve 10 mM'lık konsantrasyonlarda Ca²⁺, Cu²⁺, Co²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺ varlığında sadece 5mM Ca²⁺'nin enzim aktivitesini atırdığı diğer metal iyonlarını tarafından inhibe edildiği (Zheng *et al.* 2020), *S. sciuri*'den elde edilmiş olan proteazın 10 mM'lık konsantrasyonda Ca²⁺ ve Mg²⁺ tarafından sırasıyla %189.6 ve %112.23 oranda aktive gösterdiği buna karşılık, 10 mM konsantrasyonda hem Cu²⁺ hem de Hg²⁺ varlığında proteaz aktivitesinin tamamen inhibe olduğu (Abu-Khudir *et al.* 2019) rapor edilmiştir.

Bazı yüzey aktif madde ve inhibitörlerin alkalın proteaz aktivitesi üzerine etkisi

Alkalın proteazın aktivitesi üzerine yüzey aktif maddeleri ve inhibitörlerin etkilerini araştırmak için %1 ve %5'lik konsantrasyonlarda SDS, Tween-20, Tween-80 Triton X-100 yüzey aktif maddeleri ve H₂O₂; 2 ve 5 mM'lık konsantrasyonlarda EDTA, DTNB, IAA, PMSF, B-merkaptetanol, 3,4-Dikloroizokumarin inhibitörleri kullanıldı. Tablo 15'te verilen sonuçlara göre alkalın proteazın SDS varlığında aktivitesini %95'den fazla koruduğu gözlemlendi. %1'lik Tween-80 ve Tween-20 yüzey aktif maddelerinin varlığında %70'in üzerinde

aktivitesinin koruyabildiği, buna karşın %5'lik Tween-80 ve Triton X-100 varlığında yaklaşık %53 oranında enzimin inhibe olduğu belirlendi. H₂O₂'nin %'lik konsantrasyonda enzim üzerinde %6 oranda artan aktiviteye neden olduğu ve %5'lik konsantrasyonunda ise enzim aktivitesinin %85 oranında korunduğu gözlemlendi. İnhibitörler varlığında ise; DTNB, EDTA ve IAA'nın 2 ve 5 mM'lık konsantrasyonlarında enzimin %80-90 aralığında aktivitesini koruduğu, ancak 2 ve 5 mM'lık β-Merkaptoetanol, 3,4-Dikloroizokumarin ve 5 mM'lık konsantrasyonda PMSF'in enzimi yaklaşık %45 oranında inhibe ettiği tespit edildi.

Tablo 16. Yüzey Aktif Maddelerin ve İnhibitörün Alkalın Proteaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Yüzey aktif maddeler	Konsantrasyon (%)	Kalan Aktivite (%)
SDS	1	98,57±4,09
	5	97,34±1,19
Tween-20	1	95,44±4,50
	5	71,91±0,53
Tween-80	1	84,90±2,04
	5	38,50±4,30
Triton X-100	1	55,37±7,86
	5	47,52±14,82
H ₂ O ₂	1	106±0,62
	5	85±18
İnhibitörler	Konsantrasyon (mM)	Kalan Aktivite (%)
DTNB	2	91,555± 0,718
	5	92,482± 7,466
EDTA	2	90,479± 3,000
	5	84,580± 1,445
IAA	2	84,613±1,239
	5	87,140±2,597
PMSF	2	76,214 ±5,570
	5	55,108±0,700
β-Merkaptoetanol	2	46,097±5,553
	5	54,542±1,411
3,4-Dikloroizokumarin	2	57,453±3,529
	5	54,103±0,626

Literatürde bulunan çalışmalar incelediğinde; *Neurospora crassa*'dan elde edilen alkalın proteazın yüzey aktif maddeler varlığında (SDS, Tween-80, Span, Triton X-100) SDS'in, proteazı %27 oranında inhibe ettiği ve diğer maddelerin ihmal edilebilir etkisi olduğu ve diğer proteaz inhibitörleri (PMSF, EDTA, pepstatin A ve IAM) varlığında PMSF' nin alkalın proteaz

aktivitesini tamamen inhibe ettiği gösterilmiş (Zheng *et al.* 2020), *S. sciuri*'den ekstrakte edilmiş olan proteaz, 10 mM konsantrasyonda gözlemlenen %39,6 aktivite ile EDTA varlığında önemli ölçüde inhibe edildiği, öte yandan, 1 ve 2 mM konsantrasyonlarındaki DTT varlığında proteaz aktivitesinin kontrole göre sırasıyla %28,9 ve %17,5'e kadar arttığı ve %0,2 ve %0,5 SDS konsantrasyonlarında sırasıyla %58,2 ve %52,73 oranda enzimin aktivitesini korumuş olduğu gözlemlenmiş (Abu-Khudir *et al.* 2019), *Bacillus circulans*'dan elde edilen proteazın 1 ve 5 mM'lık PMSF ile sırasıyla %85 ve %95 oranında inhibe olduğu, Triton X-100 ve Tween-20, maddeleri varlığında ise proteaz aktivitesinin sırasıyla %15 ve %20 oranında arttığı ve %1 SDS varlığında enzimin başlangıç aktivitesini %75'ini koruduğu (Rao *et al.* 2009); *Nesterkonkia sp.* Al-20 suşundan izole edilen proteaz enziminin PMSF 'nin 1 mM konsantrasyonunda kararlı kaldığı, 10 mM konsantrasyonda ise aktivitesinin %108 olduğu, diğer bir serin proteaz inhibitörü olan 3,4- diklorokomarin ile aktivitesini %70 oranında kaybettiği ve bu nedenle bu enzimin serin proteaz olduğunu (Gessesse *et al.* 2003) rapor edilmiştir. Yapılan çalışmalara göre değerlendirildiğinde, PMSF ve 3,4-Dikloroizokumarin varlığında inhibisyonundan yola çıkılarak *B. licheniformis* SO7 proteaz enziminin alkalın serin proteaz olabileceği düşünülmektedir. Aynı zamanda, *B. licheniformis* SO7'dan izole edilen proteaz enziminin yüzey aktif ajanlar ve H₂O₂ varlığında aktivitesini yüksek oranda koruması özelliğiyle de enzim, birçok endüstriyel alanda kullanım için cazip bir aday olma potansiyeline sahiptir.

Bazı organik çözücülerin alkalın proteazın aktivitesi üzerine etkisi

Alkalın proteazın aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkisini araştırmak için %15 ve %50 konsantrasyonlarda metanol, etanol, izopropanol, t-bütanol, aseton ve DMSO kullanılarak 1 ve 24 saatlik sürelerde aktivite tayinleri yapıldı. Tablo 16'da verilen sonuçlara göre kullanılan organik çözücülerin varlığında 1 saatlik süre sonunda alkalın proteazın aktivitesini %100'ün üzerinde koruduğu gözlemlendi. 24 saatlik inkübasyon sonunda ise alkalın proteaz aktivitesinin %15'lik 2-propanol varlığında %91 korunduğu, metanolün %15'lik konsantrasyonunda %42'lik bir inhibisyona uğradığı, ancak %50 konsantrasyonunda aktivitesinin %88'ini koruyabildiği gözlemlenmiştir.

Tablo 17. Bazı Organik Maddelerin Alkalın Proteaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Organik Çözücüler (1 saat)	Konsantrasyon (%)	Kalan Aktivite (%)
Metanol	15	104,7±9,672
	50	119,4±10,55
Etanol	15	104,4±4,390
	50	103,4±6,133
2-Propanol	15	111,9±3,224
	50	102,4±2,81
DMSO	15	105,9±11,6
	50	113,9±10,2
Aseton	15	110,9±5,75
	50	110,9±10,5
Tert-bütanol	15	111,9±6,78
	50	128,3±3,22
Organik Çözücüler (24 saat)	Konsantrasyon (%)	Kalan Aktivite (%)
Metanol	15	58,58±2,43
	50	89,55±3,22
Etanol	15	100±0,700
	50	106,4±4,92
2-Propanol	15	91,04±1,21
	50	100±8,110
DMSO	15	113,4±1,21
	50	136,8±5,62
Aseton	15	98,50±1,21
	50	102,9±10,62
Tert-bütanol	15	103,48±8,64
	50	122,80±9,92

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde; *Neurospora crassa*'dan ekstrakte edilen alkalın proteazın %1 ve %10 konsantrasyonlardaki metanol, etanol, izopropanol, aseton, asetonitril varlığında aktivite üzerinde pek bir etki yaratmadığı (Zheng *et al.* 2020), *Streptomyces sp.*'den elde edilen alkalın proteazın etanol varlığında aktivitesinin en yüksek oranda stabil kaldığı, etil asetat, DMSO, kloroform ve heksan çözücülerinde yaklaşık %80 stabilite gösterdiği ancak aseton, asetonitril, izopropanol, benzen ve toluen gibi diğer solventlerin varlığında ise orta düzeyde %30-%50 arasında stabilite gösterdiği tespit edilmiş (Sarkar & Suthindhiran 2020), *Bacillus cereus* S8 alkalın proteaz aktivitesinin aseton, etanol, metanol, benzen ve izopropanol varlığında %60'ın üzerinde inhibe olduğu buna karşın ksilen ve etil eter varlığında enzim

aktivitesinde minimum artış görüldüğü (Lakshmi *et al.* 2018) raporlanmıştır. Sonuç olarak, *B. licheniformis* SO7 proteazının organik çözücüler varlığında yüksek konsantrasyonda ve uzun süreli inkübasyon sürelerinde kararlılığını koruduğu ve bunun da endüstriyel prosesler açısından önemli olduğu söylenebilir.

Substrat Spesifitesi

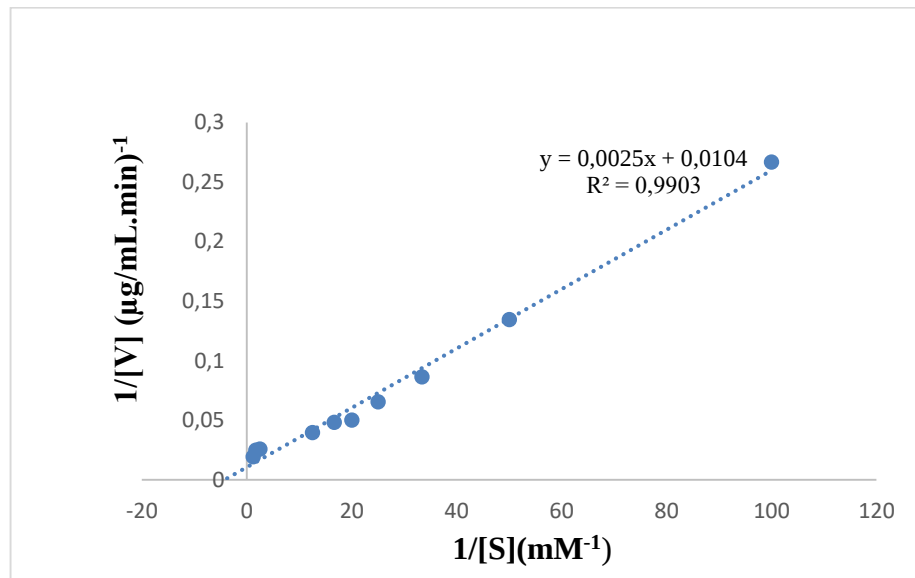
B. licheniformis SO7'den saflaştırılmış olan alkalın proteazın substrat özgüllüğü çeşitli substratlar kullanılarak test edildi. Yapılan deneyler sonucunda elde edilen veriler değerlendirildiğinde alkalın proteazın substrat olarak kazein için en yüksek aktiviteyi gösterdiği belirlendi (Tablo 17).

Tablo 18. *B. licheniformis* SO7 Alkalın Proteaz Substratları - % Bağıl Aktivite Değerleri

Doğal Substratlar	Bağıl Aktivite (%)
Kazein	100,0 ± 0,001
Azokazein	82,82± 7,919
Hemoglobin	52,62± 4,525
Jelatin	51,48±6,713

Alkalın proteazın kinetik parametrelerinin belirlenmesi

B.licheniformis SO7 suşundan kısmi olarak saflaştırılan alkalın proteazın kazein substratı için K_m ve V_{max} değerleri Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak hesaplandı. Kullanılan grafiğe göre; kazein için K_m değeri 0,240 mg/mL, V_{max} değeri 96,15 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{dk}^{-1}$, K_{cat} değeri, $1,7 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, K_{cat}/K_m değeri, $0,071 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ olarak hesaplandı (Şekil 45).

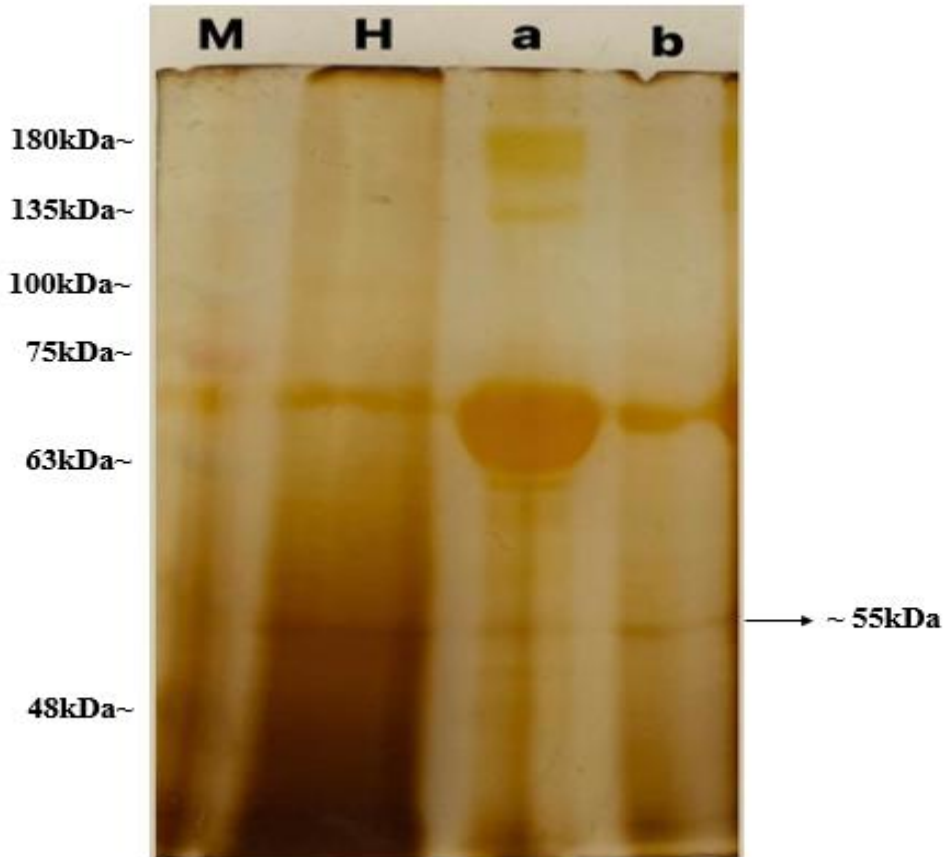


Şekil 45. Kazein substratı için K_m ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik Lineweaver-Burk grafiği

Maclura pomifera proteazı için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,87 mg/mL ve 8,82 U (Başlar *et al.* 2021), *Bacillus sp.* alkalın proteazı için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 16,7 mg/ml ve 14,7 ug/(dk.ml) (Yu *et al.* 2019), *B. licheniformis*'ten alkalın proteazın V_{max} ve K_m değerleri sırasıyla 104,9 U/mL ve 29 uM (Bashir *et al.* 2018), *Neurospora crassa*'dan elde edilen alkalın proteazın K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 2,18 mg/mL ve 36,36 μ g/mL/dk (Zheng *et al.* 2020), %1 kazein kullanılarak izole edilen proteazın K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla %5,9 ve 32,25 μ M/dk/mg (Sarkar & Suthindhiran, 2020), *Nocardiopsis dassonvillei* OK-18 alkalın proteaz için hesaplanan K_m , V_{max} ve K_{cat} değerleri sırasıyla 1,0 mg/mL, 1879,12 U (10,370 uM/dk) ve $7,8 \times 10^{-2} s^{-1}mL$ (Sharma *et al.* 2020) olarak belirtilmiştir.

Alkalın Proteazın Hidroliz Deney Sonucu

B.licheniformis SO7 alkalın proteazının, kontrol proteini olan BSA'ni büyük ölçüde hidrolize ettiği BSA hidroliz deneyi ve SDS-PAGE analizi ile gösterilmiştir. Şekil 46, H: Ham enzim çözeltisine ait bantları, a: BSA'e ait protein bandını ve b: BSA'in alkalın proteaz enzimi ile muamelesi sonucu BSA'daki bandın büyük oranda küçüldüğünü, yani yüksek oranda parçalandığını göstermektedir.



Şekil 46. Alkalın proteazın BSA hidrolizi SDS-PAGE görüntüsü, **M-)** Marker, **H-)** Ham enzim çözeltisi, **a-)** BSA proteini **b-)** BSA-Alkalın proteaz

Literatürde alkalın proteazların hidroliz çalışmaları incelendiğinde; Ketnawa *et al.* (2014) tarafından yapılan çalışmada, yayın balığı iç organlarından safalştırılan alkalın proteazın soya proteini izolatları, yumurta akı proteini ve peynir altı suyu proteini konsantreleri üzerindeki hidrolizine bakılmış ve sonuçta ticari tripsin ile karşılaştırıldığında, ekstrakte edilen alkalın proteazın, yumurta akı proteini hariç tüm protein izolatlarının hidrolizinde daha yüksek etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir. *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-82'den saflştırılan alkalın proteazın tüy bozunması üzerindeki etkisinin analiz edildiği başka bir çalışmada, enzimin %90'dan fazla keratini bozduğu tespit edilmiş ve tüy tozunun hidrolizi için ek enzimlerin gerekli olmadığı belirtilmiştir (Al-Dhabi *et al.* 2020). *Cohnella* sp. A01'den elde edilen L-glutaminaz rSAM proteininin proteazlara karşı direnç gösteriminde kontrol protein BSA olacak şekilde karşılaştırmalı olarak ticari proteazlar (kimotripsin, pepsin, tripsin ve proteinaz K) ile muamelesi SDS-PAGE analizi ile gösterilmiştir. Sonuçta rSAM'ın rSAM üzerinde çok sayıda bölünme bölgesi olmasına rağmen kimotripsin, pepsin ve tripsin tarafından çok hafif kesimlerle yaklaşık olarak bozulmadan kaldığı buna karşın kontrol proteini BSA'nın, kimotripsin ve tripsin tarafından büyük ölçüde parçalandığı ve pepsin ve proteinaz K tarafından tamamen yok edildiği gözlenmiştir (Mosallatpour *et al.* 2019). Bu çalışmadan yola çıkarak tez çalışmasında elde edilen alkalın proteazın BSA üzerindeki hidroliz etkisine bakılmış ve buna benzer bir sonuç elde edilmiştir.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında ilk olarak, *B. licheniformis* SO7 bakteri suşu ile alkalın proteazın gıda atığından yüksek aktiviteli üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu çevre dostu biyoüretim prosesi ile endüstri ve biyoteknoloji açısından büyük önem arz eden biyomoleküller düşük maliyetle yüksek oranda üretilebildiği gibi atıkların da geri dönüşümüne potansiyel bir çözüm yolu sunmaktadır. Üretimi gerçekleşen alkalın proteaz, pH 10'da 1.0:0.5 (ham enzim çözeltisi:t-bütanol oranı) ve %70 doygunlukta amonyum sülfat kullanılarak TPP yöntemi ile %147 verimle 3,23 kat saflaştırıldı. Optimize edilen şartlar kullanılarak literatürde yeni bir yöntem olan manyetik alan destekli TPP tekniğı ilk kez alkalın proteaz enziminin kısmi saflaştırılması için kullanıldı. MFTPP için; %40 görev döngüsü, 40 W manyetik alan gücü ve 6 dk'lık saflaştırma süresi kullanılarak %181 verimle 4 kat saflaştırma gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar, manyetik alan destekli TPP'nin geleneksel TPP'ye kıyasla çok daha kısa işlem süresinde daha yüksek verim ve saflaştırma oranıyla alkalın proteazın kısmi saflaştırılması için kullanılabilecek etkin bir yöntem olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla MFTPP sistemi, farklı birçok enzimin ve diğer biyomoleküllerin ekstraksiyonunda daha yüksek bir saflıkla ve % geri kazanımla elde edilmeleri için yeni bir teknik olarak önerilebilir. Kısmi olarak saflaştırılan alkalın proteazın pH 6-12 ve 0-90°C sıcaklık aralığında yüksek oranda aktif ve stabil olduğu tespit edildi. Ayrıca bazı metal iyonlarının (Li^+ , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , K^+) bazı organik çözücülerin (Metanol, etanol, t-bütanol, izopropanol, aseton, DMSO), bazı yüzey aktif maddeleri (Tween-20, Tween-80, Triton X-100, SDS), H_2O_2 ve inhibitörlerin (DTNB, EDTA, IAA, PMSF, β -Merkaptoetanol, 3,4-Dikloroizokumarin) varlığında enzim aktivitesinin arttığı ya da büyük oranda stabilitesini koruduğu tespit edilmiştir. Bunun yanında, 2 ve 5 mM konsantrasyonda PMSF, β -Merkaptoetanol, 3,4-Dikloroizokumarin'in inhibisyona sebep olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, *B. licheniformis* SO7 alkalın proteaz; geniş bir sıcaklık ve pH aralığında aktivitesini koruyarak yüksek kararlılığa sahip olmasının yanında çeşitli metal iyonları, organik çözücüler ve yüzey aktif maddelerinin varlığında dahi yüksek kararlılık ve aktivite göstermesi gibi avantajları barındırması sebebiyle endüstriyel uygulamaların birçok alanında kullanımı için uygun bir aday olduğunu göstermektedir.

KAYNAKÇA

- Abatenh, E., Gizaw, B., Tsegaye, Z., & Wassie, M. (2017). The role of microorganisms in bioremediation-A review. *Open Journal of Environmental Biology*, 2(1), 038-046.
- Abdoulaye, A., Noumavo, A. D., Dah-Nouvlessounon, D., Ohin, M. A., Bayraktar, H., Bade, F. T., & Baba-Moussa, F. (2023). Purification of *Moringa oleifera* Leaves Protease by Three-Phase Partitioning and Investigation of Its Potential Antibacterial Activity. *American Journal of Plant Sciences*, 14(1), 64-76.
- Abu Yazid, N.; Barrena, R.; Komilis, D.; Sánchez, A. Solid-state fermentation as a novel paradigm for organic waste valorization: A Review. *Sustainability* 2017, 9, 224.
- Abu-Khudir, R., Salem, M. M., Allam, N. G., & Ali, E. M. (2019). Production, partial purification, and biochemical characterization of a thermotolerant alkaline metallo-protease from *Staphylococcus sciuri*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 189, 87-102.
- Adetunji, A.I. (2017). Treatment of lipid-rich wastewater using free and immobilized bioemulsifier and hydrolytic enzymes from indigenous bacterial isolates. University of KwaZulu-Natal, Westville, pp 60-78.
- Aehle, W. (2004). *Enzymes in industry: production and applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH, 484, Germany.
- Ahmad, W., Tayyab, M., Aftab, M. N., Hashmi, A. S., Ahmad, M. D., Firyal, S., ... & Awan, A. R. (2020). Optimization of conditions for the higher level production of protease: characterization of protease from *Geobacillus* SBS-4S. *Waste and Biomass Valorization*, 11, 6613-6623.
- Akcan, N. (2012). Production of extracellular protease in submerged fermentation by *Bacillus licheniformis* ATCC 12759. *African Journal of Biotechnology*, 11(7), 1729.
- Akoijam, N., Kalita, D., & Joshi, S. R. (2022). Bacteria and their industrial importance. In *Industrial Microbiology and Biotechnology* (pp. 63-79). Singapore: Springer Singapore.
- Alcaraz LD, Olmedo G, Bonilla G, *et al*. The genome of *Bacillus coahuilensis* reveals adaptations essential for survival in the relic of an ancient marine environment. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:5803–5808
- Al-Dhabi, N. A., Esmail, G. A., Ghilan, A. K. M., Arasu, M. V., Duraipandiyan, V., & Ponmurugan, K. (2020). Characterization and fermentation optimization of novel thermo stable alkaline protease from *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-82 from the Saudi Arabian environment for eco-friendly and industrial applications. *Journal of King Saud University-Science*, 32(1), 1258-1264.
- Ali, N., Ullah, N., Qasim, M., Rahman, H., Khan, S. N., Sadiq, A., & Adnan, M. (2016). Molecular characterization and growth optimization of halo-tolerant protease producing *Bacillus Subtilis* Strain BLK-1.5 isolated from salt mines of Karak, Pakistan. *Extremophiles*, 20, 395-402.
- Alvarez-Guerra, E. and Irabien, A. (2014) Ionic liquid-based three phase partitioning (ILTPP) for lactoferrin recovery. *Sep. Sci. Technol.*, 49(7):957–965.

- Alvarez-Guerra, E. and Irabien, A. (2015) Ionic liquid-based three phase partitioning (ILTPP) systems for whey protein recovery: ionic liquid selection. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 90(5):939–946.
- Aras Ş. (2023). Termofilik *Bacillus licheniformis* SO5'ten α -amilazın manyetik alan destekli üçlü faz ayırma sistemi ile saflaştırılması ve karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Arshad, Z.I., Amid, A. (2014). Bromelain: an overview of industrial application and purification strategies. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 98(17): 7283-7297.
- Astudillo, Á., Rubilar, O., Briceño, G., Diez, M. C., & Schalchli, H. (2023). Advances in Agroindustrial Waste as a Substrate for Obtaining Eco-Friendly Microbial Products. *Sustainability*, 15(4), 3467.
- Aunstrup, K., “Industrial Aspects of Biochemistry”, (B. Spencer editör), FEBS, Dublin, 23-29 (1981).
- Bashir, F., Asgher, M., Hussain, F., & Randhawa, MA (2018). *Bacillus licheniformis*'ten ısıya dayanıklı alkalın proteazın çapraz bağlı enzim kümelerinin geliştirilmesi ve karakterizasyonu. *Uluslararası biyolojik makromoleküller dergisi*, 113 , 944-951.
- Başlar, G. E., Bayraktar, H., & Önal, S. (2021). A Milk-Clotting Protease From *Maclura Pomifera* (Osage Orange): Three-Phase Partitioning And Characterization. *Annals: Food Science & Technology*, 22(3).
- Bayraktar, H., & Önal, S. (2013). Concentration and purification of α -galactosidase from watermelon (*Citrullus vulgaris*) by three phase partitioning. *Separation and purification technology*, 118, 835-841.
- Belmessikh, A., Boukhalfa, H., Mechakra-Maza, A. (2013). Statistical optimization of culture medium for neutral protease production by *Aspergillus oryzae*, Comparative study between solid and submerged fermentations on tomato pomace. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*, 44: 377-385.
- Bhatia, R. K., Ullah, S., Hoque, M. Z., Ahmad, I., Yang, Y. H., Bhatt, A. K., & Bhatia, S. K. (2021). Psychrophiles: A source of cold-adapted enzymes for energy efficient biotechnological industrial processes. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(1), 104607.
- Bhatia, S. C. (2017). Pollution control in textile industry. CRC Press.
- Blanco, A.S., Durive, O.P., Pérez, S.B., Montes, Z.D., Guerra, N.P. (2016). Simultaneous Production of Amylases and Proteases by *Bacillus subtilis* in Brewery Wastes. *Braz. J. Microbiol.* 47; 665–674.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-54.
- Brown, M., Jones, T., & Wilson, K. (2019). Thermophilic enzymes and their industrial applications: A comprehensive review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 46(4), 449-460.
- Chandraprakash Yamini, Govindasamy Sharmila, Chandrasekaran Muthukumaran, Kumar Pavithran, Narasimhan Manojkumar. Proteomic perspectives on thermotolerant microbes: an updated review. Received: 11 May 2021 / Accepted: 4 October 2021 © The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2021.
- Chen, X.; Yan, J.; Chen, J.; Gui, R.; Wu, Y.; Li, N. Potato pomace: An efficient resource for Monascus pigments production through solid-state fermentation. *J. Biosci. Bioeng.* 2021, 132, 167–173.

- Chew, K. W., Chia, S. R., Lee, S. Y., Zhu, L., & Show, P. L. (2019). Enhanced microalgal protein extraction and purification using sustainable microwave-assisted multiphase partitioning technique. *Chemical Engineering Journal*, 367, 1-8.
- Chew, K. W., Ling, T. C., & Show, P. L. (2019). Recent developments and applications of three-phase partitioning for the recovery of proteins. *Separation & Purification Reviews*, 48(1), 52-64.
- Clerici, N. J., Lermen, A. M., & Daroit, D. J. (2021). Agro-industrial by-products as substrates for the production of bacterial protease and antioxidant hydrolysates. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 37, 102174.
- Coelho, D. F.; Silveira, E.; Pessoa-Junior, A.; Tambourgi, E. B. Bromelain Purification Through Unconventional Aqueous Two-Phase System (PEG/Ammonium Sulphate). *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2013, 36(2), 185–192. DOI:10.1007/s00449-012-0774-5.
- Contesini FJ, de Melo RR, Sato HH (2018). An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. *Crit Rev Biotechnol* 38(3):321–334.
- Çelik, S. 2018. Çiğdem (*Crocus biflorus*) yumrularından proteaz enziminin saflaştırılması ve saflaştırılan enzimin kazeinin koagülasyonunda kullanılabilirliğinin araştırılması. *GIDA*, 43(2): 231-239.
- Dahmoune, F., Nayak, B., Moussi, K., Remini, H. and Madani, K. (2015) Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. leaves. *Food Chem.*, 166:585–595.
- Demir, S. (2020). *Bacillus* sp. EBTA6 ile proteaz üretiminin optimizasyonu ve enzimin endüstriyel kullanım olanaklarının araştırılması (Master's thesis, Sakarya Üniversitesi).
- Demirel, R., & Gürbüz, Y. (1999). Karma yemlerde enzim kullanımı. *VIV. Poultry Yutav*, 99, 3-6.
- Dennison, C. and Lovrein, R. (1997). Three phase partitioning: concentration and purification of proteins. *Protein Expression and Purification* 1: 149-161.
- Dey, S. and Rathod, V.K. (2013) Ultrasound assisted extraction of b-carotene from *Spirulina platensis*. *Ultrason. Sonochem.*, 20:271–276.
- Donohue Jr, T. M., & Osna, N. A. (2003). Intracellular proteolytic systems in alcohol-induced tissue injury. *Alcohol Research & Health*, 27(4), 317.
- dos Santos Aguilar, J. G., & Sato, H. H. (2018). Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. *Food Research International*, 103, 253-262.
- Duman, Y.A. and Kaya, E. (2013) Three-Phase partitioning as a rapid and easy method for the purification and recovery of catalase from sweet potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 170(5):1119– 1126.
- Duran, K., Bozacı, E., & Karahan, H. A. (2007). Protein esaslı mamüllerin enzimatik ön terbiyesi.
- Duschak, V.G., Couto, A.S. (2009). Cruzipain, the major cysteine protease of *Trypanosoma cruzi*: a sulfated glycoprotein antigen as relevant candidate for vaccine development and drug target. *Current Medicinal Chemistry*, 16(24): 3174-3202.
- Ellaiah, P., Srinivasulu, B., Adinarayana, K. 2002. A review on microbial alkaline proteases. *J Sci Ind Res* 61: 690-704.

- Ferrero, M. A., Castro, G. R., Abate, C. M., Baigori, M. D., & Sineriz, F. (1996). Thermostable alkaline proteases of *Bacillus licheniformis* MIR 29: isolation, production and characterization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45, 327-332.
- Fischer, I., Hsu, C. C., Gärtner, M., Müller, C., Overton, T. W., Thomas, O. R., & Franzreb, M. (2013). Continuous protein purification using functionalized magnetic nanoparticles in aqueous micellar two-phase systems. *Journal of Chromatography A*, 1305, 7-16.
- Gagaoua, M., Boucherba, N., Bouanane-Darenfed, A., Ziane, F., NaitRabah, S., Hafid, K. and Boudechicha, H.-R. (2014) Three-phase partitioning as an efficient method for the purification and recovery of ficin from Mediterranean fig (*Ficus carica* L.) latex. *Sep. Purif. Technol.*, 132:461– 467.
- Gao, W., Lu, J., Zhang, S., Zhang, X., Wang, Z., Qin, W. & Sang, Y. (2019). Suppressing photoinduced charge recombination via the Lorentz force in a photocatalytic system. *Advanced Science*, 6(18), 1901244.
- Garg, R. and Thorat, B.N. (2014) Nattokinase purification by three phase partitioning and impact of t-butanol on freeze drying. *Sep. Purif. Technol.*, 131:19–26
- Gautam, S., Dubey, P., Singh, P., Varadarajan, R. and Gupta, M.N. (2012) Simultaneous refolding and purification of recombinant proteins by macro- (affinity ligand) facilitated three-phase partitioning. *Anal. Biochem.*, 430 (1):56–64.
- Gessesse, A., Hatti-Kaul R., Gashe B.A., Mattiasson B. /2003). Novel Alkaline Proteases from Alkaliphilic Bacteria Grown on Chicken Feather. *Enzyme and Microbial Technology* No:519-524.
- Giemenes, N. C., Silveira, E., & Tambourgi, E. B. (2021). An overview of proteases: production, downstream processes and industrial applications. *Separation & Purification Reviews*, 50(3), 223-243.
- Golunski, S., Astolfi, V., Carniel, N., de Oliveira, D., Di Luccio, M., Mazutti, M. A., & Treichel, H. (2011). Ethanol precipitation and ultrafiltration of inulinases from *Kluyveromyces marxianus*. *Separation and Purification Technology*, 78(3), 261-265.
- Gul, A., Khan, S., Arain, H., Khan, H., Ishrat, U., & Siddiqui, M. (2022). Three-phase partitioning as an efficient one-step method for the extraction and purification of bromelain from pineapple crown waste. *Journal of Food Processing and Preservation*.
- Gupta R, Beg QK, Lorenz P (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biot.* 59: 15-32.
- Gupte, M., Kulkarni, P. (2003). A study of antifungal antibiotic production by *Thermomonospora* sp. MTCC 3340 using full factorial design. *J Chem Technol Biotechnol* 78: 605-610
- Gurumalles P, Alagu K, Ramakrishnan B, Muthusamy S (2019) A systematic reconsideration on proteases. *Int J Biol Macromol* 128:254–267.
- Gurung, N., Ray, S., Bose, S., & Rai, V. (2013). A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *BioMed research international*, 2013.
- Hammami A, Fakhfakh N, Abdelhedi O, Nasri M, Bayoudh A (2018). Proteolytic and amylolytic enzymes from a newly isolated *Bacillus mojavensis* SA: characterization and applications as laundry detergent additive and in leather processing. *Int J Biol Macromol* 108:56–68.
- Hamza, T.A. 2017. Bacterial Protease Enzyme: Safe and Good Alternative for Industrial and Commercial Use. *International Journal of Chemical and Biomolecular Science* 3 (1), 1-10.

- Hashim, M.M., Mingsheng, D., Iqbal, M.F. and Xiaohong, C. (2011) Ginger rhizome as a potential source of milk coagulating cysteine protease. *Phytochemistry*, 72(6):458–464.
- Hashmi, S., Iqbal, S., Ahmed, I., & Janjua, H. A. (2022). Production, optimization, and partial purification of alkali-thermotolerant proteases from newly isolated *Bacillus subtilis* S1 and *Bacillus amyloliquefaciens* KSM12. *Processes*, 10(6), 1050.
- Hölker, U., Lenz, J., 2005. Solid-state fermentation are there any biotechnological advantages? *Current Opinion in Microbiology* 8(3): 301–306.
- Hu, Y., Yu, D., Wang, Z., Hou, J., Tyagi, R., Liang, Y., & Hu, Y. (2019). Purification and characterization of a novel, highly potent fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* DC27 screened from Douchi, a traditional Chinese fermented soybean food. *Scientific reports*, 9(1), 9235.
- Ibrahim, A.S.S., Al-Salamah, A.A., Elbadawi, Y.B., El-Tayeb, M.A., Ibrahim, S.S.S. 2015. Production of extracellular alkaline protease by new halotolerant alkaliphilic *Bacillus* sp. NPST-AK15 isolated from hyper saline soda lakes. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18(3), 236–243.
- Işık, B. 2014. Biyosensörlere farklı bir bakış açısı enzim aktivitesi tayinlerine yönelik sistemler. Yüksek Lisans Tezi, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Tekirdağ.
- Johnson, R., Patel, H., & Lee, J. (2018). Advantages of thermophilic enzymes in industrial biotechnology. *Biochemical Engineering Journal*, 137, 1-9.
- 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 Biochemistry*, 37, 139-144.
- Kalender, N., “Biyoteknolojik Üretim İçin Rekombinant Mikroorganizma Geliştirilmesi”, Yüksek Lisans Semineri, Ankara Üniversitesi, Ankara, (1999).
- Kalwasińska, A., Jankiewicz, U., Felföldi, T., Burkowska-But, A., & Brzezinska, M. S. (2018). Alkaline and halophilic protease production by *Bacillus luteus* H11 and its potential industrial applications. *Food technology and biotechnology*, 56(4), 553.
- Kaur, N., Gat, Y., & Panghal, A. (2019). Cost-Effective Purification and Characterization of an Industrially Important Alkaline Protease from a Newly Isolated Strain of *Bacillus* sp. ICTF2. *Industrial Biotechnology*, 15(1), 20-24.
- Kazan, D., Denizci, A.A., Kerimak Öner, M.N. and Eraslan, A. (2005). Purification and characterization of a kme alkaline protease from *Bacillus clausii* GMBAE-42. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 32:335-344.
- Ketnawa, S., Benjakul, S., Martínez-Alvarez, O., & Rawdkuen, S. (2014). Three-phase partitioning and proteins hydrolysis patterns of alkaline proteases derived from *fish viscera*. *Separation and Purification Technology*, 132, 174-181.
- Ketnawa, S., Rungraeng, N. and Rawdkuen, S. (2017) Phase partitioning for enzyme separation: an overview and recent applications. *Int. Food Res. J.*, 24:1.
- Kornberg, A. (1990). [1] Why purify enzymes?. *Methods in enzymology*, 182, 1-5.
- Kotb, E., Alabdallal, A. H., Alsayed, M. A., Alghamdi, A. I., Alkhalidi, E., AbdulAzeez, S., & Borgio, J. F. (2023). Isolation, Screening, and Identification of Alkaline Protease-Producing Bacteria and Application of the Most Potent Enzyme from *Bacillus* sp. Mar64. *Fermentation*, 9(7), 637.

- Krik O, Borchert TV, Fuglsang CC (2002). Industrial enzyme applications. *Curr. Opin. Biotech.* 13: 345-435.
- Kulkarni, V. M. and Rathod, V. K. (2015). A novel method to augment extraction of mangiferin by application of microwave on three phase partitioning. *Biotechnol Reports* 6(0): 8-12.
- Kulkarni, V.M. and Rathod, V.K. (2014) Extraction of mangiferin from *Mangifera indica* leaves using three phase partitioning coupled with ultrasound. *Ind. Crops Prod.*, 52:292–297.
- Kumar, C.G., Takagi, H., “Microbial Alkaline Proteases: From a Bioindustrial Viewpoint”, *Biotechnology Advances*, 17: 561-594 (1999).
- Kumar, V.V., Sathyaselvabala, V., Premkumar, M., Vidyadevi, T. and Sivanesan, S. (2012) Biochemical characterization of three phase partitioned laccase and its application in decolorization and degradation of synthetic dyes. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 74(1):63–72.
- Lakshmi, B. K. M., Kumar, D. M., & Hemalatha, K. P. J. (2018). Purification and characterization of alkaline protease with novel properties from *Bacillus cereus* strain S8. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), 295-304.
- Lakshmi, B.K.M., Hemalatha K.P.J. (2016). Production of Alkaline Protease from *Bacillus licheniformis* through Statistical Optimization of Growth Media by Response Surface Methodology. *Ferment Technol* 5: 130.
- Laxman, R. S., Sonawane, A. P., More, S. V., Rao, B. S., Rele, M. V., Jogdand, V. V., ...
ACCEPTED MANUSCRIPT ACCEPTED MANUSCRIPT 33 Rao, M. B. (2015). Optimization and scale up of production of alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*. *Process Biochemistry*, 40, 3152–3158.
- Lee, S. Y., Khoiroh, I., Ooi, C. W., Ling, T. C., & Show, P. L. (2017). Recent advances in protein extraction using ionic liquid-based aqueous two-phase systems. *Separation & Purification Reviews*, 46(4), 291-304.
- Lemes, A. C., Gautério, G. V., Rosa, C. A. D., Brandelli, A., & Kalil, S. J. (2023). Two-Step Purification and Partial Characterization of Keratinolytic Proteases from Feather Meal Bioconversion by *Bacillus* sp. P45. *Processes*, 11(3), 803.
- Lopez-Iglesias M, Busto E, Gotor V. (2011). Use of protease from *Bacillus licheniformis* as promiscuous catalyst for organic synthesis: applications in C-C and C-N bond formation reactions. *Adv Synth Catal.*353: 2345–2353.
- Luan, Y., Xu, W. 2007. The structure and main functions of aminopeptidase N. *Curr. Med. Chem.*, 14(6): 639-647.
- Mabrouk., S.S., Hashem., A.M., EL-Shayeb, A., Ismail, M.S., Abdel-Fattah, A.F., “Optimization of Alkaline Protease Productivity by *Bacillus licheniformis* ATCC 21415”, *Bioresource Technology*, 69:155-159 (1998).
- Maity, T. K., Singh, N., Vaghela, P., Ghosh, A., Singh, S., Shinde, P. B., ... & Prasad, K. (2022). Efficient isolation of keratin from protein-rich waste biomass: a practical approach to minimize environmental impact and valorize waste biomass. *Sustainable Environment Research*, 32(1), 1-8.
- Manpreet, S., Sawraj, S., Sachin, D., Pankaj, S., & Banerjee, U. C. (2005). Influence of process parameters on the production of metabolites in solid-state fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology*, 2(1), 1-9.
- Matkawala, F., Nighojkar, S., Kumar, A., & Nighojkar, A. (2019). Enhanced production of alkaline protease by *Neocosmospora* sp. N1 using custard apple seed powder as inducer

- and its application for stain removal and dehairing. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21, 101310.
- Matkawala, F., Nighojkar, S., Kumar, A., & Nighojkar, A. (2021). Microbial alkaline serine proteases: Production, properties and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37, 1-12.
- Mistry, V. V. (2006). Chymosin in cheese making. *Food biochemistry and food processing*, 241-252.
- Mohana, S., Shah, A., Divecha, J., Madamwar, D. 2005. Xylanase Production by *Burkholderia sp.* DMAX Strain Under Solid State Fermentation Using Distillery Spent Wash. *Bioresource Technol.* 99, 7553–7564.
- Mondal, K. and Gupta, M.N. (2006) The affinity concept in bioseparation: evolving paradigms and expanding range of applications. *Biomol. Eng.*, 23(2):59–76.
- Mondal, K., Sharma, A. and Gupta, M.N. (2003) Macroaffinity Ligand-Facilitated Three-Phase Partitioning (MLFTPP) of α -amylases using a modified alginate. *Biotechnol. Prog.*, 19(2):493–494.
- Mosallatpour, S., Aminzadeh, S., Shamsara, M., & Hajihosseini, R. (2019). Novel halo-and thermo-tolerant *Cohnella sp.* A01 L-glutaminase: Heterologous expression and biochemical characterization. *Scientific Reports*, 9(1), 19062.
- Mukherjee AK, Adhikari H, Rai SK (2008). Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using Imperata cylindrica grass and potato peel as low-cost medium: characterization and application of enzyme in detergent formulation. *Biochem. Eng. J.* 39: 353-361.
- Muras, A., Romero, M., Mayer, C., & Otero, A. (2021). Biotechnological applications of *Bacillus licheniformis*. *Critical Reviews in Biotechnology*, 41(4), 609-627.
- Narayan, A., Madhusudhan, M. and Raghavarao, K. (2008) Extraction and purification of Ipomoea peroxidase employing three-phase partitioning. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 151(2–3):263–272.
- Naveed, M., Nadeem, F., Mehmood, T., Bilal, M., Anwar, Z., & Amjad, F. (2021). Protease—a versatile and ecofriendly biocatalyst with multi-industrial applications: an updated review. *Catalysis Letters*, 151, 307-323.
- Niphadkar, S. S., & Rathod, V. K. (2015). Ultrasound-assisted three-phase partitioning of polyphenol oxidase from potato peel (*Solanum tuberosum*). *Biotechnology progress*, 31(5), 1340-1347.
- Oberoi, R., Beg, Q.K., Puri, S., Saxena, R.K., and Gupta, R., “Characterization and wash performance analysis of an SDS-resistant alkaline protease from a *Bacillus sp.*”, *World J. Microbiol Biotechnol.*, 17:493-497 (2001).
- Öner, Z., Karahan, A. G., Aloğlu, H. (2006). Changes in the microbiological and chemical characteristics of an artisanal Turkish white cheese. *Food Sci. Technol.*, 39; 449-454.
- Özden, S. 2014. *Bacillus subtilis* (RSKK-11014)’den proteaz enziminin saflaştırılması, aktivitesinin tayini ve karakterizasyonu. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- Özer, B., Akardere, E., Çelem, E.B. and Önal, S. (2010) Three-phase partitioning as a rapid and efficient method for purification of invertase from tomato. *Biochem. Eng. J.*, 50(3):110–115.
- Pakhale, S. V., & Bhagwat, S. S. (2016). Purification of serratiopeptidase from *Serratia marcescens* NRRL B 23112 using ultrasound assisted three phase partitioning. *Ultrasonics sonochemistry*, 31, 532-538.

- Pandit, B. (2023). Application Of Microbial Enzymes In Food Industry: A Review. Science And Culture.
- Pereira, M. M., Pedro, S. N., Quental, M. V., Mohamadou, A., Coutinho, J. A., & Freire, M. G. (2022). Integrated approach to extract and purify proteins from honey by ionic liquid-based three-phase partitioning. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 10(29), 9275-9281.
- Pessôa Filho, P. A., Hirata, G. M., Watanabe, É. O., & Miranda, É. A. (2011). Precipitation and Crystallization.
- Polaina, J., MacCabe, A.P. (2007). *Industrial Enzymes Structure, Function and Applications*. Springer, 161-243, Spain.
- Poppe L, Novak L. Selective biocatalysis: a synthetic approach. New York: Weinheim; 1992.
- Prakasham RS, Subba RC, Rao S, Sarma PN (2007). Enhancement of acid amylase production by an isolated *Aspergillus awamori*. *J. Appl. Microbiol.* 102: 204-211.
- Puri, S., Beg, Q. K., & Gupta, R. (2002). Optimization of alkaline protease production from *Bacillus sp.* by response surface methodology. *Current microbiology*, 44, 286-290.
- Putatunda, C., Kundu, B. S., & Bhatia, R. (2019). Purification and characterization of alkaline protease from *Bacillus sp.* HD292. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 89, 957-965.
- Puvanakrishnan, R., Sivasubramanian, S., Hemalatha, T. (2015). *Microbes and enzymes: basics and applied*. MJP Publishers, Chennai, India, 558 pp.
- Queiroga, A.C., Pintado, M.E., Malcata, F.X. (2012). Use of response surface methodology to optimize protease synthesis by a novel strain of *Bacillus sp.* isolated from Portuguese sheep wool. *Journal of Applied Microbiology*. 113(1):36-43
- Raghava, S. and Gupta, M.N. (2009) Tuning permeabilization of microbial cells by three-phase partitioning. *Anal. Biochem.*, 385:20–25.
- Raghava, S., Barua, B., Singh, P.K., Das, M., Madan, L., Bhattacharyya, S., Bajaj, K., Gopal, B., Varadarajan, R. and Gupta, M.N. (2008) Refolding and simultaneous purification by three-phase partitioning of recombinant proteins from inclusion bodies. *Protein Sci.*, 17(11):1987–1997.
- Rahath Kubra, I., Kumar, D. and Rao, L.J.M. (2013) Effect of microwaveassisted extraction on the release of polyphenols from ginger (*Zingiber officinale*). *Int. J. Food Sci. Technol.*, 48(9):1828–1833.
- Rahman, R., Geok, L., Basri, M. and Salleh, A. (2006). An organic solvent-stable alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa* strain K: Enzyme purification and characterization. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 1484-1491
- Rajeeva, S. and Lele, S. S. (2011). Three-phase partitioning for concentration and purification of laccase produced by submerged cultures of *Ganoderma sp.* WR-1. *Biochemical Engineering Journal* 54: 103-110.
- Ramesh, A., Harani Devi, P., Chattopadhyay, S., & Kavitha, M. (2020). Commercial applications of microbial enzymes. *Microbial enzymes: roles and applications in industries*, 137-184.
- Rao, C. S., Sathish, T., Ravichandra, P., & Prakasham, R. S. (2009). Characterization of thermo- and detergent stable serine protease from isolated *Bacillus circulans* and evaluation of eco-friendly applications. *Process Biochemistry*, 44(3), 262-268.

- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., and Deshpande, V. V., "Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3): 597-635 (1998).
- Rao, S., Sathish, T., Ravichandra, P. and Prakasham, R. (2009). Characterization of thermo- and detergent stable serine protease from isolated *Bacillus circulans* and evaluation of eco-friendly applications. *Process Biochemistry*, 44, 262–268.
- Rawdkuen, S., Vannabun, A. and Benjakul, S. (2012). Recovery of proteases from the viscera of farmed giant catfish (*Pangasianodon gigas*) by three-phase partitioning. *Process Biochemistry* 47: 2566-2569.
- Rekik, H., Jaouadi, N. Z., Gargouri, F., Bejar, W., Frikha, F., Jmal, N., ... & Jaouadi, B. (2019). Production, purification and biochemical characterization of a novel detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus safensis* strain RH12. *International journal of biological macromolecules*, 121, 1227-1239.
- Robinson, P. K. (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in biochemistry*, 59, 1.
- Rockel, B., Kopec, K.O., Lupas, A.N., Baumeister, W. 2012. Structure and function of tripeptidyl peptidase II, a giant cytosolic protease. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1824(1): 237- 245.
- Rosovitz, M.J., Voskuil, M.I., Chambliss, G. H., "Bacillus, Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Systematic Bacteriology", 9nd Edition, by edited Collier L., Balows, A. and Susman, M., Oxford University Pres, New York, 2:709-730 (1998).
- Roy, I., Sharma, A. and Gupta, M. N. 2005. Recovery of biological activity in reversibly inactivated proteins by three phase partitioning. *Enzyme and Microbial Technology* 37: 113-120.
- Ruffell, B., Affara, N.I., Cottone, L., Junankar, S., Johansson, M., DeNardo, D.G., Korets, L., Reinheckel, T., Sloane, B.F., Bogyo, M., Coussens, L.M. (2013). Cathepsin C is a tissue-specific regulator of squamous carcinogenesis. *Genes Dev.*, 27(19): 2086- 2098.
- Salvi, H. M., & Yadav, G. D. (2020). Extraction of epoxide hydrolase from Glycine max using microwave-assisted three phase partitioning with dimethyl carbonate as green solvent. *Food and Bioproducts Processing*, 124, 159-167.
- Sardar, M., Sharma, A. and Gupta, M.N. (2007) Refolding of a denatured α -chymotrypsin and its smart bioconjugate by three-phase partitioning. *Biocatal. Biotransform.*, 25(1):92–97.
- Sarkar, G., & Suthindhiran, K. (2020). Extraction and characterization of alkaline protease from *Streptomyces* sp. GS-1 and its application as dehairing agent. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 25, 101590.
- Satpute, S. K., Banpurkar, A. G., Dhakephalkar, P. K., Banat, I. M., & Chopade, B. A. (2010). Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Critical reviews in biotechnology*, 30(2), 127-144.
- Saxena, L., Iyer, B. K. and Ananthanarayan, L. (2010). Purification of a bifunctional amylase/protease inhibitor from ragi (*Eleusine coracana*) by chromatography and its use as an affinity ligand. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 878: 1549-1554.
- Schallmeyer, M., Singh, A., Ward, O.P. (2004). Developments in the Use of *Bacillus* Species for Industrial Production. *Can J Microbiol.* 50: 1-17.

- Setyorini, E., Kim, Y-J., Takenaka, S., Murakami, S., Aoki, K., (2006). "Purification and characterization of a halotolerant intracellular protease from *Bacillus subtilis* strain FP-133", J.Basic Microbiol., 46(4): 294-304.
- Sevinç, N. (2010). Türkiye Topraklarından İzole Edilen *Bacillus* sp. Suşlarından Proteaz Üretimi, Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu (Doctoral dissertation, Bursa Uludağ University (Turkey)).
- Shah, K., Mody, K., Keshri, J. and Jha, B. (2010). Purification and characterization of a solvent, detergent and oxidizing agent tolerant protease from *Bacillus cereus* isolated from the Gulf of Khambhat. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 67, 85-91.
- Shankar, S., Rao, M., Laxman, R.S. (2011). Purification and characterization of an alkaline protease by a new strain of *Beauveria* sp. Proc Biochem 46: 579-585.
- Sharma, A. and Gupta, M.N. (2002) Macroaffinity ligand-facilitated three phase partitioning (MLFTPP) for purification of xylanase. Biotechnol. Bioeng., 80(2):228–232.
- Sharma, A., Mondal, K. and Gupta, M.N. (2003) Separation of enzymes by sequential macroaffinity ligand-facilitated three-phase partitioning. J. Chromatogr. A, 995(1):127–134.
- Sharma, A., Roy, I. and Gupta, M.N. (2004) Affinity precipitation and macroaffinity ligand facilitated three-phase partitioning for refolding and simultaneous purification of urea-denatured pectinase. Biotechnol. Prog., 20(4):1255–1258.
- Sharma, A. K., Kikani, B. A., & Singh, S. P. (2020). Biochemical, thermodynamic and structural characteristics of a biotechnologically compatible alkaline protease from a haloalkaliphilic, *Nocardiopsis dassonvillei* OK-18. International Journal of Biological Macromolecules, 153, 680-696.
- Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U.C., Production, purification, characterization and applications of lipases, Biotechnology Advances, 19:627-662, (2001).
- da Silva, R. R., Souto, T. B., Gonsales da Rosa, N., de Oliveira, L. C. G., Juliano, M. A., Juliano, L., ... & Cabral, H. (2020). Evaluation of the milk clotting properties of an aspartic peptidase secreted by *Rhizopus microsporus*. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 50(3), 226-233.
- Singh N. A. Solid state and Sub. Fermentation. Assistant Professor. Department of Microbiology. MLSU, Udaipur. Fermentation. https://www.mlsu.ac.in/econtents/685_SSF%20&%20SM-Dr.%20Namita.pptx
- Singh S, Bajaj BK (2017) Potential application spectrum of microbial proteases for clean and green industrial production. Energy Ecol Environ 2(6):370–386.
- Singh, A.; Bajar, S.; Devi, A.; Bishnoi, N. Adding value to agro-industrial waste for cellulase and xylanase production via solid-state bioconversion. Biomass Convers. Biorefin. 2021, 1, 1–10.
- Singh, J., Batra, N., Sobti, R.C., "Serine Alkaline Protease From a Newly Isolated *Bacillus* sp. SSR1", Process Biochemistry, 36: 781-785 (2000).
- Singh, R. K., Gourinath, S., Sharma, S., Roy, I., Gupta, M. N. and Betze, C. (2001). Enhancement of enzyme activity through three-phase partitioning: crystal structure of a modified serine proteinase at 1.5 Å resolution. Protein Engineering 14: 307-313.
- Singh, R., Mittal, A., Kumar, M., Mehta, P.K. (2016). Microbial proteases in commercial applications. J Pharm Chem Biol Sci 4: 365-374.

- Singhania, R.; Sukumaran, R.; Patel, A.; Larroche, C.; Pandey, A. (2010). Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme Microb. Technol.* 46, 541–549.
- Soares, P. A., Vaz, A. F., Correia, M. T., Pessoa Jr, A., & Carneiro-da-Cunha, M. G. (2012). Purification of bromelain from pineapple wastes by ethanol precipitation. *Separation and purification technology*, 98, 389-395.
- Soccol, C.; Costa, E.; Letti, L.; Karp, S.; Woiciechowski, A. (2017). Vandenberghe, L. Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnol. Res. Innov.* 1, 52–71.
- Subba Rao C, Sathish T, Brahmaiah P, Kumar TP, Prakasham RS (2009). Development of a mathematical model for *Bacillus circulans* growth and alkaline protease production kinetics. *J. Chem. Technol. Biot.* 84: 302-307.
- Subba Rao C, Sathish T, Mahalaxmi M, Suvana Laxmi G, Sreenivas Rao R, Prakasham RS (2008). Modeling 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.
- Sümengen, M., Dinçer, S., & Ünal, M. Ü. (2016). *Bacillus subtilis* Kullanılarak Atık Ekmeklerden Alkali Proteaz Ve Biyosüpfektan Üretimi.
- Şen, A., Eryılmaz, M., Bayraktar, H. and Önal, S. (2011) Purification of α -galactosidase from pepino (*Solanum muricatum*) by three-phase partitioning. *Sep. Purif. Technol.*, 83:130–136.
- Takami, H., Akiba, T., & Horikoshi, K. (1989). Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. no. AH-101. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 30, 120-124.
- Thapa, S., Li, H., OHair, J., Bhatti, S., Chen, F. C., Nasr, K. A., ... & Zhou, S. (2019). Biochemical characteristics of microbial enzymes and their significance from industrial perspectives. *Molecular biotechnology*, 61, 579-601.
- Tufvesson, P., Lima-Ramos, J., Nordblad, M. 2011. Guidelines and cost analysis for catalyst production in biocatalytic processes. *Org. Process Res. Dev.*, 15: 266-274.
- Ullah, N., Rehman, M. U., Sarwar, A., Nadeem, M., Nelofer, R., Shakir, H. A., ... & Alqahtani, F. (2022). Purification, characterization, and application of alkaline protease enzyme from a locally isolated *Bacillus cereus* strain. *Fermentation*, 8(11), 628.
- Verma A, Singh H, Anwar S et al (2017) Microbial keratinases: industrial enzymes with waste management potential. *Crit Rev Biotechnol* 37(4):476–491.
- Vidhate, G. S. and Singhal, R. S. 2013. Extraction of cocoa butter alternative from kokum (*Garcinia indica*) kernel by three phase partitioning. *Journal of Food Engineering* 117: 464-466.
- Walia, A., Guleria, S., Mehta, P., Chauhan, A., & Parkash, J. (2017). Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review. *3 Biotech*, 7, 1-12.
- Walsh, G. (2014). *Proteins: biochemistry and biotechnology*. John Wiley & Sons.
- Wang C, Guan Z, He Y. Biocatalytic domino reaction: synthesis of 2H-1-benzopyran-2-one derivatives using alkaline protease from *Bacillus licheniformis*. *Green Chem.* (2011);13:2048–2054.
- Wang Q, Cen Z, Zhao J (2015) The survival mechanisms of thermophiles at high temperatures: an angle of omics. *Physiology* 30:97–106.

- Wang, Y., Sun, J., Deng, Y., Tu, Y., Niu, H., Cai, W., & Han, X. (2022). Whey protein influences the production and activity of extracellular protease from *Pseudomonas fluorescens* W3. *LWT*, 154, 112865.
- Ward, O. P., Rao, M. B., & Kulkarni, A. (2009). Proteases, production.
- Ward, O. P. (2011). Proteases. *Comprehensive biotechnology*, 571.
- Wati, R.K., Theppakorn, T., Benjakul, S. and Rawdkuen, S. (2009) Threephase partitioning of trypsin inhibitor from legume seeds. *Process. Biochem.*, 44(12):1307–1314.
- Wiseman, A., Chapter 3 The Application of Enzymes in Industry, *Handbook of Enzymes Biotechnology*, (Editör: Horwood, E.), 274-373, Chichester-UK, 1987.
- Yan, J. K., Wang, Y. Y., Qiu, W. Y., Ma, H., Wang, Z. B., & Wu, J. Y. (2018). Three-phase partitioning as an elegant and versatile platform applied to nonchromatographic bioseparation processes. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58(14), 2416-2431.
- Yanar, Y., (2015). Seafood enzymes and their application in the seafood industry. *Ege J. Fish Aqua Sci.*, 32(2): 105-113.
- Yu, P., Huang, X., Ren, Q., & Wang, X. (2019). Purification and characterization of a H₂O₂-tolerant alkaline protease from *Bacillus* sp. ZJ1502, a newly isolated strain from fermented bean curd. *Food chemistry*, 274, 510-517.
- Yu, X. C.; Ma, S. L.; Xu, Y.; Fu, C. H.; Jiang, C. Y.; Zhou, C. Y. Construction and Application of a Novel Genetically Engineered *Aspergillus Oryzae* Expressing Proteases. *Electron.J. Biotechnol.*(2017),29,32–38.
- Zayed, A., & Ulber, R. (2020). Fucoidans: Downstream processes and recent applications. *Marine drugs*, 18(3), 170.
- Zeren B. (2020). Yeni İzolat *Bacillus subtilis* e6-5 Suşundan Proteaz: Üretim Koşullarının Optimizasyonu, Kısmi Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Deri Endüstrisindeki Potansiyel Uygulamaları, Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
- Zhang, J. (2012). Protein-Protein Interactions in Salt Solutions; INTECH Open Access Publisher: Croatia, Europe.
- Zheng, L., Yu, X., Wei, C., Qiu, L., Yu, C., Xing, Q., ... & Deng, Z. (2020). Production and characterization of a novel alkaline protease from a newly isolated *Neurospora crassa* through solid-state fermentation. *Lwt*, 122, 108990.
- Zhu, Z., Zhang, G., Luo, Y., Ran, W., Shen, Q. (2012). Production of Lipopeptides by *Bacillus amyloliquefaciens* XZ-173 in Solid State Fermentation Using Soybean Flour and Rice Straw as the Substrate. *Bioresource Technology*. 112, 254–260.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı: Göksen GÖREN

Doğum tarihi:

Doğum Yeri:

Uyruğu:

Adres:

Tel:

E-mail:

Eğitim

Lise:

Lisans:

Yüksek lisans:

Yabancı Dil Bilgisi:

İngilizce:
