



***Bacillus licheniformis* OSBS6'DAN AMİLAZ VE
PROTEAZ ENZİMLERİNİN ÜÇLÜ FAZ AYIRMA
SİSTEMİ (TPP) İLE SAFLAŞTIRILMASI
VE KARAKTERİZASYONU**

Damla RÜZGAR

Yüksek Lisans Tezi

Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Bilim Dalı

2019

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Bacillus licheniformis* OSBS6'DAN AMİLAZ VE PROTEAZ
ENZİMİNİN ÜÇLÜ FAZ AYIRMA SİSTEMİ (TPP) İLE
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Damla RÜZGAR

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
Biyoteknoloji Bilim Dalı

ERZURUM
2019

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

***Bacillus licheniformis* OSBS6'DAN PROTEAZ VE AMİLAZ ENZİMİNİN ÜÇLÜ
FAZ AYIRMA SİSTEMİ (TPP) İLE SAFLAŞTIRILMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU danışmanlığında, Damla RÜZGAR tarafından hazırlanan bu çalışma, 18.01.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı – Biyoteknoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak ~~oybirliği~~ / ~~oy çokluğu~~ (...) ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Mesut TAŞKIN

İmza:

Üye: Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ

İmza:

Üye: Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

İmza:

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 24.01.2019 tarih ve 09 / 26 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet KARAKAN
Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: PRJ2015/103

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

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

***Bacillus licheniformis* OSBS6'DAN AMİLAZ VE PROTEAZ ENZİMLERİNİN ÜÇLÜ FAZ AYIRMA SİSTEMİ (TPP) İLE SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Damla RÜZGAR

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Biyoteknoloji Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

Bu tez çalışması kapsamında; Türkiye'nin farklı jeotermal alanlarından sıcak su alınarak izole edilen 26 izolatin amilaz ve proteaz üretme potansiyelleri petri denemeleri ile araştırıldı. Sonuçta en geniş zon çapı veren OSBS6 izolatu seçilerek 16S rRNA sekans analizi sonucu %99 *Bacillus licheniformis*'e benzerlik gösterdiği tespit edildi. *B. licheniformis* OSBS6'dan amilaz ve proteaz enzimleri üçlü faz ayırma (TPP) sistemi ile kısmi olarak saflaştırıldıktan sonra biyokimyasal karakterizasyonları yapıldı. TPP sistemi ile amilaz enzimi pH 7,0, 1,0:1,5 (Ham enzim çözeltisi: t-bütanol oranı) ve %30 doygun amonyum sülfat kullanılarak %32,84 verimle 7,23 kat; proteaz enzimi ise pH 6,0, 1,0:1,5 (Ham enzim çözeltisi: t-bütanol oranı) ve %70 doygun amonyum sülfat kullanılarak %87,65 verimle 13,33 kat saflaştırıldı. SDS-PAGE jel elektroforez yöntemiyle amilaz ve proteaz enzimlerinin molekül ağırlıkları sırasıyla ~56,65 ve ~35,87 kDa olarak hesaplandı. *B. licheniformis* OSBS6'dan saflaştırılan amilaz ve proteaz enzimlerinin optimum pH'ları ise sırasıyla 9,0 ve 10,0; optimum sıcaklıkları ise sırasıyla 70°C ve 60°C olarak belirlendi. 10 mM'lık K⁺ metal iyonu %8 oranında amilaz enzimini artırırken 10 mM'lık Mn²⁺ metal iyonu ise %92 oranında proteaz enzim aktivitesini arttırdığı tespit edildi. 10 mM'lık Co²⁺ metal iyonu amilaz enzimini tamamen inhibe ederken proteaz enziminin ise aktivitesini düşürdüğü belirlendi. Amilaz ve proteaz enzimlerinin metaloenzim inhibitörü olan EDTA ile tamamen inhibe olduğu tespit edildi. Amilaz enzim aktivitesinin %20'lik gliserol varlığında %5 oranında artırdığı, proteaz enzim aktivitesinin %15'lik etanol varlığında %94 oranında korunduğu gözlemlendi. Amilaz ve proteaz enzimlerinin aktivitelerini %1'lik H₂O₂ varlığında sırasıyla %94 ve %97 oranında koruduğu belirlendi. Amilaz ve proteaz enzimlerinin sırasıyla patates nişastası ve kazeine substratlarına karşı yüksek spesifiklik gösterdiği belirlendi. *B. licheniformis* OSBS6'dan saflaştırılan amilaz ve proteaz enzimlerinin sırasıyla patates nişastası ve kazein substratları için Km ve Vmax değerleri sırasıyla 5,18 mg/mL; 5,76 mg/mL ve 0,0604 µmol.mL⁻¹.dk⁻¹; 27,10 µmol.mL⁻¹.dk⁻¹ olarak hesaplandı.

2019, 118 sayfa

Anahtar Kelimeler: Amilaz, Proteaz, Termofilik bakteri, *Bacillus licheniformis*, üçlü faz ayırma sistemi (TPP)

ABSTRACT

Master Thesis

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF AMYLASE AND PROTEASE ENZYMES FROM *Bacillus licheniformis* OSBS6 BY THREE- PHASE PARTITIONING SYSTEM

Damla RÜZGAR

Ataturk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics
Department of Biotechnology

Supervisor: Assoc. Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

In this thesis; The amylase and protease producing potentials of 26 isolates isolated from different geothermal fields of Turkey were investigated by petri dishes. As a result, 16S rRNA sequence analysis was found to be similar to 99% *Bacillus licheniformis* by selecting OSBS6 isolate which gives the widest zone diameter. Biochemical characterization of amylase and protease enzymes from *B. licheniformis* OSBS6 was performed after partial purification by three phase partitioning (TPP) method. With the TPP system, the amylase enzyme was purified by 7.23 fold with 32.84% yield using pH 7.0, 1.0: 1.5 (Crude enzyme solution: t-butanol ratio) and 30% saturated ammonium sulfate, while the protease enzyme was purified by 13,33 fold with %87,65 yield using pH 6,0, 1,0:1,5 (Crude enzyme solution: t-butanol ratio) and 70% saturated ammonium sulfate. The molecular weights of amylase and protease enzymes were calculated as ~ 56,65 and ~ 35,87 kDa by SDS-PAGE gel electrophoresis, respectively. The optimum pH of amylase and protease enzymes purified from *B. licheniformis* OSBS6 were found to be 9.0 and 10.0, respectively; optimum temperatures were determined as 70 ° C and 60 ° C, respectively. 10 mM K⁺ metal ions increased the activity of amylase enzyme by 8% and 10 mM Mn²⁺ metal ion was found to increase the protease enzyme activity by 92%. The 10 mM Co²⁺ metal ion completely inhibited the amylase enzyme, while it decreased protease enzyme activity. Amylase and protease enzymes were found to be completely inhibited by EDTA, a metalloenzyme inhibitor. It was observed that amylase enzyme activity increased by 5% in the presence of 20% glycerol and the protease enzyme activity was protected by 94% in the presence of 15% ethanol. It was determined that amylase and protease enzymes maintained their activity in 94% and 97% respectively in the presence of 1% H₂O₂. Amylase and protease enzymes were found to show high specificity against potato starch and casein substrates, respectively. The K_m and V_{max} values for the potato starch and casein substrates of amylase and protease enzymes, purified from *B. licheniformis* OSBS6, were calculated as 5,18 mg/mL; 5,76 mg/mL and 0,0604 µmol mL⁻¹.min⁻¹; 27,10 µmol.mL⁻¹.min⁻¹, respectively.

2019, 118 pages

Keywords: Amylase, Protease, *Bacillus licheniformis*, Three phase partitioning system, Thermophilic bacteria

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam aşamasında laboratuvar imkanlarından faydalanmama olanak tanıyan ve tezin mikrobiyolojik aşamalarında bilgi ve tecrübesine başvurduğum Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL’e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca fikirleriyle beni aydınlatan bilgi ve tecrübesini paylaştan bu tezi yazmamda ilgisi, hassasiyeti, yardımlarından dolayı Hocam Sayın Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU’na,

Tez çalışmam boyunca laboratuvarında her yardıma koşan Sayın Arş. Gör. Sümeyye AKBULUT’a, her sıkıştığımda koştuğum çok büyük yardımlarını gördüğüm Sayın Yeliz DEMİR’e ve tezimin deney aşamasında ve yazımında yardımları esirgemeyen Sayın Esra ALÇİÇEK’e,

Yine laboratuvarında yardım ve bilgilerini esirgemeyen Sayın Arş. Gör. Mustafa Özkan BALTACI’ya,

Her zaman varlıklarıyla içimi aydınlatan can dostlarıma,

Ve son olarak maddi manevi desteklerini esirgemeyen her zaman varlıklarıyla güç veren babam Ahmet RÜZGAR’a annem Mecbure RÜZGAR’a kardeşlerim Fırat RÜZGAR ve Mert RÜZGAR’a teşekkürlerimi borç bilirim.

Damla RÜZGAR

Ocak, 2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Enzimler	1
1.2. Enzimlerin Sınıflandırılması	3
1.3. Mikrobiyal Enzimler	5
1.4. Multienzimler	5
1.5. Termofilik Enzimler	6
1.6. <i>Bacillus</i> Suşları.....	6
1.7. Amilaz	7
1.8. Nişasta	9
1.9. Amilazın Biyoteknolojik Uygulamaları	10
1.9.1. Nişastanın endüstrisi.....	10
1.9.2. Yiyecek endüstrisi	10
1.9.3. Deterjan endüstrisi.....	11
1.9.4. Tekstil endüstrisi	11
1.9.5. Kağıt endüstrisi.....	12
1.9.6. Yakıt olarak alkol üretimi.....	12
1.10. Proteazlar.....	13
1.11. Proteazın Biyoteknolojik Uygulamaları	14
1.11.1. Deri işleme endüstrisi	14
1.11.2. Atık işleme endüstrisi.....	15
1.11.3. Yiyecek endüstrisi	15
1.11.4. Gümüş kazanımı.....	15
1.11.5. Deterjan endüstrisi.....	16
1.11.6. Kimyasal endüstrisi	16

1.11.7. Medikal araştırmalar.....	16
1.12. Üçlü Faz Ayırma Sistemi (TPP).....	17
1.13. TPP Ayırma Mekanizması	17
1.14. Tpp Prosesini Etkileyen Faktörler	18
1.14.1. Amonyum sülfat	18
1.14.2. t-bütanol.....	19
1.14.3. pH	19
1.14.4. Sıcaklık.....	19
2. KAYNAK ÖZETLERİ	21
2.1. Tezin Amacı	25
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	26
3.1. Materyal.....	26
3.1.1. Tezde kullanılan kimyasallar ve kitler	26
3.1.2. Tez çalışmasında yararlanılan materyal ve cihazlar.....	28
3.1.3. Tez çalışmasında kullanılan çözeltilerin hazırlanışı.....	29
3.1.3.a. Bakteri izolatının moleküler analizi için kullanılan çözelti ve tamponlar.....	29
3.1.3.b. Bakteri izolatının morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesinde kullanılan çözelti ve tamponlar.....	30
3.1.3.c. Enzim tayini için kullanılan çözelti ve tamponlar	30
3.1.3.d. Protein analizi için kullanılan çözelti ve tamponlar	31
3.1.3.e. SDS-P AGE için kullanılan çözelti ve tamponlar	31
3.1.3.f. Gümüş boyama için kullanılan çözelti ve tamponlar.....	32
3.1.4. Tezde kullanılan besiyerlerinin hazırlanışı.....	33
3.2. Yöntem	34
3.2.1. Bakteri seçimi.....	34
3.2.2. Konvensiyonel özelliklerinin belirlenmesi.....	34
3.2.2.a. Morfolojik özelliklerinin belirlenmesi.....	34
3.2.2.b. %3'lük KOH çözeltisi ile gram özelliklerinin belirlenmesi	34
3.2.2.c. Katalaz testi	35
3.2.2.d. Oksidaz testi	35
3.2.3. Moleküler analiz.....	35
3.2.4. Amilaz ve proteaz enziminin üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu.....	42

3.2.4.a. Amilaz ve proteaz enzimi üretimi	42
3.2.4.b. Amilaz enziminin aktivite tayini	43
3.2.4.c. Proteaz enziminin aktivite tayini	43
3.2.4.d. Protein tayini	44
3.2.4.e. Amilaz ve proteaz enziminin üçlü faz ayırma (TPP) sistemi ile saflaştırılması	44
3.2.4.f. Enzimlerin molekül kütesinin belirlenmesi için Sodyum dodesil sülfat- poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)	46
3.2.4.g. Gümüş boyama ile örneklerin boyanması	47
3.2.4.h. Proteaz enziminin Zimogram Analizi	48
3.2.5. Amilaz enziminin karakterizasyon çalışmaları	48
3.2.5.a. Amilaz enzimi için optimum pH ve pH kararlılığının incelenmesi.....	48
3.2.5.b. Amilaz enzimi için optimum sıcaklık ve stabil sıcaklığının incelenmesi	49
3.2.5.c. Amilaz enzim aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisinin incelenmesi.....	49
3.2.5.d. Amilaz enzim aktivitesi üzerine bazı organik çözücülerin etkisinin incelenmesi.....	49
3.2.5.e. Amilaz enzim aktivitesi üzerine bazı inhibitörlerin etkisinin incelenmesi....	50
3.2.5.f. Amilaz enzim aktivitesi üzerine yüzey aktif maddelerinin ve okside edici ajanın etkisinin incelenmesi	50
3.2.5.g. Amilaz enziminin substrat olan özgülüğünün incelenmesi	51
3.2.5.h. Amilaz enziminin K_m ve V_{max} değerlerinin hesaplanması	51
3.2.6. Proteaz enziminin karakterizasyon çalışmaları	51
3.2.6.a. Proteaz enzimi için optimum pH ve pH kararlılığının incelenmesi	51
3.2.6.b. Proteaz enzimi için optimum sıcaklık ve stabil sıcaklığının incelenmesi	52
3.2.6.c. Proteaz enzim aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisinin incelenmesi.....	52
3.2.6.d. Proteaz enzim aktivitesi üzerine bazı organik çözücülerin etkisinin incelenmesi.....	53
3.2.6.e. Proteaz aktivitesi üzerine bazı inhibitörlerin etkisinin incelenmesi	53
3.2.6.f. Proteaz enzim aktivitesi üzerine yüzey aktif maddelerinin ve okside edici ajanın etkisinin incelenmesi	53

3.2.6.g. Proteaz enziminin doğal substratlara olan özgünlüğünün incelenmesi.....	54
3.2.6.h. Proteaz enziminin K_m ve V_{max} değerlerinin hesaplanması	54
3.2.6.i. Proteaz enzimi üzerine ticari deterjanların etkilerinin incelenmesi	54
3.2.7. İstatiksel Sonuçlar	55
4. ARAŞTIRMA BULGULAR.....	56
4.1. Petride Amilaz ve Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi	56
4.2. Konvensiyonel Test Sonuçları.....	57
4.3. 16S rRNA Sekans Analiz Sonuçları.....	57
4.4. Amilaz ve Proteaz Enzimlerinin Üretimi	57
4.5. Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik	58
4.6. Amilaz Aktivitesi Hesaplamasında Kullanılan Glukoz Standart Grafiği.....	58
4.7. Proteaz Aktivitesinin Hesaplanması İçin Tirozin Standart Grafiği.....	59
4.8. Üçlü Faz Ayırma (TPP) Sistemi ile Amilaz ve Proteaz Enziminin Saflaştırılması.....	60
4.8.1. Amilaz Enziminin TPP Sistemiyle Amonyum Sülfat ve Organik Çözgen Oranının İncelenmesi	60
4.7.2. Amilaz Enziminin Saflaştırılmasında TPP Sistemine pH'nın Etkisi İncelenmesi	64
4.7.3. Amilaz Enziminin Üçlü Faz Yöntemiyle Saflaştırma Sonuçları.....	64
4.7.4. SDS-PAGE İle Amilaz Enziminin Saflık Kontrolü ve Molekül Kütlesinin Tayini	65
4.7.5. Amilaz Enzimi İçin Optimum pH ve Stabil pH İncelenmesine Yönelik Sonuçlar.....	66
4.7.6. Amilaz Enzimi İçin Optimum ve Stabil Sıcaklıkların İncelenmesine Yönelik Sonuçlar.....	68
4.7.7 Bazı Metal İyonlarının Amilaz Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesine Yönelik Sonuçlar.....	70
4.7.8. Bazı İnhibitörlerin Amilaz Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesine Yönelik Sonuçlar.....	72
4.7.9. Bazı Organik Çözücülerin Amilaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisini İncelenmesine Yönelik Sonuçlar.....	73

4.7.10. Amilaz Enziminin Aktivitesi Üzerine Yüzey Aktif Maddelerinin ve Okside Edici Ajanının Etkisinin İncelenmesine Yönelik Sonuçlar	74
4.7.11 B.licheniformis OSBS6'dan Saflaştırılan Amilaz Enzimin Doğal Substratlara Olan Özgünlüğünün İncelenmesine Yönelik Sonuçlar	75
4.7.12. K_m ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar.....	75
4.7.13. Proteaz Enziminin TPP Sistemiyle Amonyum Sülfat ve Organik Çözgen Oranının İncelenmesi	76
4.7.14. Proteaz Enziminin Saflaştırılmasında TPP Sistemine pH'nın Etkisi	80
4.7.15. Proteazın Üçlü Faz Yöntemiyle Saflaştırma Sonuçları	81
4.7.16. SDS-PAGE İle Proteaz Enziminin Saflık Kontrolü, Molekül Kütlesinin Tayini ve Zimogram Analizi	81
4.7.17. Proteaz Enzimi İçin Optimum ve Stabil pH İncelenmesine Yönelik Sonuçlar.....	83
4.7.18 Proteaz Enzimi Üzerine Optimum ve Stabil Sıcaklığının Etkisinin Sonuçları	84
4.7.19. Proteaz Enzimi Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisinin İncelemesine Yönelik Sonuçlar.....	86
4.7.20. Proteaz Enzimi Aktivitesi Üzerine Bazı İnhibitörlerin Etkisinin İncelenmesine Yönelik Sonuçlar.....	88
4.7.21. Bazı Organik Çözücülerin Proteaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisine Yönelik Sonuçlar.....	90
4.7.22. Proteaz Enziminin Aktivitesi Üzerine Yüzey Aktif Maddelerinin ve Okside Edici Ajanının Etkisinin İncelenmesine Yönelik Sonuçlar	94
4.7.23. B.licheniformis OSBS6'dan Saflaştırılan Proteaz Enziminin Doğal Substratlara Olan Özgüllüğünün İncelenmesi Yönelik Sonuçlar.....	95
4.7.24. K_m ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar.....	96
4.7.25. B.licheniformis OSBS6'dan Saflaştırılan Proteaz Enzimin Aktivitesi Üzerine Ticari Deterjanların Etkisinin İncelemesine Yönelik Sonuçlar	96
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	98
KAYNAKÇA.....	112
ÖZGEÇMİŞ	119

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. Amilaz ve proteaz enzimlerinin aktivite zaman ilişkisi.....	58
Şekil 4.2. Protein tayininde kullanılan standart grafik.....	58
Şekil 4.3. Amilaz aktivitesi için kullanılan standart glukoz grafiği.....	59
Şekil 4.4. Proteaz aktivitesi için kullanılan standart tirozin grafiği.....	59
Şekil 4.5. Amilaz enziminin saflaştırılmasında, %20 amonyum sülfat doygunluğu ve farklı homojenat: t-bütanol oranının (1,0:0,5; 1,0:1,0; 1,0:1,5; 1,0:2,0) saflaştırma katsayısına ve verime etkisi.....	60
Şekil 4.6. Amilaz enziminin saflaştırılmasında, %30 amonyum sülfat doygunluğu ve farklı homojenat: t-bütanol oranının (1,0:0,5; 1,0:1,0; 1,0:1,5; 1,0:2,0) saflaştırma katsayısına ve verime etkisi.....	61
Şekil 4.7. Amilaz enziminin saflaştırılmasında, %40 amonyum sülfat doygunluğu ve farklı homojenat: t-bütanol oranının (1,0:0,5; 1,0:1,0; 1,0:1,5; 1,0:2,0) saflaştırma katsayısına ve verime etkisi.....	61
Şekil 4.8. Amilaz enziminin saflaştırılmasında, %50 amonyum sülfat doygunluğu ve farklı homojenat: t-bütanol oranının (1,0:0,5; 1,0:1,0; 1,0:1,5; 1,0:2,0) saflaştırma katsayısına ve verime etkisi.....	62
Şekil 4.9. Amilaz enziminin saflaştırılmasında; %60 amonyum sülfat doygunluğu ve farklı homojenat: t-bütanol oranının (1,0:0,5; 1,0:1,0; 1,0:1,5; 1,0:2,0) saflaştırma katsayısına ve verime etkisi.....	62
Şekil 4.10. Amilaz enziminin saflaştırılmasında, %70 amonyum sülfat doygunluğu ve farklı homojenat: t-bütanol oranının (1,0:0,5; 1,0:1,0; 1,0:1,5; 1,0:2,0) saflaştırma katsayısına ve verime etkisi.....	63
Şekil 4.11. Amilaz enziminin saflaştırılmasında, %80 amonyum sülfat doygunluğu ve farklı homojenat: t-bütanol oranının (1,0:0,5; 1,0:1,0; 1,0:1,5; 1,0:2,0) saflaştırma katsayısına ve verime etkisi.....	63
Şekil 4.12. Amilazın saflaştırılmasında pH'nın saflaştırma katsayısına ve verime etkisi	64
Şekil 4.13. SDS-PAGE sonucuyla oluşturulan Log M_A - R_f grafiği.....	65

Şekil 4.14. <i>B. licheniformis</i> OSBS6'dan üçlü faz ayırma yöntemiyle saflaştırılan amilaz enziminin SDS-PAGE görüntüsü	66
Şekil 4.15. Amilaz enziminin optimum pH grafiği	67
Şekil 4.16. Amilaz enziminin stabil pH grafiği	67
Şekil 4.17. Amilaz enziminin optimum sıcaklık grafiği	68
Şekil 4.18. Sıcaklığın amilaz enzim kararlılığı üzerine etkisi	69
Şekil 4.19. Bazı metal iyonlarının proteaz aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesi	71
Şekil 4.20. <i>B. licheniformis</i> OSBS6'dan saflaştırılan amilaz enzimi üzerine inhibitörlerin etkisi	72
Şekil 4.21. Amilaz enziminin organik çözücülerdeki 1 saat inkübasyon sonundaki sonuçları	73
Şekil 4.22. <i>B. licheniformis</i> OSBS6'dan saflaştırılan amilaz enzime yüzey aktif maddelerin ve okside edici ajanın etkisi	74
Şekil 4.23. Patates nişastası substratıyla elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.....	76
Şekil 4.24. Proteaz enziminin saflaştırılmasında; %20 amonyum sülfat doygunluğu ve farklı homojenat:t-bütanol oranının (1,0:0,5; 1,0:1,0; 1,0:1,5; 1,0:2,0) saflaştırma katsayısına ve verime etkisi	77
Şekil 4.25. Proteaz enziminin saflaştırılmasında; %30 amonyum sülfat doygunluğu ve farklı homojenat:t-bütanol oranının (1,0:0,5; 1,0:1,0; 1,0:1,5; 1,0:2,0) saflaştırma katsayısına ve verime etkisi	77
Şekil 4.26. Proteaz enziminin saflaştırılmasında; %40 amonyum sülfat doygunluğu ve farklı homojenat:t-bütanol oranının (1,0:0,5; 1,0:1,0; 1,0:1,5; 1,0:2,0) saflaştırma katsayısına ve verime etkisi	78
Şekil 4.27. Proteaz enziminin saflaştırılmasında; %50 amonyum sülfat doygunluğu ve farklı homojenat:t-bütanol oranının (1,0:0,5; 1,0:1,0; 1,0:1,5; 1,0:2,0) saflaştırma katsayısına ve verime etkisi	78
Şekil 4.28. Proteaz enziminin saflaştırılmasında; %60 amonyum sülfat doygunluğu ve farklı homojenat:t-bütanol oranının (1,0:0,5; 1,0:1,0; 1,0:1,5; 1,0:2,0) saflaştırma katsayısına ve verime etkisi	79
Şekil 4.29. Proteaz enziminin saflaştırılmasında; %70 amonyum sülfat doygunluğu ve farklı homojenat:t-bütanol oranının (1,0:0,5; 1,0:1,0; 1,0:1,5; 1,0:2,0) saflaştırma katsayısına ve verime etkisi	79

Şekil 4.30. Proteaz enziminin saflaştırılmasında; %80 amonyum sülfat doygunluğu ve farklı homojenat:t-bütanol oranının (1,0:0,5; 1,0:1,0; 1,0:1,5; 1,0:2,0) saflaştırma katsayısına ve verime etkisi	80
Şekil 4.31. Proteazın saflaştırılmasında TPP sistemine pH'nın etkisi	80
Şekil 4.32. SDS-PAGE sonucunda oluşturulan Log M_A-R_f grafiği	82
Şekil 4.34. Proteaz enziminin optimum pH grafiği	83
Şekil 4.35. Saflaştırılan proteaz enziminin farklı pH'larda stabilitesi	84
Şekil 4.36. Proteaz enziminin optimum sıcaklık grafiği.....	85
Şekil 4.37. Saflaştırılan proteaz enziminin sıcaklık zaman grafiği.....	86
Şekil 4.38. Proteaz enzim aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi	88
Şekil 4.39. <i>B. licheniformis</i> OSBS6'dan saflaştırılan proteaz enzimi inhibitörlerin etkisi	90
Şekil 4.40. Proteaz enziminin organik çözücülerdeki 1 saat inkübasyon sonunda etkisi	92
Şekil 4.41. Proteaz enziminin organik çözücülerdeki 24 saat inkübasyon sonundaki etkisi	93
Şekil 4.42. <i>B.licheniformis</i> OSBS6'dan saflaştırılan proteaz enzimi üzerine yüzey aktif maddelerin ve okside edici ajanın etkisi	95
Şekil 4.43. Kazein substratıyla elde edilen Lineweaver-Burk grafiği	96
Şekil 4.44. <i>B. licheniformis</i> OSBS6'dan saflaştırılan proteaz enzimi üzerine ticari deterjanların etkisi	97

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Enzimlerin sınıflandırılması ve reaksiyon tipleri	4
Çizelge 3.1. Tez çalışması boyunca kullanılan kimyasallar ve kitler	26
Çizelge 3.2. Tezde kullanılan laboratuvar cihazları.....	28
Çizelge 3.4. PCR Programının Sıcaklık, Süre, Döngü Sayısı.....	37
Çizelge 3.5. Ligasyon işleminde kullanılan malzemelerin miktarları	39
Çizelge 3.6. Koloni PCR işleminde kullanılan reaktiflerin yoğunluk ve miktarları.....	40
Çizelge 3.7. Koloni PCR programı	41
Çizelge 3.8. Jel bileşenleri	47
Çizelge 4.1. Katı besiyerinde amilaz ve proteaz aktivitesinin belirlenmesi	56
Çizelge 4.2. OSBS6 izolatının morfolojik ve biyokimyasal özellikleri.....	57
Çizelge 4.3. DNA dizi analizi sonucu OSBS6'nın benzerlik yüzdesi	57
Çizelge 4.4. <i>B. licheniformis</i> OSBS6'dan saflaştırılan amilaz enziminin saflaştırma tablosu	65
Çizelge 4.5. <i>B. licheniformis</i> OSBS6'dan saflaştırılan amilaz enziminin optimum pH'sını belirlemek için oluşturulan bağıl aktivite çizelgesi	66
Çizelge 4.6. <i>B. licheniformis</i> OSBS6'dan saflaştırılan amilaz enziminin stabil pH'sını belirlemek için oluşturulan kalan aktivite çizelgesi.....	67
Çizelge 4.7. <i>B. licheniformis</i> OSBS6'dan saflaştırılan amilaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için oluşturulan bağıl aktivite çizelgesi.....	68
Çizelge 4.8. <i>B. licheniformis</i> OSBS6'dan saflaştırılan amilaz enziminin stabil sıcaklığını belirlemek için oluşturulan sıcaklık zaman grafiği	69
Çizelge 4.9. Amilaz aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi	70
Çizelge 4.10. <i>B. licheniformis</i> OSBS6'dan saflaştırılan amilaz enzimi üzerine inhibitörlerin etkisi	72
Çizelge 4.11. Amilaz enziminin organik çözücülerdeki 1 saat inkübasyon sonundaki sonuçları	73
Çizelge 4.12. <i>B. licheniformis</i> OSBS6'dan saflaştırılan amilaz enzimine yüzey aktif maddelerin ve okside edici ajanın etkisi.....	74

Çizelge 4.13. <i>B. licheniformis</i> OSBS6'dan saflaştırılan amilaz enziminin subsratlara olan özgünlüğü	75
Çizelge 4.14. <i>B. licheniformis</i> OSBS6'dan saflaştırılan proteazın enziminin saflaştırma tablosu	81
Çizelge 4.15. <i>B. licheniformis</i> 'dan TPP sistemiyle saflaştırılan proteaz enziminin optimum pH sonuçları	83
Çizelge 4.16. <i>B. licheniformis</i> OSBS6'dan saflaştırılan proteaz enziminin stabil pH'sını bulmak için oluşturulan kalan aktivite çizelgesi	84
Çizelge 4.17. <i>B. licheniformis</i> OSBS6'dan saflaştırılan proteaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için oluşturulan bağıl aktivite çizelgesi	84
Çizelge 4.18. <i>B. licheniformis</i> OSBS6'dan TPP sistemiyle saflaştırılan proteaz enziminin stabil sıcaklığı belirlemek için sıcaklık zaman çizelgesi	85
Çizelge 4.19. Proteaz enzim aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi	87
Çizelge 4.20. <i>B.licheniformis</i> OSBS6'dan elde edilen proteaz enzimi üzerine inhibitörlerin etkisi	89
Çizelge 4.21. Proteaz aktivitesi üzerine bazı organik çözücülerin 1 saatlik inkübasyonu sonunda etkisi.....	91
Çizelge 4.22. Proteaz aktivitesi üzerine bazı organik çözücülerin 24 saatlik inkübasyonu sonunda etkisi.....	91
Çizelge 4.23. Yüzey aktif maddelerin ve okside edici ajanın <i>B.licheniformis</i> OSBS6'dan saflaştırılan proteaz enzimi üzerine etkisi	94
Çizelge 4.24. <i>B. licheniformis</i> OSBS6 suşundan saflaştırılan proteaz enziminin doğal subsratlara karşı özgülüğü	95

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat Derece
µl	: Mikrolitre
BSA	: Sığır Serum Albumin
dk	: Dakika
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DNS	: Dinitrosalisilik Asit
DNTB	: Dinitrotriyo Benzen
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EU	: Enzim Ünitesi
gr	: Gram
HCl	: Hidroklorik Asit
IPTG	: izopropil β-D-1- tiyogalaktopiranosid
L	: Litre
M	: Molar
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
NaOH	: Sodyum Hidroksit
nm	: Nanometre
OD	: Optik Dansite
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PMSF	: Fenil Metil Sülfonil Florid
IAA	: İndol Asetik Asit
rDNA	: Ribozomal DNA
RNA	: Ribonükleik Asit
rpm	: Dakikadaki dönüş sayısı
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
TCA	: Triklorik asit
sn	: Saniye
TEMED	: N, N, N, N-tetrametiletildiamin
TSA	: Triptone Soy Agar

TSB : Triptone Soy Broth

α : Alfa

β : Beta



1. GİRİŞ

1.1. Enzimler

Enzimler, spesifik bir biyokimyasal reaksiyonu gerçekleştirmek için canlı organizmalar tarafından üretilen katalizörlerdir. Biyokatalizörler olarak da adlandırılırlar. Enzimler normal bir kimyasal reaksiyonun hızını 100 milyon ile 10 milyar kat kadar hızını artırabilirler (Gurung *et al.* 2013). Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç çoğunluğu protein yapısında olduğundan DNA seviyesinde düzenlenir (Keha ve Küfrelioğlu 2009). Enzimler hem katalizlediği reaksiyon hem de substrat seçiminde oldukça spesifiktirler (Negi and Banerjee 2009). Herhangi kalıcı bir değişikliğe uğramaksızın aktivasyon enerjisini düşürerek sadece reaksiyon hızını artıran biyolojik makromoleküllerdir. Enzimlerin biyodegrade edilebilir ve toksik olmamaları nedeniyle zararlı kimyasallar yerine de kullanılabilirler (Singh *et al.* 2016).

Enzimlerin bir kısmı sadece protein yapısıyla fonksiyon gösterir. Ancak büyük kısmı enzimatik aktivite için zorunlu olan protein yapısında olmayan kofaktör denilen kısımlara ihtiyaç duyar. Kofaktörlü enzimlere holoenzim denir. Protein kısımlarına ise apoenzim denir. Kofaktör metal iyon olabildiği gibi koenzim adı verilen kompleks yapıda organik bir molekül de olabilir. Enzimler oldukça spesifik olup genellikle tek bir reaksiyon tipini katalize eder (Ha and Bhagavan 2011).

Doğada bulunan enzimler eski zamanlardan beri peynir, maya, bira, şarap, sirke, deri, çivit ve keten gibi maddelerin üretiminde kullanılmıştır. Bu işlemlerin tümü ya kendiliğinden büyüyen mikroorganizmalar tarafından ya da buzağı rumeni, papaya meyvesi gibi ilave maddeler eklenerek yapılmıştır.

Enzim kullanımı insanoğlu yüzyıllar öncesine kadar bilmesine rağmen bu biyomoleküle bir bilimsel terminoloji ilk kez Wilhelm Friedrich Kühne tarafından verilmiştir. Enzimlerin tarihçesine bakıldığında ise 1783'de İtalyan Katolik Rahip Lazzaro

Spallanzani biyogenez çalışmasında ilk kez enzimin önemine değinmiştir. 1812’de Gottlieb Sigismund Kirchhof nişastayı glikoza dönüştürmenin prosedürünü araştırırken katalizör olarak uygulamasını aydınlatmıştır. 1833’de Fransız Kimyacı Anselme Payen ilk enzim distazı keşfetmiştir. 1835’de İsveç bilimadamı Jons Jacob Berzelius tarafından distaz enzimi tarafından nişastanın hidrolizi katalitik reaksiyon kabul edilerek fermentasyonun katalitik aktivite kaynaklı olduğu yorumlanmıştır. 1862’lerde Louis Pasteur, Ferdinand Cohn ve Robert Koch enzimlerin sadece canlı hücre içinde fonksiyon gösterdiği ve hayati bir molekül olduğu yorumlanmıştır. 1897’de Eduard Buchner mayadan hücre içermeyen ekstraktan glukozun etanole dönüşümünü gösterirken; 1908’de Alman bilimadamı Otto Rohm derileri kesmek ve tabakhanede gereksinimi karşılamak için inorganik tuzlarla pankretik enzimlerin kullanımı gerçekleştirilmiştir. Ancak ilk kez enzimin saflaştırılması 1947’de James B. Sumner tarafından başarılmıştır. John Northrop ve Wendell Stanley pepsini izole etmek için kompleks bir prosedür keşfetmiştir. John Northrop ve Wendell Stanley 1947’de Nobel Ödülünü James B. Sumner ile paylaşmıştır. 1960’da NOVO tarafından ticari alanda *Bacillus lichenformis* kullanılarak proteaz üretimine başlanmıştır. 1980’den sonra enzim üretimini geliştirmek ve aynı zamanda protein mühendisliği tarafından enzimlerin özelliğini değiştirmek için genetik mühendisliği teknolojileri kullanılmaya başlanmıştır (Gurung *et al.* 2013).

Enzimler katalizörlerle kıyaslandığında; yüksek katalitik etkinlik ve özgülüklere sahip olmaları yanında, gereksiz yan ürünleri oluşturmayan, çevreyle dost, toksik olmayan, düşük enerji ihtiyacı ve maliyetinin düşük olması gibi özelliklerinden dolayı endüstrilerde kullanımı hızla artmaktadır (Singh *et al.* 2016).

Enzimler; yiyecek ve içecek, deterjan, tekstil, kağıt, hayvan yemi, deri, yakıt, kozmetik, ilaç gibi çeşitli endüstrilerde önemli rol oynamaktadır. Özellikle mikrobiyal enzimler endüstrinin toksik bileşenlerini ve fenolik bileşikler, nitriller, aminler gibi atıkları ya dönüşüm ya da degradasyon yoluyla ortadan kaldırma yeteneğine sahiptir. Mikrobiyal enzimler genetik kaynaklı enzim eksikliği tedavisinde kullanılır. Örneğin kalıtsal konjenital sukroz izomeraz eksikliği olan hastalar sukroz sindiremediğinden sakkarosidaz (β -fruktofuranozid fruktohidrolaz, EC 3.2.1.6) enzimi sakkarozun sindirimini

kolaylaştırmak için oral olarak verilir. Buna ek olarak, fenilalanin amonyak liyaz (EC 4.3.1.24), genetik fenilketonüri bozukluğunda fenilalanini indirmek için kullanılır. Enzimlerin ilaç ve tanı endüstrilerinde çok önemli rolleri vardır. Enzimler ELİSA ve diyabet test kitleri gibi tanı işlemleri, enzimatik eksiklik ve sindirim bozukluklarıyla ilişkili sağlık konularında terapötik ilaç olarak kullanılır. Enzim uygulamaları tıpta da endüstri de kullanıldığı kadar geniş uygulama alanına sahiptir. Mikrobiyal enzimlerden özellikle proteolitik enzimler son yıllarda yanık vakalarında ölü deriyi kaldırmak için kullanılır. İlaveten enzimler diğer sağlık bozulukları ve diyabetin belirlenmesi için klinik teşhislerde de kullanılır. Örneğin; glukoz için glukooksidaz (EC 1.1.3.4), üre için üreaz (EC 3.5.1.5) ve glutamatdehidrogenaz (EC 1.4.1.2).

Enzimler genetik mühendisliği alanında özellikle aminoasit manipülasyonlarında vazgeçilmezdir. Örneğin DNA amplifikasyonu için DNA polimeraz PCR’da kullanılır; restriksiyon endonükleaz moleküler klonlamada DNA’nın spesifik bölgelerini kesmek için kullanılır (Bhat 2000; Gurung *et al.* 2013; Mane and Tale 2015; Singh *et al.* 2016).

1.2. Enzimlerin Sınıflandırılması

Uluslararası Biyokimya Birliği tarafından kurulan Uluslararası Enzim Komisyonu (IUBMB) her enzimi tanımlamak için sistematik bir isim ve enzim kod numarası (E.C) kullanarak bir sınıflandırma sistemi geliştirmiştir. Pepsin, renin, tripsin gibi enzimler ilk çalışılan enzimler hariç çoğu enzimler substratın sonuna ‘‘az’’ eki getirilerek isimlendirilir. Katalizlediği tepkime türüne göre, bunlar oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlar olmak üzere altı sınıfa ayrılır.

E.C tarafından önek konulan enzim kod numaraları noktalarla ayrılarak dört eleman içerir.

1. İlk sayı, enzimin hangi alt ana bölümden (sınıftan) olduğunu gösterir,
2. İkinci sayı alt sınıfı belirtir,
3. Üçüncü sayı alt-alt sınıfı verir,

4.Dördüncü sayı alt-alt sınıfındaki enzimin seri numarasıdır.

Çizelge 1.1. Enzimlerin sınıflandırılması ve reaksiyon tipleri (Gurung *et al.* 2013, Ha and Bhagavan 2011)

Enzim Komisyonu Numarası	Enzimin Sınıfı	Reaksiyon Mekanizması
EC 1	Oksidoredüktazlar	Oksidasyon reaksiyonları bir molekülden diğerine elektron transferini sağlar. Biyolojik sistemlerde her zaman subsrattan hidrojeni uzaklaştırır. Bu sınıfta tipik enzimler dehidrogenazlar olarak adlandırılırlar.
EC 2	Transferazlar	Enzimlerinin bu sınıfı bir molekülden diğerine atomlarının bir grubunun transferini kataliz eder
EC 3	Hidrolazlar	Hidrolazlar su tarafından subsratların hidrolizini katalize eder. Reaksiyolar lipidlerde ester bağlarını, karbonhidratlarda glikozidik bağları ve proteinlerde peptid bağlarının parçalanmasını sağlar.
EC 4	Liyazlar	Liyazlar grupların uzaklaştırılmasıyla çift bağların oluşumu ya da çift bağlara grupların ilavesini katalizler. Böylece bağlar hidrolizden farklı bir prensip kullanarak parçalar.
EC 5	İzomerazlar	İzomerazlar aynı molekülde bir pozisyondan diğerine grupların transferini katalizler. Diğer deyişle bu enzimler atomları yeniden düzenleyerek bir subsratın yapısını değiştirir.
EC 6	Ligazlar	Ligazlar, molekülleri kovalent bağlarla birleştirir. Bu enzimler yeni bağ grubunun oluşturduğu biyosentetik reaksiyonlara katılır.

1.3. Mikrobiyal Enzimler

Bitkisel, hayvansal mevcut olmasına rağmen endüstride en çok mikrobiyal enzimler tercih edilmektedir. Mikrobiyal enzimlerin tercih edilme nedenleri arasında;

1. Mikroorganizmaların gelişimi hızlı olması nedeniyle enzim üretimi hızlı olması,
2. Hayvan ve bitkilerle karşılaştırıldığında eldesi daha kolay olması,
3. Daha az alan gerektirip, daha uygun maliyetli kaynaklar kullanılması,
4. Mikroorganizmaların genetik mühendisliği ve diğer yollarla kolaylıkla manipüle edilebilmesi,
5. Daha kolay optimize edilebilmesi,
6. Mevsimsel dalgalanmalar olmayıp düzenli kaynak sağlanması,
7. Çeşitli ekstrem koşullarda stabilitesinin daha yüksektir,
8. Daha fazla katalitik aktiviteye sahip olması sayılabilir. Bu nedenle mikrobiyal enzimler, endüstriyel işlem ve uygulamaları için daha güvenli kaynak olarak tercih edilmektedir (Goyal *et al.* 2005, Sundarram and Murthy 2014).

1.4. Multienzimler

Multienzimler, enzimlerin iki çeşidinden daha fazlasını içeren bir sistem olarak tanımlanırlar. Multienzimlerin tek enzimlere göre fonksiyonel entegrasyon ve kooperatif etkisi gibi bazı avantajları vardır. Multienzimlerin işleme, üretim, remediasyon gibi karmaşık sistemler için yüksek potansiyelleri vardır. Şimdiye kadar çoklu enzimler deterjan, gıda ve yem endüstrisinin de önemli bir rol oynamaktadırlar. Günümüzde etkin bir şekilde ve aynı anda multienzim üretmek için kurulmuş biyomühendislik temeli uygun bir biyoproses bulunmamaktadır. Geleneksel yollarla multienzimleri üretmek için üç metod bulunur; birinci metod direk çeşitli enzimlerin karışımını içerir ancak bu metod çok maliyetlidir. İkinci yöntem de genetik mühendisliği ile çoklu fonksiyonlarla donatılmış mikroorganizmaların saf kültürü kullanılır. Çoklu genler, konakçı hücreler için ağır bir yük olur ve pratik uygulamayı sınırlar. Üçüncü yöntem ise iyi tasarlanmış farklı mikroorganizmalardan oluşan karışık bir kültürdür. Bu yöntem çok dikkat

çekmektedir. Çünkü karışık kültürdeki bireysel mikroorganizmalar kolayca modifiye olmaktadır ve biyoürünlerin etkili üretimi için mikroorganizmalar arasındaki etkileşimden fonksiyonel entegrasyon açısından faydalanılmaktadır. Ayrıca çoklu bileşenlerin ayrılması ve saflaştırılması sadece tek bir kültürle başarılabilmektedir (Zhang *et al.* 2004).

1.5. Termofilik Enzimler

Enzimler genellikle 50-60°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda aktivitelerini kaybederler ve denature olurlar. Ancak termostabil enzimler yüksek reaktivite (daha yüksek reaksiyon hızı, daha düşük difüzyonel kısıtlamalar), daha yüksek kararlılık, daha yüksek proses verimi, daha düşük viskozite ve daha az kontaminasyon problemi gibi nedenlerle avantaj sağlar. Termostabil enzimler, biyoteknolojik proseslerde potansiyel kullanımları nedeniyle son derece caziptirler ve dikkat çekmektedirler (Prakash and Jaiswal 2010).

1.6. *Bacillus* Suşları

Bergey'in Sistematik Bakteriyoloji kitabına göre *Bacillus* suşları gram pozitif, çubuk şekilli, aerobik, katalaz pozitif, spor oluşturan mikroorganizmalardır. (Saxena *et al.* 2007). *Bacillus* cinsi suşları endüstriyel enzim üreticisi olduğu bilinir. Enzim pazarının yaklaşık %50'sinden sorumludur. Enzim üretimi için bu türleri kullanımının nedeni diğer mikroorganizmaların enzimatik sentez ve gelişimini engelleyen büyüme şartlarına kolayca adapte olur ve laboratuvarında kolayca büyütülüp muhafaza edilmeleridir. *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus licheniformis* ve *Bacillus amyloliquefaciens* termostabil α -amilazın iyi üreticileri olduğu bilinmektedir ancak başlangıçta, *B. amyloliquefaciens*'ten elde edilen α -amilazın yerini *B. stearothermophilus* veya *B. licheniformis* almıştır. *Bacillus* türünün enzimleri, olağanüstü termostabilite nedeniyle büyük ölçekli biyoteknolojik prosesler için özel bir ilgi gösterilmektedir (Kirk *et al.* 2002, Van Der Maarel *et al.* 2002, Prakash ve Jaiswal 2010). Termostabil enzimlerle ısıya duyarlılık prosesleri sınırlayan bir faktör değildir (Barros *et al.* 2013). Lin *et al.* (1998) tarafından *Bacillus* suşundan enzim sentezi için optimal sıcaklığın 55°C olduğu

bildirilmiştir. *B. liceniformis* peptid antibiyotiklerin ve endüstriyel ekzoenzimlerin üretiminde tercih edilen önemli bir bakteridir. Tarımda mikrobiyal gübre olarak kullanılması yanında endüstriyel alanda enzimatik ajan, peptid, antibiyotik, aseton, poli- γ -glutamik asit üretmek için de kullanılır. *Bacillus* tarafından üretilen termostabil amilaz ve proteazlar en önemli endüstriyel enzimler arasındadır. Kullanılan endüstriyel enzimlerin çoğu hidrolitiktir ve çeşitli doğal maddelerin degradasyonu için kullanılır. Proteaz enzimi deterjan endüstrisinde kullanımı nedeniyle çok büyük enzim grubunu oluşturur. İkinci büyük enzim grubu ise nişasta, tekstil, deterjan ve fırıncılık gibi endüstrilerde kullanılan başta amilaz olmak üzere karbonhidrazlardır (Underkofler *et al.* 1958).

1.7. Amilaz

Amilaz, 1833 yılında Anselme Payen tarafından keşfedilen ve izole edilen ilk enzimdir. Amilaz, bitişik glikoz üniteleri arasındaki α -1,4-glikozidik bağlarını rastgele parçalamasıyla basit şeker türevlerine dönüşümünü katalize eden bir hidrolaz enzimidir. Sindirimin mekanik işleminin başladığı insan tükürüğünde amilaz bol miktarda bulunur. Patates, pirinç gibi çok fazla nişasta içeren yiyecekler az tatlıdır. Ağızda amilaz ile biraz çiğnendiğinde nişastanın birazını şekere dönüştürür ve hafif tatlı bir lezzet bırakır. Endüstriyel uygulamalarda nişastanın şeker şuruplarına dönüştürülmesinden etanol üretimine, tekstil ve deterjan endüstrisinden farmasötik alan için siklodekstrin üretimine kadar pek çok alanda kullanılmaktadır. Hidrolazların endohidrolazlar ve ekzohidrolazlar olmak üzere iki tipi vardır. Endohidrolazlar substrat molekülünün iç tarafından parçalarken ekzohidrolazlar indirgeyici olmayan terminal uçta parçalamaya başlar. Amilazlar endoamilazlar ve ekzoamilazlar olarak iki gruba ayrılır. Endoamilazlar nişasta içinden rastgele hidroliz ederek çeşitli zincir uzunluklu lineer ve dallı oligosakkaritlerin oluşumuna neden olur. Ekzoamilazlar ise substratın indirgeyici olmayan ucunu hidroliz eder ve sonunda daha kısa bir ürün oluşturur. Enzimlerin pek çoğu farklı ürünlerle nişasta molekülünü hidroliz eder ve çeşitli enzimlerin kombinasyonu tamamen nişastayı hidroliz etmek için gereklidir.

Enzim, substrat molekülünün 4 ile 10 arasındaki glukoz ünitelerini alan bir karakteristik substrat bağlayan yarık içerir. Her bağlanma bölgesi karbonhidrat zincirinin sadece bir glukoz birimine afinite gösterir. Substrat bağlanma bölgesinin sayısındaki farklılıklar ve katalitik bölgenin yeri, serbest kalan oligosakkarit uzunluğunu belirler (Gupta *et al.* 2003, Gurung *et al.* 2013, Božić *et al.* 2014).

Amilaz üç alt sınıfa ayrılır; α - β - γ -amilaz

1. α -Amilaz: (α -1,4-glukan-4-glukanhidrolaz; EC 3.2.1.1) α -Amilaz; glikoz, dekstrin, limit dekstrin üretmek için nişastada α -1,4-glikozidik bağların hidrolizini katalizler. α -Amilazlar kalsiyum yokluğunda fonksiyonun tamamen yerine getiremeyen kalsiyum metaloenzimlerdir. α -Amilazlar nişasta zincirleri boyunca rastgele bölgelere hareket ederek uzun karbonhidrat zincirlerini kırar ve amilozdan maltoz, maltotrioz; amilopektinden maltoz, glukoz ve limit dekstrin ürünlerini oluşturur. α -Amilazın aktivitesine karar vermek için çeşitli metodlar mevcuttur. Bunlar nişasta iyodin renk yoğunluğunda artış, DNSA metodu ile indirgenen şeker miktarındaki artış, substrat renk kompleksinin degradasyonu ve nişasta süspansiyonun vizkozitesindeki artışına dayalıdır (Priest 1977; Kirk *et al.* 2002). α -Amilaz, tahıldaki nişastayı şekere yıkarak etanol üretiminde kullanılır. Yüksek früktoz mısır şurubu üretiminde; ilk adım α -amilaz ile mısır nişastasının muamele edilerek oligosakkarit adlandırılan dekstrin zincirleri üretilirken daha sonra glukoamilaz enzimiyle dekstrin zincirlerinden limit dekstrin üretilir. Limit deltrinler izomeraz enzimiyle fruktoza dönüştürülür. *B. licheniformis*'den üretilen 'termamil' adlandırılan bir α -amilaz ise özellikle bulaşık yıkama ve nişasta söken deterjanlarda kullanılır.

2. β -Amilaz: Amilazın başka formu β -amilaz (EC 3.2.1.2) (alternatif ismi: 1,4- α -D-glukan maltohidrolaz; glikujenaz; sakkarojen amilaz) bakteri, bitki ve funguslar tarafından sentezlenir. β -amilaz polisakkaritin indirgeyici olmayan ucuna hareket ederek α -1, 4 glikozidik bağın hidrolizini sağlayan bir ekzohidrolaz enzimdir. Meyve olgunlaşması sırasında β -amilaz nişastayı maltoza parçalayarak olgunlaşan meyvenin tatlanmasını sağlar. Tahıl amilazı malt üretiminde anahtar rol oynar. Hayvan hücreleri β -

amilaz içermez ancak sindirim sistemi içerisinde bulunan mikroorganizmalarda bulunabilir. β -Amilaz, endüstriyel alanların yanı sıra araştırma alanlarında farklı uygulamalar için de kullanılabilir. Çeşitli yöntemlerle üretilen nişasta ve glikojen moleküllerinin yapısal araştırmalarında; endüstride, demleme ve damıtma endüstrisinde fermantasyon için kullanılır. Ayrıca, yüksek maltoz şurubu üretmek için kullanılır.

3. γ -Amilaz: γ -Amilaz (EC 3.2.1.3) (alternatif isimleri: Glukan 1,4- α -glukozidaz; amiloglukozidaz; Ekzo-1,4- α -glukozidaz; glukoamilaz; lizozomal α -glukozidaz; 1,4- α -D-glukan glukohidrolaz) glukoz ürünü olan amiloz ve amilopektin sonundaki uçta α -1,4 glikozidik bağların yanı sıra α -1,6 glikozidik bağlarını parçalar (Gurung *et al.* 2013, Sundarram and Murthy 2014).

1.8. Nişasta

Nişasta; mısır, patates, pirinç, buğday gibi çoğu tarım ürününün ana bileşenidir. Soğuk suda çözünmeyen granül formundaki nişasta depo maddesi olarak bitki hücresinde depolanır. İnsan beslenmesinde büyük bir enerji sağlayan bir karbonhit olan nişasta ekonomik olmaları nedeniyle endüstriyel uygulamalarda sıklıkla kullanılır (Patel *et al.* 2017). Nişasta bitki de depo polisakkaritlerinin en bol formudur ve bu nedenle yiyecek endüstrisinde genişçe kullanıldığı maltoz, fruktoz ve glukoz içeren şurupların üretilmesinde ucuz bir kaynak oluşturur (Gopinath *et al.* 2017).

Nişasta, amiloz ve amilopektin olmak üzere iki molekülden oluşur. Amiloz α -1,4 glikozid bağlarıyla bağlı tekrarlı glukoz birimlerinden oluşan bir lineer zincirdir. Amilozdan farklı olarak amilopektin her 24-30 glukoz monomerinden birinde α -1,6 glikozidik bağıyla bağlanan bir yan zincir ile başlar. Amiloz iyodinle koyu mavi renk verir. Amiloz daha viskozdur ve daha fazla suda çözünebilir (Janeček 2009; Pallardy 2010). Amiloz ve amilopektin nispi içeriği bitki türüne bağlıdır. Örneğin, buğday nişastasası yaklaşık %25 amiloz içerirken mısır nişastasası ise %97-99'den fazla amilopektinden oluşur. Nişastanın elde edildiği kaynağa göre amiloz heliksin hidrofobik iç yüzeyi içinde tutulduğu lipid ve diğer bileşiklerin miktarı, fosforik asitle esterleşme miktarı, şişme gücü, jelatinleşme

sıcaklığı, polisakkarit granüllerinin büyüklüğü, şekli ve yapısında farklılıklar oluşturur (Machovic and Janecek 2007).

1.9. Amilazın Biyoteknolojik Uygulamaları

Amilaz yiyecek, ekmek yapımı, tatlandırıcılar, fruktoz ve glukoz şurubu, meyve suyu, alkollü içecekler, kağıt endüstrisi, tekstil, deterjanlar, yakıt etanol, sindirime yardımcı ve kuru temizleme de leke çıkarıcı gibi çeşitli endüstriyel alanlarda geniş bir uygulamaya sahiptir. Ayrıca bakteriyel α -amilaz tıbbi, klinik ve analitik biyokimyada da kullanılır (Pandey *et al.* 2000).

1.9.1. Nişastanın endüstrisi

Amilazın en geniş kullanıldığı alan nişasta endüstrisidir. Nişasta, fruktoz ve glukoz şurubunun üretiminde kullanılır. Bu işlem jelatinleştirme, sıvılaştırma ve sakrifikasyon olmak üzere üç aşama içerir. Jelatinleştirme, viskoz bir nişasta süspansiyonu oluşturmak üzere nişasta granüllerinin suda eritilmesini içerir. Amiloz ve amilopektin suda dağılır. Nişastanın sıvılaştırılması, α -amilaz tarafından kısa dekstrin zincirlerine kısmi hidrolizidir. Sakrifikasyon ise daha fazla hidrolizle glukoz ve fruktoz şurubu üretimidir. Glukoamilaz, ekzoamilaz olarak hareket ederek indirgeyici olmayan terminal uçtan α -1,6 glikozidik bağı parçalar. Glukoamilaz pullunazla birlikte glukoz şurubu üretir. Bu glukoz şurubu glukoz izomeras tarafından katalize edilerek yüksek fruktoz şurubuna dönüştürülür. Fruktoz şurubu özellikle içecek endüstrisinde tatlandırıcı olarak kullanılır (Gupta *et al.* 2003; Gopinath *et al.* 2017).

1.9.2. Yiyecek endüstrisi

Amilazlar; sindirim yardımcılarının hazırlanması, mayalama, pişirme, kek üretimi, bira hazırlama, meyve suları ve nişasta şurupları gibi işlenmiş gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. α -amilazlar özellikle fırıncılık endüstrisinde genişçe kullanılır. Ekmek pişirme endüstrisinde hamura eklenen α -amilaz fermentasyon hızını artırır ve

nişastanın küçük dekstrinlere hidroliz edilmesine yardımcı olur. Ayrıca nişasta hidrolizi hamurun vizkozitesini düşürür böylece hamur kabararak somun hacmini artırır. Dahası ekmeğin lezzetini, kabuk rengini ve kızartma kalitesini artırır. Bayatlamayla kırıntı sertliğinin artması, kabuğun canlılığının kaybı, kırıntı içeriğindeki nemin azalması ve ekmeğin lezzetinin kaybı gibi istenmeyen değişikliklere neden olabilir. Enzim aynı zamanda pişmiş ürünlerin raf ömrünü ve yumuşaklığını korumak için bayatlamaya karşı bir ajan olarak da kullanılır. Anti bayatlama etkisine rağmen dallanmış dekstrinin üretimi nedeniyle aşırı dozu da ekmeğin yapışkanlığına neden olur. Günümüzde, pastane endüstrisinde ticari olarak *B. stearrowthermophilus*'un termostabil maltojenik bir amilazı kullanılmaktadır. Amilazlar ayrıca biranın veya meyve sularının durultulması ve liflerin sindirilebilirliğini artırmak için hayvan yeminin ön arıtımında da kullanılır (Kulp *et al.* 1981; Van Der Maarel *et al.* 2002; Gupta *et al.* 2003; Couto and Sanromán 2006; Chi *et al.* 2009; Sundarram and Murthy 2014).

1.9.3. Deterjan endüstrisi

Deterjan endüstrileri enzimlerin başlıca kullanıldığı endüstriyel alanlardır. Deterjan formülasyonlarında enzimlerin kullanılması zor lekeleri çıkarmayı kolaylaştırır. Enzimler çevreyle dost deterjanların üretilmesine imkan sağlar. Amilazlar enzimatik deterjanın formülasyonunda kullanılan ikinci enzim türüdür ve tüm sıvı deterjanlarda %90'ı amilaz içerir. Deterjan endüstrisinde kullanılan amilazlar düşük sıcaklık ve alkalın pH'da aktiflerdir. Deterjan endüstrisinde kullanılan amilaz örnekleri *Basillus* veya *Aspergillus* suşlarından üretilir (Mitidieri *et al.* 2006). Amilazlar patates, sos, muhallebi, çikolata vb. nişastalı gıdaların kalıntılarını dekstrinlere ve diğer küçük oligosakaritlere indirgeyerek lekeleri çıkarmak için çamaşır ve bulaşık deterjanlarında kullanılır (Gurung *et al.* 2013).

1.9.4. Tekstil endüstrisi

Nişasta gibi ajanlar hızlı ve güvenli dokuma işlemini sağlamak için kumaş üretiminden önce ipliğe uygulanır. Nişasta ucuz ve dünyanın birçok bölgesinde kolaylıkla bulunması nedeniyle çok caziptir. İpliğe uygulanan nişasta, tekstil kaplama endüstrisinden sonra

dokuma kumaştan ıslak işlemle çıkarılır. Haşıl sökme olarak bilinen bu işlemde dokuma işlemi boyunca sarılı ipliğinin kopmasını önlemek için güçlendirici madde olarak işlev gören nişastanın kumaştan uzaklaştırılmasını içerir (Ahlawat *et al.* 2009). Amilaz haşıl sökme prosesi için tekstil endüstrisinde kullanılır. α -Amilaz nişastayı seçici olarak kaldırır ve fibrillere zarar vermez. *Bacillus* suşundan elde edilen amilaz, tekstil endüstrisinde oldukça uzun süredir kullanılmaktadır (Souza 2010).

1.9.5. Kağıt endüstrisi

Kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde kaplama işleminde α -amilazlar ile nişasta modifikasyona uğratarak düşük viskoziteli nişasta üretilir. Kağıt endüstrisinde kaplama işlemiyle kağıtın yazı kalitesini iyileştirmek için kağıtın yüzeyini yeterince yumuşak ve güçlü yapmaya yarar. Doğal nişastanın viskozitesi kağıtın sertleşmesi için çok yüksektir. Bu α -amilazlarla kısmen degrede edilerek değiştirilebilir. Nişasta, kağıdın iyi kaplamasının yanı sıra kalitesini ve silinmesini iyileştirmek için iyi bir sertleştirme ajanı olarak kullanılmaktadır (Souza 2010).

1.9.6. Yakıt olarak alkol üretimi

Etanol en çok kullanılan sıvı biyoyakıttır. Etanol üretimi için nişasta, dünyanın birçok bölgesinde maliyetinin düşük olması ve kolayca elde edilebilen hammaddesi nedeniyle en çok kullanılan substrattır (Chi *et al.* 2009). Bu üretimde, iki enzimatik aşamayla etanol üretimi gerçekleştirilir. İlk olarak nişastanın etanole dönüştürülmesi için nişastanın bir amilolitik mikroorganizma ya da α -amilaz gibi enzimler kullanılarak şekere dönüştürülmesi ardından da mayalama için *Saccharomyces cerevisiae* gibi bir etanol fermantasyon mikroorganizması kullanılarak etanol üretiminin gerçekleştirilmesi gereklidir (Toksoy 2006). Ayrı sakarifikasyon işlemine gerek kalmadan doğrudan nişastadan etanol üretebilen yeni bir maya suşu elde etmek için, amilolitik maya *Saccharomyces fibuligera* ve *Saccharomyces cerevisiae* arasında protoplast füzyonu gerçekleştirilmiştir (Sanchez and Cardona 2008).

1.10. Proteazlar

Proteazlar, ilkel organizmalarda protein katabolizması ve aminoasidin oluşumu için gerekli basit yıkıcı enzim olarak protein evriminin en erken aşamasında ortaya çıkmıştır (López-Otín and Bond 2008). Proteazlar (peptidazlar veya proteolitik enzimler), diğer proteinlerdeki peptit bağlarının hidrolizini katalize eden geniş bir enzim grubu oluşturur. Proteazlar, tüm canlı organizmalarda bulunan proteinlerin peptid bağını peptid ve aminoasitlere hidroliz eder. Proteolitik enzimler bütün canlı organizmalarda bulunur ve hücre büyümesi ve farklılaşması için zorunludur. Proteazlar, protein katabolizması, kan pıhtılaşması, hücre büyümesi ve göçü, doku düzenlemesi, gelişimde morfogenezis, inflamasyon, tümör büyümesi, zimojenlerin aktivasyonu, prekürsör proteinlerden farmakolojik olarak aktif peptitlerin ve hormon salınması gibi birçok fizyolojik ve patolojik süreçte kritik role sahiptir (Rao *et al.* 1998).

Proteolitik enzimler, etki alanlarına göre ekzopeptidaz ve endopeptidaz olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Ekzopeptidazlar sadece polipeptit zincirlerinin uçlarının yakınında etkindir. N veya C terminusundaki hareket alanlarına göre amino ve karboksipeptidaz olarak sınıflandırılırlar. Aminopeptidazlar (EC 3.4.1.4), polipeptit zincirinin serbest N ucunda hareket eder ve tek bir amino asit kalıntısı, bir dipeptit ya da bir tripeptidi serbest bırakır. Karboksipeptidazlar, polipeptit zincirinin C terminallerinde hareket eder, tek bir amino asidi ya da bir dipeptidi serbest bırakır. Karboksipeptidazlar enzimlerin aktif bölgesinde amino asit kalıntılarının doğasına dayalı serin peptidazlar (EC 2.4.1.6), metalopeptidazlar (EC 2.4.1.7) ve sistein peptidazlar (EC 2.4.1.8) olmak üzere üç büyük gruba ayrılır. Endopeptidazlar, polipeptit zincirinin iç bölgelerindeki peptid bağlarını hidroliz eder. Endopeptidazlar, katalitik mekanizmalarına dayanarak serin proteazları (EC 2.4.2.1), sistein proteazlar (EC 2.4.2.2), aspartik proteazlar (EC 2.4.2.3) ve metalloproteazlar (EC 2.4.2.4) olmak üzere dört alt gruba ayrılır. Ayrıca proteazlar yüksek aktiviteye sahip oldukları pH aralığına göre asidik (pH 2,0 ile 6,0), nötr (pH 6,0 ile 8,0) ve alkalın (pH 8,0 ile 13,0) sınıflandırılır (Rao *et al.* 1998; Gupta *et al.* 2002). Serin proteazlar aktif bölgelerinde bir serin grubu taşır ve genellikle pH 7,0-11,0 nötral ve alkalın pH'da aktiftirler. Düşük molekül (18-35 kDa) ağırlığına sahip olup pek çok

endüstriyel uygulamaya sahiptirler. Asidik proteazlar olarak da bilinen aspartik proteazlar katalitik aktivite için aspartik asit rezidülerine sahip olan endopeptidazlardır. Sistein proteazların katalitik aktivitesi için sistein ve histidin rezidülerine sahip olan ve genellikle sistein proteazlar HCN ve sistein gibi indirgeyici ajanlar varlığında aktif olan proteaz grubudur. Metalloproteazlar ise aktiviteleri için bir divalent metal iyonu gereklidir. Metalloproteazların çoğu katalitik aktivite için çinko iyonları gerekirken ancak manganez, bakır, nikel ve kobalt iyonları gerekebilir. EDTA gibi şelatlayıcı ajanlarla inhibe olurlar (Souza *et al.* 2015; Rao *et al.* 1998)

1.11. Proteazın Biyoteknolojik Uygulamaları

Mikrobiyal proteazlar en önemli ve en çok çalışılan hidrolitik enzimler arasındadır. Endüstriyel enzimlerin en büyük grubu olarak bilinir. Enzim pazarında tüm enzimlerin yaklaşık %60'ını oluşturur. Endüstriyel üretimde atık işleme, deri işleme, deterjan endüstrisi, gümüş kazanım, kimyasal endüstrisi ve medikal araştırmalar ve yiyecek endüstrisi gibi endüstriyel alanlarda sayısız uygulaması vardır (Zambare *et al.* 2011).

1.11.1. Deri işleme endüstrisi

Deri et endüstrisinin yan ürünüdür. Son deri ürünü ortaya çıkana kadar bir çok kimyasal muameleye maruz kalır. Deri endüstrisinde ham deriyi işlemek için ısılatma, kireç serpmeye, kıl çıkarma, kireci çıkarma, yağ alma, asitle temizleme gibi aşamalardan oluşur. Mikroorganizma tarafından üretilen alkalın proteazlar kılları çıkarmak için oldukça etkilidir. Çevre kirliliği oluşturan sodyum sülfid gibi kimyasalların kullanıldığı geleneksel metodlardan daha güvenlidir. Alkalın proteaz derinin kollajen olmayan bileşenini hidroliz eder ve deri işlenmesinde albümin ve globulin gibi proteinleri kaldırır (Sabotič and Kos 2012; Banerjee and Ray 2017).

1.11.2. Atık işleme endüstrisi

Keratinaz katı atık problemi oluşturan tüy, kıl, yün, kollajen ve diğer keratin yapıların hidrolizinde önemli rol oynar. Keratinazın mikrobiyal kaynakları geniş substrat spesifikliği nedeniyle atık işlemede çok yararlıdır. Kanatlı ve su ürünleri endüstrisinde yem katkı maddesi olarak tüy ya da diğer atık maddeleri yüksek talebin olduğu keratine dönüştürür (Banerjee and Ray 2017; Verma *et al.* 2017).

1.11.3. Yiyecek endüstrisi

Yiyecek endüstrisinde proteince yüksek diyetlerin hazırlanmasında, çeşitli protein hidrolazların hazırlanmasında, tahıl ezme, bira arındırmasında, pişirme hamurun viskozite özelliklerinin değiştirilmesinde ve peynir yapımında pıhtılaştırma aşamasında kullanılır (Sabotič and Kos 2012). Süt endüstrisinde proteazların başlıca uygulaması peynir üretimidir. Yüksek özgülüğünden dolayı peynir yapımında buzağı rennin tercih edilmiş, ancak zamanla yerini mikrobiyal proteazlar almıştır. Alerjenik bileşikleri azaltarak sağlıklı olmasının yanı sıra gıdaların kalite ve sindirilebilirliğini de artırır.

1.11.4. Gümüş kazanımı

Gümüş; fotoğrafta, MRI, CT taramasında ve X ışında kullanılan filmde değerli bir metal ve ana maliyet bileşenidir. X-ışını filmi, jelatin tabakasında yaklaşık %1,5 ile %2 gümüş içerir. Kullanılmış X-ışını filminden gümüşün geri kazanımı oldukça zordur ve zahmetlidir. Filmin yakılması ve metalik gümüşün oksidasyonu gibi gümüş geri kazanımı için çeşitli kimyasal yöntemler vardır ancak bunlar çevre dostu değildir. Alkalın proteazlar, filmin jelatin tabakasını aktif olarak indirgeyen ve sınırlı gümüşü serbest bırakan bu özel amaç için kullanılır. İlaç endüstrisinde proteazlar yavaş salımlı dozaj formlarının hazırlanmasının yanı sıra terapötik ajanlar olarak da kullanılır. Gümüş kurtarmak için X-Ray filmlerinde kullanılan biyoişleme için alkalın proteazlar kullanılır. İlâveten endüstriyel ve medikal uygulamalarda basit araştırmalarda kullanılır. Örneğin; proteazlar çok seçici peptit bağ parçalanması için protein dizilemede; proteinaz K nükleik

asit izolasyonunda ve tripsin hayvan hücre kültürlerinin korunmasında yaygın olarak kullanılır (Kumaran *et al.* 2013).

1.11.5. Deterjan endüstrisi

Deterjan endüstrilerinde amilaz, proteaz, lipaz, vb. gibi farklı enzim tipleri kullanılır. Bunlar arasında, proteazlar deterjan endüstrilerindeki toplam enzim pazarının yaklaşık %60'ını oluşturmaktadır. Deterjan endüstrilerinde kullanılabilen ideal proteazın iki özelliği olmalıdır; alkalın pH'da stabil ve deterjanla uyumlu olmalıdır.

1.11.6. Kimyasal endüstrisi

Proteazlar, sentetik kimyasal endüstrisinde peptid üretiminde biyokatalizör olarak önemli bir rol oynarlar. Temel olarak, biyoaktif peptitler üretmek için en yaygın yol mikrobiyal proteinlerin hidrolizi yoluyla gerçekleştirilir. Bununla birlikte, bu uygulamanın önemli bir dezavantajı ise susuz ortamda enzim aktivitesinin azaltmasıdır (Sabotić and Kos 2012)

1.11.7. Medikal araştırmalar

Mikrobiyal kaynaklardan elde edilen proteazların, tümör, iltihaplanma, kanser vb. gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde etkili olduğu görülmüştür. Katalitik aktivitenin yanı sıra, proteazlar, çeşitli biyokimyasal yollarda ve hücre sinyalleme, apoptoz, hücre göçü, hücre adezyonu ve metastaz gibi fizyolojik fonksiyonlarda önemli bir ajan olarak kabul edilir. Araştırmacılar, proteaz inhibitörü kullanılarak bu tür proteazların mikrobiyal inaktivasyonunun, anti-kanser ilaçlarının geliştirilmesinde alternatif bir yol olabileceğini bildirmişlerdir. Toksisite açısından bakıldığında, kanser tedavisindeki enzim kullanımının kemoterapötik ajanlara göre avantajı bulunmaktadır (Banerjee and Ray 2017).

1.12. Üçlü Faz Ayırma Sistemi (TPP)

Geleneksel olarak protein saflaştırma karmaşık bir teknikler dizisini içerir. Ancak süreç sürekli olarak saflığı ve verimi artıran ve işlem süresi maliyetini azaltan yöntemler talep eder. Üçlü Faz Ayırma Sistemi (TPP) dikkat çeken saflaştırma yöntemlerinden biridir. Yiyecek, kozmetik, tıpta doğal kaynaklardan biyoaktif moleküllerin ayrımı ve saflaştırması için hızlı, etkili, ekonomik, temiz ve ölçülebilir bir yöntemdir.

İlk kez 1972’de Tan ve Lovrein tarafından yaygın olarak çok miktarda uçucu organik çözücüler, enerji ve zaman gerektiren geleneksel ekstraksiyon ve ayırma tekniklerine umut verici bir alternatif strateji olarak TPP kullanımı önermişlerdir. TPP sürecinde ilk olarak inorganik tuz (genellikle amonyum sülfat) protein içeren ham ekstrakta eklenir ve sonra uygun miktarda organik çözügenle (genellikle t-bütanol) karıştırılır. t-bütanol amonyum sülfat varlığında eklendiğinde t-bütanol proteini çözeltinin dışına iter. Genellikle bir saat içinde t-bütanol içeren üst organik faz ile alt sulu faz arasında ara bir çökelti oluşur (Dennison and Lovrien 1997; Rachana and Jose 2014).

Mikroorganizmaların yanı sıra bitkiler, hayvanlar gibi çeşitli doğal kaynaklardan protein, enzim, enzim inhibitörleri, yenilebilir yağlar, karbonhidratlar ve küçük moleküllü organik bileşikler içeren çok çeşitli biyoaktif moleküllerin etkin bir şekilde saflaştırılması için TPP sistemi kullanılır. TPP sisteminin kullanıldığı 100’den fazla araştırma çalışması vardır. Bu çalışmaların yaklaşık %70’inde enzim ve proteinlerin saflaştırılması odaklanırken %30’inde ise yağ, küçük moleküllü organik bileşikler ve karbonhidratların saflaştırılması çalışılmıştır (Yan *et al.* 2017).

1.13. TPP Ayırma Mekanizması

Enzimleri saflaştırmak için uygulanan bu metotta, ham ekstrakt ya da süspansiyona yeterli miktarda sulu antikaotropik tuz (tipik olarak $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ile bir organik çözücü (tipik olarak t-bütanol) ardışık olarak karıştırılır. Santrifüjden sonra üst t-bütanol fazı, proteince zengin ara faz ve alt sulu faz adlandırılan üç faza ayrılır. Pigmentler, lipidler,

enzim inhibitörleri ve diğer polar olmayan bileşikleri içeren ham ekstraktda üst t-bütanol fazında zenginleşirken sakkaritler gibi bazı polar bileşikler alt sulu fazda yoğunlaşır. Alternatif bir strateji olarak TPP, geleneksel ayırma teknolojileri ile kıyaslandığında çeşitli proteinleri zenginleştirmek ve ayırmak için basit, etkili, temiz biyoayırma teknolojisidir. TPP ayırma işlemleri sırasında proteinleri çöktürmek için amonyum sülfat ve t-bütanol miktarları arasında karşılıklı bir ilişki vardır.

TPP yönteminin pekçok avantajı vardır. TPP yönteminin en büyük avantajlarından biri genellikle oda sıcaklığında 1 saatten az bir sürede gerçekleştirilir ve proseste kullanılan kimyasallar tekrar kullanılabilir. Yöntem kolayca ölçeklenebilmekte ve büyük hacimli ekstraktla kolaylıkla çalışılabilmektedir. TPP'nin tam mekanizması literatürde iyi bildirilmemiş veya tanımlanmamış olsada, genel olarak ayırma işlemlerinin kombinasyonunu içerdiği düşünülmektedir. Salting out, kosolvent çöktürme, izo-iyonik çöktürme, osmotik elektrostatik kuvvetler, konformasyon sıkışması, protein hidrasyon kaymaları gibi genel olarak ayırma işlemlerinin farklı işlem kombinasyonları TPP işlemi sırasında ara fazda protein çökmesine neden olur. TPP metodu esası amonyum sülfat tuzunun dehidrasyon özellikleri, t-bütanolün protein kaldırma gücü özellikleri, organik çözücü t-bütanol ve sülfat anyonları itme ve çekme yeteneklerinden kaynaklıdır. TPP biyoaktif moleküllerin geniş bir aralıkta ekstraksiyon ve saflaştırma çoğu araştırmacılar tarafından genişçe kullanılmasına rağmen TPP nin kullanımı ile ilgili genişçe literatür incelemesi, potansiyel kullanımı ve gelecekteki gelişmeleri eksiktir. (Pike and Dennison 1989; Dennison and Lovrien 1997; Rachana and Jose 2014).

1.14. Tpp Prosesini Etkileyen Faktörler

1.14.1. Amonyum sülfat

Amonyum sülfat iyon gücü ve yüksek çözünürlüğü nedeniyle protein salting out için en çok kullanılan inorganik tuzdur. Bunun dışında NH^{+4} ve SO_4^{-2} de bulunan iyonlar protein yapısını stabilize ettiği gösterilmiştir. TPP sisteminde amonyum sülfat konsantrasyonu veya doygunluk önemli bir rol oynar, çünkü protein-protein etkileşimleri ve çökmesi

için sorumludur. Yüksek tuzda, su molekülleri güçlü protein-protein etkileşimlerine neden olur ve tuz iyonları tarafından adsorbe edilir ve hidrofobik etkileşimler ile protein moleküllerinin çökmesini sağlar.

1.14.2. t-bütanol

Büyükluğu ve dallanmış yapısı nedeniyle t-butanol olduğu katlanmış protein moleküllerinin içine kolayca nüfuz edemediğinden denatürasyona yol açmadığı bilinir. TPP yönteminde t-butanol konsantrasyonu oldukça önemlidir. Düşük t-bütanol konsantrasyonları, amonyum sülfat ile yeterince sinerjize olmadığı gibi yüksek konsantrasyonlarda ise protein denatürasyonuna ve proteinlerin çökmesine engel olabilir. Ayrıca t-butanol miktarı artırılması TPP işlemi sırasında hedef ürünün verimini arttırmaz çünkü t-butanol miktarı artırılması, çözeltinin viskozitesini artırır. Viskozite arttıkça molekül hareketliliği azalır, moleküllerin etkileşime girmesi zorlaşır. Bu nedenle bu yöntemde kullanılacak t-butanolün miktarı iyi belirlenmesi gerekir.

1.14.3. pH

TPP ayırma işleminde pH proteinlerin ayırma işleminde pozitif etkiye sahiptir. pH değişimi nedeniyle proteinlerin yüzeyinde aminoasit rezüdülerinde değişimlerle sonuçlanır. TPP sisteminde kullanılan pH değeri izoelektrik pH'nın yukarısında ise protein yüzeyindeki amino asit kalıntıları net bir negatif olarak yüklenir ve sonuç olarak, protein sulu fazda kalır. Tam tersine, TPP sürecinde pH değeri izoelektrik pH'nın altındaysa protein ara fazda çöker.

1.14.4. Sıcaklık

TPP ayırma işlemlerinde düşük sıcaklık gereksinimi bildirilmemesine rağmen sıcaklığın TPP'nin performansı üzerinde önemli bir etkisi olduğu görülmüştür. Birçok çalışmada, TPP yöntemi, kullanılarak 20-40°C'lik bir sıcaklık aralığının optimal olduğunu göstermiştir. Üstelik sıcaklık arttıkça 40°C'nin üstünde, t-bütanolün uçuculuğu yavaşça

artar ve çözücünün hacmi azalır. Daha az miktarlarda t-bütanol oluşması durumunda ise amonyum sülfat ile sinerjik etki azalır, böylece daha düşük bir ekstraksiyon verimi elde edilir. Ayrıca TPP işlemi sırasında daha yüksek sıcaklık, daha büyük enerji tüketimine yol açar (Yan *et al.* 2017).



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Singh *et al.* (2018) tarafından yapılan çalışmada *Bacillus subtilis* K-1'den (BSK-1) saflaştırılan proteazın karakterizasyonu çalışılmıştır. BSK-1'den proteaz enzimini saflaştırmak için amonyum sülfat çökeltilmesi ve iyon değişimi kromatografisi kullanılmış ve enzim 5,21 kat saflaştırıldığı bildirilmiştir. BSK-1 proteazın moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile 42 kDa olarak saflaştırılmıştır. BSK-1 proteaz aktivitesi için optimum sıcaklık ve pH sırasıyla 50°C ve 10,0 olarak belirlenmiş ve proteaz yüksek sıcaklıklarda (60-80°C) ve geniş bir pH aralığında (pH 7,0-11,0) belirgin aktivite ve stabilite gösterdiğini bildirmiştir. Elde edilen proteaz birçok organik çözücüye ve diğer potansiyel enzim inhibitörlerine karşı dayanıklılık göstermiştir. Fenilsetilsülfonil fluorür varlığında belirgin aktivite kaybı olduğundan enzimin bir serin proteaz olduğu belirtilmiştir. BSK-1 proteazı için kinetik parametreler (K_m ve V_{max}) sırasıyla 0,14 mg/ml⁻¹ ve 1176 mg/min⁻¹ olarak bulunmuştur. BSK-1 proteazının proteaz geninin nükleotid sekansından türetilen putatif amino asit sekansı ile enzimin S8 / S53 süper ailesine ait olduğu belirlenmiştir.

Niyonzima *et al.* (2014) tarafından yapılan çalışmada *Bacillus flexus* XJU-1 suşundan submerged bir fermentasyonla ortak bir besiyerinde optimum seviyede alkali amilaz, alkali lipaz ve alkalın proteazı eşzamanlı olarak üretimi gerçekleştirilmiştir. Çalışmada amilaz, proteaz ve lipazı indüklemek için %0,5 nişasta, %0,4 kazein ve %0,5 pamuk tohumu yağının kültür ortamına eklendiği bildirilmiştir. Çalışmada kazein üç enzim için azot kaynağı olarak görev yaptırdığı nişastanın ise hem lipaz hem de proteaz için karbon kaynağı olarak görev yaptığı belirtilmiştir. Maksimum enzim üretimi %1,5 kazein, %1,5 çözünebilir nişasta, %2 pamuk tohumu yağı, nitrojen kaynağı olarak %1 soya fasulyesi unun eklendiği pH 11,0 sıcaklığın 37°C olarak düzenlendiği bir fermentasyon ortamında bir fermentasyon ortamında gerçekleştirildiği bildirilmiştir. Çalışma sonucunda amilazın 24. saat lipaz ve proteaz enzimi için ise 48. saatin optimum inkübasyon süresi olduğunu tespit edilmiştir. Çalışmada lipazın (37,72 U/mL), amilazın (29,63 U/mL) 1,27 kat ve proteazdan (6,45 U/mL) ise 5,85 kat daha yüksek miktarda üretildiği bildirilmiştir. Çalışma mikrobiyal kaynaklı 3 alkali enzimin eşzamanlı olarak üretimi ilk kez çalışıldığı belirtilmiştir.

Amid *et al.* (2014) tarafından pitaya kabuğundan amilaz enzimini saflaştırmak için amonyum sülfat çöktürmesi, jel filtrasyonu ve iyon değişim kromatografisi kullanılarak %72,1 verim ile 234,2 kat saflaştırıldığı bildirilmiştir. Jel filtrasyon kromatografisi ile SDS-PAGE’de enzimin yaklaşık olarak 42,1 kDa’lık bir moleküler ağırlığa sahip olduğu belirtilmiştir. Amilazın K_m ve V_{max} değeri sırasıyla 2,7 mg/ml ve 34,30 U/dak/mg olarak tespit edilmiştir. Enzimin optimum pH’sının 5,0 olduğu pH 5,0-11,0 arasında ise yüksek derecede aktif ve stabil olduğu belirtilmiştir. Enzimin çözünür nişasta, amilopektin, glikojen ve pullan için oldukça seçici olduğu belirtilmiştir. Saflaştırılan amilazın, kalsiyum gerektirmediği ve yüzey aktif maddeler ve oksitleyici maddeler açısından aşırı stabilite sergilediği belirtilmiştir. Güçlü bir şelatlama ajanı olan EDTA’nda, enzimin stabilitesinde önemli bir etkiye sahip olmadığı bildirilmiştir.

Mukhtar *et al.* (2012) tarafından topraktan izole edilen *Bacillus subtilis* izolatından 7,5 L’lik laboratuvar ölçekli ve bilgisayar kontrollü bir biyoreaktörden α -amilaz ve proteaz enziminin eşzamanlı olarak üretimi çalışılmıştır. Çalışmada *Bacillus subtilis*’in enzim üretimiyle büyüme ve sporulasyon arasındaki korelasyon incelendiğinde ve bakteriyel büyüme ekimden 24 saat sonra maksimum değere ulaştığı inkübasyondan 42 saat sonra maksimum sporulasyonun meydana geldiği bildirilmiştir. Alkalın proteaz ve α -amilaz üretiminin maksimum sporulasyonla eşleştiği belirtilmiştir. Fermantasyon sıvısında bir nötr ve bir alkalın proteaz olmak üzere sırasıyla en fazla 7,0-8,0 ve 8,0-10,0 arası bir pH aralığında aktif olan iki tip proteaz tespit edilmiştir. 37°C’lik bir inkübasyon sıcaklığında maksimum proteaz üretimi gözlemlendiği belirtilmiş, maksimum amilaz üretimi ise 40°C’de olduğu belirtilmiştir. Optimum havalandırma ve çalkalama seviyelerinin proteaz üretimi için 0,6 U/ L/ dk ve 200 rpm; α -amilaz için 0,6 U/ L/ dk ve 150 rpm olduğu bulunmuştur.

Dyk *et al.* (2010) tarafından yapılan çalışmada bitki biyomaslarını deşere eden mikroorganizmaların bu tür substratları bozmak için çoklu enzim ürettiği değerlendirilerek, *B. licheniformis*’in selülotik ve hemiselolitik enzimler çalışılmıştır. *B. licheniformis* SVD1’in birchwood ksilanında kültüre edildikten sonra zimogram analiziyle enzim içeriği iki endoglukanaz (25-27 kDa, 30-32 kDa’da), yedi ksilanaz (20 kDa, 38 kDa, 42 kDa, 45 kDa, 48 kDa, 54 kDa ve 70 kDa’da), iki mannanaz (25 kDa, 40-42 kDa)

ve bir pektinaz (70-72 kDa'da bir pektat liyaz) tespit edilmiştir. SDS-PAGE analizinde ise 17 farklı protein türü tespit edilerek zimogram analizi ile sadece 9 tanesi tanımlanabildiği bildirilmiştir.

Rawdkuen *et al.* (2010) tarafından yapılan çalışmada proteolitik aktivite gösteren kurutulmuş papaya kabukları taze kabuklara proteaz için ekstraksiyonu yapıldıktan TPP işlemi ile optize edilmiştir. İlk olarak ham ekstrata %40 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ üzerine homojenat: t-bütanol 1,0:0,5; 1,0:1,0, 1,0:1,5 ve 1,0:2,0 oranlarında t-bütanol eklenerek saflaştırma katsayısının en yüksek olduğu t-bütanol oranı belirlenmiştir. Belirlenen t-bütanol oranı %20, 30, 40 ve 50 (w/v)'de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ konsantrasyonlarının etkisi incelenerek tuz oranı belirlenmiştir. En yüksek aktiviteyi veren Tpp fazı, ikinci Tpp de optimizasyon için başlama materyali olarak seçilerek diyaliz olmaksızın seçilen faz 1,0:0,5 oranında t-bütanol ile %50, 55 ve 60 (w/v) oranında $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eklenilmiştir. t-bütanol artışı verim ve saflaştırma katsayısında azalış gözlemlendiği bildirilmiştir. Şayet t-bütanol içeriği yüksekse protein denatürasyonu daha yüksek olduğu belirtilmiştir. İkinci TPP yapılma amacı ilk TPP nin verimli olarak protein kirliliğini kaldırmak için yapıldığı belirtilmiştir. Yaklaşık %89,4'lük verim ile 10,1 kat saflaştırıldığı belirtilmiştir.

Dey *et al.* (2009) tarafından yapılan çalışmada *Aspergillus awamori*: nakazawa MTCC 6652'dan tek bir biyoreaktörde eş zamanlı olarak üretilen glukoamilaz ve asit proteazı aseton çöktürmesi ve iyon değişimi kromatografisi ile saflaştırdıktan sonra karakterize edilmiştir. Her iki enzim pH (3,0–9,0) ve sıcaklık (25-70°C) sıcaklık aralığında kararlı bulunmuştur. Amilaz ve proteazın optimum pH'ları sırasıyla pH 4,0 ve 5,0 elde edilmişken optimum sıcaklık sırasıyla 70°C ve 55°C için en uygun sıcaklık olarak tespit edilmiştir. Glikoamilazın yarı ömrü sırasıyla 50, 60, 70 ve 80°C'de 210, 120, 60 ve 35 dk olarak proteazın ise 40, 50, 60 ve 70°C sırasıyla 150, 120, 65 ve 15 dakika olarak tespit edilmiştir. Glukoamilaz ve proteazın sırasıyla K_m ve V_{max} 9,8 mg / ml, 56,2 mg / ml / dk ve 1,08 mg/ml, 8,8 mg/ml/dak. olarak bulunmuştur. Glukozamilaz aktivitesi düşük miktarda (1 mM) Mn^{+2} hariç neredeyse tüm metal iyonları, Ca^{+2} , Co^{+2} , Cu^{+2} , Fe^{+3} , Mg^{+2} , Zn^{+2} ve Hg^{+2} artırdığı proteaz aktivitesini ise Zn^{+2} dışındaki tüm iyonlar tarafından inhibe ettiği bildirilmiştir. Düşük konsantrasyonda, yani (%0,03 a/ h) Triton X-100 ve SLS'nin

glukoamilaz aktivitesini arttırdığı, yüksek konsantrasyonda her iki enzimide inhibe ettiği bildirilmiştir. β -merkaptoetanol, %0,25 (v / v) seviyesinde amilazı ve proteaz aktivitesini 1,6 ve 3,0 arttırırken %0,5 (v / v) varlığında ise her ikisinin de aktivitesini inhibe ettiği bildirilmiştir. 0,5 M'lık üre konsantrasyonunda, glukoamilaz aktivitesi artarken, 5 M'lık üre konsantrasyonunda inhibe ettiği tespit edilmiştir.

Dhananjay *et al.* (2008) tarafından *Aspergillus oryzae* ekstraktından α -galaktosidaz ve invertaz enzimleri TPP metoduyla %50 ve %54 verimle 15 ve 12 kat saflaştırıldığı bildirilmiştir. Çalışmada Amonyum sülfat (%30 w/v) ve 1:1 homojenat: t-bütanol ilave edilmiş ve 1 saat sonra karışım santrifüjlendikten (10 dakika boyunca 2,000 g) sonra üç faz oluştuğu bildirilmiştir. Alt sulu fazda %90 α -galaktosidaz ve %95 invertaz kaldığı alt sulu faz farklı koşullarda ikinci kez TPP yapıldığı bilinmiştir. İki enzimin fizikokimyasal yapıları farklı olduğu için ikinci TPP farklı şartlarda gerçekleştirildiği belirtilmiştir. Sulu fazda diğer proteinlerin çoğundan ayrılarak α -galaktosidaz enzimi pH 4,3'te invertaz enzimi ise pH 5,0'da ara fazda toplandığı bildirilmiştir. Tpp sonucu oluşan orta fazlar SDS-PAGE'le analiz edildiği bildirilmiştir.

Zhang *et al.* (2004) alkalofilik *Bacillus* suşları çoklu enzimleri karışık bir kültür sisteminde üretilerek alkalın amilaz ve selüloz enzimi üretilmiştir. Karışık kültür, iki tür alkalofilin aynı kültürde büyümesini sağladığı bildirilmiştir. Saf kültür karışık kültürle karşılaştırıldığında alkali amilazın benzer bir verimlilik sergilediği karışık kültür alkalın selüloz hücre yüzeyinden besiyerine salgısını hızlandırmış ve pratik uygulamada diğer enzimlere zararlı olabilecek proteaz aktivitesini düşürdüğü belirtilmiştir. Bulgular, karışık alkalofilik kültürün alkali çoklu enzimlerin üretimi için yararlı bir yöntem olduğunu gösterdiği bildirilmiştir. Aynı anda hem nişasta hem de çözünür selülozı degrede eden amilaz ve selüloz etanol ile çöktürülerek aktivitelerine bakılmıştır.

2.1. Tezin Amacı

Endüstriyel pazarda üretilen enzimlerin yaklaşık %60'ını proteaz oluştururken geri kalan enzimlerin yaklaşık %30'unu ise amilaz enzim grubu oluşturur. Deterjan endüstrisi gibi pek çok alanda birden fazla enzim grubuna ihtiyaç vardır. Özellikle alkalın amilaz ve proteaz deterjan endüstrisinde geniş bir kullanım alanına sahiptir. Termofil bakterilerden izole edilen enzimlerin sıcaklık, pH'ya dayanıklılık göstermesi ile endüstriyel anlamda önem kazanmıştır.

Bu tez kapsamında; daha önce su kaynaklarından izole edilen bakterilerden amilaz ve proteaz için en iyi zon veren OSBS6'nın moleküler tanısı yapılarak üçlü faz ayırma (TPP) sistemi ile amilaz ve proteaz enziminin kısmi saflaştırılması ve biyokimyasal karakterizasyonu amaçlanmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Tez çalışmasında, daha önce çeşitli sıcak su kaynaklarından izole edilen bakteri suşlarının petri denemesiyle amilaz ve proteaz aktivitesi en iyi bakteri tespit edildi.

3.1.1. Tezde kullanılan kimyasallar ve kitler

Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar ve kitler Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Tez çalışması boyunca kullanılan kimyasallar ve kitler

KİMYASALLAR ve KİTLER	ŞİRKET
Agaroz	Sigma
DTNB	Sigma
Agaroz DNase-RNase-Protease free	Sigma
Distile Su	Sigma
Amfisilin	Sigma
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Sigma
Amonyum sülfat	Thermo
DNA Marker	Thermo
Etidyum Bromür	Sigma
Etil Alkol	Sigma
Etilendiamintetraasetikasit (EDTA)	Sigma
Lizozim	Sigma
Hidroklorik Asit (HCl)	Sigma
Gliserol	Sigma
Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	Sigma

Çizelge 3.1. (devam)

Izopropil β -D-thiogalaktozid (IPTG)	Sigma
İzopropanol	Sigma
Kalsiyum Klorür (CaCl_2)	Sigma
Magnezyum Klorür (MgCl_2)	İnvitrogen
N,N,N'',N''-Tetrametilendiamin (TEMED)	Sigma
Promega WizardR Plus Minipreps DNA Purification Systems (Plazmit izolasyon kiti)	Promega
RNaz A	Invitrogen
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Sigma
t-Bütanol	Ensure
Coomassie Brilliant G-250	Fluka
Fosforik Asit	Sigma
Bovin Serum Albumin	Sigma
3-N-Morfolino Propansülfonik Asit (MOPS)	Sigma
TSA (Tryptic Soy Agar)	Lab M
TSB (Tryptic Soy Broth)	Lab M
LB (Luria-Bertani)	Sigma
NB (Nutrient Broth)	Oxoid
Starch form rice	Sigma
Starch form rice	Sigma
Starch wheat	Sigma
Starch form patato	Sigma
Formamid	Sigma
Fenilmetansülfonilflorür (PMSF)	Sigma
Sodyum Karbonat (Na_2CO_3)	Sigma
Trizma Base	Sigma
Potasyum Fosfat Monobazik (KH_2PO_4)	Sigma
D-Glukoz Monohidrat	Sigma
α -Siklodekstrin	Sigma
β -Siklodekstrin	Sigma
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Sigma
Potasyum Sodyum Tartarat (K-Na Tartarat)	Sigma
Hidroklorik Asit (HCl)	Sigma

3.1.2. Tez çalışmasında yararlanılan materyal ve cihazlar

Çizelge 3.2. Tezde kullanılan laboratuvar cihazları

EKİPMAN ADI	ŞİRKET
Hassas terazi	Ohaus Pioneer
Çalkalayıcı İnkübatör	ZHWY – 2102C
Spektrofotometre	Beckman coulter
Santrifüj	Hettich
Buzdolabı	Vestel
Kuru Hava Sterilizatörü	Telstar Bio II-A
Otoklav	HMC Hirayama
Mikroskop	Leica
Jel Görüntüleme Cihazı	Quantum Vilber Courmat
Su Banyosu	Memmert
Çoklu Blok Isıtıcı	Lab-Line
Dijital Isıtıcı	VWR
Etüv	Binder
PCR Cihazı	SensoQuest
Manyetik Karıştırıcı	Heidolph
pH Metre	Mettler Toledo
Vorteks	Fisons
Mini Santrifüj	Hangzhou Allheng
SDS-PAGE Elektroforez Cihazı	Bio-rad
Agaroz Jel Elektroforez cihazı	Thermo EC
Çalkalayıcı İnkübatör (37	Edmund Bühler Gmbhl
Mikrodalga Fırın	Beko
Saf Su Cihazı	MP Minipure
Çeker Ocak	TÜV-SÜD
Deep- Freeze (-86	Glacier
Elektroforez Cihazı	Sigma Aldrich

Çizelge 3.2. (devam)

Güç Kaynağı	Thermo EC EC 135-90
Kar Üretme Cihazı	Scotsman
Magnetik Karıştırıcı	Heidolph MR Hei-standart
Mikrodalga Fırın	Beko MD 1500
Nanodrop	Thermo Scientific Multiscan GO USA
Etüv	BINDER
Vorteks	Wisd WiseMix VM-10

3.1.3. Tez çalışmasında kullanılan çözeltilerin hazırlanışı

3.1.3.a. Bakteri izolatının moleküler analizi için kullanılan çözelti ve tamponlar

EDTA Tamponu (50mM pH 8,0); 0,73 gr EDTA 40 mL distile su içerisinde çözüldü. 1 N HCl ve 1 N NaOH ile pH'sı 8,0'e ayarlandıktan sonra 50 mL olacak şekilde hazırlandı.

%70'lik EtOH; 35 mL EtOH 15 mL distile su ile tamamlanarak hazırlandı.

CaCl₂ Solüsyonu (100mM); 0,61 gr CaCl₂ tartılarak son hacim 50 ml olacak şekilde distie su eklendikten sonra otoklavlandı.

Amfisilin Solüsyonu; 20 mg/mL olacak şekilde 10 ml distile su içerisinde 0,2 gr amfisilin tartılarak hazırlandı ve 0,22 µm çaplı milipor filtreden geçirildikten sonra kullanıldı.

X-Gal Solüsyonu; 40 mg/mL olacak şekilde 10 mL distile su içerisinde 0,4 gr X-Gal tartılarak hazırlandıktan sonra ışıktan muhafaza edildi.

IPTG Solüsyonu; 23,8 mg/mL olacak şekilde 10 mL distile suda 0,238 gr IPTG tartılarak hazırlandı ve sonra 0,22 µm çaplı filtreden geçirildikten sonra -20°C'de muhafaza edildi.

3.1.3.b. Bakteri izolatının morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesinde kullanılan çözelti ve tamponlar

%3'lük KOH çözeltisi; 1,5 g KOH son hacmi 50 ml olacak şekilde distile su içerisinde çözdürülerek hazırlandı.

%7'lik H₂O₂ çözeltisi; 3,5 mL H₂O₂'in hacmi, distile su ile 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

3.1.3.c. Enzim tayini için kullanılan çözelti ve tamponlar

Tris – HCl Tamponu (100mM pH:8,5); 0,605 gr Trisma base 40 mL distile su içerisinde çözdürüldükten sonra 1M'lık HCl ile pH'sı 8,5'a ayarlandı, son hacim 50 mL'ye tamamlandı.

%0,65 (w/v)'lik Kazein Çözeltisi; 0,325 gr kazein tartıldıktan sonra 100 mM'lık pH'sı 8,5 olan Tris-HCl tamponundan 40 mL üzerine eklenerek kazein çözünene kadar NaOH eklendi. Daha sonra pH 8,5 ayarlandıktan sonra hacim 50 mL'ye tamamlandı.

Triklorik Asit Çözeltisi (110 mM TCA); 0,895 gr TCA 50 mL distile suda çözülerek hazırlandı.

Sodyum Karbonat Çözeltisi (0.5M Na₂CO₃); 2,65 gr Na₂CO₃ 50 mL distile suda çözülerek hazırlandı.

Folin-Ciocalteu (0,5M F-C Reaktifi); 25 mL F-C reaktifi üzerine 100 mL olacak şekilde distile su ile tamamlandı.

MOPS Tamponu; 0,52 gr MOPS tartılarak 40 mL distile suda çözüldükten sonra pH 7,0'a ayarlandı. Son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

%2'lik Nişasta Çözeltisi; 1 gr patates nişastası tartılarak 40 mL pH 7,0 olan MOPS tamponu içerisinde çözdürüldükten sonra pH 7,0 ayarlandı son hacim distile su ile 50 mL tamamlandı.

Lügel Solüsyonu; 0,5 gr iyot ve 1 gr KCl tartılarak, 40 mL distile suda çözdürüldükten sonra son hacim 50 mL'ye tamamlandı.

DNS Çözeltisi; 35 mL saf su içerisinde 0,5 gr DNS ve 15 g sodyum potasyum tartarat çözüldü. Aynı bir beherde 10 mL saf suda 0,8 gr NaOH çözülerek bu karışım DNS içeren çözeltiye ilave edildi ve son hacim 50 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.d. Protein analizi için kullanılan çözelti ve tamponlar

Bradford Çözeltisi; %95'lik 25 mL EtOH'de 0,05 gr Coomassie Brilliant Blue G-250 tartılarak çözdükten sonra 50 mL %95'lik fosforik asit eklendi ve distile su ile 500 mL tamamlandı. Karanlık ortamda ve oda sıcaklığında muhafaza edildi.

3.1.3.e. SDS-P AGE için kullanılan çözelti ve tamponlar

Tris-HCl (1M pH 8,8); 6,05 gr Trisma base tartılarak distile suyla 45 mL tamamlandı. 1 N HCl ile pH'sı 8,8'e ayarlandıktan sonra son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

Tris-HCl (1M pH 6,8); 6,05 gr Trisma base tartılarak distile suyla 45 mL tamamlandı. 1 N HCl ile pH'sı 6,8'e ayarlandıktan sonra son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

Akrilamid-Bisakrilamid Çözeltisi (%30-%0,8); 3 gr akrilamid ve 0,08 gr bisakrilamid tartıldıktan sonra 6,92 mL distile suyla tamamlandı.

SDS Çözeltisi (%10); 1 gr sodyum dodesil sülfat üzerine 9 mL distile su eklenerek hazırlandı.

PER Çözeltisi (%10); 1 gr amonyum persülfat üzerine 9 mL distile su eklenerek hazırlandı.

Yürütme Tamponu; 6 gr Tris, 28,8 gr glisinine üzerine 20 mL %10'luk SDS eklendi. Son hacim 2000 mL tamamlandıktan sonra pH 8.3'e ayarlandı.

Numune Tamponu; 325 µL Tris-HCl (1M pH 6,8) üzerine 50 µL %10'luk SDS, 500 µL gliserin ve 500 µL %1'lik Bromfenol mavisi eklendikten sonra çözeltinin son hacmi 5 mL'ye tamamlandı. SDS-PAGE için kullanılacaksa hazırlanan tamponun içerisine 250µL β-Merkaptoetanol eklenirken zimogram analizi için kullanılacaksa β-Merkaptoetanol eklenmeden kullanıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

3.1.3.f. Gümüş boyama için kullanılan çözelti ve tamponlar

Tespit Çözeltisi; 30 mL distile su, 15 mL %96'luk EtOH ve 5 mL asetik asit eklendi.

Redüksiyon Çözeltisi; 40 mL didistile suyun üzerine 22,5 mL EtOH eklendikten sonra 2,4 gr sodyum asetat konularak karıştırıldı. Asetik asitle pH 6,0'ya ayarlandıktan sonra üzerine 0,075 gr sodyum tiyosülfat ve 2 mL glutaraldehit eklendikten sonra son hacim distile su ile 75 mL'ye tamamlandı.

Boyama Çözeltisi; 25 mL didistile su içerisinde 10 µL formaldehit eklendikten sonra en son 0,05 gr gümüş eklenerek kullanılıncaya kadar karanlıkta muhafaza edildi.

Yıkama Çözeltisi; 1,875 gr sodyum karbonat tartılarak 135 mL distile su eklendikten sonra üzerine 60 µL formaldehit ilave edilerek hazırlandı.

3.1.4. Tezde kullanılan besiyerlerinin hazırlanışı

Trypton Soy Agar (TSA); 15 gr/L tripton, 5gr/L sodyum klorid, 5gr/L soya pepton, 12gr/L agar içerikli hazır besiyerinden hazırlanarak 121°C 15 dakika otoklavlandı.

Trypton Soy Broth (TSB); 2,5 gr/L Dipotasyum hidrojen fosfat, 17 gr/L Tripton, 3gr/L soya pepton, 5gr/L sodyum klorid, 2,5 gr/L dekstroz içerikli hazır besiyerinden 30 gr tartılıp, 1000 mL distile suda çözüldü ve 121°C 15 dakika otoklavlandı.

Proteaz Katı Besiyeri: 1 gr/L K_2HPO_4 , 0,05 gr/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 gr/L KCl tartılarak 1000 mL distile suda çözüldü ve 121°C 15 dakika otoklavlandıktan sonra 48 gr/L Skim Milk Powder tartılarak eklendi. 5 dakika karıştırıcıda çözdürüldükten sonra petrilere döküldü.

Proteaz Sıvı Besiyeri: 1 gr/L K_2HPO_4 , 0,05 gr/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 gr/L KCl, 37 gr/L TSA tartılarak 1000 mL distile suda çözüldü ve 121°C 15 dakika otoklavlandıktan sonra 48 gr/L Skim Milk Powder tartılarak eklendi. 5 dakika karıştırıcıda çözdürüldü.

Amilaz Katı Besiyeri: 12 gr/L agar, 3gr/L pepton, 3gr/L sığır ekstraktı, 8 gr/L sodyum klorid içerikli Nutrient agar (NA) besiyerinden 1 L distile su içerisine 28 g Nutrient Agar tartılarak 10 gr/L nişasta eklenerek 1000 mL didistile suda çözüldü ve 121°C 15 dakika otoklavlandıktan sonra petrilere döküldü.

Amilaz Sıvı Besiyeri: 5gr/L pepton, 2 gr/L maya ekstraktı, 1gr/L sığır ekstraktı, 5 gr/L sodyum klorid içerikli Nutrient Broth (NB) besiyerinden 1 L distile su içerisine 13 g Nutrient Agar tartılarak 10 gr/L nişasta eklenerek 1000 mL didistile suda çözülerek 121°C 15 dakika otoklavlandı.

Karışık (Mix) Besiyeri: Amilaz sıvı besiyeri ve proteaz sıvı besiyeri 121°C 15 dakika otoklavlandıktan sonra 1:1 oranında karıştırılarak hazırlandı (Zhang 2004).

3.2. Yöntem

3.2.1. Bakteri seçimi

Yapılan tez çalışmasında kullanılacak bakterinin belirlenmesi için çeşitli su kaynaklarından izole edilmiş bakteriler önce TSA besiyerine inoküle edilerek 55°C'ye inkübatörde 24-48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Büyüyen bakteriler, proteaz ve amilaz katı besiyerlerine inoküle edildi. 55°C'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. 24-48 saat inkübasyondan sonra proteaz katı besiyerinde zon veren bakteriler pozitif kabul edildi. Amilaz katı besiyerine lügol dökülerek koloniler etrafında şeffaf zon veren bakteriler pozitif kabul edildi. Sonra hem amilaz hem de proteaz katı besiyerinde en iyi zonu veren bakteri tespit edildi (Panda *et al.* 2013).

3.2.2. Konvensiyonel özelliklerinin belirlenmesi

3.2.2.a. Morfolojik özelliklerinin belirlenmesi

Seçilen izolatın morfolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla stoktan alınan izolatlar 3-4 faz çizgi ekimi ile TSA besiyerine aktarıldıktan sonra 55°C'de 1 gece inkübe edildi. Lam üzerine yayılan bakteri kültürleri havada kurutulduktan sonra alevden geçirildikten sonra lam üzerine kristal viyole boya solüsyonu ilave edilerek, 3-4 dk bekledikten sonra, saf su ile yıkayıp kurutuldu ve mikroskop altında incelendi (Arda 2000).

3.2.2.b. %3'lük KOH çözeltisi ile gram özelliklerinin belirlenmesi

TSA besiyerinde büyütülen 24 saatlik kültürden alınan bakteri lam üzerine damlatılan %3 KOH çözeltisi ile etkileştiğinde öze aşağı yukarı hareket ettirilir. KOH çözeltisi ile muamele sonucunda gram negatif bakterilerin hücre duvarı parçalandığından viskoz bir yapı oluşur. Viskoz yapının oluşması durumunda bakteriler gram negatif, oluşmaması halinde bakteriler gram pozitif olarak tanımlanır (Saygılı ve Şahin 2006).

3.2.2.c. Katalaz testi

Seçilen bakterinin katalaz enzim aktivitesine sahip olup olmadığını belirlemek için TSA besiyerine inoküle edilerek 24 saat inkübasyona bırakıldı. TSA besiyerinde büyütülen bakterilerden alınarak lam üzerine konularak üzerine %5’lik H₂O₂ bir damla bırakıldı. ze yardımıyla H₂O₂’nin bakteri içerisine nüfuz etmesi sağlandı ve kabarcık oluşturan bakteriler katalaz testi sonucu pozitif kabul edilirken kabarcık oluşturmayan bakteriler katalaz testi sonucu negatif olarak değerlendirildi. (Adığuzel 2006).

3.2.2.d. Oksidaz testi

Oksidaz testleri, canlının elektron transferi sırasında sitokrom c proteinlerine sahip olup olmadığını gösterir. Sitokrom c proteini (oksidaz c), solunum olayında görev alır. Bu test için hazır kitler kullanılır. Eğer oksidaz c sistemi bulunuyorsa, enzimin reaksiyon vermesi sonucunda ortamda mavi renk oluşumu gözlenir. Kit 1 damla steril saf su ile temas ettirildikten sonra zerine TSA besiyerinde büyütülen OSBS6 bakteri suşu bırakıldı. Oksidaz testi sonucu pozitif bakteriler mavi-mor renk oluştuğu gözlenirken, oksidaz test sonucu negatiflerde renk oluşumu gözlenmez (Acar 2009).

3.2.3. Moleküler analiz

16S rRNA gen bölgesinin klonlanması

1. Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonu için OSBS6 izolatu TSA besiyerine inoküle edilerek 55°C’de 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. 24 saatlik inkübasyon sonunda tek koloni alınarak TSB sıvı besiyeri içerisine inoküle edildi. 55°C’lik çalkalayıcı inkübatörde 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. İzolasyonda kit olarak Promega wizardR genomic DNA purification kit (A2360)’nin protokl ile hazırlandı.

- 24 saat inkübasyondan sonra TSB besiyerleri içerisindeki bakteri kültüründen 4 ml alınarak 16000 rpm’de 2 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant atıldıktan sonra, çökelti üzerine 480 µl 50 mM EDTA ve 120 µl 10 mg/mL lizozim ilave edildi, 1 saat 37°C de inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyondan sonra 14000 rpm’de 2 dk santfirüj yapıp, süpernatant uzaklaştırıldı. 600 µl Nüklei Lizis eklenerek homojen hale getirmek için pipetleme yapıldı.
- Sonra 5 dk boyunca 80°C’de inkübe edildikten sonra oda sıcaklığına soğutuldu. 3 µl RNase A eklendikten sonra 30 dk 37°C’de inkübe edildi.
- Tekrar oda sıcaklığında soğutulduktan sonra üzerine 200 µl Protein Presipitasyon solüsyonundan bırakıldı ve 10 sn vortekslendi.
- Buzda 5dk bekletildikten sonra, 14000 rpm’de 15 sn santfirüj yapıldı. Elde edilen süpernatant, içinde 600 µl izopropanol bulunan ependorf içerisine alındı.
- Pellet oluşumu gözle görünür bir şekle gelene kadar, ependorf alt üst edildi. Tekrar 14000 rpm’de 2 dk santfirüj yapıldı ve süpernatant uzaklatırıldı.
- Kurutma kâğıdı üzerinde içindeki sıvının tamamen uzaklaşana kadar beklendi.
- Yıkama amaçlı üzerine %70’lik etanolden 600 µl eklendikten sonra 14000 rpm de 2 dk santfirüjlendi, süpernatantı uzaklaştırılıp 20 dk 37°C’de inkübe edildi.
- Ependorflara 100’er µl DNA Rehidrasyon solüsyonu eklendikten sonra 65°C’de 1 saat beklendikten sonra sonra +4°C’de muhafaza edildi.

2. 16S rRNA PCR işlemi

16S rRNA gen bölgesi evrimsel açıdan da korunmuş bölgeler taşır. 16S rRNA dizisini PCR yöntemiyle çoğaltabilmek için 16S rRNA gen bölgesi 27F (forward 5’- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3’), 1492R (reverse 5’- GGT TAC CTT GTT ACG ACT T -3’) primerleri kullanıldı (Yanmis ve Adiguzel 2014).

Bu aşamada 30µl’lik bir PCR karışımı hazırlandı.

Çizelge 3.3. 16S rRNA PCR'da kullanılan kimyasalların miktarları

Reaktif	Konsantrasyon	Kullanılan Miktar (µL)
PCR Buffer	10X	3
Dntp	25 mM	0,6
MgCl ₂	25 mM	1,8
27F	5 pmol	3
1492R	5 pmol	3
DMSO	99%	1,2
ddH ₂ O	-	14,1
Kalıp DNA	100 ng	3
Toplam		30

Çizelge 3.4. PCR Programının Sıcaklık, Süre, Döngü Sayısı

Aşamalar	Sıcaklık (°C)	Süre(dk)	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	94	2	1
Denatürasyon	94	1	36
Bağlanma	49	1	36
Uzama	72	2	36
Son Uzama	72	5	1

1X TAE tamponu kullanılarak %1'lik agaroz jel hazırlandıktan sonra donma sıcaklığına yakın bir aşamada üzerine 0,4 µl etidyum bromür eklendi ve tarakları yerleştirilmiş olan küvete döküldü. Yaklaşık yarım saat donması beklendi. Donan jelden dikkatlice taraklar çıkartıldıktan ilk kuyuya DNA markır konuldu. PCR ürünü 1 µl 6X yükleme boyası 3 µl ile karıştırılarak yüklendi ve jel 100 voltta 1 saat süreyle yürütüldü. Süre sonunda yürüyen

jel üzerindeki PCR ürünleri Quantum Vilber Lournat Gel Documentation System ile görüntülendi (Adıgüzel 2006).

3. Kompetant hücre hazırlanması

Kompetent hücre olarak *Escherichia coli* JM101 suşu kullanıldı. *Escherichia coli* JM101 suşu LB katı besiyerine inoküle edildi ve 16-24 saat süreyle 37°C'lik inkübatöre bırakıldı. Tek bir koloni LB broth (4 mL) içerisine inoküle edildi ve 1 gece boyunca 37°C'de inkübatörde büyütüldü. 300 µL kültür 2700 µL su ile seyreltilip spektrofotometrede 600 nm dalga ölçüm yapıldı. Çıkan değer seyreltme oranı olan 10 ile çarpıldı. Ayrı bir erleninde hazırlanan 30 mL LB sıvı besiyeri üzerine, hesaplama sonucu eklenmesi gereken kültür miktarı bırakıldı ve 37°C'de çalkalamalı inkübatörde 50-90 dk süre ile inkübe edildi. Yaklaşık 40 dk sonrasında kültürden örnek alınarak 600 nm'de 0,044-0,055 olana dek belirli zaman aralıklarında ölçüm yapıldı. Uygun değere ulaşan kültürden steril tüpler içerisine 8'er mL eklendi ve kültür içerisindeki hücreler 4400 rpm'de 10 dk çöktürülüp süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı. Çökelti üzerine 10 mL 100 mM CaCl₂ soğuk olarak eklendi ve 40 dk buz üzerinde bekletildi. Süre sonunda tüpler +4°C'de, 4400 rpm 10 dk sentrifüjde çöktürüldü. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra üzerine 2 mL CaCl₂ (100 mM) eklenip +4°C'de bir gece bekletildi.

4. Ligasyon işlemi

Steril bir tüpte Çizelge 3.5'de verilen oranlar eklenerek pipetlendi. Daha sonra spin edilerek PCR cihazında 16°C'de 13-15 saat bırakıldı. +4°C'de muhafaza edildi.

Çizelge 3.5. Ligasyon işleminde kullanılan malzemelerin miktarları

Reaktif	Kullanılan Miktar (µl),
Ligasyon Buffer 2X	5
PCR ürünü	3
Vektör	1
T4 DNA Ligaz	1

5. Transformasyon işlemi

Önceden hazırlanıp buzdolabında en az bir gece +4°C’de muhafaza edilen kompetent hücrelerden 200'er µL konulup buzda bekletildi. 42°C’ye ayarlı olan sıcak su banyosuna 2 dk süre ile bekletilerek ısı şokuna maruz bırakıldı. Üzerine ligasyon ürünü eklendikten buzda 30 dk bekletildi.

Karışım ısı şokuna uğratılmak amacıyla buzdan dikkatlice çıkarılıp 42°C'de sabit bir şekilde 2 dk tutuldu. Üzerine LB Broth sıvı besiyerinden 200 µL konulup yaklaşık 1 saat 40 dk süre ile 37°C'lik etüvde inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon süresi sırasında önceden otoklavlanmış amfisilinli katı besi yeri oda ısısına geldikten sonra steril kabin içerisinde 40 µL X-Gal ve 40 µL IPTG pipetlenip petrilere eklenip yayıldı. Daha sonra kompetent + ligasyon ürünü karışımından 150 µl alınarak, LB agar + Amfisilin + X-gal + IPTG içeren besiyerine steril drigalski özesi ile yayma ekim yöntemi ile yayıldıktan sonra 37°C’de yaklaşık 12-14 saat inkübasyona bırakıldı.

6. Kolonilerin seçilmesi ve sıvı kültüre alınması

37°C’de inkübasyona bırakılan petriler 14 saatin sonunda etüvden alınıp +4°C’ye bırakıldı ve bir gece bekletildi. Mavi beyaz koloniler oluşuktan sonra, beyaz koloniler

steril bir pipet ucu ile alınıp içinde 3 mL amfisilinli LB broth besiyeri bulunan tüplere inoküle edildi. 37°C'lik çalkalayıcıda bir gece inkübasyona bırakıldı.

7. Koloni PCR için örneklerin hazırlanması ve PCR işlemi

Amfisilinli LB broth sıvı besiyerinde bir gece inkübasyona bırakılan kültürden 4 µL alınıp, içinde 16 µL steril distile su bulunan tüpe konularak seyreltildi. Su banyosunda 10 dk kaynatıldı ve sonra 2 dk buzda bekletilerek ısı şokuna maruz bırakıldı. Daha sonra 12000 rpm'de 5 dk süre ile santifirüjlendi.

Daha sonra Çizelge 3.6'da verilen reaktifler ve miktarlara göre PCR tüpleri hazırlandı.

Çizelge 3.6. Koloni PCR işleminde kullanılan reaktiflerin yoğunluk ve miktarları

Reaktif	Kullanılan Miktar (µL)
Tampon	3
Dntp	0,6
MgCl₂	1,8
T7 Primer	2
SP6 Primer	2
DMSO	1,2
ddH₂O	16,1
Taq Polimeraz	0,3
Süpernatant	3

Hazırlanan tüpler PCR cihazına yerleştirilip Çizelge 3.7'de verilen değerler girilerek koloni PCR programı çalıştırıldı.

Çizelge 3.7. Koloni PCR programı

Aşamalar	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	94	2dk	1
Denatürasyon	94	30 sn	35
Bağlanma	55	30 sn	35
Uzama	72	2 dk	35
Son Uzama	72	10 dk	1
Saklama	4	∞	

PCR işleminden sonra %1'lik agaroz jel hazırlandı. Agaroz jele, markır, içerisinde istenen geni içeren (pozitif) ve içerisinde gen bulunmayan (negatif) kontroller yüklenerek 90 voltta 1 saat süre ile yürütüldü. Jel görüntülenerek istenen aralıkta bant veren koloniler plazmit izolasyonu için amfisilinli LB broth'a inoküle edildi.

8. Plazmit izolasyonu

Promega A1330 plazmit izolasyon kitine ait protokol uygulanarak, plazmit izolasyonu yapıldı. Protokole göre;

- LB broth besi yerinde bir gece inkübasyona bırakılan kültürden 4 mL alınarak 11000 rpm'de santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- Çöken pelletin üzerine Cell Resuspension Solüsyonu eklendi ve pipetajlanarak homojen hale getirildi.
- Homojen hale getirildikten sonra karışımın üzerine 250 µL Cell Lysis Solüsyonundan eklenerek aşağı yukarı karıştırıldı ve oda sıcaklığında 5 dk bekletildi.
- İnkübasyondan sonra Alkaline Protease Solüsyonundan 10 µL ilave edildi ve oda sıcaklığında 5 dk bekletildi.

- 350 µL Nötralizasyon çözeltisinden üzerine eklendi 13000 rpm'de 10 dk santrifüj yapıldı.
- Süpernatanttan yaklaşık 650–750 µL alındı ve içerisinde kolon bulunan ependorf tüpüne aktarıldı ardından 13000 rpm'de 1 dk süre ile santrifüjlendi.
- Santrifüj sonunda kolona 750 µL Wash Solution eklendi ve tekrar 13000 rpm'de 1 dk santrifüjlendi. Tekrar kolona 250 µL Wash Solüsyonundan eklendi ve 13000 rpm'de 2 dk santrifüjlendi.
- Alta geçen sıvı uzaklaştırılıp 1 dk 13000 rpm'de santrifüj edildikten sonra kolon yeni bir ependorfa aktarıldı.
- Nuclease-Free Water Solüsyonundan 100 µL eklenip 13000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
- Son olarak kolon çıkarılıp uzaklaştırıldı ve tüpler ölçüm yapılana kadar -20°C'de muhafaza edildi.

9. Plazmit Konsantrasyonunun Belirlenmesi

2 µL plazmit, 998 µL didistile su ile karıştırılarak, spektrofotometrede OD260 nm dalga boyunda konsantrasyonu belirlendi. Plazmit konsantrasyonun 100-200 ng olacak şekilde hesaplandı. 30-50 µL örnek alınarak sekans analizi için Macrogen (Hollanda) firmasına gönderildi.

3.2.4. Amilaz ve proteaz enziminin üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu

3.2.4.a. Amilaz ve proteaz enzimi üretimi

Bakteri izolatlarından hem proteaz katı besiyerinde hem de amilaz katı besiyerinde, en iyi zon veren bakteri OSBS 6 suşu tespit edildikten sonra moleküler tanısı yapıldı. Tez çalışmasında OSBS6 (*B. licheniformis*) suşu ile devam edildi. TSA katı besiyerine inoküle edilip 55°C'de 24 saat süreyle etüvde bir gece inkübasyona bırakıldı. Daha sonra bu suş TSB sıvı besiyerinde 55°C inkübatörde bir gece büyütüldü. TSB besiyerinde büyüyen bakterilerin hücre miktarını mililitre cinsinden hesaplanarak 100 mL'lik mix kültüre

inoküle edildi. 24, 48, 72, 96, 120. saatlerde örnekler alınarak hem amilaz hem de proteaz aktivitelerine bakılarak hem amilazın hem de proteazın üretildiği en iyi zaman aralığı belirlendi.

3.2.4.b. Amilaz enziminin aktivite tayini

Amilaz enziminin aktivitesi (Miller *et al.* 1959) 3,5-dinitrosalisilik asit metodu (DNS) kullanılarak belirlendi. DNS metodu, amilaz enziminin nişastayı hidroliz etmesi sonucunda oluşan indirgen şeker miktarını saptamak için kullanılır. Bu metodun prensibi, alkali koşullar altında serbest aldehit veya keton grubuna sahip şekerler 3,5-dinitrosalisilik asidi, 3-amino-5-nitrosalisilik aside indirgeme esasına dayanır. Bu yöntemin uygulama aşamaları;

MOPS (50 mM pH 7,0) tamponundan 150µl alınarak, üzerine MOPS (50 mM pH 7,0) tamponunda hazırlanmış %2 nişasta çözeltisinden 300 µl eklendi. 5 dk 70°C ısı blokunda ön ısıtma yapıldı. Üzerine 500 µl saflaştırılmış enzim çözeltisinden tüpe eklenerek 70°C’de 20 dk inkübasyon için ısı blokuna bırakıldı. 600 µl DNS çözeltisi ile inkübe edilerek 5 dk 90°C su banyosuna bırakıldıktan sonra oda ısısına gelene kadar beklendi. Köre karşı 540 nm’de absorbansına bakıldı.

Bir ünite amilaz aktivitesi (U/mL) 37°C pH 7,0’de hidroliz reaksiyonu sonucunda dakikada %2’lik nişastadan 1µg glukoz açığa çıkması için gerekli enzim miktarı olarak ifade edildi. Önceden oluşturulmuş glukoz standart grafiğinin eğimi kullanılarak enzim aktivitesi hesaplandı.

3.2.4.c. Proteaz enziminin aktivite tayini

Proteaz enziminin aktivitesi, Takami *et al.* (1989) tarafından substrat olarak kazeinin kullanıldığı yöntemin modifiye edilmesiyle belirlendi. Bu yöntemin uygulama aşamaları;

%0,65'lik kazeinden 2,5mL alınarak üzerine 0,5 mL enzim çözeltisi eklendi. Reaksiyon karışımı 37°C'lik su banyosuna konularak 10 dakika inkübe edildi. Tris-HCl tampon (100 mM pH 8,5) çözeltisi enzim yerine eklendi ve kör olarak kullanıldı. 10 dk inkübasyondan sonra reaksiyonu durdurmak için 110 mM'lık TCA'dan 2,5 mL eklendikten sonra 30 dakika 37°C su banyosuna bırakıldı. 10 dk 5000 rpm'de santrifüj yapıldı. Yeni bir tüpe oluşan süpernatanttan 1mL alınarak üzerine 2,5 mL Na₂CO₃ (0,5 M) çözeltisinden ve 0,5 mL 0,5 M Folin Ciocalteu reaktifinden eklendikten sonra 30 dakika 37°C su banyosunda bekletildi. Köre karşı 660 nm'de absorbansına bakıldı.

Bir ünite proteaz aktivitesi (U/mL) 37°C pH 8,5'da hidroliz reaksiyonu sonucunda dakikada %0,65'lik kazeinden 1µg tirozinin açığa çıkması için gerekli enzim miktarıdır. Önceden oluşturulmuş tirozin standart grafiğinin eğimi kullanılarak enzim aktivitesi hesaplandı.

3.2.4.d. Protein tayini

Bradford yöntemi (Bradford 1976) ile protein tayini yapıldı. Bu yöntem protein konsantrasyonunun tahmini için basit, hızlı ve hassas bir yöntemdir. Bu yöntemin esası Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının proteine bağlanmasına dayanır. Farklı konsantrasyonlardaki proteinler farklı şiddette mavi renkli çözeltiler oluşturarak maksimum absorbans gösterdiği 595 nm dalga boyunda absorbanslarına bakılır. Özellikle boya arjinin ve lizin gibi aminoasitlere kolaylıkla bağlanma eğilimi gösterir. (Robyt and White 1987).

3.2.4.e. Amilaz ve proteaz enziminin üçlü faz ayırma (TPP) sistemi ile saflaştırılması

TPP işlemiyle enzimi saflaştırmadan önce besiyeri belli bir santrifüj edilerek homojenat hücre kalıntılarından uzaklaştırıldı. Elde edilen homojenat, üçlü faz ayırma yöntemiyle saflaştırma işlemi gerçekleştirildi. TPP işlemiyle enzimin en iyi saflaştığı aralığı bulmak için amonyum sülfat ve t- bütanol oranı belirlendikten sonra farklı pH'larda enzimin en iyi saflaştığı pH tespit edildi. TPP optimizasyonunda literatürde iki yöntem kullanılır.

Birinci yöntemde %30 veya %40 aralığının birinde tuz eklenerek farklı t-bütanol oranlarında saflaştırmanın en iyi olduğu t-bütanol aralığı belirlendikten sonra %20, %30, %40, %50, %60, %70, %80 olmak üzere farklı tuz oranı denenerek en iyi saflaştırmanın gerçekleştiği tuz aralığı belirlenir. İkinci yöntemde ise %20, %30, %40, %50, %60, %70, %80 olmak üzere farklı tuz oranının herbiri için farklı oranlarda t-bütanol denemeleri oluşturarak saflaştırmanın en iyi gerçekleştirildiği t-bütanol ve tuz oranı tespit edilir.

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

Tez çalışmasında *B. licheniformis* OSB6 suşunun en iyi aktivite verdiği 72. Saate kadar büyütüldükten sonra 24°C’de 6000 rpm’de 25 dk santrifüj edildi. TPP yöntemiyle saflaştırmak için elde edilen homojenat 2 mL alınarak yukardaki formülle %20, %30, %40, %50, %60, %70, %80 farklı tuz oranları hesaplanarak homojenatın üzerine eklendi. Vortekslendikten sonra her tuz oranı için 1,0:0,5; 1,0:1,0; 1,0:1,5; 1,0:2,0 oranında homojenat: t-bütanol oranı hesaplanarak t-bütanol eklendi. Tekrar vortekslendikten sonra oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. 1 saatin sonunda çok net olarak üç faza ayrıldığı gözlemlendi. Sonra 24°C’de 6000 rpm’de 10 dk santrifüj yapıldı. Pastör pipeti yardımıyla üst faz ayrıldıktan sonra orta faz ve alt faz ayrı tüplere bırakıldı. Son santrifüjden sonra orta faz 1 mL tampon çözeltisinde (amilaz için MOPS pH 7,0 tamponunda; proteaz için ise Tris-HCl pH 8,5 tamponunda) homojen olacak şekilde pipetleme yapılarak her bir enzim için alt ve orta fazın enzim aktivitesi ve protein tayini yapıldı. % Verim ve saflaştırma katsayısı hesaplanarak grafikleri çizildi (Rachana and Jose 2014).

TPP işleminde tuz ve organik çözügen oranının optimizasyonu yapıldıktan sonra farklı pH’larda aktivitelere bakıldı. % Verim ve saflaştırma katsayısı hesaplanarak grafik oluşturulduktan sonra saflaştırmanın en iyi olduğu pH seçildi. Optimizasyon sonucuna göre amilaz enzimini saflaştırmak için 2 mL’lik homojenat üzerine %30 oranında amonyum sülfat eklendi. pH’sı 7,0’ye ayarlandıktan sonra üzerine 1,5 mL t-bütanol eklendi. Oda sıcaklığında 1 saat süreyle bekletildikten sonra 6000 rpm’de 10 dk santrifüj yapılarak alt faz ve ara faz ayrıldı. Ara faz MOPS (50 mM, pH 7,0) tamponunda 1 mL

içerisinde homojen hale gelecek şekilde vorteksledi. Amilaz enziminin orta fazda kaldığı tespit edildi ve sonuç olarak karakterizasyon çalışmaları için amilaz %30'luk tuzda pH 7,0'de 1:1,5 oranında t-bütanolle ara fazdan saflaştırılırken proteaz %70'luk tuzda pH 6,0'da 1:1,5 oranında t-bütanolle alt fazdan saflaştırıldı (Dennison and Lovrien 1997, Rachana and Jose 2014).

3.2.4.f. Enzimlerin molekül kütesinin belirlenmesi için Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Homojenatta bulunan amilaz ve proteaz enziminin verilen aralıkta TPP sistemiyle saflaştırılıp yaklaşık molekül ağırlığını belirlemek için SDS-PAGE yapıldı (Laemmli 1970). Amilaz ve proteaz enzimlerinin ham enzim ekstraktı, TPP alt ve ara fazı SDS-PAGE de yürütüldü. %10'luk yürütme jeli, %4'lük yığma jeli hazırlandı. Örnekler yürütüldükten sonra gümüşboyama metodu ile bantlar belirlendi.

Elektroforez malzemeleri iyice yıkandı. Kalın ve ince cam eşit seviye getirilip kısıkaçlarla tutturulduktan sonra altına jeli dışarı sızdırmayacak şekilde sünger bulunan, jel hazırlama kabinin üzerine konuldu ve sabitlendi. İlk önce ayırma jeli hazırlandı. Kimyasallar verilen sıraya göre konularak en son amonyum persülfat eklendi. Hızlı bir şekilde 4,5mL alınarak plakalara dikkatlice döküldü. Hava kabarcıklarının oluşmasını önlemek için üst hizaya kadar izopropanol eklendi. Jelin polimerleşmesi için 30 dk beklendikten sonra üzerindeki izoalkol uzaklaştırıldı. Bu işlemten sonra ayırma jelinin üzerine eklenecek olan yükleme jeli hazırlanıp döküldü. Numune kuyucuklarının oluşması için üzerine tarak dikkatlice yerleştirildi ve 30 dakika süre polimerleşmeye bırakıldı. Donan jelden tarak dikkatli bir şekilde çıkartıldı. Jel hazırlama aparatından çıkarılan jel, elektroforez tankı içerisine yerleştirildi.

Elektroforeze yüklenecek örnekler (Ham enzim ekstraktı, alt faz, ara faz) 20'şer µl alınıp 20 µL numune çözeltisiyle bir eppendorfta karıştırılır. Sonra eppendorflar 90°C su banyosunda 5 dk süre ile bekletilerek denatüre edildi. Kuyulardan ilkine proteinin molekül ağırlığını belirlemek için 4 µl markır yüklendi. Önce jel 60 voltta 30 dakika

yürütüldükten sonra 120 volt akımda numuneler jelin en alt sınırına gelene kadar yürütüldü. Yürütme işlemi bittikten sonra jel cam plakalar arasından dikkatlice çıkarılarak gümüş boyama yapıldı.

Çizelge 3.8. Jel bileşenleri

Kimyasallar	Ayırma Jeli (mL)	Yığma Jeli (mL)
ddH₂O	2,35	1,84
%30 Akrilamid/bisakrilamid	3,3	0,325
1,0 M Tris-HCl (pH 6,8)	-	0,31
1,0 M Tris-HCl (pH 8,8)	3,75	-
%1,5 PER	0,2	0,05
%5 TEMED	0,1	0,025
%10 SDS	0,15	0,025

3.2.4.g. Gümüş boyama ile örneklerin boyanması

Jel, cam plaklardan dikkatlice çıkarılarak tabanı düz bir kap içerisine bırakıldı. Jel, 30 dk boyunca tespit çözeltisiyle karanlık ortamda çalkalandı. Tespit çözeltisi dökülerek jel distile su ile yıkandı. Redüksiyon çözeltisi eklenerek 30 dk karanlık ortamda çalkalandı. 30 dk'nın sonunda redüksiyon çözeltisi dökülerek tekrar distile su ile yıkandı. Sonra yıkama işlemi olarak distile su eklendi ve 5 dk çalkalamaya bırakıldı. Bu işlem üç kez tekrarlandı. Boyama çözeltisi yıkama işlemleri bittikten sonra eklenerek 20 dk çalkalandı. Tekrar distile su ile yıkandıktan sonra yıkama çözeltisinde el yardımıyla hafifçe çalkalandı. Jelde bantlar belirginleşmeye başladığı andan itibaren görüntü alınmaya başlandı.

3.2.4.h. Proteaz enziminin Zimogram Analizi

Saflaştırılan proteaz enziminin zimogramı için, SDS-PAGE jel hazırlandı. Zimogram analizi için β -Merkaptoetanol eklenmeyen numune boyası kullanıldı. Kuyucuklara yüklenecek örnekler 20 μ L numune boyası, 20 μ L %0,65'lik kazein çözeltisi ve 20 μ L örnek alınarak ependorf tüpünde karıştırıldıktan sonra yüklendi. Elektroforez sistemine yüklenen örnekler 60 voltta 30 dakika yürütüldükten sonra 120 voltta 1 saat kadar yürütüldü. Yürütme işlemi bittikten sonra jel dikkatlice cam plakalardan çıkarıldı. Jel düz bir kaba konularak üzerine %2'lik Triton-X-100 çözeltisi bırakıldı. 30 dakika 37°C 150 rpm'de çalkalandı. Sonra Triton-X-100 dökülerek jel distile su ile yıkandı. Tris-HCl (100 mM pH 8,5) tamponu eklenerek 20 dakika 37°C 150 rpm'de çalkalandı. Distile su ile yıkandıktan sonra jel, %0,65'lik kazein çözeltisi eklenerek 30 dakika 37°C 150 rpm'de çalkalandıktan sonra gümüş boyama yapıldı (Kazan *et al.* 2005).

3.2.5. Amilaz enziminin karakterizasyon çalışmaları

3.2.5.a. Amilaz enzimi için optimum pH ve pH kararlılığının incelenmesi

B. licheniformis OSBS6 suşundan saflaştırılan amilaz enziminin optimum pH'sının belirlenmesi amacıyla 50 mM'lık sodyum asetat (pH 4,0-5,5), MOPS (pH 6,0-7,5), Tris-HCl (pH 8,0-9,5), Glisin-NaOH (pH 10,0-11,0) tamponlarında hazırlanan %2'lik nişasta çözeltisi substrat olarak kullanılarak aktivitetlerine bakıldı. En yüksek aktivitenin gözlemlendiği pH değeri 100 kabul edilerek enzimin optimum pH değeri ona göre bağlı aktivite olarak hesaplandı.

Amilaz enziminin stabil olduğu pH aralığının belirlenmesi için 50 mM sodyum asetat (pH 4,0-5,5), MOPS (pH 6,0-7,5), Tris-HCl (pH 8,0-9,5), Glisin-NaOH (pH 10,0-11,0) tamponları kullanıldı. 2mL tampon çözeltisinin üzerine 2mL enzim çözeltisi ilave edilerek oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon öncesi amilaz enzim aktivitesi 100 kabul edilerek inkübasyondan sonraki değerler kalan aktivite olarak hesaplandı.

3.2.5.b. Amilaz enzimi için optimum sıcaklık ve stabil sıcaklığının incelenmesi

B. licheniformis OSBS6 suşundan saflaştırılan amilaz enziminin optimum sıcaklığın belirlenmesi için 20-90°C sıcaklık aralığında aktivite tayini yapıldı. Aktivite tayininde 5 dk'lık ön ısıtma ve 20 dk'lık inkübasyon süreleri 20-90°C sıcaklık aralığında gerçekleştirilerek aktivitesi belirlendi. Enzimin optimum sıcaklığını belirlemek için çizilen grafikte en yüksek aktivitenin gözlemlendiği sıcaklık değeri 100 olarak kabul edilerek sonuçlar ona göre bağlı aktivite olarak hesaplandı.

Amilaz enziminin sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi için; enzim çözeltisi 20°C'den 90°C'ye kadar olan sıcaklık değerlerinde 30, 60, 90, 120 dk'lık sürelerde inkübe edilerek aktivitesine bakıldı. Amilaz enzimi stabil sıcaklık grafiğinde, inkübasyon öncesi amilaz enzim aktivitesi 100 kabul edilerek inkübasyon süreleri sonunda elde edilen değerler kalan aktivite olarak hesaplandı.

3.2.5.c. Amilaz enzim aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisinin incelenmesi

B. licheniformis OSBS6 suşundan saflaştırılan amilaz enzimine metal etkisinin belirlenmesi amacıyla Fe^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} ve K^{+} metal iyonlarının klorlu tuzları kullanılarak hazırlanan 10 mM'lık konsantrasyonlardaki stok çözeltilerinden MOPS (50 mM, pH 7,0) tamponu ile seyreltilerek 1 mM'lık ve 5 mM'lık çözeltiler hazırlandı. Ön ısıtma için hazırlanan karışımda tampon çözeltisi yerine metal çözeltisi eklenerek 55°C'de 30 dk inkübasyona bırakıldıktan sonra aktivitelerine bakıldı. Kontrol olarak metal iyonu yerine MOPS (50 mM, pH 7,0) tamponu kullanıldı. Kontrolün enzim aktivitesi 100 kabul edilerek sonuçlar kalan aktivite olarak hesaplandı.

3.2.5.d. Amilaz enzim aktivitesi üzerine bazı organik çözücülerin etkisinin incelenmesi

B. licheniformis OSBS6 suşundan saflaştırılan amilaz enziminin aktivitesine organik çözücüler varlığında etkisini incelemek için etanol, metanol, aseton, gliserol ve

izopropanol gibi organik çözücüler MOPS (50 mM, pH 7,0) tamponu içerisinde %10 ve %20'lük konsantrasyonlarda hazırlandı. Ön ıstma için hazırlanan karışımda tampon çözeltisi yerine organik çözücü eklenerek 55°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra aktivitelere bakıldı. Kontrol olarak metal iyonu yerine MOPS (50 mM, pH 7,0) tamponu eklendi. Kontrolün enzim aktivitesi 100 kabul edilerek sonuçlar kalan aktivite olarak hesaplandı.

3.2.5.e. Amilaz enzim aktivitesi üzerine bazı inhibitörlerin etkisinin incelenmesi

B. licheniformis OSBS6 suşundan saflaştırılan amilaz enziminin üzerine inhibisyon ajanlarının etkisini belirlemek amacı ile EDTA (1 mM ve 10 mM), PMSF (1 mM ve 10 mM), β -merkaptoetanol (%1 ve %5) ve DNTB (1 mM ve 10 mM) kullanıldı. PMSF %96'luk etanol içerisinde hazırlanırken EDTA, β -merkaptoetanol ve DNTB MOPS (50 mM, pH 7,0) tamponunda hazırlandı. Ön ıstma için hazırlanan karışımda tampon çözeltisi yerine inhibitör çözeltileri eklenerek 37°C'de 30 dk inkübasyona bırakıldıktan sonra aktivitelere bakıldı. Kontrol olarak hazırlanan örnekte inhibitör yerine MOPS (50 mM, pH:7,0) tamponu kullanıldı. Kontrolün enzimin aktivitesi 100 kabul edilerek sonuçlar kalan aktivite olarak hesaplandı (Burhan *et al.* 2003)

3.2.5.f. Amilaz enzim aktivitesi üzerine yüzey aktif maddelerinin ve okside edici ajanın etkisinin incelenmesi

B. licheniformis OSBS6'dan saflaştırılan amilaz enziminin yüzey aktif maddelerinden Tween-20 (%1 ve %5), Tween-80 (%1 ve %5) Triton X-100 (%1 ve %5), SDS (%1 ve %5) ve okside edici ajan H_2O_2 (%1 ve %5) varlığında aktivitesinde meydana gelen değişim incelendi. Ön ıstma için hazırlanan karışımda tampon çözeltisi yerine yüzey aktif maddeleri eklenerek 37°C'de 30 dk inkübasyona bırakıldıktan sonra aktivitelere bakıldı. Kontrol olarak yüzey aktif maddelerin yerine MOPS (50 mM, pH 7,0) tamponu eklendi. Kontrolün enzimin aktivitesi 100 kabul edilerek sonuçlar kalan aktivite olarak hesaplandı.

3.2.5.g. Amilaz enziminin substrat olan özgünlüğünün incelenmesi

B. licheniformis OSBS6 saflaştırılan amilaz enziminin substratlara olan özgünlüğünü belirlenmesi amacıyla patates nişastası, pirinç nişastası, buğday nişastası, amiloz ve maltotrioz gibi çeşitli substratların MOPS (50 mM, pH 7,0) tamponunda %2'lik konsantrasyonda hazırlanarak aktivitelere bakıldı. Enzimin aktivitesinin en yüksek olduğu substratın aktivitesi 100 kabul edilerek diğer substratların aktivitesi bağıl aktivite olarak hesaplandı.

3.2.5.h. Amilaz enziminin K_m ve V_{max} değerlerinin hesaplanması

B. licheniformis OSBS6 saflaştırılan amilaz enziminin K_m ve V_{max} değerlerini belirlemek amacıyla MOPS (50 mM, pH:7,0) tamponunda %0,1-2,0 konsantrasyon aralığında patates nişastası substratı ile aktivite tayini yapıldı. Elde edilen değerlerle $1/V$ 'ye karşı $1/[S]$ Lineweaver-Burk grafiği çizilerek K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı.

3.2.6. Proteaz enziminin karakterizasyon çalışmaları

3.2.6.a. Proteaz enzimi için optimum pH ve pH kararlılığının incelenmesi

B. licheniformis OSBS6 suşundan saflaştırılan proteaz enziminin optimum pH'sını belirlenmesi amacıyla 0,1 M'lık sodyum fosfat (pH 6,0-7,5), Tris-HCl (pH 8,0-9,5) ve Glisin-NaOH (pH 9,0-11,0) tamponlarında hazırlanan %0,65'lik kazein çözeltisi substrat olarak kullanılarak aktivitelere bakıldı. 0,5mL enzim farklı pH'larda hazırlanmış olan 2,5mL %0,65'lik kazein çözeltisi ilave edilerek aktivite tayini yapıldı. En yüksek aktivitenin gözlemlendiği pH değeri 100 kabul edilerek enzimin optimum pH değeri ona göre bağıl aktivite olarak hesaplandı (Yıldırım 2014).

Proteaz enzimin stabil olduğu pH aralığının belirlenmesi için 0,1 M'lık sodyum fosfat (pH 6,0-7,5), Tris-HCl (pH 8,0-9,5) ve Glisin-NaOH (pH 9,0-11,0) tampon çözeltileri

kullanıldı. 2mL tampon çözeltisi üzerine 2mL enzim çözeltisi ilave edilerek oda sıcaklığında 2 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon öncesi proteaz enzim aktivitesi 100 kabul edilerek inkübasyondan sonraki değerler kalan aktivite olarak hesaplandı (Rahman *et al.* 2006).

3.2.6.b. Proteaz enzimi için optimum sıcaklık ve stabil sıcaklığının incelenmesi

B. licheniformis OSBS6'dan saflaştırılan proteaz enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi için 20°C-90°C arasındaki sıcaklıklarda 10 dakika inkübe edilerek aktivite tayini yapıldı. Enzim optimum sıcaklığını belirlemek için çizilen grafikte en yüksek aktivitenin gözlemlendiği sıcaklık değeri 100 olarak kabul edilerek sonuçlar ona göre bağlı aktivite olarak hesaplandı.

Proteaz enziminin sıcaklık stabilitesini belirlemek için; enzim çözeltisi 20°C'den 90°C'ye kadar olan sıcaklık değerlerinde 30, 60, 90 ve 120 dk'lık sürelerde inkübe edilerek aktivitesine bakıldı. Proteaz enziminin stabil sıcaklık grafiğinde, inkübasyon öncesi proteaz enzim aktivitesi 100 kabul edilerek inkübasyon süreleri sonunda elde edilen değerler kalan aktivite olarak hesaplandı (Yıldırım 2014).

3.2.6.c. Proteaz enzim aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisinin incelenmesi

B. licheniformis OSBS6 suşundan saflaştırılan proteaz enzime metal etkisinin belirlenmesi amacıyla Fe^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Li^{2+} ve K^{+} metal iyonlarının klorlu tuzları kullanılarak hazırlanan 10 mM'lık konsantrasyonlardaki stok çözeltilerinden Tris-HCl (100 mM, pH 8,5) tamponu ile seyreltilerek 1 mM'lık ve 5 mM'lık çözeltiler hazırlandı. Saflaştırılan proteaz enzim aktivitesine etkisi incelendi. 450 μ L metal iyonu üzerine 50 μ L enzim çözeltisi eklenerek 30 dk inkübasyona bırakıldı. Kontrol olarak metal iyonları yerine 450 μ L Tris-HCl (100 mM pH 8,5) tamponu kullanıldı. Kontrol aktivitesi 100 kabul edilerek sonuçlar kalan aktivite olarak hesaplandı (Badgujar and Mahajan 2013).

3.2.6.d. Proteaz enzim aktivitesi üzerine bazı organik çözücülerin etkisinin incelenmesi

B. licheniformis OSBS6 suşundan saflaştırılan proteaz enzim aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkisini incelemek için; etanol, metanol, izopropanol, t- bütanol, aseton, DMSO gibi organik çözücülerin %15 ve %50'lik konsantrasyonlarında Tris-HCl (100 mM pH 8,5) tamponu içinde hazırlandı. 450 µL organik çözücü üzerine 50 µL enzim çözeltisi eklenerek 1 ve 24 saatlik inkübasyon sonunda aktivite tayini yapıldı. Kontrol olarak organik çözücüler yerine 450 µL Tris-HCl (100 mM pH 8,5) tamponu kullanıldı. Kontrol aktivitesi 100 kabul edilerek sonuçlar kalan aktivite olarak hesaplandı.

3.2.6.e. Proteaz aktivitesi üzerine bazı inhibitörlerin etkisinin incelenmesi

B. licheniformis OSBS6 suşundan saflaştırılan proteaz enziminin üzerine inhibitörlerin etkisini belirlemek amacı ile PMSF (2mM ve 5mM), EDTA (2mM ve 5mM), β-merkaptotetanol (%1 ve %5), DTNB (2 mM ve 5 mM) ve IAA (2 mM ve 5mM) kullanıldı. EDTA, β-merkaptotetanol, DTNB, IAA Tris-HCl (100 mM, pH 8,5) tamponunda hazırlanırken PMSF %96 etanol çözeltisinde hazırlandı. 450 µl inhibitör üzerine 50 µl enzim çözeltisi eklenerek 37°C'de 30 dk inkübasyona bırakıldıktan sonra aktivitelere bakıldı Kontrol olarak organik çözücüler yerine 450 µL Tris-HCl (100 mM, pH 8,5) tamponu kullanıldı. Kontrol aktivitesi 100 kabul edilerek sonuçlar kalan aktivite olarak hesaplandı (Rai and Mukherjee 2010).

3.2.6.f. Proteaz enzim aktivitesi üzerine yüzey aktif maddelerinin ve okside edici ajanın etkisinin incelenmesi

B. licheniformis OSBS6'dan saflaştırılan proteaz enziminin yüzey aktif maddelerinden Tween-20 (%1 ve %5), Tween-80 (%1 ve %5), Triton X-100 (%1 ve %5), SDS (%1 ve %5) ve okside edici ajan H₂O₂ (%1 ve %5) varlığında aktivitesinde meydana gelen değişimler incelendi. 450 µl'sinin üzerine 50 µl enzim çözeltisi eklenerek 37°C'de 30 dk inkübasyona bırakıldıktan sonra aktivitelere bakıldı. Kontrol olarak yüzey maddeleri

yerine 450 μ L Tris-HCl (100 mM pH 8,5) tamponu kullanıldı. Kontrol aktivitesi 100 kabul edilerek sonuçlar kalan aktivite olarak hesaplandı (Rai and Mukherjee 2010, Reddy *et. al.* 2008).

3.2.6.g. Proteaz enziminin doğal substratlara olan özgünlüğünün incelenmesi

B. licheniformis OSBS6 saflaştırılan proteaz enziminin substratlara olan özgünlüğünü belirlenmesi amacıyla kazein, azokazein, hemoglobin, BSA ve jelatin gibi çeşitli substratların Tris-HCl (100 mM, pH 8,5) tamponunda %0,65 konsantrasyonda hazırlanarak aktivitelere bakıldı. Enzimin aktivitesinin en yüksek olduğu substratın aktivitesi 100 kabul edilerek diğer substratların aktivitesi bağıl aktivite olarak hesaplandı.

3.2.6.h. Proteaz enziminin K_m ve V_{max} değerlerinin hesaplanması

B. licheniformis OSBS6'dan saflaştırılan proteaz enziminin K_m ve V_{max} değerlerini belirlemek amacıyla Tris- HCl (100 mM, pH 8,5) tamponunda %0,1-0,6 konsantrasyon aralığında kazein substratı ile aktivite tayini yapıldı. Elde edilen değerlerle $1/V$ 'ye karşı $1/[S]$ Lineweaver-Burk grafiği çizilerek K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı. (Rai and Mukherjee 2010).

3.2.6.i. Proteaz enzimi üzerine ticari deterjanların etkilerinin incelenmesi

B. licheniformis OSBS6'dan saflaştırılan proteaz enziminin Omo, Ariel,ABC Bingo, Alo, Persil gibi katı ticari deterjanlar varlığında aktivitesi bakıldı. Bu deterjanlardan %1(w/v) konsantrasyonlarındaki çözeltiler hazırlandıktan sonra 1 saat 65°C de inkübasyona bırakılarak deterjanın içerisindeki enzimi denatüre edildikten sonra 450 μ l deterjan çözeltisinin üzerine 50 μ l enzim çözeltisi eklendi. Kontrol olarak deterjan çözeltisi yerine Tris- HCl (100 mM, pH 8,5) tamponu kullanılarak diğer çözeltilerle birlikte 37°C'de bir saat bırakıldıktan sonra aktivitesine bakıldı. Kontrol aktivitesi 100 kabul edilerek ona göre sonuçlar hesaplandı (Sellami-Kamoun *et al.*, 2008).

3.2.7. İstatiksel Sonuçlar

Elde edilen tüm veriler üç deneyin ortalaması SEM olarak ifade edildi. Sonuçların karşılaştırılması, grapped programı kullanılarak Student's two tailed t-test ile yapıldı. (nsP >0,05; * P <0,05; ** P <0,005; *** P <0,0001 yalnız kontrole karşı)



4. ARAŞTIRMA BULGULAR

4.1. Petride Amilaz ve Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Çeşitli jeotermal su kaynaklarından izole edilmiş izolatların amilaz ve proteaz katı besiyerine wel difüzyon yapılarak, 55°C’de 24 saat süreyle inkübe edildi. Zon veren petrilerin görüntüleri alındı. Bakterilerden zon verenler + zon vermeyenler ise – işareti ile Çizelge 4.1’de gösterildi. Hem amilaz hem de proteaz katı besiyerinde en geniş zon çapını veren OSBS6 izolatı tez çalışması için seçildi.

Çizelge 4.1. Katı besiyerinde amilaz ve proteaz aktivitesinin belirlenmesi

Bakteriler	Amilaz	Proteaz
OSBS6	+	+
OSBS34	+	-
OSBS44	+	-
Saf 6	+	+
D-8	+	-
4-1	+	+
6-2	+	+
10-1	-	+
10 (1)	-	+
5-1	-	+
8-2	+	+
Z (2)	-	+
D (4)	+	+
61	-	-
L-1	+	+
L-2	-	-
Z (4)	+	-

4.2. Konvensiyonel Test Sonuçları

OSBS6 izolatının konvensiyonel test sonucu çubuk şeklinde, gram pozitif, oksidaz ve katalaz pozitif olduğu tespit edildi.

Çizelge 4.2. OSBS6 izolatının morfolojik ve biyokimyasal özellikleri

Stok kodu	Morfolojisi	Gram	Oksidaz	Katalaz
OSBS6	Çubuk	+	+	+

4.3. 16S rRNA Sekans Analiz Sonuçları

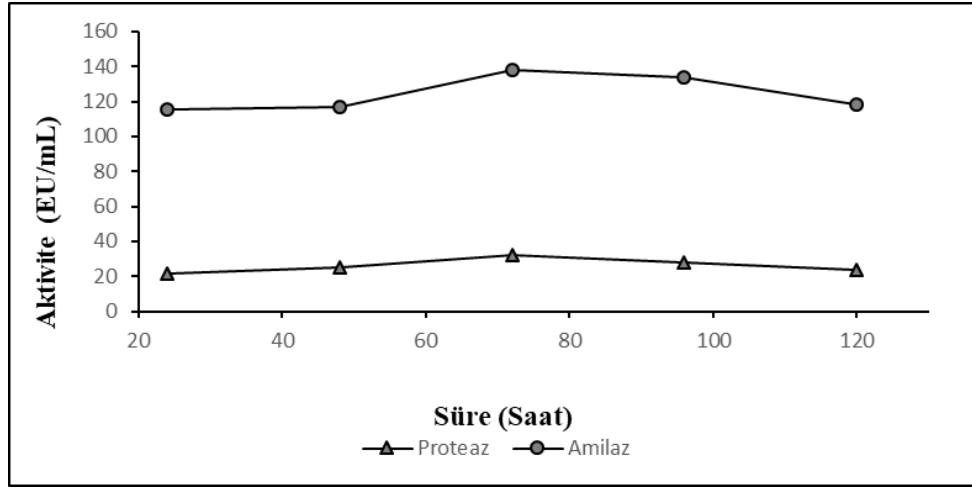
16S rRNA gen bölgesine ait sekans sonuçları BioEdit programıyla dizilerin Fasta formatında vektöre ait diziler çıkarılarak elde edilen dizi, Gen Bankasındaki diğer dizilerle karşılaştırıldı. Böylece OSBS6'nın tür seviyesinde *Bacillus licheniformis*'e %99 benzediği belirlendi.

Çizelge 4.3. DNA dizi analizi sonucu OSBS6'nın benzerlik yüzdesi

Kod	İsim	Benzerlik Oranı
OSBS6	<i>Bacillus licheniformis</i>	%99

4.4. Amilaz ve Proteaz Enzimlerinin Üretimi

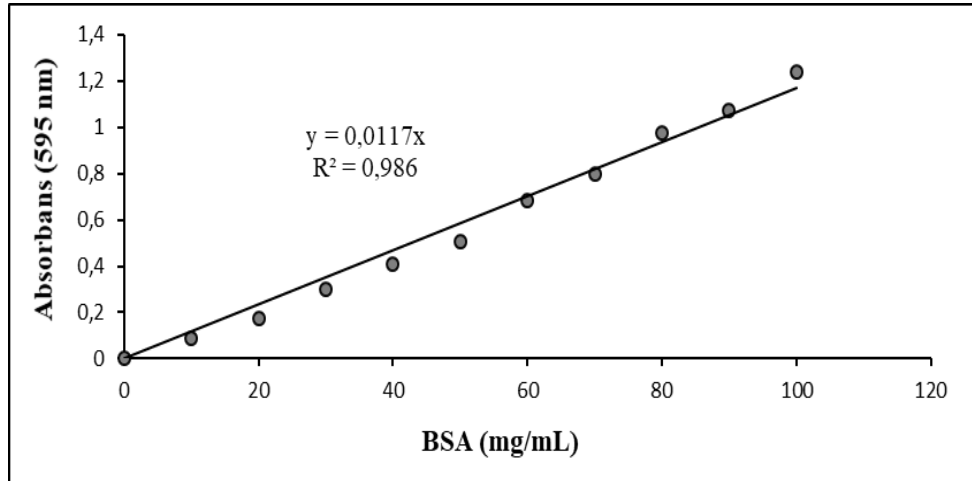
Bakteri seçimi yapıldıktan ön besiyeri olarak TSB besiyerine sonrada karışık(mix) besiyerine inokülasyonu yapıldı. 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerde amilaz ve proteaz aktivite tayini yapıldı. *B. licheniformis* OSBS6'dan saflaştırılan amilaz enzimi ve proteaz enziminin maksimum aktiviteyi 72. saatte gösterdiği belirlendi. Enzim çalışmaları için 72. saat kullanıldı.



Şekil 4.1. Amilaz ve proteaz enzimlerinin aktivite zaman ilişkisi

4.5. Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

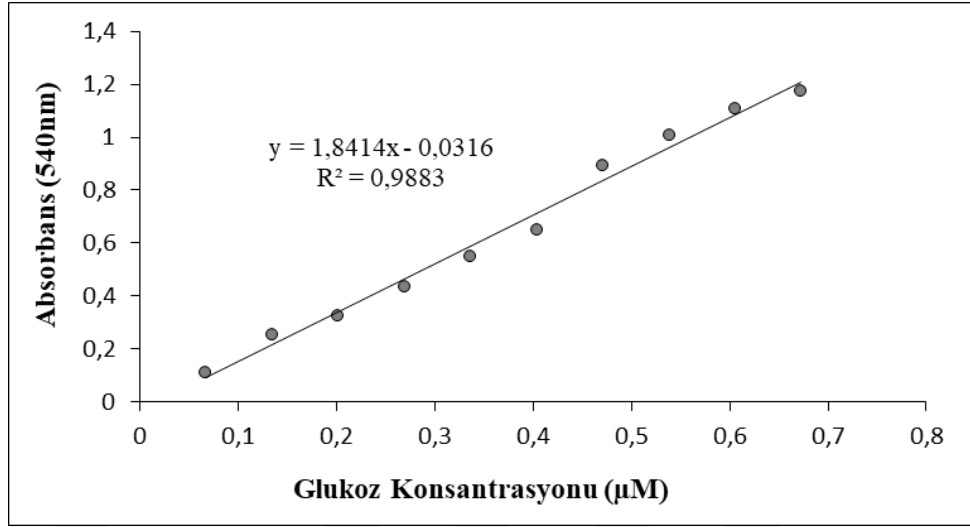
Bu tez çalışmasında protein miktarlarını hesaplamak için Alçiçek (2017) tarafından oluşturulan BSA standart grafiği kullanıldı (Şekil4.2).



Şekil 4.2. Protein tayininde kullanılan standart grafik

4.6. Amilaz Aktivitesi Hesaplamasında Kullanılan Glukoz Standart Grafiği

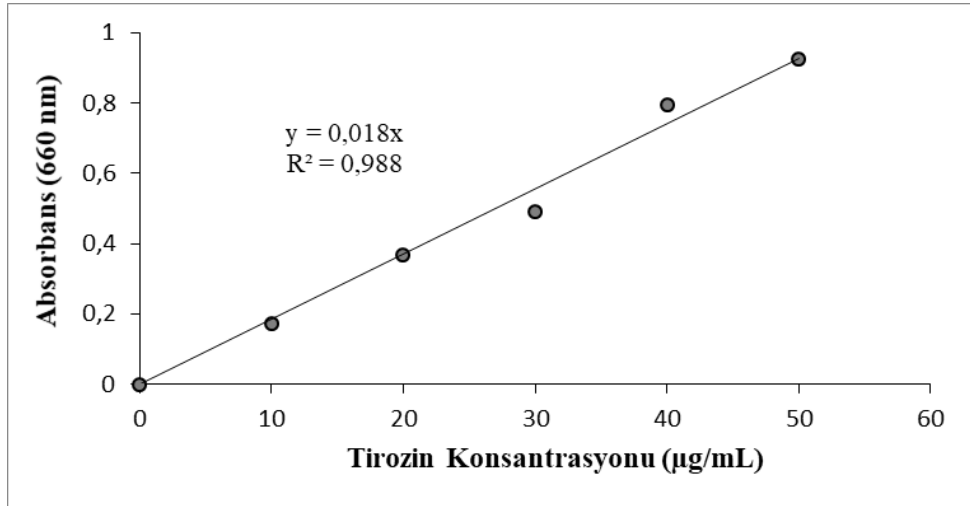
Tez çalışmasında protein miktarlarını hesaplamak için Ölmez (2014) tarafından oluşturulan Glukoz standart grafiği kullanıldı (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Amilaz aktivitesi için kullanılan standart glukoz grafiği

4.7. Proteaz Aktivitesinin Hesaplanması İçin Tirozin Standart Grafiği

Bu tez çalışmasında enzim aktivitesini hesaplamak için Yıldırım (2014) tarafından oluşturulan tirozin standart grafiğinden yararlanıldı. (Şekil 4.4).

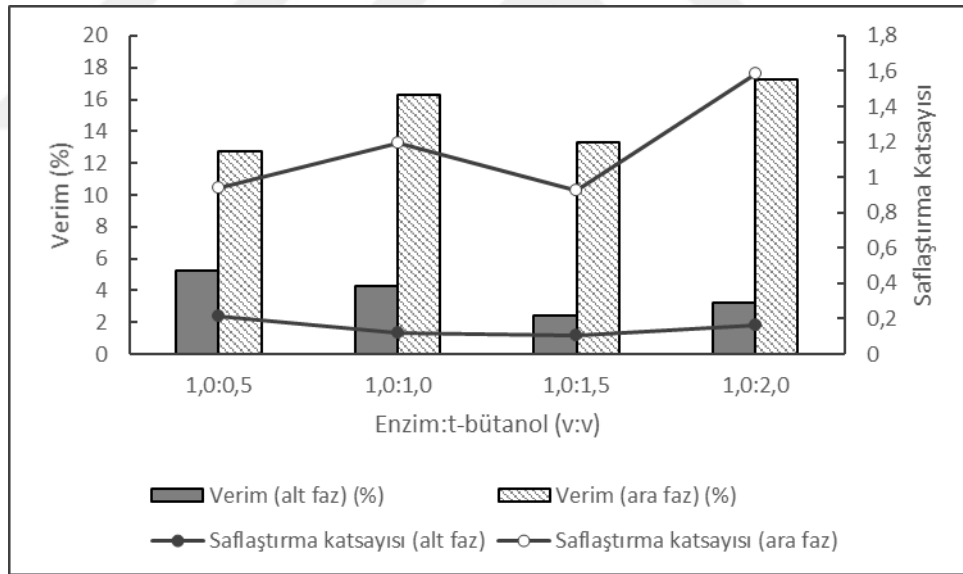


Şekil 4.4. Proteaz aktivitesi için kullanılan standart tirozin grafiği

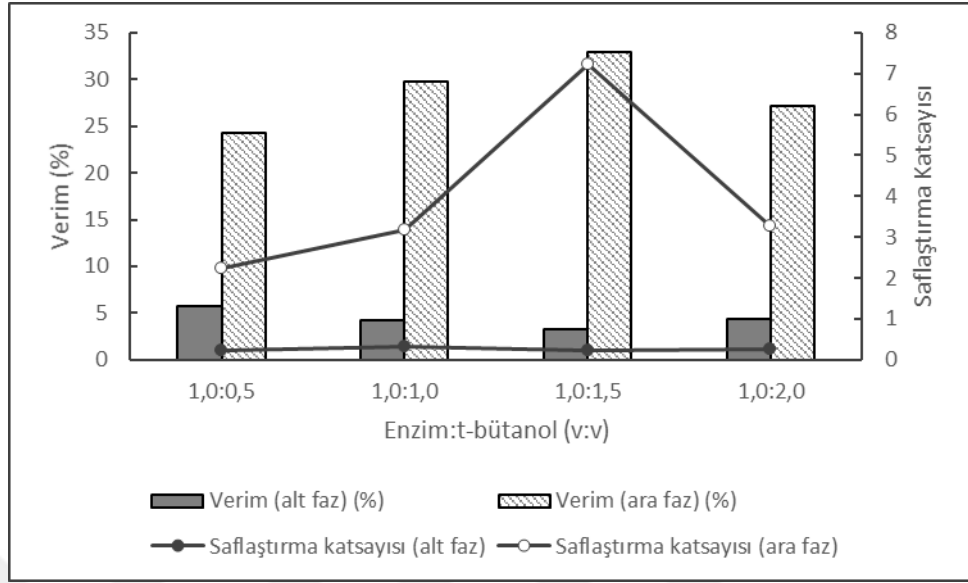
4.8. Üçlü Faz Ayırma (TPP) Sistemi ile Amilaz ve Proteaz Enziminin Saflaştırılması

4.8.1. Amilaz Enziminin TPP Sistemiyle Amonyum Sülfat ve Organik Çözgen Oranının İncelenmesi

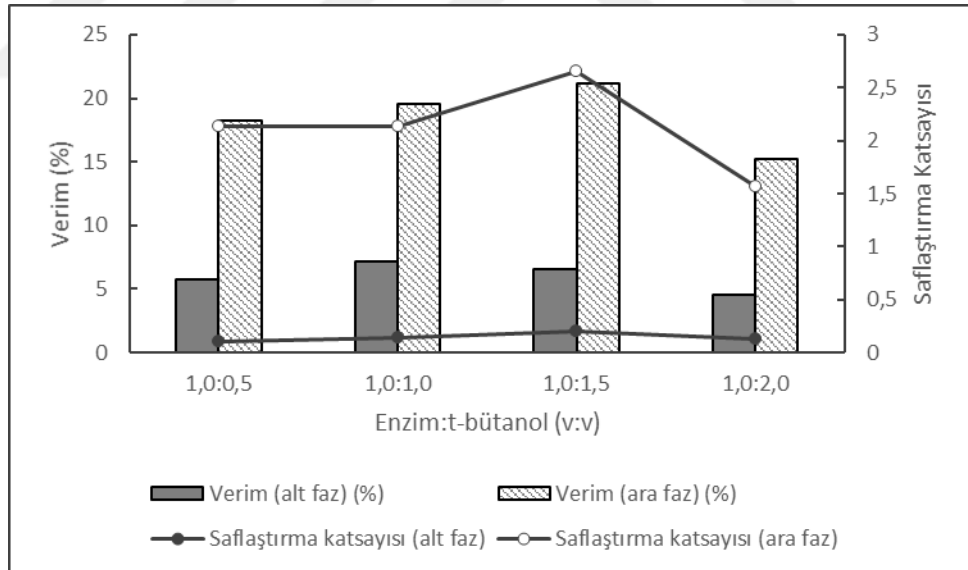
Saflaştırılan amilaz enziminin %20, %30, %40, %50, %60, %70 ve %80 farklı amonyum sülfat oranlarıyla ve 1,0:0,5; 1,0:1,0; 1,0:1,5; 1,0:1,2 farklı homojenat:t-bütanol oranı ile elde edilen sonuçlarla % verim ve saflaştırma katsayısına karşı grafikler oluşturuldu. Grafikler incelendiğinde; saflaştırılan amilaz enziminin ara fazda alt faza göre daha yüksek miktarda kaldığı; amilaz enziminin en iyi saflaştırıldığı aralık ise %30 amonyum sülfat oranında ve 1,0:1,5 homojenat: t-bütanol oranında elde edildiği belirlendi.



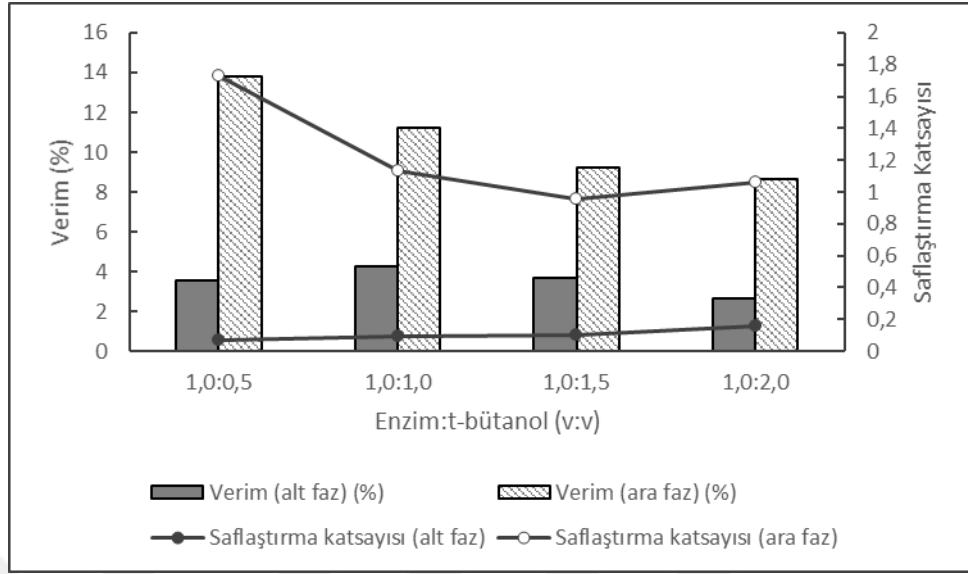
Şekil 4.5. Amilaz enziminin saflaştırılmasında, %20 amonyum sülfat doygunluğu ve farklı homojenat: t-bütanol oranının (1,0:0,5; 1,0:1,0; 1,0:1,5; 1,0:2,0) saflaştırma katsayısına ve verime etkisi



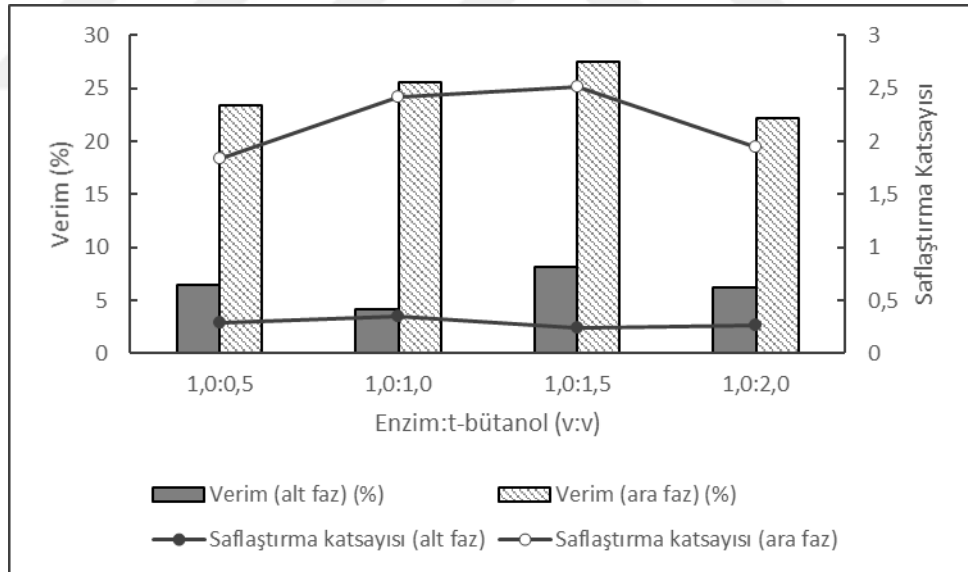
Şekil 4.6. Amilaz enziminin saflaştırılmasında, %30 amonyum sülfat doygunluğu ve farklı homojenat: t-bütanol oranının (1,0:0,5; 1,0:1,0; 1,0:1,5; 1,0:2,0) saflaştırma katsayısına ve verime etkisi



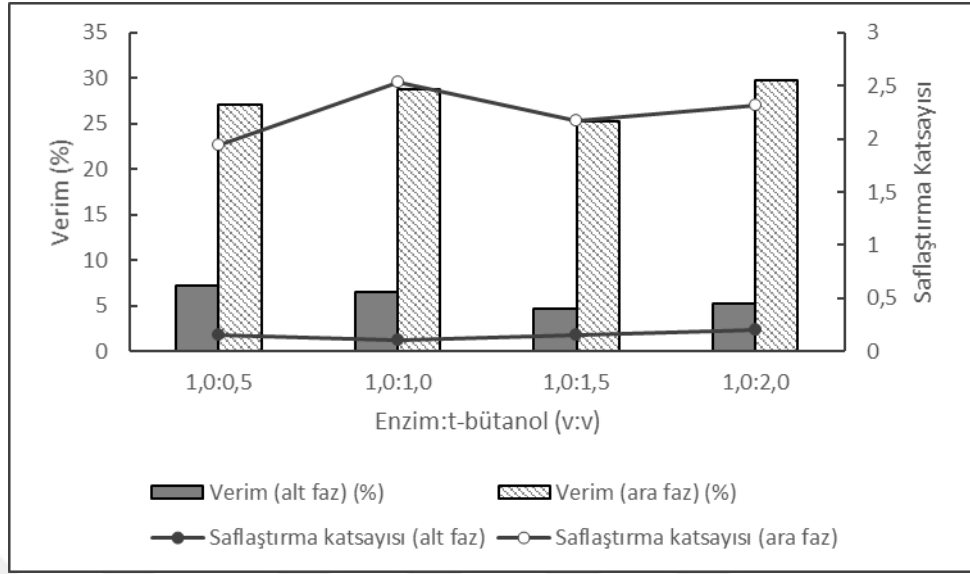
Şekil 4.7. Amilaz enziminin saflaştırılmasında, %40 amonyum sülfat doygunluğu ve farklı homojenat: t-bütanol oranının (1,0:0,5; 1,0:1,0; 1,0:1,5; 1,0:2,0) saflaştırma katsayısına ve verime etkisi



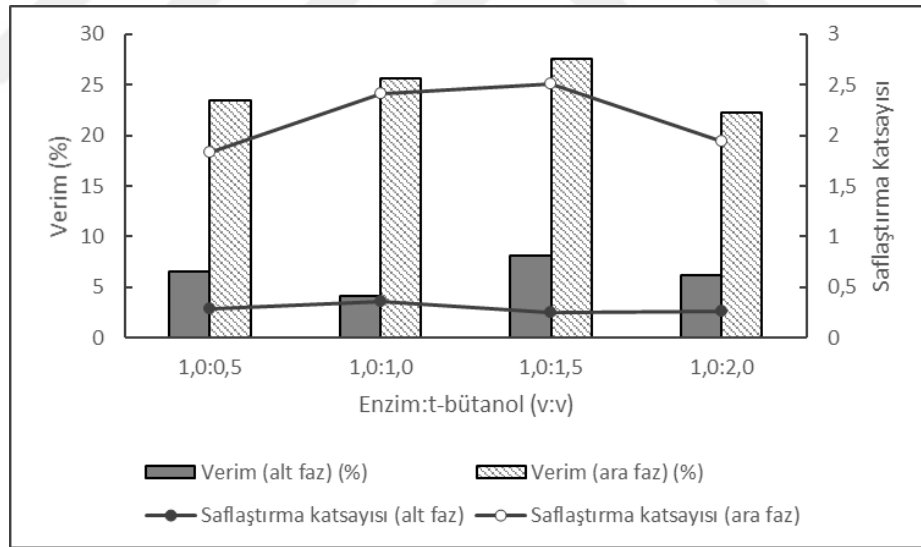
Şekil 4.8. Amilaz enziminin saflaştırılmasında, %50 amonyum sülfat doygunluğu ve farklı homojenat: t-bütanol oranının (1,0:0,5; 1,0:1,0; 1,0:1,5; 1,0:2,0) saflaştırma katsayısına ve verime etkisi



Şekil 4.9. Amilaz enziminin saflaştırılmasında, %60 amonyum sülfat doygunluğu ve farklı homojenat: t-bütanol oranının (1,0:0,5; 1,0:1,0; 1,0:1,5; 1,0:2,0) saflaştırma katsayısına ve verime etkisi



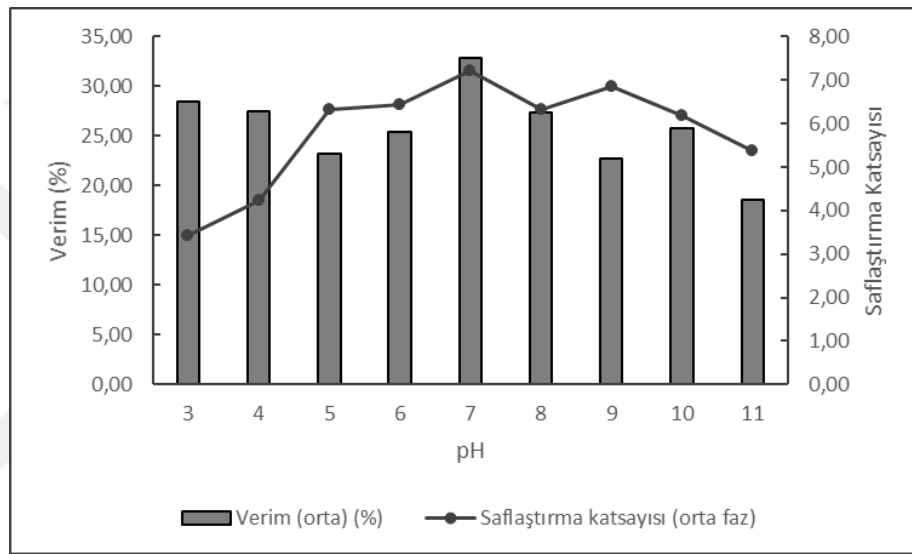
Şekil 4.10. Amilaz enziminin saflaştırılmasında, %70 amonyum sülfat doygunluğu ve farklı homojenat: t-bütanol oranının (1,0:0,5; 1,0:1,0; 1,0:1,5; 1,0:2,0) saflaştırma katsayısına ve verime etkisi



Şekil 4.11. Amilaz enziminin saflaştırılmasında, %80 amonyum sülfat doygunluğu ve farklı homojenat: t-bütanol oranının (1,0:0,5; 1,0:1,0; 1,0:1,5; 1,0:2,0) saflaştırma katsayısına ve verime etkisi

4.7.2. Amilaz Enziminin Saflaştırılmasında TPP Sistemine pH'nın Etkisi İncelenmesi

TPP işleminde en uygun tuz %30 tuz konsantrasyonu ve 1,0:1,5 oranında t-bütanol belirlendikten sonra farklı pH değerlerinde işlemler tekrarlandı. En iyi saflaştırmanın pH 7,0'de olduğu belirlendi (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Amilazın saflaştırılmasında pH'nın saflaştırma katsayısına ve verime etkisi

4.7.3. Amilaz Enziminin Üçlü Faz Yöntemiyle Saflaştırma Sonuçları

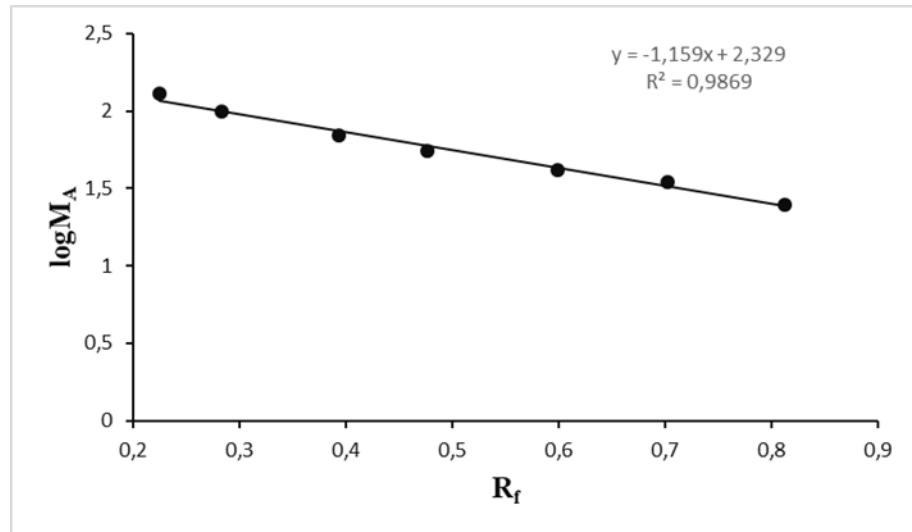
Saflaştırılan amilaz enzimi TPP işlemiyle %30 (w/v) amonyum sülfat, 1,0:1,5 (v/v) homojenat: t-bütanol oranı ve pH 7,0'de enzim %32,84'lik verimle 7,23 kat ara fazda elde edildikten sonra saflaştırma tablosu oluşturuldu.

Çizelge 4.4. *B. licheniformis* OSBS6'dan saflaştırılan amilaz enziminin saflaştırma tablosu

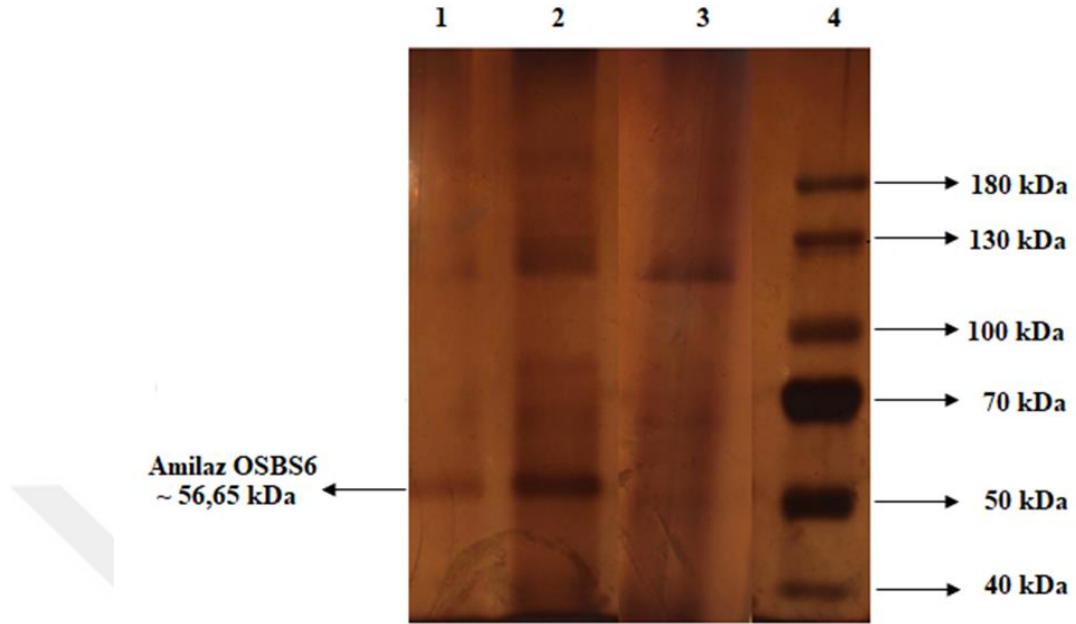
Basamak	Total Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Protein (mg/mL)	Total Aktivite (EU)	Total Protein (mg)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	% Verim	Saflaştırma katsayısı
Homojenat	2	93,02	21,12	186,04	42,24	4,4	100	1
TPP-Alt Faz	2	5,08	19,53	10,16	39,06	0,26	5,46	0,05
TPP-Ara Faz	2	30,55	0,96	61,1	1,92	31,82	32,84	7,23

4.7.4. SDS-PAGE İle Amilaz Enziminin Saflık Kontrolü ve Molekül Kütlesinin Tayini

B. licheniformis OSBS6 suşundan üçlü faz ayırma yöntemiyle saflaştırılan amilaz enziminin SDS-PAGE yöntemiyle saflığı kontrol edildi. Standart proteinlerin ve enzimlerin jelde yürüdükleri mesafeler ölçülerek R_f değeri hesaplandı. Log M_A - R_f değerleri ile çizilen grafik kullanılarak amilaz enziminin molekül kütlesi 56,65 kDa olarak hesaplandı (Şekil.4.13)



Şekil 4.13. SDS-PAGE sonucuyla oluşturulan Log M_A - R_f grafiği



Şekil 4.14. *B. licheniformis* OSBS6'dan üçlü faz ayırma yöntemiyle saflaştırılan amilaz enziminin SDS-PAGE görüntüsü

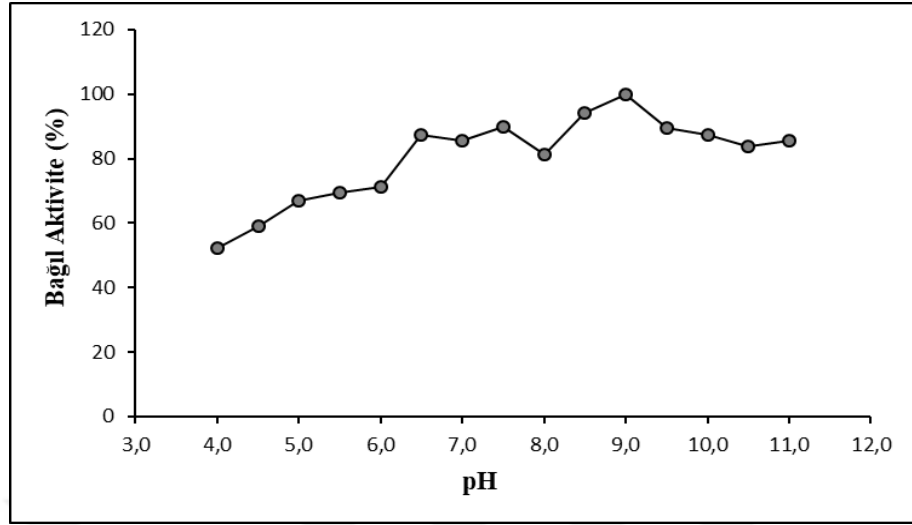
1-Orta Faz, 2- Homojenat, 3- Alt Faz, 4- Marker

4.7.5. Amilaz Enzimi İçin Optimum pH ve Stabil pH İncelenmesine Yönelik Sonuçlar

B. licheniformis OSBS6 suşundan saflaştırılan amilaz enziminin optimum pH ve stabil pH'sını bulmak için farklı tsampon çözeltileri kullanılarak grafik oluşturuldu. Amilaz enziminin pH 9,0'de en iyi stabiliteye sahip olduğu belirlenirken pH 6,0-7,0 aktivitesini koruduğu belirlendi.

Çizelge 4.5. *B. licheniformis* OSBS6'dan saflaştırılan amilaz enziminin optimum pH'sını belirlemek için oluşturulan bağıl aktivite çizelgesi

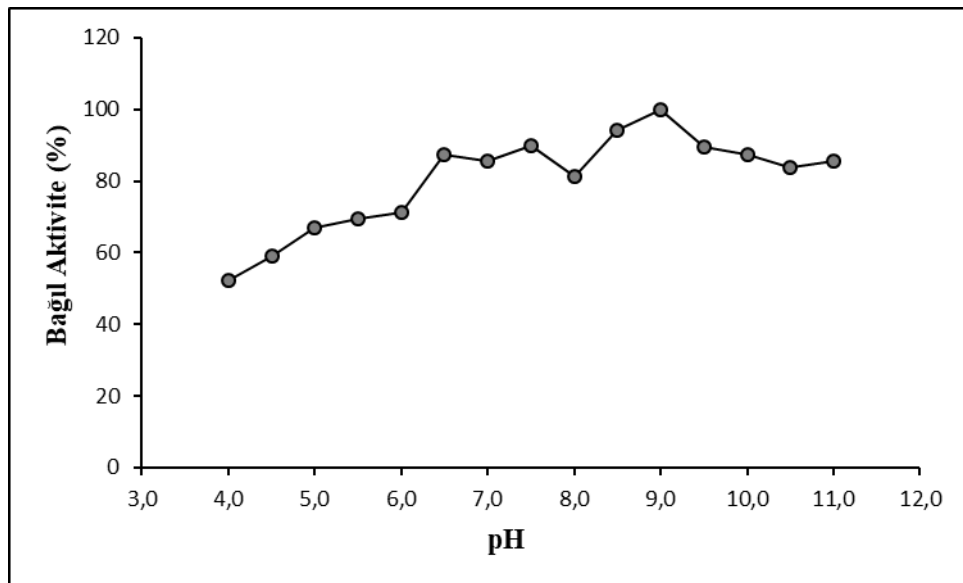
pH	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0	9,5	10,0	10,5	11,0
Bağıl Aktivite (%)	52,1	59,1	67,1	69,3	71,2	87,3	85,7	89,8	81,2	94,1	100	89,5	87,2	83,7	85,4



Şekil 4.15. Amilaz enziminin optimum pH grafiği

Çizelge 4.6. *B. licheniformis* OSBS6'dan saflaştırılan amilaz enziminin stabil pH'sını belirlemek için oluşturulan kalan aktivite çizelgesi

pH	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0	9,5	10,0	10,5	11,0
Kalan Aktivite (%)	42,4	58,1	55,4	65,1	79,6	100,2	106,4	75,8	80,38	85,2	88,68	88,2	92,6	88,4	84,6



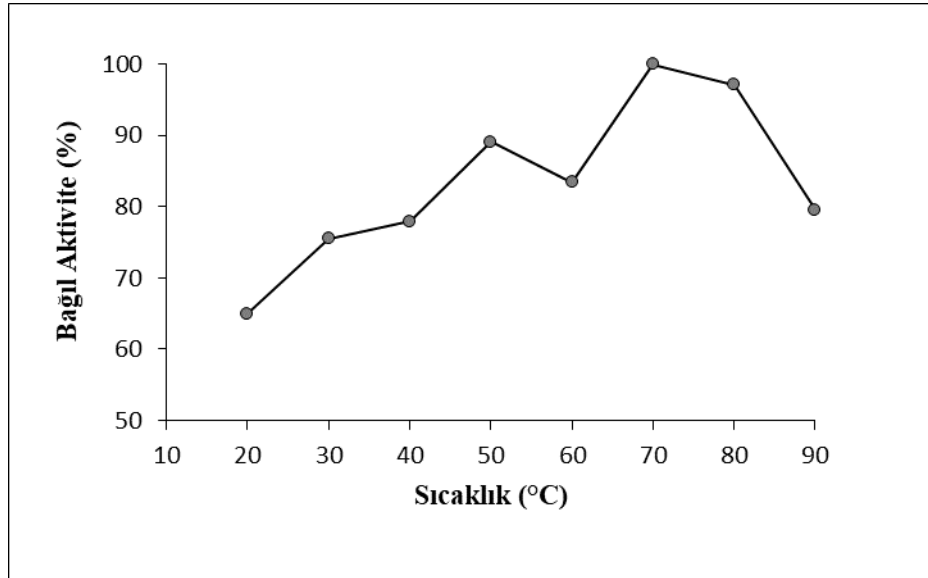
Şekil 4.16. Amilaz enziminin stabil pH grafiği

4.7.6. Amilaz Enzimi İçin Optimum ve Stabil Sıcaklıkların İncelenmesine Yönelik Sonuçlar

B. licheniformis OSBS6 suşundan saflaştırılan amilaz enziminin optimum sıcaklık ve stabil sıcaklıkları belirlendi. Enzimin optimum sıcaklığını belirlemek için 20°C'den 90°C'ye yapılan sıcaklık denemeleri grafikte gösterildi. Sonuçlar incelendiğinde *B. licheniformis* OSBS6 suşundan elde edilen amilaz enziminin optimum sıcaklığı 70°C olarak belirlendi.

Çizelge 4.7. *B. licheniformis* OSBS6'dan saflaştırılan amilaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için oluşturulan bağıl aktivite çizelgesi

Sıcaklık	20 °C	30 °C	40 °C	50 °C	60 °C	70 °C	80 °C	90 °C
Bağıl Aktivite (%)	65,12	75,52	77,95	89,08	83,43	100,00	97,12	79,53



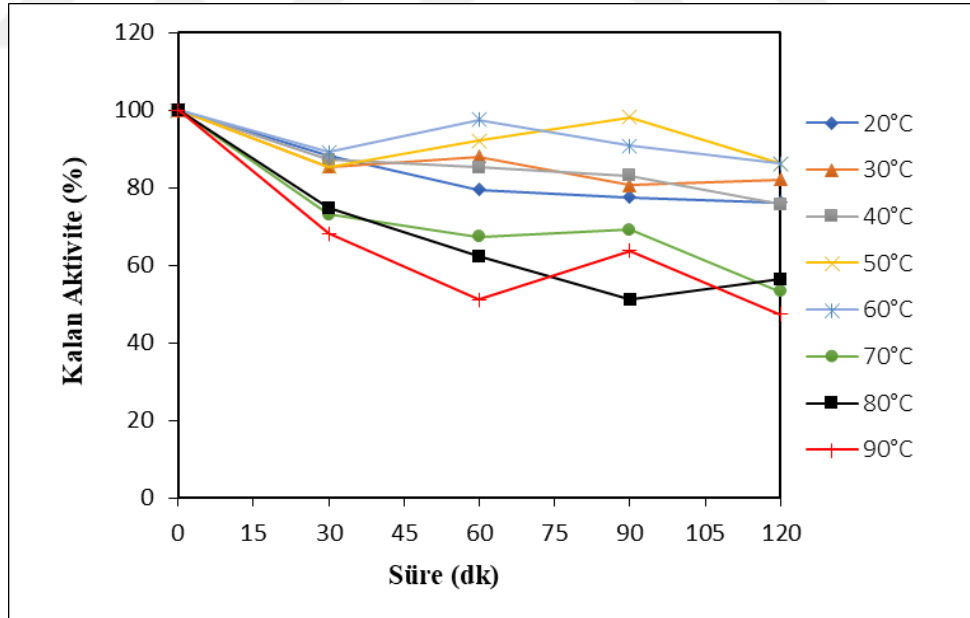
Şekil 4.17. Amilaz enziminin optimum sıcaklık grafiği

B. licheniformis OSBS6 suşundan saflaştırılan amilaz enziminin stabil sıcaklığını belirlemek amacıyla 20°C'den 90°C'ye kadar olan sıcaklık aralığında farklı inkübasyon

sürelerinde (30, 60, 90 ve 120 dk) aktivite tayinleri yapıldı. Enzimin verilen tüm sıcaklık aralıklarında iki saat inkübasyon sonunda sıcaklık arttıkça aktivitesinin azaldığı tespit edilirken 50-60°C arasında aktivitesini en iyi koruduğu gözlemlendi.

Çizelge 4.8. *B. licheniformis* OSBS6'dan saflaştırılan amilaz enziminin stabil sıcaklığını belirlemek için oluşturulan sıcaklık zaman grafiği

İnkübasyon Sonrasında Kalan Aktivite								
Süre (dk)	20°C	30°C	40°C	50°C	60°C	70°C	80°C	90°C
30	88,18	85,43	87,12	85,41	89,15	73,14	74,82	68,25
60	79,43	87,93	85,21	92,14	97,59	67,37	62,36	51,19
90	77,47	80,56	83,14	98,12	90,84	69,12	51,13	63,72
120	76,28	82,15	75,72	86,29	86,29	53,29	56,34	47,32



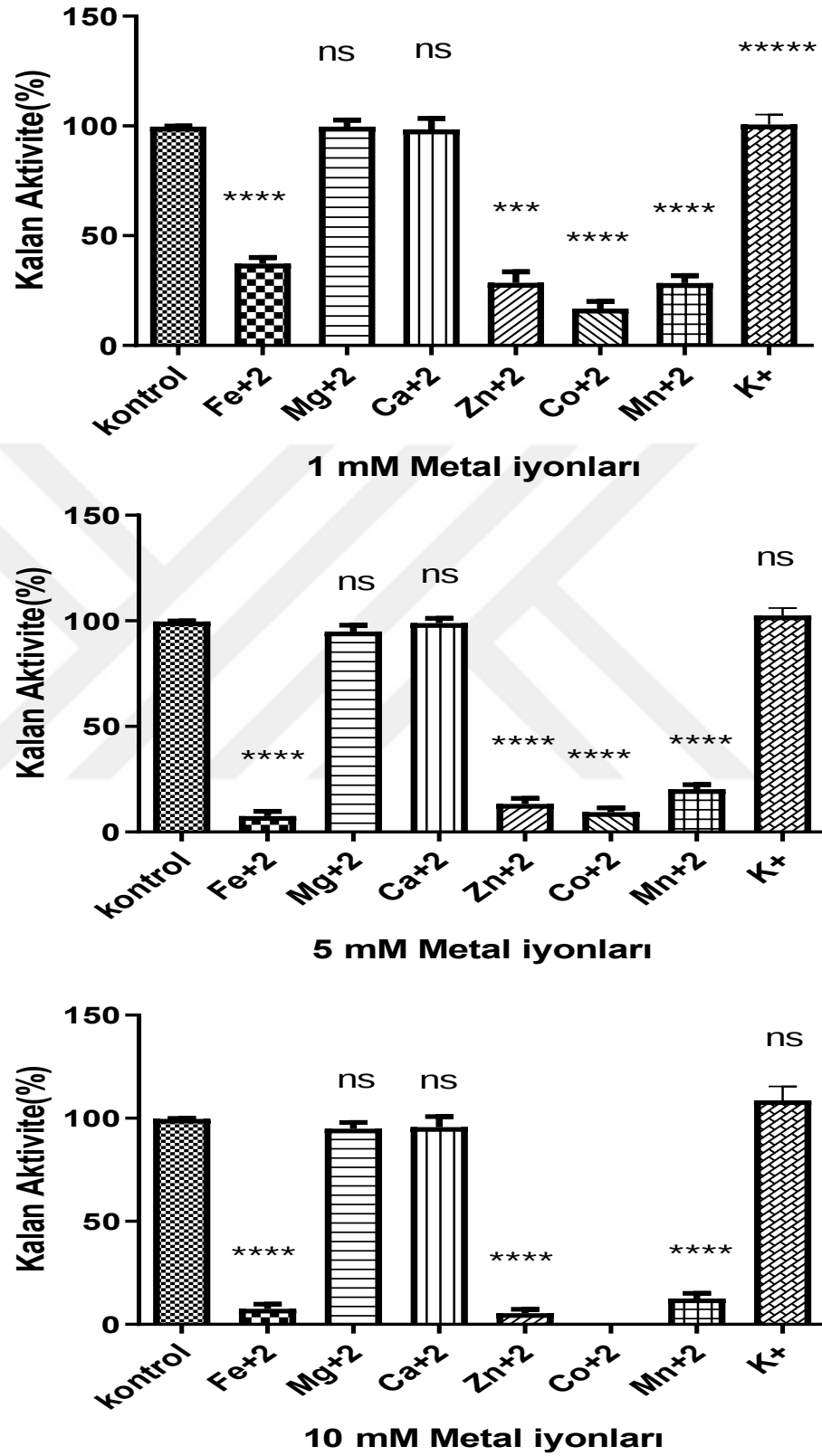
Şekil 4.18. Sıcaklığın amilaz enzim kararlılığı üzerine etkisi

4.7.7 Bazı Metal İyonlarının Amilaz Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesine Yönelik Sonuçlar

Metal iyonlarının amilaz enzimi aktivitesi üzerine etkisinin belirlemek için 1mM,5mM ve 10 mM’lık konsantrasyonlarda Fe^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} ve K^+ metal iyonları kullanılarak elde edilen sonuçlar verildi. Genel olarak K^+ varlığında iyonları az da olsa amilaz enziminin aktivitesini artırırken Ca^{2+} , Mg^{2+} iyonları amilaz enzimin aktivitesini koruduğu; Fe^{2+} ve Zn^{2+} iyonlarının ise enzim aktivitesini sırasıyla %7 ve %9 oranına düşürdüğü 10 mM konsantrasyonda Co^{2+} ‘nin tamamen inhibe ettiği belirlendi.

Çizelge 4.9. Amilaz aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi

Metal iyonları	1 Mm	5 Mm	10 Mm
Kontrol	100±0,00	100±0,00	100±0,00
Fe^{2+}	37,32± 2,702	16,03± 5,559	7,500± 2,392
Mg^{2+}	99,66± 2,985	95,95 ± 4,039	95,00± 2,963
Ca^{2+}	98,41± 5,011	98,99± 2,219	76,3 ± 3,646
Zn^{2+}	28,50± 5,016	13,25± 2,559	9,63 ± 2,387
Co^{2+}	16,82± 3,214	9,467± 2,002	0,000
Mn^{2+}	28,43± 3,318	20,36± 2,070	12,55± 2,496
K^+	100,7± 4,337	102,6± 3,489	108,7± 6,762



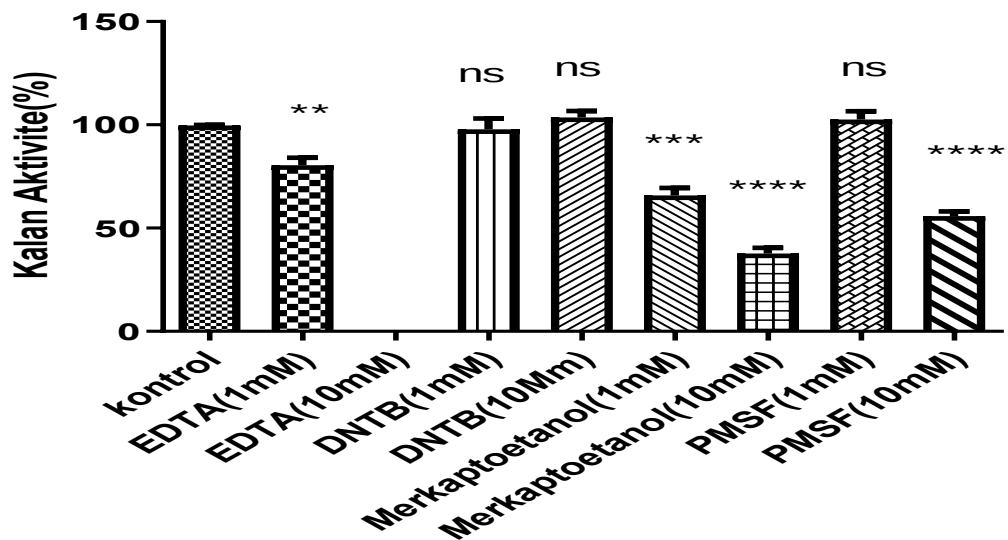
Şekil 4.19. Bazı metal iyonlarının proteaz aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesi

4.7.8. Bazı İnhibitörlerin Amilaz Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesine Yönelik Sonuçlar

B. licheniformis OSBS6'dan saflaştırılan amilaz enzimine inhibitörlerin etkisini belirlenmesi için 1-10 mM'luk konsantrasyonlarında EDTA, DNTB, PMSF ve %1 -5'lik β -Merkaptoetanol kullanıldı. Bu sonuçlara göre 10 mM'luk EDTA amilaz enzimini tamamen inhibe ettiği; 10 mM'luk DNTB ve 1 mM'luk PMSF enzim aktivitesini artırdığı 10 mM'luk PMSF ve β -Merkaptoetanol enzim aktivitesini düşürdüğü belirlendi.

Çizelge 4.10. *B.licheniformis* OSBS6'dan saflaştırılan amilaz enzimi üzerine inhibitörlerin etkisi

İnhibitörler	1 Mm	10 mM
Kontrol	100±0.00	100±0.00
EDTA	80,43±3,683	0
DTNB	97,86± 5,213	103,6 ± 3,193
PMSF	102,6± 4,011	55,85± 2,240
İnhibitör	%1	%5
β -Merkaptoetanol	65,80±3,643	37,71±2,763



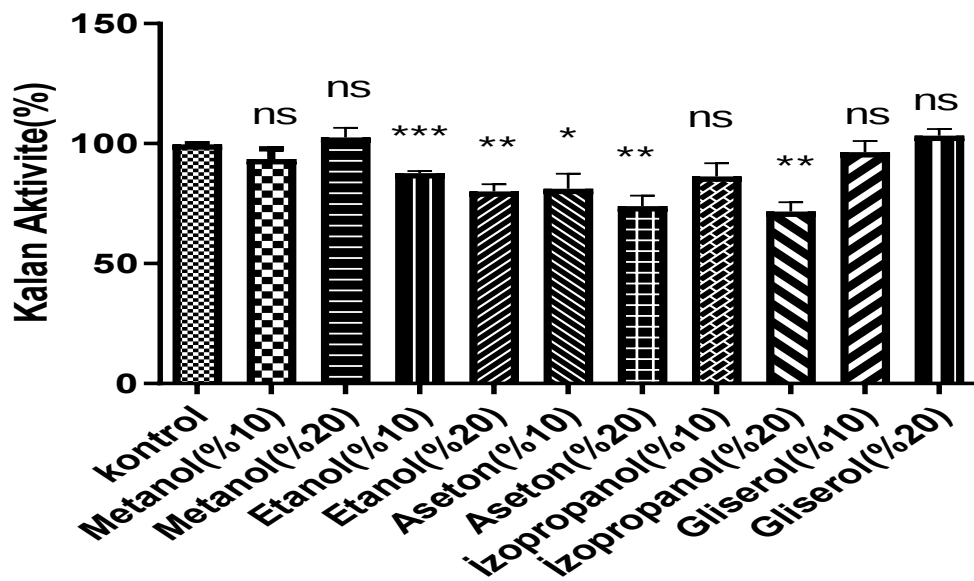
Şekil 4.20. *B. licheniformis* OSBS6'dan saflaştırılan amilaz enzimi üzerine inhibitörlerin etkisi

4.7.9. Bazı Organik Çözücülerin Amilaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisini İncelemesine Yönelik Sonuçlar

B. licheniformis OSBS6 suşundan saflaştırılan amilaz enzimi üzerine metanol, etanol, aseton, izopropanol ve gliserol gibi organik çözücülerin %10-%20'lik konsantrasyonlarda 1 saatlik inkübasyon süresince etkisi incelendi. Her iki konsantrasyon değerinde de metanol ve gliserolün enzim aktivitesini artırıcı bir etkiye sahip olduğu belirlendi. Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde organik çözücülerin varlığında %70 oranına kadar enzimin aktivitesini koruduğu tespit edildi.

Çizelge 4.11. Amilaz enziminin organik çözücülerdeki 1 saat inkübasyon sonundaki sonuçları

Organik çözücüler	%10	%20
Kontrol	100±0.00	100±00
Metanol	93,54± 4,227	102,5± 4,068
Etanol	87,72± 0,955	80,10± 2,979
Aseton	81,23± 6,156	73,99± 4,327
İzopropanol	86,32± 5,492	71,70± 3,880
Gliserol	91,13± 2,413	105,43± 2,423



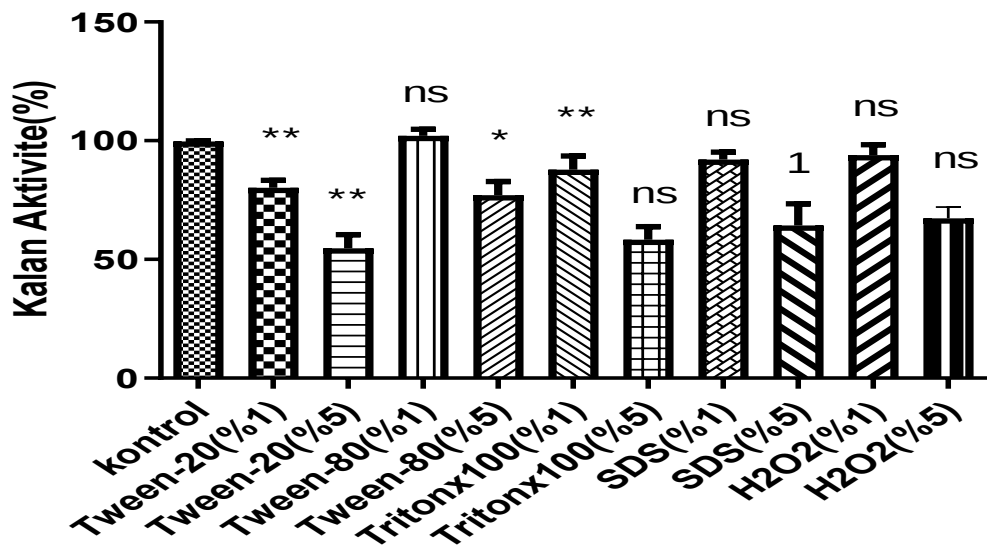
Şekil 4.21. Amilaz enziminin organik çözücülerdeki 1 saat inkübasyon sonundaki sonuçları

4.7.10. Amilaz Enziminin Aktivitesi Üzerine Yüzey Aktif Maddelerinin ve Okside Edici Ajanının Etkisinin İncelenmesine Yönelik Sonuçlar

B. licheniformis OSBS6 suşundan saflaştırılan amilaz enzimine yüzey aktif maddelerin ve okside edici ajan olan H_2O_2 'nin etkisini belirlemek amacıyla %1-5'lik hazırlanan SDS, H_2O_2 , Tween-20, Tween-80, Triton-X-100 kullanıldı. Deney sonuçları grafik haline getirildi. Tüm yüzey aktivite maddeleri ve okside edici ajan %1'lik konsantrasyonda enzim aktivitesini koruduğu Tween-80 ise enzim aktivitesini artırdığı belirlendi. Genel olarak kullanılan maddelerinin konsantrasyonu arttıkça enzim aktivitesinin düşürdüğü tespit edildi.

Çizelge 4.12. *B. licheniformis* OSBS6'dan saflaştırılan amilaz enzimine yüzey aktif maddelerin ve okside edici ajanın etkisi

Yüzey aktif maddeler	%1	%5
Kontrol	100±0.00	100±0.00
Tween-20	80,17±3,211	54,68±5,752
Tween-80	102,1±2,579	77,03±5,796
Triton-X-100	87,80±5,92	58,26±5,608
SDS	92,02±2,478	64,34±9,052
Okside edici ajan	%1	%5
H_2O_2	94,00± 4,382	63,18± 4,244



Şekil 4.22. *B. licheniformis* OSBS6'dan saflaştırılan amilaz enzimine yüzey aktif maddelerin ve okside edici ajanın etkisi

4.7.11 B.licheniformis OSBS6'dan Saflaştırılan Amilaz Enzimin Doğal Substratlara Olan Özgünlüğünün İncelenmesine Yönelik Sonuçlar

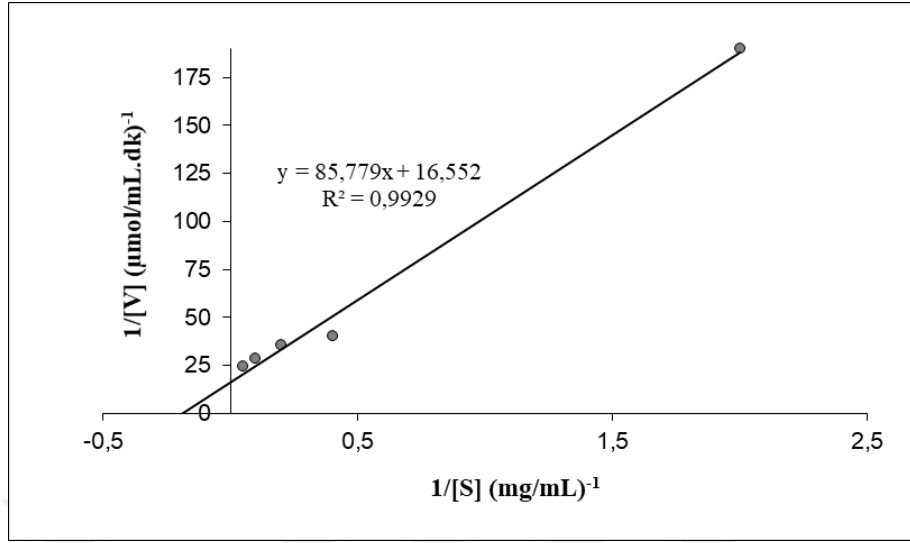
B. licheniformis OSBS6'dan saflaştırılan amilaz enziminin patates nişastası, pirinç nişastası, buğday nişastası, amiloz ve maltotrioz gibi substratlar varlığında aktivitesine bakıldı. Enzim en yüksek aktiviteyi patates nişastasında (%100) substrat için gösterdiği diğer substratlara karşı özgünlüğü sırasıyla pirinç nişastası (%93), buğday nişastası (%87), maltotrioz (%45) ve amiloz (%34) olduğu belirlendi.

Çizelge 4.13. *B. licheniformis* OSBS6'dan saflaştırılan amilaz enziminin substratlara olan özgünlüğü

Doğal substratlar (%2 w/v)	Bağlı aktivite %100
Patates Nişastası	100
Pirinç Nişastası	93
Buğday nişastası	87
Maltotrioz	45
Amiloz	34

4.7.12. K_m ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar

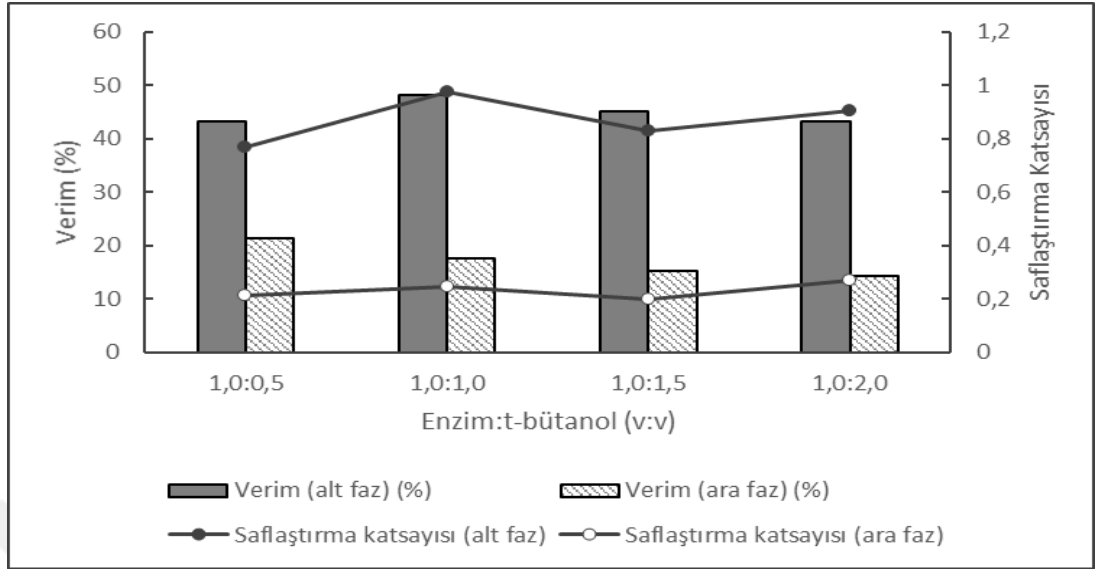
B. licheniformis OSBS6'dan üçlü faz ayırma yöntemiyle saflaştırılan amilaz enziminin patates nişastası substratıyla elde edilen aktivite sonuçlarından yararlanılarak Lineweaver-Burk grafiğiyle K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı. Bu grafikten yararlanılarak patates nişasta substratı için K_m 5,18 mg/mL ve V_{max} değeri 0,0604 $\mu\text{mol.ml}^{-1}.\text{dk}^{-1}$ olarak hesaplandı.



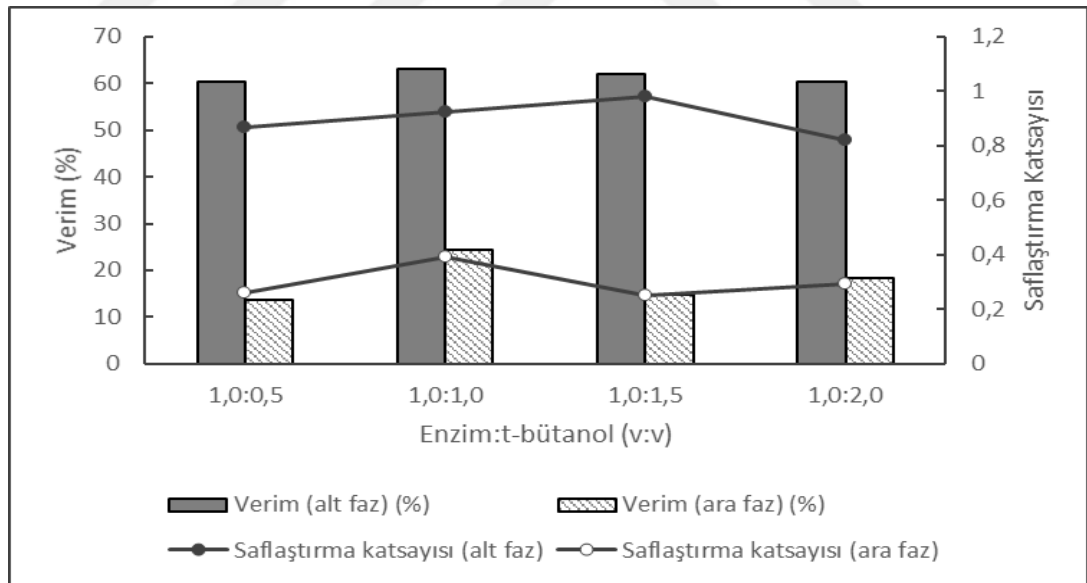
Şekil 4.23. Patates nişastası substratıyla elde edilen Lineweaver-Burk grafiği

4.7.13. Proteaz Enziminin TPP Sistemiyle Amonyum Sülfat ve Organik Çözgen Oranının İncelenmesi

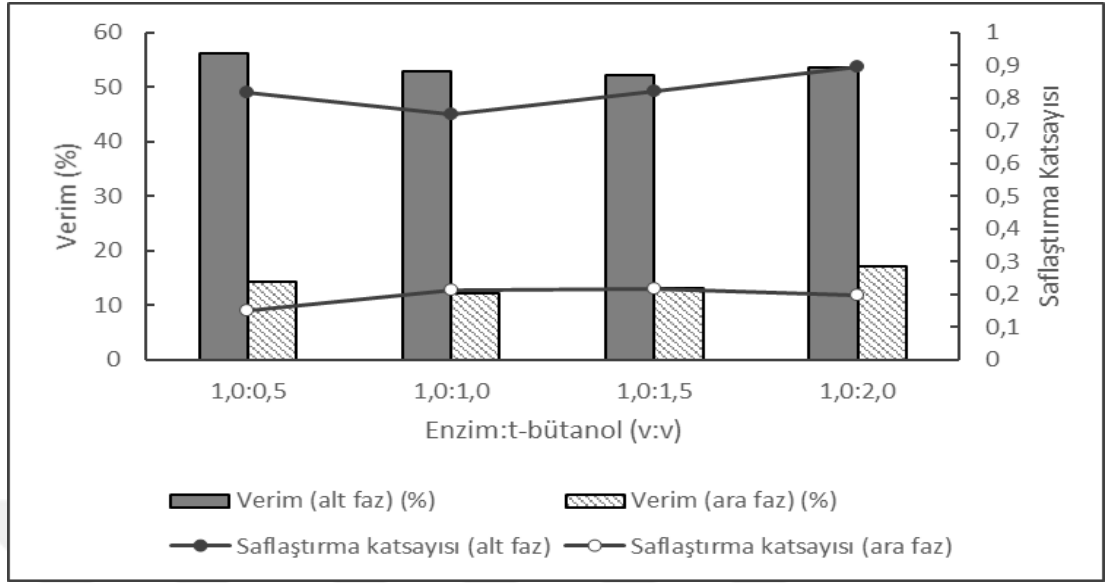
Saflaştırılan amilaz enziminin %20, %30, %40, %50, %60, %70 ve %80 farklı ammonyum sülfat oranlarıyla ve 1,0:0,5; 1,0:1,0; 1,0:1,5; 1,0:1,2 farklı homojenat: t-bütanol oranı ile elde edilen sonuçlarla % verim ve saflaştırma katsayısına karşı grafikler oluşturuldu. Grafikler incelendiğinde; saflaştırılan proteaz enziminin en iyi % verim ve saflaştırma katsayısı %70 amonyum sülfat ve 1,0:1,5 homojenat: t-bütanol oranında alt fazda elde edildiği belirlendi.



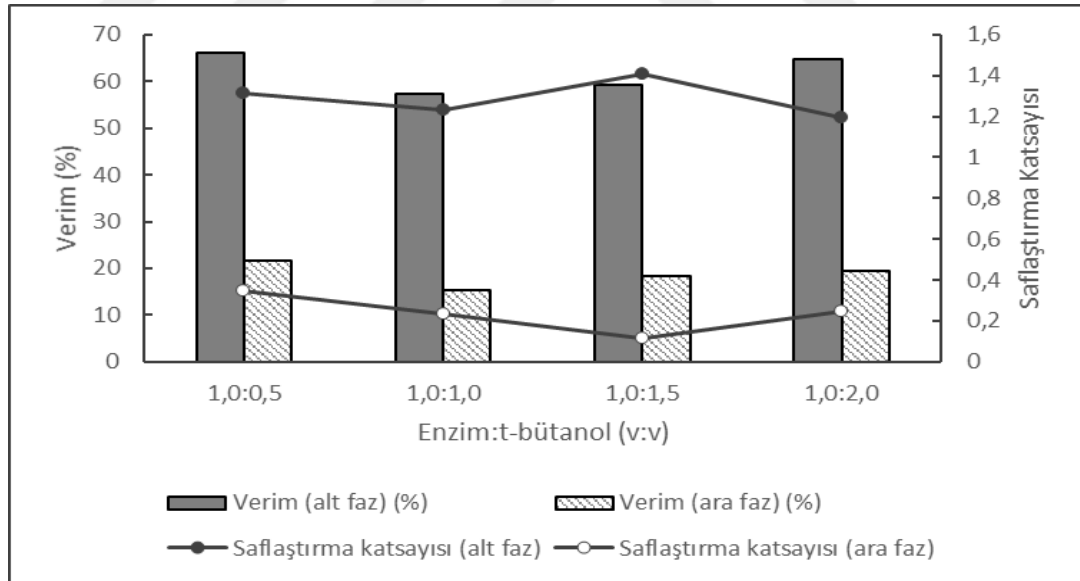
Şekil 4.24. Proteaz enziminin saflaştırılmasında; %20 amonyum sülfat doygunluğu ve farklı homojenat:t-bütanol oranının (1,0:0,5; 1,0:1,0; 1,0:1,5; 1,0:2,0) saflaştırma katsayısına ve verime etkisi



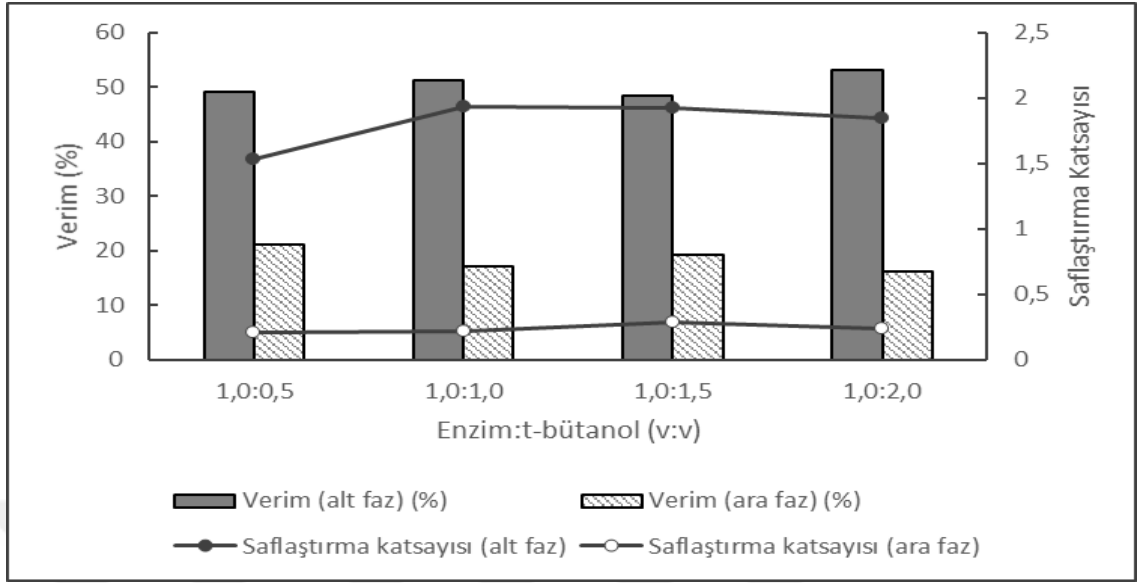
Şekil 4.25. Proteaz enziminin saflaştırılmasında; %30 amonyum sülfat doygunluğu ve farklı homojenat:t-bütanol oranının (1,0:0,5; 1,0:1,0; 1,0:1,5; 1,0:2,0) saflaştırma katsayısına ve verime etkisi



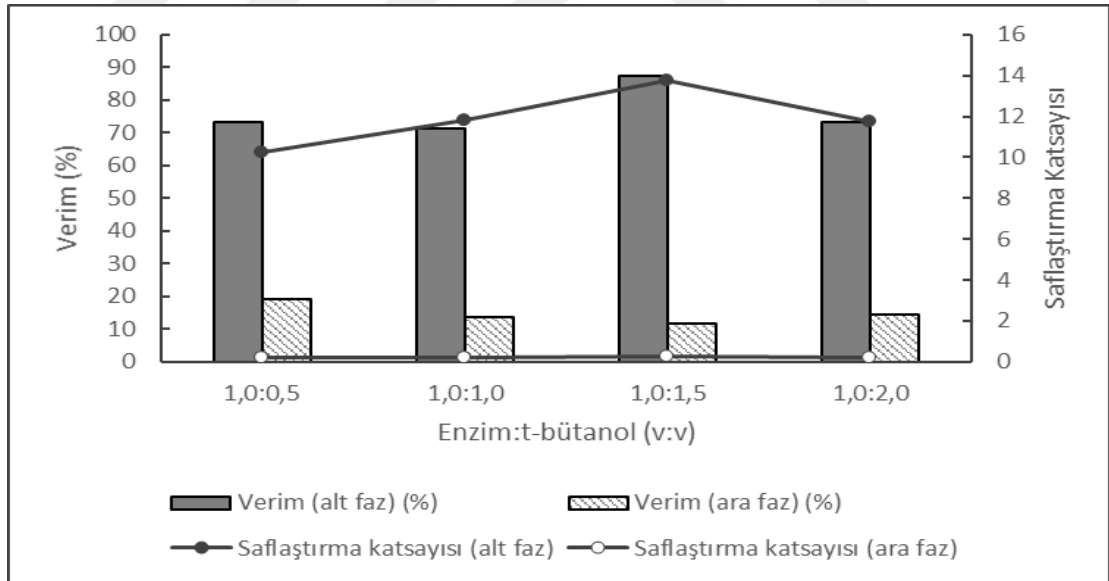
Şekil 4.26. Proteaz enziminin saflaştırılmasında; %40 amonyum sülfat doygunluğu ve farklı homojenat:t-bütanol oranının (1,0:0,5; 1,0:1,0; 1,0:1,5; 1,0:2,0) saflaştırma katsayısına ve verime etkisi



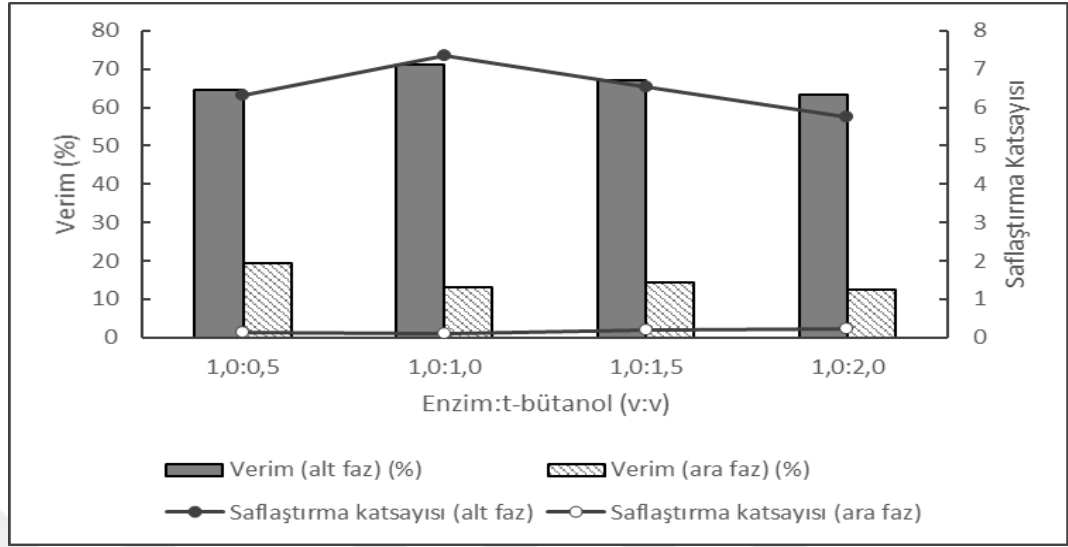
Şekil 4.27. Proteaz enziminin saflaştırılmasında; %50 amonyum sülfat doygunluğu ve farklı homojenat:t-bütanol oranının (1,0:0,5; 1,0:1,0; 1,0:1,5; 1,0:2,0) saflaştırma katsayısına ve verime etkisi



Şekil 4.28. Proteaz enziminin saflaştırılmasında; %60 amonyum sülfat doygunluğu ve farklı homojenat:t-bütanol oranının (1,0:0,5; 1,0:1,0; 1,0:1,5; 1,0:2,0) saflaştırma katsayısına ve verime etkisi



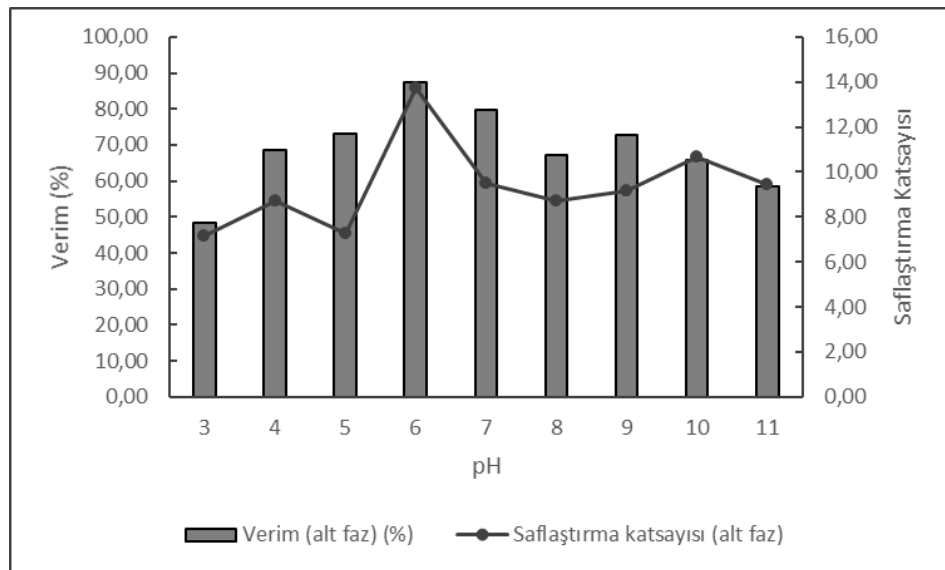
Şekil 4.29. Proteaz enziminin saflaştırılmasında; %70 amonyum sülfat doygunluğu ve farklı homojenat:t-bütanol oranının (1,0:0,5; 1,0:1,0; 1,0:1,5; 1,0:2,0) saflaştırma katsayısına ve verime etkisi



Şekil 4.30. Proteaz enziminin saflaştırılmasında; %80 amonyum sülfat doygunluğu ve farklı homojenat:t-bütanol oranının (1,0:0,5; 1,0:1,0; 1,0:1,5; 1,0:2,0) saflaştırma katsayısına ve verime etkisi

4.7.14. Proteaz Enziminin Saflaştırılmasında TPP Sistemine pH'nın Etkisi

TPP işleminde en uygun tuz %70 tuz konsantrasyonu ve 1,0:1,5 oranında t-bütanol belirlendikten sonra farklı pH değerlerinde işlemler tekrarlandı. En iyi saflaştırmanın pH 6,0'da olduğu belirlendi. (Şekil 4.31).



Şekil 4.31. Proteazın saflaştırılmasında TPP sistemine pH'nın etkisi

4.7.15. Proteazın Üçlü Faz Yöntemiyle Saflaştırma Sonuçları

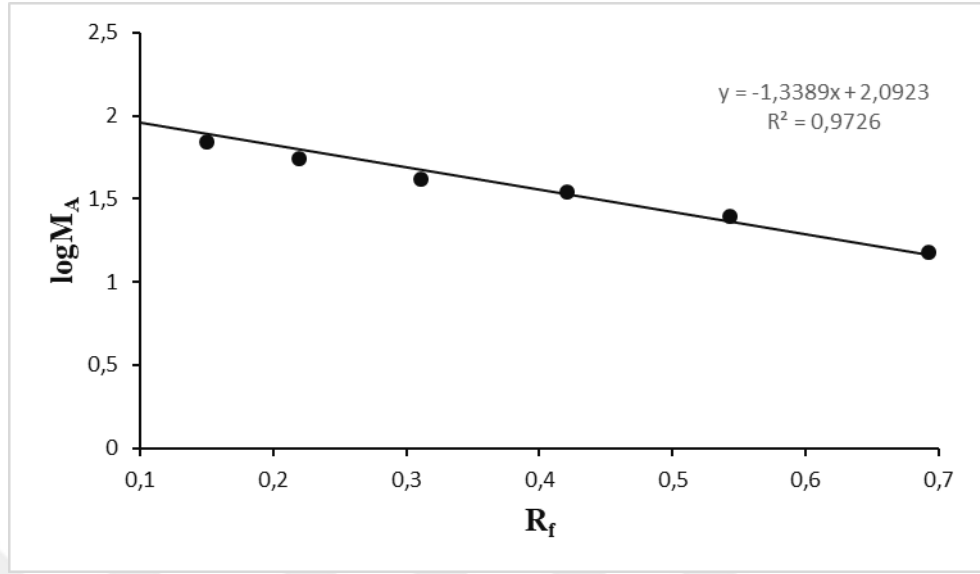
Saflaştırılan amilaz enzimi TPP işlemiyle %70 (w/v) amonyum sülfat, 1,0:1,5 (v/v) homojenat: t-bütanol oranı ve pH 6,0'da enzim %87,65'lik verimle 13,33 kat alt fazda elde edildikten sonra saflaştırma tablosu oluşturuldu.

Çizelge 4.14. *B. licheniformis* OSBS6'dan saflaştırılan proteazın enziminin saflaştırma tablosu

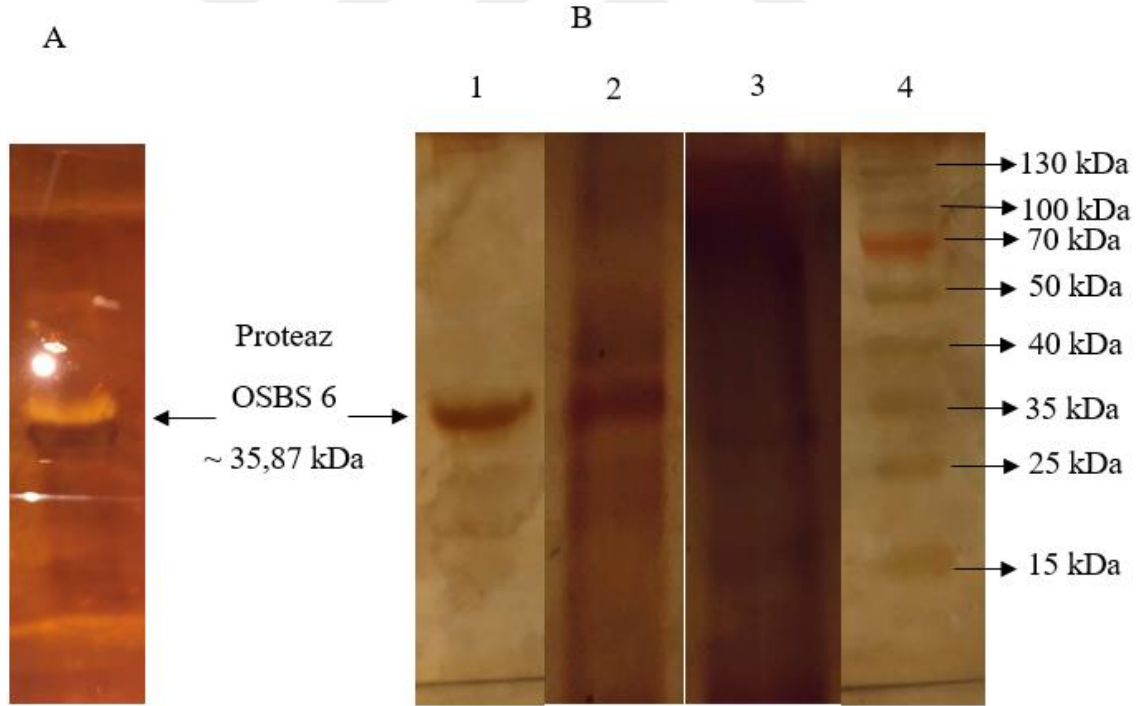
Basamak	Total Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Protein (mg/mL)	Total Aktivite (EU)	Total Protein (mg)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	% Verim	Saflaştırma katsayısı
Homojenat	2	23,82	7,14	47,64	14,28	3,33	100	1
TPP-Alt Faz	2	20,86	0,47	41,76	0,94	44,42	87,65	13,33
TPP-Ara Faz	2	2,64	6,02	5,28	12,04	0,43	11,08	0,12

4.7.16. SDS-PAGE İle Proteaz Enziminin Saflık Kontrolü, Molekül Kütlesinin Tayini ve Zimogram Analizi

B. licheniformis OSBS6 suşundan üçlü faz ayırma yöntemiyle saflaştırılan proteaz enziminin SDS-PAGE yöntemiyle saflığı kontrol edildi. Standart proteinlerin ve enzimlerin jelde yürüdükleri mesafeler ölçülerek R_f değeri hesaplandı. $\log M_A - R_f$ değerleri ile çizilen grafik kullanılarak amilaz enziminin molekül ağırlığı 37,87 kDa olarak hesaplandı (Şekil 4.13).



Şekil 4.32. SDS-PAGE sonucunda oluşturulan Log M_A-R_f grafiği



Şekil 4.33. *B. licheniformis* OSBS6'dan TPP işlemiyle elde edilen proteaz enziminin Zimogram ve SDS-PAGE görüntüsü

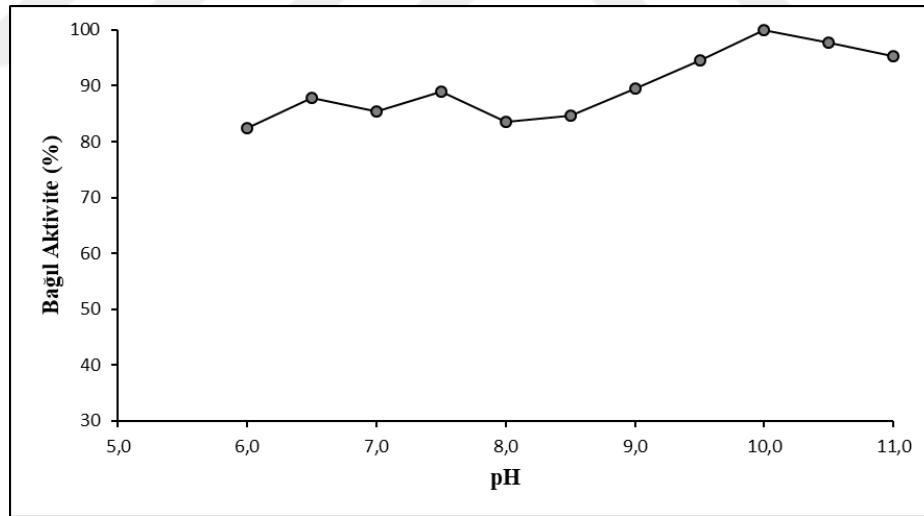
A-Zimogram, 1-Alt Faz, 2-Homojenat, 3-Orta Faz, 4-Marker

4.7.17. Proteaz Enzimi İçin Optimum ve Stabil pH İncelenmesine Yönelik Sonuçlar

B. licheniformis OSBS6 suşundan saflaştırılan proteaz enziminin optimum pH ve stabil pH'sını bulmak için pH (6,0-11,0) aralıklarında tampon çözeltiler kullanılarak enzim aktivitesi ölçüldü. Proteaz enziminin pH 10,0'da en iyi aktiviteye sahip olduğu belirlenirken, enzimin aktivitesini pH 10,0'da %93 oranında, pH 8,0-11,0 aralığında ise aktivitesini ortalama %80'nin üzerinde koruduğu belirlendi.

Çizelge 4.15. *B. licheniformis*'dan TPP sistemiyle saflaştırılan proteaz enziminin optimum pH sonuçları

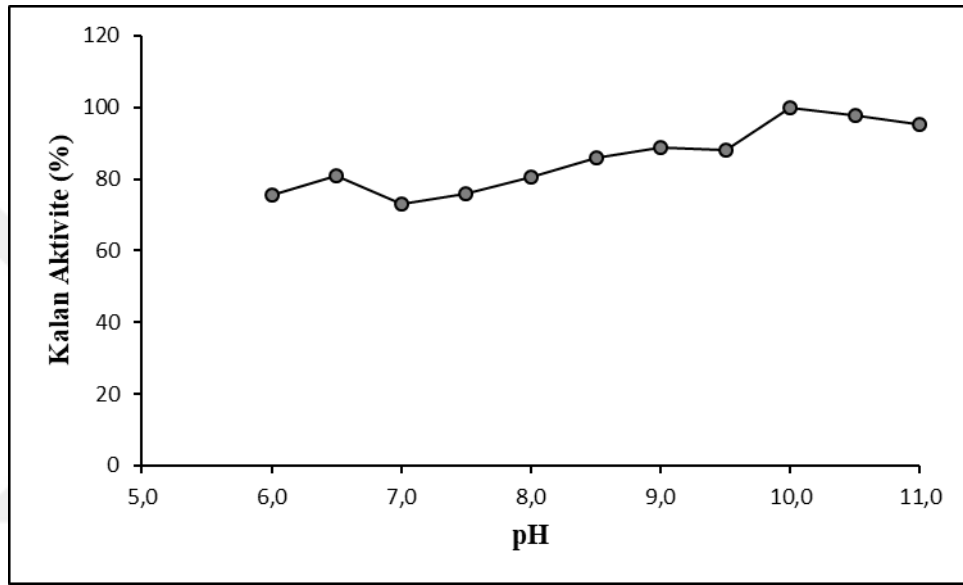
Ph	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0	9,5	10,0	10,5	11,0
Bağıl Aktivite (%)	82,5	87,9	85,4	88,9	83,5	84,7	89,4	94,6	100	97,8	95,3



Şekil 4.34. Proteaz enziminin optimum pH grafiği

Çizelge 4.16. *B. licheniformis* OSBS6'dan saflaştırılan proteaz enziminin stabil pH'sını bulmak için oluşturulan kalan aktivite çizelgesi

pH	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0	9,5	10,0	10,5	11,0
Kalan Aktivite (%)	75,6	81,08	73,03	75,96	80,38	85,8	88,68	88,24	92,68	86,46	87,12



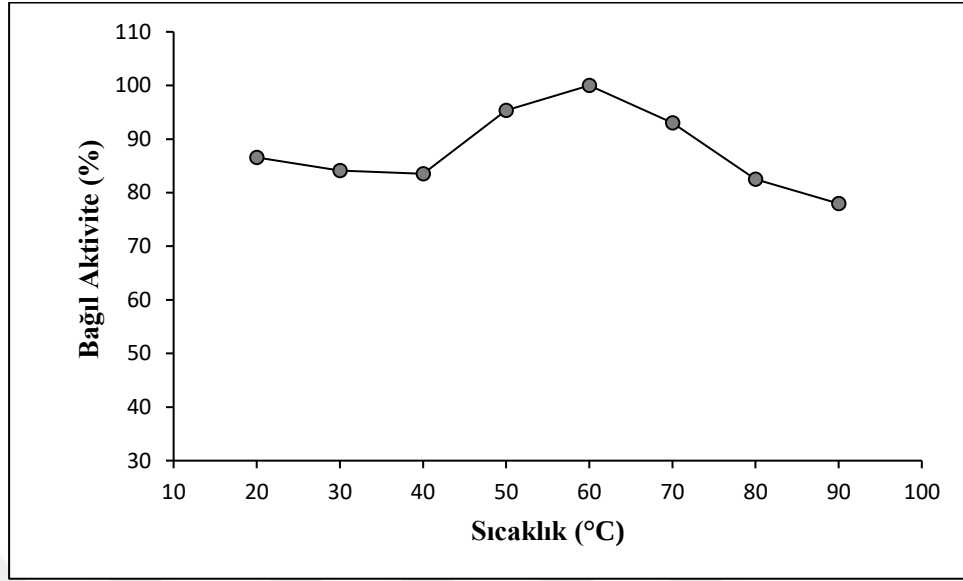
Şekil 4.35. Saflaştırılan proteaz enziminin farklı pH'larda stabilitesi

4.7.18. Proteaz Enzimi Üzerine Optimum ve Stabil Sıcaklığının Etkisinin Sonuçları

Saflaştırılan proteaz enziminin optimum ve stabil sıcaklıklarını belirlemek için Enzimin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla 20°C ile 90°C arasındaki sıcaklıklar denendi. Sonuçlar incelendiğinde *B. licheniformis* OSBS6 suşundan saflaştırılan proteaz enziminin optimum sıcaklığı 60°C olarak belirlendi.

Çizelge 4.17. *B. licheniformis* OSBS6'dan saflaştırılan proteaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için oluşturulan bağıl aktivite çizelgesi

Sıcaklık	20 °C	30 °C	40 °C	50 °C	60 °C	70 °C	80 °C	90 °C
Bağıl Aktivite (%)	86,57	84,09	83,50	95,33	100,00	92,99	82,48	77,96

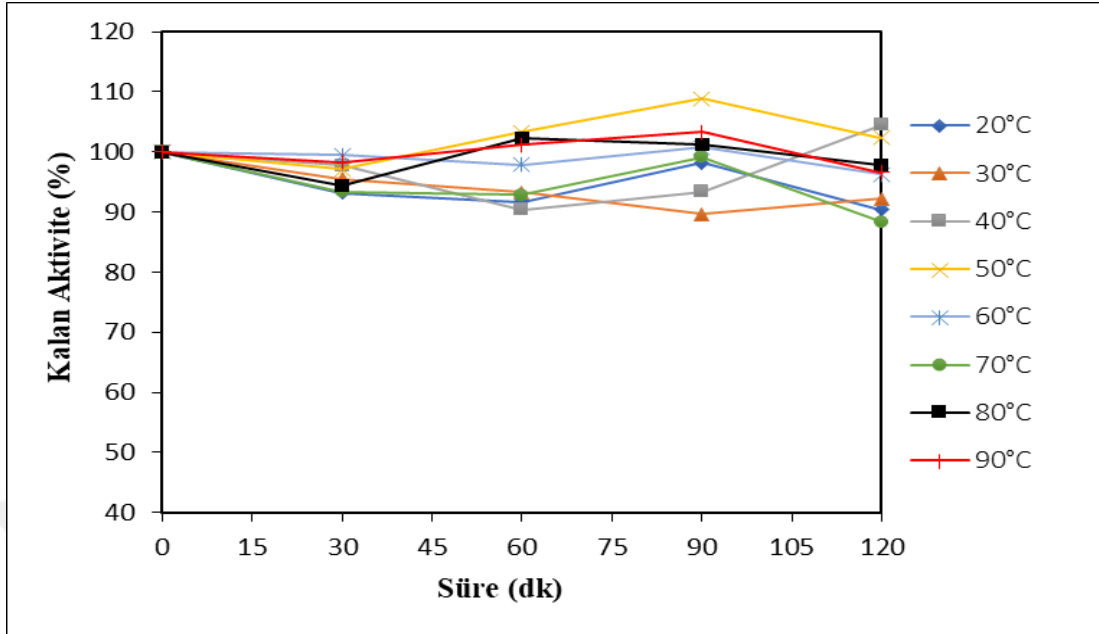


Şekil 4.36. Proteaz enziminin optimum sıcaklık grafiği

B. licheniformis OSBS6 suşundan saflaştırılan proteaz enziminin stabil sıcaklığını belirlemek amacıyla 20°C'den 90°C'ye kadar olan sıcaklık aralığında farklı inkübasyon sürelerinde (30, 60, 90 ve 120 dk) aktivite tayinleri yapıldı. Enzimin verilen tüm sıcaklık değerlerinde aktivitesinde ciddi bir azalma meydana gelmezken belli sıcaklıklarda aktivitesinin arttığı 50°C'de 90 dk inkübasyonun sonunda iaktivitesini en yüksek olduğu gözlemlendi.

Çizelge 4.18. *B. licheniformis* OSBS6'dan TPP sistemiyle saflaştırılan proteaz enziminin stabil sıcaklığı belirlemek için sıcaklık zaman çizelgesi

İnkübasyon Sonrasında Kalan Aktivite								
Süre (dk)	20°C	30°C	40°C	50°C	60°C	70°C	80°C	90°C
30	93,12	95,51	97,81	97,13	99,45	93,4	94,38	98,25
60	91,68	93,23	90,35	103,34	97,92	92,87	102,26	101,19
90	98,17	89,68	93,41	108,87	100,79	99,18	101,14	103,28
120	90,41	92,25	104,5	102,39	96,27	88,36	97,83	96,54



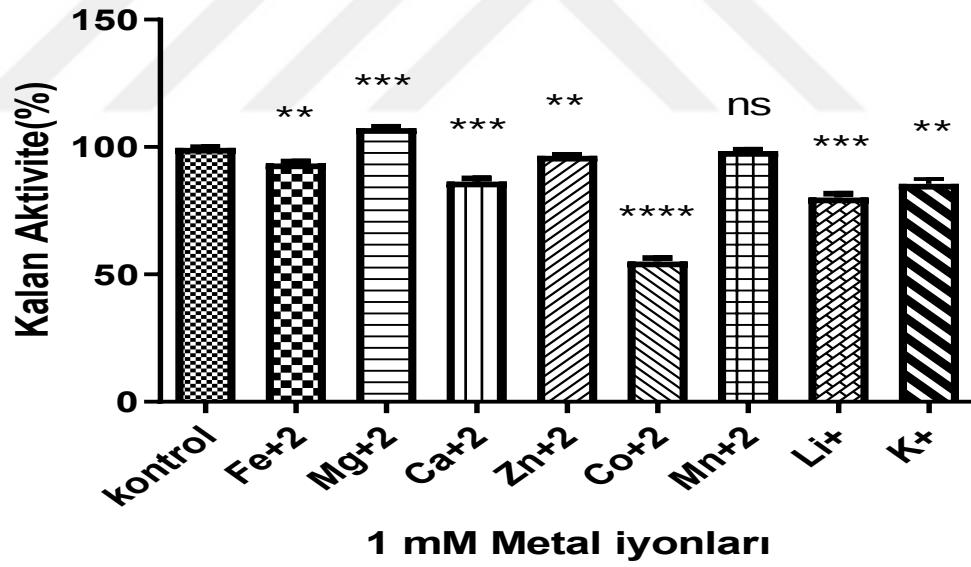
Şekil 4.37. Saflaştırılan proteaz enziminin sıcaklık zaman grafiği

4.7.19. Proteaz Enzimi Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisinin İncelenmesine Yönelik Sonuçlar

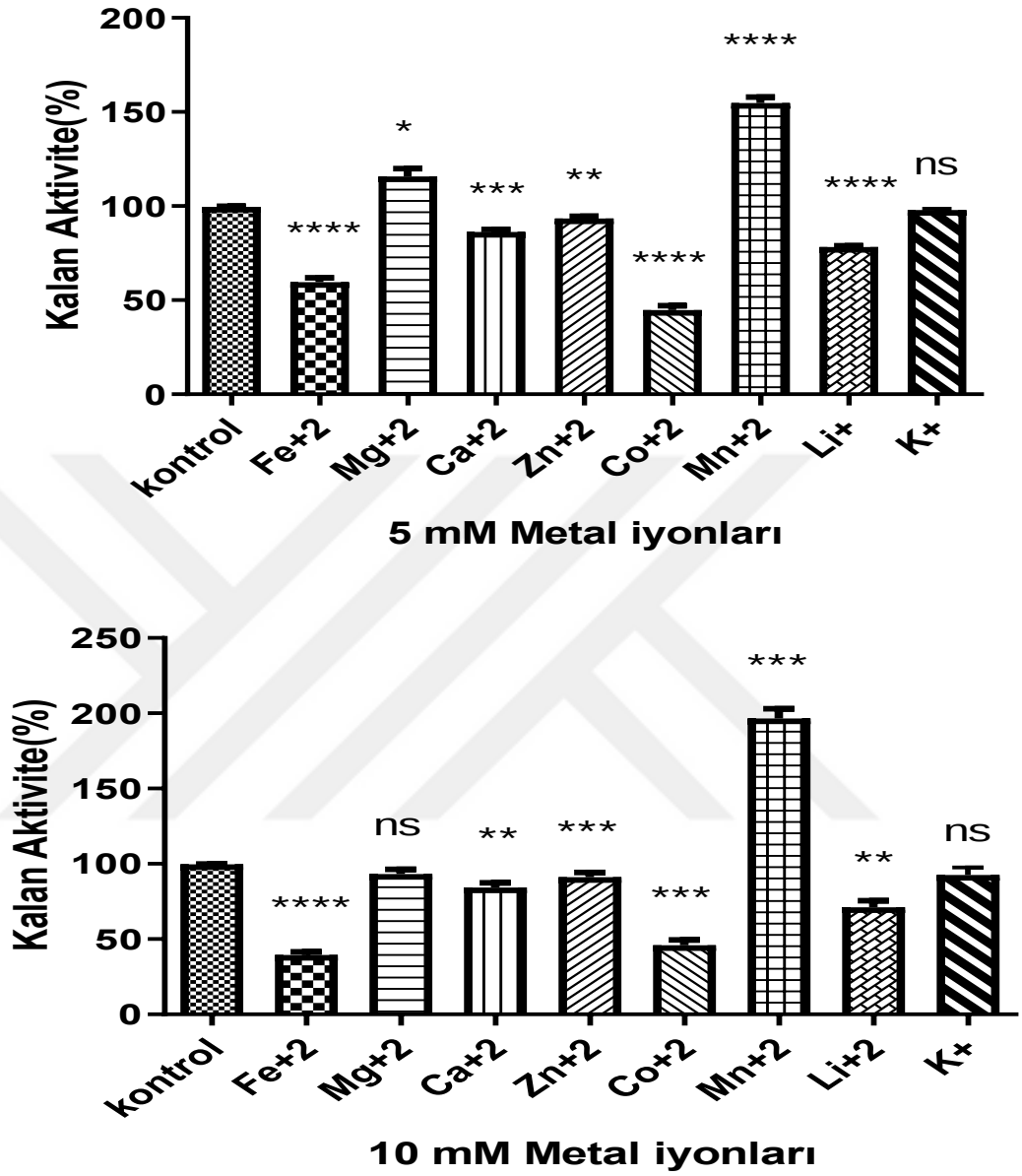
B. licheniformis OSBS6 suşundan saflaştırılan proteaz enzimine metal iyonlarının etkisini belirlemek için, 1, 5 ve 10 mM'lık konsantrasyonlarda Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Li^{2+} , Ca^{2+} ve K^{+} metal iyonları muamele edildi. 1mM'lık konsantrasyonda Ca^{2+} ve Co^{2+} iyonları dışında diğer metal iyonlarının varlığında enzimin aktivitesini yüksek kararlılıkta koruduğu gözlemlendi 5 mM ve 10 mM konsantrasyonlarda Mn^{2+} iyonu varlığında enzim aktivitesinde önemli bir artış olduğu gözlemlendi. 10 mM konsantrasyonda Co^{2+} iyonları %46'a kadar enzim aktivitesini düşürürken Fe^{2+} iyonları ise %39'a kadar düşürdüğü belirlenmiştir.

Çizelge 4.19. Proteaz enzim aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi

Metal iyonları	1 Mm	5 Mm	10 mM
Kontrol	100 ± 0,00	100±0,00	100±0,00
Fe²⁺	93,55± 6,007	59,55± 2,458	39,58± 2,011
Mg²⁺	107,4± 0,6383	115,8± 4,047	93,16± 3,230
Ca²⁺	86,43± 1,244	86,23± 1,452	84,33± 1,136
Zn²⁺	96,60± 7,165	93,39± 1,314	91,16 ± 3,016
Co²⁺	55,01±1,433	44,73± 2,346	45,99± 3,508
Mn²⁺	98,39± 0,6609	154,8± 3,106	196,6± 6,467
Li²⁺	84,94± 1,516	78,27± 0,666	71,22 ± 3,223
K⁺	85,59 ± 1,868	97,87± 0,811	92,58 ± 5,53



Şekil 4.38. (devam)



Şekil 4.38. Proteaz enzim aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi

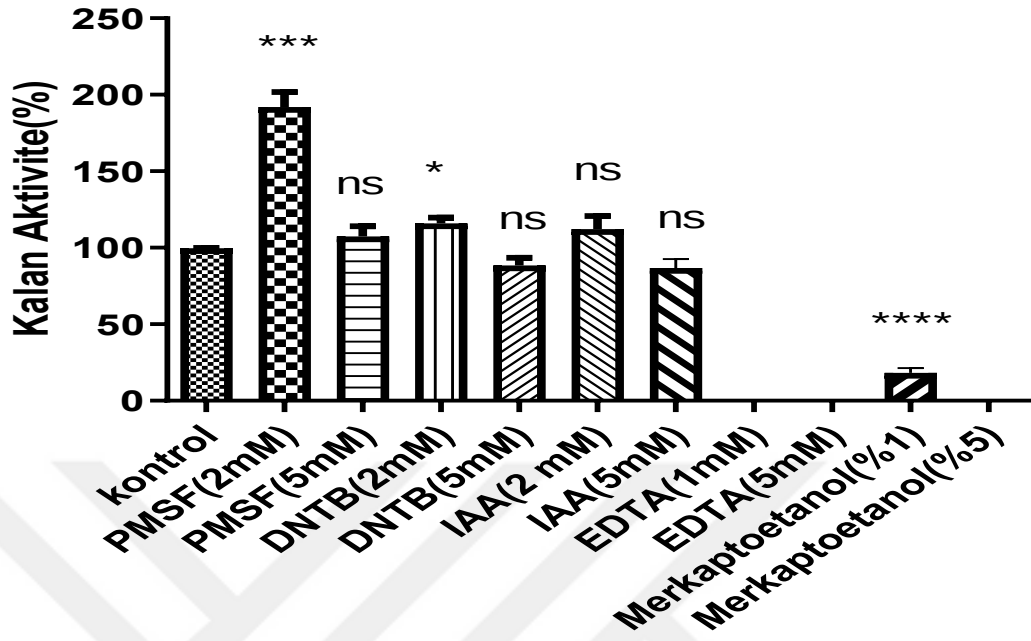
4.7.20. Proteaz Enzimi Aktivitesi Üzerine Bazı İnhibitörlerin Etkisinin İncelenmesine Yönelik Sonuçlar

B. licheniformis OSBS6'dan saflaştırılan proteaz enzimine inhibitör etkisinin belirlemek için 2-5 mM'lık konsantrasyonlarında EDTA, PMSF, DNTB, IAA ve %1 -5'lik oranında β -Merkaptoetanol kullanıldı. Bu sonuçlara göre, metalloenzim inhibitörü olan EDTA her

iki konsantrasyonunda da proteaz enzimini tamamen inhibe ettiği; β -Merkaptoetanol 2mM'lık konsantrasyonda enzim aktivitesini %18'e kadar düşürdüğü, 5 mM'lık konsantrasyonda ise tamamen inhibe ettiği; serin proteaz inhibitörü olan PMSF ise her iki konsantrasyonda enzim aktivitesini artırdığı; histidin proteaz inhibitörü olan IAA 2 mM konsantrasyonda enzim aktivitesini artırırken 5 mM konsantrasyonda enzim aktivitesini %85'e kadar düştüğü; sistein proteaz inhibitörü DNTB ise 2 mM'lık konsantrasyonda enzim aktivitesini %99 a kadar korurken 5 mM'lık konsantrasyonda %88'e kadar düştüğü gözlemlendi. EDTA'nın enzim aktivitesini tamamen inhibe ettiği belirlendiğinden enzimin metalloenzim olduğu belirlendi.

Çizelge 4.20. *B.licheniformis* OSBS6'dan elde edilen proteaz enzimi üzerine inhibitörlerin etkisi

İnhibitörler	2 Mm	5 Mm
Kontrol	100±0.00	100±0.00
PMSF	192,0± 9,757	139,5± 1,849
DTNB	99,63± 3,631	88,50± 5,025
EDTA	0	0
IAA	112,2± 8,639	86,86± 5,819
İnhibitör	%1	%5
β-Merkaptoetanol	18,15± 3,238	0



Şekil 4.39. *B. licheniformis* OSBS6'dan saflaştırılan proteaz enzimi inhibitörlerin etkisi

4.7.21. Bazı Organik Çözücülerin Proteaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisine Yönelik Sonuçlar

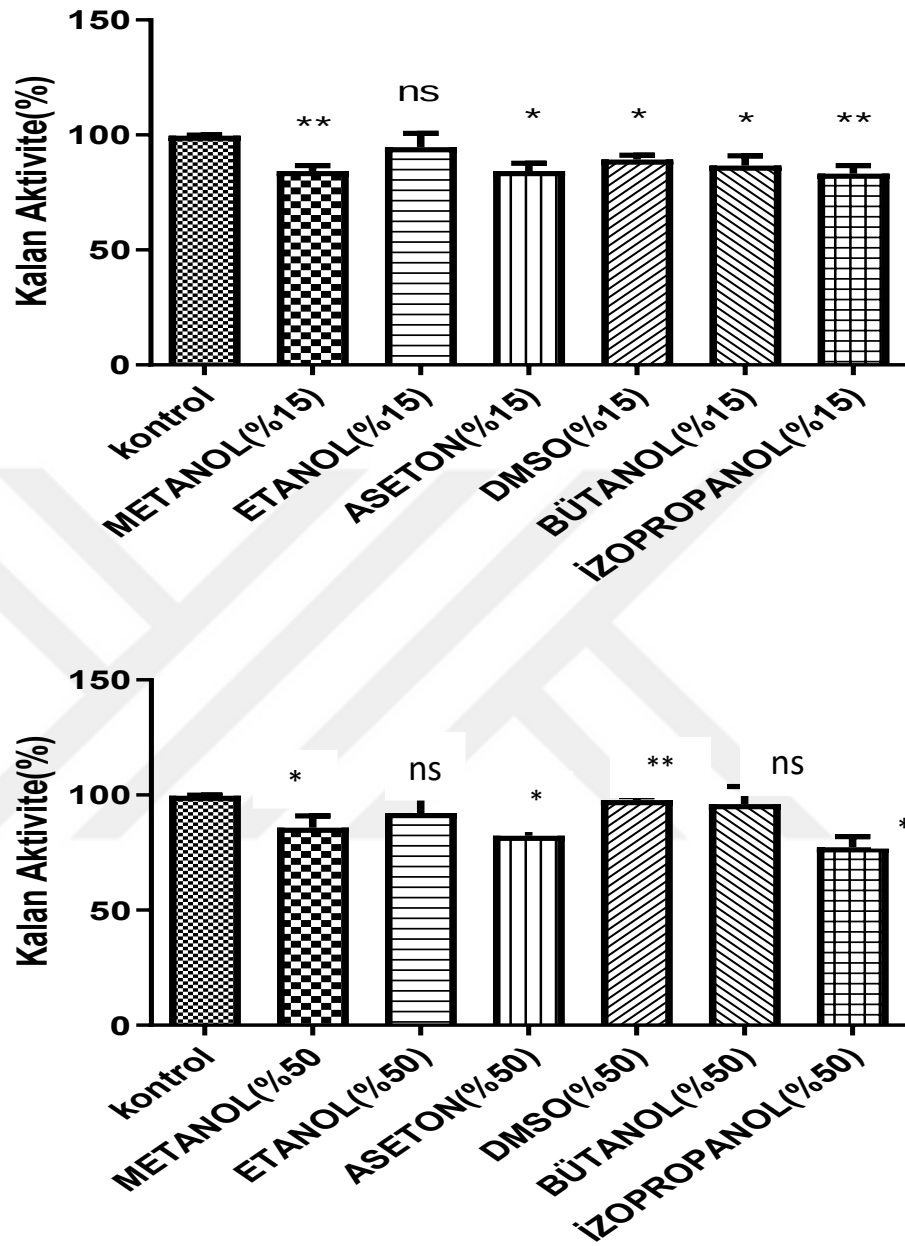
B. licheniformis OSBS6 suşundan saflaştırılan proteaz enzimi üzerine metanol, etanol, aseton, DMSO, t-bütanol, izopropanol gibi organik çözücülerin %15 ve %50'lik konsantrasyonlarda 1 ve 24 saatlik inkübasyon süresince etkisine bakıldı. 1 saatlik ve 24 saatlik inkübasyon sonunda enzimin aktivitesinde ciddi bir inhibisyon gözlenmezken genel olarak organik çözücülerle aktivitesi %77'lere kadar korumuştur.

Çizelge 4.21. Proteaz aktivitesi üzerine bazı organik çözücülerin 1 saatlik inkübasyonu sonunda etkisi

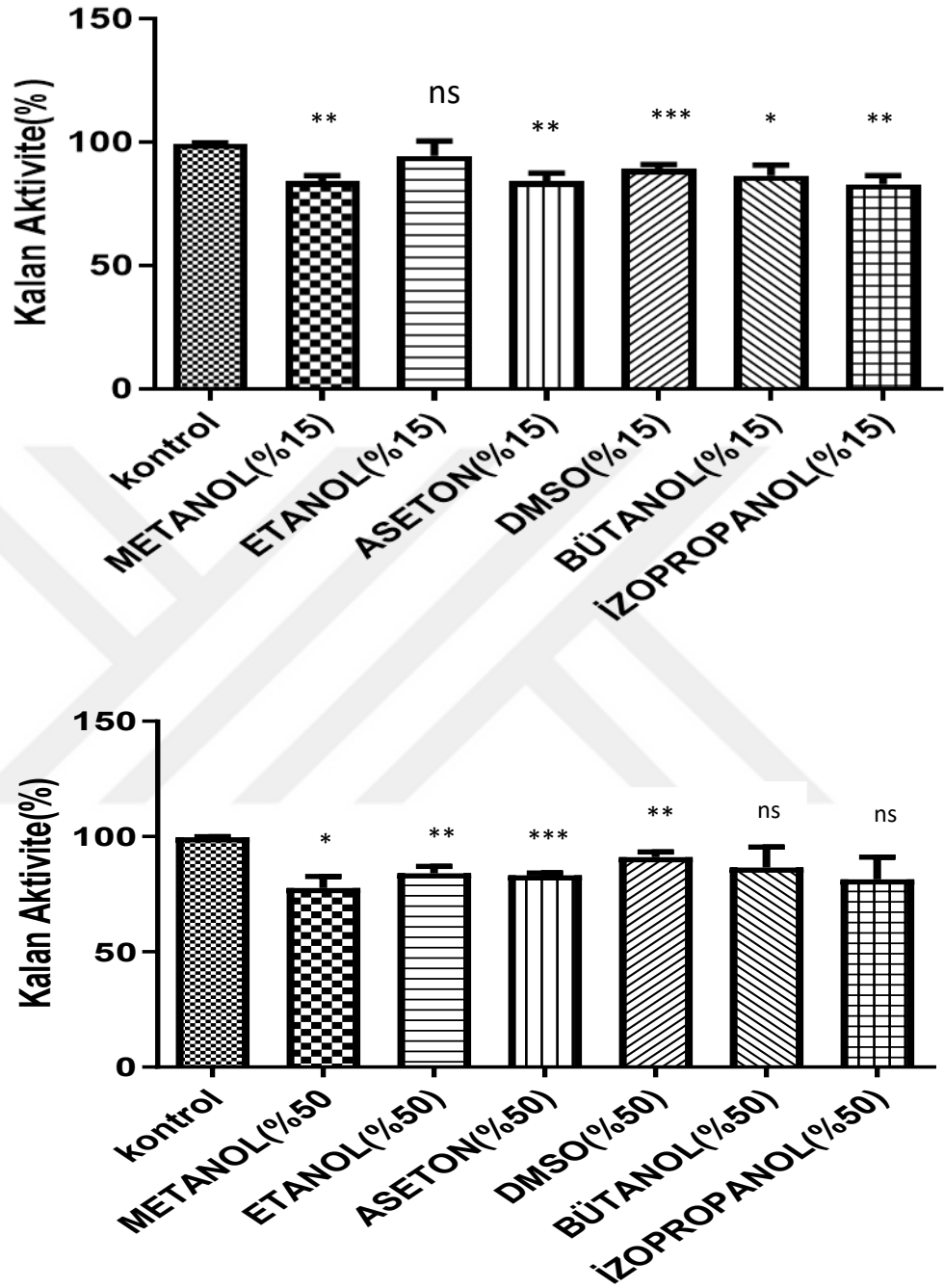
Organik çözücüler	%15	%50
Kontrol	100±0.00	100±0.00
Metanol	84,36± 2,379	85,85± 5,068
Etanol	94,7± 6,07	92,19± 6,943
Aseton	84,3± 3,43	82,32± 4,869
DMSO	89,30± 1,944	97,75± 1,587
Bütanol	86,68± 4,284	96,05± 7,673
İzopropanol	83,15± 3,497	77,30± 4,621

Çizelge 4.22. Proteaz aktivitesi üzerine bazı organik çözücülerin 24 saatlik inkübasyonu sonunda etkisi

Organik çözücüler	%15	%50
Kontrol	100±0.00	100±00
Metanol	84,24 ± 7,709	77,18± 4,982
Etanol	80,49± 4,797	84,02± 3,106
Aseton	91,54± 1,872	83,20± 1,059
DMSO	94,99 ± 6,925	91,12± 2,157
Bütanol	90,05± 4,269	86,57 ± 8,89
İzopropanol	84,64± 4,893	81,43± 9,580



Şekil 4.40. Proteaz enziminin organik çözücülerdeki 1 saat inkübasyon sonunda etkisi



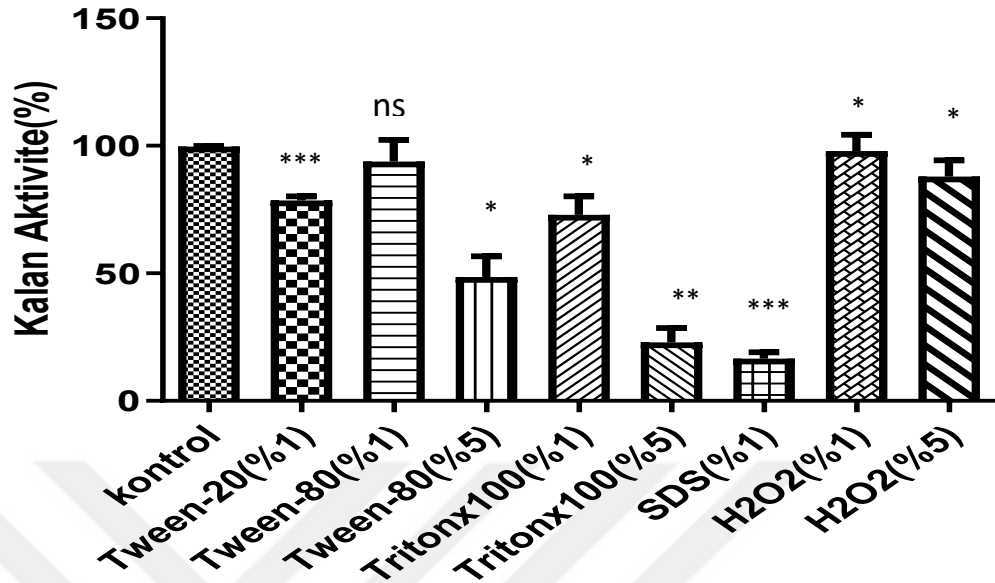
Şekil 4.41. Proteaz enziminin organik çözücülerdeki 24 saat inkübasyon sonundaki etkisi

4.7.22. Proteaz Enziminin Aktivitesi Üzerine Yüzey Aktif Maddelerinin ve Okside Edici Ajanının Etkisinin İncelenmesine Yönelik Sonuçlar

B.licheniformis OSBS6 suşundan saflaştırılan proteaz enzimine yüzey aktif maddelerin ve okside edici ajan olan H_2O_2 etkisini belirlemek amacıyla %1-5'lik konsantrasyonlarda SDS, Tween-20, Tween-80, Triton-X-100 ve H_2O_2 kullanıldı. %1'lik SDS enzim aktivitesinde ciddi bir inhibisyon gözlenirken bir aktivite kaybı gözlenirken %1'lik H_2O_2 Tween-80 ve okside edici ajan olarak kullanılan H_2O_2 varlığında enzimin aktivitesini %97'ye kadar koruduğu tespit edildi. Kullanılan yüzey maddelerinin konsantrasyonu arttıkça enzimin aktivitesini daha fazla etkilediği tespit edildi. %5'lik Tween-20'nin ve SDS'in enzimin aktivitesinin tamamen inhibe ettiği gözlemlendi.

Çizelge 4.23. Yüzey aktif maddelerin ve okside edici ajanın *B.licheniformis* OSBS6'dan saflaştırılan proteaz enzimi üzerine etkisi

Yüzey aktif maddeler	%1	%5
Kontrol	100±0.00	100±0.00
Tween-20	78,51± 1,765	0
Tween-80	93,85± 8,489	48,56 ± 8,121
Triton-X-100	72,91± 7,227	22,94 ± 5,674
SDS	16,60 ± 2,478	0
Okside edici ajan	%1	%5
H_2O_2	97,92± 6,343	87,92± 6,436



Şekil 4.42. *B.licheniformis* OSBS6'dan saflaştırılan proteaz enzimi üzerine yüzey aktif maddelerin ve okside edici ajanın etkisi

4.7.23. *B.licheniformis* OSBS6'dan Saflaştırılan Proteaz Enziminin Doğal Substratlara Olan Özgüllüğünün İncelenmesi Yönelik Sonuçlar

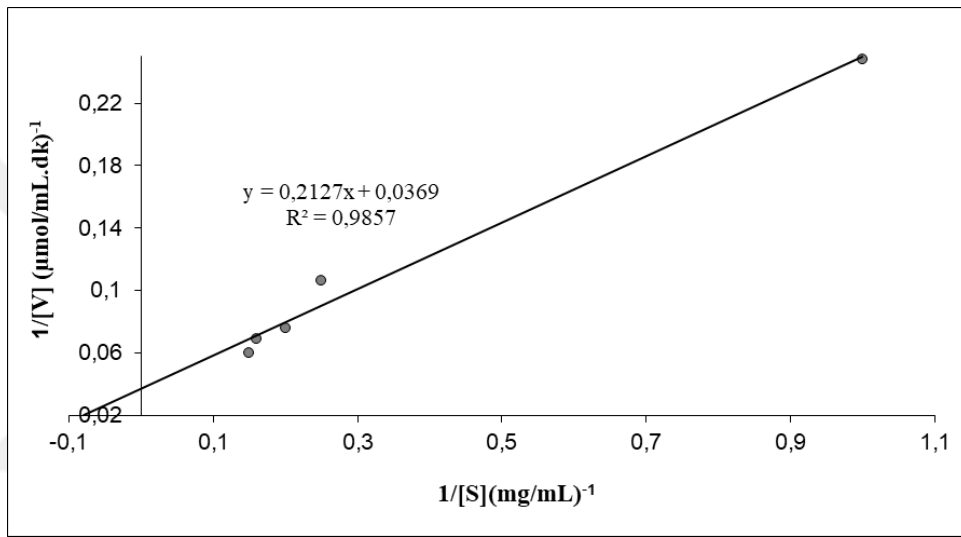
B. licheniformis OSBS6'dan saflaştırılan proteaz enziminin kazein, azokazein, hemoglobin, jelatin ve BSA substratlarının enzim aktivitesi üzerine etkisine bakıldı. Enzimin aktivitesi sırasıyla kazeinde (%100) gösterdiği daha sonra azokazein (%78), hemoglobin (%57), BSA (%28) ve jelatin (%12) olarak belirlendi.

Çizelge 4.24. *B. licheniformis* OSBS6 suşundan saflaştırılan proteaz enziminin doğal substratlara karşı özgüllüğü

Doğal substratlar (%0,65 w/v)	Bağıl aktivite %100
Kazein	100
Azokazein	78
BSA	28
Jelatin	12
Hemoglobin	57

4.7.24. K_m ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar

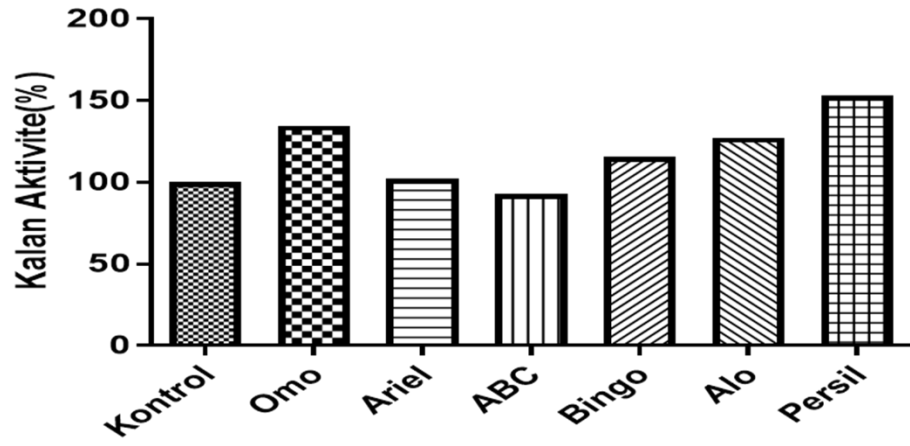
B. licheniformis OSBS6'dan üçlü faz ayırma yöntemiyle saflaştırılan proteaz enziminin kazein substratıyla elde edilen aktivite sonuçlarından yararlanılarak Lineweaver-Burk grafiğiyle K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı. Bu grafikten yararlanılarak kazein substratı için 5,76 K_m mg/mL ve V_{max} değeri 27,10 $\mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{dk}^{-1}$ olarak hesaplandı.



Şekil 4.43. Kazein substratıyla elde edilen Lineweaver-Burk grafiği

4.7.25. *B.licheniformis* OSBS6'dan Saflaştırılan Proteaz Enzimin Aktivitesi Üzerine Ticari Deterjanların Etkisinin İncelemesine Yönelik Sonuçlar

B.licheniformis OSBS6'dan saflaştırılan proteaz enzimi üzerine bazı ticari deterjanların etkisi incelendi. Bu deterjanlardan enzim aktivitesini ABC hariç diğerlerinin artırdığı belirlendi.



Şekil 4.44. *B. licheniformis* OSBS6'dan saflaştırılan proteaz enzimi üzerine ticari deterjanların etkisi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tez çalışması kapsamında çeşitli su kaynaklarından izole edilmiş bakterilerden petri denemesiyle hem amilaz hem proteaz aktivitesine sahip olan suşlar tespit edildi. Zon çapı dikkate alındığında sıcak su kaynağından izole edilmiş termofilik OSBS 6 suşunun en iyi enzim aktivitesine sahip olduğu tespit edildi. Bu tez çalışmasında çeşitli su kaynaklarından izole edilmiş bakterilerden petri denemesi yapılarak hem amilaz hem proteaz aktivitesine sahip olan suşlar tespit edildi. Zon çapı dikkate alındığında sıcak su kaynağından izole edilen termofilik OSBS6 suşunun enzim aktivitesinin yüksek olduğu belirlendi. Tez çalışması boyunca OSBS6 suşu kullanıldı. OSBS6 suşunun 16S rRNA tür düzeyinde analizi yapılarak *B. licheniformis* suşuyla %99 benzerlik gösterdiği tespit edildi. Biyokimyasal testlerle de desteklendi. Endüstride amilaz ve proteaz enzimi en çok *Bacillus* suşlarından tercih edilir. Tür belirlendikten sonra TPP yöntemiyle amilaz enzimi saflaştırıldı. *B. licheniformis* OSBS6'dan TPP yöntemiyle amilaz enzimi %30 amonyum sülfat oranı, 1,0:1,5 homojenat: t-bütanol, pH 7,0'de, %32,84 verimle 7,23 kat ara fazda saflaştırıldı. Literatürde amilazın saflaştırılmasına kromatografik yöntemlerle örnek olarak; *Bacillus subtilis* KIBGE HAS'dan amilaz enzimini saflaştırmak için ultrafiltrasyon, amonyum sülfat çöktürmesi, jel filtrasyon çöktürmesi yöntemi kullanılarak 13011 U/mg spesifik aktiviteyle ve 96,3 kat saflaştırıldığı bildirilmiştir. *Bacillus subtilis*'ten amilazı saflaştırmak için amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişim kromatografisi ve jel kromatografisi yöntemleri kullanılarak iki farklı tip amilaz enzimleri sırasıyla %8 ve %4 verimle 15,93 ve 6,44 kat saflaştırıldığı bildirilmiştir (David *et al.* 2017). TPP yöntemi olarak ise *B. amiloliquefaciens*, buğday tohumu ve domuz pankreasından α -amilaz enzimi TPP'nin bir çeşidi olan MLPTPP yöntemiyle homojenatlara alginat ester eklendikten sonra %20 (w/v) amonyum sülfat, 1,0 :1,0 homojenat: t-bütanol oranında 37°C'de 1 saat inkübe edildiği belirtilmiştir. Üst fazda t-bütanol ara fazda alginat ester alt fazda ise enzimlerin toplandığı; amilaz enzimi *Bacillus amiloliquefaciens* suşundan %74 verimle 10 kat; domuz pankreasından %74 verimle 10 kat; buğday tohumundan ise %77 verimle 55 kat saflaştırıldığı bildirilmiştir (Mondal *et al.* 2003). *B. licheniformis* OSBS6 suşundan TPP yöntemiyle saflaştırılan amilaz enziminin ara fazda kalmış ve SDS-PAGE'de tek bant olarak belirlendi.

Saflaştırılan amilaz enziminin moleköl kütlesi yaklaşık 56,65 kDa olarak hesaplandı. Literatürde saflaştırılan amilaz enzimlerin amilazın moleköler ağırlığı 10-210 kDa arasında değişir. *B. licheniformis* B4-423 suşundan saflaştırılan amilaz enziminin SDS-PAGE’de moleköl kütlesinin 58 kDa (Wu *et al.* 2018); *Bacillus mojavensis* A21 suşundan saflaştırılan amilaz enziminin 58 kDa (Hmidet *et al.* 2008); alkalifik bir *Bacillus* suşundan saflaştırılan amilaz enzimi 53 kDa (Igarashi *et al.* 1998); *Bacillus licheniformis*’den saflaştırılan amilaz enziminin 22,5 kDa (Saito *et al.* 1973); *Bacillus* ANT-6 suşundan saflaştırılan amilaz enzimi 94,5 kDa (Burhan *et al.* 2003); *Bacillus* IMD 434 suşundan saflaştırılan amilaz enzimi 69,2 kDa (Hamilton *et al.* 1999) olduğu belirlenmiştir.

B. licheniformis OSBS6 suşundan saflaştırılan amilaz enziminin optimum pH’sı 9,0 olarak belirlenirken 2 saat inkübasyondan sonra pH 8,0-11,0 arası aktivitesini %40’dan fazlasını koruduğu belirlendi. *B. licheniformis* CUMC305’ten saflaştırılan α -amilaz enziminin optimum pH’sı 9,0 olduğu ve 18 saat inkübasyondan sonra stabilitesini pH 3,0; 4,0; 5,0; 6,0’da sırasıyla %50, %68, %74, %84; pH 7,0-9,0 arasında %100; pH 10,0’da ise %95’e kadar aktivitesini koruduğu bildirilmiştir (Krishnan and Chandra 1983). *B. licheniformis* PN5’ten izole edilen edilen alkalın amilaz pH 4,0-12,0’da aktifken, pH 10’da maksimum aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Saxena *et al.* 2007). *Bacillus* TS-23 suşundan elde edilen amilaz enziminin optimum pH’sı 9,0 olduğu tespit edilmiştir (Lin *et al.* 1998). *Bacillus* XAL601 suşundan saflaştırılan amilaz enziminin optimum pH’sının 9,0 olduğu belirlenmiştir (Lee *et al.* 1994). *B. licheniformis*’ten saflaştırılan amilaz enziminin optimum pH’sı 9,0; pH 6,0-11,0 arasında stabilitesini koruduğunu bildirilmiştir (Saito *et al.* 1973). *B. licheniformis* 44MB82-A’dan saflaştırılan amilaz enziminin pH 6,5 ile 8,0 arasında stabilitesini koruduğunu rapor edilmiştir (Ivanova *et al.* 1993). *Bacillus* A3-15’den saflaştırılan amilaz enziminin pH 11,0’de optimum aktivite gösterirken pH 10,0–11,5 arasında %95’e kadar aktivitesini koruduğu belirtilmiştir (Arikan 2008). *Bacillus licheniformis* OSBS6’dan saflaştırılan amilaz enziminin alkalın pH’ya sahip olduğu belirlendi. pH değeri 8,0’dan yüksek olan amilazlar, nişasta ve tekstil endüstrilerinde nişasta sakrifikasyonuna yönelik potansiyel uygulamalara sahiptir ve ayrıca bulaşık deterjanı ve çamaşır deterjanların bir bileşenidir (Saxena *et al.* 2007). Bu

nedenle *B. licheniformis* OSBS6 suşundan saflaştırılan amilaz enziminin alkalın özellikte pek çok endüstriyel alanda kullanım alanına imkan sağlamaktadır.

B. licheniformis OSBS6 suşundan saflaştırılan amilaz enzimin optimum sıcaklığı 70°C olduğu belirlenirken stabil sıcaklığının belirlenmesi için 20-90°C aralığında 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda aktivite tayini yapıldı. Sıcaklık kararlılığı sıcaklık arttıkça enzim aktivitesi düşürdüğünü tespit edildi. Literatüre bakıldığında *B. licheniformis* suşuyla pek çok çalışma bulunmaktadır. Alkalın termotolerant *Bacillus cereus* suşundan saflaştırılan α -amilaz enziminin optimum sıcaklığının 65°C olduğu belirtilmiştir (Annamalai *et al.* 2011). *B. licheniformis* CUMC305'den saflaştırılan α -amilaz enziminin 90°C'de maksimum aktivite gösterirken 100°C'de ise %91'e kadar aktivitesini koruduğunu; stabil sıcaklığı ise 60°C ve 70°C'de 3 saat; 80°C'de 90 dk bekletildikten sonra sırayla %91, %79, %71 aktivitelerini koruduğu, 100°C ise 4 saat inkübasyondan sonra tamamen stabil olduğu belirtilmiştir (Krishnan and Chandra 1983). *Bacillus licheniformis* B4-423'den saflaştırılan α -amilaz enziminin 20 °C ile 80 °C sıcaklık aralıklarında stabilitesini %90 kadar koruduğu gösterilmiştir (Wu *et al.* 2018). *B. licheniformis* 44MB82-A'ten saflaştırılan amilaz enzimin optimum sıcaklığının 90°C olduğu gösterilmiştir (Ivanova *et al.* 1993). *Bacillus* suşundan saflaştırılan α -amilaz enziminin optimum sıcaklığının 45-55°C; 90°C de 1 saat inkübasyondan sonra %100; 60°C de 24 saatlik inkübasyondan sonra %40'a kadar aktivitesini koruduğu tespit edilmiştir (Teodoro and Martins 2000). *B. licheniformis* NCIB 6346'dan saflaştırılan α -amilazın 85°C de 1 saatlik inkübasyondan sonra aktivitesini %98 koruduğu bildirilmiştir (Morgan *et al.* 1981). *B. licheniformis* ANT-6'den saflaştırılan amilaz enzimi 80°C'de maksimum aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Burhan *et al.* 2003). *B. licheniformis* KSM-1378'den saflaştırılan amilaz enzimi 55°C'de maksimum aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Igarashi *et al.* 1998). Literatüre genel olarak bakıldığında aynı cins çalışılmasına rağmen sıcaklık ve pH profili geniş bir aralıkta değişmekle birlikte elde edilen sonuçlarla termostabil bir enzim saflaştırıldığını göstermektedir. Termofilik mikroorganizmalar (50°C veya üstü optimum büyüme sıcaklığı) ekstremofiller arasında büyük ilgi görmüştür, çünkü termostabil enzimler amilazlar, selülazlar, kitinazlar, pektinazlar, ksilanazlar, proteazlar, lipazlar ve DNA polimerazlar gibi enzimlerin kaynaklarıdır. Bu enzimler, yüksek sıcaklıklarda

biyoteknolojik işlemler gerçekleştirmek için uygun olabilecek benzersiz özellikler göstermektedir. Ayrıca, termofilik enzimler birçok çözücüye, deterjanlara ve asidik ve alkalın pH'a karşı daha kararlıdır (Mohammad *et al.* 2017).

B. licheniformis OSBS6'dan saflaştırılan amilaz enzimi üzerine metallerin etkisine bakıldı. Saflaştırılan amilaz enziminin 10 mM'lık K^+ metal iyonu enzim aktivitesini %8'e kadar artırdığı, Mg^{2+} metal iyonu tüm konsantrasyon değerlerinde %95'e kadar koruduğu belirlendi. 1 ve 5 mM'lık Ca^{2+} metal iyonu enzim aktivitesini %95'e kadar koruduğu, 10 mM'lık konsantrasyonda ise %76'a kadar düşürdüğü belirlendi. Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} metal iyonlarının konsantrasyonu arttıkça enzimi güçlü bir şekilde inhibe ettiği tespit edildi. *B.licheniformis* CUMC305'ten saflaştırılan α -amilaz enzimi üzerin Na^+ , Ca^{2+} , and Mg^{2+} iyonları aktivitesini artırdığını; Hg^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Ag^+ , Fe^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Al^{2+} ve Mn^{2+} iyonları ise inhibe ettiğini bildirilmiştir. (Krishnan and Chandra 1983). *Bacillus licheniformis* B4-423'den saflaştırılan α -amilaz enzimi üzerinde 5 mM'lık K^+ , Na^+ , Mg^{2+} and Ca^{2+} aktivitesini artırdığını, Mn^{2+} ve Ba^{2+} düşürdüğü ancak 5 mM Pb^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , and Fe^{3+} varlığında güçlü bir şekilde inhibe ettiğini bildirilmiştir (Wu *et al.* 2018). *Bacillus licheniformis* NH1'den saflaştırılan termostabil α -amilazın 2 mM'lık hazırlanan Ca^{2+} , Fe^{2+} and Ba^{2+} metal iyonları enzim aktivitesini düşürdüğünü, Mg^{2+} metal iyonu hafif şekilde artırdığı, Hg^{2+} and Zn^{2+} metal iyonları ise enzimi tamamen inhibe ettiği rapor edilmiştir (Hmidet *et al.* 2008). *Bacillus subtilis* JS-2004 suşundan izole edilen α -amilazın enzim aktivitesini 2 mM'lık Hg^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} metal iyonları güçlüce inhibe ettiğini; Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , and Mn^{2+} metal iyonları az etkilediğini belirtilmiştir (Asgher *et al.* 2007). *B.licheniformis* OSBS6'dan saflaştırılan amilaz enziminin aktivitesini K^+ metal iyonları az da olsa artırdığı tespit edildi.

B.licheniformis OSBS6'dan saflaştırılan amilaz enzimi aktivitesi üzerine bazı inhibitörlerin etkisinin belirlenmesi amacıyla; 1 mM ve 10 mM'lık serin spesifik inhibitörü olan PMSF; sülfhidril grubu inhibitörü olan β -merkaptotanol; sistein spesifik inhibitörü olan DTNB ve metaloenzim inhibitörü olan EDTA kullanıldı. *Bacillus licheniformis* OSBS6 suşundan saflaştırılan amilaz enziminin aktivitesini EDTA'nın tamamen inhibe ettiğini, DTNB'nin ise artırdığını, PMSF ve β -merkaptotanol'ün ise

azalttığı tespit edildi. *B.licheniformis* OSBS6'dan saflaştırılan amilaz enziminin metalloenzim olduğu aktif bölgesinde sülfidril grubu bulunduğu ancak sistein grubunun ise bulunmadığı söylenilebilir. *Bacillus licheniformis* NH1'den saflaştırılan termostabil α -amilaz enziminin inhibitör etkisi için sırasıyla 1 mM, 5 mM ve 15 mM'lık PMSF, β -merkapttoethanol and EDTA kullanılarak enzim PMSF ve β -merkapttoethanol de aktivitesini korurken EDTA'da ise %17'e kadar aktivitesini azalttığı belirlenmiştir (Hmidet *et al.* 2008)

B. licheniformis OSBS 6 amilaz enzimi üzerine organik çözümlerin etkisini belirlemek için %10 ve %20'lik konsantrasyonlarında metanol, etanol, aseton, izopropanol ve gliserol gibi organik çözümler kullanıldı. %10'luk metanol, etanol, aseton, izopropanol ve gliserol varlığında sırasıyla enzim aktivitesini %93, %87, %81, %86, %91 oranında korurken %20'luk konsantrasyonda ise sırasıyla %102, %80, %70, %71, %105 oranında koruduğu belirlendi. %20'lik metanol ve gliserol enzim aktivitesini arttırdığı tespit edildi. Literatürde *B. licheniformis* suşuyla ilgili pek çok çalışma mevcut olmasına rağmen enzim üzerine organik çözümlerin etkisi ile ilgili çalışma sınırlıdır. *Bacillus licheniformis* AI20 suşundan saflaştırılan α -amilaz enziminin etanol, methanol, aseton, izopropanol ve gliserol gibi çözümlerin etkisine bakıldığı %10 konsantrasyonlarda enzim aktivitesini koruduğu %20 lik konsantrasyonda ise hafif bir inhibisyon gösterdiğini belirtmiştir (Abdel-Fattah *et al.* 2012).

B. licheniformis OSBS6 suşundan saflaştırılan amilaz enzime etkisini belirlemek için yüzey maddelerinden Tween-20, Tween-80, TritonX-100 ve SDS; okside edici ajan olarak ise H_2O_2 kullanıldı. Sonuçlar incelendiğinde %1'lik Tween-80 enzim aktivitesini arttırdığı belirlenirken %1'lik konsantrasyonlarda genel olarak enzim aktivitesini koruduğu %5'lik konsantrasyonda ise enzim aktivitesini %54'e kadar düşürdüğü belirlendi. Literatüre bakıldığında, *B. mojavensis* A21 suşundan izole edilen α -amilaz enziminin Triton X-100, Tween 20 (%5, v/v) and SDS (%1, w/v) varlığında sırayla % 85, %83 ve %71 oranınd aktivitesini koruyabildiğini belirtilmiştir (Hmidet *et al.* 2010). *Bacillus* TS-23'dan saflaştırılan α -amilaz enzime Tween 80, Triton X-100 ve SDS'in inhibitör etkisi gösterdiğini ancak %0.05 Tween-80 enzimin aktivitesini artırdığı

bildirmiştir (Lin *et al.* 1998). *Bacillus licheniformis* CUMC-305'ten saflaştırılan α -amilaz enziminin aktivitesini yüzey maddelerinden Tween-80, Triton X-100 ve SDS'in artırırken SDS'in enzim aktivitesini daha fazla artırdığı bildirilmiştir (Chandra *et al.* 1980) Yüzey maddeleri ve okside edici ajanlar lekeyi çıkarmak ve beyazlatmak için deterjana eklenen katkı maddeleridir. Deterjan endüstrisinde uygulamalara sahip olması için yüzey aktif maddeleri, şelatörler ve okside edici maddeler gibi çeşitli deterjan bileşenlerine karşı kararlı olmalıdır. Deterjan içeriğindeki katkı maddesi çeşitleri ve miktarı deterjan endüstri için ideal olup olmadığını belirlemesine rağmen %1'lik yüzey maddelerinden Tween-20, Tween-80, TritonX-100 ve SDS; okside edici ajan olarak ise H₂O₂ varlığında enzim aktivitesini koruduğu gözlemlendi.

B. licheniformis OSBS6'dan saflaştırılan amilaz enziminin patates nişastası, pirinç nişastası, buğday nişastası, maltotrioz ve amiloz gibi farklı substratlar varlığında aktivitesine bakıldı. Amilaz enzimi sırasıyla patates nişastası (%100), pirinç nişastası (%93), buğday nişastası (%87), maltotrioz (%42) ve amiloz (%34) aktivite gösterdiği belirlendi. Literatüre bakıldığında; *B.licheniformis* MTCC 2618 suşundan saflaştırılan α -amilazın nişasta, pirinç tozu, buğday tozu, ragi tozu gibi farklı substrata (nişasta 3.64 IU/ mL/ dk, pirinç tozu 2.93 IU/ mL/ dk, buğday tozu 2.67 IU/ mL/ dk, ragi tozu 2.36 IU/ mL/ dk) karşı aktivitesine bakılmış ve nişastaya en fazla ilgi gösterdiği belirlenmiştir. (Divakaran *et al.* 2011). *B. mojavensis* A21 suşundan izole edilen α -amilaz enzimine %1 (w/v)'lik patates nişastası, buğday nişastası, mısır nişastası, amiloz, amylopektin ve maltooligosakkarit gibi farklı substratların etkisi sırasıyla %100, %78, %64, %80 ve %117 olarak rapor edilmiştir (Hmidet *et al.* 2010). *Bacillus* TS-23 suşundan saflaştırılan α -amilaz enzimine patates nişastası, α -siklodekstrin, β -siklodekstrin, γ -siklodekstrin, amilopektin, glikojen, maltoz, maltotrioz, maltotetroz, maltopentoz, maltoheptoz, amiloz gibi farklı substratların varlığında etkisine bakılmış en fazla patates nişastasına özgünlük gösterdiği belirlenmiştir (Lin *et al.* 1998). Enzimin farklı substratlara özgünlük göstermesi endüstriyel olarak kullanım alanını artırır.

Proteaz enzimleri canlının fizyolojik durumunu korumasının yanısıra endüstride de farklı rol oynayan benzersiz enzim sınıflarını oluşturur. Pek çok proteaz enzimi üreticisi olan

mikroorganizma bulunmasına rağmen sadece birkaçı ticari olarak tercih edilir. Günümüzde endüstriyel olarak kullanılan enzimlerin %50'den fazlası protein ve genetik mühendisliği ile modifiye edilen suşlar tarafından üretilir (Banerjee and Ray 2017). Mikrobiyal proteazlar, maksimum aktivite gösterdikleri pH değerine göre asidik, nötral ve alkalın olarak sınıflandırılır. Bunlar arasında alkalın proteazlar çamaşır deterjanı, tekstil, gıda işleme, ilaç, deri, kağıt hamuru endüstrisi gibi çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanılır (Rai and Mukherjee 2010). Termofilik bakterilerden izole edilen termostabil enzimler ise sıcaklığa dayanılıkları nedeniyle ilaç endüstrisinde tercih edilmektedir (Panda *et al.* 2013)

B. licheniformis OSBS6 suşundan TPP yöntemiyle proteaz enzimi %70 amonyum sülfat oranı 1,0:1,5 (homojenat: t-bütanol oranı) ve pH 6,0'da %87,65 verimle 13,33 kat alt fazdan saflaştırıldı. Literatürde enzim saflaştırma çalışmalarında genellikle birden fazla aşamalı kromatografik yöntemler tercih edilirken TPP yöntemiyle sayılı çalışmalar mevcuttur. Kromatografik çalışmalara bakılınca *Planomicrobium* L-2 suşundan proteaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz, iyon değişim kromatografisi ve jel kromatografisiyle %7,5 verimle 1,7 kat saflaştırıldığı bildirilmiştir (Liu *et al.* 2013). *Aspergillus niger*'den proteaz enzim iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak %10,96 verim 16,60 kat saflaştırıldığı bildirilmiştir (Racheal *et al.* 2015). *Bacillus licheniformis*'ten proteaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesi ve iyon değişim kromatografisi ile %66,76 verimle 2,28 kat saflaştırıldığı belirtilmiştir (Mardina and Yusof, 2016). Proteaz enzimini saflaştırmak için yapılan TPP çalışmalarına bakıldığında ise ipek otundan saflaştırmak için proteaz enzimini önce %50 amonyum sülfat 1,0:0,5 oranında t-bütanolle birinci TPP sonrada alt faz alınarak %65 amonyum sülfatla 1,0:0,5 oranında t-bütanolle muamele edilerek ikinci bir TPP yapıldığı belirtilerek %132 verimle 6,92 kat saflaştırıldığı ve enzimin alt fazda kaldığı bildirmiştir (Rawdkuen *et al.* 2010). Balık iç organlarından alkalın proteazı saflaştırmak için %50 amonyum sülfat, 1,0:0,5 oranında t-bütanolle ve pH 8,0 25°C koşullarında TPP yöntemiyle %154 verimle saflaştırıldığı rapor edilmiştir (Ketnawa *et al.* 2014). Kromatografik yöntemle TPP kıyaslandığında TPP yöntemi kısa, hızlı, ekonomik, etkili, küçük ölçekli çalışılabilirdiği gibi büyük ölçekte çalışılması gibi avantajlarına sahipken kısmi olarak saflaştırır (Yan *et*

al. 2017). TPP yöntemiyle yapılan enzim saflaştırmaları %25-363 verim; 2,7-95 arasında kat saflaştırıldığı değıştiği belirlenirken *B. licheniformis* OSBS6'dan saflaştırılan proteaz enzimi ise %87,65 verimle 13,33 kat saflaştırıldığı tespit edildi.

B. licheniformis OSBS6 suşundan saflaştırılan proteaz enziminin TPP yöntemiyle enzimin SDS-PAGE, zimogram analiziyle alt fazda kaldığı tespit edilmiştir ve moleküler ağırlığının 35,87 kDa olarak hesaplandı. Subtilisinlerin moleköl kütleleri 27,5 kDa, aspartik protezlar 30-45 kDa, serin proteazların ise moleköl kütleleri 18-35 kDa arasında değışmektedir (Rao *et al.* 1998) Literatürdeki çalışmalarda ise SDS-PAGE yöntemini kullanarak *B.licheniformis* K7A suşundan saflaştırılan proteaz enziminin 30,34 kDa (Hadjidj *et al.* 2018); *B. licheniformis* A10'dan saflaştırılan proteaz enziminin 40,55 kDa (Yılmaz *et al.* 2016); *B. licheniformis* SHG10 DSM 28096 saflaştırılan alkalın proteaz enziminin 30,4 kDa (Embaby *et al.* 2016); *B. licheniformis* VSG'den saflaştırılan proteaz enziminin ise 40 kDa (Sangeetha *et al.* 2010) olduğu tespit edilmiştir.

Enzimin fiziksel özellikleri, fonksiyonları ve aktif bölgesindeki aminoasitleri belirlemek için saflaştırma ve karakterizasyon önemli bir aşamadır. *B. licheniformis* OSBS6 suşundan saflaştırılan proteaz enzimin karakteristik özelliklerini belirlemek için farklı pH ve sıcaklıkta aktivitesine bakıldı. *B. licheniformis* OSBS6 suşundan saflaştırılan proteaz enzimin optimum pH'sı 10,0 olarak belirlenirken 2 saatlik inkübasyondan sonra pH 8,0-11,0 arasında aktivitesini %80'ne kadar koruduğu en yüksek aktiviteyi pH 10,0'da gözlendi. *B. subtilis* DM-04'den saflaştırılan proteaz enziminin optimum pH'sı 10,0 olduğu belirlenmiştir (Rai and Mukherjee 2010). *B. licheniformis* P003'ten saflaştırılan alkalın proteazın pH 10,0'da en yüksek enzim aktivitesine sahipken pH 7,0-11,0 arasında oldukça stabil olduğu rapor edilmiştir (Sarker *et al.* 2013). *B. licheniformis* 3C5'den saflaştırılan alkalın proteaz pH 10,0'da optimum aktiviteye sahip olduğunu belirtilmiştir (Rachadech *et al.* 2010). *Salinivibrio* AF-2004'ten saflaştırılan proteaz enzimi optimum pH 8,5 olduğu pH 6,0 ve 10,0'da sırayla aktivitelerinin %75 ve %85'e kadar koruduğu bildirilmiştir (Amoozegar *et al.* 2007) *B. licheniformis* OSBS6 suşundan saflaştırılan proteaz enziminin yüksek pH'da aktif olduğundan alkalın bir proteaz olduğu belirlenildi. Endüstriyel çalışmalar için yüksek alkalılık ve sıcaklığa toleranslı olması istenen

durumdur. Yüksek sıcaklık ve yüksek pH aralığında yüksek aktivite ve stabiliteye sahip olan proteazlar biyomühendislik ve biyoteknolojik uygulamalarda daha fazla kullanılır (Yang *et al.* 2014). Dolayısıyla bu yönüyle *B. licheniformis* OSBS6 proteaz enziminin oldukça avantajlı olduğu söylenebilir.

B. licheniformis OSBS 6 suşundan saflaştırılan proteaz enziminin optimum sıcaklığı 60°C olduğu belirlenirken sıcaklık kararlılığını belirlemek için 20-90°C sıcaklık aralığında 30, 60, 90, ve 120. dakikalarda enzimin sıcaklık kararlılığına bakıldığında tüm sıcaklık aralığında enzim aktivitesi koruduğu tespit edilirken çeşitli sıcaklıklarda enzimin aktivitesinin arttığı belirlendi. Literatür çalışmalarına bakıldığında; *B. licheniformis* RPK'dan saflaştırılan proteaz enziminin optimum sıcaklığının 60°C olduğu belirlenmiştir (Fakhfakh *et al.* 2009). *B. licheniformis* RP1'den saflaştırılan termostabil alkalın proteaz enzimi optimum sıcaklığı 70°C olduğu bildirilmiştir (Sellami-Kamoun *et al.* 2008). *B. cereus* UV-15 mutantadan saflaştırılan proteaz enzimi 50 ile 60°C arasında çok aktif olduğu optimum sıcaklığının 60°C olduğu bildirilmiştir (Basavaraju *et al.* 2017). *B. licheniformis* P003'ten saflaştırılan alkalın proteaz enzimi 1 saat inkübasyondan sonra 50°C'de en yüksek aktivite gösterdiği 60°C'de enzim aktivitesinin %75'ini, 70°C'de ise %78'ini koruduğu belirlenmiştir. *Bacillus* HR-08 suşdan saflaştırılan proteaz enzim aktivitesinin, 60 ve 70°C'de 30 dakika inkübasyondan sonra sırayla başlangıç aktivitesinin %80'inden ve %50'sinden fazlasını koruduğu tespit edilmiştir (Moradian *et al.* 2009). *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)'den saflaştırılan proteaz enziminin 60°C inkübasyonda 1, 2, 3 saat bekletildiğinde sırasıyla proteaz aktivitesini %92,8; %85,5 ve %83,8 oranında düşürdüğü belirlenmiştir (Chatterjee *et al.* 2015). *B. licheniformis* OSBS6 suşundan saflaştırılan proteaz enziminin iki saatlik inkübasyon süresi sonunda yüksek sıcaklıklarda bile enzim aktivitesini koruduğu hatta enzim aktivitesinin arttırdığı belirlendi. Literatürde ise genellikle inkübasyon süresi ve sıcaklık arttıkça aktivite düştüğü görülürken ancak termofilik enzimlerin genellikle sıcaklıkla aktivitenin arttığı gözlenmiştir. Endüstriyel alanlarda sıcaklıklığa dayanıklılık tercih edilme nedenlerinden biridir.

B. licheniformis OSBS6 suşundan saflaştırılan proteaz enzimine metal iyonlarının etkisi incelendiğinde Mn^{2+} metalinin 1mM konsantrasyonunda %98'e kadar enzim aktivitesini korurken, 5 ve 10 mM'lık konsantrasyonda ise %54 ve %96 olarak enzim aktivitesini artırdığı belirlendi. Mg^{2+} metal iyonunun 1 ve 5 mM'lık konsantrasyonlarda sırasıyla enzimin aktivitesini %7, %15 artırırken 10 mM'da ise %97'e kadar koruduğu belirlendi. Co^{2+} metalinin genel olarak enzim aktivitesini düşürken 5 mM'lık konsantrasyonda ise %44'e kadar düşürdüğü tespit edildi. Fe^{2+} iyonlarının konsantrasyonu arttıkça inhibitör etkisi gösterdiği 10 mM'lık konsantrasyonda ise %37'e kadar enzim aktivitesini düşürdüğü gözlemlendi. Ca^{2+} iyonları ise 10 mM'lık konsantrasyonda %84'e kadar aktivitesini koruduğu belirlendi. Literatürde metal iyonlarının proteaz enzimi üzerine etkisi incelendiğinde; Tayland balığından izole edilen *B. licheniformis* RKK-04 suşundan saflaştırılan proteaz enzim aktivitesini 1 mM'lık Hg^{2+} ve Cu^{2+} metal iyonları hemen hemen inhibe ederken; 1 mM'lık Pb^{2+} metal iyonlarının ise belirgin olarak düşürdüğü; Ag^+ , Zn^{2+} , and Mo^{6+} iyonlarının ise hafif etkilediği 1 mM'lık Mn^{2+} az da olsa yükselttiğini 1 mM'lık Ca^{2+} ise etkilemediği belirtilmiştir (Toyokawa *et al.* 2010). *Bacillus* RRM1 suşundan saflaştırılan alkalın proteaz enziminin aktivitesini Na^+ , Ca^{2+} , and K^+ iyonları artırırken Hg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} ve Zn^{2+} iyonları ise düşürdüğü belirtilmiştir (Rajkumar *et al.* 2011). *B. licheniformis*'ten elde edilen alkalın proteazın enzim aktivitesini 10 mM'lık Ca^{2+} ve Mn^{2+} metal iyonları artırdığı Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} ve Na^+ metal iyonları herhangi bir etki yapmadığı Hg^{2+} ve K^+ metal iyonları hemen hemen inhibe ettiği Fe^{2+} %34'e kadar düşürdüğü belirtilmiştir (Bezawada *et al.* 2011). *B. Subtilis* (MTCC N0-10110)'den elde edilen alkalın proteaz enziminin aktivitesi Mg^{2+} ve Mn^{2+} metal iyonlarıyla arttığı Ca^{2+} ile düştüğü bildirilmiştir (Ramakrishna *et al.* 2010). *B. licheniformis* OSBS6'dan saflaştırılan proteaz enzimi literatürde de belirttiği gibi Co^{2+} ve Fe^{2+} metal iyonları enzim aktivitesini düşürdüğü Ca^{2+} iyonları enzim aktivitesini %84'lere kadar koruduğu belirlendi.

B. licheniformis OSBS6 suşundan saflaştırılan proteaz enzim aktivitesi üzerine bazı inhibitörlerin etkisinin belirlenmesi amacıyla; serin spesifik inhibitörü olan PMSF; sülfidril grubu inhibitörü olan β -merkaptotanol; sistein spesifik inhibitörü olan DTNB ve histidin inhibitörü olan IAA kullanıldı. Elde edilen veriler sonucunda EDTA'nın 2 mM

ve 5 mM'lık konsantrasyonlarda enzim aktivitesini tamamen inhibe ettiği, β -merkaptoetanol'ün 2 mM'lık konsantrasyonda %18 kadar düşürdüğü 5 mM'lık konsantrasyonda ise tamamen inhibe ettiği belirlendi. Serin proteaz inhibitörü olan PMSF'nin enzim aktivitesini arttırdığı, sistein proteaz inhibitörü olan DNTB ise 2 mM'lık konsantrasyonda enzim aktivitesini %99; 5 mM'lık konsantrasyonda ise %88 oranında koruduğu gözlemlendi. Histidin enzim inhibitörü olan IAA 2Mm'lık konsantrasyonda enzim aktivitesini arttırdığı, 5 Mm'lık konsantrasyon ise %86 oranında koruduğu belirlendi. *Salinivibrio* AF-2004 suşundan saflaştırılan proteaz enzimi EDTA varlığında tamamen inhibe olduğundan metalloenzim üyesi olduğu bildirilmiştir (Amoozegar *et al.* 2007). *B. licheniformis* OSBS6 suşundan saflaştırılan proteaz enziminin ise metalloenzim olabileceği ve aktivitesi için metal gruplarına ihtiyaç duyduğu, aktif bölgesinde sülfidril grupları bulunduğu söylenilebilir.

%15 ve %50'lik konsantrasyonlardaki organik çözümlerin varlığında *B. licheniformis* OSBS6'dan saflaştırılan proteaz enzim aktivitesine etkisi incelendi. Enzimin 1 saatlik inkübasyon süresi sonunda; %15'lik konsantrasyon etanol çözeltisinde %94, aseton çözeltisinde %84, DMSO çözeltisinde %89, t-bütanol çözeltisinde %86 ve izopropanol çözeltisinde %83 oranında aktiviteye sahip olduğu görüldü. %15'lik konsantrasyonlarda 24 saat sonunda metanol çözeltisinde %84, etanol çözeltisinde %80, aseton çözeltisinde %91, DMSO çözeltisinde %94, t-bütanol çözeltisinde %90, izopropanol çözeltisinde %84 oranında aktivitesini koruduğu tespit edildi. %50'lik konsantrasyonlarda ise belirtilen organik çözümlerde 1 saatin sonunda metanol, etanol, aseton, DMSO, bütanol, izopropanol çözeltilerinde varlığında sırasıyla %85, %92, %82, %97, %94, %77 aktivitesini korurken 24 saat sonunda metanol, etanol, aseton, DMSO, bütanol, izopropanol varlığında sırasıyla %76, %84, %83, %91, %86, %81 oranında enzim aktivitesini koruduğu tespit edildi. Literatürde ise proteaz benzen, toluen, ksilen, etanol, aseton and DMSO gibi organik çözümlerde stabil proteazların nadir bulunur ve bu enzimler endüstri de sentetik reaksiyonlarda kullanım alanlarına sahiptir (Rahman *et al.* 2006). Termofillerden elde edilen proteaz enzimleri susuz ortamda ester ve peptid sentezi gibi biyoteknolojik uygulamalarda organik çözümler varlığında kullanılır (Toplak *et al.* 2015). *B. licheniformis* OSBS6'dan saflaştırılan proteaz enziminin organik çözümlerle

aktivitesinde ciddi bir inhibisyon meydana gelmezken enzim aktivitesini %77 oranında koruduğu belirlendi. Böylece peptid sentezi gibi organik çözümlere dayanıklı enzimlerin tercih edildiği endüstrilerde endüstrilerde yararlanılabilir.

B. licheniformis OSBS6'dan proteaz enziminin üzerine yüzey aktif maddelerin ve okside edici ajanın etkisini incelemek için %1-5'lik konsantrasyonlarda Tween-20, Tween-80, Triton-X-100, SDS ve H₂O₂ kullanıldı. Yapılan çalışma sonucunda enzim aktivitesinin %1'lik Tween-20, Tween-80 ve Triton-X-100 varlığında sırasıyla %78, %93 ve %72 oranında koruduğu belirlendi. %1'lik SDS enzim aktivitesini %16 oranına düşürdüğü, %5'lik konsantrasyonda ise tamamen inhibe ettiği belirlendi. %5'lik Tween-20 varlığında ise enzim aktivitesini tamamen kayborduğu Tween-80 ve Triton-X-100 sırayla %48, %22 oranına düşürdüğü tespit edildi. Enzim aktivitesini %1 ve %5 'lik H₂O₂ varlığında sırasıyla %97 ve %87 oranında koruduğu tespit edildi. Literatür incelendiğinde *Bacillus licheniformis* P003'den üretilen proteaz enziminin aktivitesi %0,5'lik Tween-20, Tween-80 ve H₂O₂ varlığında sırayla %103, %107, %108 oranında arttığı; %1'lik Tween-20 ve H₂O₂ %84 ve %90 oranında koruduğu, %0,5 ve %1'lik Tween-80 sırasıyla %107 ve %104 oranında arttırdığı, %0,5 ve %1,0'lik SDS varlığında ise %16 ve %11 oranına düşürdüğü bildirilmiştir. Tween-20 ve H₂O₂ konsantrasyonu arttıkça proteaz aktivitesini kademeli olarak azalttığı tespit edilmiştir (Sarker *et al.* 2013). SDS, Tween 20 ve Triton X-100 gibi deterjanlar varlığında etkinliğini koruyan enzimler deterjan formülasyonunda etkili bir katkı maddesi olarak kabul edilir (Chatterjee *et al.* 2015). İyi bir deterjan proteazı deterjan formülasyonunda bulunan yüzey aktif maddeler, ağartıcılar, oksitleyici maddeler ve katkı maddeleri gibi ortak kullanılan deterjan bileşenlerine karşı uyumlu ve kararlı olmalıdır (Basavaraju *et al.* 2017). Genel olarak literatürde yüzey aktif maddeleri %0,5'lik konsantrasyonda artış gözlenirken %1 konsantrasyonda düştüğü gözlenmiştir. Yüzey aktif maddeleri yüzey gerilimini artırarak lekenin çıkmasını kolaylaştırırken oksitleyici maddeler ise çamaşırın beyazlatması için eklenir. Bu maddelere karşı stabil olan proteaz enzimleri protein lekelerini çıkarmak için deterjan endüstrisinde tercih edilir. *B. licheniformis* OSBS6'dan saflaştırılan proteaz enziminin oksitleyici madde olan %1'lik H₂O₂ varlığında aktivitesini önemli ölçüde koruduğu gözlemlendi. Yüzey aktif maddelerinde ise %1'lik konsantrasyonda %70'lere kadar koruduğu %5'lik

konsantrasyonda ise ciddi bir inhibisyon gözlemlendi. Deterjan için uygun olup olmadığını deterjanda bulunan maddelerin konsantrasyonu belirlemesine rağmen %1’lik konsantrasyonlardaki yüzey aktif maddeleri ve okside edici ajanlar enzim aktivitesini koruduğu tespit edildi. Tipik olarak deterjan endüstrisinde kullanılan proteazların pH 9,0–11,0 20–60°C aralığında sıcaklıklarda ve tuz, ağartma maddesi ve yüzey aktif maddelerine karşı aktif ve stabil olması gerekir.

B. licheniformis OSBS6’dan saflaştırılan proteaz enziminin %0,65’lik (w/v) kazein, azokazein, hemoglobin, BSA ve jelatin gibi farklı substratlar varlığında aktivitesine bakıldı. Aktivite ölçümleri sonucunda enziminin en yüksek aktiviteyi kazein varlığında gösterdiği tespit edildi. Enzimin diğer substratlara olan aktivitesi azokazein (%78), hemoglobin (%57), BSA (%28) ve jelatin (%12) olarak belirlendi. Literatüre bakıldığında *Aspergillus oryzae* CH93’den saflaştırılan proteaz enzimi BSA, N-asetil-l-tirozin etil ester monohidrat (ATEE), kazein, azokazein ve jelatin substratlarından en iyi aktiviteyi kazeinde gösterdiği bildirilmiştir (Salihi *et al.* 2017). *Scopulariopsis* suşundan saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesine kazein, jelatin, BSA, albümin ve fibrinojen substratlarının etkisine bakılmıştır. Enzim aktivitesinin en fazla jelatin olmak üzere kazein, fibrinojen, albümin, BSA şeklinde etkilediği bildirilmiştir (Niyonzima and More 2014). Enzimin farklı substratlara karşı ilgisinin olması farklı alanlarda kullanıma olanak sağlar.

B. licheniformis OSBS6’dan saflaştırılan proteaz enzimine ticari katı deterjanların etkisi incelendi. Bunun için Ariel, Alo, Omo, Bingo, ABC markalı katı ticari deterjanlar kullanıldı. ABC markalı deterjan haricinde diğer deterjanların varlığında enzim aktivitesini arttığı belirlendi. Persil markalı deterjan varlığında ise enzim aktivitesinde önemli bir artış gösterdiği tespit edildi. Deterjan içerisinde bulunan katkı maddelerinin enzimin substrat etkilişiminde etkili olan bölgeleri etkileyerek aktiviteyi etkilediği söylenebilir. Enzim bazlı deterjanlar daha iyi temizleme, düşük sıcaklıkta daha yüksek temizleme, daha güvenli ve daha sağlıklı kir çıkarma özelliklerine sahip olması nedeniyle alkalin proteaz bazlı deterjanların kullanımı sentetik deterjanlara göre daha fazla tercih

edilmektedir. Yüksek alkalın proteazlar kan, süt, keratin ve çikolata gibi proteinli lekelerin parçalanması için eşsizdir.

Amilazlar, enzim pazarının yaklaşık %25'ini oluşturur. α -amilazların, işlemlerin ekonomik hale getirilmesi için yüksek jelatinleşme (100-110°C) ve sıvılaştırma (80-90°C) sıcaklıklarında aktif olması istenir. Bu nedenle, daha fazla termostabil α -amilazlara için bir ihtiyaç vardır. Termofilik enzimler soğutma maliyetlerini azaltması, daha iyi bir substrat çözünürlüğü sağlaması, daha düşük bir viskozite için daha hızlı bir şekilde karıştırmaya ve pompalamaya olanak sağlaması ve mikrobiyal kontaminasyon riskini azaltmaya olanak sağlaması gibi avantajlara sahiptir. Alkalifik *Bacillus* suşlarının genellikle alkalın α -amilaz, proteaz ve sellüloz enzimleri alkalın pH'da aktif enzimler üretir (Burhan *et. al* 2003).

Sonuç olarak *B. licheniformis* OSBS6'dan elde edilen amilaz ve proteaz enziminin çok düşük ve çok yüksek sıcaklıklara kadar hemen her sıcaklıkta aktivitesinin olması ve geniş bir pH aralığında aktivitesini koruması endüstriyel anlamda yararlı olabilir. Aynı şekilde düşük sıcaklıkta oldukça kararlı olması, enzimin uzun süreli uygulama gereksinimi duyulan proseslerde mükemmel bir materyal olmasını sağlamaktadır. Her iki enzimin alkalın olması deterjan endüstrisi için yararlı olabileceğini göstermektedir. Aynı şekilde organik çözücülere karşı kararlı olması bu amilaz ve proteaz enziminin kullanım açısından proseslerde oldukça kolaylık sağlayabilir. Proteaz ve amilaz enziminin belli koşulları altında stabil olması, stabilitenin moleküler temelini anlamak için bir model sistem olarak ve endüstriyel uygulamalar için uygun olan yeni proteaz ve amilazların tasarlanmasına yardımcı olabilir.

KAYNAKÇA

- Abdel-Fattah, Y. R., Soliman, N. A., El-Toukhy, N. M., El-Gendi, H., Ahmed, R. S., 2012. Production, purification, and characterization of thermostable α -amylase produced by *Bacillus licheniformis* isolate AI20. *Journal of Chemistry*, 2013.
- Acar, S., 2009. Hasanabdal Köyü Termal Tesislerinden Alınan Su Örneklerinden İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Adıgüzel, A., 2006. Bazı Termal Tesislerden Alınan Su Örneklerinden İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Ahlawat, S., Dhiman, S. S., Battan, B., Mandhan, R., Sharma, J., 2009. Pectinase production by *Bacillus subtilis* and its potential application in biopreparation of cotton and micropoly fabric. *Process biochemistry*, 44(5), 521-526.
- Alçiçek, E., 2017. Van İlinden Alınan Sıcak su örneklerinden Termofilik Bakterilerin İzolasyonu, İdentifikasyonu, *Bacillus licheniformis* E10'dan Proteaz Enziminin Üçlü Faz Sistemiyle(TPP) ile Saflaştırılması ve Karakterizasyonu Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Amid, M., & Manap, M. Y. A., 2014. Purification and characterisation of a novel amylase enzyme from red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) peel. *Food chemistry*, 165, 412-418.
- Amoozegar, M. A., Fatemi, A. Z., Karbalaeei-Heidari, H. R., Razavi, M. R., 2007. Production of an extracellular alkaline metalloprotease from a newly isolated, moderately halophile, *Salinivibrio* sp. strain AF-2004. *Microbiological Research*, 162(4), 369-377.
- Annamalai, N., Thavasi, R., Vijayalakshmi, S., Balasubramanian, T., 2011. Extraction, purification and characterization of thermostable, alkaline tolerant α -amylase from *Bacillus cereus*. *Indian journal of microbiology*, 51(4), 424-429.
- azArda, M., 2000. Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayın Serisi No: 46: 548s.
- Arikan, B., 2008. Highly thermostable, thermophilic, alkaline, SDS and chelator resistant amylase from a thermophilic *Bacillus* sp. isolate A3-15. *Bioresource Technology*, 99(8), 3071-3076.
- Asgher, M., Asad, M. J., Rahman, S., Legge, R., 2007. A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *Journal of Food Engineering*, 79(3), 950-955.
- Badgujar, S. B., Mahajan, R. T., 2013. Characterization of thermo-and detergent stable antigenic glycosylated cysteine protease of *Euphorbia nivulia* Buch.-Ham and evaluation of its ecofriendly applications. *The Scientific World Journal*, 2013.
- Banerjee, G., Ray, A. K., 2017. Impact of microbial proteases on biotechnological industries. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 33(2), 119-143.
- Barros, F. F. C., Simiqueli, A. P. R., de Andrade, C. J., Pastore, G. M., 2013. Production of enzymes from agroindustrial wastes by biosurfactant-producing strains of *Bacillus subtilis*. *Biotechnology research international*, 2013.

- Basavaraju, S., Kathera, C., Jasti, P. K., 2017. Purification, characterization and application of novel alkaline protease from new *Bacillus cereus* UV-15 mutant. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 7(4), 1-12.
- Bezawada, J., Yan, S., John, R. P., Tyagi, R., Surampalli, R., 2011. Recovery of *Bacillus licheniformis* alkaline protease from supernatant of fermented wastewater sludge using ultrafiltration and its characterization. *Biotechnology research international*, 2011.
- Bhat, M., 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology advances*, 18(5), 355-383.
- Burhan, A., Nisa, U., Gökhan, C., Ömer, C., Ashabil, A., Osman, G., 2003. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. *Process biochemistry*, 38(10), 1397-1403.
- Chandra, A., Medda, S., Bhadra, A., 1980. Production of extracellular thermostable α -amylase by *Bacillus licheniformis*. *Journal of fermentation technology*, 58(1), 1-10.
- Chatterjee, J., Giri, S., Maity, S., Sinha, A., Ranjan, A., Gupta, S., 2015. Production and characterization of thermostable alkaline protease of *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) from optimized solid-state fermentation. *Biotechnology and applied biochemistry*, 62(5), 709-718.
- Chi, Z., Chi, Z., Liu, G., Wang, F., Ju, L., Zhang, T., 2009. *Saccharomycopsis fibuligera* and its applications in biotechnology. *Biotechnology advances*, 27(4), 423-431.
- Couto, S. R., & Sanromán, M. A. (2006). Application of solid-state fermentation to food industry—a review. *Journal of Food Engineering*, 76(3), 291-302.
- David, S., Femi, B., Gbenga, A., Saanu, A., 2017. Purification and Characterization of α -Amylase from *Bacillus subtilis* Isolated from Cassava Processing Sites. *J Bioremediat Biodegrad*, 8(417), 2.
- Dennison, C., Lovrien, R., 1997. Three phase partitioning: concentration and purification of proteins. *Protein expression and purification*, 11(2), 149-161.
- Dey, T. B., Banerjee, R., 2014. Application of decolourized and partially purified polygalacturonase and α -amylase in apple juice clarification. *Brazilian journal of microbiology*, 45(1), 97-104.
- Dhananjay, S., & Mulimani, V., 2008. Purification of α -galactosidase and invertase by three-phase partitioning from crude extract of *Aspergillus oryzae*. *Biotechnology letters*, 30(9), 1565-1569.
- Divakaran, D., Chandran, A., Pratap Chandran, R., 2011. Comparative study on production of α -amylase from *Bacillus licheniformis* strains. *Brazilian journal of microbiology*, 42(4), 1397-1404.
- Embaby, A. M., Saeed, H., Hussein, A., 2016. SHG10 keratinolytic alkaline protease from *Bacillus licheniformis* SHG10 DSM 28096: Robust stability and unusual non-cumbersome purification. *Journal of basic microbiology*, 56(12), 1317-1330.
- Fakhfakh, N., Kanoun, S., Manni, L., Nasri, M., 2009. Production and biochemical and molecular characterization of a keratinolytic serine protease from chicken feather-degrading *Bacillus licheniformis* RPK. *Canadian journal of microbiology*, 55(4), 427-436.

- Gopinath, S. C., Anbu, P., Arshad, M., Lakshmipriya, T., Voon, C. H., Hashim, U., & Chinni, S. V., 2017. Biotechnological processes in microbial amylase production. *BioMed research international*, 2017.
- Goyal, N., Gupta, J., Soni, S., 2005. A novel raw starch digesting thermostable α -amylase from *Bacillus* sp. I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch. *Enzyme and Microbial Technology*, 37(7), 723-734.
- Gupta, R., Beg, Q., Lorenz, P., 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 59(1), 15-32.
- 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.
- Ha, C.-E., Bhagavan, N., 2011. *Essentials of medical biochemistry: with clinical cases*: Academic Press.
- Hadjidj, R., Badis, A., Mechri, S., Eddouaouda, K., Khelouia, L., Annane, R., Jaouadi, B., 2018. Purification, biochemical, and molecular characterization of novel protease from *Bacillus licheniformis* strain K7A. *International journal of biological macromolecules*, 114, 1033-1048.
- Hamilton, L. M., Kelly, C. T., Fogarty, W. M., 1999. Purification and properties of the raw starch-degrading α -amylase of *Bacillus* sp. IMD 434. *Biotechnology letters*, 21(2), 111-115.
- Hmidet, N., Bayoudh, A., Berrin, J. G., Kanoun, S., Juge, N., Nasri, M., 2008. Purification and biochemical characterization of a novel α -amylase from *Bacillus licheniformis* NH1: cloning, nucleotide sequence and expression of amyN gene in *Escherichia coli*. *Process biochemistry*, 43(5), 499-510.
- Hmidet, N., Maalej, H., Haddar, A., Nasri, M., 2010. A novel α -amylase from *Bacillus mojavensis* A21: purification and biochemical characterization. *Applied biochemistry and biotechnology*, 162(4), 1018-1030.
- Igarashi, K., Hatada, Y., Hagihara, H., Saeki, K., Takaiwa, M., Uemura, T., Kobayashi, T., 1998. Enzymatic properties of a novel liquefying α -amylase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate and entire nucleotide and amino acid sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(9), 3282-3289.
- Ivanova, V. N., Dobрева, E. P., Emanuilova, E. I., 1993. Purification and characterization of a thermostable α -amylase from *Bacillus licheniformis*. *Journal of biotechnology*, 28(2-3), 277-289.
- Janeček, S., 2009. Amylolytic enzymes-focus on the α -amylases from archaea and plants. *Nova Biotechnol*, 9(1), 5-25.
- Jaouadi, B., Ellouz-Chaabouni, S., Ali, M. B., Messaoud, E. B., Naili, B., Dhouib, A., Bejar, S., 2009. Excellent laundry detergent compatibility and high dehairing ability of the *Bacillus pumilus* CBS alkaline proteinase (SAPB). *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14(4), 503-512.
- Kazan, D., Denizci, A.A., Kerimak Öner, M.N. and Eraslan, A. 2005. Purification and characterization of a serine 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.

- Kirk, O., Borchert, T. V., & Fuglsang, C. C., 2002. Industrial enzyme applications. *Current opinion in biotechnology*, 13(4), 345-351.
- Krishnan, T., Chandra, A., 1983. Purification and characterization of α -amylase from *Bacillus licheniformis* CUMC305. *Applied and Environmental Microbiology*, 46(2), 430-437.
- Kulp, K., Ponte Jr, J., D'Appolonia, B. L., 1981. Staling of white pan bread: fundamental causes. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 15(1), 1-48.
- Kumaran, E., Mahalakshmipriya, A., Rajan, S., 2013. Effect of fish waste based *Bacillus* protease in silver recovery from waste X-ray films. *Int. J. Curr. Microb. Appl. Sci*, 2(3), 49-56.
- Lee, S.-P., Morikawa, M., Takagi, M., Imanaka, T., 1994. Cloning of the *aapT* gene and characterization of its product, alpha-amylase-pullulanase (AapT), from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. strain XAL601. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(10), 3764-3773.
- Lin, L. L., Chyau, C. C., & Hsu, W. H., 1998. Production and properties of a raw-starch-degrading amylase from the thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. TS-23. *Biotechnology and applied biochemistry*, 28(1), 61-68.
- Liu, Q., Sun, S., Piao, M., Yang, J. Y., 2013. Purification and Characterization of a Protease Produced by a *Planomicrobium* sp. L-2 from Gut of *Octopus vulgaris*. *Preventive nutrition and food science*, 18(4), 273.
- Machovic, M., & Janecek, S., 2007. Amylolytic enzymes: Types, structures and specificities. *Industrial Enzymes. Structure, Function and Applications*, 3-19.
- Mane, P., Tale, V., 2015. Overview of microbial therapeutic enzymes. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 4(4), 17-26.
- Mardina, V., Yusof, F., 2016. Purification and Characterization of Surfactant-Stable Protease from *Bacillus Licheniformis*: A Potential Additive for Laundry Detergent. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ADVANCED BIOTECHNOLOGY AND RESEARCH*, 7(2), 634-643.
- Mohammad, B. T., Al Daghistani, H. I., Jaouani, A., Abdel-Latif, S., Kennes, C., 2017. Isolation and Characterization of Thermophilic Bacteria from Jordanian Hot Springs: *Bacillus licheniformis* and *Thermomonas hydrothermalis* Isolates as Potential Producers of Thermostable Enzymes. *International journal of microbiology*, 2017.
- Mondal, K., Sharma, A., & Gupta, M. N., 2003. Macroaffinity Ligand-Facilitated Three-Phase Partitioning (MLFTPP) of α -Amylases Using a Modified Alginate. *Biotechnology progress*, 19(2), 493-494.
- Moradian, F., Khajeh, K., Naderi-Manesh, H., Sadeghizadeh, M., 2009. Isolation, purification and characterization of a surfactants-, laundry detergents-and organic solvents-resistant alkaline protease from *Bacillus* sp. HR-08. *Applied biochemistry and biotechnology*, 159(1), 33-45.
- Morgan, F., Priest, F., 1981. Characterization of a thermostable α -amylase from *Bacillus licheniformis* NCIB 6346. *Journal of Applied Bacteriology*, 50(1), 107-114.
- Mukhtar, H., 2012. Concomitant production of two proteases and alpha-amylase by a novel strain of *Bacillus subtilis* in a microprocessor controlled bioreactor. *Brazilian journal of microbiology*, 43(3), 1072-1079.

- Negi, S., Banerjee, R., 2009. Characterization of amylase and protease produced by *Aspergillus awamori* in a single bioreactor. *Food research international*, 42(4), 443-448.
- Niyonzima, F. N., More, S., 2014. Purification and properties of detergent-compatible extracellular alkaline protease from *Scopulariopsis* spp. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 44(7), 738-759.
- Pallardy, S. G., 2010. *Physiology of woody plants*: Academic Press.
- Panda, M. K., Sahu, M. K., Tayung, K., 2013. Isolation and characterization of a thermophilic *Bacillus* sp. with protease activity isolated from hot spring of Tarabalo, Odisha, India. *Iranian journal of microbiology*, 5(2), 159.
- Pike, R., Dennison, C., 1989. Protein fractionation by three phase partitioning (TPP) in aqueous/t-butanol mixtures. *Biotechnology and bioengineering*, 33(2), 221-228.
- Prakash, O., Jaiswal, N., 2010. α -Amylase: an ideal representative of thermostable enzymes. *Applied biochemistry and biotechnology*, 160(8), 2401-2414.
- Rachadech, W., Navacharoen, A., Ruangsit, W., Pongtharangkul, T., Vangnai, A., 2010. An organic solvent-, detergent-, and thermostable alkaline protease from the mesophilic, organic solvent-tolerant *Bacillus licheniformis* 3C5. *Microbiology*, 79(5), 620-629.
- Rachana, C., Jose, V., 2014. Three phase partitioning-a novel protein purification method. *Int. J. ChemTech Res*, 6(7), 3467-3472.
- Racheal, O. O., Ahmed, A. T. F., Ndigwe, E. V., Morakinyo, S. D., 2015. Extraction, purification and characterization of protease from *Aspergillus Niger* isolated from yam peels. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 4, 125-131.
- Rahman, R. N. Z. R. A., Geok, L. P., Basri, M., Salleh, A. B., 2006. An organic solvent-stable alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa* strain K: Enzyme purification and characterization. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(7), 1484-1491.
- Rai, S. K., Mukherjee, A. K., 2010. Statistical optimization of production, purification and industrial application of a laundry detergent and organic solvent-stable subtilisin-like serine protease (Alzwiprase) from *Bacillus subtilis* DM-04. *Biochemical engineering journal*, 48(2), 173-180.
- Rajkumar, R., Kothilmozhan, J., Ramasamy, R., 2011. Production and characterization of a novel protease from *Bacillus* sp. RRM1 under solid state fermentation. *Journal of microbiology and biotechnology*, 21(6), 627-636.
- Ramakrishna, D., Gopi, R. N., Rajagopal, S. (2010). Purification and properties of an extra cellular alkaline protease produced by *Bacillus Subtilis* (MTCC N0-10110). *International Journal of Biotechnology & Biochemistry*, 6(4), 489-501.
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(3), 597-635.
- Rawdkuen, S., Chaiwut, P., Pintathong, P., Benjakul, S., 2010. Three-phase partitioning of protease from *Calotropis procera* latex. *Biochemical engineering journal*, 50(3), 145-149.
- Reddy, L., Wee, Y. J., Ryu, H. W., 2008. Purification and characterization of an organic solvent and detergent-tolerant novel protease produced by *Bacillus* sp. RKY3. *Journal of Chemical Technology Biotechnology: International Research in Process, Environmental Clean Technology*, 83(11), 1526-1533.

- Ölmez, S., 2017, Nevşehir Kozaklı Kaplıcalarından İzole Edilen Termofilik Bakterilerin İzolasyonu, İdentifikasyonu, *Bacillus licheniformis* SO7'den Amilaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Sabotič, J., Kos, J., 2012. Microbial and fungal protease inhibitors current and potential applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 93(4), 1351-1375.
- Saito, N., 1973. A thermophilic extracellular α -amylase from *Bacillus licheniformis*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 155(2), 290-298.
- Salihi, A., Asoodeh, A., Aliabadian, M., 2017. Production and biochemical characterization of an alkaline protease from *Aspergillus oryzae* CH93. *International journal of biological macromolecules*, 94, 827-835.
- Sangeetha, R., Geetha, A., Arulpandi, I., 2010. Concomitant production of protease and lipase by *Bacillus licheniformis* VSG1: production, purification and characterization. *Brazilian journal of microbiology*, 41(1), 179-185.
- Sarker, P. K., Talukdar, S. A., Deb, P., Sayem, S. A., Mohsina, K., 2013. Optimization and partial characterization of culture conditions for the production of alkaline protease from *Bacillus licheniformis* P003. *SpringerPlus*, 2(1), 506.
- Saxena, R. K., Dutt, K., Agarwal, L., Nayyar, P., 2007. A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5. *Bioresource Technology*, 98(2), 260-265.
- Saygılı, H., Sahin, F. ve Aysan Y., 2006. *Fitobakteriyoloji*, Meta Basım Matbaacılık, İzmir, Türkiye, pp 550.
- Sellami-Kamoun, A., Haddar, A., Ali, N. E.-H., Ghorbel-Frikha, B., Kanoun, S., & Nasri, M., 2008. Stability of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* RP1 in commercial solid laundry detergent formulations. *Microbiological Research*, 163(3), 299-306.
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., Mehta, P. K., 2016. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech*, 6(2), 174.
- Singh, S., Gupta, P., & Bajaj, B. K., 2018. Characterization of a robust serine protease from *Bacillus subtilis* K-1. *Journal of basic microbiology*, 58(1), 88-98.
- Souza, P. M. d., 2010. Application of microbial α -amylase in industry-A review. *Brazilian journal of microbiology*, 41(4), 850-861.
- Souza, P. M. d., Bittencourt, M. L. d. A., Caprara, C. C., Freitas, M. d., Almeida, R. P. C. d., Silveira, D., Magalhães, P. O., 2015. A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian journal of microbiology*, 46(2), 337-346.
- Sundarram, A., Murthy, T. P. K., 2014. α -amylase production and applications: a review. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 2(4), 166-175.
- Teodoro, C. E. d. S., & Martins, M. L. L., 2000. Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus* sp. *Brazilian journal of microbiology*, 31(4), 298-302.
- Toplak, A., Nuijens, T., Quaedflieg, P. J., Wu, B., Janssen, D. B., 2015. Peptide synthesis in neat organic solvents with novel thermostable proteases. *Enzyme and Microbial Technology*, 73, 20-28.
- Toyokawa, Y., Takahara, H., Reungsang, A., Fukuta, M., Hachimine, Y., Tachibana, S., Yasuda, M., 2010. Purification and characterization of a halotolerant serine proteinase from thermotolerant *Bacillus licheniformis* RKK-04 isolated from Thai fish sauce. *Applied microbiology and biotechnology*, 86(6), 1867-1875.

- Underkofler, L., Barton, R., Rennert, S., 1958. Production of microbial enzymes and their applications. *Applied microbiology*, 6(3), 212.
- Van Der Maarel, M. J., Van der Veen, B., Uitdehaag, J. C., Leemhuis, H., Dijkhuizen, L., 2002. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of biotechnology*, 94(2), 137-155.
- Van Dyk, J. S., Sakka, M., Sakka, K., Pletschke, B. I., 2010. Identification of endoglucanases, xylanases, pectinases and mannanases in the multi-enzyme complex of *Bacillus licheniformis* SVD1. *Enzyme and Microbial Technology*, 47(3), 112-118.
- Verma, A., Singh, H., Anwar, S., Chattopadhyay, A., Tiwari, K. K., Kaur, S., Dhilon, G. S., 2017. Microbial keratinases: industrial enzymes with waste management potential. *Critical reviews in biotechnology*, 37(4), 476-491.
- Wu, X., Wang, Y., Tong, B., Chen, X., Chen, J., 2018. Purification and biochemical characterization of a thermostable and acid-stable alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* B4-423. *International journal of biological macromolecules*, 109, 329-337.
- Yan, J.-K., Wang, Y.-Y., Qiu, W.-Y., Ma, H., Wang, Z.-B., Wu, J.-Y., 2017. Three-phase partitioning as an elegant and versatile platform applied to nonchromatographic bioseparation processes. *Critical reviews in food science and nutrition*, 1-16.
- Yang, H., Li, J., Shin, H.-d., Du, G., Liu, L., Chen, J., 2014. Molecular engineering of industrial enzymes: recent advances and future prospects. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(1), 23-29.
- Yıldırım, V., 2014. *Aeribacillus pallidus* C10'dan Alkalın Proteaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik olarak Uygulanabilirliği Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Yilmaz, B., Baltacı, M. O., Sisecioglu, M., Adiguzel, A., 2016. Thermotolerant alkaline protease enzyme from *Bacillus licheniformis* A10: purification, characterization, effects of surfactants and organic solvents. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 31(6), 1241-1247.
- Zambare, V., Nilegaonkar, S., Kanekar, P. 2011. A novel extracellular protease from *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327: enzyme production and its partial characterization. *New biotechnology*, 28(2), 173-181.
- Zhang, C., Xing, X.-H., Liu, M.-S., 2004. Production of multienzymes consisting of alkaline amylase and cellulase by mixed alkalophilic culture and their potential use in the saccharification of sweet potato. *Biochemical engineering journal*, 19(2), 181-187.

ÖZGEÇMİŞ

19.04.1991 yılında Bitlis’te doğdu. İlk, orta, lise öğrenimini Bitlis’te tamamladı. 2010 yılında kazandığı Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’nden 2014 yılında mezun oldu. 2015 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı.

