



**TERMOFİLİK *Bacillus licheniformis* SO5'TEN α -
AMİLAZIN MANYETİK ALAN DESTEKLİ ÜÇLÜ
FAZ AYIRMA SİSTEMİ İLE SAFLAŞTIRILMASI
VE KARAKTERİZASYONU**

Şeyma ARAS

Yüksek Lisans Tezi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

2023

(Her hakkı saklıdır.)

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

**TERMOFİLİK *Bacillus licheniformis* SO5'TEN α -AMİLAZIN MANYETİK ALAN
DESTEKLİ ÜÇLÜ FAZ AYIRMA SİSTEMİ İLE SAFLAŞTIRILMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

(Purification and Characterization of α -Amylase from Thermophilic *Bacillus licheniformis*
SO5 using Magnetic Field-Assisted Three Phase Partitioning)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Şeyma ARAS

Danışman: Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

Erzurum
Ocak, 2023

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Şeyma ARAS tarafından hazırlanan “Termofilik *Bacillus licheniformis* SO5’ten α -Amilazın Manyetik Alan Destekli Üçlü Faz Ayırma Sistemi ile Saflaştırılması ve Karakterizasyonu” başlıklı çalışması 31/01/2023 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı, Biyoteknoloji Bilim Dalında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

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

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

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Enstitü Müdürü

Aslı Islak İmzalıdır

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

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi olarak Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU danışmanlığında sunulan “Termofilik *Bacillus licheniformis* SO5’ten α -Amilazın Manyetik Alan Destekli Üçlü Faz Ayırma Sistemi ile Saflaştırılması ve Karakterizasyonu” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	14	30
Kuramsal Temeller	3	30
Materyal ve Yöntem	23	35
Araştırma Bulguları	14	20
Tartışma ve Sonuç	7	20
Tezin Geneli	13	25

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

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

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Şeyma ARAS	Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU
31.01.2023	31.01.2023
İmza: Aslı Islak İmzalıdır	İmza: Aslı Islak İmzalıdır

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

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

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

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel çalışmaları Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Yüksek lisans tezi boyunca her aşamada benden bilgi ve deneyimlerini, sabrını ve güler yüzünü esirgemeyen saygıdeğer hocam Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU'na,

Çalışmalarımızı en iyi şekilde ve başarıyla yürütebilmemiz için laboratuvarında bir çok imkan sağlayan Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e,

Laboratuvarında bütün deneyimlerini ve bilgilerini benden esirgemeyen, bana çalışmam boyunca yardımcı olan Esra AYGÜN'e,

Çalışmalarım boyunca benden yardımlarını esirgemeyen her an yanımda olan Göksen GÖREN, Rahime ALTINTAS ve Sayın Arş. Gr. Şeyda ALBAYRAK'a,

Laboratuvarında bulunan bütün hocalarım ve arkadaşlarıma,

Tez çalışmamın bir kısmını yürüttüğüm Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM)'a ve çalışmalarım esnasında her türlü yardım ve desteklerini gördüğüm Melek ACAR ve Fatma TURHAN'a,

Tez çalışmamın bir kısmını yürüttüğüm Fen Fakültesi Analitik Kimya Bilim Dalı'nda çalışan hocalarıma ve arkadaşlarıma,

Ailem oldukları için gurur duyduğum, bütün eğitim-öğretim hayatımda benden maddi manevi desteklerini esirgemeyen babam Murat ARAS'a, annem Arife ARAS'a, ablam Seda ARAS'a ve üzerimde ailem kadar emeği olan dayım Doç. Dr. Ali YILMAZ'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Şeyma ARAS

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TERMOFİLİK *Bacillus licheniformis* SO5'TEN α -AMİLAZIN MANYETİK ALAN DESTEKLİ ÜÇLÜ FAZ AYIRMA SİSTEMİ İLE SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Şeyma ARAS

Danışman: Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

Amaç: Günümüzde nişasta hidrolizi mikrobiyal α -amilazlar kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Amilazlar etanol, ekmek ve yüksek fruktozlu mısır şurubu üretimi, gıda, tekstil, kağıt ve deterjan endüstrileri gibi çok çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanılmaktadırlar. Yapılan tez çalışmasında; *Bacillus licheniformis* SO5 suşundan elde edilen amilazın hızlı, tek adımlı, basit ve yeni bir teknik olan manyetik alan destekli üçlü faz ayırma sistemi (MFTPP:Magnetic Field-assisted Three Phase Partitioning) ile kısmi saflaştırılması, karakterizasyon çalışmalarının yapılması ve gıda endüstrisinde kullanım potansiyelinin araştırılması hedeflenmiştir.

Yöntem: *Bacillus licheniformis* SO5 (GenBank No: MG076975) suşundan α -amilaz üçlü faz ayırma (TPP) kullanılarak tek bir adımda kısmi olarak saflaştırıldı. Daha sonra bu sistemin faz ayrıştırma oranlarını artırmak (yöntemin süresini azaltmak) için kullanılan teknik, manyetik alan ile kombine edildi ve manyetik alanın ekstraksiyon geri kazanımı üzerindeki etkisi incelendi. Saflaştırılan amilazın biyokimyasal karakterizasyonu yapılarak enzim preparasyonunun ekmek yapım sürecindeki performansı araştırıldı.

Bulgular: α -Amilaz enziminin TPP tekniğiyle saflaştırılması sırasında ilk olarak tuz, organik çözügen, pH, süre, sıcaklık optimizasyonu yapıldı. pH 9,0'da, 1,0:1,5 (kültür sıvısı:t-bütanol oranı), %30 amonyum sülfat doygunluğunda, 60 dakika boyunca 30°C'de gerçekleştirilen TPP sonucunda enzim %105 verimle 1,84 kat saflaştırıldı. Bu tez kapsamında literatürde ilk defa uygulanan MFTPP ile manyetik alan süresi, görev döngüsü ve manyetik alan gücü değiştirilerek yapılan bir dizi deney sonucunda sırasıyla 10 dk, %30 ve 70 W'da %195 verimle 3,07 kat saflaştırma gerçekleştirildi. Enzimin molekül ağırlığı SDS-PAGE ile ~68,7 kDa olarak hesaplandı. α -Amilaz enzimi için optimum pH 7,0 ve optimum sıcaklık 50°C olarak belirlendi. Enzimin 20-90°C sıcaklık aralığında bütün değerlerde 30 ve 60. dk'da aktiviteyi %40 üzerinde koruduğu tespit edildi. %1 ve %5'lik konsantrasyonlardaki yüzey aktif maddelerin varlığında enzimin yüksek oranda stabil kaldığı, %10 ve %30'luk konsantrasyonlarda kullanılan organik çözücülerin aktiviteyi artırdığı, Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} ve Mg^{2+} metallerinin varlığında enzim aktivitesinin arttığı belirlendi. *B. licheniformis* SO5 enziminin buğday nişastası substratı için K_m , V_{max} , K_{cat} , ve K_{cat}/K_m değerleri sırasıyla 1,19 μM , 3,42 $\mu mol.mL^{-1}.dk^{-1}$, 1,425 s^{-1} ve 1,2 $s^{-1}.mM^{-1}$ olarak hesaplandı. Ayrıca fırıncılık endüstrisinde kullanım potansiyelini araştırmak amacıyla saflaştırılan α -amilaz enzimi ile pişirme testleri gerçekleştirildi ve kullanılan enzimin mayalanma, ekmek şekli ve yumuşaklık açısından ekmek yapımı üzerinde katkı sağladığı tespit edildi.

Sonuç: Günümüzde biyomolekülleri saflaştırmak için gelişmiş ayırma tekniklerine yönelik güçlü bir talep bulunmaktadır. Çünkü etkili bir saflaştırma prosesi, üretimin en önemli adımlarından birisidir ve toplam maliyetin önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. Sonuç olarak bu tez kapsamında, manyetik alan destekli TPP'nin, α -amilazın yüksek verimle kısa sürede kısmen saflaştırılması için etkili ve yeni bir teknik olduğu bulundu. Ayrıca, *B. licheniformis* SO5 α -amilazının geniş bir sıcaklık ve pH aralığındaki aktivitesi ve kararlılığı, çeşitli metal iyonları, organik çözücüler ve yüzey aktif maddeleri varlığındaki nispeten yüksek kararlılığı ve ekmek yapımında kullanılabilme potansiyeli bu enzimin gıda başta olmak üzere pekçok endüstriyel uygulama için uygun bir aday olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Amilaz, *Bacillus licheniformis*, TPP, manyetik alan, ekmek üretimi.

Ocak 2023, 82 sayfa

ABSTRACT

MASTER'S THESIS

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF α -AMYLASE FROM THERMOPHILIC *Bacillus licheniformis* SO5 USING MAGNETIC FIELD-ASSISTED THREE PHASE PARTITIONING

Şeyma ARAS

Supervisor: Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

Purpose: Today, starch hydrolysis is carried out using microbial α -amylases. Amylases are used in a variety of industrial applications, such as production of ethanol, bread and high fructose corn syrup production, as well as food, textile, paper and detergent industries. In the thesis study; It is aimed to partially purify the amylase obtained from *Bacillus licheniformis* SO5 by a fast, one-step, simple and new technical magnetic field assisted three phase separation system (MFTPP: Magnetic Field-assisted Three Phase Partitioning), perform characterization studies and investigate its potential for use in the food industry.

Method: α -Amylase was partially purified from strain *Bacillus licheniformis* SO5 (GenBank No: MG076975) in a single step using triple phase separation (TPP). Then the technique was combined with the magnetic field to increase the phase separation rates of this system (reducing the time of the method) and the effect of the magnetic field on the extraction recovery was studied. The performance of the enzyme preparation in the bread making process was investigated by biochemical characterization of the purified amylase.

Findings: During the purification of amylase enzyme by TPP technique, salt, organic solvent, pH, time and temperature were first optimized. As a result of TPP performed at pH 9.0, 1.0:1.5 (culture broth:t-butanol ratio), a concentration of 30% ammonium sulfate, at 30°C for 60 minutes, the enzyme was purified 1.84-fold with a yield of 105%. As a result of a series of experiments performed by varying the magnetic field duration, duty cycle and magnetic field strength with MFTPP applied for the first time, 3.07-fold purification was achieved with 195% efficiency at 10 min, 30% and 70W, respectively. The molecular weight of the enzyme was calculated as ~68.7 kDa by SDS-PAGE. The optimum pH for the amylase enzyme was 7.0 and the optimum temperature was 50°C. It was determined that the enzyme maintained its activity above 40% at 30 and 60 minutes at all values in the temperature range of 20-90°C. It was determined that the enzyme remained highly stable in the presence of surfactants at 1% and 5% concentrations, organic solvents used at 10% and 30% concentrations increased the activity, and the enzyme activity increased in the presence of Fe²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺ and Mg²⁺ metals. K_m, V_{max}, K_{cat}, and K_{cat}/K_m values of *B. licheniformis* SO5 enzyme for wheat starch substrate were calculated as 1.19 μ M, 3.42 μ mol.mL⁻¹.dk⁻¹, 1.425 s⁻¹ and 1.2 s⁻¹.mM⁻¹, respectively. In addition, baking tests were carried out with the purified amylase enzyme to investigate its potential for use in the bakery industry and it was determined that the enzyme used contributed to leavening, bread shape and softness on bread.

Conclusion: Today, there is a strong demand for advanced separation techniques to purify biomolecules. This is because an efficient purification process is one of the most important steps in production and accounts for a significant portion of the total cost. Consequently, in this thesis, magnetic field assisted TPP was found to be an efficient and novel technique for the partial purification of α -amylase in a short time with high yield. Furthermore, the activity and stability of *B. licheniformis* SO5 α -amylase over a wide range of temperature and pH, its relatively high stability in the presence of various metal ions, organic solvents and surfactants, and its potential for use in bread making indicate that this enzyme is a suitable candidate for many industrial applications, especially food.

Keywords: Amylase, *Bacillus licheniformis*, TPP, magnetic field, bread production.

January 2023, 82 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	iii
ETİK VE BİLDİRİM VE BEYAN FORMU SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ.....	ix
GİRİŞ.....	1
KURAMSAL TEMELLER.....	3
Endüstriyel Enzimler.....	3
Amilaz	3
α -Amilaz Enziminin Kullanım Alanları.....	6
Termofilik Bakteriler	7
<i>Bacillus</i> cinsi	7
<i>Bacillus licheniformis</i>	7
Enzimlerin Saflaştırılması.....	8
Üçlü Faz Ayırma (TPP)	8
Üçlü faz ayırma sisteminin prensibi.....	9
Üçlü Faz Ayırma Çeşitleri	10
Ultrasonik destekli üçlü faz ayırma (UATPP)	11
Mikrodalga destekli üçlü faz ayırma (MWTPP).....	11
Makroafinite ligand-kolaylaştırılmış üçlü faz ayırma (MLFTPP)	11
İyonik likit üçlü faz ayırma (ILTPP).....	12
Üçlü Faz Ayırma Sistemini Etkileyen Parametreler	12
Tuz doygunluğunun etkisi.....	12
Organik çözücü etkisi.....	12
pH etkisi	13
Sıcaklık etkisi	13
Tezin Amacı.....	18

MATERYAL VE METOT	20
Materyal	20
Kullanılan organizma	20
Tez çalışmasında kullanılan cihaz ve ekipmanlar	20
Tez çalışmasında kullanılan kimyasal malzemeler	21
Tez Çalışmasında Kullanılan Çözeltilerin ve Besiyerlerinin Hazırlanışı	21
Enzim aktivite tayininde kullanılan çözelti ve tamponlar	21
Protein analizinde kullanılan çözelti ve tamponlar	22
Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez işleminde kullanılan çözelti ve tamponlar	22
Gümüş boyamada kullanılan çözeltiler	23
Karakterizasyon çalışmasında kullanılan tamponlar	23
Yöntem	23
Amilazı üreten bakterilerin katı besiyerinde belirlenmesi ve seçimi	23
Sıvı amilaz üretim besiyerine bakteri inokülasyonu	24
α -Amilaz enzim aktivitesinin belirlenmesi	24
Glukoz standart grafiği	24
Bradford metodu ile protein tayini	25
α -Amilazın saflaştırılması	25
Üçlü Faz Ayırma (TPP)	25
Tuz doygunluğu ve kültür sıvısı:t-bütanol oranının etkisinin incelenmesi	25
pH etkisinin incelenmesi	26
Sıcaklık etkisinin incelenmesi	26
Manyetik Alan Destekli Üçlü Faz Ayırma (MFTPP)	27
SDS-PAGE İle Molekül Ağırlığının Belirlenmesi	27
<i>B. licheniformis</i> SO5 Suşundan Elde Edilen α -Amilazın Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	28
α -Amilazın aktivitesi ve stabilitesi üzerine pH'ın etkisinin belirlenmesi	28
α -Amilazın aktivitesi ve stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisinin belirlenmesi	28
Bazı metal iyonlarının α -amilazın aktivitesine etkisinin belirlenmesi	28
Bazı yüzey aktif maddelerin ve inhibitörün α -amilazın aktivitesine etkisinin belirlenmesi	29
Bazı organik çözücülerin amilazın α -aktivitesine etkisinin belirlenmesi	29
Substrat spesifitesinin belirlenmesi	29
α -Amilazın kinetik parametrelerinin hesaplanması	30

Saflaştırılan α -Amilazın Ekmek Kalitesini Artırmada Kullanımı.....	30
İstatistiksel Analiz.....	30
ARAŞTIRMA BULGULARI	31
Katı Besiyerinde α -Amilaz Üreten Bakterilerin Belirlenmesi ve Seçimi	31
Sıvı α -Amilaz Üretim Besiyerine Bakteri İnokülasyonu	31
Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik.....	32
Glukoz Standart Grafiği	32
α -Amilazın Üçlü Faz Ayırma (TPP) Tekniği İle Saflaştırılması	33
TPP sistemine pH etkisi	36
TPP sistemine sıcaklık etkisi.....	37
α -Amilazın Manyetik Alan Destekli Üçlü Faz Ayırma (MFTPP) Tekniği İle Saflaştırılması.....	38
<i>B. licheniformis</i> SO5 α -amilazının TPP ve MFTPP yöntemiyle saflaştırma sonuçları .	41
SDS-PAGE Yöntemi İle Enzimin Molekül Ağırlığının Belirlenmesi	41
<i>B. licheniformis</i> SO5 α -Amilazının Biyokimyasal Karakterizasyonu Çalışmaları.....	42
α -Amilazın aktivitesi ve stabilitesi üzerine pH'ın etkisi	42
α -Amilazın aktivitesi ve stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	43
Bazı metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi	44
Bazı yüzey aktif madde ve inhibitörlerin enzim aktivitesi üzerine etkisi	45
Bazı organik çözücülerin enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	46
Substrat Spesifitesi	47
Kısmi Olarak Saflaştırılan α -Amilazın Ekmek Kalitesini Artırmada Kullanımı	49
TARTIŞMA ve SONUÇ	51
KAYNAKÇA	59
ÖZGEÇMİŞ.....	68

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. α -Amilazların Endüstriyel Uygulamaları	6
Tablo 2. Tez Çalışmasında Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar	20
Tablo 3. Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasallar	21
Tablo 4. Standart Glukoz Çözeltilerinin Hazırlanması.....	25
Tablo 5. <i>B. licheniformis</i> SO5'ten Saflaştırılan α -Amilazın Saflaştırma Tablosu.....	41
Tablo 6. Yüzey Aktif Maddelerin ve İnhibitörün Amilaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	46
Tablo 7. Bazı Organik Çözücülerin α -Amilaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	46
Tablo 8. <i>B. licheniformis</i> SO5 Amilazının Substrat - % Bağlı Aktivite Değerleri.....	47
Tablo 9. α -Amilaz Aktivitesinin Özgül Hacim ve Yükseklik/Genişlik Oranı Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi.	50
Tablo 10. TPP ve MFTPP Sisteminin Optimize Edilen Şartlarda % Geri Kazanım ve Saflaştırma Katının Karşılaştırılması	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. (a) Amiloz ve (b) Amilopektinin kimyasal yapısı	4
Şekil 2. Üçlü faz ayırma	9
Şekil 3. Üçlü faz ayırma çeşitleri	10
Şekil 4. MSI Automation Hyper-5 cihazı.....	27
Şekil 5. SO5 suşuna ait petri görüntüsü	31
Şekil 6. Sıvı amilaz üretim besiyerine bakteri inokülasyonu	32
Şekil 7. Protein standart grafiği.....	32
Şekil 8. Glukoz standart grafiği.....	33
Şekil 9. TPP sistemine %20 amonyum sülfat doygunluğunda farklı t-bütanol oranının (kültür sıvısı:t-bütanol; 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) etkisi	33
Şekil 10. TPP sistemine %30 amonyum sülfat doygunluğunda farklı t-bütanol oranının (kültür sıvısı:t-bütanol; 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) etkisi	34
Şekil 11. TPP sistemine %40 amonyum sülfat doygunluğunda farklı t-bütanol oranının (kültür sıvısı:t-bütanol; 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) etkisi	34
Şekil 12. TPP sistemine %50 amonyum sülfat doygunluğunda farklı t-bütanol oranının (kültür sıvısı:t-bütanol; 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) etkisi	35
Şekil 13. TPP sistemine %60 amonyum sülfat doygunluğunda farklı t-bütanol oranının (kültür sıvısı:t-bütanol; 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) etkisi	35
Şekil 14. TPP sistemine %70 amonyum sülfat doygunluğunda farklı t-bütanol oranının (kültür sıvısı:t-bütanol; 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) etkisi	36
Şekil 15. TPP sistemine %80 amonyum sülfat doygunluğunda farklı t-bütanol oranının (kültür sıvısı:t-bütanol; 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) etkisi	36
Şekil 16. TPP sistemine pH'ın etkisi.....	37
Şekil 17. TPP sistemine sıcaklık etkisi.....	37
Şekil 18. Manyetik alan süresinin ve görev döngüsünün (%10) α -amilazın %verim ve saflaştırma katsayısına etkisi.....	38
Şekil 19. Manyetik alan süresinin ve görev döngüsünün (%30) α -amilazın %verim ve saflaştırma katsayısına etkisi.....	38
Şekil 20. Manyetik alan süresinin ve görev döngüsünün (%50) α -amilazın %verim ve saflaştırma katsayısına etkisi.....	39
Şekil 21. Manyetik alan süresinin ve görev döngüsünün (%70) α -amilazın %verim ve saflaştırma katsayısına etkisi.....	39

Şekil 22. Manyetik alan süresinin ve görev döngüsünün (%100) α -amilazın %verim ve saflaştırma katsayısına etkisi.....	40
Şekil 23. Manyetik alan gücünün α -amilazın %verim ve saflaştırma katsayısına etkisi (manyetik alan süresi: 10 dk, görev döngüsü: %30, kültür sıvısı: 2,2 U/mL)	40
Şekil 24. Log M_K - R_f grafiği	41
Şekil 25. <i>B. licheniformis</i> SO5'ten TPP ve MFTPP sistemiyle saflaştırılan amilazın SDS-PAGE görüntüsü	42
Şekil 26. α -Amilaz için optimum pH grafiği.....	42
Şekil 27. Amilaz için stabil pH grafiği.....	43
Şekil 28. α -Amilaz için optimum sıcaklık grafiği	44
Şekil 29. α -Amilaz için stabil sıcaklık grafiği.....	44
Şekil 30. 1 mM ve 10 mM konsantrasyonlarda hazırlanan metal iyonlarının enzim aktivesi üzerine etkisi	45
Şekil 31. Amilopektin substratı için K_m ve V_{max} bulunmasına yönelik Lineweaver-Burk grafiği.....	47
Şekil 32. Maltotrioz substratı için K_m ve V_{max} bulunmasına yönelik Lineweaver-Burk grafiği.....	48
Şekil 33. Buğday nişastası substratı için K_m ve V_{max} bulunmasına yönelik Lineweaver-Burk grafiği.....	48
Şekil 34. β -siklodekstrin substratı için K_m ve V_{max} bulunmasına yönelik Lineweaver-Burk grafiği.....	49
Şekil 35. Ekmek diliminin enine kesiti	49
Şekil 36. 10 gün oda koşullarında bekletilen ekmek diliminde küf oluşum miktarı	50

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

rpm	: Revolutions Per Minutes (Dakikada Dönüş Sayısı)
°C	: Santigrat Derece
μl	: Mikrolitre
AA	: Akrilamid
K _m	: Michaelis-Menten Hız Sabiti (mM)
V _{max}	: Maksimum Hız (μmol/dak)
U/mg	: Ünite/Miligram
BSA	: Bovin Serum Albumin
DNS	: Dinitrosalisilik Asit
EtOH	: Etil Alkol
dk	: Dakika
CaCl ₂	: Kalsiyum Klorür
HCl	: Hidroklorik Asit
L	: Litre
M	: Molar
mg	: Miligram
g	: Gram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
NaOH	: Sodyum Hidroksit
OD	: Optik Dansite
nm	: Nanometre
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
sn	: Saniye
Tris-HCl	: Trizma Tamponu
TSA	: Triptone Soy Agar
TSB	: Triptone Soy Broth
V	: Volt
α	: Alfa

GİRİŞ

Günümüzde biyoteknoloji bilimi, biyoloji biliminin alt disiplini olmaktan çıkmış ve disiplinlerarası bir bilim haline gelmiştir. En genel anlamıyla biyoteknoloji, “tüm teknolojik uygulamalar, biyolojik sistemler, organizmalar veya organizmalardan üretilen yapılar; bir ürünün imalatında, dönüştürülmesinde veya özel işlemlerinde kullanılması” olarak tanımlanmaktadır (Strickland, 2007; Schmid, 2003; Diversity, 2009).

Hızla artan dünya nüfusu ve küresel talebin artmasıyla birlikte ekonomik, kolay üretilen, çevre dostu ve kolay parçalanabilen biyoteknolojik ürünlere olan ilgide önemli bir artış olmuştur. Bunların başında hücrede veya hücre dışı ortamda aynı şekilde davranabilen enzimler gelmektedir (Aehle, 2004).

Kühna enzim kelimesini ilk olarak 1878 yılında kullanmıştır ve Yunanca “maya” anlamına gelmektedir. Enzimler, canlı organizmalarda meydana gelen biyokimyasal reaksiyonları hızlandıran biyolojik katalizörlerdir. Canlı organizmaların özellikle mikroorganizmaların ekonomik koşullarda enzim üretmeleri, ürettikleri atık miktarının az olması ve bu nedenle daha az çevre kirliliğine neden olmaları gibi avantajlar, enzimlerin endüstriyel alanlarda kullanımını oldukça çekici hale getirmektedir. Ortamda mevcut olan enzim ve substrat miktarı, reaksiyon ortamının pH ve reaksiyon değerleri ve diğer bazı fiziksel faktörler, enzimlerin katalitik aktivitesini etkiler (Demirel & Gürbüz, 1999; Aehle, 2004; Robinson, 2015).

Enzimlerin kullanımına ilk olarak antik çağlarda başlandığına inanılmaktadır. Enzimler yüzyıllardır alkollü içecekler, ekmek, peynir, sirke gibi farklı gıdaların üretim aşamasında ve kumaş/deri işlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda biyoteknolojide meydana gelen gelişmeler ve üretimde modern tekniklerin kullanılmaya başlanmasıyla birlikte enzim endüstrisi önemli ölçüde gelişmiştir. Bu nedenden dolayı endüstriyel öneme sahip enzimlerin daha bol ve ucuza üretimine yönelik araştırmalar her geçen gün hızla artmaktadır. Günümüzde enzimler gıda endüstrisinde; süt ürünleri üretiminde, bira üretiminde, etin işlenmesinde, meyve sularının berraklaştırılmasında, fruktoz şurubu üretiminde, deterjan endüstrisinde; protein ve yağların parçalanmasında, tekstil endüstrisinde; deri ve tekstil ipliklerinin işlenmesini kolaylaştırmakta ve tıpta teşhis ve tedavi amacıyla kullanılmaktadır (Msakni, 2020; Kirk *et al.* 2022; Özcan, 2005).

Mikrobiyal kaynaklardan elde edilen enzimlerin endüstriyel alanlarda artan kullanımı biyoloji ve biyoteknolojide araştırma konusu olmuştur. Mikroorganizmalar üreme sıcaklıklarına göre üç gruba ayrılır. 20°C'nin altında üreyen mikroorganizmalara psikrofil, 20°C ile 50°C arasında üreyen mikroorganizmalara mezofil, 50°C ile 80°C arasında üreyen mikroorganizmalara ise termofil denir (Choi *et al.* 2015). Endüstriyel biyoteknolojide sağladığı önemli avantajlar nedeniyle termofil bakteriler yaygın olarak kullanılmaktadır. Termofil mikroorganizmaların ürettikleri enzimler yüksek sıcaklıklarda aktiftir. Yüksek termal aktiviteye sahip enzimler, bu özelliklerini proteinin alt biriminde bulunan hidrofobik etkileşimler yoluyla kazanır. Termoenzimler aynı zamanda basınç yüksekliğine ve denatürasyona da yüksek dayanıklılık gösterirler. Sahip olduğu bu özellikler dikkate alındığında termofilik mikroorganizmalar ve bu organizmalardan üretilen enzimler geniş bir kullanım alanına sahiptirler (Atalah, 2019).

Biyolojik olarak önemli proteinleri verimli bir şekilde ekstrakte etme ve saflaştırma işlemi, biyokimya alanındaki en önemli araştırma konularından birisi olmuştur. Protein ve enzim üretimi için ayırma ve saflaştırma işlemleri genellikle toplam üretim maliyetinin büyük bir bölümünü oluşturur. Rekombinant terapötik proteinlerin, gıda proteinlerinin ve endüstriyel enzimlerin küresel pazarda artan bir etkiye sahip olduğu biyoteknoloji süreçlerinin geliştirilmesine yönelik önemli çabalar sarf edilmektedir (Sadana & Beelaram, 1994; Kelley *et al.* 2009).

Spesifik proteinlerin üretiminin başarısı, proteinin kullanım amacına uygun olacak şekilde seçilecek olan saflaştırma proseslerine büyük ölçüde bağlıdır. Prosesin tasarımı amaca uygun bir şekilde yapılmazsa bu durum ekonomik ve teknik nedenlerle üretimde başarısızlığa neden olabilir. Proteinlerin geri kazanılması, saflaştırılmış ürünlerin yüksek toplam maliyetine katkıda bulunan yüksek miktarda kimyasal ve pahalı ekipman kullanan süreçleri içerir. Bu nedenle, işlem süresini kısaltabilen, daha uygun maliyetli, toksik olmayan ve çevre dostu özelliklere sahip olabilen yeni ayırma ve saflaştırma teknikleri geliştirmek için büyük bir çaba ve ilgi gösterilmektedir (Chew *et al.* 2019).

KURAMSAL TEMELLER

Endüstriyel Enzimler

Endüstriyel işlemlerin birçoğunda hayvanlar ve bitkilerden elde edilen enzimler kullanılmış olsada günümüzde endüstriyel enzimlerin büyük kısmı ticari olarak kullanılan mikrobiyal enzimler sayesinde ilerleme kaydetmiştir. Endüstriyel mikrobiyoloji, binlerce yıldır alkollü içecekler, süt ve sebzelerin muhafazasında, peynir, ekmek, şarap ve turşu gibi fermente ürünlerin hazırlanmasında mikroorganizmalardan önemli ölçüde faydalanmıştır (Arat, 2007; Robinson, 2015).

Günümüzde bilinen 3000 farklı enzim vardır ve bu enzimlerin 150-170 kadarının endüstriyel boyutta üretimi gerçekleştirilerek kullanılmaktadır. Küresel enzim pazarı incelendiği zaman endüstriyel enzimler için 2018 yılında pazar hacminin 9,3 milyar ABD doları olacağı ve 2019 yılından 2025 yılına kadar yıllık %7,1 oranında büyüme gerçekleşerek 14,9 milyar ABD dolarına ulaşacağı tahmin edilmektedir. Novozymes (Danimarka), DuPont-Danisco (ABD) ve DSM (Hollanda) şirketleri küresel enzim pazarı için lider üreticilerin başında gelmekte ve enzim pazarının %75'den fazlasına hakim durumda bulunmaktadır. İlaç, kozmetik ve kişisel bakım, yiyecek-içecek ve deterjan gibi alanlarda tüketici ilgisine yönelik üretim gerçekleştirmesinden dolayı Kuzey Amerika lider enzim pazarı olarak bilinmektedir (Patel *et al.* 2017, Andrio & Demain, 2014).

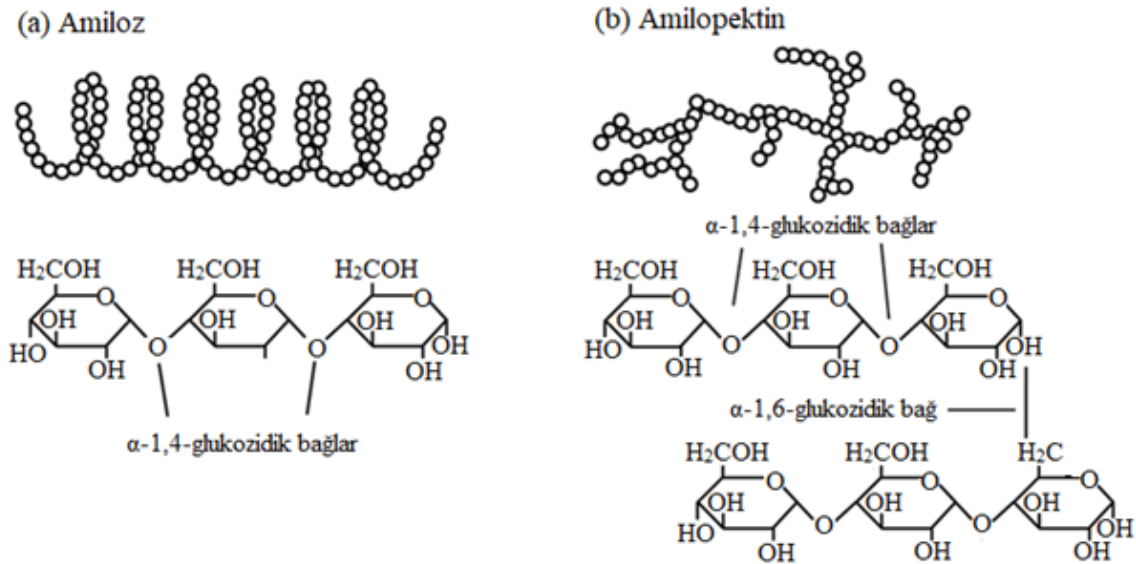
Hidrolaz grubu enzimler kapladıkları %75'lik alan ile enzim pazarında en baş sırada yer almaktadırlar. Hidrolaz grubunun temel olarak proteaz, lipaz ve karbohidralazlar (amilaz, maltoz, lakkaz) oluşturur. Karbohidraz enzimlerin %70'den fazlası gıda alanında yaygın olarak kullanılmaktadır (Liu & Kokare, 2017; Guerrand, 2017).

Amilaz

Hidrolaz grubuna mensup olan amilazlar nişasta ve polimer moleküllerini parçalar. α -Amilaz (α -1,4-glukan-4-glukanohidrolazlar EC 3.2.1.1), nişasta moleküllerindeki glukozil kalıntıları ve diğer benzer α -glukanlar arasında bulunan α -1,4-D glukozidik bağlarını parçalayan bir nişasta hidrolize edici enzimdir. α -Amilaz ürün olarak glikoz, maltoz, maltotrioz, kısa zincirli oligosakkaritler ve α -limit dekstrin oluşturur. Yalnızca α -amilaz değil, bakteri ve mantarlardan üretilen β -amilaz, glikoamilaz ve glikoizomeraz enzimleri de nişastayı parçalama gücüne sahiptir. Toplam enzim pazarının yaklaşık %25-30'unu oluşturan α -amilaz, sahip olduğu üstün özelliklerden dolayı polisakkaritlerin hidrolizi için mevcut tüm amilazlar arasında

glukozit hidrolaz ailesinin (GH13) en yaygın kullanılan üyesidir. Son yıllarda enzim kullanımının nişasta endüstrisinde yaygınlaşmasından dolayı nişastanın farklı yollarla parçalanmasına son verilmiştir (Janeček & Zámocká, 2020; Gupta *et al.* 2003; Lee, 1996; Syu & Chen, 1997).

Nişasta bitkilerin fotosentezi sonucu ortaya çıkan tatsız ve kokusuz bir üründür ve elde edildiği kaynaklar genellikle tahıllar ve patatestir. Kimyasal özelliklerinin iyi tanımlanmış olması ve biyolojik olarak parçalanabilirliğinin yüksek olması dolayısıyla gıda alanında ve gıda dışındaki alanlarda geniş bir kullanım yelpazesine sahiptir. İnsanlarda ve hayvanlarda gıda maddesi olarak kullanımının yanı sıra kağıt, tekstil ve diğer alanlarda da kullanılan önemli bir maddedir. Hem aseton, etanol ve organik asitlere dönüştürülebilir olduğundan hem de fermente edilebilmesinden dolayı polimer teknolojisinde en fazla kullanılan malzemelerdendir. Buğday, pirinç, mısır, tatlı patates, tapyoka ve patates gibi farklı kaynaklar nişasta üretebilmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Nişastaların tümü ürettiği kaynakla beraber isimlendirilir (patates nişastası, mısır nişastası, buğday nişastası vb.). Nişasta, dallanmamış amiloz (α -1,4-D-glukozidik bağlardan oluşur) ve dallanmış amilopektin (α -1,4-D glukozidik bağlar ve α -1,6-D-glukozidik bağlar içerir) olmak üzere iki polimerden oluşmaktadır (Jobling, 2004; Swinkels, 1990; Belgacem, 2011; Swinkels, 1998).



Şekil 1. (a) Amiloz ve (b) Amilopektinin kimyasal yapısı (Willfahrt *et al.* 2019)

α -Amilazlar, nişasta moleküllerinin yalnızca α -1,4-D-glukozidik bağlarını parçalayabilir. Amilaz enzimleri endoamilaz ve ekzoamilaz olmak üzere iki gruba ayrılır. Farklı uzunluklarda ve farklı şekillerde oligosakkarit oluşturan endoamilazlar nişasta molekülünü rastgele parçalar. Ekzoamilazlar ise parçalamayı indirgen olamayan uç kısımdan gerçekleştirir ve kısa son ürünler oluşturur (Gupta *et al.* 2003; Paul *et al.* 2021).

Amilazların α , β ve γ olmak üzere üç farklı formu bulunmaktadır. α -Amilaz (EC 3.2.1.1); endo-etkili kalsiyum içeren bir metalloenzimdir. α -Amilaz, glikozidik bağı parçalamak için katalitik bölgesinde bir proton donörü gibi davranan Glu ve nükleofilik Asp'yi içeren iki amino asit kalıntısı bulunmaktadır (Wang *et al.* 2020; Janeček *et al.* 2014; Machius *et al.* 1995; Taniguchi & Honnda, 2009). Terminal glukozidik bağı hidrolizliyeemez ve temel hidrolitik ürünleri maltotrioz, maltoz, glukoz ve dekstrindir. Ca^{2+} ve Cl^- iyonlarını bağlama kabiliyetine sahip α -amilazlar aktif formda olmaları için kalsiyum iyonuna ihtiyaç duyarlar. Diyaliz metoduyla uzaklaştırılabilen Ca^{2+} iyonları tekrar ilave edilerek enzim aktif forma dönüştürülebilir. Yapısında bulunan kalsiyum iyonları enzimi çeşitli enzimlere, alkali pH ve yüksek sıcaklığa karşı dayanıklı kılar (Tatar, 2007; Quian *et al.* 1994; Declerck *et al.* 2000). β -Amilaz (EC 3.2.1.2); ekzo-hidrolaz enzimidir ve polisakaritin indirgeyici olmayan ucundan α -1,4-glukan bağı ayırarak maltoz verir. Glukoamilaz (EC 3.2.1.3); ekzo-etkili bir glukoamilazdır ve polisakkaritlerin hem α -1,6 hem de indirgeyici olmayan terminal α -1,4 glukozidik bağlarının hidrolizini katalize eder (Chen *et al.* 2012; Taniguchi & Honnda, 2009; Wang *et al.* 2020).

Bitki, hayvan ve mikroorganizma gibi farklı kaynaklardan elde edilen amilazlar birçok farklı alanda kullanılmasına rağmen mikrobiyal kaynaklardan elde edilen amilazlar endüstride yaygın olarak kullanılır. Mikrobiyal kaynaklı α -amilazlar; kararlı ve spesifik yapıları, bunlarla ilişkili karmaşık bir biyokimyasal yol olmadığı için genetik düzeyde ve protein düzeyinde daha kolay manipülasyon, endüstriyel ölçekte daha ucuza üretilmeleri gibi çeşitli avantajlara sahiptirler (Dafe *et al.* 2017).

α -Amilaz kullanılan en eski enzimlerden birisidir ve endüstriyel açıdan büyük bir öneme sahiptir. Ticari olarak en sık kullanılan α -amilazlar çeşitli *Bacillus* türlerinden elde edilmektedir. İlk olarak enzim üretimi için *Bacillus subtilis* kullanılmış, sonraki yıllarda da yaygın olarak enzim *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus* ve *Bacillus amyloliquefaciens*'dan elde edilmiştir. α -Amilazların endüstriyel kullanımında termostabilite ve alkaline pH'a dayanıklılık aranan özelliklerdir (Lee, 1996; Syu & Chen, 1997, Paul 2021). Nişasta yüksek sıcaklıklarda (100-110°C) sıvı forma dönüştüğünden dolayı glikoz, kristal dekstroz, dekstroz şurubu, maltoz ve maltodekstrinler gibi değerli ürünlerin endüstriyel üretim aşamalarını daha iyi bir seviyeye getirebilmek için termostabil enzimlerin araştırılması günümüzde devam etmektedir (Asghur *et al.* 2007; Gomes *et al.* 2003; Pandey *et al.* 2000; Konsoula & Liakopoulou-Kyriakides, 2007).

α -Amilaz Enziminin Kullanım Alanları

Son yıllarda α -amilazlar gibi amilolitik enzimlerin çeşitli endüstriyel faaliyetlerin gerçekleştirilmesinde kullanımı artmıştır. α -Amilaz günümüzde yüksek fruktozlu mısır şurubu ve etanol üretimi, gıda, tekstil, kağıt ve deterjan endüstrileri gibi çok çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanılmaktadır. α -Amilazların modern veya yeni uygulamaları arasında atık su arıtma, hidrojel oluşumu ve kontrollü ilaç dağıtımı için amiloz çapraz bağlı polimer (tablet) hazırlama, farmasötikler/ilaç ve bir biyofilm inhibitörü olarak kullanımı gibi uygulamaları bulunmaktadır. Tablo 1’de, α -amilazın farklı endüstrilerdeki en güncel uygulamaları gösterilmektedir (Priya & Renu, 2018; Dumoulin *et al.* 1999; Suribabu *et al.* 2014; Vaikundomoorthy *et al.* 2018).

Tablo 1. α -Amilazların Endüstriyel Uygulamaları (Far *et al.* 2020)

Endüstri	Uygulama	Mikroorganizma
Deterjan (çamaşır ve bulaşık)	Tüm sıvı deterjanların %90’ında α -amilaz bulunur. α -Amilaz nişastalı gıdaların kalıntıları parçalayarak leke çıkarmada kullanılır.	<i>Bacillus</i> veya <i>Aspergillus suşu</i>
Nişasta sıvılaştırma	α -Amilazlar içecek endüstrisinde alkolsüz içeceklerde tatlandırıcı olarak yaygın olarak kullanılır.	<i>Bacillus stearothermophilus</i> veya <i>Bacillus licheniformis</i>
Yakıt üretimi	Nişasta, mikroorganizma veya α -amilaz kullanılarak şekere dönüştürülür ve ardından şeker etanole dönüştürülerek yakıt olarak yaygın olarak kullanılmaktadır.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Gıda endüstrisi	α -Amilazlar gıda endüstrisinde ekmek kalitesini artırmada, meyve suyu ve bira arıtımında, hayvan yemlerinin ön işleminde yaygın olarak kullanılır.	<i>Bacillus stearothermophilus</i> ’un termostabil maltojenik amilazı
Tekstil endüstrisi	Tekstil endüstrisinde dokuma aşamasının hızlı ve güvenli olabilmesi için ipliğin kopmaması önemlidir. Dokuma sırasında ipliğe uygulanan nişasta sağlamlık kazandırır ve işlemde sonra dokuma kumaştan uygulanan bir işlem ile uzaklaştırılır.	<i>Bacillus suşu</i>
Hamur ve kağıt	Tekstil endüstrisinde olduğu gibi kağıt yapım aşamasında da kağıdın mekanik hasarlara karşı korunması gerekir. Bu aşamada α -amilaz kullanılır. Ayrıca kullanılan α -amilaz kalitesini, boyutunu ve sertliğini artırır. Aynı zamanda kağıt için iyi bir kaplamadır.	-

Termofilik Bakteriler

Termofilik bakterilerin ortaya çıkışı ilk olarak Misque tarafından 1879 yılında gerçekleştirilmiştir. Çöplerden, pisliklerden, topraktan ve nehir çamurlarından izole edilen termofilik bakterilerin 72°C’de gelişimi sağlanmıştır. 1982 yılında Stetter ise volkanik alanlardan termofilik bakteri izolasyonu gerçekleştirmiştir (Misque, 1888; Dölger, 2003; Adıgüzel, 2006).

Yaşadıkları sıcaklığa göre bakteriler üç gruba ayrılır; psikrofiller, mezofiller ve termofiller. -10°C’ye kadar olan sıcaklıklarda yaşayan psikrofillerin optimum büyüme sıcaklıkları 15°C’dir. İnsanlar için patojen etkiye sahip olan mezofillerin büyüme sıcaklıkları ise 20-45°C arasındadır. Çoğunlukla 45°C’nin üzerindeki sıcaklıklarda yaşayan termofilik bakteriler ise çeşitli sıcak su kaynaklarında, karasal ve denizel volkanik alanlarda ve hidrotermal menfezlerde faaliyet gösterirler (Caccoma *et al.* 2001; Deive *et al.* 2012; Baltaş, 2012).

Bacillus cinsi

Aerobik, sporlu, gram pozitif ve çubuk şekilli *Bacillus* türleri doğada hemen her yerde mevcuttur ve bazı türleri yaşa bağlı olarak zamanla gram negatif olabilir. Yaşam alanları buzullar, sıcak su kaynakları, tatlı su ve çöllerdir. Her ortamda yaşayabilir özellik sağlayan çeşitli yeteneklere sahiptir. Sahip olduğu sporlar sıcak, soğuk, radyasyon ve dezenfektan gibi zorlu şartlara karşı dayanıklıdır (Turnbull *et al.* 1996).

Optimum gelişim gösterdikleri sıcaklık aralığı 25-27°C olmasına rağmen 75°C’nin üzerinde ve 3°C’nin altında gelişebilen türleride mevcuttur. Aynı şekilde pH 2,0 gibi çok düşük ve pH 10,0 gibi yüksek pH’larda gelişim gösterebilirler (Drobniewski, 1993).

α -Amilaz, proteaz, ribonükleaz gibi termostabil özelliğe sahip enzimleri üreten *Bacillus* türlerinin gıda, ilaç, deterjan, kağıt gibi endüstriyel alanlarda kullanımları oldukça yaygındır (Bolton *et al.* 1997).

Bacillus licheniformis

Topraklardan ve bitki materyallerinden izole edilen endospor oluşturan gram pozitif organizmadır. Ortam şartları kötü olduğu zaman spor oluştururlar. Yüksek sıcaklıklarda bile hayatta kalma kabiliyetine sahip olmalarına rağmen 55°C’de optimum büyüme gösterirler. Yüksek protein salgılama yeteneği bulunduğu için dolayı ticari olarak yaygın kullanılırlar (Divakaran *et al.* 2011; Veith *et al.* 2004).

Enzim salgılanmasını optimum 37°C’de gerçekleştirirler. Doğanın her yerinde yaygın olarak bulunan *B. licheniformis*’in sayısı tam olarak bilinmemesine rağmen toprakta gram başına düşen bakteri sayısı 106-107 olarak bilinmektedir (Veith *et al.* 2004).

Enzimlerin Saflaştırılması

Hücre içinde enzimler genellikle diğer proteinler, nükleik asitler, polisakkaritler ve lipidlerle birlikte bulunur. Enzimi saflaştırmak amacıyla kirletici materyali uzaklaştırmak için çeşitli yöntemler kullanılabilir. Saflaştırma seviyesi ne kadar yüksek olursa, enzim üretim maliyeti de o kadar yüksek olur. Endüstriyel alanda uygulama söz konusu olduğunda genellikle saflaştırma derecesi daha düşük olan enzimler kullanılmaktadır (Rajendran *et al.* 2022).

Endüstriyel enzim üretim prosesinin uygulanabilir olduğu kadar ekonomik olması da gerekir. Üretilen enzimin saflaştırılması, enzim üretim maliyetinin büyük bir kısmını içerir. Endüstriyel ölçekte α -amilaz üretilirken dikkat edilmesi gereken belirli kriterler bulunmaktadır. Amilaz üretiminde yüksek verim elde edebilmek için, ekonomik substratların kullanımı, yüksek verimle α -amilaz üreten suşların kullanımı, proses parametrelerinin optimizasyonu ve en uygun alt akım işlemlerinin (downstream proses) belirlenmesi gibi birkaç temel strateji geliştirilmiştir. Bunların içerisinde downstream prosesler, en zorlu basamağı oluşturmaktadır. Çünkü downstream prosesi oluşturan tüm teknikler oldukça maliyetli olan sofistike enstrümantasyon gerektirebilir ve aynı zamanda bu süreçte hem enzimin biyolojik aktivitesini kaybetme olasılığı yüksektir, hemde enzim kaybı söz konusu olabilir.

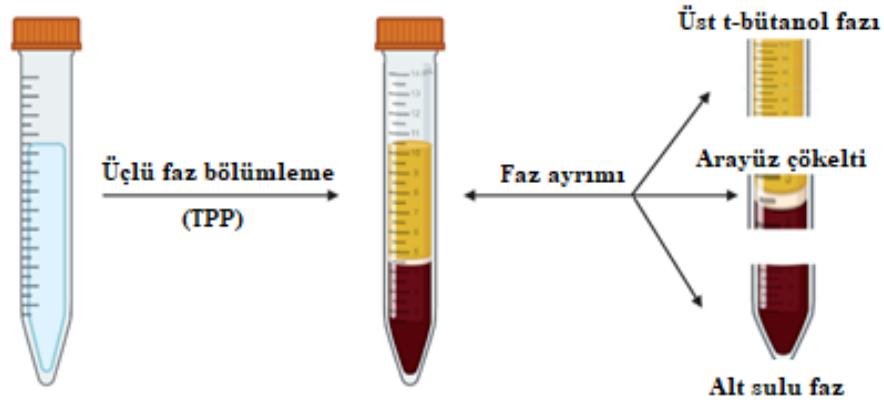
Enzim saflaştırmanın farklı yöntemleri bulunmaktadır. Ancak nihai yöntemin seçilmesi enzim pazarına, maliyete, nihai kaliteye ve mevcut teknolojiye bağlıdır. Enzimleri saflaştırmak için kullanılan çöktürme, kolon kromatografisi, membran ayırma, kristalleştirme ve ultrafiltrasyon gibi geleneksel saflaştırma teknikleri zahmetli, maliyetli, zaman alıcı birkaç adımdan oluşmaktadır. Bu nedenle, bu dezavantajları çözmek için sulu iki fazlı sistem (ATPS), ısıyla ayırma (TMP) ve üçlü faz bölümlleme (TPP) gibi alternatif bir geri kazanım teknikleri geliştirilmiştir (Madhavan Nampoothiri *et al.* 2010; Rather & Gupta, 2013).

Üçlü Faz Ayırma (TPP)

Günümüzde geleneksel teknikler kullanılarak homojenatta bulunan çok sayıda proteini saflaştırmak pahalı ve zaman alıcıdır. Bu dezavantajı ortadan kaldırmak amacıyla yeni yöntem arayışı başlamıştır (Çamurlu vd. 2020). İlk defa Lovrien ve arkadaşları tarafından geleneksel yöntemlere alternatif olarak düşünülen TPP tekniği önerilmiştir (Gagaoua & Hafid, 2016). Enzimler gibi protein bileşiklerinin kompleks karışımlardan ayrılmasını sağlayan TPP yöntemi basit, düşük maliyetli ve etkili bir tekniktir (Dennison & Lovrien, 1997).

Üçlü faz ayırma sisteminin prensibi

TPP tekniği kültür sıvısına farklı doygunluklarda tuz (genellikle amonyum sülfat) ve çözünürlüğü az olan bir alkol (çoğunlukla t-bütanol) ilavesiyle gerçekleşir. Proteinlerin yüzeylerindeki etkileşimi artıran tuz salting-out metoduyla proteinleri çözeltiden ayırır ve su molekülleri tuz iyonları tarafından çekilerek proteinlerin çökmesi sağlanır. Sistemde kullanılan t-bütanol, etanol, metanol gibi alkoller ise bağlı olduğu protein parçacıklarının kaldırma kuvvetini artırarak konsantre bir tuz çözeltisinde yüzmelerini sağlar. Ayırım gerçekleştikten sonra üç faz oluşur. Pigmentler, lipitler ve non-polar bileşiklerin toplandığı üst faz organik çözümlerle zengindir. Proteinler, sakkaritler gibi polar olmayan bileşiklerin toplandığı alt faz tuzca zengin fazdır. Organik çözümler ile sıvı alt faz arasında oluşan kısım ara fazdır ve oluşan ara faz çöken proteinleri bulundurmaz (Alçıçek, 2017). Bununla birlikte, bütün proteinlerin ara fazda toplanmaları beklenmez. Hidrofobisite, proteinin moleküler ağırlığı ve fiziksel koşullar (sıcaklık, pH) gibi parametreler bu dağılıma ve ayırma işlemini etkilemektedir (Bayraktar & Önal 2013).



Şekil 2. Üçlü faz ayırma

TPP iyonik şiddet, kosmotropi, osmotik stres, ara yüzey gerilimi ve yığılma etkileşimleri gibi çeşitli faktörlerin etkilediği kompleks bir yapı sergileyen fizikokimya esaslı bir tekniktir. TPP sisteminde proteinler kaynaklarına, moleküler ağırlıklarına, pI'lerine ve sıcaklıklarına bağlı olarak farklı davranışlar gösterirler (Pike & Dennison 1989; Saxena *et al.* 2007).

Üçlü faz ayırma sisteminin avantajları ve dezavantajları şunlardır;

Avantajları;

- Kısa ve basit bir saflaştırma tekniğidir.
- Yöntemde kullanılan çözelti miktarları, fiyatı ve tekrar kullanımlarının mümkünlüğü göz önüne alındığında maliyeti oldukça düşüktür.

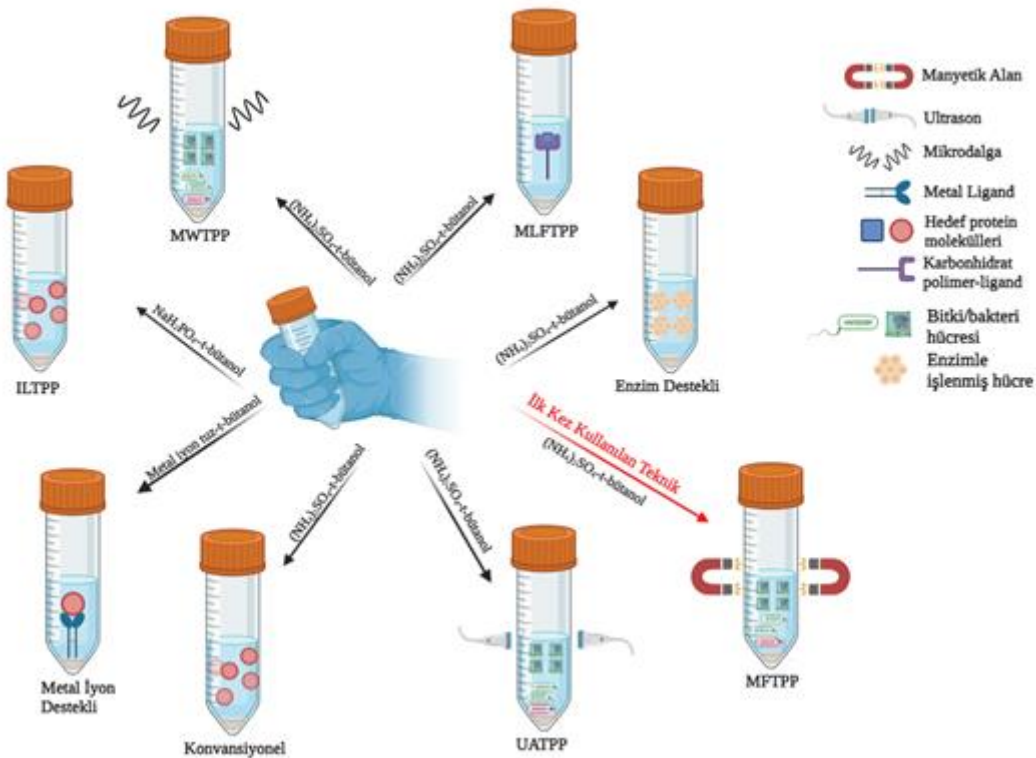
- Oda sıcaklığında kolaylıkla uygulanabildiğinden farklı bir sıcaklık ayarlamasına ihtiyaç duymaz.
- Küçük hacimler için başarıyla uygulanabildiği gibi ölçek büyütmek mümkündür.
- Protein denatürasyonuna sebep olmaz.
- Kromatografik tekniklerin aksine proteinleri saflaştırır ve saflaştırılmış proteini konsantre hale getirir.
- Kültür sıvısına direkt olarak yöntem uygulanabilir (Alçiçek, 2017; Duman, 2016).

Dezavantajları;

- Saflaştırma işlemine tabi tutulan hassas proteinler, kullanılan t-bütanol ile denatüre olabilirler.
- Kullanılan tuzun enzimin aktivitesinde bir azalmaya sebep olmaması için ek bir basamak olan diyaliz işlemi ile tuzun ortamdan uzaklaştırılması gerekir.
- Ortamda az miktarda protein bulunması durumunda TPP işlemi uygun değildir (Alçiçek, 2017).

Üçlü Faz Ayırma Çeşitleri

TPP'nin süresini minimuma indirerek geri kazanım ve saflığını artırmak amacıyla TPP sistemi ile yürütülen farklı teknikler geliştirilmiştir.



Şekil 3. Üçlü faz ayırma çeşitleri

Ultrasonik destekli üçlü faz ayırma (UATPP)

UATPP nispeten yeni ve daha az keşfedilmiş saflaştırma tekniklerinden biridir. Ultrasonikasyon, farklı fitokimyasalların ekstraksiyonu, biyokataliz, adsorpsiyon ve biyoremediasyon süreçleri için birçok katı-sıvı ekstraksiyon işleminde verimi ve kütle transferini arttırdığı uzun zamandan beri bilinmektedir (Rokhina *et al.* 2009; Xia *et al.* 2012). Bu yöntemde, kütle transfer direnci azaltılarak daha kısa sürede daha yüksek verim elde edilmesi sağlanır (Day & Rathod, 2013; Ketnawa *et al.* 2017).

Ultrasonik dalgaların etkisi altında oluşan gaz kabarcıkları çöker ve ortamda şok dalgaları ve mekanik hareketler oluşturur. Enerji yoğunluklarında ve mekanik kaymalarda meydana gelen değişiklik farklı fazlar arasında kütle transferini hızlandırır (Pakhale & Bhagwat, 2016).

Mikrodalga destekli üçlü faz ayırma (MWTPP)

TPP'nin verimini daha da artırmak için yapılan birçok teknik arasında en yeni ve başarılı deneme, üç tabakanın oluşumuna yardımcı olmak için mikrodalga radyasyonun kullanılması olmuştur. MWTPP numunelerde bulunan çözücüler mikrodalga enerjisini kullanarak ısıtan yeni bir tekniktir. Çözücü polaritesi ve sıcaklığına bağlı olarak ısınmanın sebep olduğu yerel sıcaklık ve artan basınç nedeniyle bitki/mikroorganizma hücrelerinden biyomoleküllerin salınımını hızlandırır. Bu durum numune ve çözücü içerisinde bulunan hedef bileşiklerin ayrımını hızlandırarak ekstraksiyon süresini ve çözücü tüketimini azaltır. MWTPP sistemi, düşük maliyeti ve yüksek performansından dolayı araştırmacılar tarafından büyük ilgi görmüştür (Dahmoune *et al.* 2015; Rahath Kubra *et al.* 2013; Chew *et al.* 2019).

Makroafinite ligand-kolaylaştırılmış üçlü faz ayırma (MLFTPP)

Klasik TPP tekniği kullanılarak geliştirilen bir tekniktir. Yöntemde proteinleri saflaştırmak için ortama eklenen akıllı polimerler kullanılır. Bu teknik, akıllı afinite mikroligand bölümlemesine dayanarak ham süspansiyonların doğrudan işlenmesine izin verir. Akıllı afiniteli mikroligand ortama $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ve t-bütanol eklendikten sonra çökelerek alt sulu faz ve t-bütanol açısından zengin olan üst faz arasında bir ara yüzey çökeltisi oluşturur. Mikroligand hedef proteine seçici olarak bağlanırken afinite kompleksi bir arayüzey çökeltisi oluşturur. Karışım daha sonra tuzlu fazda çözünmüş çökelti ve t-bütanol tabakası olarak iki kısma ayrılır. Çökelti, hedef proteinlerin geri kazanımı için ayrıştırılır (Mondal & Grupta, 2006; Mondal *et al.* 2003).

Akıllı polimerlerin MLFTPP'de kullanılması geleneksel TPP'ye kıyasla doğal yapıya yakın konformasyona sahip proteinlerin başarılı bir şekilde saflaştırılmasını sağlar. Düşük

işletme maliyetleri, yüksek seçicilik, kolay ölçeklenebilirlik ve homojenatin herhangi bir ön işlem gerektirmemesi MLFTPP'nin önemli avantajlarından (Raghava *et al.* 2008; Gautam *et al.* 2012; Sharma *et al.* 2004).

İyonik likit üçlü faz ayırma (ILTPP)

Proteinlerin geri kazanımı için iyonik sulu iki fazlı sistemlerin kullanımı aktif olarak devam etmektedir ancak ILATPS araştırması, uygulanabilirliğinin önündeki en büyük engel olan biyomoleküllerin geri kazanımı konusunda eksiktir. İyonik sıvı TPP, hem TPP hem de ILATPS'nin faydalarını birleştirir. Bununla birlikte, ekstraksiyon için iyonik likit (IL) kullanımının ana zorluklarından biri, her işlem sonunda pahalı olan IL'yi geri kazanma yeteneğidir. IL'nin geri kazanılabilirliği ve yeniden kullanılabilirliği, ekstraksiyon işleminin verimini belirler (Lee *et al.* 2017; Alvarez-Guerra *et al.* 2014).

Üçlü Faz Ayırma Sistemini Etkileyen Parametreler

TPP sisteminin geri kazanım (verim) ve saflık derecesini artırabilmek amacıyla tuz/organik çözücü tipi ve doygunluğu, sistemin pH'ı, sistemin sıcaklığı gibi birçok faktör araştırılmakta ve optimizasyon çalışmaları yapılmaktadır.

Tuz doygunluğunun etkisi

TPP'de amonyum sülfat, sodyum sülfat, magnezyum sülfat gibi sülfat tuzları kullanılabilir, fakat sahip olduğu yüksek çözünürlük ve iyonik şiddeti nedeniyle $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (amonyum sülfat) TPP işleminde en fazla kullanılan inorganik tuzdur. Protein protein etkileşimlerinden ve çökmesinden sorumlu olan amonyum sülfat sistemde önemli bir rol oynar. Sistemde kullanılan tuz doygunluğu istenen verimin elde edilmesi için optimize edilmelidir. TPP işleminin optimize edilmesi için en düşük tuz doygunluğu (%20) ile başlanır ve artan doygunluklarda işlem devam eder. Artan tuz doygunluğu ile su moleküllerinin protein tabakasından ayrılması desteklenir. Yüksek tuz çökmesinde, tuz iyonları tarafından adsorbe edilen su molekülleri protein moleküllerinin çökmesine neden olur (Yan *et al.* 2018; Choonia & Lele, 2013).

Organik çözücü etkisi

TPP'de kullanılan n-heksan, aseton, metanol ve etanol ile karşılaştırıldığında daha az yanıcı ve yüksek kaynama noktasına (84°C) sahip olan t-bütanol sistemde yaygın olarak kullanılır. t-bütanole ek olarak n-propanol, izopropanol, n-bütanol, n-pentanol ve n-heksan gibi birçok organik çözücünün sisteme etkisi incelenmiştir. Bu çözücüler t-bütanol ile kıyaslandığında yüksek deaktivasyon ve düşük arayüz çökmesi oluşturur. Dallanmış yapısı

ve boyutu dikkate alındığı zaman protein moleküllerinin içine giremeyen t-bütanol denatürasyona sebep olmadığı kabul edilmektedir, fakat yüksek t-bütanol konsantrasyonunda protein çökmesini engelleme ihtimali yüksektir. t-bütanol miktarının artmasına paralel olarak çözelti viskozitesinin artmasından dolayı hedef ürün miktarında artış olmadığı dikkat çekmektedir. TPP işleminde başarı elde etmek için uygun çözücü seçimi oldukça önemlidir (Vetal *et al.* 2014; Dennison & Loverian, 1997; Dennison *et al.* 2000; Chaiwut *et al.* 2010; Yan *et al.* 2018).

pH etkisi

TPP ile saflaştırma işleminde protein ve enzim zenginleştirme ve saflaştırma verimliliği üzerinde pH'ın olumlu ve büyük bir etkisi vardır. Bu etki çoğunlukla pH'daki değişiklikler nedeniyle proteinlerin yüzeyindeki amino asit kalıntılarındaki değişikliklerle ilişkilendirilir. Buna ek olarak yüklü proteinler ve fazlar arasında oluşan elektrostatik etkileşimler bölünme davranışını bir dereceye kadar etkiler. TPP sisteminde hedef alınan proteinin ara faza veya sulu faza geçmesi esas olarak pI'sına dayanır (Dennison & Lovrein, 1997; Çalci *et al.* 2009; Özer *et al.* 2010). pH değeri pI değerinin üzerinde olduğu zaman protein yüzeyinde bulunan negatif yüklü amino asit kalıntıları proteini negatif yüklü hale getirir ve sonuç olarakta protein sulu fazda kalır. Bu durumun aksine pH değeri pI değerinin altında olduğu zaman protein orta fazda toplanıp zenginleşecektir (Dennison & Lovrein, 1997; Wang *et al.* 2011). Bu nedenden dolayı TPP işleminde çalışılacak uygun pH değerini bulmak oldukça önemlidir.

Sıcaklık etkisi

TPP işlemlerinin çoğu genellikle düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilir ve böylece protein denatürasyonunun minimum olması sağlanır (Dogan & Tari, 2008; Garg & Thorat, 2014). TPP işlemlerinin düşük sıcaklık gerektirdiği literatürde belirtilmemiştir fakat amonyum sülfat ve t-bütanolden oluşan TPP sisteminin etkisinin düşük sıcaklıklarda daha yüksek olduğu görülmektedir ve bu nedenle TPP'lerin çoğu normal sıcaklıklarda gerçekleştirilmiştir. TPP sistemi için optimal sıcaklık aralığı 20-40°C olarak birçok çalışmada belirtilmiştir (Garg & Thorat, 2014; Sharma & Gupta, 2001a). Buna ek olarak 40°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda uçuculuğu artan t-bütanol daha az hacimde saflaştırmaya sebep olacaktır. Bütün bunlara ek olarak yüksek sıcaklıkta kurulan TPP sistemi daha fazla enerji ihtiyacına ve tüketimine yol açacaktır.

Amilaz ve TPP sistemi ile yapılan literatür çalışmalarından bazıları şunlardır;

Salvi & Yadav (2020) yaptıkları çalışmada epoksit hidrolaz enzimini TPP tekniğini kullanarak kısmi olarak saflaştırmışlardır. Yapılan saflaştırma sonucunda bir çökelti olarak ara

fazda toplandığını gözlemlemişlerdir. Organik çözücü olarak dimetil karbonat ve tuz olarak amonyum sülfat kullanmışlardır. Daha sonra sisteme mikrodalga'nın etkisini gözlemek amacıyla klasik TPP'yi mikrodalga ile birleştirmişlerdir. Amonyum sülfat doygunluğu, kültür sıvısı:organik çözücü miktarı ve sıcaklık değerlerini sırasıyla %40, 1,0:1,5 ve 45°C olarak belirlemiş ve belirledikleri bu şartlar ile $121,2 \pm 1,6$ verimle $2,14 \pm 0,03$ kat saflaştırma oranı elde etmişlerdir. Aynı koşulları 20 W ve %50 görev döngüsü ile mikrodalga altında uygulamış ve $142,6 \pm 1,9$ verimle $2,38 \pm 0,02$ kat saflaştırma elde etmişlerdir. MTPP'nin klasik TPP'ye kıyasla geri kazanım yüzdesini 1,17 kat artırdığını ve bu tekniğin epoksit hidrolaz enzimini etkili bir şekilde saflaştırmak ve geri kazanmak için etkili bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir.

Patil & Yadav (2018) yaptıkları çalışmada *Ttameses hirsuta* MTCC-1171 suşundan üretilen lakkaz enzimini ilk kez mikrodalga destekli TPP (MWTPP) tekniğini kullanarak kısmi olarak saflaştırmışlardır. %40 amonyum sülfat doygunluğu, 1:1 (v/v) kültür sıvısı:t-bütanol oranı, pH 4,5 ve 30°C sıcaklık gibi değerlerde $2,4 \pm 0,07$ kat saflıkta enzimin % $53,9 \pm 0,9$ 'unu veren gleneksel TPP tekniğini optimize etmiş ve referans yöntem olarak kullanmışlardır. Yanıt yüzeyi metodolojisinin (RSM) Box-Behnken tasarımı (BBD) kullanılarak MTPP optimizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. RSM analizi sonunda MTPP'nin mikrodalga ışınlama süresi 7 dakika, görev döngüsü %20, güç 20 W, maksimum verim $59,8 \pm 1,4$ ve saflık oranı $13,9 \pm 0,5$ kat olarak belirlemişler ve tahmin edilen değerlerle uyumlu olduğunu tespit etmişlerdir. Lakkaz saflığının ve veriminin klasik TPP yöntemindeki 60 dk'ya karşılık MTPP'de 7 dakikada iyileştirildiğini belirtmişlerdir. Buna ek olarak farklı parametrelerde lakkaz dağılımı üzerinde olumsuz etki oluşturduğunu gözlemlemişlerdir. SDS-PAGE analizi sonunda lakkaz anziminin molekül ağırlığı 67-72 kDa olarak belirlenmiş ve enzimin kısmi olarak saflaştırıldığını belirlemişlerdir.

David *et al.* (2017) yaptıkları çalışmada *Bacillus subtilis* kullanılarak α -amilazı saflaştırmış ve karakterizasyon çalışmalarını yapmışlardır. Amilaz ilk olarak TPP tekniği ile saflaştırılmış ardından jel filtrasyon ve DEAE Sephadex A-50 iyon değişim kromatografisi yapılmıştır. Saf enzim ile pH, sıcaklık ve metal iyon çalışmaları yapılmıştır. Yapılan SDS-PAGE sonucunda enzimin homojenliği kanıtlanmıştır. Amilaz iyon değişim kromatografisinde kolon A ve kolon B olarak adlandırılan alanlarda sırasıyla %8 ve %4 verim ile 15,93 ve 6,44 kat saflaştırılmıştır. Spesifik aktivite değeri ise 2,55 umol/dak/mg ve 1,03 umol/dak/mg olarak bulunmuştur. Optimum pH her iki havuz içinde 6,0 olarak, enzimin stabil pH değerleri ise sırasıyla pH 4,0-7,0 ve pH 8,0 olarak bulunmuştur. Na^+ ve Zn^{2+} iyonlarının enzimi aktive ettiği, Al^{3+} , K^+ , Ca^{2+} ve Hg^{2+} iyonlarının ise farklı oranlarda inhibisyona sebep olduğu belirlenmiştir.

Keskin & Ertunga (2017) yaptıkları çalışmada *Geobacillus sp.* TF14 suşundan izole edilen α -amilazı amonyum sülfat çökeltmesi, iyon değişim ve hidrofobik etkileşim kromatografisi ve ultrafiltrasyon kullanarak 17,11 kat saflaştırmışlardır. Yapılan SDS-PAGE analizi sonunda proteinin molekül ağırlığı 54 kDa olarak bulmuşlardır. Saflaştırılmış enzim için pH 5,0 ve pH 9,0'da optimum pH'a sahip olduğu ve 48 saatlik inkübasyonun sonunda bu iki pH değerinde kararlı olduğunu tespit etmişlerdir. Saflaştırılan enzim için en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık değerini 75°C olarak belirlemiş ve 72 saatlik inkübasyon sonunda bu sıcaklıkta aktivitesini tamamen koruduğunu gözlemlenmişlerdir. Ortama eklenen Ca^{2+} iyonunun aktiviteyi %70 oranında artırdığını ve %1'lik SDS, Triton X-100, Triton X-114 ve Tween-20 deterjanlarının başlangıç aktivitesinin yarısını kaybettirdiğini tespit etmişlerdir.

Ait Kaki El-Hadef El-Okki *et al.* (2017), *Rhizopus oryzae* FSIS4 kullanarak ilk kez α -amilazı TPP tekniğini kullanarak %168,8'lik verim ile 14,94 kat saflaştırmışlardır. Saf ve ticari enzimi karşılaştırmalı olarak ve 1 kg un başına 1,936 U konsantrasyonda olacak şekilde ekmek yapımında kullanmışlardır. α -Amilazın ekmek yapımında kaliteyi artırmak için büyük etkisi olduğunu göstermişlerdir. Sonuç olarak saflaştırılarak geri kazanımı sağlanan α -amilazın gıda biyoteknolojisinde çok önemli bir aday olduğunu göstermişlerdir.

Sagu *et al.* (2015) tarafından yapılan çalışmada, *Abris precatorius*'dan β -amilaz TPP tekniği kullanılarak kısmi olarak saflaştırmışlardır. Amonyum sülfat doygunluğu %49,46, ham özüt:t-bütanol oranı 0,87 (v/v) ve pH 5,2 olarak belirlenmiştir. Enzimin %156,2'lik bir geri kazanımla 10,17 kat saflaştırıldığı bildirilmiştir.

Batur & Aygan (2015), çalışmalarında *Bacillus sp.* A-3 suşunu kullanmışlardır. α -Amilazın saflaştırılması için alkol presipitasyon tekniğini kullanmışlardır. 37°C sıcaklık ve pH 6,5 enzimin en yüksek aktivite gösterdiği değerler olarak belirlenmiştir. SDS-PAGE sonucunda enzimin molekül ağırlığının 53,94 kDa olduğu belirlenmiştir. Yapılan pH çalışması sonucunda optimum pH'ın 6,0-6,5 olduğu ve enzimin stabil sıcaklığının 40°C'ye kadar olduğu belirlenmiştir. Kimyasalların enzime etkisini belirlemek için yapılan çalışmalar sonucunda kalan aktivite KCl %93 ile en yüksek, EDTA %0,8 ile en düşük değer olarak hesaplanmıştır. Yapılan bütün çalışmalar ve elde edilen veriler ışığında A-3 suşundan alkol presipitasyon tekniği kullanılarak saflaştırılan α -amilazın birçok alanda yüksek başarıyla kullanılabileceği belirtilmiştir.

Smitha *et al.* (2015) tarafından yapılan çalışmada jel filtrasyon kromatografisi ve amonyum sülfat çökeltmesi teknikleri kullanılarak α -amilaz %79 verimle 15 kat saflaştırılmıştır. Yapılan SDS-PAGE sonucunda saflaştırılan amilazın molekül ağırlığı 51 kDa olarak bulunmuştur. 60°C'de pH 6,0'da 3 μM Ca^{2+} varlığında %2,5 nişasta çözeltisi ile amilazın

maksimum aktivite gösterdiği aynı zamanda SDS ve EDTA varlığında enzim aktivitesinin düştüğü belirlenmiştir. Amilaz enzini için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 2,9 mg/mL ve 0,053 umol/mL/dk olarak hesaplanmıştır. Bu çalışma sonunda herhangi bir ek maliyet olmadan amilaz saflaştırılabildiği için biyoendüstride kullanımının avantajlı olacağı sonucuna varılmıştır.

Samanta *et al.* (2014) yaptıkları çalışmada, SKB4 suşu ile DEAE selüloz kolonu kullanarak amilazı saflaştırmışlardır. Saflaştırılan enziminin 42°C sıcaklıkta ve pH 6,5’de 24 saat sonra yüksek oranda amilaz aktivitesi gösterdiğini belirlemişlerdir. Amilaz üretimi için en iyi azot ve karbon kaynağı olarak pepton ve nişasta belirlenmiştir. Saflaştırılmış enzimin en yüksek aktivite gösterdiği metal iyonlarının K^+ ve Mg^{++} olduğu ve bu iki iyon dışındaki diğer iyonlarda aktivite göstermediği belirtilmiştir. Enzimin stabil ve en aktif olduğu pH değeri 6,5, optimum sıcaklık gösterdiği değer ise 90°C ve 100°C olarak bulunmuştur. Tüm bu sonuçlar ışığında kolon kullanılarak saflaştırılan amilazın özelliklerine bakılarak nişastayı hidroliz etmek için üstün özelliklere sahip olduğu ortaya konulmuştur.

Gagaoua *et al.* (2014), yaptıkları çalışmada TPP tekniğini kullanılarak ficin enzimi pH 7,0’da, kültür sıvısı:t-bütanol oranı 1,0:0,75 ve %40’lık amonyum sülfat oranında %167 geri kazanım ile 6,04 kat saflaştırılmıştır. Enzimin ara fazda toplandığı belirlenmiştir. Yapılan bu çalışma sonunda üçlü faz ayırma tekniği olan TPP’nin ficinin saflaştırılması için hızlı, ekonomik ve basit bir teknik olduğu aynı zamanda bu parametreler ışığında gıda sanayisinde başarılı bir teknik olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Avhad *et al.* (2014), yaptıkları çalışmada *Bacillus sphaericus* MTCC 3672 suşundan fibrinolitik bir enzimin ultrasonik destekli üçlü faz ayırma (UATPP) tekniği kullanılarak saflaştırılmasını amaçlamışlardır. Fibrinolitik enzimin üçlü faz bölümlenmesini pH, sıcaklık, besiyerindeki t-bütanol oranı ve amonyum sülfat doygunluğu, ultrason gücü, frekansı ve kullanım oranı gibi çeşitli parametreleri kullanarak incelemiş ve 16,15 kat %65 geri kazanım oranıyla saflaştırıldığını bildirmişlerdir.

Fischer *et al.* (2013), yaptıkları çalışmada yeni bir teknik sunarak proteinlerin saflaştırılmasını amaçlamışlardır. Bu sistemin manyetik nanopartiküllerin kullanıldığı 25°C sıcaklık ile faz ayırmasına uğrayan sulu ikili fazlı sistem olduğunu ve bu sistem kullanılarak farklı boyutlardaki nanopartiküllerle yüksek verim elde edilebileceği belirtmişlerdir. Bu sistemi kullanarak *Escherichia coli* periplazmasının bir antikor parçası olan A33 Fab’ın manyetik ekstraksiyon yolu ile saflaştırılması gerçekleştirilmiştir ve sistemdeki en önemli başarı olarak kullanılan nanopartiküllerin işlemden kaybının çok az olmasını ve tekrar tekrar kullanılabilme yeteneği olduğunu belirtmişlerdir.

Abdel-Fattah *et al.* (2013) yaptıkları çalışmada *B. licheniformis* AI20 izolatını kullanarak α -amilazı çeşitli kromatografik teknikler kullanarak saflaştırmışlardır. Box-Behnken tasarımının kullanıldığı yanıt yüzey metodolojisi (RSM) modeli kullanarak değişkenler arasındaki en iyi koşulları belirlemişlerdir. %1,0 nişasta, %0,75 maya özütü ve %0,02 CaCl_2 'nin kullanıldığı besi ortamını enzim için en iyi ortam olarak belirlemişlerdir. α -Amilazın aktivitesi 384 U/mL/dk olarak tespit edilmiştir. Enzimin tahmini moleküler ağırlığını 55 kDa, optimum sıcaklığı 60-80°C ve pH'ı 6,0-7,5 olarak belirlemişlerdir. Saflaştırılan enzimin K_m değerini 0,709 mg/mL ve V_{max} değerini 454 mU/mg olarak hesaplamışlardır. Çeşitli çözücülere karşı α -amilazın yüksek stabilite gösterdiğini belirtmişlerdir. Ortama eklenen deterjan, sodyum dodesil sülfat (SDS), EDTA ve EGTA gibi maddelerin enzim aktivitesi üzerinde inhibe edici etki gösterdiği belirlenmiştir. Bunlara ek olarak 0,1 mM konsantrasyona sahip iki değerlikli çeşitli metal iyonlarına karşı enzimin yüksek aktivite gösterdiği ancak 10 mM konsantrasyonda kullanılan Cu^{2+} 'nin aktiviteyi %25 oranında ve Zn^{2+} iyonlarının ise aktiviteyi %55 oranında azalttığı belirlenmiştir.

Bano *et al.* (2011) çalışmalarında ultrafiltrasyon, amonyum sülfat çökeltmesi ve jel filtrasyon kromatografisi tekniklerini kullanarak *Bacillus subtilis* KIBGE HAS'tan α -amilazı saflaştırmışlardır. Enzimin 96,3 kat saflaştırıldığı ortaya konmuştur. SDS-PAGE tekniği kullanılarak saflaştırılan amilazın molekül ağırlığı 56 kDa olarak bulunmuştur. α -Amilaz için K_m ve V_{max} değerleri hesaplanmış, K_m değeri 2,68 mg/ml ve V_{max} değeri ise 1773 U/mL olarak bulunmuştur. 50°C pH'ı 7,5 olan 0,1 M fosfat tamponunda enzim için optimum aktivite gözlenmiştir. Elde edilen veriler sonucunda *Bacillus subtilis* KIBGE HAS'tan elde edilmiş olan α -amilazın aynı türden elde edilen α -amilaz ile benzerlik göstermediği belirtilmiştir.

Mahdavi *et al.* (2010) tarafından yapılan çalışmada, α -amilaz DEAE-Sepharose kolonu ve sıvı kromatografisi teknikleri kullanılarak saflaştırılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda saflaştırılan α -amilaz için uygun koşullar belirlenmiştir. Enzimin çok geniş bir sıcaklık aralığında (10-70°C) yüksek aktiviteye sahip olduğu ve optimum sıcaklığın 50°C olduğu tespit edilmiştir. Enzimin en yüksek aktiviteyi pH 6,0'da gösterdiği ve aktivitesinin pH 8,0'de %75'inin pH 9,0'da ise %50'sinin korunduğu belirlenmiştir. Yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucunda Zn^{2+} , Ni^{2+} ve EDTA varlığında inhibe edildiği gösterilmiştir. Saflaştırılan α -amilazın nişasta hidrolizinde kullanıldığı, maltoz ve maltopentoz gibi çeşitli ana ürünler oluşturduğu tespit edilmiştir.

Demirkan (2010) yaptığı çalışmada *B. subtilis* ve mutantlarından elde edilen α -amilaz amonyum sülfat çökeltmesi, kolon kromatografisi, ultrafiltrasyon ve diyaliz teknikleri kullanılarak saflaştırılmış ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bir dizi basamakla

saflaştırılan α -amilaz için pH değeri 6,0, optimum sıcaklık değeri ise 45°C olarak bulunmuştur. Mutant suştan elde edilen amilaz alkali koşullar altında ana suştan elde edilen amilazdan daha stabil olduğu gözlemlenmiştir. İki amilaz içinde K_m ve V_{max} değerleri karşılaştırılmıştır. Enzimler Ca^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , Li^{2+} ve Mn^{2+} iyonları varlığında yüksek aktivite gösterdiği fakat Cu^{2+} , Hg^{2+} ve Ag^{2+} iyonları varlığında ise güçlü şekilde inhibe edildiği gözlemlenmiştir. 1 mM ve 5 mM konsantrasyonlarda metal iyonları ile deneyler yapılmış, 1 mM konsantrasyonda uygulanan metal iyonlarının gösterdiği etkinin 5 mM konsantrasyondan daha büyük olduğu belirtilmiştir. Saflaştırılmış amilazın tahmini molekül ağırlığı 56 kDa olarak bildirilmiştir. Her iki suştan üretilen amilazın amino asit sekanslarının homoloji gösterdiği belirtilmiştir.

Liu & Xu (2007), çalışmalarında yeni bir tür olan *Bacillus sp.* YX-1'den amilazın saflaştırmasını ve karakterizasyon çalışmalarını yapmışlardır. 45°C'de 44 saatlik inkübasyon sonucunda maksimum aktiviteyi elde etmişlerdir. Amilazın saflaştırılması amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişimi ve jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve yapılan SDS-PAGE sonucu molekül ağırlığı 56 kDa olarak bulunmuştur. Enzimin pH 4,5-11,0 aralığında aktivitesinin sabit olduğu, maksimum aktiviteyi gösterdiği değer pH 5,0 ve optimum sıcaklık değeri 40-50°C olarak bulunmuştur. %20'lik konsantrasyonlarda kullanılan çeşitli nişastalara karşı sindirme gücünün kuvvetli olduğu bulunmuştur. Amino asit dizisinin analizi yapılarak kullanılan enzimin yeni bir α -amilaz olduğu belirlenmiştir.

Tezin Amacı

Son yirmi yılda moleküler biyolojideki gelişmeler nedeniyle proteinlere ve enzimlere yönelik artan talep, bu makromoleküllerin üretim proseslerinde ekonomik, ölçeklenebilir ve tutarlı tekniklerin de geliştirilmesine yönelik araştırmalara olan ilginin artmasına yol açmıştır. Bu amaç doğrultusunda son yıllarda, kromatografik biyoseparasyon tekniklerine alternatif olarak TPP gibi ham ekstraktta direkt uygulanabilen, yüksek verimli, hızlı ve maliyeti düşük non-kromatografik yöntemler geliştirilmiştir. Bununla birlikte, TPP tekniği hala nispeten yeni bir yöntemdir. Bu nedenle, ayırma sürecini geliştirmek için harici yaklaşımları TPP'ye dahil etme olasılığının çok umut verici olduğu literatürde vurgulanmaktadır. Enzimlerin ekstraksiyon verimini ve saflaştırma oranını artırmak amacıyla modifiye edilmiş birkaç TPP varyantı geliştirilmiştir. Bu varyantlar, ultrasonik destekli TPP, mikrodalga destekli TPP, makro afinite ligand-kolaylaştırılmış TPP ve iyonik likit TPP'yi içermektedir. Bunun gibi yeni uygulamalarla modifiye edilmiş TPP araştırmalarının gelecekte sadece proteinlerin değil, diğer biyomoleküllerin ayrılması ve saflaştırılmasında da TPP'nin gücünü artıracığı öngörülmektedir.

Bu tez çalışmasında, Nevşehir-Kozaklı kaplıcasından alınan sıcak su örneklerinden daha önce izolasyon ve identifikasyonu yapılan termofilik *B. licheniformis* SO5 bakterisinden α -amilazın TPP'nin farklı bir modifikasyonu ile ilk kez bu çalışmada gerçekleştirilen manyetik alan destekli TPP (MFTPP) ile kısmi olarak saflaştırılması, karakterizasyonu ve enzim preparasyonunun ekmek yapım sürecindeki performansının araştırılması hedeflenmiştir.



MATERYAL VE METOT

Materyal

Kullanılan organizma

Tez çalışması kapsamında Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU danışmanlığında Sultan ÖLMEZ tarafından hazırlanan Yüksek Lisans tezi kapsamında izolasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirilen bakteriler kullanılmıştır (Ölmez, 2017).

Tez çalışmasında kullanılan cihaz ve ekipmanlar

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar aşağıda Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 2. Tez Çalışmasında Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar

Cihazlar
Steril Kabin (Telstar Bio-II-A)
Etüv (Redline by-BINDER)
UV-Spektrofotometre (Beckman Coulter DU 730)
Santrifüj Cihazı (Hettich Zentrifugen Mikro)
Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı (Heidolph)
Buzdolabı (+4/-20°C) (Vestel)
Dondurucu (-80°C) (Glacier Ultralow Freezer)
pH Metre (Mettler Toledo FiveEasy Plus)
Çalkalamalı İnkübatör (Zhicheng)
Hassas Terazı (Ohaus Pioneer)
Isı Bloğu (LAB-LINE)
Otoklav (Hmc Hiramaya)
Kuvarz Küvetler (Merck)
Kar Makinesi (Angelantoni)
Otomatik Mikropipet Takımı (Thermo Scientific ve Eppendorf)
Saf Su Cihazı (Mp Minipure)
Su Banyosu (Memmert)
Vortex (Fisons WhirliMixer)
Alüminyum Folyo (Parex)
Parafilm (Isolab)
Falkon Tüpler (Eppendorf)
MSI Automation Hyper-5 cihazı

Tez çalışmasında kullanılan kimyasal malzemeler

Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar Tablo 3’de gösterilmiştir.

Tablo 3. Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasallar

Kimyasallar
Etil Alkol (Sigma)
Lügol (Sigma)
İzopropanol (Sigma)
Magnezyum Klorür ($MgCl_2$) (İnvitrogen)
Sodyum Hidroksit ($NaOH$) (Sigma)
Potasyum Fosfat (Sigma)
Sodyum Potasyum Tartarat (Sigma)
TSA (Lab M)
TSB (Lab M)
Starch From Patato (Sigma)
Starch Wheat (Sigma)
Tris-HCl (Sigma)
Fosforik Asit (Sigma)
Coomassie Brilliant Blue G-250 (Fluka)
Hidroklorik Asit (HCl) (Sigma)
Dinitrosalisilikasit (Sigma)

Tez Çalışmasında Kullanılan Çözeltilerin ve Besiyerlerinin Hazırlanışı

Lügol Çözeltisi: 1 g iyot ve 2 g KCl tartıldıktan sonra son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

%70’lik EtOH: 70 mL etil alkole 30 mL saf su ilave edilerek son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

Enzim aktivite tayininde kullanılan çözelti ve tamponlar

Dinitrosalisilik Asit (DNS) Çözeltisi: 1 g DNS ve 30 g potasyum sodyum tartarat 70 mL distile su içinde çözüldü. Ayrı bir beher içerisinde 1,6 g NaOH 20 mL distile suda çözüldü ve bu karışım DNS içeren solüsyona ilave edilerek hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

Sodyum Fosfat Tamponu (Aktivite Tamponu) (50 mM): 0,6 g sodyum fosfat (NaH_2PO_4) tartıldı ve 90 mL damıtılmış su içinde çözüldü. pH'sı 6,0'a ayarlandı. Hacim 100 mL'ye getirildi ve 4°C'de saklandı.

Substrat Çözeltisi: 2 g nişasta toplam hacim 100 mL olacak şekilde hazırlanan aktivite tamponunun içerisinde çözüldü.

Protein analizinde kullanılan çözelti ve tamponlar

Bradford Çözeltisi: 50 mL %95'lik etanol içerisine 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 tartılarak çözdürüldü. Bu çözeltiye 100 mL %95'lik fosforik asit ilave edildi ve çözeltinin hacmi distile su ile 1 litreye tamamlandı. Işıktan korumak için alüminyum folyoya sarıldı ve oda sıcaklığında saklandı.

Standart Serum Albumin Çözeltisi: 1 mL distile su içerisinde 1 mg standart serum albümin çözülerek hazırlandı.

Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez işleminde kullanılan çözelti ve tamponlar

1 M Tris-HCl (pH 8,8): 90 mL saf suda 27,23 g Tris çözüldü ve pH 8,8'e ayarlandı. Son hacim 150 mL'ye tamamlandı.

1 M Tris-HCl (pH 6,8): 90 mL saf suda 6 g Tris çözüldü ve pH 6,8'e ayarlandı. Son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

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

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

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

Yürütme Tamponu (10X SDS-PAGE): 3 g Tris, 14,4 g glisin ve 10 mL ve 10 mL %10'luk SDS karıştırıldı ve son hacim 1 L'ye tamamlandı.

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

%10'luk SDS: 4,5 mL saf su içerisinde 1 g SDS çözüldü ve son hacim 10 mL'ye tamamlandı.

%10'luk PER: 4,5 mL saf su içerisinde 1 g amonyum persülfat çözüldü ve son hacim 10 mL'ye tamamlandı.

Gümüş boyamada kullanılan çözeltiler

Tespit Çözeltisi: 30 mL %90'lık etanol ile 60 mL distile su ve 10 mL asetik asit karıştırıldı.

Redüksiyon Çözeltisi: 45 mL etanol, 4,8 g sodyum asetat ve 80 mL distile su ile karıştırılı ve CH_3COOH ile pH 6,0'a ayarlandı. Üzerine 150 mg sodyumtiyosülfat ve 3 mL gluteraldehit eklendi.

Gümüş Nitrat Çözeltisi: 150 mL saf su, 150 mg AgNO_3 ve 3 μL formaldehit karıştırılarak boyamadan hemen önce hazırlandı.

Yıkama Çözeltisi 1: 270 mL saf su, 3,75 g Na_2CO_3 ve 120 μL formaldehit karıştırılarak hazırlandı.

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

Karakterizasyon çalışmasında kullanılan tamponlar

Glisin-NaOH Tamponu (50 mM): 0,375 g glisin 90 mL distile suda çözüldü. pH HCl veya NaOH kullanılarak istenilen değere ayarlandı. Son hacim 100 mL olacak şekilde saf su ile tamamlandı.

Tris-HCl Tamponu (50 mM): 0,605 g Tris 90 mL distile suda çözüldü. pH istenen değere ayarlandıktan sonra son hacim 100 mL olacak şekilde saf su ile tamamlandı.

Sodyum Fosfat Tamponu (50 mM): 0,575 g sodyum fosfat 90 mL distile suda çözüldü. pH istenen değere ayarlandıktan sonra son hacim 100 mL olacak şekilde saf su ile tamamlandı.

Sodyum Asetat Tamponu (50 mM): 0,2 g sodyum asetat 48 mL saf suda çözüldü. pH istenen değere ayarlandıktan sonra son hacim 50 mL olacak şekilde saf su ile tamamlandı.

Yöntem

Amilazı üreten bakterilerin katı besiyerinde belirlenmesi ve seçimi

Amilazı üreten bakteri izolatlarını seçmek için, bakteri suşları TSA ortamına çizgi ekim tekniği ile ekildi ve bir gece boyunca 55 °C'de inkübe edildi. Büyüyen saf koloniler bir öze ile toplandı, nutrient agar ve patates nişastası içeren besiyerine çizgi ekim tekniği ile ekildi. Gece boyunca 55°C'de inkübe edilen izolatlar tarafından üretilen hücre dışı amilazın petri kaplarında ham nişastayı parçaladığı tahmin edildi. Besiyerlerine damlatılan lügol çözeltisinin kolonilerin çevresinde saydam zonlar oluşturduğu gözlemlendi. Koloninin çevresinde oluşan bölgenin çapı

ölçülerek en yüksek enzim üreten bakteri suşu belirlendi ve daha sonra yapılan bütün çalışmalarda seçilen bakteri suşu kullanıldı.

Sıvı amilaz üretim besiyerine bakteri inokülasyonu

TSA katı besiyerine ekilen *B. licheniformis* SO5 suşu 55°C'ye ayarlanmış inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra SO5 suşu TSB sıvı besiyerine alındı. Sıvı besiyerine alınan suş 24 saat 55°C çalkalamalı inkübatöre üremesi için bırakıldı. 24 saat sıvı besiyerinde büyümüş olan bakterilerin hücre miktarını belirlemek için spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. Çıkan sonuca göre 1/OD hesabı yapılarak hesaplanan değer kadar 100 mL üretim besiyerine inoküle edildi.

α -Amilaz enzim aktivitesinin belirlenmesi

Enzim aktivitesi, α -amilaz ile nişastanın etkileşimi sonucu açığa çıkan indirgen şeker miktarındaki artışın belirlenmesi esasına dayanan 3,5-dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemi kullanılarak belirlendi (Bernfeld, 1955; Miller, 1959). Aktivite tayini aşağıdaki prosedüre göre gerçekleştirildi:

- ❖ 500 μ l enzim çözeltisi üzerine 500 μ l substrat çözeltisi (%2'lik çözünür buğday nişastası) eklenerek 3 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- ❖ Daha sonra reaksiyon karışımına 500 μ l DNS çözeltisi eklendi ve 5 dk 90°C' de bekletildi.
- ❖ Oda sıcaklığına getirilen örnekler için spektrofotometrede aynı koşullar altında hazırlanan köre karşı 540 nm' de absorbands ölçüldü.

Bir ünite (U) enzim aktivitesi, 1 dk'da 1 μ M glukoz açığa çıkaran enzim miktarı olarak ifade edildi. Bu hesaplama glukoz standart grafiğinden elde edilen doğrunun denklemi kullanılarak yapıldı.

Glukoz standart grafiği

Enzimatik reaksiyon sonucu açığa çıkan indirgen şeker miktarını belirlemek amacıyla glukoz standart grafiği oluşturuldu. Bunun için, 0,673 mg/mL konsantrasyonda stok glukoz çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan çözeltilerden Tablo 4'te gösterildiği gibi farklı oranlarda seyreltmeler yapılarak bu glukoz çözeltileri için DNS metodu ile spektrofotometrik olarak ölçüm yapıldı. Absorbans değerlerine karşı konsantrasyon grafiği çizildi. Elde edilen doğru denkleminde yararlanılarak enzim aktiviteleri hesaplandı.

Tablo 4. Standart Glukoz Çözeltilerinin Hazırlanması

	Kör	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Glukoz (0,673 mg/mL)	-	100 µl	200 µl	300 µl	400 µl	500 µl	600 µl	700 µl	800 µl	900 µl	1000 µl
dH ₂ O	1000 µl	900 µl	800 µl	700 µl	600 µl	500 µl	400 µl	300 µl	200 µl	100 µl	-

Bradford metodu ile protein tayini

Saflaştırmanın her aşamasında, proteinin kantitatif tayini için Bradford yöntemi kullanıldı (Bradford, 1976). Protein miktarını belirleyebilmek amacıyla öncelikle standart grafik hazırlandı. Hazırlanan 1 mg/mL BSA çözeltisinden tüplere 10-100 µl olacak şekilde eklendi ve distile su kullanılarak son hacim 100 µl'ye tamamlandı. Tüplerin üzerine 4900 µl Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisinden eklendi. Oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildikten sonra spektrofotometrede 595 nm'de absorbans ölçümü yapıldı. Absorbans değerlerine karşı µg protein grafiği çizildi. Protein tayini yapılan örnekler için aynı şekilde 0,1 mL enzim çözeltisi üzerine 4,9 mL boya çözeltisi eklenerek 10 dk inkübasyondan sonra 595 nm'de absorbans değeri okundu. Standart grafiğinin doğru denkleminde yararlanılarak protein miktarları belirlendi.

α-Amilazın saflaştırılması

α-Amilazın kısmi saflaştırılmasının gerçekleştirilmesi amacıyla ilk olarak; *B. licheniformis* SO5 bakterisinin optimizasyon koşullarına uygun olarak hazırlanan besiyerinde inkübasyonu sonrası elde edilen enzimi içeren kültür 6000 rpm' de 20 dk santrifüj edildi ve süpernatat kısmı alındı. Elde edilen kültür sıvısı saflaştırma için tüm deneylerde enzim kaynağı olarak kullanıldı.

Bu tez çalışması kapsamında, α-amilazın tek adımda kısmi olarak saflaştırılması, MFTPP yöntemiyle gerçekleştirildi. Bu amaç doğrultusunda ilk olarak klasik TPP yöntemi uygulandı ve optimizasyon çalışmaları yapıldı. TPP yöntemi, kültür sıvısına önce uygun tuz, ardından uygun organik çözügen eklendikten sonra belirli bir süre inkübasyona bırakılarak üç faz oluşması esasına dayanır. α-Amilazın saflaştırılmasında uygulanan TPP sisteminde, literatürde yaygın olarak tercih edilen organik çözücü olarak t-bütanol, tuz olarak etkin kozmotropik bir ajan olan amonyum sülfat kullanıldı.

Üçlü Faz Ayırma (TPP)**Tuz doygunluğu ve kültür sıvısı:t-bütanol oranının etkisinin incelenmesi**

TPP ile kısmi saflaştırmada en iyi verim ve saflaştırma oranını elde etmek amacıyla ilk olarak ortama eklenen tuz ve t-bütanol miktarı optimize edildi. Bu işlem için aşağıda verilen

formüle göre hesaplanan %20, %30, %40, %50, %60, %70, %80 oranlarında olacak şekilde 7 farklı tuz oranı ve kültür sıvısı:t-bütanol oranı 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0 olacak şekilde 4 farklı alkol oranı uygulanarak denemeler yapıldı. Her denemede oda koşullarında 1 saat inkübasyon ve sonra 5 dk 5500 rpm'de santrifüj yapıldı. Oluşan üç fazın üst fazında bulunan organik çözücü tekrar kullanılmak üzere, alt ve üst faz ise protein ve aktivite tayini yapmak için pipet yardımıyla toplandı. Elde edilen sonuçlar ile saflaştırma katsayısına karşı % verim grafiği oluşturuldu ve oluşan grafiğe bakılarak en iyi tuz yüzdesi ve organik çözücü miktarı belirlendi (Alçiçek, 2017).

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

V: Enzim çözeltisinin hacmi

S₁: 1'in kesri olarak çözeltide bulunan amonyum sülfat doygunluğu

S₂: 1'in kesri olarak istenen amonyum sülfat doygunluğu

pH etkisinin incelenmesi

TPP yönteminde uygun olan tuz ve organik çözücü miktarı belirlendikten sonra uygun pH oranını belirleyebilmek için farklı pH oranlarında deneyler tekrarlandı. Kültür sıvısından 2 mL alınıp %30 oranında tuz eklendi. Kültür sıvısı ve tuz 1 dk vorteksenerek karışması sağlandı. Tamamen karışım sağlandıktan sonra sistemin pH'ı sırasıyla pH 3,0-12,0'a ayarlandı. pH'ı ayarlanan karışıma 1,0:1,5 oranında alkol eklendi ve bütün deney düzenekleri oda sıcaklığında 60 dakika bekletildi. Süre sonunda 6000 rpm'de 5-6 dakika santrifüj yapıldıktan sonra alınan alt faza aktivite ve protein tayini yapıldı. Çıkan sonuçlara göre % verim grafiği oluşturuldu ve grafiğe bakılarak uygun pH değeri belirlendi.

Sıcaklık etkisinin incelenmesi

TPP yönteminde uygun tuz, organik çözücü miktarı ve pH belirlendikten sonra uygun sıcaklık değerini belirleyebilmek için farklı sıcaklık aralıklarında optimizasyon yapıldı. 2 mL kültür sıvısı üzerine %30 oranında tuz eklendi. 1 dk vorteks yapılarak karışım sağlandıktan sonra belirlenen pH'a ayarlama yapıldı. Karışımın üzerine 1,0:1,5 oranında alkol eklendi ve farklı sıcaklıklarda (30-60°C) 60 dk inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda 5-6 dakika 6000 rpm'de santrifüj yapıldı. Santrifüj sonunda alt faza aktivite ve protein tayini yapıldı. Çıkan sonuçlara göre % verim grafiği oluşturuldu ve grafiğe bakılarak uygun sıcaklık belirlendi.

Manyetik Alan Destekli Üçlü Faz Ayırma (MFTPP)

MFTPP, Salvi & Yadav (2020) tarafından uygulanan mikrodalga destekli TPP tekniği modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. MFTPP, MSI Automation Hyper-5 cihazı kullanılarak gerçekleştirildi (Şekil 4). Tüm reaksiyonlar TPP’de kullanılan amonyum sülfat doygunluğu, kültür sıvısı:t-bütanol oranı ve pH kullanılarak gerçekleştirildi. 4 mL kültür sıvısı üzerine 0,656 g (%30 w/v) amonyum sülfat eklenerek karıştırıldı ve üzerine 6 mL t-bütanol ilave edildi. Kurulan sistem belirli bir süre manyetik alana maruz bırakıldı. Üç tabaka oluştuğundan sonra ara faz ve alt sulu faz ayrılarak her iki faz içinde enzim aktivitesi ve protein tayini yapıldı. Sistemin başarısı test edildikten sonra optimum şartları belirlemek için manyetik alan uygulama süresi (2-10 dk), görev döngüsü (%30, 50, 70, 90, 100) ve güç (40-100 W) parametreleri ile bir dizi deney düzeneği kuruldu ve sistem için optimum şartlar belirlendi (Salvi & Yadav, 2020).



Şekil 4. MSI Automation Hyper-5 cihazı

SDS-PAGE İle Molekül Ağırlığının Belirlenmesi

Başlangıç olarak alkol ve su kullanılarak elektroforez plakaları yıkandı. Aralarında uygun boşluk olacak şekilde plakalar sabitlendi. Hazırlanan ayırma jeli cam plakalara pipetlendi. Polimerleşen jelin düz ve pürüzsüz olması amacıyla üzerine 1 mL izo-propanol eklendi. Ayırma jeli polimerleştikten sonra eklenen izo-propanol bir peçete yardımı ile alınarak üzerine yığma jeli eklendi ve üzerine taraklar dikkatli bir şekilde yerleştirilerek polimerize olması için +4°C’de bekletildi.

10’ar µl numune tamponu üzerine TPP tekniği kullanılarak saflaştırılan alt faz, ara faz ve kültür sıvısından 30’ar µl eklenerek kısa süre vorteks uygulandı. Vortekslenen örnekler proteinin denatüre olması amacıyla 90°C’de 5 dk bekletildi. Örneklerden 15’er µl ve standart olarak seçilen markerdan 1,5 µl alınarak kuyulara yüklendi. Jel kasetlerinin yerleştirileceği tank 1X SDS-PAGE yürütme tamponu ile dolduruldu ve kasetler yerleştirildi. İlk olarak 250 voltta 5-10 dk yürüten jel ikinci aşamada 120 voltta 90 dk yürütüldü. Yürütme işlemi tamamlandıktan

sonra jel gümüş boyama tekniği kullanılarak boyandı. Bu işlem için jel sırasıyla tespit çözeltisi, redüksiyon çözeltisi, boyama çözeltisi ve tespit çözeltisiyle muamele edilerek görüntü alındı. İşlem sonrası jel üzerinde standar proteinlerin ve enzimin yürümüş oldukları mesafeler R_f değerini hesaplamak için ölçüldü. Hesaplanan R_f değerlerine karşı standart proteinlerin Log M_K değerleri ile bir grafik oluşturuldu ve oluşturulan grafik yardımıyla α -amilazın molekül kütlesi hesaplandı.

B. *licheniformis* SO5 Suşundan Elde Edilen α -Amilazın Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

α -Amilazın aktivitesi ve stabilitesi üzerine pH'ın etkisinin belirlenmesi

B. licheniformis SO5 suşundan saflaştırılan α -amilazın optimum pH'ını belirleyebilmek için 10 farklı pH aralığında (pH 3,0-pH 12,0) 4 farklı tampon (sodyum asetat, sodyum fosfat, Tris-HCl, Glisin-NaOH) ve bu tamponların %2'lik hazırlanmış nişasta çözeltileri kullanıldı. En yüksek aktivite gösteren pH değeri 100 olarak kabul edildi ve diğer değerler (%) bağıl aktivite olarak hesaplandı (Ölmez, 2017).

α -Amilazın stabil olduğu pH aralığını belirlemek için 50 mM sodyum asetat (pH 3,0-5,0), sodyum fosfat (pH 6,0-7,0), Tris-HCl (pH 8,0-9,0) ve Glisin-NaOH (pH 10,0-12,0) tamponları kullanıldı. Hazırlanan tampon çözeltilerinden 2 mL alındı ve 2 mL enzim ile muamele edilerek oda sıcaklığında belli aralıklarla (30-120 dk) bekletildi. İnkübasyon öncesi amilaz aktivite miktarı 100 olarak kabul edildi ve inkübasyon sonrası aktivite değerleri kalan aktivite yüzdesi olarak hesaplandı (Rüzgar, 2019).

α -Amilazın aktivitesi ve stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisinin belirlenmesi

Optimum sıcaklık belirlemesi yapmak için 10'ar derecelik aralıklar ile 10-90°C sıcaklıklarda aktivite ölçümleri yapıldı. Çıkan sonuçlar ile grafik oluşturuldu. En yüksek aktivite gösteren sıcaklık değeri 100 olarak kabul edildi ve diğer değerler (%) bağıl aktivite olarak hesaplandı.

α -Amilazın stabil sıcaklığının belirlenebilmesi için enzim çözeltisi 20°C'den 90°C'ye kadar 30-120 dk arasında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon öncesi amilaz aktivite miktarı 100 olarak kabul edildi ve inkübasyon sonrası aktivite değerleri kalan aktivite yüzdesi olarak hesaplandı.

Bazı metal iyonlarının α -amilazın aktivitesine etkisinin belirlenmesi

α -Amilazın aktivitesine bazı metal iyonlarının etkisini incelemek amacıyla Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} , Li^+ , K^+ iyonları 50 mM pH 7,0 sodyum fosfat tamponu içerisinde 1 mM

ve 10 mM konsantrasyonlarda hazırlandı. Hazırlanan metal iyon çözeltileri ve enzim 1:1 oranında muamele edildi ve oda sıcaklığında 30 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra aktivite tayin metodu ile aktivite ölçümü yapıldı. İçerisinde metal iyonu bulunmayan tampon ile enzim muamelesi kontrol olarak kullanıldı ve 100 olarak kabul edildi. Metal iyonları ile muamele edilen örneklerin aktivitesi kalan aktivite yüzdesi olarak hesaplandı (Malekabadi *et al.* 2018).

Bazı yüzey aktif maddelerin ve inhibitörün α -amilazın aktivitesine etkisinin belirlenmesi

α -Amilaza bazı kimyasalların etkisini belirlemek amacıyla %1 ve %5'lik konsantrasyonlarda Triton X-100, Tween 20, Tween 80, H₂O₂ ; 5 ve 10 mM'lık konsantrasyonlarda EDTA 50 mM pH 7,0 sodyum fosfat tamponu içerisinde 10 mL'lik olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan çözeltilerden 900 μ l alındı ve üzerine enzim çözeltisinden 200 μ l eklenerek 50°C 180 rpm'de 30 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda aktivite tayini yapıldı. Kontrol olarak kimyasal bulunmayan tampon ve enzim çözeltisi muamele edilip aynı koşullarda inkübasyona bırakıldı. Aktivitesi ölçülen kontrol 100 olarak kabul edildi ve diğer kimyasalların aktivitesi ise kontrole göre kalan aktivite yüzdesi olarak hesaplandı (Malekabadi *et al.* 2018).

Bazı organik çözücülerin amilazın α -aktivitesine etkisinin belirlenmesi

α -Amilazın aktivitesi üzerine kullanılan organik çözücülerin etkisini belirlemek amacıyla %10'luk ve %30'luk konsantrasyonlarda gliserol, etanol, izopropanol, aseton ve DMSO çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan çözeltilerden 500 μ l alınarak 500 μ l enzim çözeltisi ile karıştırıldı. 500 μ l tampon çözeltisi ve 500 μ l enzim çözeltisi ile muamele edildi ve kontrol olarak kullanıldı. Oluşan karışım 55°C'de 30 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra aktivite tayini yapıldı. Kontrolün enzim aktivitesi %100 olarak kabul edildi ve bu değere göre kalan aktivite yüzdesi hesaplandı (Ölmez, 2017).

Substrat spesifitesinin belirlenmesi

α -Amilazın substrat özgüllüğünü belirlemek amacıyla %2'lik konsantrasyonlarda amiloz, amilopektin, maltoz, maltodekstrin ve β -siklodekstrin çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan çözeltiler substrat olarak aktivite tayininde kullanıldı. Aktivitesi en yüksek substrat 100 olarak kabul edildi ve diğer değerler (%) bağlı aktivite olarak hesaplandı.

α -Amilazın kinetik parametrelerinin hesaplanması

α -Amilazın K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi amacıyla farklı konsantrasyonlarda (%0,5-%2,5) substrat çözeltileri hazırlandı ve aktivite tayini yapıldı. Sonuçlar belirlendikten sonra çizilen Lineweaver-Burk grafiğinden yararlanılarak K_m , V_{max} , K_{cat} ve katalitik etkinlik (K_{cat}/K_m) değerleri hesaplandı (Laemmli, 1970).

Saflaştırılan α -Amilazın Ekmek Kalitesini Artırmada Kullanımı

SO5 suşundan üretilen amilazın ekmek kalitesini artırma performansı kullanılan buğday unu ile ekmek yapım sürecinde test edildi. Enzim eklenmeden normal koşullarda üretilen ekmek kontrol olarak kullanıldı. 100 g buğday unu, 2 g tuz, 2 g ekmek mayası, 65 gr su ve 1 kg un başına 1,936 U saflaştırılmış enzim kullanıldı. Eklenen malzemeler 20 dk karıştırıldı. Hamur %75 bağlı nem ortamında 45 dk 35°C’de dinlendirildi. 70 g’lık bezelere ayrılan hamur bir kalıba koyuldu, 35 dk 35°C’deki fermantasyon kabininde mayalanması için bekletildi. 210°C’de 20 dk pişirildi. Aynı işlemler enzim eklenmeden yapıp kontrol olarak kullanıldı (Sahnoun *et al.* 2013; Ndangui *et al.* 2014).

Pişme işlemi geręekleştikten 1 saat sonra hacim ve yükseklik/genişlik belirlendi. Hacmi bilinen bir kaba yerleştirilen somun ekmeğin hacim kontrolü yapıldı. Hacmin ağırlığa bölünmesi ile ekmeğin özgül hacmi hesaplandı. Yükseklik/genişlik oranı ise ekmekten alınan kesitin bir tarayıcı yardımıyla taranması ile belirlendi (Ait Kaki El-Hadef El-Okki *et al.* 2017).

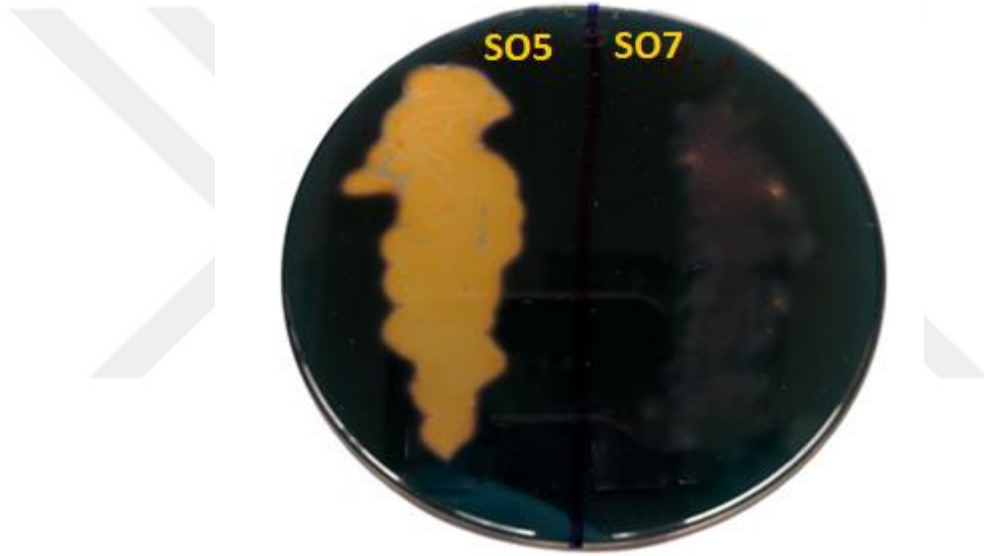
İstatistiksel Analiz

Tüm deneyler üç tekrar halinde yapıldı ($n = 3$). Üç bağımsız deney için ortalamalar, standart sapmalar ve değerler, ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak ifade edildi. GraphPad Prism ® yazılımı (versiyon 9.0, GraphPad Software, San Diego, CA) istatistik programı kullanıldı.

ARAşTIRMA BULGULARI

Katı Besiyerinde α -Amilaz Üreten Bakterilerin Belirlenmesi ve Seçimi

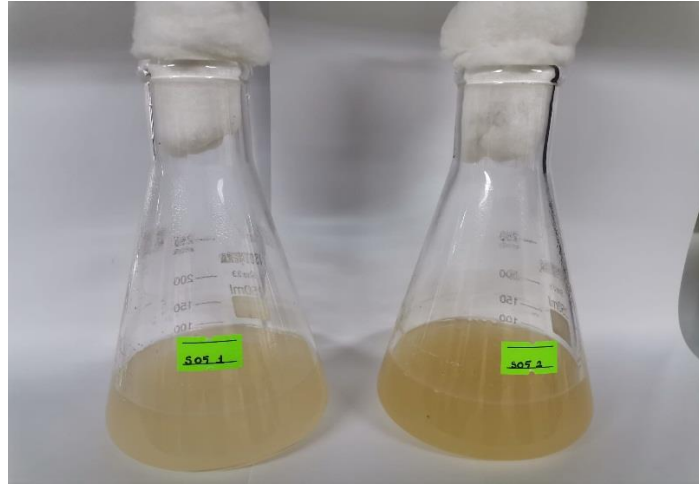
Stokta muhafaza edilen EA1-EA10 ve SO1-SO15 olmak üzere toplamda 25 adet bakteri izolatu nişasta içeren katı besiyerine çizgi ekim tekniğiyle ekildi. Ekilen bakteri izolatlarının 24 saat 55°C’de büyümesi gerçekleştikten sonra amilaz pozitif olan bakteri izolatlarının belirlenmesi amacıyla lügol çözeltisi ile muamale edildi. Lügol muamelesi sonucunda amilaz pozitif olan bakteri suşları etrafında şeffaf zon oluşumu gözlendi ve en uygun bakteri izolatının SO5 olduğuna karar verildi.



şekil 5. SO5 suşuna ait petri görüntüsü

Sıvı α -Amilaz Üretim Besiyerine Bakteri İnokülasyonu

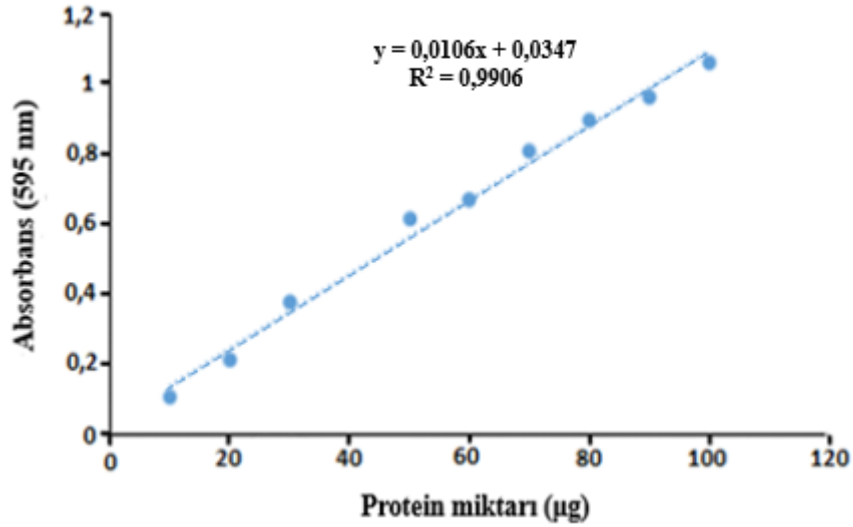
En yüksek α -amilaz aktivitesine sahip olan bakteri suşu seçimi yapıldıktan sonra nişasta içeren sıvı besiyerine ekim yapıldı. DNS metoduyla 24, 48, 72. saatlerde aktivite ölçümü yapıldı. *B. licheniformis* SO5 α -amilazın maksimum aktiviteyi 48. saatte gösterdiği belirlendi ve sonraki enzim çalışmaları için kullanıldı.



Şekil 6. Sıvı amilaz üretim besiyerine bakteri inokülasyonu

Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

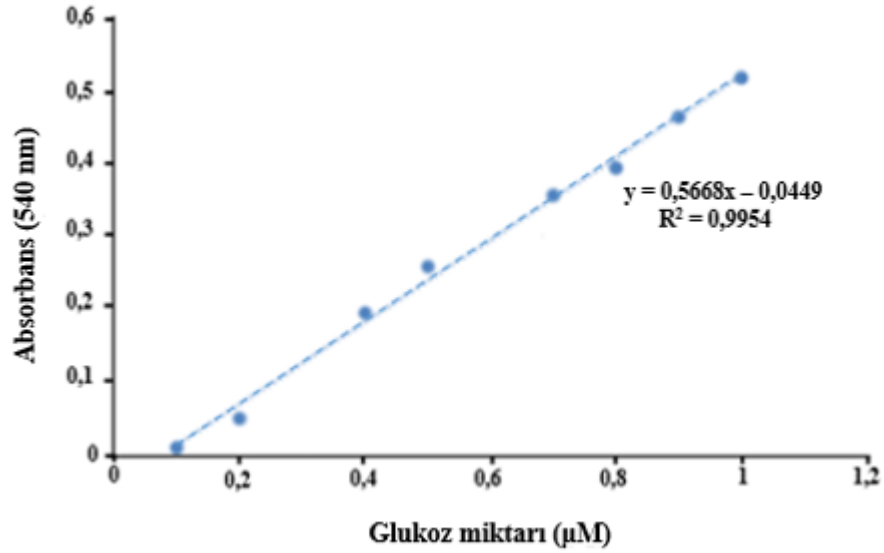
Kültür sıvısı ve TPP/MFTPP metodu kullanılarak kısmi saflaştırılan α -amilazın kantitatif protein tayini Bradford metodu kullanılarak gerçekleştirildi. Bunun için ilk olarak standart grafik hazırlandı ve enzim çözeltisindeki protein miktarı standart grafik kullanılarak belirlendi. Hazırlanan standart grafik Şekil 7’de gösterildi.



Şekil 7. Protein standart grafiği

Glukoz Standart Grafiği

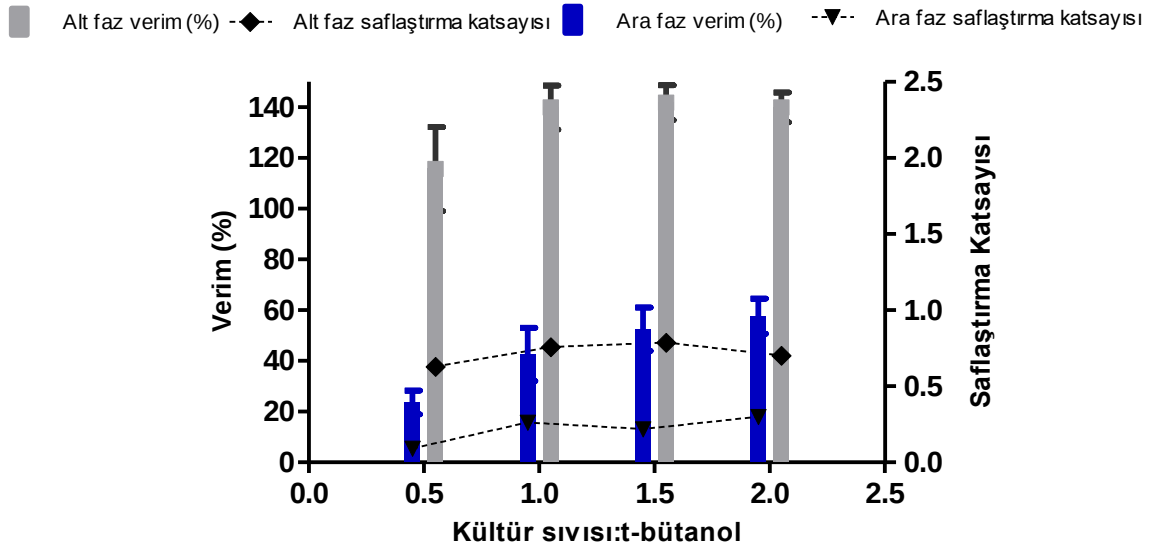
Glukoz standart grafiği 0,673 mg/mL konsantrasyonda stok glukoz çözeltisi kullanılarak hazırlandı. Enzim aktivitesinin hesaplanmasında kullanılmak üzere çıkan sonuçlara göre konsantrasyona karşı absorbans grafiği çizildi (Şekil 8).



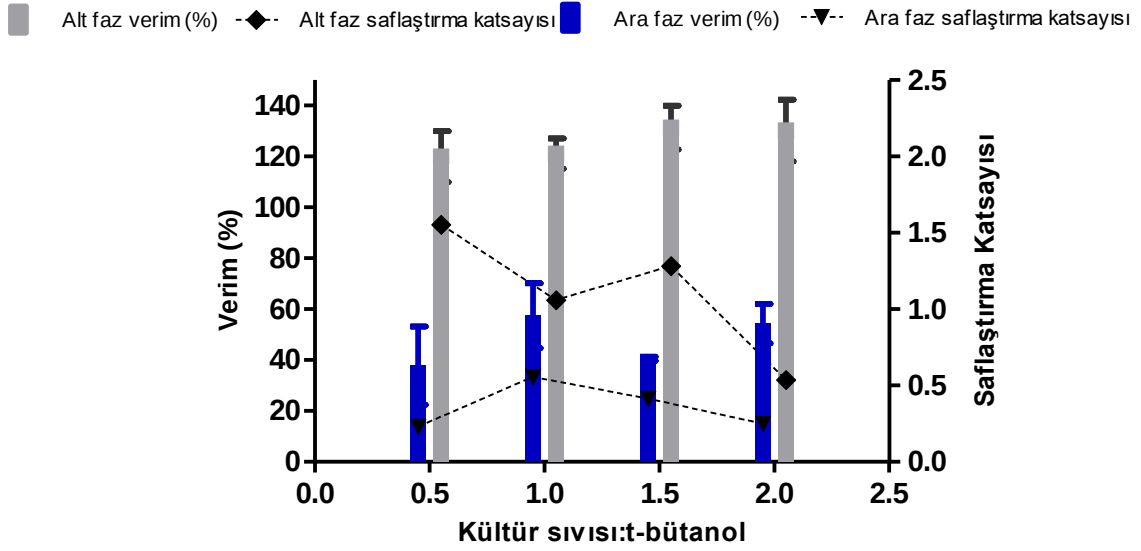
Şekil 8. Glukoz standart grafiği

α -Amilazın Üçlü Faz Ayırma (TPP) Tekniği İle Saflaştırılması

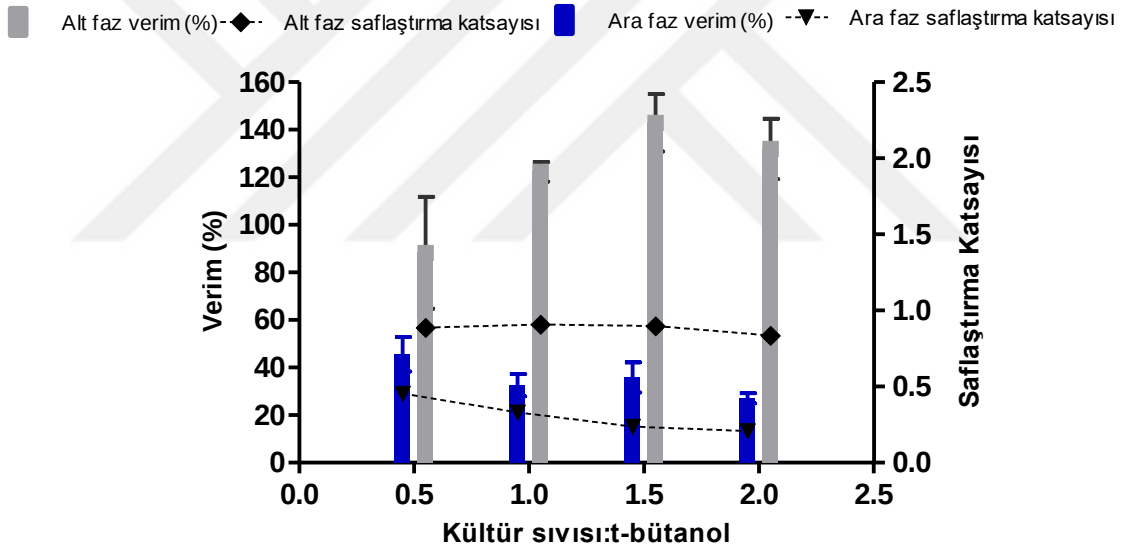
α -Amilazın klasik TPP işlemiyle saflaştırılmasında enzimin en yüksek verime ve saflaştırma katsayısına sahip olduğu uygun aralığı belirlemek amacıyla $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ doygunluğu ve kültür sıvısı:t-bütanol oranı gibi farklı proses parametrelerinin optimizasyonu yapıldı. Yapılan bu optimizasyon çalışmaları sonucunda, *B. licheniformis* SO5 suşundan α -amilaz TPP ile 2 mL kültür sıvısı (2,9 U/mL) için %30 tuz doygunluğunda, 1,0:1,5 alkol oranında ve 60 dk inkübasyon süresinde kısmi olarak alt fazda saflaştırıldığı belirlendi. Elde edilen sonuçlar Şekil 9-15'te gösterildi.



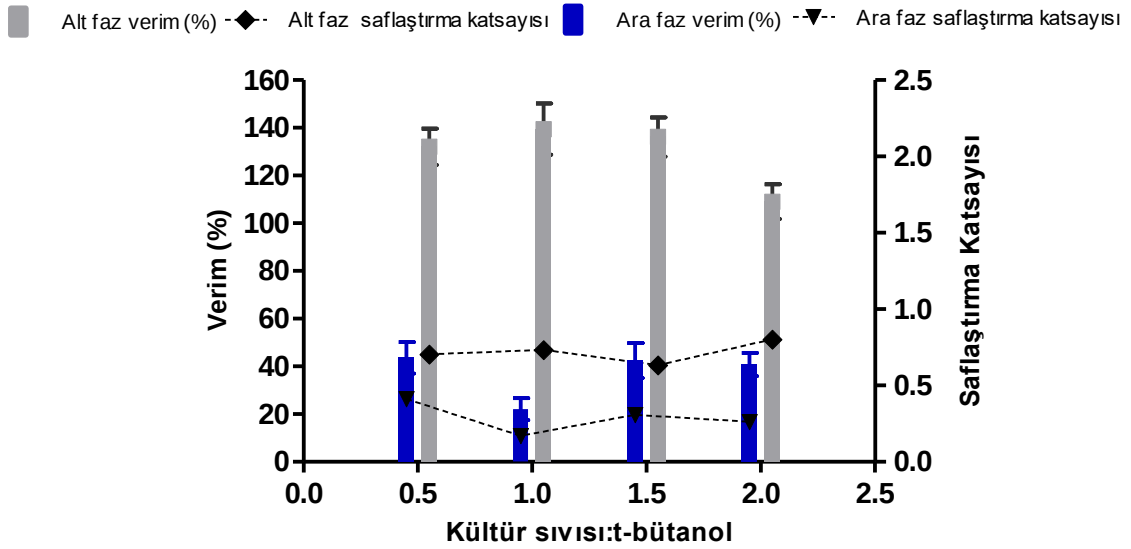
Şekil 9. TPP sistemine %20 amonyum sülfat doygunluğunda farklı t-bütanol oranının (kültür sıvısı:t-bütanol; 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) etkisi



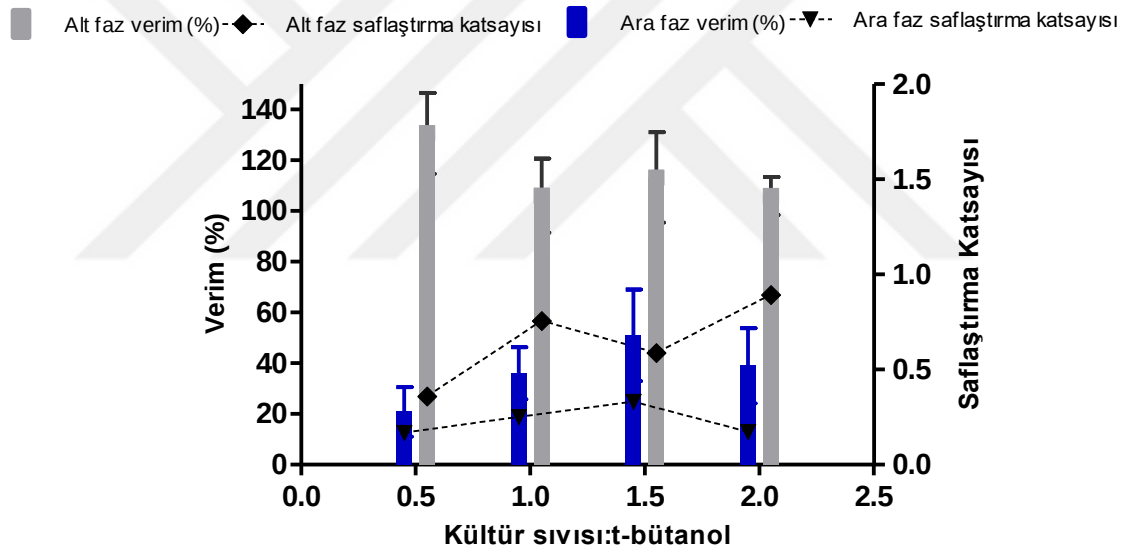
Şekil 10. TPP sistemine %30 amonyum sülfat doygunluğunda farklı t-bütanol oranının (kültür sıvısı:t-bütanol; 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) etkisi



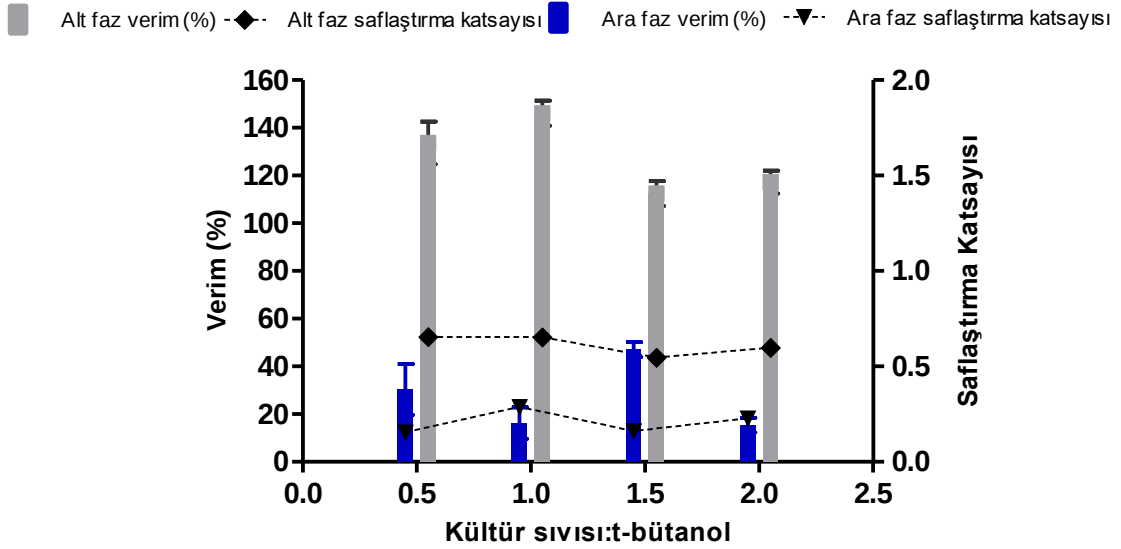
Şekil 11. TPP sistemine %40 amonyum sülfat doygunluğunda farklı t-bütanol oranının (kültür sıvısı:t-bütanol; 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) etkisi



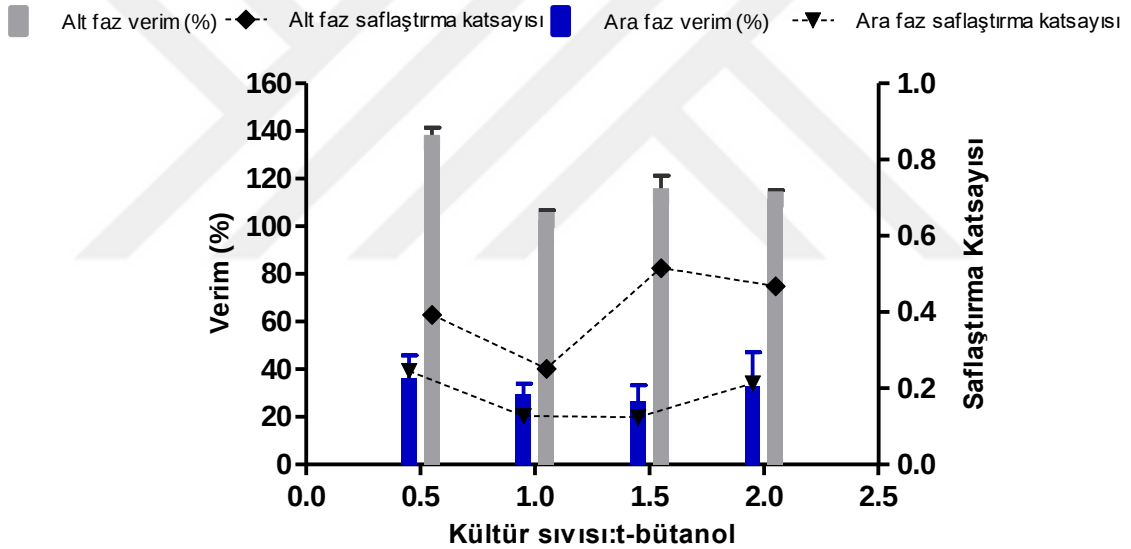
Şekil 12. TPP sistemine %50 amonyum sülfat doygunluğunda farklı t-bütanol oranının (kültür sıvısı:t-bütanol; 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) etkisi



Şekil 13. TPP sistemine %60 amonyum sülfat doygunluğunda farklı t-bütanol oranının (kültür sıvısı:t-bütanol; 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) etkisi



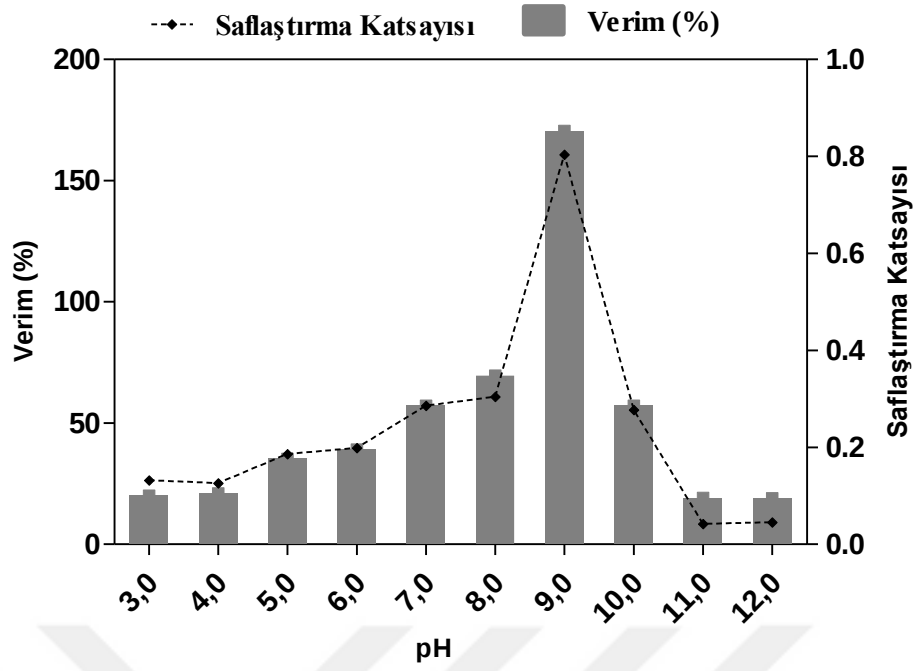
Şekil 14. TPP sistemine %70 amonyum sülfat doygunluğunda farklı t-bütanol oranının (kültür sıvısı:t-bütanol; 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) etkisi



Şekil 15. TPP sistemine %80 amonyum sülfat doygunluğunda farklı t-bütanol oranının (kültür sıvısı:t-bütanol; 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) etkisi

TPP sistemine pH etkisi

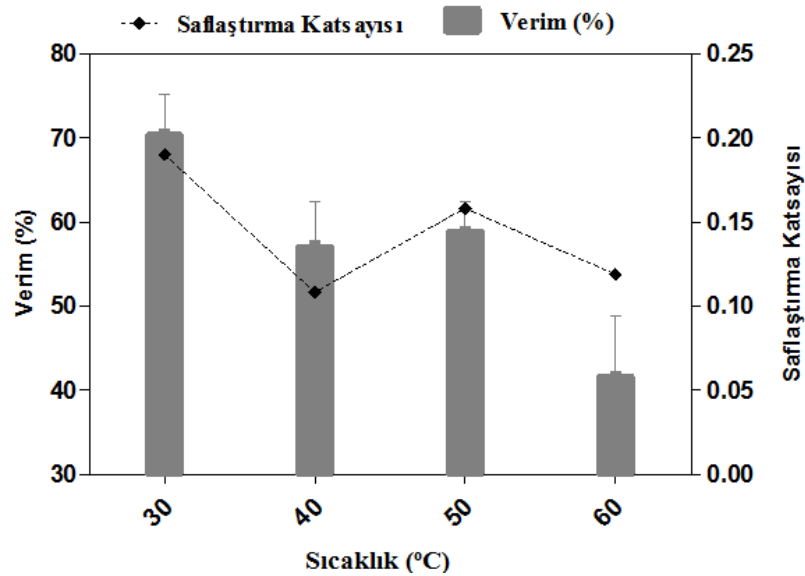
TPP sisteminde en uygun tuz doygunluğu ve alkol oranı belirlendikten sonra sistemin optimizasyonunu gerçekleştirmek amacıyla farklı değerlerde pH (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12) ayarlaması yapılarak 2 mL kültür sıvısı (1,93 U/mL) için işlemler tekrarlandı. Şekil 16'da elde edilen sonuçlara bakılarak en uygun değer olarak pH 9,0 belirlendi.



Şekil 16. TPP sistemine pH'ın etkisi

TPP sistemine sıcaklık etkisi

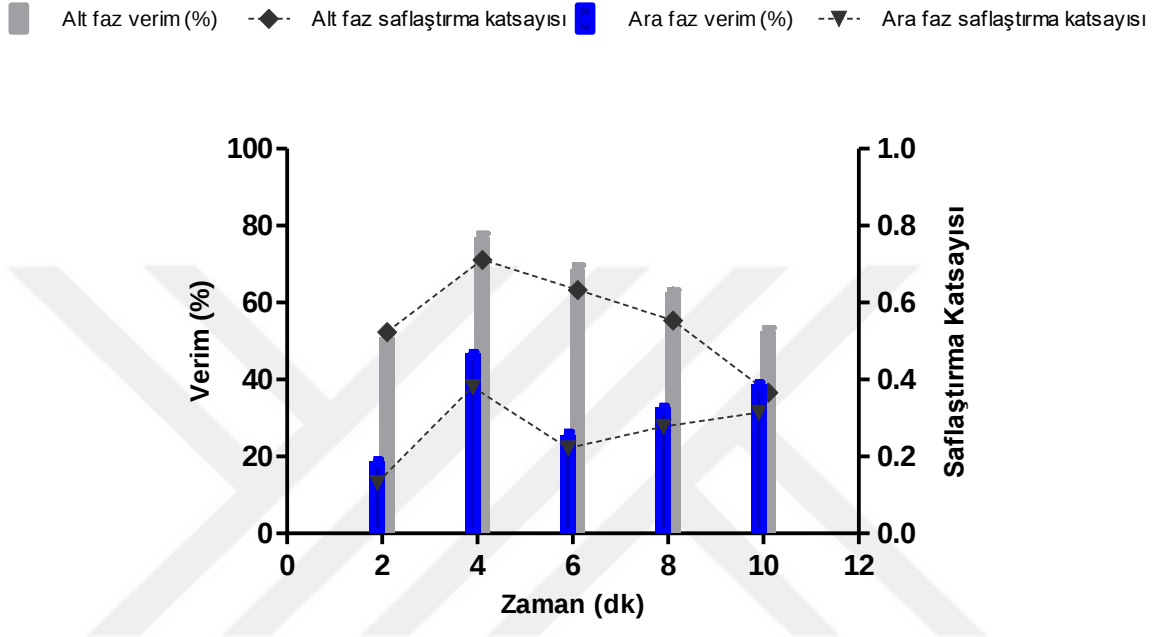
TPP sisteminde en uygun tuz doygunluğu, alkol oranı ve pH değeri belirlendikten sonra sıcaklık optimizasyonunu gerçekleştirmek amacıyla 2 mL kültür sıvısı (1,77 U/mL) için farklı sıcaklık (30, 40, 50, 60°C) değerlerinde işlemler tekrarlandı. Şekil 17'de elde edilen sonuçlara bakılarak en uygun sıcaklık değeri 30°C olarak belirlendi.



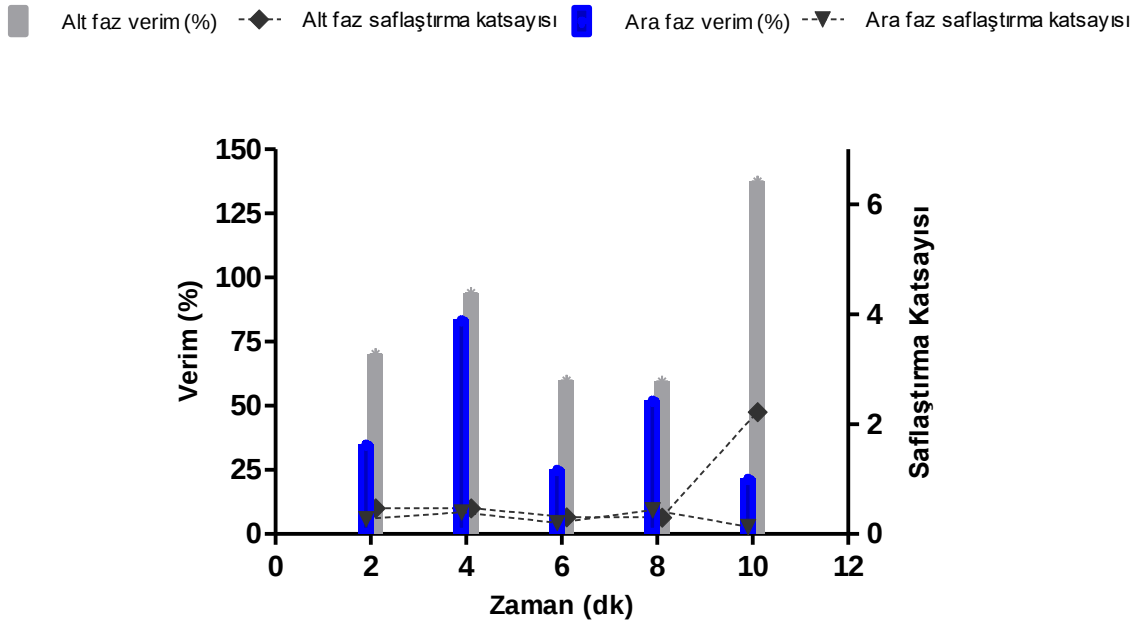
Şekil 17. TPP sistemine sıcaklık etkisi

α -Amilazın Manyetik Alan Destekli Üçlü Faz Ayırma (MFTPP) Tekniğı İle Saflaştırılması

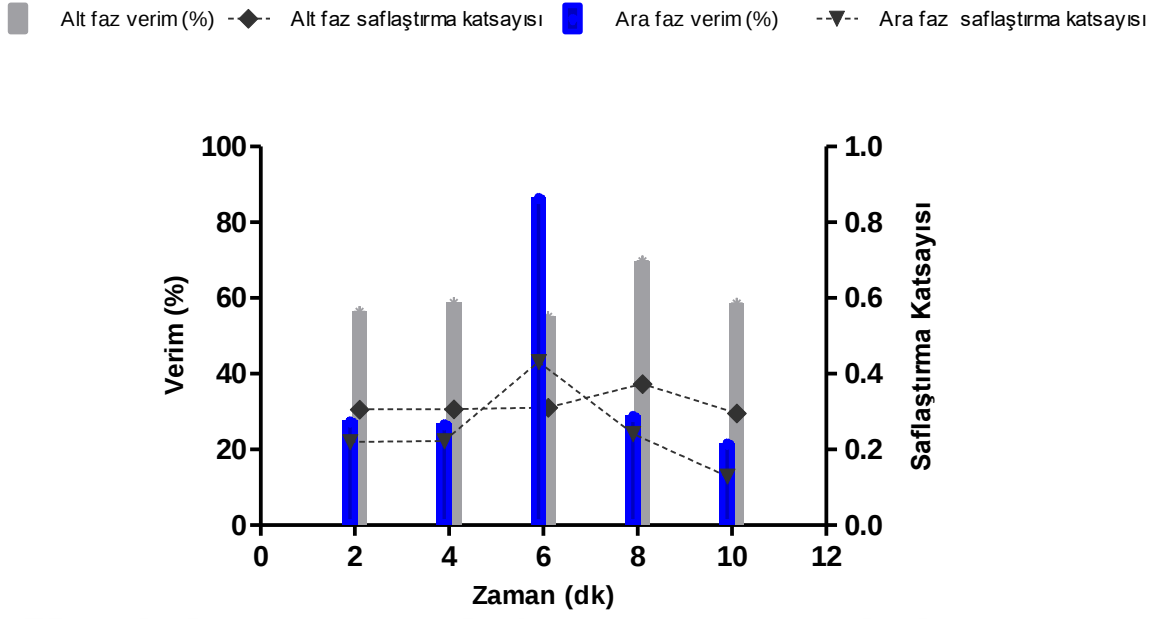
MFTPP'nin optimum şartlarını belirlemek amacıyla manyetik alan süresi, görev döngüsü ve manyetik alan gücü olmak üzere çeşitli parametreler değiştirilerek 4 mL kültür sıvısı (1,29 U/mL) için bir dizi işlem uygulanmıştır. Uygulanan işlemler sonrası en uygun şartlar sırasıyla sırasıyla 10 dk, %30 ve 70 W olarak belirlendi. Elde edilen sonuçlar Şekil 18-23'de gösterildi.



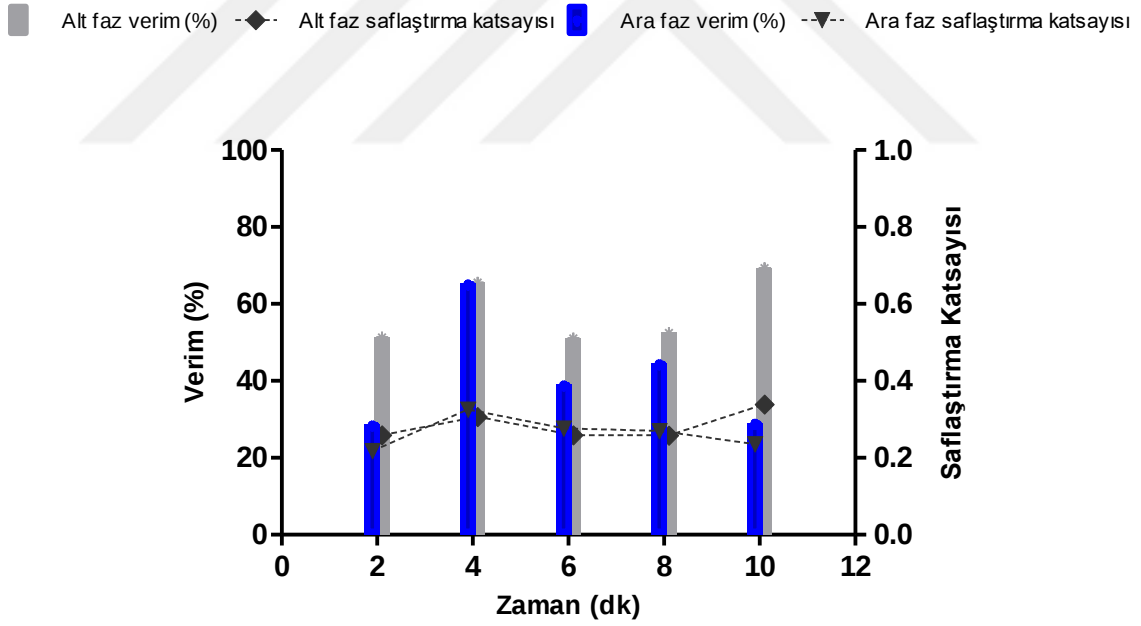
Şekil 18. Manyetik alan süresinin ve görev döngüsünün (%10) α -amilazın %verim ve saflaştırma katsayısına etkisi



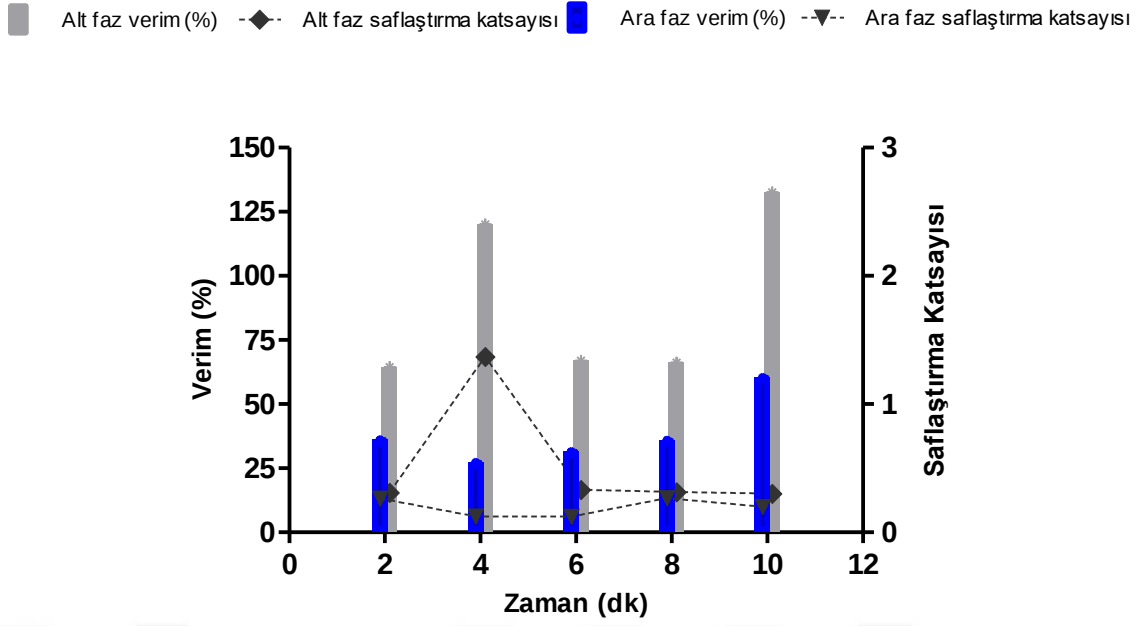
Şekil 19. Manyetik alan süresinin ve görev döngüsünün (%30) α -amilazın %verim ve saflaştırma katsayısına etkisi



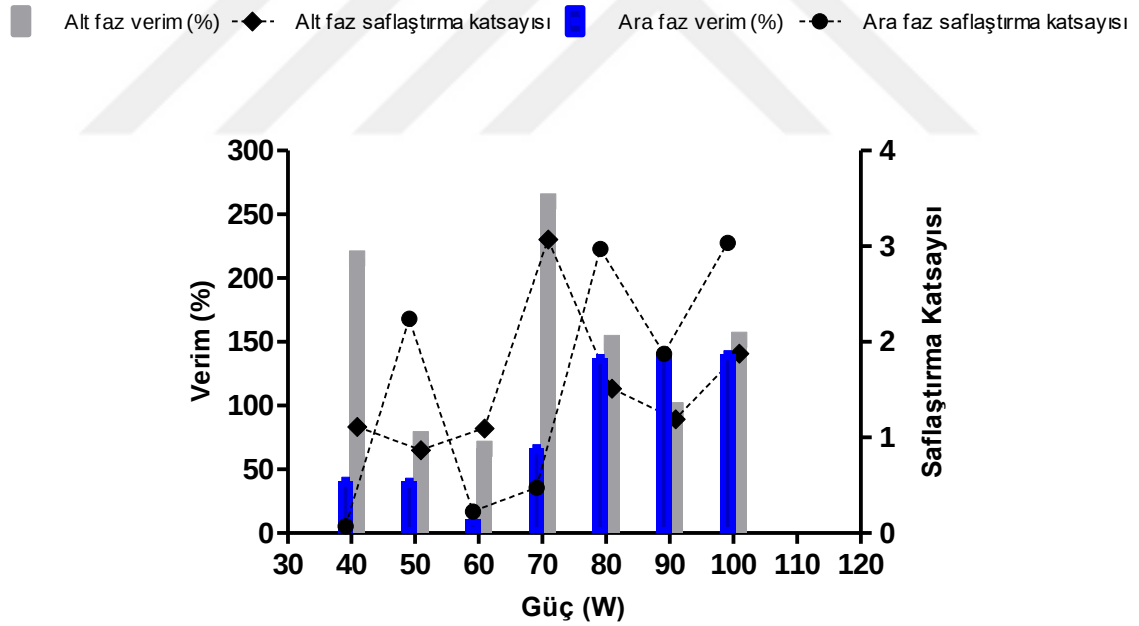
Şekil 20. Manyetik alan süresinin ve görev döngüsünün (%50) α -amilazın %verim ve saflaştırma katsayısına etkisi



Şekil 21. Manyetik alan süresinin ve görev döngüsünün (%70) α -amilazın %verim ve saflaştırma katsayısına etkisi



Şekil 22. Manyetik alan süresinin ve görev döngüsünün (%100) α -amilazın %verim ve saflaştırma katsayısına etkisi



Şekil 23. Manyetik alan gücünün α -amilazın %verim ve saflaştırma katsayısına etkisi (manyetik alan süresi: 10 dk, görev döngüsü: %30, kültür sıvısı: 2,2 U/mL)

***B. licheniformis* SO5 α -amilazının TPP ve MFTPP yöntemiyle saflaştırma sonuçları**

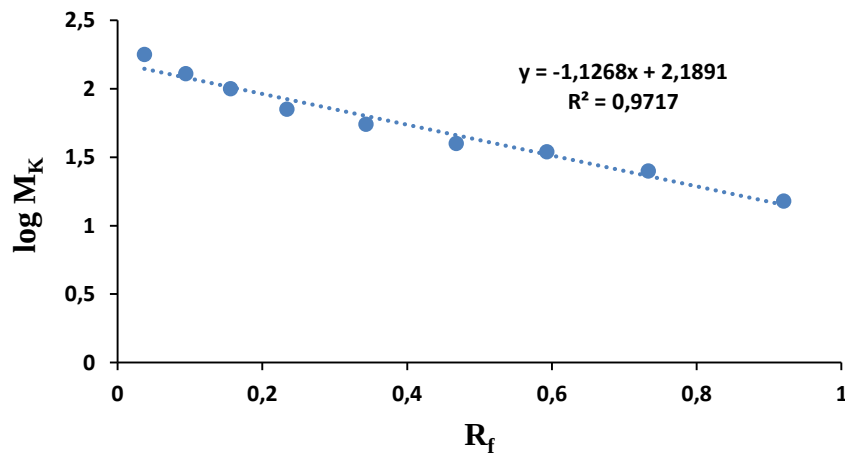
B. licheniformis SO5'ten α -amilaz enzimi TPP optimizasyonu ile belirlenen parametreler kullanılarak 4 mL kültür sıvısı (0,9 U/mL) için %30 (w/v) amonyum sülfat doygunluğu, 1,0:1,5 (v/v) kültür sıvısı:t-bütanol oranı ve pH 9,0'da %105 verimle 1,84 kat; MFTPP ile belirlenen parametreler kullanılarak %30 görev döngüsü, 10 dk manyetik alan süresi ve 70 W manyetik alan gücünde %195 verimle 3,07 kat alt fazda kısmi olarak saflaştırıldı.

Tablo 5. *B. licheniformis* SO5'ten Saflaştırılan α -Amilazın Saflaştırma Tablosu

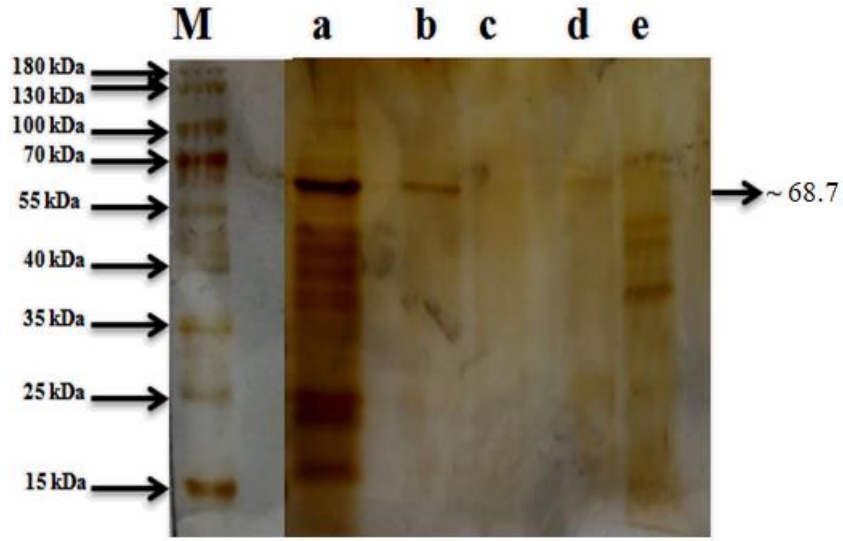
Basamak	Total Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Protein (mg/mL)	Total Aktivite (EU/mL)	Total Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	%Verim	Saflaştırma Katsayısı
Kültür sıvısı	4	0,9	4,08	3,36	26,1	10,6	100	1
TPP Alt Faz	3	1,22	2,29	3,52	13,4	19,5	105	1,84
TPP Ara Faz	1	0,37	1,91	0,37	1,91	5,34	8,82	0,5
MFTPP Alt Faz	3	2,21	2,95	6,5	15,4	32,4	195	3,07
MFTPP Ara Faz	1	0,45	7,01	0,45	7,01	3,5	11,2	0,32

SDS-PAGE Yöntemi İle Enzimin Molekül Ağırlığının Belirlenmesi

TPP/MFTPP tekniğiyle *B. licheniformis* SO5 suşundan saflaştırılan amilaz enziminin saflığını ve molekül ağırlığının belirlemek amacıyla SDS-PAGE yapıldı (Şekil 25). Log M_K - R_f grafiğini elde etmek için standart protein ve enzimlerin jel üzerinde yürümüş oldukları mesafeler ölçüldü. Şekil 24'te çizilen grafikten yararlanarak α -amilaz enziminin molekül ağırlığı ~68,7 kDa olarak hesaplandı.



Şekil 24. Log M_K - R_f grafiği

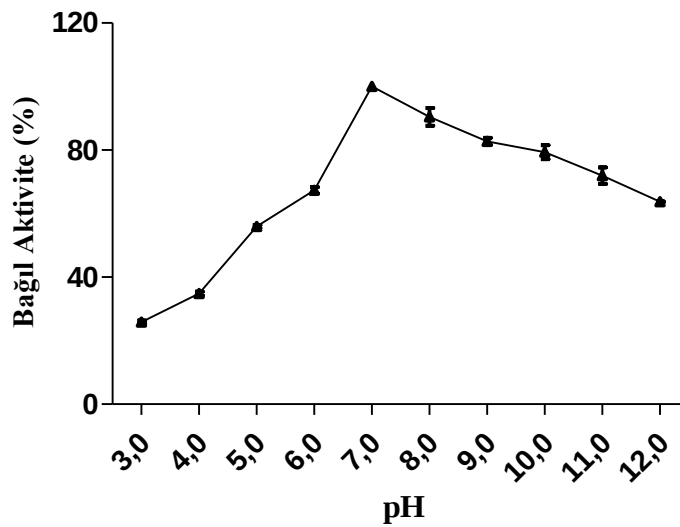


Şekil 25. *B. licheniformis* SO5'ten TPP ve MFTPP sistemiyle saflaştırılan amilazın SDS-PAGE görüntüsü, M: Marker, a: Kültür sıvısı, b. MFTPP alt faz, c. MFTPP ara faz, d. TPP alt faz, e. TPP ara faz

***B. licheniformis* SO5 α -Amilazının Biyokimyasal Karakterizasyonu Çalışmaları**

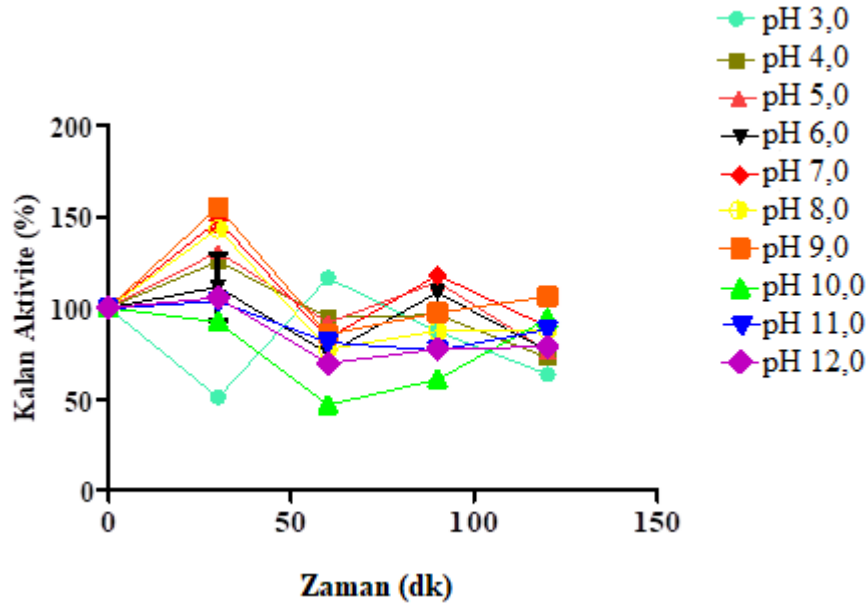
α -Amilazın aktivitesi ve stabilitesi üzerine pH'ın etkisi

SO5'ten saflaştırılan amilazın optimum pH'sını belirlemek amacıyla farklı tamponlarla hazırlanan 10 farklı pH değerinden elde edilen aktivite sonuçlarına göre grafik oluşturuldu (Şekil 26). Grafiğe göre amilazın pH 7,0'de en yüksek aktiviteye sahip olduğu gözlenmektedir. pH 3,0 ve 4,0 dışında *B.licheniformis* SO5 suşundan elde edilen amilaz %45'in üzerinde aktivite gösterdiği belirlenmiştir. pH değeri yükseldikçe aktivitenin yükseldiği ancak pH 7,0'den sonra aktivitenin düşmeye başladığı grafikten gözlenmektedir.



Şekil 26. α -Amilaz için optimum pH grafiği

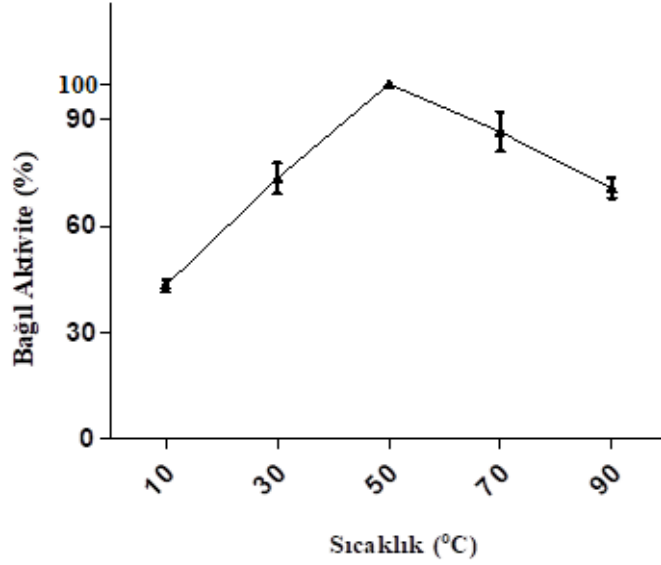
α -Amilazın asidik ve bazik ortamda stabilitesini belirlemek amacıyla 2 saat boyunca pH 3,0 ve pH 12,0 aralığındaki değerlerde enzim aktivitesi ölçüldü. Ölçülen aktivite sonuçlarına göre grafik çizildi ve Şekil 27’de gösterildi. 2 saatin sonunda tüm pH değerlerinde SO5 amilazın aktivitesini %40’ın üzerinde koruduğu; 120. dakikada pH 3,0 dışındaki değerlerde kalan aktivitenin %70 üzerinde olduğu gözlemlendi (Şekil 27).



Şekil 27. Amilaz için stabil pH grafiği

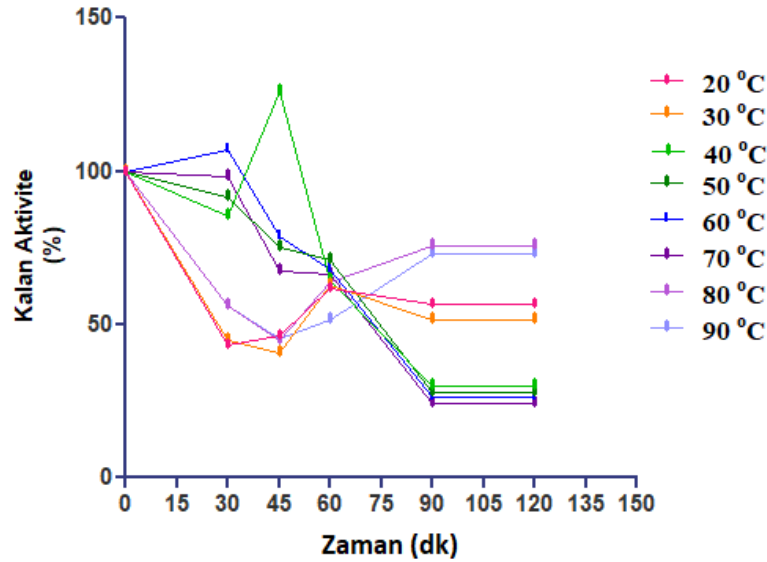
α -Amilazın aktivitesi ve stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisi

SO5’ten saflaştırılan α -amilazın 20-90°C’ye kadar olan sıcaklık aralığında aktivite ölçümü yapıldı. Farklı sıcaklıklarda çalışılan amilazın aktivitelerine göre çizilen grafikte gösterildiği gibi optimum sıcaklık 50°C olarak belirlendi. Elde edilen veriler Şekil 28’de gösterildi.



Şekil 28. α-Amilaz için optimum sıcaklık grafiği

α-Amilazın 20-90°C aralığında 120 dk süresince aktivite ölçümü yapıldı. Şekil 29'da gösterildiği gibi *B. licheniformis* SO5'ten saflaştırılan amilazın farklı sıcaklıklarda 30 ve 60. dk'da bütün değerlerde aktivitesini %40 üzerinde koruduğu; 90-120 dk arasında 20, 30, 80 90°C'de %50 üzerinde, 40, 50, 60 ve 70°C'de 90. dk'da %60 üzerinde, 120.dk'da ise %20 üzerinde kalan aktiviteye sahip olduğu gözlemlendi (Şekil 29).

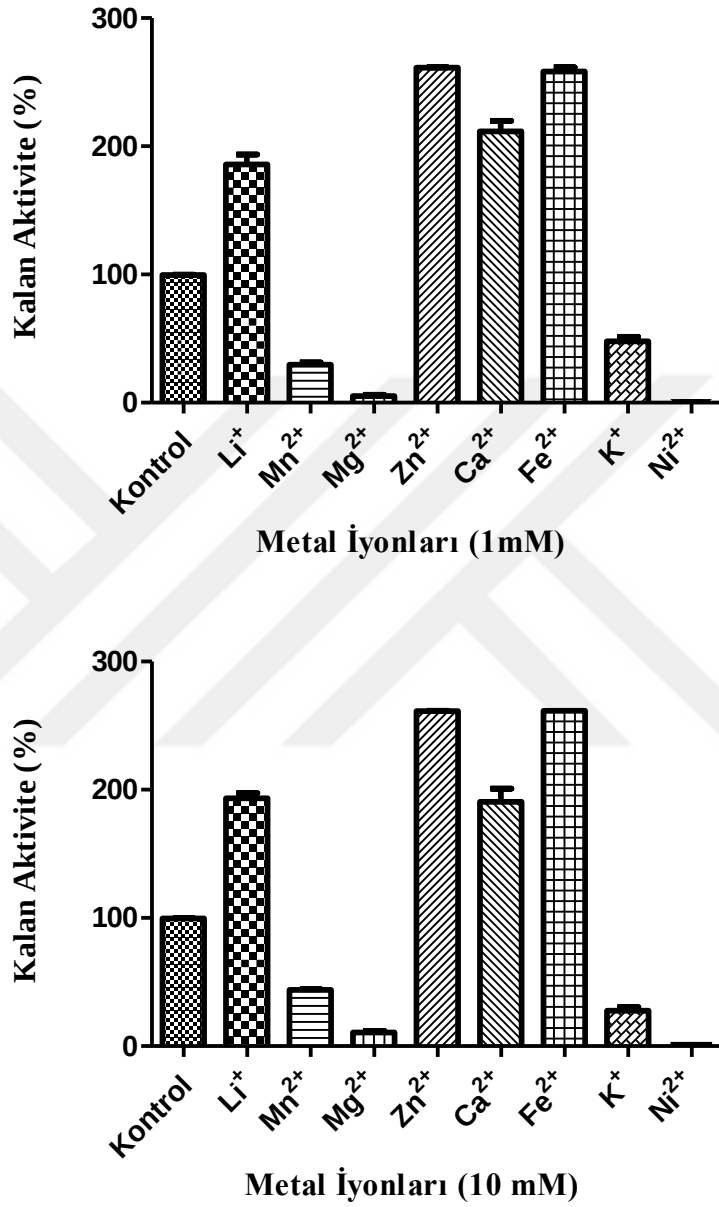


Şekil 29. α-Amilaz için stabil sıcaklık grafiği

Bazı metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi

α-Amilaz aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisini incelenmek amacıyla 1 mM ve 10 mM'lık konsantrasyonlardaki Li^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , K^+ , Zn^{2+} metal iyonları amilaz aktivitesi ölçümünde kullanıldı. 1 ve 10 mM'lık konsantrasyonlarda Li^+ varlığında

%80'in üzerinde, Ca^{2+} varlığında %100'ün üzerinde, Zn^{2+} ve Fe^{2+} iyonlarının varlığında ise %150'nin üzerinde enzimin aktivitesinde artış olduğu; Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , K^{+} iyonlarının varlığında ise aktiviteyi %50'nin üzerinde inhibe edildiği tespit edildi. Metal iyonlarının varlığında enzim aktivitesinin etkisi Şekil 30'da gösterilmiştir.



Şekil 30. 1 mM ve 10 mM konsantrasyonlarda hazırlanan metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi

Bazı yüzey aktif madde ve inhibitörlerin enzim aktivitesi üzerine etkisi

α -Amilazın aktivitesi üzerine yüzey aktif maddeleri ve inhibitörlerin etkilerini araştırmak için %1 ve %5'lik konsantrasyonlarda Triton X-100, Tween-80, Tween-20 ve H_2O_2 ; 5 ve 10 mM'lık konsantrasyonlarda EDTA kullanıldı. Tablo 6'da verilen sonuçlara göre amilazın Triton X-100 varlığında aktivitesini %90'dan fazla koruduğu gözlemlendi. Tween-80 ve

Tween-20 yüzey aktif maddelerinin varlığında ise enzimin aktivitesini artırdığı belirlendi. 5 ve 10 mM'lık konsantrasyonlarda kullanılan EDTA'nın ve %1'lik konsantrasyondaki H₂O₂'nin ise enzimi yaklaşık %66 oranında inhibe ettiği, buna karşılık H₂O₂'nin %5'lik konsantrasyonunda ise enzimin aktivitesini %95 oranında koruduğu tespit edildi.

Tablo 6. Yüzey Aktif Maddelerin ve İnhibitörün Amilaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Yüzey Aktif Maddeler	Konsantrasyon (%)	Kalan Aktivite (%)
H ₂ O ₂	1	34,6±0,159
	5	95,5±8,495
Triton X-100	1	91,1 ± 0,611
	5	91,4± 9,334
Tween-20	1	234,9± 4,751
	5	156,8± 15,253
Tween-80	1	109,7± 4,548
	5	171,4 ± 24,858
İnhibitör	Konsantrasyon (mM)	Kalan Aktivite (%)
EDTA	5	33,2 ± 3,61
	10	33,7± 5,363

Bazı organik çözücülerin enzim aktivitesi üzerine etkisi

α -Amilazın aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkisini araştırmak için %10 ve %30 konsantrasyonlarda gliserol, etanol, izopropanol, aseton ve DMSO kullanıldı. Tablo 7'de verilen sonuçlara göre kullanılan organik çözücülerin amilaz aktivitesini artırdığı gözlemlendi.

Tablo 7. Bazı Organik Çözücülerin α -Amilaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Organik Çözücüler	Konsantrasyon (%)	Kalan Aktivite (%)
Gliserol	10	186,7±3,403
	30	216,7±10,439
Etanol	10	120,9±4,979
	30	124,3±4,353
İzopropanol	10	122,7±3,835
	30	155,4±3,445
Aseton	10	137,8±4,575
	30	166,6±11,035
DMSO	10	122,3±6,388
	30	120,2±3,649

Substrat Spesifitesi

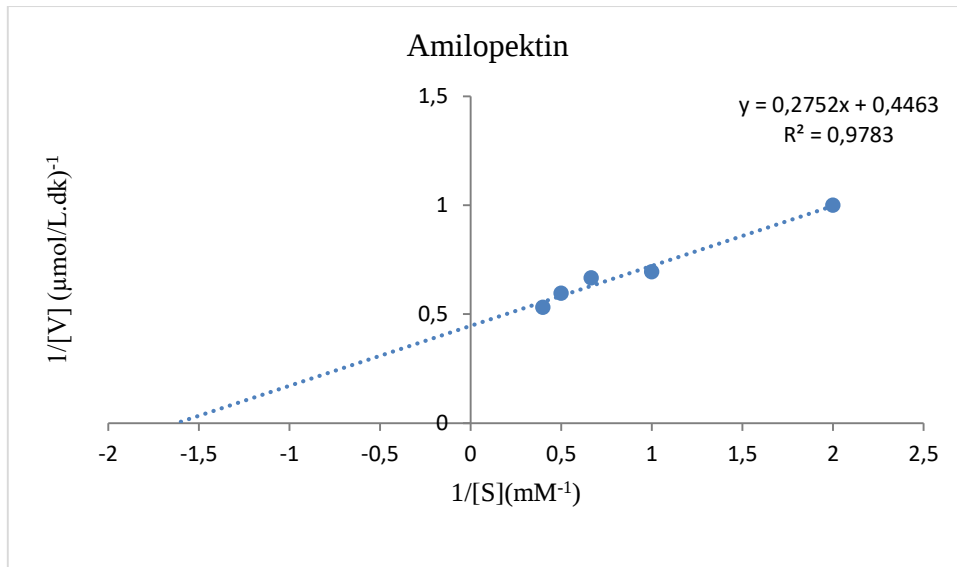
B. licheniformis SO5'ten saflaştırılmış amilazın substrat özgülüğü çeşitli substratlar kullanılarak test edildi. Yapılan deneyler sonucunda elde edilen veriler değerlendirildiğinde amilazın substrat olarak buğday nişastası için en yüksek aktiviteyi gösterdiği belirlendi (Tablo 8).

Tablo 8. *B. licheniformis* SO5 Amilazının Substrat - % Bağlı Aktivite Değerleri

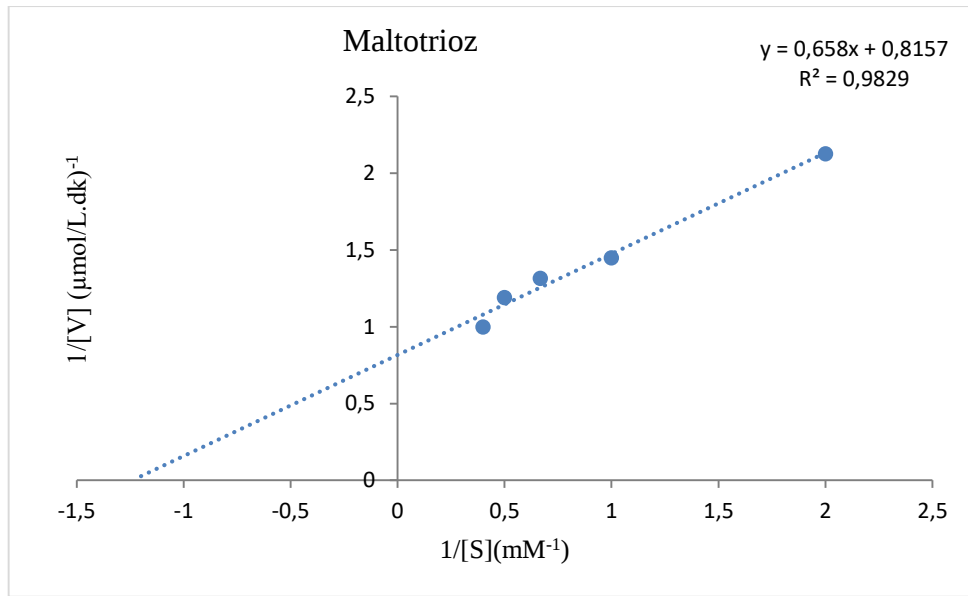
Substrat	Bağlı Aktivite (%)
Buğday Nişastası	100,0 ± 0,001
Maltotrioz	91,91± 2,871
Amilopektin	95,38± 3,872
B-siklodekstrin	74,14±1,091

α -Amilazın kinetik parametrelerinin belirlenmesi

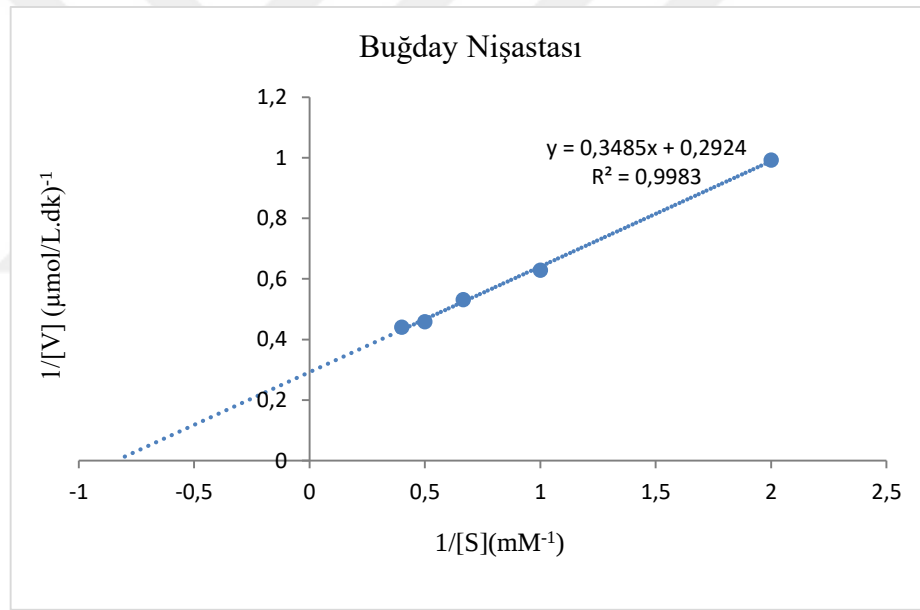
B.licheniformis SO5 suşundan saflaştırılan α -amilazın maltotrioz, β -siklodekstrin, amilopektin ve buğday nişastası için K_m ve V_{max} değerleri Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak hesaplandı. Kullanılan grafiğe göre; Maltotrioz için K_m değeri 0,81 μM , V_{max} değeri 1,225 $\mu mol.mL^{-1}.dk^{-1}$, K_{cat} değeri 0,51 s^{-1} , K_{cat}/K_m değeri 0,415 $s^{-1}.mM^{-1}$; β -siklodekstrin için K_m değeri 0,29 μM , V_{max} değeri 1,405 $\mu mol.mL^{-1}.dk^{-1}$, K_{cat} değeri 0,58 s^{-1} , K_{cat}/K_m değeri 2 $s^{-1}.mM^{-1}$; amilopektin için K_m değeri 0,62 μM , V_{max} değeri 2,24 $\mu mol.mL^{-1}.dk^{-1}$, K_{cat} değeri 0,93 s^{-1} , K_{cat}/K_m değeri 1,5 ve buğday nişastası için K_m değeri 1,19 μM , V_{max} değeri 3,42 $\mu mol.mL^{-1}.dk^{-1}$, K_{cat} değeri 1,425 s^{-1} , K_{cat}/K_m 1,2 $s^{-1}.mM^{-1}$ değeri olarak hesaplandı (Şekil 31-34).



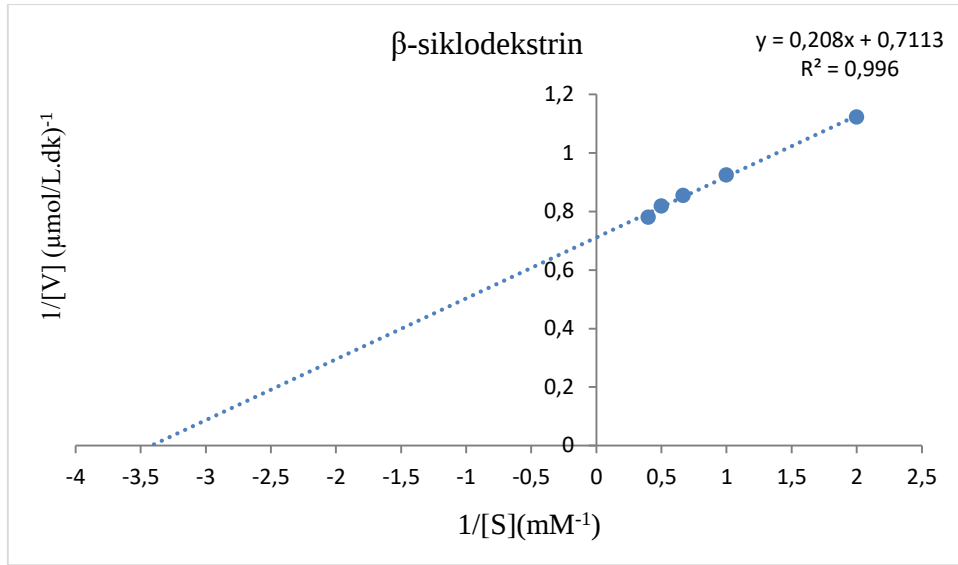
Şekil 31. Amilopektin substratı için K_m ve V_{max} bulunmasına yönelik Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 32. Maltotrioz substratı için K_m ve V_{max} bulunmasına yönelik Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 33. Buğday nişastası substratı için K_m ve V_{max} bulunmasına yönelik Lineweaver-Burk grafiği

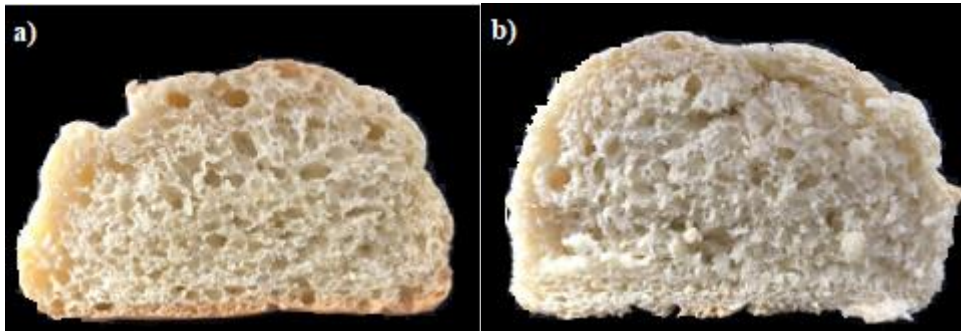


Şekil 34. β-siklodekstrin substratı için K_m ve V_{max} bulunmasına yönelik Lineweaver-Burk grafiği

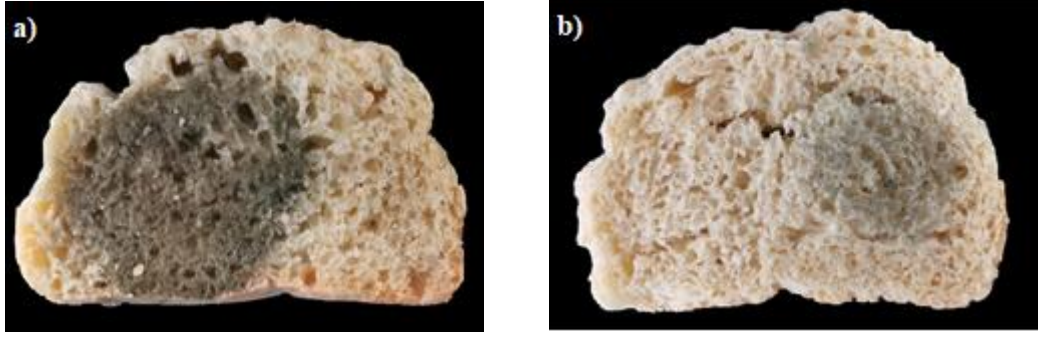
Kısmi Olarak Saflaştırılan α-Amilazın Ekmek Kalitesini Artırmada Kullanımı

Kontrol (enzimsiz) ve saflaştırılan α-amilaz ile gerçekleştirilen pişirme testlerinden elde edilen sonuçlar Şekil 35 ve Şekil 36’da verildi.

Bulgular, saflaştırılmış amilaz ile üretilen ekmeğin kontrole göre ağırlık bakımından daha fazla, şekil olarak daha düzenli, doku bakımından daha yumuşak ve mayalanma süresinin daha kısa olduğunu ortaya çıkardı. Ekmek dilimleri oda koşullarında aynı şartlarda 10 gün bekletildikten sonra sonra kontrole kıyasla enzimli ekmekte küf oluşumunda önemli derece azalma gözlemlendi ve buna bağlı olarak raf ömrünün olumlu yönde etkilendiği düşünülmektedir. (Şekil 36). Kısmi saflaştırılan α-amilaz ilavesinin, kontrole kıyasla ekmeğin özgül hacminde, yükseklik/genişlik oranında ve ağırlığında sırasıyla 0,09, 0,25 ve 4,2 g’lık artışa sebep olduğu kaydedildi (Tablo 9).



Şekil 35. Ekmek diliminin enine kesiti: a) Kontrol, b) *B. licheniformis* SO5 α-amilaz



Şekil 36. 10 gün oda koşullarında bekletilen ekmek diliminde küf oluşum miktarı: a) Kontrol, b) *B. licheniformis* SO5 α -amilaz

Tablo 9. α -Amilaz Aktivitesinin Özgül Hacim ve Yükseklik/Genişlik Oranı Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi.

	Özgül Hacim (cm ³ /g)	Yükseklik/Genişlik (Oran)	Ağırlık (g)
α -amilaz bulunmayan ekmek	1,73	1	138,6
α -amilaz bulunan ekmek	1,82	1,25	142,8

TARTIŞMA ve SONUÇ

Biyoteknolojinin gelişmesiyle birlikte endüstriyel üretimde kullanılan kimyasal katalizörlere alternatif olarak istenmeyen ürünlerin oluşumunu azaltan, etkinliği yüksek, çevre dostu ve yüksek ürün spesifikliğine sahip enzimlerin kullanımına olan ilgi de gün geçtikçe artmaktadır. Yeşil katalizörler olarak görülen enzimleri biyokatalizör olarak kullanmanın tek dezavantajı, saflaştırma için gereken çok adımlı prosedürlerden kaynaklanan yüksek maliyetidir. Bu nedenle enzimlerin ayrılması ve derişikleştirilmesi için, hem maliyetin önemli ölçüde azaltılmasına yardımcı olacak hemde sahip olduğu diğer avantajları ile TPP gibi alternatif ekstraksiyon yöntemleri geliştirilmiştir. Endüstriyel biyoteknoloji firmaları, kimyasal maddelerin üretiminde enzimler veya biyokatalizörler üretmek için biyolojik sistemler kullanırlar. Endüstriyel biyoteknolojinin amacı, yüksek ve düşük pH ya da sıcaklık derecelerine karşı zor koşullar altında yaşamlarını sürdürebilecek mikroorganizmalar ve özelliklerini kaybetmeyen biyomoleküller belirlemektir. Biyoteknolojik yöntemlerle sıklıkla üretilen ve kullanılan enzimlerden bazılarının; proteinleri parçalayan proteaz, yağları etkileyen lipaz, selülozu parçalayan selülaz ve nişastayı basit şekerlere dönüştüren amilaz olduğu bilinmektedir (Çırakoğlu, 2009; Gözükara, 1997; Salvi & Yadav, 2020).

Amilazın endüstride yaygın kullanım alanları bulunmaktadır. Glukoz ve fruktoz şurubu üretimi, kağıt ve tekstil endüstrisi, meyve suyu ve alkollü içecek üretimi, deterjan endüstrisinde leke giderimi ve en yaygın olarak fırıncılık endüstrisinde başarıyla kullanılmaktadır. Amilaz ekmek yapımında hamurun hacmini ve iç yapısını değiştirerek normal hamura göre daha kaliteli bir üretim sağlamaktadır. Buna bağlı olarak ekmek bayatlamasını geciktirerek raf ömrünü uzatır. Aynı zamanda mayalanma süresinin kısalması nedeniyle kısa sürede kaliteli üretim sağlar (Pandey *et al.* 2000).

Bu tez çalışması kapsamında; daha önceden izolasyonu ve identifikasyonu gerçekleştirilmiş olan *B. licheniformis* SO5'ten üretilen α -amilaz, TPP'nin farklı bir modifikasyonu ile gerçekleştirilen manyetik alan destekli TPP yöntemiyle saflaştırıldı.

B. licheniformis SO5'ten izole edilen α -amilazın TPP yöntemi kullanılarak saflaştırılması amacıyla ilk aşama olarak organik çözügen, tuz ve pH optimizasyonu yapıldı. α -Amilaz pH 7,0'de, 1,0:1,5 (kültür sıvısı:t-bütanol oranı) ve %30 doygun amonyum sülfat kullanılarak %105 verimle 1,84 kat saflaştırıldı. Literatürde TPP ile etkili faz ayrımı gerçekleşmesi için 1,0:1,0 ve 1,0:1,5 (v/v) kültür sıvısı:t-bütanol oranı bildirilmiştir (David *et*

al. 2017; Mondal *et al.* 2003). Amilazın TPP tekniği kullanılarak saflaştırmadaki başarısı ve elde edilen sonuçlar literatürde verilmiştir. α -Amilazın *Bacillus amiloliquefaciens*'den %174 verim ile 10 kat, buğday tohumundan ise %77 verim ile 55 kat (Mondal *et al.* 2003), OSBS6'dan %32,4 verim ile 7,23 kat (Rüzgar, 2019), SO7'den %28,65 verim ile 1,95 kat (Ölmez, 2017) saflaştırıldığı bildirilmiştir. Literatür ile karşılaştırma yapıldığında *B. licheniformis* SO5 suşundan saflaştırılan amilazın TPP tekniği kullanılarak yüksek verimle elde edildiği görülmektedir.

Bu tez çalışmasında α -amilaz enziminin saflaştırılması için ilk olarak klasik TPP yapıldı. Daha sonra verim ve saflaştırma derecesini artırmak amacıyla TPP yöntemi modifiye edilerek ilk defa manyetik alan destekli TPP gerçekleştirildi. Tablo 10'da MFTPP ve TPP sisteminin karşılaştırılması özetlenmiştir. Klasik TPP tekniğinde optimize edilen şartlar ile α -amilazın kısmi saflaştırılması %30 görev döngüsü ve 70 W manyetik alan gücü kullanarak MFTPP sistemi uygulandı. Klasik TPP'de elde edilen %105 verim ve 1,84 saflaştırma katı MFTPP'de %195 verim ve 3,07 saflaştırma katına yükselerek önemli ölçüde başarı elde edildi. Klasik TPP'de uygulanan 60 dk'lık sürenin MFTPP'de 10 dk'ya düştüğü görülmektedir. TPP ile yapılan saflaştırmalarda bazı durumlarda toplam enzim aktivitesinde artış gözlenmektedir. Bunun sonucu olarak enzimlerin spesifik aktivitesindeki artışın arkasındaki mekanizma hala tam olarak açıklanamamış olsa da, bunun başlıca nedenlerinin inhibitörlerin enzim preparatlarından uzaklaştırılması, enzim molekülünün artan esnekliği, yapısal değişiklikler ve konformasyonel sıkışma olabileceği düşünülmektedir (Bayraktar & Önal 2013; Rawdkuen *et al.* 2010).

Tablo 10. TPP ve MFTPP Sisteminin Optimize Edilen Şartlarda % Geri Kazanım ve Saflaştırma Katının Karşılaştırılması

Sistem	Optimum Koşullar	% Verim	Saflaştırma Katı	İşlem Süresi (dk)
TPP	%30 (w/v) NH ₂ SO ₄ , 1,0:1,5 t-bütanol, 30°C, pH 9,0	%105	1,84	60
MFTPP	%30 (w/v) NH ₂ SO ₄ , 1,0:1,5 t-bütanol, 30°C, pH 9,0, görev döngüsü %30, manyetik alan gücü 70 W	%195	3,07	10

Literatür çalışmaları incelendiğinde çeşitli TPP teknikleriyle yapılan saflaştırmalar şu şekildedir; *Trametes hirsuta*'dan lakkaz enzimini mikrodalga destekli üçlü faz ayırma (MWTPP) kullanarak %20 görev döngüsü, 20 W güç ile %59,8 verimle 13,9 kat saflaştırmayı

7 dakikada gerçekleştirmişlerdir (Patil & Yadav, 2018). *Bacillus sphaericus* MTCC suşundan fibrinolitik bir enzim ultrasonik destekli üçlü faz ayırma (UATPP) kullanarak %40 görev döngüsü, 150 W güç ile %65 verimle 16,15 kat saflaştırmayı 5 dakikada gerçekleştirmişlerdir (Avhad *et al.* 2014). Zhang *et al.* (2017) ultrasonik destekli TPP kullanarak %50 görev döngüsü, 150 W güç ile %93,4 verimle 6,69 kat saflaştırmayı 5 dakikada gerçekleştirmişlerdir. Vetal *et al.* (2014) tarafından yapılan çalışmada ultrasonik destekli TPP kullanılarak 180 W güç ile 14 dakika süre kullanarak %83,36 ve %85,58 verim elde etmişlerdir.

Klasik TPP ile karşılaştırıldığında TPP modifikasyonları ile yapılan çalışmalardaki verim, saflaştırma oranı ve faz ayrılma etkinliğindeki artış farklı mekanizmalarla açıklanmaktadır. Örneğin; MWTPP ile ilgili yapılan çalışmalarda bu yöntemin temel prensibinin, moleküler hareketi artıran iyonik iletim ve dipol dönüş yoluyla ısı üretimi olduğu bildirilmiştir. Bu tekniğin mekanizması şu şekilde açıklanmaktadır: Moleküllerin aynı frekansta dönmesi sonunda moleküler sürtünmeye neden olmakta ve bu da sıcaklığın artmasına sebep olmaktadır. Sıcaklık yükseldikçe, solvent erişimi matrikse daha etkili bir şekilde nüfuz ederek ekstraksiyonu mümkün kılmakta ve verimi artırmaktadır. Işınlama süresi ve gücü, ulaşılan nihai sıcaklığı ve ısının lokalizasyonunu etkilemektedir. Sonuç olarak mikrodalga, bir matriks içindeki hedef molekülün difüzyonunu artırabildiği ileri sürülmüştür (Veggi *et al.* 2013; Zou *et al.* 2013). ATPS'nin manyetik parçacıklarla kombinasyonu ile yapılan bir çalışmada, harici bir manyetik alan uygulamasının ardından faz ayrılma oranının önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir (Fischer *et al.* 2013). Yapılan bir çalışmada, yeni bir yöntem olan elektromanyetik ayırma tekniği ile proteinlerin saflaştırılmasında yüksek elektrik alan gücünün, partikül yörüngesinin sapmasını ve agregatlar arasında ayrılmayı sağladığı böylece protein ayırma verimliliğini önemli ölçüde artırdığı ifade edilmektedir. Yine aynı çalışmada, yüklü parçacıkların yörüngesini daha fazla değiştirmek ve proteinlerin ayırma verimliliğini daha da artırmak için bir manyetik alan uygulanabileceği belirtilmektedir (Zhu *et al.* 2021). Manyetik alanın yüklü parçacıklar üzerinde Lorentz kuvveti olarak adlandırılan bir kuvvet uygulayabileceği ve hareketli yükler üzerinde bir sapma etkisine neden olabileceği vurgulanmaktadır (Gao *et al.* 2019). Bu tez çalışmasında uygulanan MFTPP yönteminde de benzer şekilde, manyetik alandan kaynaklanan yüklü parçacıklar üzerindeki sapma etkisinin faz ayrılma oranını ve hedef proteinin difüzyonunu artırabileceği şeklinde bir mekanizma ileri sürülebilir.

B. licheniformis SO5 suşu kullanılarak saflaştırılan α -amilazın molekül kütlesi ~68.7 kDa olarak belirlendi. Ayrıca SDS-PAGE ile enzimin TPP tekniği kullanılarak saflaştırılması sonucunda enzimin alt fazda kaldığı görüldü. Literatürde; *Bacillus sp.* GA4 α -amilazının

molekül kütlesinin 55 kDa (Özdemir & Özcan, 2020), *Bacillus subtilis* α -amilazının molekül ağırlığını 59 kDa (Bukhari & Rehman, 2015) ve *Bacillus thuringiensis subsp. Kurstaki* α -amilazının 51 kDa molekül kütlesine (Smitha et al. 2015) sahip olduğu bildirilmiştir.

B. licheniformis SO5 suşu kullanılarak α -amilazın optimum pH'sı 7,0 olarak tespit edildi. pH 3,0 ve 4,0 dışında *B.licheniformis* SO5 suşundan elde edilen amilazın %45'in üzerinde aktivite gösterdiği belirlenmiştir. pH değeri yükseldikçe aktivitenin yükseldiği ancak pH 7,0'den sonra aktivitenin düşmeye başladığı grafikten gözlenmektedir. Aynı zamanda 120 dk boyunca yapılan aktivite ölçümü sonunda tüm pH değerlerinde SO5 amilazın aktivitesini %40'ın üzerinde koruduğu; 120. dakikada pH 3,0 dışındaki değerlerde kalan aktivitenin %70 üzerinde olduğu gözlemlendi. *B. licheniformis* CUMC305 kullanılarak saflaştırılan α -amilaz için optimum pH'nın 9,0 olduğu ve 18 saatlik inkübasyon süresinden sonra pH 3,0-6,0 arasında aktivitesini %50 üzerinde; pH 7,0-9,0 arasında %100, pH 10,0'da ise sahip olduğu aktivitenin yaklaşık %95'ini koruduğu bildirilmiştir (Krishnan & Chandra, 1983). *B. mojavensis* A21 kullanılarak saflaştırılan α -amilaz için optimum pH 6,5 olarak bildirilmiştir (Sidkey et al. 2011). *Geobacillus* sp. TF14'ten saflaştırılan α -amilaz için pH 5,0 ve pH 9,0'da optimum pH'a sahip olduğu ve 48 saatlik inkübasyonun sonunda bu iki pH değerinde kararlı olduğunu bildirmişlerdir (Keskin & Ertunga, 2017). *Bacillus subtilis* kullanılarak saflaştırılan α -amilaz için optimum pH değeri 7,0 olarak bildirilmiştir (Bukhari & Rehman, 2015). Geniş pH aralığında uzun süre stabil kalan α -amilazın endüstriyel kullanım açısından avantajlı olduğu ve bundan dolayı SO5 amilazının da bu özelliğe sahip olduğu düşünülmektedir.

B. licheniformis SO5 kullanılarak saflaştırılan α -amilazın sıcaklık profili incelendi ve optimum sıcaklık 50°C olarak tespit edildi. Ayrıca *B. licheniformis* SO5'ten saflaştırılan amilazın farklı sıcaklıklarda 30 ve 60. dk'da bütün değerlerde aktivitesini %40 üzerinde koruduğu; 90-120 dk arasında 20, 30, 80 90°C'de %50 üzerinde, 40, 50, 60 ve 70°C'de 90. dk'da %60 üzerinde, 120.dk'da ise %20 üzerinde kalan aktiviteye sahip olduğu gözlemlendi. Metabolik aktiviteleri etkileyerek mikroorganizmanın büyümesini etkileyen sıcaklık enzim üretiminde önemli bir parametredir. 50°C'den sonra aktivitede meydana gelen düşüşün yükselen sıcaklık ile birlikte termal proteinlerin inaktivasyonundan kaynaklanabileceği ve *Bacillus* cinsinden üretilen α -amilaz enziminin sıcaklık profilinin çoğunlukla 20-70°C arasında olduğu belirtilmiştir (Bano et al. 2011; Amoozegar et al. 2003). Literatür çalışmaları incelendiğinde; *Bacillus* sp. A-3 suşu kullanılarak saflaştırılan α -amilaz için optimum sıcaklık 37°C ve aynı zamanda 40°C dereceye kadar sıcaklığın stabil kaldığı bildirilmiştir (Batur & Aygan, 2015). *Bacillus* sp. suşlarından elde edilen amilazın optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri 25°C olarak belirtilmiş ve 10-40°C arasında 30 dakika boyunca aktivitesinin yaklaşık

%96'sını koruduğu bildirilmiştir (Arabacı, 2011). *Bacillus subtilis*'ten saflaştırılan α -amilazın optimum sıcaklık değeri 37°C olarak belirtilmiş ve 25-80°C arasında aktivitesini korumasına rağmen 80°C'de aktivitesinin bir kısmını kaybettiği belirtilmiştir (Bukhari & Rehman, 2015). Literatürde bulunan çalışmalar ile karşılaştırma yapıldığında yapılan bu çalışmada *B. licheniformis* SO5 α -amilazın sıcaklık toleransının yüksek olduğu ve geniş sıcaklık aralığında kararlılık gösterdiği belirlenmiştir.

SO5 suşundan amilazın aktivitesine 1 mM ve 10 mM konsantrasyonlarda Li^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , K^+ , Zn^{2+} metal iyonlarının etkisi incelendiğinde 1 ve 10 mM'lık konsantrasyonlarda Li^+ varlığında %80'in üzerinde, Ca^{2+} varlığında %100'ün üzerinde, Zn^{2+} ve Fe^{2+} iyonlarının varlığında ise %150'nin üzerinde enzimin aktivitesinde artış olduğu; Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , K^+ iyonlarının varlığında ise %50'nin üzerinde enzimin inhibe edildiği tespit edildi. α -Amilaz enziminin genel olarak iki değerliğe sahip metal iyonlarının varlığında yüksek aktiviteye sahip olduğu ve özellikle yapısal stabiliteleri için Ca^{2+} iyonuna ihtiyaç duyan metalloenzimler olduğu bunun yanında bazı amilazların kalsiyum iyonundan bağımsız olduğu belirtilmiştir (Pandey *et al.* 2000; Gupta *et al.* 2003; Wang *et al.* 2019). Literatür çalışmaları incelendiğinde; *Bacillus amyloliquefaciens*'den elde edilen α -amilazın aktivitesine 1 mM konsantrasyona sahip iyonların 10 mM konsantrasyona sahip olanlara göre etkisinin daha fazla olduğu ve 1 mM konsantrasyona sahip Fe^{3+} , Cu^{2+} ve Ca^{2+} iyonları tarafından aktive edilirken 1 mM ve 5 mM konsantrasyonlarında Mn^{2+} ve Ni^{2+} iyonları tarafından ise yüksek oranda inhibe edildiği belirtilmiştir (Fouda, 2021). *Bacillus amyloliquefaciens*'ten saflaştırılan α -amilazın aktivitesine metal iyonlarının zorunlu bir gereksinim göstermediği bunun yanında Ca^{2+} ve Cu^{2+} iyonlarının varlığında aktivite üzerinde artırıcı bir etki sergilediği gösterilmiştir (Gangadharan *et al.* 2009). *Bacillus subtilis* suşundan saflaştırılan α -amilazın Na^+ ve Zn^{2+} iyonlarının enzim aktivitesini artırıcı yönde etki ettiği ancak Al^{3+} , K^+ , Ca^{2+} ve Hg^{2+} iyonlarının farklı oranlarda enzim inhibisyonuna sebep olduğu bildirilmiştir (David *et al.* 2017).

B. licheniformis SO5 α -amilazın aktivitesine %1 ve %5'lik konsantrasyonlarda H_2O_2 , Triton X-100, Tween-80 ve Tween-20 aynı zamanda 5 mM ve 10 mM'lık konsantrasyonlarda EDTA'nın etkisi incelendi. α -Amilazın Triton X-100 varlığında aktivitesini %90'dan fazla koruduğu, Tween-80 ve Tween-20 yüzey aktif maddelerinin varlığında ise enzimin aktivitesini artırdığı belirlendi. 5 ve 10 mM 'lık konsantrasyonlarda kullanılan EDTA'nın ve %1'lik konsantrasyondaki H_2O_2 'nin ise enzimi yaklaşık % 66 oranında inhibe ettiği, buna karşılık H_2O_2 'nin %5'lik konsantrasyonunda ise enzimin aktivitesini % 95 oranında koruduğu tespit edildi. Literatür çalışmalarına bakıldığında; *Bacillus sp.* A3-15 suşundan saflaştırılan α -amilazın %1 konsantrasyonda SDS varlığında aktivitesini %18 oranında kaybettiğini; %1'lik

konsantrasyonda Tween-20 ve TritonX-100 enzim aktivitesini artırıcı yönde etki gösterirken, SDS ve Tween-80'nin varlığında az da olsa inhibe olduğu belirtilmiştir (Arikan *et al.* 2008). Yapılan başka bir çalışmada %1'lik konsantrasyonda kullanılan SDS varlığında enzimin aktivitesini %68 oranında kaybettiği Triton X-100 ve Tween-80 varlığında ise %80 oranında kararlılığını koruduğu bildirilmiştir (Kalpana & Pandian, 2014). Başka bir çalışmada ise *Geobacillus sp.* TF14 suşundan izole edilen amilazın aktivitesi üzerine %1'lik SDS, Triton X-100, Triton X-114 ve Tween-20 deterjanlarının etkisini araştırmış ve kullanılan bu deterjanların başlangıç aktivitesinin yarısını kaybettirdiğini tespit etmişlerdir (Keskin & Ertunga, 2017).

B. licheniformis SO5'ten saflaştırılan amilaza bazı organik çözücülerin etkisini belirlemek amacıyla %10 ve %30'luk konsantrasyonlarda gliserol, etanol, izopropanol, aseton ve DMSO kullanıldı. Kullanılan organik çözücülerin amilaz aktivitesini artırdığı gözlemlendi. Literatür çalışmalarına bakıldığında, *B. licheniformis* AI20'den üretilen amilazın %10'luk metanol, aseton, etanol, izopropanol ve gliserole karşı aktivitesinin kararlı olduğunu, %20'lik konsantrasyonda aktivitede düşüş olduğu, aseton ve gliserolün ise bu konsantrasyonda hiçbir etkiye sebep olmadığı belirtilmiştir (Abdel-Fattah *et al.* 2013). Genel olarak TPP ile saflaştırılan enzimlerin, geniş bir pH ve sıcaklık aralığında ve organik çözücülere karşı artan kararlılık ve enzim performansı gösterdiği bildirilmiştir (Rajendran *et al.* 2022).

B. licheniformis SO5'ten saflaştırılan α -amilazın çeşitli substratlara olan spesifitesini belirlemek için buğday nişastası, amilopektin, β -siklodekstrin ve maltotrioz substratları kullanıldı. α -Amilazın buğday nişastası için en yüksek aktiviteyi gösterdiği belirlendi. Kullanılan diğer substratlara spesifitesi sırasıyla amilopektin (%95,38), maltotrioz (%91,91) ve β -siklodekstrin (%74,14) olarak belirlendi. Nişasta-amilaz ile arasındaki ilginin enzimin sahip olduğu C-terminal bağlayıcı domain sayesinde olabileceğini açıklanmıştır (Sarıkaya *et al.* 2000). Literatür çalışmaları incelendiğinde; Sharma & Satyanarayana (2013)'nın yaptığı çalışmada bazı substratlar ile karşılaştırıldığında α -amilazın nişastaya karşı yüksek bir spesifite gösterdiğini belirtmişlerdir. Goyal *et al.* (2005) tarafından yapılan çalışmada ise *Bacillus sp.* I-3 α -amilazın ham patates granüllerine ilgisinin %94 oranında olduğu bildirilmiştir. *Bacillus sp.* YX-1'den üretilen amilazın kullanılan çeşitli nişastalara karşı kuvvetli sindirme gücü olduğu bildirilmiştir (Liu & Xu, 2007). *B. licheniformis* SO5 amilazının literatürle uyumlu özelliklere sahip olduğu görülmektedir.

B. licheniformis SO5'ten elde edilen α -amilaz kullanılarak kinetik çalışmalar gerçekleştirildi. Maltotrioz için K_m değeri 0,81 μM , $V_{\max}$ değeri 1,225 $\mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{dk}^{-1}$, K_{cat} değeri 0,51 s^{-1} , K_{cat}/K_m değeri 0,415 $\text{s}^{-1}.\text{mM}^{-1}$; β -siklodekstrin için K_m değeri 0,29 μM , $V_{\max}$ değeri 1,405 $\mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{dk}^{-1}$, K_{cat} değeri 0,58 s^{-1} , K_{cat}/K_m değeri 2 $\text{s}^{-1}.\text{mM}^{-1}$; amilopektin için K_m

değeri 0,62 μM , $V_{\max}$ değeri 2,24 $\mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{dk}^{-1}$, K_{cat} değeri 0,93 s^{-1} , K_{cat}/K_m değeri 1,5 ve buğday nişastasası için K_m değeri 1,19 μM , $V_{\max}$ değeri 3,42 $\mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{dk}^{-1}$, K_{cat} değeri 1,425 s^{-1} , K_{cat}/K_m 1,2 $\text{s}^{-1}.\text{mM}^{-1}$ değeri olarak hesaplandı. Enzimin kinetik parametrelerini bilmek reaksiyon hızını belirleyebilmek açısından zorunludur. *B. subtilis* ITBCCB148'den amilaz için K_m değeri 2,5 mg/mL, $V_{\max}$ değeri 192,3 $\mu\text{mol/mL.dk}$ olarak belirlenmiştir (Yandri *et al.* 2010). *B. subtilis* KIBGE HAS'dan üretilen α -amilaz için K_m değeri 2,68 mg/mL, $V_{\max}$ değeri 1773 U/mL olarak belirtilmiştir (Bano *et al.* 2021).

Şekerlerin ekmek yapımında fermentasyon hızını artırarak gaz oluşumunu ve buna bağlı olarak da hamurun yapısını etkilediği, hamurun pişmesine, yumuşaklığına, hacmine ve şekline olumlu yönde etki ettiği yapılan çalışmalarda gözlemlenmiştir (Jekle & Berker, 2012). Bu tez çalışmasında SO5'ten saflaştırılan α -amilazın nişastayı parçalama özelliği göz önüne alınarak ekmek yapımının kalitesini artırma işleminde kullanılmıştır. Saflaştırılmış amilaz ile üretilen ekmeğin kontrole göre ağırlık bakımından daha fazla, şekil olarak daha düzenli, doku bakımından daha yumuşak ve mayalanma süresinin daha kısa olduğu görüldü. Aynı zamanda oda koşullarında bekletilen amilazlı ekmekte kontrole kıyasla daha az küf oluşumu gözlemlendi. Kısmi saflaştırılan α -amilaz ilavesinin, kontrole kıyasla ekmeğin özgül hacminde, yükseklik/genişlik oranında ve ağırlığında sırasıyla 0,09, 0,25 ve 4,2 g'lık artışa sebep olduğu kaydedildi. Ait Kaki El-Hadef El-Okki *et al.* (2017), yaptıkları çalışmada α -amilazı ekmek kalitesini artırmak için kullanmış ve büyük bir etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında *B. licheniformis* SO5'ten amilaz pH 9,0'da, 1,0:1,5 (kültür sıvısı:t-bütanol oranı) ve %30 doygunlukta amonyum sülfat kullanılarak uygulanan TPP yöntemi ile %105 verimle 1,84 kat saflaştırıldı. Optimize edilen şartlar kullanılarak ilk kez literatürde bulunmayan manyetik alan destekli TPP tekniği (%30 görev döngüsü, 10 dk manyetik alan süresi ve 10 dk'lık saflaştırma süresi) kullanılarak %195 verimle 3,07 kat saflaştırma gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar, manyetik alan destekli TPP'nin geleneksel TPP'ye kıyasla kısa bir işlem süresinde, daha yüksek verim ve saflaştırma oranıyla α -amilaz enziminin biyoayırımında etkin bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir. Dolayısıyla MFTPP sistemi, farklı enzimler ve ayrıca diğer biyomoleküllerin daha yüksek bir saflıkla ve % geri kazanımla ekstraksiyonunda kullanılabilecek yeni bir teknik olarak önerilebilir. Saflaştırılan amilazın pH 3,0-12,0 ve 20-90°C sıcaklık aralığında yüksek oranda aktif ve stabil olduğu tespit edildi. Ayrıca bazı metal iyonlarının (Li^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , K^+ , Zn^{2+}), bazı organik çözücülerin (gliserol, etanol, izopropanol, aseton, DMSO) ve yüzey aktif maddelerin (Triton X-100, Tween-20, Tween-80) varlığında aktivitesini artırdığı ya da büyük oranda koruduğu, aynı zamanda %1'lik konsantrasyonda H_2O_2 'nin ve 5 ve 10 mM'lık

konsantrasyonda EDTA'nın inhibisyona sebep olduğu görölmüştür. Endüstriyel uygulamalarda kullanılan biyokatalizörlerin spesifik özellikleri gerekli olduğundan enzimlerin karakterizasyon çalışmaları biyoteknolojik uygulamalar açısından önemlidir. Bu nedenle yeni kaynaklardan amilazın tanımlanması ve karakterizasyon çalışmalarının gerçekleştirilmesi mevcut biyoteknolojik uygulamaların gelişmesi açısından gereklidir. *B. licheniformis* SO5 amilazının; geniş bir sıcaklık ve pH aralığındaki aktivitesi ve kararlılığına sahip olması, çeşitli organik çözücüler, metal iyonları ve yüzey aktif maddelerin varlığında yüksek kararlılık ve aktivite göstermesi gıda başta olmak üzere pek çok endüstriyel uygulama alanları için uygun bir aday haline getirmektedir.



KAYNAKÇA

- Abdel-Fattah, Y. R., Soliman, N. A., El-Toukhy, N. M., El-Gendi, H., & Ahmed, R. S. (2013). Production, purification, and characterization of thermostable α -amylase produced by *Bacillus licheniformis* isolate AI20. *Journal of Chemistry*, 2013.
- Adiguzel, A., Agar, G., Baris, O., Gulluce, M., Sahin, F., & Sengul, M. (2006). RAPD and FAME analyses of *Astragalus* species growing in eastern Anatolia region of Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology*, 34(5), 424-432.
- Aehle, W. (2004). Enzymes in industry: production and applications. Wiley-VCH Verlag GmbH, 484, Germany.
- Ait Kaki El-Hadef El-Okki, A., Gagaoua, M., Bourekoua, H., Hafid, K., Bennamoun, L., Djekrif-Dakhmouche, S., & Meraihi, Z. (2017). Improving bread quality with the application of a newly purified thermostable α -amylase from *Rhizopus oryzae* FSIS4. *Foods*, 6(1), 1.
- Alçiçek, E. (2017). Van Gölü'nden alınan sıcak su örneklerinden termofilik bakterilerin izolasyonu, identifikasyonu, *Bacillus licheniformis* EA10'dan proteaz enziminin üçlü faz ayırma sistemi (TPP) ile saflaştırılması ve karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Alvarez-Guerra, E., Ventura, S. P., Coutinho, J. A., & Irabien, A. (2014). Ionic liquid-based three phase partitioning (ILTPP) systems: Ionic liquid recovery and recycling. *Fluid Phase Equilibria*, 371, 67-74.
- American Association of Cereal Chemists. AACC International. Approved Methods of Analysis, 11th Ed. Method 10-05.01. Guidelines for Measurement of Volume by Rapeseed Displacement, 11th ed.; AACC International: St. Paul, MN, USA, 2009.
- Amoozegar, M. A., Malekzadeh, F., & Malik, K. A. (2003). Production of amylase by newly isolated moderate halophile, *Halobacillus* sp. strain MA-2. *Journal of microbiological methods*, 52(3), 353-359.
- Arabacı, N. (2011). Cold aktif alkalın amilaz enzimi üreten *Bacillus* sp. suşlarının izolasyonu, enzim üretimi, karakterizasyonu ve endüstriyel kullanım olanaklarının araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Arat, Ö. (2007). *Aspergillus flavus* HBF34'ün glukoamilaz üretimi, saflaştırılması ve kinetik özelliklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Arikan, B., 2008. Highly thermostable, thermophilic, alkaline, SDS and chelator resistant amylase from a thermophilic *Bacillus* sp. isolate A3-15. *Bioresource Technology*. 99, 3071-3076.
- Adrio, J. L., & Demain, A. L. (2014). Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules*, 4(1), 117-139.
- Asgher, M., Asad, M. J., Rahman, S. U., & Legge, R. L. (2007). A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *Journal of food engineering*, 79(3), 950-955.
- Atalah, J., Cáceres-Moreno, P., Espina, G., & Blamey, J. M. (2019). Thermophiles and the applications of their enzymes as new biocatalysts. *Bioresource technology*, 280, 478-488.

- Avhad, D. N., Niphadkar, S. S., & Rathod, V. K. (2014). Ultrasound assisted three phase partitioning of a fibrinolytic enzyme. *Ultrasonics sonochemistry*, 21(2), 628-633.
- Aygan, A. (2015). Kahramanmaraş topraklarından izole edilen *Bacillus* sp. tarafından α -amilaz üretimi ve karakterizasyonu. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi*, 5(2), 68-74.
- Baltaş, N. (2012). *Anoxybacillus gonensis* Z4 suşundan ekstraselüler α -amilaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Bano, S., Qader, S. A. U., Aman, A., Syed, M. N., & Azhar, A. (2011). Purification and characterization of novel α -amylase from *Bacillus subtilis* KIBGE HAS. *Aaps Pharmscitech*, 12(1), 255-261.
- Bayraktar, H., & Önal, S. (2013). Concentration and purification of α -galactosidase from watermelon (*Citrullus vulgaris*) by three phase partitioning. *Separation and purification technology*, 118, 835-841.
- Belgacem, M. N., & Gandini, A. (Eds.). (2011). Monomers, polymers and composites from renewable resources. *Elsevier*.
- Bergel, B. F., Osorio, S. D., da Luz, L. M., & Santana, R. M. C. (2018). Effects of hydrophobized starches on thermoplastic starch foams made from potato starch. *Carbohydrate polymers*, 200, 106-114.
- Bolton, D. J., Kelly, C. T., & Fogarty, W. M. (1997). Purification and characterization of the α -amylase of *Bacillus flavothermus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 20(5), 340-343.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Bukhari, D. A., & Rehman, A. (2015). Purification and characterization of α -amylase from *Bacillus subtilis* isolated from local environment. *Pakistan Journal of Zoology*, 47(4).
- Caccamo, D., Maugeri, T. L., & Gugliandolo, C. (2001). Identification of thermophilic and marine bacilli from shallow thermal vents by restriction analysis of their amplified 16S rDNA. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 520-524.
- Chaiwut, P., Pintathong, P., & Rawdkuen, S. (2010). Extraction and three-phase partitioning behavior of proteases from papaya peels. *Process Biochemistry*, 45(7), 1172-1175.
- Chemat, F., & Cravotto, G. (Eds.). (2012). *Microwave-assisted extraction for bioactive compounds: theory and practice* (Vol. 4). Springer Science & Business Media.
- Chen, W., Xie, T., Shao, Y., & Chen, F. (2012). Phylogenomic relationships between amylolytic enzymes from 85 strains of fungi. *PLoS One*, 7(11), e49679.
- Chew, K. W., Ling, T. C., & Show, P. L. (2019). Recent developments and applications of three-phase partitioning for the recovery of proteins. *Separation & Purification Reviews*, 48(1), 52-64.
- Choi, J. M., Han, S. S., & Kim, H. S. (2015). Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnology advances*, 33(7), 1443-1454.
- Choonia, H. S., & Lele, S. S. (2013). Three phase partitioning of β -galactosidase produced by an indigenous *Lactobacillus acidophilus* isolate. *Separation and Purification Technology*, 110, 44-50.

- Çalci, E., Demir, T., Çelem, E. B., & Önal, S. (2009). Purification of tomato (*Lycopersicon esculentum*) α -galactosidase by three-phase partitioning and its characterization. *Separation and purification technology*, 70(1), 123-127.
- Çamurlu, D., Bayraktar, H., ÇALIŞKAN, S., Ataç, U. Z. E. L., & Seçil, Ö. N. A. L. (2020). Three-phase partitioning of α -galactosidase from *Aspergillus lentulus*: optimization of system and characterization of enzyme. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 48(1), 83-98.
- Çırakoğlu, B. 2009. Biyoteknolojideki Gelişmelerin Temel Prensipleri ve Sanayiye Uygulamaları. İzmir, 176-324.
- Dafe, A., Etemadi, H., Dilmaghani, A., & Mahdavinia, G. R. (2017). Investigation of pectin/starch hydrogel as a carrier for oral delivery of probiotic bacteria. *International journal of biological macromolecules*, 97, 536-543.
- Dahmoune, F., Nayak, B., Moussi, K., Remini, H., & Madani, K. (2015). Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. leaves. *Food chemistry*, 166, 585-595.
- David, S., Femi, B., Gbenga, A., & Saanu, A. B. (2017). Purification and characterization of α -amylase from *Bacillus subtilis* isolated from cassava processing sites. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 8(6), 1-7.
- Declerck, N., Machius, M., Wiegand, G., Huber, R., & Gaillardin, C. (2000). Probing structural determinants specifying high thermostability in *Bacillus licheniformis* α -amylase. *Journal of molecular biology*, 301(4), 1041-1057.
- Deive, F. J., Álvarez, M. S., Morán, P., Sanromán, M., & Longo, M. A. (2012). A process for extracellular thermostable lipase production by a novel *Bacillus thermoamylovorans* strain. *Bioprocess and biosystems engineering*, 35(6), 931-941.
- Demirel, R., & Gürbüz, Y. (1999). Karma yemlerde enzim kullanımı. VIV. *Poultry Yutav*, 99, 3-6.
- Demirkan, E. (2011). Production, purification, and characterization of alpha-amylase by *Bacillus subtilis* and its mutant derivatives. *Turkish Journal of Biology*, 35(6), 705-712.
- Dennison, C., & Lovrien, R. (1997). Three phase partitioning: concentration and purification of proteins. *Protein expression and purification*, 11(2), 149-161.
- Dennison, C., Moolman, L., Pillay, CS, Meinesz, R. E. (2000). T-butanol: Nature's gift for protein isolation. *South African Journal of Science*, 96(4), 159-160.
- Dey, S., & Rathod, V. K. (2013). Ultrasound assisted extraction of β -carotene from *Spirulina platensis*. *Ultrasonics sonochemistry*, 20(1), 271-276.
- Divakaran, D., Chandran, A., & Pratap Chandran, R. (2011). Comparative study on production of α -amylase from *Bacillus licheniformis* strains. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42, 1397-1404.
- Diversity, C.o.B. Convention on Biological Diversity 2009 [cited 2009 Nissan 2009]
- Dogan, N., & Tari, C. (2008). Characterization of three-phase partitioned exopolysaccharidase from *Aspergillus sojae* with unique properties. *Biochemical Engineering Journal*, 39(1), 43-50.
- Drobniewski, F. A. (1993). *Bacillus cereus* and related species. *Clinical microbiology reviews*, 6(4), 324-338.

- Duman, Y. Üçlü faz ayrımı (ÜFA) ile geleneksel enzim saflaştırma tekniğinin karşılaştırılması; ÜFA ile saflaştırılan β -galaktosidazın termodinamik özellikleri. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 6(3), 107-117.
- Dumoulin, Y., Cartilier, L. H., & Mateescu, M. A. (1999). Cross-linked amylose tablets containing α -amylase: an enzymatically-controlled drug release system. *Journal of controlled release*, 60(2-3), 161-167.
- Dülger, S. (2003). Gönen, Kestanbol ve Diyadin kaplıcalarından termofilik bakterilerin izolasyonu, moleküler yöntemlerle karakterizasyonu ve tanımlanması. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Far, B. E., Ahmadi, Y., Khosroshahi, A. Y., & Dilmaghani, A. (2020). Microbial alpha-amylase production: progress, challenges and perspectives. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 10(3), 350.
- Fischer, I., Hsu, C. C., Gärtner, M., Müller, C., Overton, T. W., Thomas, O. R., & Franzreb, M. (2013). Continuous protein purification using functionalized magnetic nanoparticles in aqueous micellar two-phase systems. *Journal of Chromatography A*, 1305, 7-16.
- Fouda, F. (2021). Production and evaluation of alpha-amylase produced from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Annals of Agricultural Science, Moshtohor*, 59(2), 361-372.
- Gagaoua, M. (2018). Aqueous methods for extraction/recovery of macromolecules from microorganisms of atypical environments: A focus on three phase partitioning. *Methods in Microbiology*, 45, 203-242. Academic Press.
- Gagaoua, M., & Hafid, K. (2016). Three phase partitioning system, an emerging non-chromatographic tool for proteolytic enzymes recovery and purification. *Biosensors Journal*, 5(1), 100134.
- Gagaoua, M., Boucherba, N., Bouanane-Darenfed, A., Ziane, F., Nait-Rabah, S., Hafid, K., & Boudechicha, H. R. (2014). Three-phase partitioning as an efficient method for the purification and recovery of ficin from Mediterranean fig (*Ficus carica* L.) latex. *Separation and Purification Technology*, 132, 461-467.
- Gangadharan, D., Nampoothiri, K. M., Sivaramakrishnan, S., & Pandey, A. (2009). Biochemical characterization of raw-starch-digesting alpha amylase purified from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 158(3), 653-662.
- Garg, R., & Thorat, B. N. (2014). Nattokinase purification by three phase partitioning and impact of t-butanol on freeze drying. *Separation and Purification Technology*, 131, 19-26.
- Gao, W., Lu, J., Zhang, S., Zhang, X., Wang, Z., Qin, W., ... & Sang, Y. (2019). Suppressing photoinduced charge recombination via the Lorentz force in a photocatalytic system. *Advanced Science*, 6(18), 1901244.
- Gautam, S., Dubey, P., Singh, P., Varadarajan, R., & Gupta, M. N. (2012). Simultaneous refolding and purification of recombinant proteins by macro-(affinity ligand) facilitated three-phase partitioning. *Analytical biochemistry*, 430(1), 56-64.
- Gomes, I., Gomes, J., & Steiner, W. (2003). Highly thermostable amylase and pullulanase of the extreme thermophilic eubacterium *Rhodothermus marinus*: production and partial characterization. *Bioresource technology*, 90(2), 207-214.
- Goyal, N., Gupta, J.K. and Soni S.K. (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.
- Gözükara, E. M. (1997). Enzimler. Biyokimya. Nobel Tıp Kitapevleri, 572-573. İstanbul.

- Guerrand, D. (2017). Lipases industrial applications: focus on food and agroindustries. *OCL Oilseeds and fats crops and lipids*, 24(4), D403.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., & Chauhan, B. (2003). Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process biochemistry*, 38(11), 1599-1616.
- Janeček, Š., Svensson, B., & MacGregor, E. A. (2014). α -Amylase: an enzyme specificity found in various families of glycoside hydrolases. *Cellular and molecular life sciences*, 71, 1149-1170.
- Janeček, Š., & Zámocká, B. (2020). A new GH13 subfamily represented by the α -amylase from the halophilic archaeon *Haloarcula hispanica*. *Extremophiles*, 24(2), 207-217.
- Jobling, S. (2004). Improving starch for food and industrial applications. *Current opinion in plant biology*, 7(2), 210-218.
- Kaur, B., Ariffin, F., Bhat, R., & Karim, A. A. (2012). Progress in starch modification in the last decade. *Food hydrocolloids*, 26(2), 398-404.
- Kelley, B., Blank, G., & Lee, A. (2009) Downstream Processing of Monoclonal Antibodies: Current Practices and Future Opportunities in Process Scale Purification of Antibodies, John Wiley & Sons, Inc.: New Jersey, USA.
- Keskin, Ş., & Ertunga, N. S. (2017). Purification, immobilization and characterization of thermostable α -amylase from a thermophilic bacterium *Geobacillus* sp. TF14. *Turkish Journal of Biochemistry*, 42(6), 633-642.
- Ketnawa, S., Rungraeng, N., & Rawdkuen, S. (2017). Phase partitioning for enzyme separation: An overview and recent applications. *International Food Research Journal*, 24(1), 1.
- Kılıç, D. (2002). Mısır nişastasının hidrolizinde α -amilaz enziminin aktivitesinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Kirk, O., Borchert, T. V., & Fuglsang, C. C. (2002). Industrial enzyme applications. *Current opinion in biotechnology*, 13(4), 345-351.
- Konsoula, Z., & Liakopoulou-Kyriakides, M. (2007). Co-production of α -amylase and β -galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates. *Bioresource Technology*, 98(1), 150-157.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Lee, B. H., Fundamentals of Biotechnology, VCH Publishers, USA, 431 p, 1996.
- Lee, S. Y., Khoiroh, I., Ooi, C. W., Ling, T. C., & Show, P. L. (2017). Recent advances in protein extraction using ionic liquid-based aqueous two-phase systems. *Separation & Purification Reviews*, 46(4), 291-304.
- Liu, X., & Kokare, C. (2017). Microbial enzymes of use in industry. In *Biotechnology of microbial enzymes* (pp. 267-298). Academic Press.
- Liu, X. D., & Xu, Y. (2008). A novel raw starch digesting α -amylase from a newly isolated *Bacillus* sp. YX-1: purification and characterization. *Bioresource Technology*, 99(10), 4315-4320.
- Machius, M., Wiegand, G., & Huber, R. (1995). Crystal Structure of Calcium-depleted *Bacillus licheniformis* α -amylase at 2.2 Å Resolution. *Journal of molecular biology*, 246(4), 545-559.
- Mahdavi, A., Sajedi, R. H., RASA, M., & Jafarian, V. (2010). Characterization of an α -amylase with broad temperature activity from an acid-neutralizing *Bacillus cereus* strain.

- Madhavan Nampoothiri K, Nair NR, John RP. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. *Bioresour Technol* 2010;101(22):8493-501. doi: 10.1016/j.biortech.2010.05.092
- Malekabadi, S., Badoei-Dalfard, A., & Karami, Z. (2018). Biochemical characterization of a novel cold-active, halophilic and organic solvent-tolerant lipase from *B. licheniformis* KM12 with potential application for biodiesel production. *International journal of biological macromolecules*, 109, 389-398.
- Miquel, P. (1888). Monographie d'un bacille vivant au del& de 70 centigrades. *Ann. Micrographic*, 1, 3.
- Mohan, N., & Satyanarayana, T. (2019), in Amylase, vol. 2: *Reference Module in Life Sciences Encyclopedia of Microbiology* (Schmidt, T. M. ed.), (Fourth Edition) pp. 107-126.
- Mondal, K., & Gupta, M. N. (2006). The affinity concept in bioseparation: evolving paradigms and expanding range of applications. *Biomolecular engineering*, 23(2-3), 59-76.
- Mondal, K., Sharma, A., & Gupta, M. N. (2003). Macroaffinity ligand-facilitated three-phase partitioning for purification of glucoamylase and pullulanase using alginate. *Protein Expression and Purification*, 28(1), 190-195.
- 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.
- Msakni, S. (2020). Türkiye topraklarından izole edilmiş *Bacillus* sp. suşlarından selüloz enzim üretiminin taranması, besinsel optimizasyon, enzimin kısmi saflaştırılması, karakterizasyonu ve yönlü kumaştaki bitki atıklarının giderilmesinde etkinliği. Doktora Tezi, Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
- Ndangui, C. B., Petit, J., Gaiani, C., Nzikou, J. M., & Scher, J. (2014). Impact of thermal and chemical pretreatments on physicochemical, rheological, and functional properties of sweet potato (*Ipomea batatas Lam*) flour. *Food and bioprocess technology*, 7(12), 3618-3628.
- Özcan, B. D. (2005). Sıcaklığa dirençli amilaz genlerinin klonlanması üzerine çalışmalar. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Özdemir, G. & Özcan, B. D. (2020). Sıcaklığa dirençli alfa-amilaz enzimi üreten mezofilik bakteri izolasyonu ve enzimin kısmi karakterizasyonu. *Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 3(2), 146-153.
- Özer, B., Akardere, E., Çelem, E. B., & Önal, S. (2010). Three-phase partitioning as a rapid and efficient method for purification of invertase from tomato. *Biochemical Engineering Journal*, 50(3), 110-115.
- Özzybek, M. (2022). Formulation of food processing wastes for co-production of bacterial pectinase and cellulase enzymes. Master's Thesis, Middle East Technical University, The Graduate School of Natural and Applied Sciences, Ankara.
- Pakhale, S. V., & Bhagwat, S. S. (2016). Purification of serratiopeptidase from *Serratia marcescens* NRRL B 23112 using ultrasound assisted three phase partitioning. *Ultrasonics sonochemistry*, 31, 532-538.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V. T., Singh, D., & Mohan, R. (2000). Advances in microbial amylases. *Biotechnology and applied biochemistry*, 31(2), 135-152.

- Patel, A. K., Singhanian, R. R., & Pandey, A. (2017). Production, purification, and application of microbial enzymes. In *Biotechnology of Microbial Enzymes* (pp. 13-41). Academic Press.
- Patil, P. D., & Yadav, G. D. (2018). Application of microwave assisted three phase partitioning method for purification of laccase from *Trametes hirsuta*. *Process Biochemistry*, 65, 220-227.
- Priya, F. S., & Renu, A. (2018). Efficacy of amylase for wastewater treatment from *Penicillium* sp. SP2 isolated from stagnant water. *Journal of Environmental Biology*, 39(2), 189-195.
- Pike, R. N., & Dennison, C. (1989). Protein fractionation by three phase partitioning (TPP) in aqueous/t-butanol mixtures. *Biotechnology and bioengineering*, 33(2), 221-228.
- Qian, M., Haser, R., Buisson, G., Duee, E., & Payan, F. (1994). The active center of a mammalian alpha-amylase structure of the complex of a pancreatic alpha-amylase with a carbohydrate inhibitor refined to 2.2-ANG resolution. *Biochemistry*, 33(20), 6284-6294.
- Raghava, S., Barua, B., Singh, P. K., Das, M., Madan, L., Bhattacharyya, S., & Gupta, M. N. (2008). Refolding and simultaneous purification by three-phase partitioning of recombinant proteins from inclusion bodies. *Protein Science*, 17(11), 1987-1997.
- Rahath Kubra, I., Kumar, D., & Rao, L. J. M. (2013). Effect of microwave-assisted extraction on the release of polyphenols from ginger (*Zingiber officinale*). *International journal of food science & technology*, 48(9), 1828-1833.
- Rajendran, D. S., Chidambaram, A., Kumar, P. S., Venkataraman, S., Muthusamy, S., Vo, D. V. N., ... & Vaidyanathan, V. K. (2022). Three-phase partitioning for the separation of proteins, enzymes, biopolymers, oils and pigments: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 1-24.
- 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.
- Robinson, P. K. (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in biochemistry*, 59, 1.
- Rokhina, E. V., Lens, P., & Virkutyte, J. (2009). Low-frequency ultrasound in biotechnology: state of the art. *Trends in biotechnology*, 27(5), 298-306.
- Sadana, A., & Beelaram, A. (1994) Efficiency and economics of bioseparation: some case studies. *Bioseparation*, 4, 221-235.
- Sagu, S. T., Nso, E. J., Homann, T., Kapseu, C., & Rawel, H. M. (2015). Extraction and purification of beta-amylase from stems of *Abrus precatorius* by three phase partitioning. *Food chemistry*, 183, 144-153.
- Sahnoun, M., Naili, B., Elgharbi, F., Kammoun, R., Gabsi, K., & Bejar, S. (2013). Effect of *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 α -amylase on rheological dough properties and bread quality. *Biologia*, 68(5), 808-815.
- Salvi, H. M., & Yadav, G. D. (2020). Extraction of epoxide hydrolase from *Glycine max* using microwave-assisted three phase partitioning with dimethyl carbonate as green solvent. *Food and Bioproducts Processing*, 124, 159-167.
- Samanta, S., Das, A., Haider, S. K., Jana, A., Kar, S., Mohapatra, P. K. D., & Mondal, K. C. (2014). Thermodynamic and kinetic characteristics of an α -amylase from *Bacillus licheniformis* SKB4. *Acta Biologica Szegediensis*, 58(2), 147-156.

- Sarıkaya, E., Higasa, T., Adachi, M., and Mikami B. (2000). Comparison of degradation abilities of α - and β -amylases on raw starch granules, *Process Biochemistry*, 35, 711-715.
- Suribabu, K., Govardhan, T. L., & Hemalatha, K. P. J. (2014). Application of partially purified α -amylase produced by *Brevibacillus borostelensis* R1 on sewage and effluents of industries. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3, 691–697.
- Šárka, E., & Dvořáček, V. (2017). Waxy starch as a perspective raw material (a review). *Food Hydrocolloids*, 69, 402-409.
- Saxena, L., Iyer, B. K., & Ananthanarayan, L. (2007). Three phase partitioning as a novel method for purification of ragi (*Eleusine coracana*) bifunctional amylase/protease inhibitor. *Process Biochemistry*, 42(3), 491-495.
- Schmid, R. D. (2003). *Pocket guide to biotechnology and genetic engineering*. Wiley-VCH.
- Shah IJ, Gami PN, Shukla RM, Acharya DK (2014). Optimization for α amylase production by *Aspergillus oryzae* using submerged fermentation technology. *Basic Res. J. Microbiol.* 1(4):1-10.
- Sharma, A., & Gupta, M. N. (2001a). Three phase partitioning as a large-scale separation method for purification of a wheat germ bifunctional protease/amylase inhibitor. *Process Biochemistry*, 37(2), 193-196.
- Sharma, A., Roy, I., & Gupta, M. N. (2004). Affinity precipitation and macroaffinity ligand facilitated three-phase partitioning for refolding and simultaneous purification of urea-denatured pectinase. *Biotechnology progress*, 20(4), 1255-1258.
- Sharma, A., Satyanarayana, T. (2013). Microbial acid-stable α -amylases: Characteristics, genetic engineering and applications. *Process Biochemistry*. 48, 201–211.
- Sidkey, N. M., Abo-Shadi, M. A., Balahmar, R., Sabry, R. ve Badrany, G., 2011. Purification and characterization of α -amylase from a newly isolated *Aspergillus flavus* F2Mbb. *International Research Journal of Microbiology*, 2, 96-103.
- Smitha, R. B., Sajith, S., Priji, P., Unni, K. N. N., Roy, T. A. N., & Benjamin, S. (2015). Purification and characterization of amylase from *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki. *Bt Research*, 6(3), 1-8.
- Smitha, R. B., Sajith, S., Priji, P., Unni, K. N. N., Roy, T. A. N., & Benjamin, S. (2015). Purification and characterization of amylase from *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki. *Bt Research*, 6(3), 1-8.
- Strickland, D. (2007). Guide to Biotechnology: Biotechnology Industry Organization. 136.
- Swinkels, J. J. M. (1990). Industrial starch chemistry: Properties, modifications and applications of starches. *Avebe*.
- Swinkels, J. J. M. (1998). Industrial starch chemistry,. *The Netherlands: AVEBE Brochure*.
- Syu, M. J., & Chen, Y. H. (1997). A study on the α -amylase fermentation performed by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Chemical Engineering Journal*, 65(3), 237-247.
- Tatar, S. (2007). Termofil moderately halofilik *Bacillus* sp. suşlarından amilaz enzimi üretimi ve endüstriyel kullanım olanaklarının araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Turnbull, P. C., Kramer, J. M., & Melling, J. (1996). *Bacillus. Medical microbiology*.

- Tuzlakoglu Ozturk, M., Akbulut, N., Issever Ozturk, S., & Gumusel, F. (2013). Ligase-independent cloning of amylase gene from a local *Bacillus subtilis* isolate and biochemical characterization of the purified enzyme. *Applied biochemistry and biotechnology*, 171(2), 263-278.
- Vaikundamoorthy, R., Rajendran, R., Selvaraju, A., Moorthy, K., & Perumal, S. (2018). Development of thermostable amylase enzyme from *Bacillus cereus* for potential antibiofilm activity. *Bioorganic Chemistry*, 77, 494-506.
- Veith, B., Herzberg, C., Steckel, S., Feesche, J., Maurer, K. H., Ehrenreich, P., & Gottschalk, G. (2004). The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. *Microbial Physiology*, 7(4), 204-211.
- Vetal, M. D., Shirpurkar, N. D., & Rathod, V. K. (2014). Three phase partitioning coupled with ultrasound for the extraction of ursolic acid and oleanolic acid from *Ocimum sanctum*. *Food and Bioproducts Processing*, 92(4), 402-408.
- Wang, H. H., Chen, C. L., Jeng, T. L., & Sung, J. M. (2011). Comparisons of α -amylase inhibitors from seeds of common bean mutants extracted through three phase partitioning. *Food Chemistry*, 128(4), 1066-1071.
- Wang, Y. C., Hu, H. F., Ma, J. W., Yan, Q. J., Liu, H. J., & Jiang, Z. Q. (2020). A novel high maltose-forming α -amylase from *Rhizomucor miehei* and its application in the food industry. *Food chemistry*, 305, 125447.
- Wang, Y. C., Zhao, N., Ma, J. W., Liu, J., Yan, Q. J., & Jiang, Z. Q. (2019). High-level expression of a novel α -amylase from *Thermomyces dupontii* in *Pichia pastoris* and its application in maltose syrup production. *International journal of biological macromolecules*, 127, 683-692.
- Willfahrt, A., Steiner, E., Hötzel, J., & Crispin, X. (2019). Printable acid-modified corn starch as non-toxic, disposable hydrogel-polymer electrolyte in supercapacitors. *Applied Physics A*, 125(7), 1-10.
- Yan, J. K., Wang, Y. Y., Qiu, W. Y., Ma, H., Wang, Z. B., & Wu, J. Y. (2018). Three-phase partitioning as an elegant and versatile platform applied to nonchromatographic bioseparation processes. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58(14), 2416-2431.
- Yandri, Suhartati, T. ve Hadi, Sutopo. (2010). Purification and characterization of extracellular α -amylase enzyme from locale bacteria isolate *Bacillus subtilis* ITBCCB148. *European Journal of Scientific Research*, 39, 64-74.
- Zhang, F., Zhang, Y. Y., Thakur, K., Zhang, J. G., & Wei, Z. J. (2019). Structural and physicochemical characteristics of lycoris starch treated with different physical methods. *Food chemistry*, 275, 8-14.
- Zhang, P., Whistler, R. L., BeMiller, J. N., & Hamaker, B. R. (2005). Banana starch: production, physicochemical properties, and digestibility—a review. *Carbohydrate polymers*, 59(4), 443-458.
- Zhang, X. F., Wang, X., & Luo, G. H. (2017). Ultrasound-assisted three phase partitioning of phycocyanin from *Spirulina platensis*. *European Journal of Pure and Applied Chemistry*, 4(1).
- Zou, T., Wu, H., Li, H., Jia, Q., & Song, G. (2013). Comparison of microwave-assisted and conventional extraction of mangiferin from mango (*M. angifera indica* L.) leaves. *Journal of Separation Science*, 36(20), 3457-3462.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Şeyma ARAS
Doğum tarihi:	
Doğum Yeri:	
Uyruğu:	
Adres:	
Tel:	
E-mail:	
Eğitim	
Lise:	
Lisans:	
Yüksek lisans:	
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	Orta