



T.C.
OSMANIYE KORKUT ATA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hürü YÜCEL

**YEM KATKISI LİKENAZ ENZİMİ ÜRETEN
BAKTERİ İZOLASYONU VE ENZİMİN KİSMİ
KARAKTERİZASYONU**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

OSMANIYE – 2017

**T.C.
OSMANIYE KORKUT ATA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**YEM KATKISI LİKENAZ ENZİMİ ÜRETEEN BAKTERİ
İZOLASYONU VE ENZİMİN KİSMİ
KARAKTERİZASYONU**

Hürü YÜCEL

**BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**OSMANIYE
MAYIS-2017**

TEZ ONAYI

YEM KATKISI LİKENAZ ENZİMİ ÜRETEN BAKTERİ İZOLASYONU VE ENZİMİN KISMİ KARAKTERİZASYONU

Hürü YÜCEL tarafından Doç.Dr. Bahri Devrim ÖZCAN danışmanlığında Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji** Anabilim Dalı'nda hazırlanan bu çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç.Dr. Bahri Devrim ÖZCAN
Biyoloji Anabilim Dalı, OKÜ

Üye: Prof.Dr. Hüsniye AKA SAĞLIKER
Biyoloji Anabilim Dalı, OKÜ

Üye: Prof.Dr. Hasan Basri İLA
Biyoloji Anabilim Dalı, ÇÜ

Yukarıdaki jüri kararı Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Doç. Dr. Halil Zeki GÖK
Enstitü Müdürü, **Fen Bilimleri Enstitüsü**

Bu Çalışma OKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.

Proje No: OKÜBAP-2016-PT3-006

Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, çizelge ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, bu çalışma sonucunda elde edilmeyen her türlü bilgi ve ifade için ilgili kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını ve bu tezin Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlandığını bildiririm.

Hürü YÜCEL



ÖZET

YEM KATKISI LİKENAZ ENZİMİ ÜRETEN BAKTERİ İZOLASYONU VE ENZİMİN KISMİ KARAKTERİZASYONU

Hürü YÜCEL

Yüksek Lisans, Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Doç.Dr. Bahri Devrim ÖZCAN

Mayıs, 2017, 36 sayfa

Bu çalışmada, Osmaniye'den alınan toprak numunelerinden β -(1,3-1,4)-glukanaz (likenaz) enzimi üreten *Bacillus* sp. HY3 izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Likenaz enzimi optimum aktivitesini 60 °C'de ve 6.0-7.0 pH değerlerinde göstermiştir. Enzim 40-80 °C arasında ortalama %89.8'lik kalan aktivite ile oldukça stabil kalırken, 80 °C'de 15 dk ön inkübasyon sonrasında %73 kalan aktivite göstermiştir. *Bacillus* sp. HY3 en yüksek düzeyde enzim üretimini inokülasyondan itibaren 36. saatte gerçekleştirmiştir. Enzimin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ve zimogram analizleri ile 83 kDa olarak belirlenmiştir. Likenaz enzimi için MgCl₂, CaCl₂, EDTA, MnCl₂ ve FeCl₃ aktivatör olarak belirlenmiştir. HgCl₂, ZnCl₂, CuCl₂ ve CoCl₂ ise enzim aktivitesini değişik oranlarda inhibe etmiştir. Enzimin termo-stabil olması, sıcaklık ve pH optimum değerleri ve bazı kimyasal malzemelerce aktivitesinin artması ile enzim endüstriyel kullanım için uygun olabilir.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus* sp., β -(1,3-1,4)-glukanaz, likenaz, izolasyon, karakterizasyon

ABSTRACT

ISOLATION OF FEED ADDITIVE LICHENASE PRODUCING BACTERIA AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF THE ENZYME

Hürü YÜCEL
M.Sc., Department of Biology
Supervisor: Assoc.Prof.Dr. Bahri Devrim ÖZCAN

May 2017, 36 Pages

In the present study, β -(1,3-1,4)-glucanase (lichenase) producer *Bacillus* sp. HY3 was isolated from the soil samples collected from Osmaniye. The enzyme showed its optimum activity at 60 °C and 6.0-7.0 pH values. While the enzyme was quite stable between 40-80 °C with the rate of 89.8%, it showed 73% residual activity after pre-incubation at 80 °C for 15 min. The strain *Bacillus* sp. HY3 reached its maximum enzyme production after 36 hours after inoculation time. The molecular weight of the enzyme was determined as 83 kDa via SDS-PAGE and zymogram analysis. The activators for the enzyme were MgCl₂, CaCl₂, EDTA, MnCl₂ and FeCl₃, whereas the inhibitors were HgCl₂, ZnCl₂, CuCl₂ ve CoCl₂ at different rates. The enzyme may be appropriate for industrial application because of its thermo-stability, optimum temperature and pH values, and its increased activity by certain chemicals.

Key Words: *Bacillus* sp., β -(1,3-1,4)-glucanase, lichenase, isolation, characterization



Çok kıymetli aileme...

TEŞEKKÜR

Öncelikle bu tez çalışmasının yapılmasında bana büyük emeği geçen, her konuda desteğini ve Biyoloji Laboratuvarı'ndaki bütün imkânlarını sağlayan, daima gülen yüzünü esirgemeyen danışman hocam Doç.Dr. Bahri Devrim ÖZCAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bana her zaman yardımcı olan, sorunlarımı sabırla dinleyen ve hayatım boyunca yanımda olmasını isteyebileceğim nadir insanlardan olan manevi ablam Yüksek Lisans öğrencisi Zübeyde BAŞARAN'a, yine ihtiyaç duyduğumda benden yardımını esirgemeyen Yüksek Lisans öğrencisi Meryem KARADAĞLI'ya teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında minik yüreğiyle sabır gösteren ve motivasyon desteğini esirgemeyen canım kızım Aybike Zeren YÜCEL'e teşekkür ederim.

Ayrıca, benden bütün eğitimim süresince maddi manevi her türlü desteğini ve yardımını esirgemeyen sevgili annem Döne KIROĞLAN'a, sevgili babam Mehmet KIROĞLAN'a ve kız kardeşlerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından OKÜBAP-2016-PT3-006 nolu proje ile desteklenmiş olup, ilgili birime de katkılarından dolayı ayrıca teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	
TEZ BİLDİRİMİ	
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>Bacillus</i> 'lar ve Enzim Üretimi	1
1.2. Likenan ve Likenaz Enzimleri	3
1.3. Likenaz Enzimlerinin Uygulama Alanları	4
1.4. Amaç.....	4
1.5. Kapsam	4
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	5
3. MATERYAL VE YÖNTEM	9
3.1. Materyal.....	9
3.1.1. Bakteri Materyali ve Besiyerleri.....	9
3.1.2. Kimyasal ve Diğer Sarf Malzemeler	9
3.1.3. Alet ve Cihazlar	9
3.2. Yöntem	10
3.2.1. Bakterinin İzolasyonu ve Likenaz Aktivitesinin Belirlenmesi	10
3.2.2. Enzim Analizleri.....	11
3.2.3. Enzimin Aktivite Gösterdiği Optimum Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi	12
3.2.4. Enzimin Aktivite Gösterdiği Optimum pH Değerlerinin Belirlenmesi	13
3.2.5. Enzimin Sıcaklık Stabilite Değerlerinin Belirlenmesi	14
3.2.6. Çeşitli Kimyasalların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	15

3.2.7. Zamana Göre Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	16
3.2.8. Enzimin Moleküler Ağırlığının Belirlenmesi	17
3.2.8.1. Bakteriden Protein Örneğinin Hazırlanması	17
3.2.8.2. SDS-PAGE ve SDS-Likenan-PAGE'nin Hazırlanması	18
3.2.8.3. Protein Örneklerinin Elektrofrez	19
3.2.3.4. Elektrofrez Sonrası İşlemler	19
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	20
4.1. Likenaz Üreten Bakterilerin İzolasyonu	20
4.2. Likenaz Enzimine Ait Bazı Özellikler	21
4.2.1. Enzimin Optimum pH Değeri.....	21
4.2.2. Enzimin Optimum Sıcaklık Değeri	22
4.2.3. Enzimin Sıcaklık Stabilitesi.....	23
4.2.4. Zamana Göre Enzim Aktivitesi	24
4.2.5. Kimyasalların Likenaz Aktivitesine Etkisi	25
4.3. Enzimin Moleküler Ağırlığı.....	28
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	30
5.1. Sonuçlar	30
5.2. Öneriler	30
KAYNAKLAR	31
ÖZGEÇMİŞ	36

ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo1.1. Bazı *Bacillus* türleri ve ürettikleri ekstraselüler enzimler 2

Tablo 4.1. Bazı kimyasal maddelerin HY3 likenazı üzerine etkisi..... 28



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Likenanın molekül yapısı.....	3
Şekil 4.1. Likenan içeren LB-agar plağında izolatlara ait likenaz aktivite zonları	20
Şekil 4.3. Bacillus sp. HY3 likenazına ait sıcaklık optimumu grafiği	22
Şekil 4.4. Bacillus sp. HY3 likenazına ait sıcaklık stabilite grafiği	23
Şekil 4.5. Bacillus sp. HY3 bakterisine ait zamana göre hücre yoğunluğu ve likenaz aktivite grafiği	25
Şekil 4.6. Bazı kimyasalların HY3 likenaz aktivitesi üzerine etkisi	26
Tablo 4.1. Bazı kimyasal maddelerin HY3 likenazı üzerine etkisi.....	26
Şekil 4.7. Bacillus sp. HY3 likenaz enziminin zimogram analizi.....	28



SİMGELER VE KISALTMALAR

EDTA	Etilendiaminotetraasetik asit
TCA	Trikloro asetik asit
kDa	Kilodalton
L	Luria besiyeri
LB	Luria Bertani
rpm	Dakikada devir sayısı
sp.	Tür
spp.	Türleri
Tris	2-Amino-2-Hidroksimetilpropan-1,3-diol
M	Molar
mM	milimolar
U/mg	Ünite/miligram
U/ml	Ünite/mililitre
UV	Ultra violat
v/v	Hacim/hacim
w/v	Ağırlık/hacim
DNS	Dinitro salisilik asit
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
Na-asetat	Sodyum asetat
Na-fosfat	Sodyum fosfat
OD	Optikal densite
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat

1. GİRİŞ

Ekstraselüler enzimlerin endüstriyel boyutta üretilmelerinde mikroorganizmaların kullanımı 20. yy'ın başında başlamıştır. Moleküler genetik tekniklerinin henüz kullanılmadığı bu dönemlerde enzim üretiminin maksimum seviyeye çıkarılması için daha çok fermentasyon koşullarının iyileştirilmesi üzerinde duruluyordu (Priest, 1987). Moleküler genetik tekniklerinin kullanılmaya başlamasından sonra enzim üretiminde sorumlu genler mikroorganizmalarda klonlanarak, enzimlerin endüstriyel boyutta daha saf ve daha ucuz bir şekilde üretilmeleri mümkün hale gelmiştir. Her ne kadar enzim üretiminde bitkisel ve hayvansal dokular kullanılsa da, enzim üretiminde mikroorganizmaların kullanımı daima başı çekmiştir. Mikroorganizmaların enzim üretiminde kullanılmalarının daha cazip olması, mikrobiyal kökenli enzimlerin katalitik aktivitelerinin daha yüksek olması, daha stabil olmaları, daha az masrafla daha bol üretilibilmeleri ve istenmeyen yan ürün oluşturmamaları ile açıklanabilir (Wiseman, 1987). Buna ilave olarak toprak işleme etkinliği, iklim, gelişim döngüsü, ulusal ve uluslararası politikalar bitkisel kökenli enzimlerin; yerli gen kaynaklarının korunması ve hayvansal dokuların ticaretindeki mevcut riskler (viral patojenler v.b.) ise hayvansal kökenli enzimlerin üretimini kısıtlaması enzim üretiminde mikroorganizmaların kullanılmasını daha da cazip hale getirmektedir (Godfrey ve West, 1996). Mikrobiyal kökenli enzimler arasında alkalin proteaz yıllık %25 kullanım ile başı çekmektedir. Bunu diğer proteazlar (%21), amilaz (%18), rennin (%10), tripsin (%3), lipaz (%3) ve diğer karbonhidrat parçalayan enzimler (selülaz ve ksilanaz, %10) takip etmektedir (Rao vd., 1998). Enzim üretiminde *Bacillus* ve fungus türleri en yoğun kullanılan mikroorganizmalardır.

1.1. *Bacillus* 'lar ve Enzim Üretimi

Bacillus 'lar gram-pozitif, endospor oluşturan, aerobik veya fakültatif anaerobik, çubuk şeklinde, çürükçül, *B. anthracis* ve *B. cereus* haricinde toksin üretmeyen, insanlar için patojenik olmadığı kabul edilen bakterilerdir (Sneath, 1986). *Bacillus* 'lar başta amilazlar, selülazlar, nötral proteazlar ve alkalin proteazlar olmak

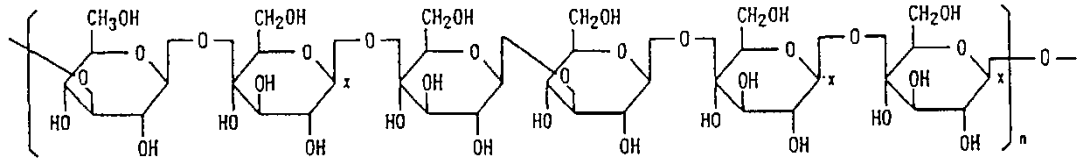
üzere pek çok enzimin üreticisi durumundadırlar. Bazı *Bacillus* türleri ve ürettikleri enzimler Tablo 1.1’de verilmiştir.

Tablo1.1. Bazı *Bacillus* türleri ve ürettikleri ekstraselüler enzimler (Priest, 1977)

Enzim	Tür	Fonksiyon
Agaraz	<i>Bacillus</i> sp. <i>B. amyloliquefaciens</i> <i>B. caldolyticus</i> <i>B. coagulans</i> <i>B. licheniformis</i>	B-1,4 bağlı agarın hidrolizi
α -Amilaz	<i>B. macerans</i> <i>B. stearothermophilus</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. subtilis</i> var. <i>amylosacchariticus</i> Alkalophilic <i>Bacillus</i> spp.	Polisakaritlerde α -1,4- glukosidik bağların endohidrolizi
β -amilaz	<i>B. cereus</i> <i>B. megaterium</i> <i>B. polymyxa</i>	Polisakaritlerde α -1,4- glukosidik bağların endohidrolizi ile β -maltoz üretimi
Arabinaz	<i>B. subtilis</i> <i>B. brevis</i>	Arabinanın hidrolizi
Selülaz	<i>B. firmus</i> <i>B. polymyxa</i> <i>B. pumilus</i> <i>B. subtilis</i>	Karboksimetil selülozun sellobiyoza hidrolizi
Kitinaz	<i>B. circulans</i>	Kitinin hidrolizi
Kitozanaz	<i>Bacillus</i> sp. R-4	<i>Rhizopus</i> spp. hücre duvarının hidrolizi
β -1,3-glukanaz	<i>B. circulans</i> <i>B. polymyxa</i> <i>B. subtilis</i> Alkalofilik <i>Bacillus</i> sp.	Laminarin ve ilgili glukanlardaki β -1,3- glükosidik bağların endohidrolizi
β -1,6-glukanaz	<i>B. circulans</i>	Pustulan ve ilgili glukanların hidrolizi
İzoamilaz	<i>B. amyloliquefaciens</i> <i>B. polymyxa</i>	Glikojen, amilopektin gibi α -1,6-glikosidik dallanmış bağların hidrolizi
Likenaz	<i>B. pumilus</i>	Likenanda β -1,4-glükosidik bağların hidrolizi
Maltaz	<i>B. subtilis</i>	Maltaz ve maltotriozda bulunan α -1,4 bağların hidrolizi
Mannanaz	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Mannanda bulunan β -1,4-mannosidik bağların endohidrolizi
Pektat liyaz	<i>B. circulans</i> <i>B. polymyxa</i> <i>B. pumilus</i> <i>B. sphaericus</i> <i>B. stearothermophilus</i> <i>B. subtilis</i> Alkalofilik <i>Bacillus</i> sp.	Poligalakturonik asitin endo bölünmesi
Pullulanaz	Alkalofilik <i>Bacillus</i> sp. <i>B. amyloliquefaciens</i> <i>B. firmus</i>	Pullulanda bulunan α -1,6 bağlarının endohidrolizi
Ksilanaz	<i>B. polymyxa</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. subtilis</i> var. <i>amylosacchariticus</i>	Ksilanın hidrolizi

1.2. Likenan ve Likenaz Enzimleri

Likenanlar (β -1,3-1,4-D-glukan) tahıl endospermelerinin hücre duvarı yapısında bulunan, tahıl danelerinin kuru ağırlığının %5.5'ini, arpa endospermide bulunan karbonhidratların ise %75'ini oluşturan lineer polisakkaritlerdir (McCleary, 1988) (Şekil 1. 1). Tahılların hücre duvarında bulunan birçok β -1,3-1,4-glukanlar yaklaşık olarak %30 β -(1,3)- ve %70 β -(1,4)-glikosil bağlardan oluşmaktadır (Yoo vd., 2007).



Şekil 1.1. Likenanın molekül yapısı

β -glukanların biyodegradasyonları dört farklı β -glukanaz tarafından gerçekleştirilmektedir: β -1,3-D-glukan 3-glukanohidrolaz (laminarinaz, E.C. 3.2.1.39), β -1,4-D-glukan 4-glukanohidrolaz (selülaz, E.C. 3.2.1.4), endo- β -1,3-1,4-glukanaz (likenzaz, E.C.3.2.1.73) ve β -1,3(4)-glukanaz. Bu enzimlerden ilk üç tanesi endo-tip enzimler olup β -1,3-1,4-glukanları hidroliz etmektedir. β -1,3(4)-glukanaz ise hem β -1,3-1,4-glukanı, hem de β -1,3-glukanı hidroliz etmektedir (Kim vd., 2014).

Endo- β -1,3-1,4-glukanaz (likenzaz) enzimi selülaz ve kitozanaz enzimlerini de barındıran glikozil hidrolaz familya 8'in bir üyesidir (Kim vd., 2014). Likenzaz, 3- β -glukanda bulunan β -1,4-glikozidik bağları hidrolize ederek sellobiyosiltroz ve selotrioziltetraoz üretirken, selülaz, laminarinaz ve β -1,3(4)-glukanaz sırasıyla β -D-glukandaki 1,4-bağlarını, 1,3-bağlarını ve 1,3- veya 1,4-bağlarını hidroliz etmektedirler (Anderson ve Stone, 1975).

1.3. Likenaz Enzimlerinin Uygulama Alanları

Likenaz enzimi bira üretiminde, yüksek moleküler ağırlıkta β -glukan içeren bira lapasının viskozitesini ve bulanıklığını azaltmak için kullanılmaktadır (Planas, 2000). Bu işlem esnasında, amilaz enzimleri endosperm hücrelerinde bulunan nişastaya kolayca ulaşarak daha etkin bir hidrolizasyon gerçekleştirir (Gözükara, 2009). Likenaz enzimleri ayrıca çiftlik hayvanlarının beslenmesinde arpa içeren yemlerin sindirilebilirliğinin ve dolayısıyla yemden yararlanma etkinliğini artırmak için kullanılmaktadır (Beckmann vd., 2006). Arpaya dayalı yemlemede likenaz enzimlerinin kullanımının sindirilebilirliği artırmanın yanında, olası sağlık sorunlarını da azaltabileceği bildirilmiştir (Zhang vd., 2006). Bunlara ilave olarak likenazlar deterjan sanayinde β -glukan lekelerinin uzaklaştırılması amacıyla da kullanılmaktadır (Chaari vd., 2012).

1.4. Amaç

Çalışmanın amacı, likenaz enzimi üreten bakterilerin topraktan izolasyonu ve enzimlerin kısmi karakterizasyonunu gerçekleştirerek endüstriyel kullanıma uygunluğunun araştırılmasıdır.

1.5. Kapsam

Çalışmanın kapsamı aşağıda maddeler halinde verilmiştir:

1. Likenaz enzimlerini üreten *Bacillus* sp. bakterilerinin topraktan izolasyonunu gerçekleştirmek.
2. Enzimlerin kısmi karakterizasyonunu gerçekleştirmek (sıcaklık optimumu, pH optimumu, sıcaklık direnci, zamana göre enzim aktivitesi, enzim aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Flint vd. (1993), *Ruminococcus flavefaciens* 15 DNA fragmentinde birbirine komşu bölgelerin ksilanaz ve likenaz enzimlerini kodladıklarını bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu fragmentin sekanslanması sonucunda her iki enzim aktivitesinin 2.406 bç'nden oluşan tek bir gen tarafından şifrelendiğini bildirmişlerdir.

Louw vd. (1993), *B. brevis* genomunda bulunan ve likenaz enzimini kodlayan geni *E. coli*'de klonlayarak sekanslamışlardır. Araştırmacılar genin 759 nükleotitten ve kodladığı enzimin ise 252 aminoasitten meydana geldiğini, enzimin optimum aktivitesinin 65-70 °C sıcaklık ve 8-10 pH aralıklarında gözlendiğini, enzimin 75 °C'de 1 saat ön inkübasyonu sonrasında %75 kalan aktivite gösterdiğini ve son olarak enzimin moleküler ağırlığının SDS-PAGE'de 29 kDa olarak belirlendiğini bildirmişlerdir.

Zhang vd. (2006), *B. subtilis* ZJF-1A5 suşuna ait β -1,3-1,4-glukanaz enziminin termo-stabilitesini artırmak için yönlendirilmiş mutasyon tekniğini uygulamışlardır. Araştırmacılar yönlendirilmiş mutasyon işleminden sonra 4 ve 5 aminoasit substitüsyona sahip 2 adet mutant varyant (EGs1 ve EGs2) elde etmişlerdir. Araştırmacılar bu substitüsyonların EGs1 ve EGs2'in erime sıcaklıklarını (T_m) 62. 5 °C'den sırasıyla 65. 5 ve 67. 5 °C'ye çıkardığını bildirmişlerdir.

Aşan ve Özcan (2007), kanatlı hayvanlar için rekombinant bir probiyotik geliştirmek amacıyla β -(1,3-1,4)-glukanaz (likenaz) genini taşıyan TL1R plazmit DNA'sını *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*'a aktarmışlardır. Araştırmacılar bu klonlama sonucunda enzimin sıcaklığa karşı bir direnç kazandığını ve 70 °C'de 15 dk inkübasyon sonucunda aktivitesini tamamen koruduğunu, buna karşılık aynı genin daha önce klonlandığı *Lactococcus lactis* ve *Escherichia coli* bakterilerinden izole edilen enzimlerin aynı kararlılığı göstermediğini bildirmişlerdir.

Khan vd. (2007), *Thermotoga maritima* MSB8 bakterisi genomunda bulunan endoglukanaz genini *E. coli* bakterisinde klonlayarak eksprese etmişlerdir. Araştırmacılar enzimin likenan ve arpa β -glukanı içindeki karışık β -1,3-1,4 bağlarını

etkili bir şekilde hidroliz ettiğini, buna karşılık kristalin selüloz ve laminarine karşı aktivite gösteremediğini, CMC'ye karşı ise kayda değmeyecek oranda bir aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Qiano vd. (2010), *B. subtilis* MA139 bakterisine ait likenaz genini alkoloksidaz 1 promotörü kontrolünde *P. pastoris* X-33 bakterisinde klonlamışlar ve eksprese etmişlerdir. Araştırmacılar 10 L kapasiteli fermentör içerisinde β -1,3-1,4-glukanaz geninin metanolün de indüksiyonu ile 95 saatte 15.000 U/ml ürün verdiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca rekombinant likenaz enziminin optimum aktivitesini 40 °C ve 6.4 pH'da gösterdiğini, enzimin bazı metal iyonlarından etkilenmediğini ve bu özellikleri ile enzimin hayvan besleme ve bira üretiminde kullanım için uygun olabileceğini bildirmişlerdir.

Çömlekçioğlu vd. (2011), β -(1,3-1,4)-glukanaz genini kodlayan geni (*licA*) *Orpinomyces* sp. GMLF18'den izole ederek *E. coli*'de klonlamışlardır. Araştırmacılar *licA*'nın DNA diziliminin 707 bp uzunluğunda bir gen olduğunu ve bu gen ürününün 26 kDa büyüklüğünde olan glikozil hidrolaz ailesine ait bir proteini kodladığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar LicA enziminin 5.0-6.0 pH aralığında ve 40-50 °C aralığında en yüksek aktivitesine ulaştığını, 40 °C'de stabilitesini korurken 50 °C'de 20 dk içinde %12'sini kaybettiğini bildirmişlerdir. Son olarak araştırmacılar geni pIL253 plazmit DNA'sı yardımıyla fakültatif anaerob bakteri olan *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363'e aktardıklarını da bildirmişlerdir.

Chaari vd. (2012), termo-stabil ve alkali-stabil iki adet likenaz enzimini (EG1 ve EG2) yeni izole ettikleri *Bacillus licheniformis* UEB CF bakterisinden saflaştırmışlardır. Araştırmacılar EG1 ve EG2'nin moleküler ağırlıklarını sırasıyla 30 ve 55 kDa olarak belirlemişlerdir. Araştırmacılar ayrıca her iki enzimin de optimum sıcaklık ve optimum pH değerlerini yine aynı sırayla 70 °C ile 5.0, 60 °C ile 7.0 olarak bildirmişlerdir. Son olarak araştırmacılar her iki enzimin de arpa β -glukan ve likenanına karşı oldukça aktif, bununla birlikte CMC ve laminarine karşı inaktif olduklarını, non-iyonik sürfaktanlara ve oksitleyici ajanlara karşı dirençli olduklarını, birçok ticari katı deterjanlara karşı oldukça dayanıklı olduklarını ve bu sebeple deterjan sanayisi için oldukça uygun bir enzim olduklarını da bildirmişlerdir.

Gözükara ve Arıkan (2012), izole ettikleri termofil *Bacillus* sp. suşlarından likenaz enziminin izolasyonunu ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişler, bakterilerin farklı sıcaklık ve pH değerlerinde katı besiyerinde üreme ve enzim üretme yeteneklerini araştırmışlardır. Araştırmacılar enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık ve pH değerlerinin sırasıyla 100 °C ve 6.0 olduğunu, enzimin 24 saat süreyle 55 °C’de pH 3.0-6.0 aralığında ortalama %88 kalan aktivite gösterdiğini, bu özellikleri ile tavuk yemi hazırlama alanında öncelikle kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Tang vd. (2012), termofilik *Rhizomucor miehei* CAU432 bakterisine ait likenaz enzimini saflaştırarak karakterize etmişlerdir. Araştırmacılar enzimin en yüksek seviyede üretiminin 6230 U/mL ile yulaf ununun karbon kaynağı olarak kullanıldığı ortamda ve 50 °C’de gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar enzimin moleküler ağırlığının SDS-PAGE ve jel filtrasyon teknikleri ile sırasıyla 35.4 ve 33.7 kDa olarak belirlendiğini, optimum pH ve sıcaklık değerlerinin sırasıyla 5.5 ve 60 °C olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar son olarak likenazı kodlayan geni klonladıklarını ve enzimin aminoasit sekansının *Paecilomyces thermophila* tarafından üretilen likenaz enziminin aminoasit sekansı ile %50 oranında benzerlik gösterdiğini de bildirmişlerdir.

Kim vd. (2014), bir toprak metagenomik kütüphanesinden likenaz genini (mt-lic) tanımlamışlardır. Araştırmacılar genin *B. circulans* WL-12 suşuna ait endo-β-1,3-1,4-glukanazı kodlayan bgc geni (likenaz ve kitosanaz aktivitelerinin her ikisine de sahip) ile yüksek derecede homoloji gösterdiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar geni *E. coli*’de klonladıklarını, genin bu bakteride eksprese olarak hem β-glukan hem de likenanı hidroliz ettiklerini bildirmişlerdir. Ayrıca maksimum aktivitesini 6.0 pH ve 50 °C’de gösterdiğini belirttikleri enzimin, Mn(2+), Ca(2+) ve Fe(2+) ile stimüle edildiğini, buna karşılık Cu(2+) ve Zn(2+) ile ise inhibe edildiğini de bildirmişlerdir.

Maktouf vd. (2015), yeni izole ettikleri *Bacillus* UEB-S bakterisinden sıcaklığa dirençli ve alkalik likenaz enzimini izole etmişlerdir. Araştırmacılar enzimin 28 kDa ağırlığında monomerik bir protein olduğunu, optimum pH ve sıcaklık değerlerinin ise sırasıyla 6.0 ve 60 °C olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca enzimin geniş bir sıcaklık ve pH stabilitesi olduğunu, enzimin 90 °C’de 30 dk ön inkübasyon

sonucunda %60 kalan aktivite gösterdiğini, enzimin üretiminden sorumlu genin sekansı ile *B. subtilis* 168 suşunun likenaz geni sekansının %98 oranında benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir.

Gao (2016), *Bacillus licheniformis* GZ-2 bakterisinden saflaştırdıkları likenaz enziminin spesifik aktivitesini 8231.3 U/mg olarak bildirmiştir. Araştırmacı enzimin SDS-PAGE'de 25 kDa büyüklüğünde tek bir protein bandı ürettiğini, optimum sıcaklık ve pH değerlerinin sırasıyla 60 °C ve 6.5 olduğunu, Km ve Vmax değerlerinin likenaz için sırasıyla 5.11 mg/ml ve 2097 µmol/min/mg ve arpa β-glukanı için 7.42 mg/ml ve 1440 µmol/min/mg olarak bildirmiştir. Son olarak araştırmacı likenaz genini pET 28a klonlama vektörü ile *E. coli* BL21 bakterisinde klonlayarak sekansladığını, genin 642 bç'nden ve ürettiği enzimin ise 214 aminoasitten meydana geldiğini bildirmiştir.

Elgharbi vd. (2017), yeni izole ettikleri *B. pumilus* US570 suşundan β-1,3-1,4-glukanaz (GluUS570) enzimini saflaştırmışlardır. Araştırmacılar enzimin geniş bir pH ve sıcaklık aralığında aktif olduğunu ve 80 °C'de 30 dk ön inkübasyon sonucunda oldukça kararlı kaldığını bildirmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar enzimin trimerik formda ve 75 kDa ağırlığında olduğunu, trimerik formda izole edilen ve karakterize edilen ilk bakteriyel likenaz olduğunu da bildirmişlerdir. Son olarak araştırmacılar likenaz genini amplifiye ederek klonladıklarını, genin 732 bç uzunluğunda olduğunu, kodladığı enzimin ise 243 aminoasitten meydana geldiğini, *B. licheniformis* likenazı ile de %97 oranında homoloji gösterdiğini bildirmişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bakteri Materyali ve Besiyerleri

Bacillus sp. HY3 bakterisi bu çalışma kapsamında, Osmaniye Bölgesinden toplanan toprak numunesinden izole edilmiştir. Bakteriler LB (%10 w/v bakto tripton, %5 w/v maya ekstraktı, %10 w/v NaCl, pH 7.5) ve LB-agar (%1.5 w/v agar) besiyerinde üretilmiştir. Likenaz aktivitesinin belirlenmesi için LB-agar besiyerine %0.1 (w/v) likenaz eklenmiştir. Bakteri kültürleri mastır plaklarda +4 °C'de, gliserol stokta (%15 v/v) ise -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.2. Kimyasal ve Diğer Sarf Malzemeler

Çalışmada kullanılan kimyasal ve diğer sarf malzemeler aksi belirtilmedikçe Sigma-Aldrich, Fluka, Merck, Ambresco, Axygen, Brand, Eppendorf, Fırat Plastik ve Isolab'dan satın alma yoluyla temin edilmiştir.

3.1.3. Alet ve Cihazlar

Çalışmada kullanılan inkübatörler (Nüve ve Memmert), su banyoları (Memmert), santrifüj (Hettich), manyetik karıştırıcı (Ika), vorteks (Ika), pH metre (Hanna), otoklav (Hirayama), saf su cihazı (Labor Şimşek), buzdolapları (Arçelik), çalkalayıcı (Ika), elektroforez takımı ve güç kaynağı (Atto) çalışmanın yapıldığı Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Laboratuvarı'nda mevcut bulunmaktadır. Yine çalışmada kullanılan spektrofotometre (Pharmacia) ise ihtiyaç duyulduğu zamanlarda Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootehni Bölümü Hayvansal Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Bakterinin İzolasyonu ve Likenaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Likenaz üreten bakterinin izolasyonu aşağıda verilen protokol uyarınca yapılmıştır:

1. Osmaniye’de OKÜ kampüs alanından alınan toprak numunesi kapalı bir kap içinde çalışmanın yapılacağı laboratuvara taşınmıştır.
2. Toprak numunesinden 1 g tartılarak alınmış ve üzerlerine 10 ml steril saf su eklenerek iyice karıştırılmıştır.
3. Tortunun çökmesi için bir müddet beklenmiş ve sonrasında üstte kalan sıvı kısımdan 500 µl alınarak bir eppendorf tüpünün içinde 80 °C’ye ayarlanmış su banyosunda 10 dk inkübe edilmiştir (pastörizasyon).
4. Pastörüze edilen numunenin tamamı steril mikropipetle 25 ml hacimli LB besiyerlerine aktarılmıştır.
5. LB besiyeri 37 °C’ye ayarlanmış inkübatörde orta çalkalama hızında 12 saat süreyle inkübe edilmiş ve böylece bakteri sporlarının çimlenmeleri sağlanmıştır.
6. Üremiş olan bakteri kültüründen seri sulandırmalar yapılmış ve 10^{-3} , 10^{-4} ve 10^{-5} oranlarında sulandırılmış örneklerden likenan içeren LB-agar besiyerlerine 100’er µl olacak şekilde cam çubukla yayma yöntemiyle ekimleri yapılmıştır.
7. Ekimleri tamamlanan plaklar ters çevrilerek 37 °C’ye ayarlanmış inkübatörde ertesi güne kadar inkübasyona bırakılmıştır.
8. Ertesi gün plaklarda gelişmiş olan bakteri kolonileri steril kürdanlarla tek tek toplanarak numaralandırılmış LB-likenan-agar plaklarına ikişer kopya olacak şekilde aktarılmışlardır.

9. Ekimi tamamlanan plaklar tekrar 37 °C’de ertesi güne kadar inkübasyona bırakılmışlardır.
10. Ertesi gün bakterilerden birer kopyasının ekili olduğu plaklar alınarak bakteri kolonilerinin üzerini örtecek şekilde Kongo kırmızısı solüsyonu (%0.1 w/v Kongo kırmızısı) dökülmüştür ve oda sıcaklığında 15 dk süreyle beklenmiştir.
11. Süre sonunda plakta bulunan boya dökülerek bu sefer petri kabının içine fazla boyanın uzaklaşması için 1 M NaCl solüsyonu eklenmiş ve 15 dk daha beklenmiştir.
12. Süre sonunda NaCl solüsyonu dökülmüş ve plak negatoskop (ışık panosu) üzerinde incelenmiştir.
13. Kırmızıya boyanan zeminde etrafında sarımtırak zon oluşturan koloniler likenaz pozitif bakteriler olarak belirlenmiştir.

3.2.2. Enzim Analizleri

Enzim analizlerinde aşağıda verilen solüsyonlar kullanılmıştır:

- a) Bakteri süpernatantı: LB sıvı besiyerinde 24 saat süreyle üretilmiş olan bakteri kültürünün 4950 rpm’de santrifüj edilmesiyle elde edilen ve enzim içeren sıvı üst faz.
- b) Substrat (%2’lik): 0.02 g likenan tartılarak deney tüpüne konur. Substrat kontrolde üzerine 2 ml Na-fosfat bafır, enzim+substrat tüplerine ise 1 ml Na-fosfat bafır ve 1 ml bakteri süpernatantı ilave edilir.
- c) DNS solüsyonu: 10 g dinitro salisilik asit, 2 g fenol, 0.5 g NaSO₃, 200 g sodyum-potasyum tartarat, 500 ml %2’lik NaOH çözeltisi içinde çözülerek saf su ile 1000 ml’ye tamamlanır.
- d) Na-asetat solüsyonları (pH analizleri için): 5.0 ve 6.0 pH değerlerinde 50’şer mM olacak şekilde ayrı ayrı hazırlanmıştır.

- e) Na-fosfat solüsyonları (pH analizleri için): 6.0, 7.0 ve 8.0 pH değerlerinde 50'şer mM olacak şekilde ayrı ayrı hazırlanmıştır.
- f) Tris-base solüsyonları (pH analizleri için): 8.0, 9.0, 10.0, 11.0 ve 12.0 pH değerlerinde 50'şer mM olacak şekilde ayrı ayrı hazırlanmıştır.

3.2.3. Enzimin Aktivite Gösterdiği Optimum Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi

Enzimlerin aktivite gösterdiği optimum sıcaklık değerlerinin belirlenmesi aşağıda verilen protokol uyarınca yapılmıştır:

1. İçine 0.02'şer g likenan tartılan 10 ml hacimli cam tüpler içinde 1 ml bakteri süpernatantı ve 1 ml Na-fosfat bafır (50 mM, pH'sı 6.5) eklenmiştir (ES, 5 tüp).
2. 10 ml hacimli cam tüpler içinde 1 ml bakteri süpernatantı 1 ml Na-fosfat bafır (50 mM, pH: 6.5) ile karıştırılarak enzim kontrolü (EK) hazırlanmıştır (4 tüp)
3. İçine 0.02'şer g likenan tartılan 10 ml hacimli cam tüpler içinde 2 ml Na-fosfat bafır (50 mM, pH'sı 6.5) eklenerek substrat kontrolü (SK) hazırlanmıştır (4 tüp).
4. 10 ml hacimli cam tüpler içinde 2 ml Na-fosfat bafır (50 mM, pH: 6.5) hazırlanmıştır (Kontrol, 1 tüp).
5. Tüplerin tamamı vortekslendikten sonra 30 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 30 dk süreyle inkübasyona bırakılmıştır.
6. Süre sonunda tüpler su banyosundan uzaklaştırılarak bütün örnekler 3'er ml DNS solüsyonu eklenmiş ve vortekslendikten sonra 5 dk süreyle kaynar suda inkübe edilmiştir.
7. Aynı işlemler sırasıyla 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 °C sıcaklık değerleri için de tekrarlanmıştır.
8. Örnekler soğuduktan sonra kontrol grupları (K) kör olarak kullanılmış ve tüm örnekler spektrofotometrede OD₅₄₀ nm dalga boyunda ölçülmüştür.
9. ES ortalama değerlerinden SK ortalama değerleri ile EK ortalama değerleri çıkarılarak enzim aktivitelerinden kaynaklanan absorbans değerleri elde edilmiştir.
10. En yüksek aktivite değeri 100 olarak kabul edilmiş ve diğer değerlerin relatif aktivite değerleri hesaplanmıştır.

3.2.4. Enzimin Aktivite Gösterdiği Optimum pH Değerlerinin Belirlenmesi

Enzimlerin aktivite gösterdiği optimum pH değerlerinin belirlenmesi aşağıda verilen protokol uyarınca yapılmıştır:

1. İçine 0.02'şer g likenan tartılan 10 ml hacimli cam tüplere 1 ml bakteri süpernatantı ve 1 ml Na-asetat bafır (50 mM, pH: 5.0) eklenerek hazırlanmıştır (ES, 5 tüp).
2. 10 ml hacimli cam tüplere 1 ml bakteri süpernatantı 1 ml Na-asetat bafır (50 mM, pH: 5.0) ile karıştırılarak enzim kontrolü (EK) hazırlanmıştır (4 tüp).
3. İçine 0.02'şer g likenan tartılan 10 ml hacimli cam tüplere 2 ml Na-asetat bafır (50 mM, pH: 5.0) eklenerek substrat kontrolü (SK) hazırlanmıştır (4 tüp).
4. 10 ml hacimli cam tüpler içinde 2 ml Na-asetat bafır (50 mM, pH: 5.0) hazırlanmıştır (Kontrol, 1 tüp).
5. Tüplerin tamamı vortekslendikten sonra optimum sıcaklık değerine (60 °C) ayarlanmış su banyosunda 30 dk süreyle inkübasyona bırakılmıştır.
6. Süre sonunda tüpler su banyosundan uzaklaştırılarak bütün örnekler 3'er ml DNS solüsyonu eklenmiş ve vortekslendikten sonra 5 dk süreyle kaynar suda inkübe edilmiştir.
7. Aynı işlemler sırasıyla diğer pH değerlerinde hazırlanan solüsyonlar (Na-asetat, pH 6.0; Na-fosfat, pH 6.0, 7.0 ve 8.0; Tris, pH 8.0, 9.0, 10.0, 11.0 ve 12.0) kullanılarak tekrarlanmıştır.
8. Örnekler soğuduktan sonra kontrol grubu (K) kör olarak kullanılmış ve tüm örnekler spektrofotometrede OD₅₄₀ nm dalga boyunda ölçülmüştür.
9. ES ortalama değerlerinden SK ortalama değerleri ile EK ortalama değerleri çıkarılarak enzim aktivitelerinden kaynaklanan absorbans değerleri elde edilmiştir.
10. En yüksek aktivite değeri 100 olarak kabul edilmiş ve diğer değerlerin relatif aktivite değerleri hesaplanmıştır.

3.2.5. Enzimin Sıcaklık Stabilite Değerlerinin Belirlenmesi

Enzimlerin sıcaklık stabilite değerlerinin belirlenmesi aşağıda verilen protokol uyarınca yapılmıştır:

1. Enzim içeren bakteri süpernatantından yetecek kadar miktar hesaplanarak alınmış ve 40 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 15 dk süreyle ön inkübasyona tabi tutulmuştur.
2. İçine 0.02'şer g likenan tartılan 10 ml hacimli cam tüpler için ön inkübasyona tabi tutulmuş 1 ml bakteri süpernatantı ile 1 ml Na-fosfat bafır (50 mM, pH: 6.5) eklenerek enzim + substrat örnekleri (ES)(5 tüp) hazırlanmıştır.
3. 10 ml hacimli cam tüpler içinde ön inkübasyona tabi tutulmuş 1 ml bakteri süpernatantı ile 1 ml Na-fosfat bafır (50 mM, pH: 6.5) ile karıştırılarak enzim kontrolü (EK) hazırlanmıştır (4 tüp)
4. İçine 0.02'şer g likenan tartılan 10 ml hacimli cam tüpler içinde 2 ml Na-fosfat bafır (50 mM, pH: 6.5) ile karıştırılarak substrat kontrolü (SK) hazırlanmıştır (4tüp).
5. 10 ml hacimli cam tüpler içine 2 ml Na-fosfat bafır (50 mM, pH: 6.5) hazırlanmıştır eklenerek (Kontrol, 1 tüp).
6. Tüplerin tamamı vortekslendikten sonra optimum sıcaklık değerine (60 °C) ayarlanmış su banyosunda 30 dk süreyle inkübasyona bırakılmıştır.
7. Süre sonunda tüpler su banyosundan uzaklaştırılarak bütün örnekler 3'er ml DNS solüsyonu eklenmiş ve vortekslendikten sonra 5 dk süreyle kaynar suda inkübe edilmiştir.
8. Aynı işlemler sırasıyla 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 °C sıcaklık değerlerinde 15 dk süreyle ön inkübasyona tabi tutulmuş bakteri süpernatantları kullanılarak tekrarlanmıştır.
9. Örnekler soğuduktan sonra kontrol grubu (K) kör olarak kullanılmış ve tüm örnekler spektrofotometrede OD₅₄₀ nm dalga boyunda ölçülmüştür.
10. ES ortalama değerlerinden SK ortalama değerleri ile EK ortalama değerleri çıkarılarak enzim aktivitelerinden kaynaklanan absorbans değerleri elde edilmiştir.

11. En yüksek aktivite değeri 100 olarak kabul edilmiş ve diğer değerlerin relatif aktivite değerleri hesaplanmıştır.

3.2.6. Çeşitli Kimyasalların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Farklı kimyasal maddelerin enzim aktiviteleri üzerine etkilerinin belirlenmesi aşağıda verilen protokol uyarınca yapılmıştır:

1. Bakteri süpernatantı 10 eşit kısma ayrılmış ve her birine CaCl_2 , MgCl_2 , ZnCl_2 , CoCl_2 , FeCl_3 , CuCl_2 , MnCl_2 , HgCl_2 ve EDTA kimyasalları son konsantrasyonları 1 mM olacak şekilde ilave edildikten sonra oda sıcaklığında 30 dk süreyle ön inkübasyona bırakılmışlardır. Onuncu parça süpernatant kontrol grubu olarak belirlenmiş ve hiçbir kimyasal madde eklenmemiştir.
2. İçine 0.02'şer g likenan tartılan 10 ml hacimli cam tüpler içinde 1 ml bakteri süpernatantı (kimyasal madde ile ön inkübasyona bırakılmış) ve 1 ml Na-fosfat bafir (50 mM, pH: 6.5) karıştırılarak hazırlanmıştır (ES, 5 tüp).
3. 10 ml hacimli cam tüpler içinde 1 ml bakteri süpernatantı (kimyasal madde ile ön inkübasyona bırakılmış) 1 ml Na-fosfat bafir (50 mM, pH: 6.5) ile karıştırılarak enzim kontrolü (EK) hazırlanmıştır (4 tüp).
4. İçine 0.02'şer g likenan tartılan 10 ml hacimli cam tüpler içine 2 ml Na-fosfat bafir (50 mM, pH: 6.5) ilave edilerek substrat kontrolü (SK) hazırlanmıştır (4 tüp).
5. 10 ml hacimli cam tüpler içinde 2 ml Na-fosfat bafir (50 mM, pH: 6.5) ilave edilerek hazırlanmıştır (Kontrol, 1 tüp).
6. Tüplerin tamamı vortekslendikten sonra enzimlerin optimum sıcaklık değerlerine ayarlanmış su banyosunda (60 °C) 30 dk süreyle inkübasyona bırakılmıştır.
7. Süre sonunda tüpler su banyosundan uzaklaştırılarak bütün örneklere 3'er ml DNS solüsyonu eklenmiş ve vortekslendikten sonra 5 dk süreyle kaynar suda inkübe edilmiştir.
8. Aynı işlemler herbir kimyasal madde içeren süpernatant için ayrı ayrı tekrarlanmıştır.

9. Örnekler soğuduktan sonra kontrol grubu (K) kör olarak kullanılmış ve tüm örnekler spektrofotometrede OD₅₄₀ nm dalga boyunda ölçülmüştür.
10. ES ortalama değerlerinden SK ortalama değerleri ile EK ortalama değerleri çıkarılarak enzim aktivitelerinden kaynaklanan absorbans değerleri elde edilmiştir.
11. En yüksek aktivite değeri 100 olarak kabul edilmiş ve diğer değerlerin relatif aktivite değerleri hesaplanmıştır.

3.2.7. Zamana Göre Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Zamana göre enzim aktivitelerinin belirlenmesi aşağıda verilen protokol uyarınca yapılmıştır:

1. LB sıvı besiyerinde 12 saat süreyle üretilmiş olan bakteri kültüründen 50'şer ml hacimli yeni sıvı besiyerine %1 olacak şekilde (500 µl) inoküle edilmiş ve 37 °C'ye ayarlanmış inkübatörde orta çalkalama hızında üremeye bırakılmışlardır.
2. İnkübasyonun başlangıcından itibaren her 12 saatte bir (12, 24, 36, 48, 60, 72) yetecek kadar numune alınarak santrifüj edilmiş (495 rpm, 10 dk) ve hücre dışı sıvı kısımlar (süpernatant) elde edilmiştir.
3. İçine 0.02'şer g likenan tartılan 10 ml hacimli cam tüpler içinde 1 ml bakteri süpernatantı ve 1 ml Na-fosfat bafır (50 mM, pH'sı 6.5) eklenmiştir (ES, 5 tüp).
4. 10 ml hacimli cam tüpler içinde 1 ml bakteri süpernatantı 1 ml Na-fosfat bafır (50 mM, pH: 6.5) ile karıştırılarak enzim kontrolü (EK) hazırlanmıştır (4 tüp)
5. İçine 0.02'şer g likenan tartılan 10 ml hacimli cam tüpler içinde 2 ml Na-fosfat bafır (50 mM, pH'sı 6.5) eklenerek substrat kontrolü (SK) hazırlanmıştır (4 tüp).
6. 10 ml hacimli cam tüpler içinde 2 ml Na-fosfat bafır (50 mM, pH: 6.5) hazırlanmıştır (Kontrol, 1 tüp).
7. Tüplerin tamamı vortekslendikten sonra optimum sıcaklık değerlerine ayarlanmış su banyosunda (60 °C) ayarlanmış su banyosunda 30 dk süreyle inkübasyona bırakılmıştır.
8. Süre sonunda tüpler su banyosundan uzaklaştırılarak bütün örneklerle 3'er ml DNS solüsyonu eklenmiş ve vortekslendikten sonra 5 dk süreyle kaynar suda inkübe edilmiştir.

9. Aynı işlemler sırasıyla her 12 saatte bir alınan bütün süpernatant örnekleri kullanılarak tekrarlanmıştır.
10. Örnekler soğuduktan sonra kontrol grubu (K) kör olarak kullanılmış ve tüm örnekler spektrofotometrede OD₅₄₀ nm dalga boyunda ölçülmüştür.
11. ES ortalama değerlerinden SK ortalama değerleri ile EK ortalama değerleri çıkarılarak enzim aktivitelerinden kaynaklanan absorbans değerleri elde edilmiştir.
12. En yüksek aktivite değeri 100 olarak kabul edilmiş ve diğer değerlerin relatif aktivite değerleri hesaplanmıştır.

3.2.8. Enzimin Moleküler Ağırlığının Belirlenmesi

Enzimin moleküler ağırlığı SDS-PAGE (Laemmli, 1970) ve zimogram analizi (Saul vd., 1990) metodları bir arada kullanılarak yapılmıştır. Zimogram analizi, SDS-PAGE'ye 3 ml likenan solüsyonu (%2 w/v) ilave edilerek gerçekleştirilmiştir.

3.2.8.1. Bakteriden Protein Örneğinin Hazırlanması

Bacillus sp. HY3 izolatu 50 ml hacimli LB besiyerine ekilmiş ve 37 °C'de 48 saat süreyle üretilmiştir. Süre sonunda bakteri kültürü inkübatörden alınarak santrifüjde 4500 devir/dk hızında çöktürülmüş ve böylece enzim içeren hücre dışı sıvı kısım (süpernatant) elde edilmiştir. Sonrasında süpernatant 1:1 oranında Trikloraasetik asit (TCA) (%20 w/v) ile karıştırılarak homojenize edilmiş ve 24 saat süreyle oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ertesi gün karışım 4900 devir/dk hızında santrifüj edilmiş ve denatüre proteinler çöktürülerek pelet haline getirilmiştir. Üst faz dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmış ve protein peletlerinin kuruması için oda sıcaklığında 30-60 dk süreyle bekletilmiştir. Son olarak herbir tüpteki protein peleti 50-100 µl hacimde tris solüsyonu (1 M, pH 8.0) ile çözülmüş ve kullanılıncaya kadar -20 °C'ye kaldırılmıştır.

3.2.8.2. SDS-PAGE ve SDS-Likenan-PAGE'nin Hazırlanması

SDS-PAGE (%12'lik) aşağıda verildiği şekilde hazırlanmıştır:

A) Ayırıcı jel

12 ml akrilamid solüsyonu (%30'luk; 30 g akrilamid, 0.8 g bisakrilamid, saf su ile 100 ml'ye tamamlanır)

5.62 ml Tris (2 M, pH 8.8)

0.3 ml SDS (%10 w/v)

12.1 ml saf su

Polimerizasyon için 200 µl amonyum persülfat (%10 w/v) ve 20 µl TEMED eklenerek iki cam levhadan oluşan düzenek arasındaki boşluğa bir pastör pipeti yardımı ile üstten 4-5 cm boşluk kalacak şekilde dökülür ve hava ile temasını engellemek için üzerine ince bir tabaka olacak şekilde su ile satüre edilmiş bütanol eklenerek polimerizasyon için 45 dk beklenir.

B) Toplayıcı jel

1.8 ml akrilamid solüsyonu

3.65 ml tris (0.5 M, pH 6.8)

0.15 ml SDS (%10 w/v)

9.4 ml saf su

Polimerizasyon için 100 µl amonyum persülfat (%10 w/v) ve 10 µl TEMED eklenerek ayırıcı jelin üzerine dökülür (öncesinde ayırıcı jelin üzerindeki bütanol bir teksir veya kurutma kâğıdına emdirilerek uzaklaştırılır). Jel tarağı üstten dikkatli bir şekilde yerleştirilir ve polimerizasyon için 45 dk beklenir. Jel donduktan sonra tarak çıkarılarak elektroforez tankına uygun şekilde yerleştirilir. Tankın içerisine, jele alttan ve üstten temas edecek şekilde elektrod solüsyonu (0.05 M glisin, 0.05 M tris baz, %0.1 w/v SDS) eklenerek protein örneklerinin yüklenmesi için hazır hale getirilir.

3.2.8.3. Protein Örneklerinin Elektroforezi

Protein örnekleri yükleme tamponu ile 2:1 oranında karıştırılarak tam denatürasyon için 3 dakika süreyle kaynar suda bekletilmiştir. Birinci kuyuya protein markırı olmak üzere örnekler markırın yanından başlayarak diğer kuyulara 40'ar µl olacak şekilde bir mikropipet yardımıyla konmuştur. Örnekte bulunan izleme boyası toplama jel süresince ilerlerken 60 V ve 40 mA, ayırma jel süresince ise ilerlerken 80 V ve 60 mA akım uygulanmıştır. İzleme boyası jelin sonuna geldiğinde elektroferez sonlandırılmıştır.

Zimogram analizinde ayırıcı jele 3 ml likenan solüsyonu (%2 w/v, 121 °C'de 15 dk otoklavlanır) eklenerek aynı miktarda suyun eksilmesi suretiyle hazırlanır. Diğer işlemler yukarıda bahsedildiği şekilde yapılır.

3.2.3.4. Elektroferez Sonrası İşlemler

Elektroferez tamamlandıktan sonra jel, cam plakalar arasından dikkatli bir şekilde çıkarılmış boyama solüsyonu [Coomassie mavisi R 250 boyası içeren metanol-asetik asit-su (4:1:5, hacmen)] bulunan bir kaba konarak 1 saat süreyle boyanmıştır. Süre sonunda jel bu sefer boya içermeyen aynı solüsyona alınarak ertesi güne kadar fazla boyanın uzaklaşması sağlanmıştır. Bu süre içerisinde yıkama solüsyonu birkaç kez değiştirilmiştir.

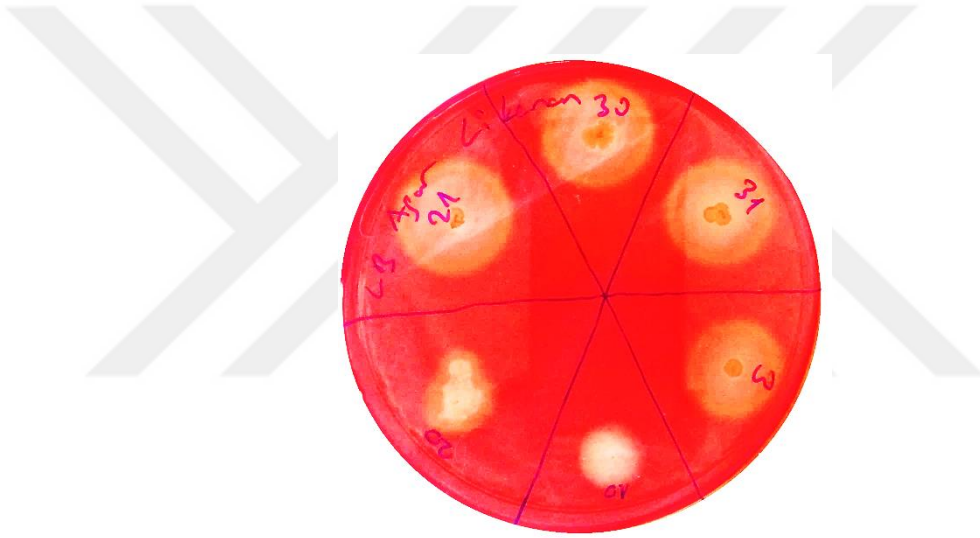
Likenan içeren jel ise, denatüre olan proteinlerin renatürasyonu için önce Solüsyon A (%20 v/v izopropanol + %80 v/v Na-fosfat bafır (50 mM, pH 7.5) içeren bir kaptaki oda sıcaklığında 1 saat, sonrasında ise Solüsyon B (Na-fosfat (50 mM, pH 7.5) + 5 mM β markaptoetanol + 1 mM EDTA) içeren solüsyonda +4 °C'de ertesi güne kadar bekletilmiştir. Ertesi gün jel Solüsyon C (Na-fosfat bafır (50 mM, pH 7.5) içeren kaba alınmış ve bu solüsyonda +4 °C'de 1 saat bekletilmiştir. Renatürasyon işleminden sonra jel streç film sarılmış ve 55 °C'de 5-6 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında jel streç filminden çıkarılarak Kongo kırmızısı solüsyonuna (%0.2 w/v Kongo kırmızısı + %0.02 w/v NaOH) alınarak 1 saat süreyle boyanmıştır. Süre sonunda jel 1 M NaCl çözeltisine alınmış ve 1 saat süre ile fazla boyanın jelden uzaklaşması sağlanmıştır. Sarı zon, likenaz enziminden sorumlu protein bantın bulunduğu bölge olarak belirlenmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Likenaz Üreten Bakterilerin İzolasyonu

Osmaniye'den alınan toprak numunelerinde likenaz enzimi üreten 6 adet izolat belirlenmiştir. İzolatlar aerobik ortamda spor çimlendirme yöntemi ile izole edilmelerinden dolayı *Bacillus* sp. olarak tanımlanmışlardır. İzolatlar likenan içeren LB-agar besi ortamında Kongo kırmızısı boyaması sonucu likenaz aktivite zonları üretmişlerdir (Şekil 4.1).

Bu izolatlardan *Bacillus* sp. HY3 izolatu aktivite zon çapı göz önünde bulundurularak ileri araştırmalar için seçilmiştir.



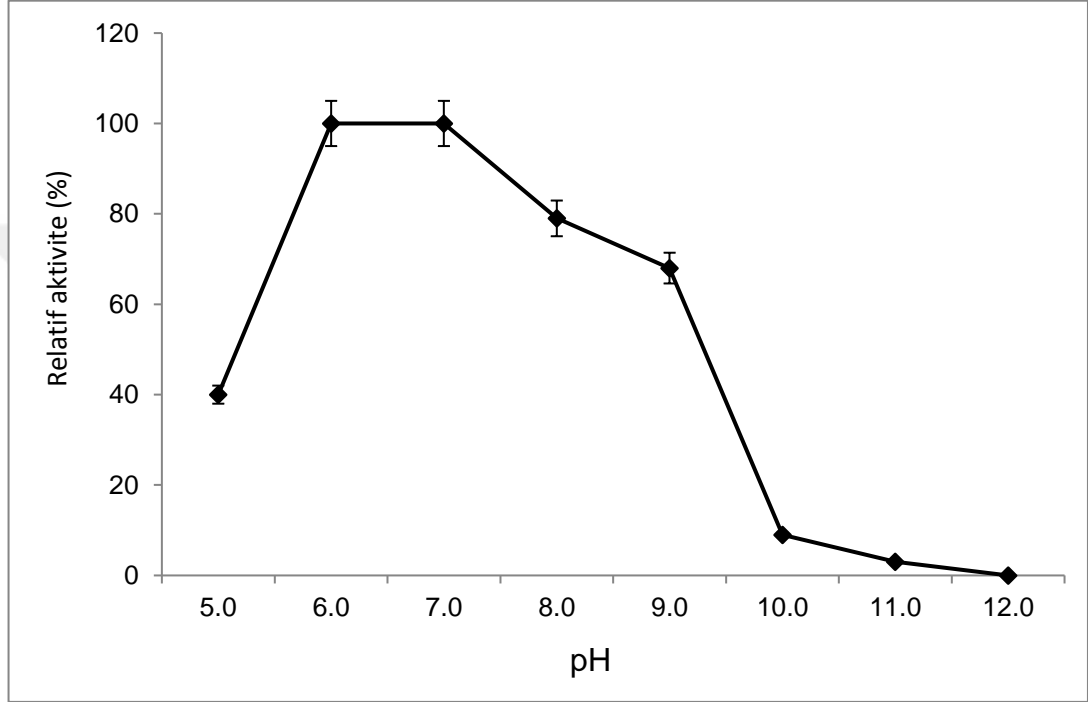
Şekil 4.1. Likenaz içeren LB-agar plağında izolatların aktivite zonları

Likenaz enzimleri doğada farklı bakteri türlerinden izole edilmiş ve enzimlerin karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. *Ruminococcus flavefaciens* (Flint vd., 1993), *B. pumilus* US570 (Elgharbi vd., 2017), Gao (2016), *Bacillus licheniformis* GZ-2 (Gao, 2016), *Bacillus* UEB-S (Maktouf vd., 2015), *B. circulans* WL-12 (Kim vd., 2014), *Rhizomucor miehei* CAU432 (Tang vd., 2012), *Bacillus licheniformis* UEB CF (Chaari vd., 2012), bu bakterilerden bazılarıdır.

4.2. Likenaz Enzimine Ait Bazı Özellikler

4.2.1. Enzimin Optimum pH Değeri

Enzimin aktivite gösterdikleri optimum pH değeri, 6.0-7.0 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. *Bacillus* sp. HY3 likenazına ait pH optimum grafiği

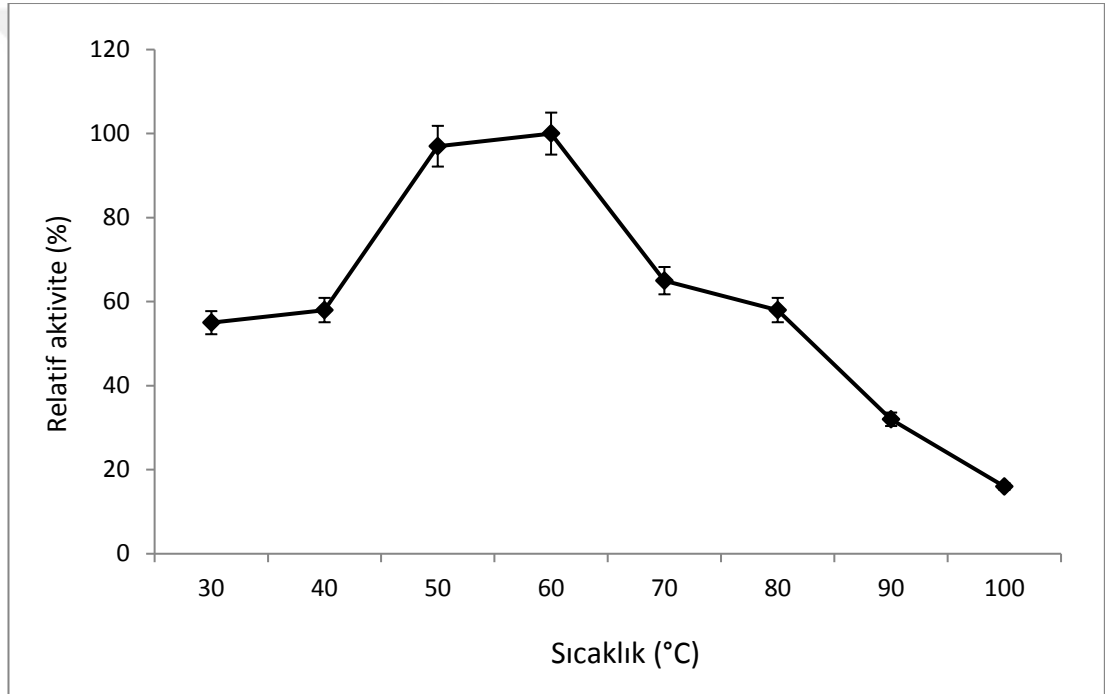
Enzim 5.0 pH değerinde %40 aktivite gösterirken, 8.0 ve 9.0 pH değerlerinde sırasıyla %79 ve 68 oranında relatif aktivite göstermiştir. Enzimin relatif aktivitesi 10.0 pH değerinde ise %9'a düşmüştür. Enzimin 5.0-7.0 pH aralığında ortalama aktivitesi %80, 7.0-9.0 pH aralığında ise %82 olarak belirlenmiştir. Enzim bu veriyle hafif alkali bir karakter göstermekle birlikte 6.0-8.0 pH aralığında ideal bir aktivite sergilemiştir.

Kim vd. (2014), Tabernero ve ark. (1994), Gözükara ve Arıkan (2012) ve Chaari vd. (2012) çalışmaları likenaz enzimlerinde benzer pH optimum değerleri bildirmişlerdir.

Bunlardan özellikle Taberero vd. (1994) ile Gözükara ve Arıkan (2012) tarafından çalışılan likenaz enzimleri bizim enzimin gösterdiği gibi geniş bir pH aralığında aktivite göstermişlerdir.

4.2.2. Enzimin Optimum Sıcaklık Değeri

HY3 likenazının optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri 60 °C olarak belirlenmekle birlikte, enzim 50 °C sıcaklık değerinde %97 oransal aktivite göstermiştir (Şekil 4.2). Enzim 30-80 °C sıcaklık değerleri arasında ortalama %72 relatif aktivite göstermiştir.



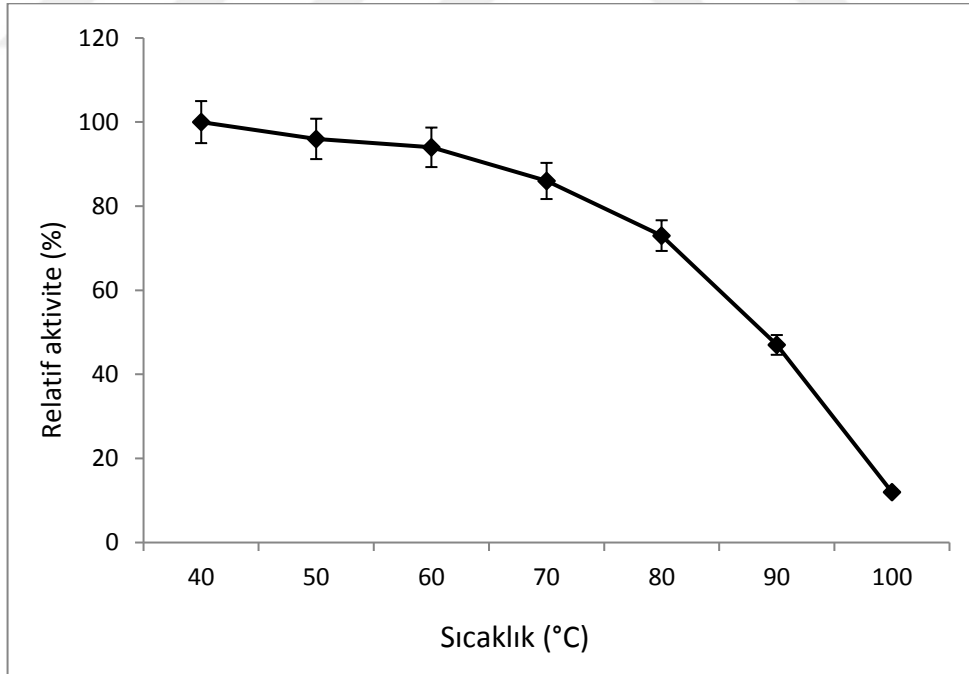
Şekil 4.3. *Bacillus* sp. HY3 likenazına ait sıcaklık optimumu grafiği

Enzimin 50-60 °C sıcaklık değerleri arasında maksimum aktiviteye sahip olması enzimin termo-stabil bir karaktere sahip olduğunu göstermektedir. Mezofilik bakterilerce termo-stabil likenaz enziminin üretilmesi daha önce de Taberero ve vd. (1994), Furtado vd. (2011) ve Louw vd. (1993) tarafından rapor edilmiş olup, mevcut çalışma sonuçları ile büyük bir benzerlik göstermektedir. Mezofilik mikroorganizmalarca termo-stabil enzimlerin üretimi, bakteri üretiminde daha az

enerji gerektirmesi ve enzimin saflaştırılmasının daha kolay olması sebebiyle tercih edilmektedir. Hatta termo-stabil enzim genlerinin mezofil mikroorganizmalarda klonlanarak enzimlerin bu mikroorganizmalarca ürettirilmesi, moleküler biyolojide zaman zaman başvurulan yöntemlerden birisidir. Termo-stabil enzimlerin endüstriyel kullanım esnasında uygulanan ısıl işlemlere dirençlilik göstermesi ve aktivitesini daha uzun süre koruyabilmesi, termo-stabil enzimleri ayrıca cazip kılmaktadır.

4.2.3. Enzimin Sıcaklık Stabilitesi

HY3 likenazı 40-100 °C aralığında, her 10 °C'de 15 dk süreyle ön-inkübasyona tabi tutulmuş ve sonrasında substrat ile uygun koşullarda reaksiyona sokularak açığa çıkan şeker miktarı belirlenmiştir. Enzim, 40-80 °C sıcaklık değerleri arasında kalan aktivitesini büyük ölçüde korumuştur. Enzimin bu sıcaklık değerleri arasında hesaplanan ortalama kalan aktivitesi %89.8 olarak hesaplanmıştır. Enzim 90 °C'de aktivitesinin yaklaşık yarısını korurken, 100 °C'de büyük bir kısmını kaybetmiştir (Şekil 4.4).

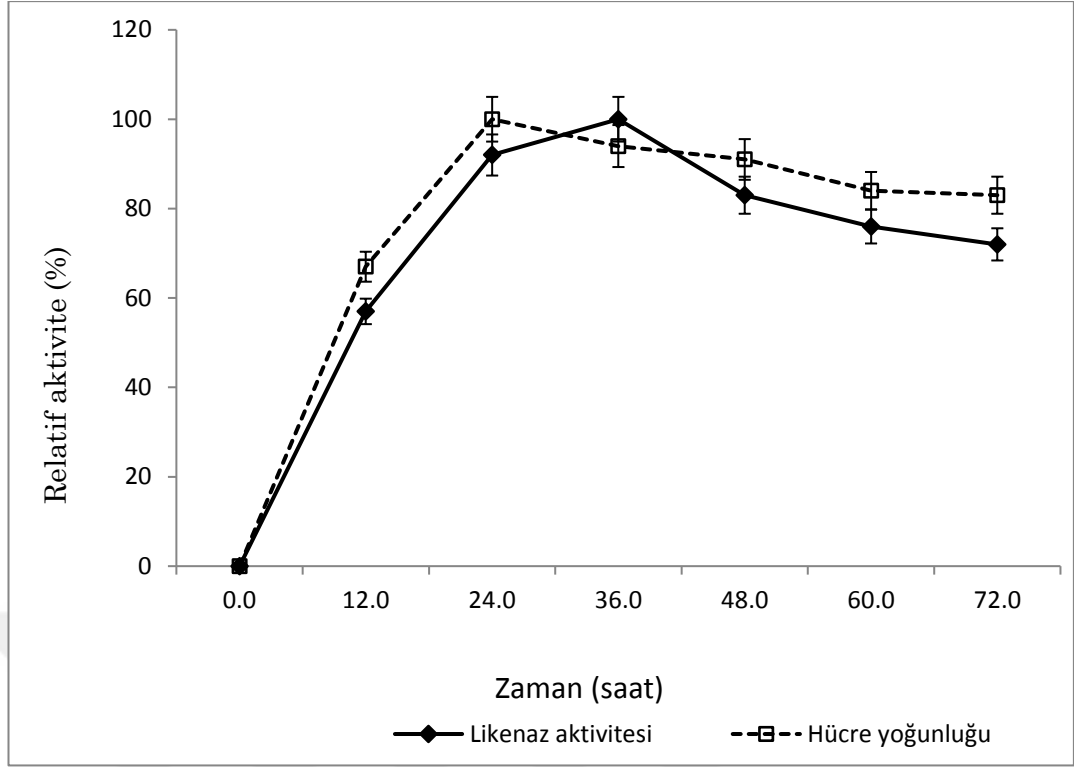


Şekil 4.4. *Bacillus* sp. HY3 likenazına ait sıcaklık stabilite grafiği

Akita vd. (2005), *B. halodurans* bakterisi genomunda bulunan likenaz genini *E. coli* bakterisinde klonlamışlar ve rekombinant enzimin 50 ve 60 °C sıcaklıklarda 2 saat ön inkübasyon sonrasında sırasıyla %100 ve %50 kalan aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

4.2.4. Zamana Göre Enzim Aktivitesi

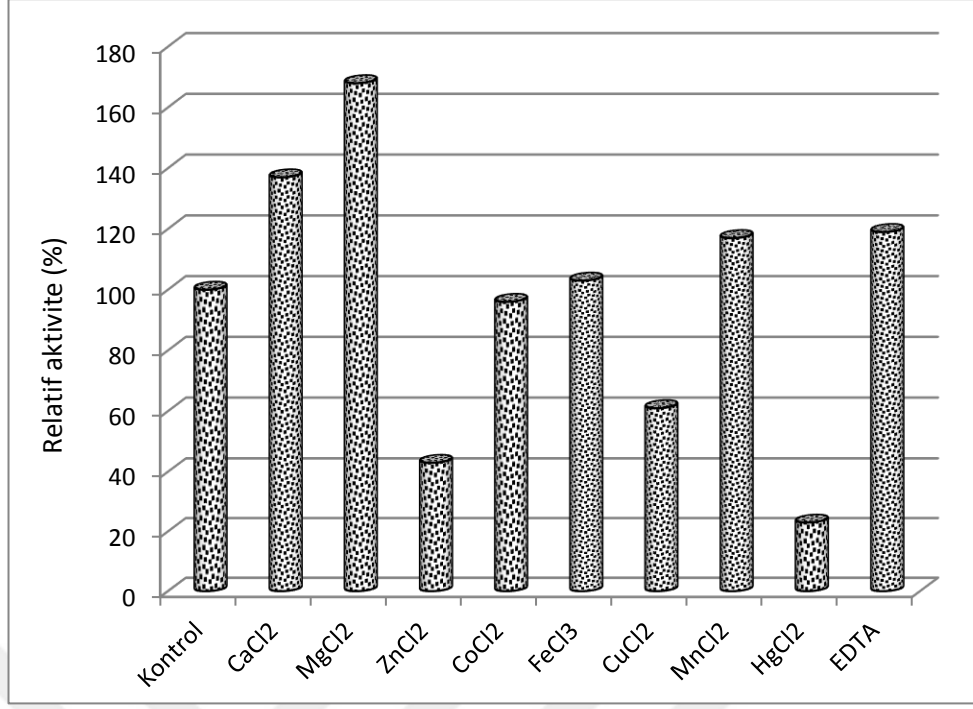
Bacillus sp. HY3 bakterisi gece boyunca geliştiği sıvı kültür ortamından yeni bir sıvı LB besiyerine aşım yapıldıktan sonra ve her 12 saatte bir olmak üzere 72 saat boyunca örnekler alınmış ve enzim aktiviteleri belirlenmiştir. HY3 bakterisi inokülasyondan itibaren en yüksek hücre yoğunluğuna 24. saatte ulaşmıştır (Şekil 4.5). Bu saatten sonra hücre kültürü yoğunluğunda kısmi eksilme yaşanmıştır. İzolat, en yüksek enzim aktivitesini ise inokülasyondan itibaren 36. saatte göstermiştir (Şekil 4.5). Bakteri üretim periyodunun 24-72. saatleri arasında ortalama enzim aktivitesi %84.6 oranında gerçekleşmiştir. Bakterinin inkübasyonunda besi ortamına likenan substratı ilave edilmemiştir. Substratın ilave edilmesi durumunda enzim aktivitesinin daha yüksek seviyede ölçülmesi beklenebilir. Zira Taberero vd. (1994) yaptıkları çalışmada likenan içeren ve içermeyen besi ortamlarında bakteriyi kültüre almışlar ve likenan içeren besi ortamından aldıkları örneklerle enzim aktivitesinin daha yüksek olarak gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu durumu, sadece likenan varlığında sentezlenen translasyonel aktivatörün likenaz üreten genin translasyonunu indüklemiş olabileceği ve böylece likenazın daha yüksek seviyede üretilmiş olabileceği şeklinde açıklamışlardır.



Şekil 4.5. *Bacillus* sp. HY3 bakterisine ait zamana göre hücre yoğunluğu ve likenaz aktivite grafiği

4.2.5. Kimyasalların Likenz Aktivitesine Etkisi

MgCl₂ %168'lik değer ile HY3 likenaz aktivitesi üzerinde en güçlü aktivatör etkisini göstermiştir. Bunu CaCl₂, EDTA, MnCl₂ ve FeCl₃ sırasıyla %137, 119, 117 ve 103'lük aktivite değerleri ile takip etmişlerdir. HgCl₂ %77'lik aktivite kaybı ile enzim üzerinde en yüksek inhibitör olmuştur. ZnCl₂, CuCl₂ ve CoCl₂ enzimin sırasıyla %57, 39 ve 4 oranlarında aktivite kaybetmesine sebep olmuşlardır (Şekil 4.6; Çizelge 4.1).



Şekil 4.6. Bazı kimyasalların HY3 likenaz aktivitesi üzerine etkisi

Tablo 4.1. Bazı kimyasal maddelerin HY3 likenazı üzerine etkisi

Kimyasal madde	Relatif aktivite (%)
Kontrol	100
CaCl ₂	137
MgCl ₂	168
ZnCl ₂	43
CoCl ₂	96
FeCl ₃	103
CuCl ₂	61
MnCl ₂	117
HgCl ₂	23
EDTA	119

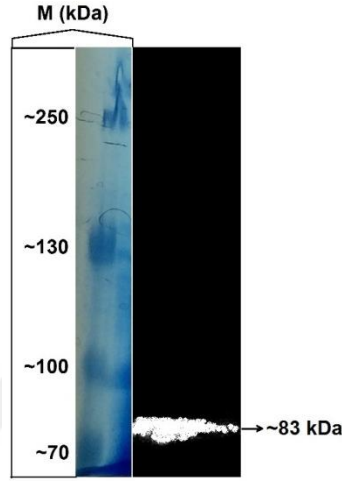
Bu çalışmada elde edilen bulgular Kim vd. (2014) tarafından bildirilen bulgularla büyük benzerlik göstermektedir. Kim vd. (2014) *B. circulans* WL-12 bakterisine ait likenaz enziminin aktivitesinin Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} ve EDTA tarafından stimüle edildiğini, buna karşılık Cu^{2+} , Zn^{2+} ve Fe^{2+} iyonlarının ise inhibisyona sebep olduğunu bildirmişlerdir. Bir farklılık, demir iyonları *B. circulans* WL-12 likenazını

hafif bir şekilde inhibe ederken (%98.6), HY3 likenazını hafif bir şekilde (%103) stimüle etmiştir. Apiraksakorn vd. (2008) ise *B. subtilis* GN156 bakterisinden izole ettikleri J₁ ve pJ₂ likenazlarının her ikisinin de Li⁺ tarafından inhibe edilmediğini, buna karşılık Ca²⁺, Cu²⁺, Mn²⁺ ve Zn²⁺ tarafından önemli derecede inhibe edildiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar bununla birlikte J₁ likenazının Fe²⁺, pJ₂ likenazının ise Mg²⁺ tarafından inhibe edildiklerini de belirtmişlerdir. Bazı metal iyonlarının bu iki likenaz üzerindeki inhibisyon etkisi HY3 likenazına göre bazı farklılıklar taşımaktadır. Ca²⁺, Mn²⁺, Fe²⁺ ve Mg²⁺ iyonları J₁ ve PJ₂ likenazları üzerinde inhibisyon etkisi gösterirken, aynı iyonlar HY3 likenazı üzerinde stimülasyon etkisi göstermişlerdir.

Divalent metal iyonları birçok enzimatik reaksiyonların gerçekleşmesi için esansiyel olmasına rağmen, bu metal iyonların enzim aktivitesi üzerindeki kritik ve spesifik rolleri hala tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir (Mordasini vd., 2003). Enzim aktivitesi üzerinde metal iyonlarının etkisinde 3 ayrı mekanizmadan bahsedilmektedir. Bunlardan birincisi, substrat ile metal iyonunun birleşerek metal-substrat kompleksini (MS) oluşturması ve bu kompleksin enzim-substrat bağlanmasını teşvik etmesidir. Bu tür davranış daha çok metal tarafından aktive edilen enzimlerde gözlenmektedir. İkinci mekanizma, metal iyonunun enzime bağlanması (EM) ve akabinde enzimin substrat ile interaksiyon yapmasını sağlamasıdır. Böyle durumlarda metal iyonu ya bağlanma bölgesi, ya enzimin katalitik bölge bileşeni ya da her ikisi olarak görev yapmaktadır. Üçüncü mekanizma ise metal iyonunun aktif bölgeden uzak bir başka enzim bölgesini etkilemesidir. Bu durumda metal iyonu katalitik aktiviteyi dolaylı olarak etkileyebilir veya proteinin az veya çok aktif biçimini stabilize ederek aktiviteyi düzenleyebilir (Riordan, 1977). Tejirian ve Xu (2010) Fe₂SO₄ ile enzim interaksiyonunu elektroforez jelde araştırmışlar ve bu interaksiyonda inhibitörlerin selülaz enziminin katlanmasını etkilemiş olabileceğini önermişlerdir. Yang vd. (2006) enzim reaksiyonlarının metal iyonları tarafından, metal iyonlarının substratla kompleks yaparak, enzimlerin protein-aktif grupları ile kombine olarak veya enzim-substrat kompleksi ile reaksiyona girerek inhibe edildiğini bildirmişlerdir. Dolayısıyla aynı substrat üzerinde etki gösteren fakat farklı kaynaklarca üretilen benzer enzimler üzerinde metal iyonlarının farklı etki göstermesi doğal karşılanmalıdır.

4.3. Enzimin Moleküler Ağırlığı

Bacillus sp. HY3 likenaz enziminin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ve zimogram analizinde 83 kDa olarak belirlenmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. *Bacillus* sp. HY3 likenaz enziminin zimogram analizi

Chen vd. (1997) *Orpinomyces* PC-2 suşu tarafından üretilen LicA enziminin moleküler ağırlığını 27 kDa, Zhang vd. (2015) *E. coli* ve *Trichoderma reesei*'de klonladıkları *Physarum* likenazının moleküler ağırlıklarını 34 ve 66 kDa, Tabernero vd. (1994) alkalofil *Bacillus* N137 suşunun likenaz enziminin moleküler ağırlığını 27 ve 40 kDa, Maktouf vd. (2015) *Bacillus* UEB-S suşuna ait likenaz enziminin moleküler ağırlığını 28 kDa, Wang vd. (2016) çalıştıkları likenaz enzimlerinin moleküler ağırlıklarını 42 ve 58 kDa, Furtado vd. (2011) *B. subtilis* 168 nolu suşunun likenaz enziminin moleküler ağırlığını ise 28 kDa olarak rapor etmişlerdir.

Likenaz enzimi üretimi *Bacillus* suşları arasında oldukça yaygındır. Daha önce rapor edilmiş olan *B. brevis*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. circulans* ve *B. halodurans* likenaz enzimlerinin moleküler ağırlıkları 25-30 kDa arasında değişmektedir (Planas, 2000). Yapılan literatür taramalarında bakteriyel likenaz enzimlerinin moleküler ağırlıklarının genel olarak HY3 likenaz enziminin moleküler ağırlığından daha düşük olduğu görülmüştür. Bunun yanısıra, Gözükara (2009) izole ettiği *Bacillus* sp. bakterisince üretilen likenaz enziminin Nativ-PAGE'de 100.74 ve 54.4 kDa

ağırlıklarında iki adet bant ürettiğini, Elgharbi vd. (2017) ise izole ettikleri *B. pumilus* US570 suşuna ait β -1,3-1,4-glukanaz (GluUS570) enziminin moleküler ağırlığının 75 kDa boyutunda olduğunu bildirmişlerdir. Bu iki bildiriş HY3 likenaz enziminin 83 kDa olan moleküler ağırlığının normal karşılanabileceğini göstermektedir. Diğer taraftan Chen vd. (1997) *Orpinomyces* PC-2 ve *N. frontalis* EB188 bakterilerinin 40-80 kDa arasında değişen büyüklüklerde çoklu zayıf bantlar ürettiklerini, bunun da likenanı hidroliz etme yeteneğine sahip selülozlar olabileceğini bildirmiştir. Bu çalışmada izole edilen *Bacillus* sp. HY3 bakterisi likenanın yanısıra CMC ve ksilanı da hidrolize edebilmektedir. Fakat bu aktivitelerin herbirinin ayrı genlerin ekspresyonu ile mi ortaya çıkıp çıkmadığı henüz bilinmemektedir. HY3 likenazının yüksek moleküler aktiviteye sahip olması, enzimin multi-fonksiyonel olabileceği şüphesini akla getirmektedir. Fakat bunun ortaya çıkarılması ancak enzimden sorumlu genin bakteri genomundan izole edilerek bu enzimlere ait herhangi bir aktivite göstermeyen başka bir bakteriye klonlanması ve bu bakteride test edilmesi ile mümkün olabilecektir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Çalışmanın sonuçları aşağıda maddeler halinde verilmiştir:

1. Bu çalışma ile likenaz aktivitesine sahip *Bacillus* sp. HY3 bakterisinin izolasyonu gerçekleştirilmiştir.
2. İzolat tafından üretilen enzimin kısmi karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.
3. Enzimin optimum sıcaklığının 60 °C ve optimum pH değerinin ise sırasıyla ve 6.0-7.0 olarak belirlenmiştir.
4. Bakteri inokülasyonundan itibaren en yüksek düzeyde enzim üretimi 36. saatte gerçekleşmiştir.
5. Enzim 40-80 °C sıcaklık değerleri arasında aktivitesini önemli ölçüde koruyarak %89.8 oranında kalan aktivite göstermiştir.
6. Likenaz enziminin aktivitesi MgCl₂, CaCl₂, EDTA, MnCl₂ ve FeCl₃ varlığında artarken, HgCl₂, ZnCl₂, CuCl₂ ve CoCl₂ varlığında değişen oranlarda inhibe olmuştur.
7. Enzimin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ve zimogram analizi ile 83 kDa olarak belirlenmiştir.

5.2. Öneriler

Çalışma sonucunda elde edilen bulgular göz önünde bulundurularak şu öneriler verilebilir:

1. Likenaz enzimleri başta çiftlik hayvanların beslenmesi olmak üzere bazı endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır. Bununla birlikte likenaz enzimleri diğer β-glukanaz enzimleri kadar (β-1,3-glukanaz, β-1,4-glukanaz) yoğun olarak çalışılmamıştır. Bu sebeple likenaz enzimlerini üreten yeni bakterilerin izolasyonu ve ürettikleri enzimin karakterize edilerek endüstriyel kullanım için uygunluklarının belirlenmesine yönelik çalışmalara devam edilmelidir.
2. Likenaz genleri üzerinde moleküler genetik tekniklerinin (klonlama ve in-vitro mutagenesis) uygulanması ile enzimlerin daha saf, bol ve ucuz bir şekilde üretilmeleri sağlanmalıdır.

KAYNAKLAR

- Akita, M. , Kayatama, K., Hatada, Y., Ito, S., Horikoshi, K., A novel β -glucanase gene from *Bacillus halodurans* C-125. FEMS Microbiology Letters, 248(1): 9-15. 2005.
- Anderson, M.A., Stone, B.A., A new substrate for investigating the specificity of β -glucan hydrolases. FEBS Letters, 52: 202-207. 1975.
- Apiraksakorn, J., Nitisinprasert, S., Levin, R.E., Grass degrading β -1,3-1,4-D-glucanases from *Bacillus subtilis* GN156: Purification and characterization of glucanase J1 and pJ2 possessing extremely acidic pI. Applied Biochemistry and Biotechnology, 149(1): 53-66. 2008.
- Aşan, M., Özcan, N., Expression of the β -(1,3-1,3)-glucanase gene in *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. Turkish Journal of Veterinary and Animal Science, 31(5): 319-324. 2007.
- Beckmann, L., Simon, O., Vahjen, W., Isolation and identification of mixed linked β -glucan degrading bacteria in the intestine of broiler chickens and partial characterization of respective 1,3-1,4- β -glucanase activities. Journal of Basic Microbiology, 46: 175-185. 2006.
- Chaari, F., Bhiri, F., Blibech, M., Maktouf, S., Ellouz,-Chaabouni, S., Ellouz-Ghorbel, R., Potential application of two thermostable lichenases from a newly isolated *Bacillus licheniformis* UEB CF: Purification and characterization. Process Biochemistry, 47(3): 509-516. 2012.
- Chen, H., Li, X-L., Ljungdahl, L.G., Sequencing of a 1,3-1,4- β -D-glucanase (lichenase) from the anaerobic fungus *Orpinomyces* strain PC-2: Properties of the enzyme expressed in *Escherichia coli* and evidence that the gene has a bacterial origin. Journal of Bacteriology, 179(19): 6028-6034. 1997.
- Çömlekçioğlu, U., Özköse, E., Akyol, İ., Yazdıç, F.C., Ekinci, M.S., Expression of β -(1,3-1,4)-glucanase gene of *Orpinomyces* sp. GMLF18 in *Escherichia coli* EC1000 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. Turkish Journal of Biology, 35: 405-414. 2011.
- Elgharbi, F., Hlima, H.B., Ameri, R., Bejar, S., Hmida-sayari, A., A trimeric and thermostable lichenase from *B. pumilus* US570 strain: Biochemical and

- molecular characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95: 273-280. 2017.
- Flint, H.J., Martin, J., McPherson, C.A., Daniel, A.S., Zhang, J.X., A bifunctional enzyme, with separate xylanase and beta(1,3-1,4)-glucanase domains, encoded by the *xynD* gene of *Ruminococcus flavefaciens*. *Journal of Bacteriology*, 175(10): 2943-2951. 1993.
- Furtado, G.P., Ribeiro, L.F., Santos, C.R., Tonoli, C.C., de Souza, A.R., Oliveira, R.R., Murakami, M.T., Ward, R.J., Biochemical and structural characterization of a β -1,3-1,4-glucanase from *Bacillus subtilis* 168. *Process Biochemistry*, 46: 1202-1206. 2011.
- Gao, Z., Purification and characterization of a novel lichenase from *Bacillus licheniformis* GZ-2. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 63(2): 249-256. 2016.
- Godfrey, T., West, S., Introduction to Industrial Enzymology. *Industrial Enzymology* (Second Edition). Ed. by T. Godfrey and S. West. Stockton Press, New York, 1996.
- Gözükara, F., Termofil *Bacillus* sp. bakterisinden lichenaz (β -1,3 ve 1,4 glucanase) enzimi üretimi, karakterizasyonu ve biyoteknolojik kullanılabilirliği. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana. 2009.
- Gözükara, F., Arıkan, B., Termofil *Bacillus* sp. bakterisinden likenaz (β -1,3 ve 1,4 glucanase) enzimi üretimi, karakterizasyonu ve biyoteknolojik kullanılabilirliği. *Ç.Ü. Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 27(5): 121-127. 2012.
- Khan, M.A.S., Akbar, M., Kitaoka, M., Hayashi, K., A unique thermostable lichenase from *Thermotoga maritima* MSB8 with divergent substrate specificity. *Indian Journal of Biotechnology*, 16: 315-320. 2007.
- Kim, S-Y. , Oh, D-B., Kwon, O., Characterization of a lichenase isolated from soil metagenome. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(12): 1699-1706. 2014.
- Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685. 1970.

- Louw, M.E., Reid, S.J., Watson, T.G., Characterization, cloning and sequencing of a thermostable endo-(1,3-1,4) β -glucanase-encoding gene from an alkalophilic *Bacillus brevis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38: 507-513. 1993.
- Maktouf, S., Moulis, C., Miled, N., Chaabouni, S.E., Simeon, M.R., A highly thermostable lichenase from *Bacillus* sp UEB-S: biochemical and molecular characterization. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, 115: 8-12. 2015.
- Mccleary, B.V., Purification of (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)-beta-D-glucan from barley flour. *Methods in Enzymology*, 160: 511-514. 1988.
- Mordasini, T., Curioni, A., Andreoni, W., Why do divalent metal ions either promote or inhibit enzymatic reactions?: The case of *Bam*HI restriction endonuclease from combined quantum-classical simulations. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(7): 4381-4384. 2003.
- Planas, A., Bacterial 1,3-1,4- β -glucanases: structure, function and protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1543: 361-382. 2000.
- Priest, F.G., Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriological Reviews*, 41(3): 711-753. 1977.
- Priest, F.G., Regulation of extracellular enzyme synthesis in *Bacilli*. *Extracellular Enzymes of Microorganisms*, Ed. by Chaloupka, J. and Krumphanzl, V., Plenum Press, New York. 1987.
- Qiao, J., Zhang, B., Chen, Y., Cao, Y., Codon optimization, expression and characterization of *Bacillus subtilis* MA139 β -1,3-1,4-glucanase in *Pichia pastoris*. *Biologia*, 65(2): 191-196. 2010.
- Rao, B.M., Tanksale, M.A., Ghathe, S.M., Deshpande, V.V., Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3): 597-635. 1998.
- Riordan, J.F., The role of metals in enzyme activity. *Annals of Clinical and Laboratory Sciences*, 7(2): 119-129. 1977.
- Saul, D.J., Williams, L.C., Grayling, R.A., Chamley, L.W., Love, D.R., Bergquist, P.L., celB, a gene coding for a bifunctional cellulase from the extreme thermophile "*Caldocellum saccharolyticum*". *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 3117-3124. 1990.

- Sneath, P.H.A., Endopore-forming gram-positive rods and cocci. Genus *Bacillus*. In Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, ed. P.H.A. Sneath, N.S. Mair and Sharpe, E. Williams & Wilkins, Baltimore. pp. 1105-1139. 1986.
- Tabernero, C., Coll, P.M., Fernandez-Abalos, J.M., Perez, P., Santamaria, R.I., Cloning and DNA sequencing of *bgaA*, a gene encoding an endo-beta-1,3-1,4-glucanase, from an alkalophilic *Bacillus strain* (N137). *Applied and Environmental Microbiology*, 60(4): 1213-1220. 1994.
- Tang, Y., Yang, S., Yan, Q., Zhout, P., Cui, J., Jiang, Z., Purification and characterization of a novel β -1,3-1,4-glucanase (lichenase) from thermophilic *Rhizomucor miehei* with high specific activity and its gene sequence. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(9): 2354-2361. 2012.
- Tejirian, A., Xu, F., Inhibition of cellulase-catalyzed lignocellulosic hydrolysis by iron and oxidative metal ions and complexes. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(23): 7673-7682. 2010.
- Wang, J., Wang, Y., Wang, X., Zhang, D., Wu, S., Zhang, G., Enhanced thermal stability of lichenase from *Bacillus subtilis* 168 by SpyTag/SpyCatcher-mediated spontaneous cyclization. *Biotechnology for Biofuels*, 9(79): 1-9. 2016.
- Wiseman, A., Handbook of Enzymes Biotechnology. Second Edition. Chapter 3. The Application of Enzymes in Industry, pp. 274-373, 1987.
- Yang, Z-X., Liu, S-Q., Zheng, D-W., Feng, S-D., Effects of cadmium, zinc and lead on soil enzyme activities. *Journal of Environmental Sciences*, 18(6): 1135-1141. 2006.
- Yoo, D.H., Lee, B.H., Chang, P.S., Lee, H.G., Yoo, S.H., Improved quantitative analysis of oligosaccharides from lichenase-hydrolyzed water-soluble barley β -glucans by highperformance anion-exchange chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 1656-1662. 2007.
- Zhang, J-H., Li, X-Q., Zhang, Y-X., Xing, M., Tian, S-L., Liu, S-D., Cloning and characterization of physarum endo-beta-1,3-1,4- glucanase-1 expression in *E. coli* and *Trichoderma reesei*. *Journal of Biotechnology and Biomaterials*, 5: 173. doi:10.4172/2155-952X.1000173. 2015.

Zhang, X.Y., Ruan, H., Mu, L., He, G., Tang, X.J., Chen, O.H. Enhancement of the thermostability of β -1,3-1,4-glucanase by directed evolution. Journal of Zhejiang University SCIENCE A, 7(11): 1948-1955. 2006.



ÖZGEÇMİŞ

1. Adı Soyadı : Hürü YÜCEL

2. Doğum Tarihi : 30.11.1984

3. Ünvanı : Biyolog

4. Öğrenim Durumu :

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Bitirme Yılı
Lisans	Biyoloji Bölümü	Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi	2014
Yüksek Lisans	Biyoloji Anabilim Dalı	Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi	-----