



**VAN İLİNDEN ALINAN SICAK SU ÖRNEKLERİNDEN
TERMOFİLİK BAKTERİLERİN İZOLASYONU,
İDENTİFİKASYONU, *Bacillus licheniformis*
EA10'DAN PROTEAZ ENZİMİNİN ÜÇLÜ FAZ
AYIRMA SİSTEMİ (TPP) İLE
SAFLAŞTIRILMASI ve KARAKTERİZASYONU**

Esra ALÇİÇEK

**Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Biyoteknoloji Bilim Dalı
Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU
2017**

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VAN İLİNDEN ALINAN SICAK SU ÖRNEKLERİNDEN
TERMOFİLİK BAKTERİLERİN İZOLASYONU,
İDENTİFİKASYONU, *Bacillus licheniformis* EA10'DAN PROTEAZ
ENZİMİNİN ÜÇLÜ FAZ AYIRMA SİSTEMİ (TPP) İLE
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Esra ALÇİÇEK

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
Biyoteknoloji Bilim Dalı

ERZURUM
2017

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü



TEZ ONAY FORMU

**VAN İLİNDEN ALINAN SICAK SU ÖRNEKLERİNDEN TERMOFİLİK
BAKTERİLERİN İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU, *Bacillus licheniformis*
EA10'DAN PROTEAZ ENZİMİNİN ÜÇLÜ FAZ AYIRMA SİSTEMİ (TPP) İLE
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU danışmanlığında, Esra ALÇİÇEK tarafından hazırlanan bu çalışma, 27.12.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Biyoteknoloji Bilim Dalı'nda Yüksek lisans tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

İmza :

Üye : Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

İmza :

Üye : Yrd.Doç.Dr. Esra DİLEK

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun **28/12/2017** tarih ve **51/.../34** nolu kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Cavit KAZAZ
Enstitü Müdürü

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.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

VAN İLİNDEN ALINAN SICAK SU ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN TERMOFİLİK BAKTERİLERİN İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU, *Bacillus licheniformis* EA10'DAN PROTEAZ ENZİMİNİN ÜÇLÜ FAZ AYIRMA SİSTEMİ (TPP) İLE SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Esra ALÇİÇEK

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

Danışman: Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

Bu tez çalışması kapsamında; Van Çaybağı ve Hasanabdal Kaplıcalarından temin edilen sıcak su örneklerinden toplam 10 adet termofilik bakteri izole edildi. İzolasyon sonrasında yapılan konvensiyonel ve moleküler analizler sonucunda 10 izolat (EA1, EA2, EA4, EA5, EA6, EA7: *Bacillus thermolactis*; EA3, EA9, EA10: *Bacillus licheniformis*; EA8: *Anoxybacillus pushchioensis*) tür düzeyinde tanılandı. Petri denemeleri sonucunda 3 suşun proteaz enzim aktivitesi bakımından pozitif olduğu gözlemlendi, en yüksek aktiviteyi ise EA10 izolatının verdiği tespit edildi. *B. licheniformis* EA10'dan proteaz enziminin saflaştırılması TPP yöntemiyle ilk kez bu çalışmada uygulandı. Bunun için tuz, organik çözücü ve pH optimizasyonu yapıldı ve pH 6,0'da, 1,0:0,5 (ham enzim çözeltisi:t-bütanol oranı) ve %70 doygun amonyum sülfat kullanılarak uygulanan TPP sistemi sonucunda %191,6 verimle 54,1 kat saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı SDS-PAGE jel elektroforez yöntemiyle yaklaşık 37,67 kDa olarak hesaplandı. Protez enzimi için optimum pH 9,5 ve optimum sıcaklık 80°C olarak belirlendi. Enzimin 90°C gibi yüksek bir sıcaklıkta 120 dk inkübasyonun sonunda aktivitesinin hiç düşmediği ve inkübasyon süresinin aktiviteyi artırıcı etki gösterdiği tespit edildi. *B. licheniformis* EA10'dan proteaz enziminin okside edici ajan olan H₂O₂ varlığında kararlılığını %1 ve %5'lik konsantrasyonlarda sırasıyla %107 ve %102 oranında koruduğu tespit edildi. Organik çözücülere karşı yüksek bir stabilite gösteren enzimin Mn²⁺ metalinin 1mM konsantrasyonunda aktivitesini koruduğu görüldü, 5 ve 10 mM'lık konsantrasyonlarında ise sırasıyla %164 ve %237 oranında enzimin aktivitesini artırdığı belirlendi. EDTA varlığında enzim stabilitesinin %104,6 oranında korunduğu belirlendi. *B. licheniformis* EA10'dan alkali proteaz enziminin hem kazeine hem de gelatine yüksek substrat spesifitesi olduğu görüldü, kazein substratı için K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,376 mg/ml ve 14,085 µmol.ml⁻¹.dk⁻¹ olarak hesaplandı.

2017, 109 sayfa

Anahtar Kelimeler: Termofilik bakteri, *Bacillus licheniformis*, proteaz, üçlü faz ayırma sistemi (TPP), enzimatik karakterizasyon, saflaştırma

ABSTRACT

Master Thesis

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF THERMOPHILIC BACTERIA ISOLATED FROM HOT WATER SAMPLES COLLECTED IN VAN PROVINCE, TURKEY AND PURIFICATION-CHARACTERIZATION OF PROTEASE ENZYME FROM *Bacillus licheniformis* EA10 ISOLATE WITH THREE PHASE PARTITIONING SYSTEM

Esra ALÇİÇEK

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

Supervisor: Assoc. Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

In this thesis work, a total of 10 thermophilic bacteria were isolated from hot water samples collected from Van Çaybağı and Hasanabdal springs. 10 isolates were identified as follows using conventional and molecular analysis; EA1, EA2, EA4, EA5, EA6, EA7: *Bacillus thermolactis*; EA3, EA9, EA10: *Bacillus licheniformis*; EA8: *Anoxybacillus pushchioensis*. According to a pedri analysis, three strains were observed to be positive in terms of protease activity and EA10 had the highest activity. Purification of protease from *B. licheniformis* EA10 using TPP was carried out for the first time in this study to the best of our knowledge. For this, optimization of salt content, organic solvent and pH was done. The TPP system applied at pH 6.0 using 1.0: 0.5 (crude enzyme solution: t-butanol ratio) and 70% saturated ammonium sulphate resulted in 54.1 fold of enzyme purification with 191.6% yield and the molecular weight of the purified enzyme was estimated to be approximately 37.67 kDa by SDS-PAGE gel electrophoresis. The optimum pH and temperature were determined as 9.5 and 80 °C, respectively. It was found that the enzyme did not decrease its activity at all after 120 minutes of incubation at a temperature as high as 90 °C and that the incubation period had an activity-enhancing effect. It was also found that *B. licheniformis* EA10 protected its protease enzyme stability by 107% and 102% in the presence of H₂O₂, an oxidizing agent, at concentration ratios of 1% and 5%, respectively. The enzyme exhibiting high stability against organic solvents maintained its activity at 1 mM Mn²⁺ and increased its activity by 164 and 237% at 5 and 10 mM concentrations, respectively. In the presence of EDTA, enzyme stability was preserved by 104.6%. Results showed that alkaline protease of *B. licheniformis* EA10 had high substrate specificity for both casein and gelatin and the K_M and V_{max} values for casein substrate was calculated (K_M: 0,376 mg/ml and V_{max}: 14,085 µmol.ml⁻¹.dk⁻¹).

2017, 109 pages

Keywords: *Bacillus licheniformis*, protease, three phase partitioning system, thermophilic bacteria, enzymatic charecterization, purification.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımı en iyi şekilde ilerletebilmem için laboratuvarında birçok imkan oluşturan ve bu tezin mikrobiyolojik aşamasında yaptığım çalışmalarda benimle değerli fikirlerini paylaşan Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e,

Tez konumu belirlemede ve deneysel çalışmalarında aktardığı değerli fikirleriyle, bilgi birikimini ve tecrübesini benden esirgemeyen, bu tezi yazmamda büyük desteği bulunan Hocam Sayın Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU'na,

Tez çalışmam boyunca laboratuvar çalışmalarında; cihazlar, deney yöntemleri ve akademik anlamda sorduğum tüm soruları sıklıkla usanmadan cevaplayan, işi olsa bile bırakıp bana yardımcı olan güler yüzüyle ve samimi yaklaşımlarıyla yardımlarını hiçbir zaman benden esirgemeyen Sayın Arş. Gör. Sümeyye AKBULUT'a, kendi yoğunluklarına rağmen tezimin bitmesinde gösterdiği yardımseverlik ve özveri için hakkını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim Sayın Yeliz DEMİR'e, ve tezimin deney aşamasında ve yazımında yardımları esirgemeyen Sayın Sultan ÖLMEZ'e,

Yine tez aşamasında laboratuvar ve tez yazımı konusunda yardım ve bilgilerini esirgemeyen Sayın Arş. Gör. Mustafa Özkan BALTACI ve Sayın Arş. Gör. Melike YILDIZ'a

Tezin yazımında benimle değerli fikirlerini paylaşan her türlü desteğiyle tezi bitirmemde yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa ŞEN abime,

Tezin son aşamalarında yardımlarını asla unutamayacağım benimle uykusuz kalan çok değerli arkadaşlarım Sayın Aybüke EROL'e, Sayın Şeyda ALBAYRAK'a ve Sayın Betül BAYDAR'a

Ve tez dönemim boyunca tüm stresime sıkıntıma katlanan, her vazgeçtiğimde beni motive eden, tezi yazmamda her türlü yardımlarıyla yanımda olan canım arkadaşlarım; Sayın Züleyha ZENGİN'e, Hilal EROĞLU'ya, Sayın Suna ALÇİÇEK'e, Sayın Selma BEKTAŞ'a, Sayın Esma ŞAHİN'e ve Sayın Büşra EROĞLU'ya,

Ve son olarak da tüm hayatım boyunca maddi ve manevi destek ve fedakarlıklarını her zaman hissettiğim dua ve sabırlarıyla yanımda olan annem Nebiye ALÇİÇEK ve Babam Cemal ALÇİÇEK'e, ablalarım Fatma BALTACI, Ayşe DEMİRAY ve Emine ŞEN'e teşekkürü bir borç bilirim.

Esra ALÇİÇEK

Aralık, 2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Endüstriyel Enzimler.....	1
1.2. Endüstriyel Enzim Uygulamaları.....	3
1.3. Endüstriyel Uygulamalarda Önemli Enzimler.....	9
1.3.1. Proteolitik enzimler.....	10
1.3.1.a. Serin proteazlar.....	12
1.3.1.b. Sistein proteazlar.....	13
1.3.1.c. Aspartik proteazlar.....	14
1.3.1.d. Metalloproteaz.....	15
1.3.2. Proteaz kaynakları.....	15
1.3.3. Bakteriyel alkalın proteazlar ve özellikleri.....	16
1.4. <i>Bacillus</i> cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri.....	17
1.5. Üçlü Faz Ayırma Sistemi (TPP).....	18
1.4.1. Üçlü faz ayırma yönteminin avantajları.....	19
1.4.2. Üçlü faz ayırma yönteminin dezavantajları.....	20
1.4.3. Üçlü faz ayırma yönteminin modifikasyonları.....	20
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	22
2.1. Tezin Amacı.....	28
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	29
3.1. Materyal.....	29
3.1.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasallar ve Kitler.....	29
3.1.2. Tez Kapsamında Kullanılan Materyal ve Cihazlar.....	30
3.1.3. Tez Kapsamında Yapılan Deneylede Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı.....	31

3.1.3.a. Bakteri İzolasyonu İçin Kullanılan Çözelti ve Tamponlar	31
3.1.3.b. Bakteri İzolatlarının Moleküler Analizi İçin Kullanılan Çözelti ve Tamponlar	32
3.1.3.c. Bakteri İzolatlarının Morfolojik, Fizyolojik Ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözelti Ve Tamponlar	32
3.1.3.d. Enzim Tayini İçin Kullanılan Çözelti Ve Tamponlar	33
3.1.3.e. Protein Analizi İçin Kullanılan Çözelti Ve Tamponlar	34
3.1.3.f. SDS-PAGE İçin Kullanılan Çözelti Ve Tamponlar	34
3.1.3.g. Gümüş Boyama İçin Kullanılan Çözelti Ve Tamponlar	35
3.1.3.h. Metal İyon Solüsyonları	36
3.1.4. Tez Kapsamında Yapılan Deneylede Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanışı ..	36
3.1.4.a. Tryptone Soy Broth (TSB)	36
3.1.4.b. Tryptone Soy Agar (TSA)	37
3.1.4.c. Proteaz Katı Besiyeri	37
3.1.4.d. Proteaz Sıvı Besiyeri	37
3.2. Yöntem	37
3.2.1. Örneklerin Toplanması	37
3.2.2. Mikroorganizmaların izolasyonu	38
3.2.3.b. Seçilen İzolatların %3'lük KOH Çözeltisi ile Gram Özelliklerinin Belirlenmesi	38
3.2.4. Bakteri İzolatlarının Moleküler Analizi	39
3.2.4.a. 16S rRNA Gen Bölgesinin Klonlanması	39
3.2.5. Proteaz Enziminin Tayini, Saflaştırılması ve Karakterizasyon Çalışmaları ...	49
3.2.5.a. Alkalın Protez Enzimi Üreten Bakteri İzolatlarının Skim Milk Agar Besiyerinde Belirlenmesi	49
3.2.5.b. Alkalın Proteaz Üretimi	49
3.2.4.c. Alkalın proteaz enziminin aktivitesinin belirlenmesi	50
3.2.5.d. Protein Tayini	51
3.2.5.e. Alkalın Proteazın Üçlü Faz Ayırma (TPP) Sistemi İle Saflaştırılması	52
3.2.5.f. Alkalın Proteaz Enzimiyle İlgili Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları	54
edici ajanın etkisinin belirlenmesi	59
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	61

4.1. Mikroorganizmaların İzolasyonu	61
4.2. Konvensiyonel Test Sonuçları.....	62
4.3. Seçilen İzolatların Moleküler Yöntemlerle Tanılarının Yapılması	63
4.3.1. (GTG)5-PCR Yöntemiyle İzolatların Gen Profillerinin Belirlenmesi	63
4.3.2. Amplifiye Edilen 16S rRNA Bölgesinin Klonlanması	65
4.4. Petride Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi	67
4.5. Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik	67
4.6. Proteaz aktivitesi hesaplamasında kullanılan tirozin standart grafiği	68
4.7. Üçlü Faz Ayırma (TPP) Sistemi ile Alkali Proteazın Saflaştırılması	68
4.7.1. TPP Sisteminde Amonyum Sülfat Konsantrasyonu ve Organik Çözgen Oranının Etkisinin Belirlenmesi	69
4.7.2. Alkalın Proteazın Saflaştırılmasında TPP Sistemine pH'nın Etkisi.....	73
4.7.3. Alkalın Proteazın Üçlü Faz Yöntemiyle Saflaştırma Sonuçları.....	74
4.5. SDS-PAGE İle Enzimin Saflık Kontrolü, Molekül Kütlesinin Tayini ve Zimogramı Analizi.....	75
4.6. Proteaz Enzimi İçin Optimum pH ve Stabil pH Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar.....	76
4.7. Proteaz Enzimi İçin Optimum Sıcaklığın ve Stabil Sıcaklığın Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar.....	78
4.9. Bazı Metal İyonlarının Proteaz Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkisine Yönelik Sonuçlar.....	80
4.10. Bazı İnhibitörlerin Proteaz Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar	83
4.11. Bazı Organik Çözücülerin Proteaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar	84
4.12. Proteaz Enziminin Aktivitesi Üzerine Yüzey Aktif Maddelerinin ve Okside Edici Ajanının Etkisinin Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar	86
4.13. <i>B.licheniformis</i> EA10'dan Saflaştırılan Proteaz Enzimin Doğal Substratlara Olan Özgünlüğün Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar.....	88
4.8. K_M ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar	88
4.14. <i>B.licheniformis</i> EA10'dan Saflaştırılan Proteaz Enzimin Aktivitesi Üzerine Bazı Endüstriyel Deterjanların Etkisinin Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar....	89

5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	90
KAYNAKÇA.....	99
ÖZGEÇMİŞ	110



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat Derece
µl	: Mikrolitre
AA	: Akrilamid
APS	: Amonyum Persülfat
Bis - AA	: Bis Akrilamid
BSA	: Sığır Serum Albumin
CaCl ₂	: Kalsiyum Klorür
dk	: Dakika
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DNS	: Dinitrosalisilik Asit
DNTB	: Dinitrotiyo Benzen
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EtOH	: Etanol
EU	: Enzim Ünitesi
gr	: Gram
HCl	: Hidroklorik Asit
IPTG	: izopropil β-D-1- tiyogalaktopiranosid
L	: Litre
M	: Molar
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
NaOH	: Sodyum Hidroksit
nm	: Nanometre
OD	: Optik Dansite
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PMSF	: Fenil Metil Sülfonil Florid
rDNA	: Ribozomal DNA
RNA	: Ribonükleik Asit
RNaz	: Ribonükleaz Enzimi
rpm	: Dakikadaki dönüş sayısı

SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SKM	: Skim Milk Powder
TCA	: Triklorik asit
sn	: Saniye
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametiletildiamin
Tris – HCl	: Trizma Tamponu
TSA	: Triptone Soy Agar
TSB	: Triptone Soy Broth
V	: Volt
α	: Alfa
β	: Beta

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Proteolitik enzimlerin peptit bağlarını parçalama modeli	11
Şekil 1.2. Sistein proteazlardan papainin üç boyutlu gösterimi.....	14
Şekil 1.3. Üçlü faz ayırma yöntem (TPP) çalışma prensibinin şematik gösterimi	19
Şekil 1.4. Ultrasyon destekli TPP posesinde kullanılan ultrasyon banyosu	21
Şekil 1.5. MLFTPP prosesinin şematik gösterimi	21
Şekil 3.1. Alkalın proteaz üretim şeması	50
Şekil 4.1. EA1, EA5, EA8 ve EA10 suşlarına ait petri görüntüleri.....	61
Şekil 4.2. İzolatların DNA jel görüntüsü	63
Şekil 4.3. Örneklere ait (GTG) ₅ -PCR jel görüntüsü	64
Şekil 4.4. İzolatların 16S rRNA jel görüntüsü.....	64
Şekil 4.5. Mavi-beyaz koloni örnek görüntüsü.....	65
Şekil 4.6. Koloni PCR jel görüntüsü.....	65
Şekil 4.7. Filogenetik ağaç.....	66
Şekil 4.8. Skim Milk Agar petrisindeki EA10 suşuna ait proteaz aktivite görüntüsü	67
Şekil 4.9. Protein tayininde kullanılan standart grafik.....	68
Şekil 4.10. Proteaz aktivitesi için standart tirozin grafiği.....	68
Şekil 4.11. Tpp prosesinin %20 amonyum sülfat konsantrasyonu varlığında farklı <i>t</i> - bütanol oranının (Homojenat: <i>t</i> - bütanol; 1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5, 1.0:2.0) alkalin proteazın saflaştırma katsayısına ve verime etkisi	70
Şekil 4.12. Tpp prosesinin %30 amonyum sülfat konsantrasyonu varlığında farklı <i>t</i> - bütanol oranının (Homojenat: <i>t</i> - bütanol; 1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5, 1.0:2.0) alkalin proteazın saflaştırma katsayısına ve verime etkisi	70
Şekil 4.13. Tpp prosesinin %40 amonyum sülfat konsantrasyonu varlığında farklı <i>t</i> - bütanol oranının (Homojenat: <i>t</i> - bütanol; 1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5, 1.0:2.0) alkalin proteazın saflaştırma katsayısına ve verime etkisi	71
Şekil 4.14. Tpp prosesinin %50 amonyum sülfat konsantrasyonu varlığında farklı <i>t</i> - bütanol oranının (Homojenat: <i>t</i> - bütanol; 1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5, 1.0:2.0) alkalin proteazın saflaştırma katsayısına ve verime etkisi	71

Şekil 4.15. Tpp prosesinin %60 amonyum sülfat konsantrasyonu varlığında farklı <i>t</i> -bütanol oranının (Homojenat: <i>t</i> - bütanol; 1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5, 1.0:2.0) alkalın proteazın saflaştırma katsayısına ve verime etkisi	72
Şekil 4.16. Tpp prosesinin %70 amonyum sülfat konsantrasyonu varlığında farklı <i>t</i> -bütanol oranının (Homojenat: <i>t</i> - bütanol; 1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5, 1.0:2.0) alkalın proteazın saflaştırma katsayısına ve verime etkisi	72
Şekil 4.17. Tpp prosesinin %80 amonyum sülfat konsantrasyonu varlığında farklı <i>t</i> -bütanol oranının (Homojenat: <i>t</i> - bütanol; 1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5, 1.0:2.0) alkalın proteazın saflaştırma katsayısına ve verime etkisi	73
Şekil 4.18. Alkalın proteazın saflaştırılmasında TPP sistemine pH'nın etkisi	74
Şekil 4.19. SDS-PAGE sonucu çizilen Log MK-Rf grafiği	75
Şekil 4.20. <i>B. licheniformis</i> EA10'dan üçlü faz ayırma yöntemiyle saflaştırılan proteaz enziminin SDS-PAGE ve zimogram görüntüsü	76
Şekil 4.21. Proteaz enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm grafiği	77
Şekil 4.22. Proteaz enzimi için elde edilen stabil pH grafiği	78
Şekil 4.23. Proteaz enzimi optimum sıcaklık ölçülmesi için çizilen sıcaklık-bağıl aktivite grafiği	79
Şekil 4.24. Sıcaklığın proteaz enzim kararlılığı üzerine etkisi.	80
Şekil 4.25. Bazı metal iyonlarının proteaz aktivitesi üzerine etkisi.....	82
Şekil 4.26. <i>B.licheniformis</i> EA10'dan elde edilen proteaz enzimi üzerine inhibitörlerin etkisi	83
Şekil 4.27. Proteaz enziminin organik çözücülerdeki 1 saat inkübasyon sonundaki sonuçları	85
Şekil 4.28. Proteaz enziminin organik çözücülerdeki 24 saat inkübasyon sonundaki sonuçları	86
Şekil 4.29. <i>B.licheniformis</i> EA10'dan saflaştırılan proteaz enzimi üzerine yüzey aktif maddelerin ve okside edici ajanın etkisi	87
Şekil 4.30. Kazein substratı için KM ve Vmax bulunmasına yönelik Lineweaver-Burk grafiği	89
Şekil 4.31. <i>B.licheniformis</i> EA10'dan saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesi üzerine bazı ticari olarak satılan deterjanların etkisi.....	89

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Farklı alanlarda kullanılan enzimler ve uygulama alanları.....	4
Çizelge 1.2. Mikrobiyal enzimlerin uygulama alanları	7
Çizelge 3.1. Örneklerin alındığı istasyonlar.	29
Çizelge 3.2. tez kapsamında kullanılan kimyasallar, kitler ve şirket adı.....	29
Çizelge 3.3. Tez çalışmasında kullanılan laboratuvar ekipmanları.	30
Çizelge 3.4. (GTG) ₅ - PCR işleminde kullanılan reaktiflerin yoğunluk ve miktarları	41
Çizelge 3.5. (GTG) ₅ - PCR programı, sıcaklık döngüsü	42
Çizelge 3.6. 16S rRNA PCR işleminde kullanılan reaktiflerin yoğunluk ve miktarları.....	43
Çizelge 3.7. PCR Programı, sıcaklık döngüsü.....	44
Çizelge 3.8. Ligasyon işleminde kullanılan reaktiflerin yoğunluk ve miktarları	45
Çizelge 3.9. Koloni PCR işleminde kullanılan reaktiflerin yoğunluk ve miktarları.....	47
Çizelge 3.10. Koloni PCR programı, sıcaklık döngüsü	47
Çizelge 3.11. Yürütme jeli bileşenleri	55
Çizelge 4.1. Termofilik bakteri suşları ve izole edildikleri istasyonlar	61
Çizelge 4.2. İzolatların morfolojik ve biyokimyasal özellikleri	62
Çizelge 4.3. DNA dizi analizi sonucu belirlenen bakterilerin benzerlik yüzdeleri	66
Çizelge 4.4. <i>Bacillus licheniformis</i> EA10'dan izole edilen alkalın proteazın saflaştırma tablosu	74
Çizelge 4.5. <i>B. licheniformis</i> EA10'dan üçlü faz ayırma yöntemiyle saflaştırılan proteaz enziminin 0,1 M sodyum fosfat (pH6,0–8,0), Tris-HCl (pH 7,0–9,0) ve glisin-NaOH (pH 9,011,0) tampon çözeltileri kullanılarak optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	77
Çizelge 4.6. <i>Bacillus licheniformis</i> EA10'dan üçlü faz ayırma yöntemiyle saflaştırılan proteaz enziminin 0,1 M sodyum fosfat (pH6,0–8,0), Tris-HCl (pH 7,0–9,0) ve glisin-NaOH (pH 9,0–11,0) tampon çözeltileri kullanılarak stabil pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları	77

Çizelge 4.7. <i>B. licheniformis</i> EA10'dan üçlü faz ayırma yöntemiyle saflaştırılan proteaz enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık- bağıl aktivite (%) ölçüm sonuçları çizelgesi.....	78
Çizelge 4.8. <i>B. licheniformis</i> EA10'dan üçlü faz ayırma yöntemiyle saflaştırılan proteaz enziminin sıcaklık kararlılığını belirlemek için zaman-sıcaklık- kalan aktivite (%) ölçüm sonuçlarının gösterimi	79
Çizelge 4.9. Bazı metal iyonlarının proteaz aktivitesi üzerine etkisi.....	81
Çizelge 4.10. <i>B.licheniformis</i> EA10'dan elde edilen proteaz enzimi üzerine inhibisyon ajanlarının etkisi	83
Çizelge 4.11. Bazı organik çözücülerin 1 saatlik inkübasyon süresinde proteaz aktivitesi üzerine etkisi	84
Çizelge 4.12. Bazı organik çözücülerin 24 saatlik inkübasyon süresinde proteaz aktivitesi üzerine etkisi	85
Çizelge 4.13. <i>B.licheniformis</i> EA10'dan saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine yüzey aktif maddelerin ve okside edici ajanın etkisi	87
Çizelge 4.14. <i>B.licheniformis</i> EA10'dan saflaştırılan proteaz enziminin doğal subsratlara varlığında aktivitesi	88

1. GİRİŞ

1.1. Endüstriyel Enzimler

Enzimler, katalizörlerin fonksiyonlarını yerine getiren kompleks organik maddelerdir. Başka bir deyişle canlı organizmada meydana gelen birçok biyokimyasal reaksiyon, protein yapılı özellikli biyokatalizörler olan enzimler tarafından katalizlenir (Topal 1985; Gazel 2016).

İnsanların enzimleri kullanması, medeniyetin en eski zamanlarına kadar uzanır. İlkel toplumlardaki; yiyecek ve içeceklerinin hazırlanması, giyinmek için derilerin iyileştirilmesi gibi insan faaliyetleri bilmeden de olsa enzim aktivitelerinin uygulamasını içeriyordu. Daha sonra biyokimyanın gelişmesiyle ve birçok önde gelen bilim adamının öncü çalışmaları ile enzimlerin doğası ve nasıl çalıştıkları netleştirilmeye başlanmıştır. Enzimatik işlemlerin, geleneksel işlemlere oranla daha az miktarda atık oluşturarak daha az çevre kirliliğine yol açması, uygun ve ekonomik şartlarda gerçekleştirilebilmesi enzim kullanımını daha cazip hale getirmektedir. Enzimlerin endüstriyel alanda kullanılmaları çok eski çağlara kadar uzanmaktadır. İlk çağlardan beri üretildiği bilinen ekmek, yoğurt, şarap, peynir gibi gıda maddelerinin üretiminde kullanıldığı, örneğin incir bitkisinden elde edilen sıvı ile süttten peynir yapıldığı bilinmektedir (Sevinç 2010, Polaina and Maccabe 2007).

Enzimler hakkında elde edilen önemli bilgileri kronolojik olarak şu şekilde sıralayabiliriz: Enzimler hakkındaki ilk bilgiler 1570'li yıllara dayanır. Pasteur ve Liebing gibi birçok ünlü araştırmacı sayesinde enzimler hakkında pek çok temel bilgi sağlanmıştır. Alman kimyacı Berzellius, 1838 yılında reaksiyon hızı üzerine etki yapan maddelere 'katalizör veya katalizatör' adını vermiştir. Gagnrard ve Schav adlı iki bilim, (1838) birbirinden habersiz olarak fermantasyon olayını incelemiş ve bu olayın maya adı verilen bazı makro organizmalar tarafından meydana getirildiğini açıklamışlardır. Kühne, (1879) biyolojik reaksiyon hızlarına etki eden maddeleri ayırt etmek için

Yunanca mayada bulunan anlamına gelen ‘enzim’ kelimesini önermiştir. Poyen ve Perşon (1883) nişastanın çözünürleştirilmesinde malt özütü içinde bulunan “diastaz enziminin” etkin olduğunu belirlemiştir. Blumenthal, (1885) peynir yapımında kullanılmak üzere, ilk kez rennin enziminin özütünü, teknolojik boyutlarda üretmeyi başarmıştır. Büchner, (1897) maya hücrelerinden bazı enzimleri ayırmayı başararak, yeni bir araştırma alanı açmıştır. Rahm, (1915) lipaz ve proteaz enzimlerinin çamaşır yıkama sularına katılarak, çok etken bir temizleyici olarak kullanılabileceğini göstermiştir. James B. Summer, (1926) ilk kez üreaz enziminin kristallerini elde ederek, molekülün büyük bir kısmının protein olduğunu göstermiştir. Northrop, Kuintz, Herriott ve Amson gibi bilginlerden oluşan bilim adamı grubu sırası ile pepsin, tripsin, kimotripsin ve karboksipeptinaz enzimlerini kristalize etmeyi başarmıştır (1930).

1930 yıllarında 80 adet enzim tanınırken, 1968’lerde bu rakam 1300’e 1982’de 2000’e yükselmiştir. Günümüzde ise 2500 enzimin var olduğu bilinmektedir ve yine enzimlerle ilgili çalışmalar sürekli artarak devam etmektedir (Acar 2009). Enzim alanındaki bu büyük ilerleme enzim isimlendirilmesinde düzenleme gerektirmiştir. Bu yüzden Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB), Uluslararası Saf ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) ile istişare ederek enzimlerin sistematik sınıflandırılmasından ve adlandırılmasından sorumlu Uluslararası bir Enzim Komisyonunu kurulmuştur (Singh *et al.* 2016). Kurulan bu Enzim Komisyonu (EC) enzimleri katalizledikleri ana reaksiyon tipine göre 6 ana gruba sınıflandırmıştır:

1. *Oksidoreduktazlar* (Oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarını katalizlerler.)
2. *Transferazlar* (Fonksiyonel bir grubun bir molekülden diğer bir moleküle transferini katalizlerler.)
3. *Hidrolazlar* (Moleküle su molekülünü dahil ederek bağ kırarlar.)
4. *Liyazlar* (Çift bağ yapar veya kırarlar.)
5. *İzomerazlar* (Molekülleri izomerlerine çevirirler.)
6. *Ligazlar* (İki molekül arasında bağ oluşumunu katalize ederler.) (Geçgil 2007)

Enzimleri kullanım amaçlarına göre; bilimsel araştırma ve analitik amaçla kullanılan saflık dereceleri yüksek *analitik enzimler*, çeşitli fizyolojik hastalıkların tedavisinde kullanılan ve saflık derecesi oldukça yüksek *linik enzimler* ve üretime yönelik çeşitli reaksiyonların katalizinde kullanılan saflık dereceleri düşük olan *endüstriyel enzimler* olarak üç grupta toplayabiliriz (Gök 2011).

1.2. Endüstriyel Enzim Uygulamaları

Enzimlerin çok çeşitli uygulama alanları bulunmaktadır. Teknik kullanım, besin üretimi, hayvansal yem üretimi, kozmetik, medikal gibi birçok alanı da içine alan geniş uygulama alanına sahiptir (Çizelge 1.1). Günümüzde hemen hemen 4000 enzim, ki bunların yaklaşık olarak 200'ü mikrobiyal orijinli olmak üzere, ticari olarak kullanılmaktadır. Ancak endüstriyel ölçekte sadece 20 tip enzim üretilmektedir (Shuang Li *et al.* 2012).

Günümüzde endüstriyel enzimlerin çoğu hidrolitiktir ve doğal maddelerin parçalanmasında kullanılmaktadırlar. Endüstriyel enzimlerden olan proteazlar süt endüstrisi, deterjan endüstrisi, gıda endüstrisi, kozmetik, kağıt ve kağıt hamuru, organik sentezi, farmasötik, tekstil endüstrisi gibi birçok endüstride yaygın olarak kullanıldıkları için endüstride en baskın olan enzim grubunu oluşturmaktadırlar. Amilaz ve selüloz gibi çeşitli karbohidrazlar; nişasta, tekstil, deterjan ve fırıncılık endüstrilerinde kullanılan ikinci büyük enzim grubudur (Gurung *et al.* 2013).

Çizelge 1.1. Farklı alanlarda kullanılan enzimler ve uygulama alanları (Gurung *et al.* 2013).

Endüstrilerin Tipleri	Enzimler	Kullanım Alanları
Alkol/içecekler	Amilaz,glukanazlar, proteazlar, beta-glukanazlar, arabinoksilanlar, amiloglükosidaz, pullulanazlar ve asetolaktat dekarboksilaz	Polikarbonatların ve nişastanın basit şekere yıkımında, Kompleks proteinleri şekere indirgeyerek fermantasyon verimliliğini arttırmada Düşük kalorili bira üretiminde kullanılırlar.
Meyve suları	Sellulazlar, pektinazlar	Meyve sularını temizlemede kullanılırlar.
Bebek yiyecekleri	Tripsin	Bebek yiyeceklerinin ön sindiriminde kullanılırlar.
Yiyecek işleme	Amilaz, proteaz ve papain	Etin yumuşatılmasında, nişasta ve kompleks proteinlerin yıkımında kullanılırlar.
Süt ürünleri	Rennin, lipazlar ve laktazlar	Proteinlerin hidrolize edilmesinde, peynir üretiminde (roquefort peyniri), Laktozdan glukoz üretiminde kullanılırlar.
Deterjan	Proteaz, amilaz, lipaz, selülazlar, ve mannanaz	Boyama sonrası proteini çıkarmada , bulaşık yıkarken çözünmez nişastayı çıkarmada, yağların çıkarılmasında ve deterjanların etkinliğini arttırılmasında kullanılırlar.
Tekstil	Amilaz, pektinaz, selülazlar, katalaz ve proteaz	Nişasta kalıntılarını gidermede, fiber çekirdek ve mumları yapıştırmada, denimlerdeki dokumayı tamamlamada, pamuğun beyazlatılmasından sonra kalıntı hidrojen peroksiti yıkmada, yün bakımında, aynı zamanda biyolojik parlatma olarak da bilinen ham ipeğin zamklaşmasında kullanılırlar

Çizelge 1.1. (Devamı)

Kağıt ve kağıt hamuru	Amilaz, ksilenaz, selülaz, hemiselülaz, ligninaz, ve esteraz	Daha az viskoziteli nişastayı yıkmada, boyutunu ayarlama, kağıt kaplama ve mürekkebi gidermede kullanılırlar. Ksilenazlar dekolorize etmek için gerekli ağartıcı sellulaz ve hemisellulazlar fiberleri düzleştirmede, su drenajını sağlamada, mürekkep çıkarmada kullanılırlar. Lipazlar zifti azaltmada kullanılırlar. Lignin-yıkan enzimler kağıdı yumuşatmak için lignini çıkarmada kullanılırlar.
Lastik	Katalaz	Lateksi köpüklü lastiğe çevirmede ve peroksiten oksijen üretiminde kullanılırlar.
Yağ ve petrol	Sellulazlar, ligninazlar ve mannazlar	Yağ sondajında jel kırıcı oluşturmada kullanılırlar.
Biyopolimer /plastik	Lakkazlar, peroksidazlar, lipazlar ve transglütaminazların	Polimerizasyon işlemi açısından in-situ materyaller üretmek için biyopolimerlerin arasında çapraz bağlar oluşturmada kullanılırlar.
Farmasötik	Nitril hidrataz, D-amino asit oksidaz, glutarik asit asilaz, penisilin asilaz, penisilin G asilaz, amonyak liyaz ve humulin	Biyosentetik insan insulini, aspartamat için ara maddeler, semisentetik antibiyotikler, suda çözünen ara maddeler üretmede kullanılırlar.
Moleküler biyoloji	Restriksiyon enzimleri, DNA ligaz ve polimeraz	Genetik mühendisliğinde DNA'yı manipule etmede kullanılırlar. Adli bilimler, polimeraz zincir reaksiyonları ve DNA'nın hidrolizi için gereklidir.

Günümüzde tüketiciler, sadece ABD ve Avrupa'da değil aynı zamanda tüketimin kalori kaynaklı yaşam kalitesinden uzaklaştığı gelişmekte olan ülkelerde de doğal lezzet ve tat bakımından gıdalarda daha yüksek kaliteli ürünler talep etmektedir. Bu eğilim, gıda

işleme alanındaki enzim uygulamalarının geliştirilmesine olan ihtiyacı tetiklemiştir. (Gurung *et al.* 2013). Enzimler gıda endüstrisinde oldukça önemli rol oynamaktadırlar. Gıda enzimleri esas olarak fırıncılık endüstrisinde, meyve suyu üretiminde, peynir üretiminde kullanılmaktadır ve aynı zamanda enzimler; şarap yapımında ve lezzetini, dokusunu, sindirilebilirliğini ve besin değeri artırmak için bira yapımında kullanılır. Yine yoğurt ve fermente ürünler de enzimatik reaksiyonlar sonucunda üretilmektedirler (Çerçi vd 2011).

Deterjan endüstrisinde ekstrem koşullara dayanıklı ve ekstrem koşullarda bile aktivitesini koruyabilen enzimlere gerek duyulmaktadır. Alkali pH, yüksek sıcaklık, sürfaktan maddelerin varlığı enzim aktivitesini inhibe eder. Denatürantlara dayanabilen termofilik enzimler bu amaçla deterjan endüstrisinde kullanılırlar (Coşkun 2010).

Hayvan beslenmesinde enzimlerin kullanılması günümüzdeki çiftlik sistemlerinde önemli bir role sahiptirler. Enzimler hayvanların sindirim sisteminde nişasta, protein ve yağları parçalayarak sindirimi kolaylaştırırlar. Yem katkı maddesi olarak kullanılan enzimler mikrobiyal kökenlidirler. Bunlardan proteaz, lipaz, amilaz, glukanaaz, selülaaz, pektinaz gibi çeşitli enzimler tek başına veya kombine olarak karma yemlere katılmak suretiyle yem sanayinde kullanılmaktadır. Enzimler, yemlerin sindirilme derecelerinin ve yemlerin metabolik enerji değerlerinin artırılmasında ve bununla beraber enzimler sayesinde hayvanların yemden yararlanma oranlarında artış sağlanmaktadır (Güler ve Başaran 2003).

Enzimlerin mikrobiyal yolla üretimi yakın geçmişte önem kazanmıştır. Buchner 1897'de ilk kez yaşayan hücreden aktif enzimlerin izole edilebileceğini göstermiştir. Endüstriyel yolla enzim üretiminde mikrobiyal kaynakların kullanılması, yetersiz olan üretimde artış sağlanması bakımından çok avantajlı olmuştur (Topal 1988).

Mikrobiyal kaynaklı enzimlerin endüstriyel önemlerinden dolayı uygun enzimleri üreten yeni bakteriyel suşların izolasyonuna olan ilgi artarak devam etmektedir. Mikrobiyal kaynaklar; düşük maliyet, üretimde tutarlılık, kısa sürede ürün elde

edinmesi, işlem modifikasyon ve optimizasyonunun kolaylığı gibi avantajlardan dolayı endüstriyel üretimler için kullanılmaktadır (Haliskaranfil 2012).

Mikrobiyal enzimler; gıda sektöründe (süt ürünlerinin üretimi, biracılık, etlerin işlenmesi, meyve sularının berraklaştırılması, fruktoz şurubu üretimi), deterjan endüstrisinde (protein ve yağ artıklarını parçalamak için), tekstilde (deri ve dokuma ipliklerinin işlenmesini kolaylaştırmada) ve teşhis ve tedavi amacıyla tıpta kullanılmaktadırlar (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2. Mikrobiyal enzimlerin uygulama alanları (Singh *et al.* 2016)

Kullanılan Endüstri	Enzim	Fonksiyon
Süt Ürünleri	Asit proteinaz	Süt Koagülasyonunda
	Nötr Proteinaz	Daha hızlı peynir olgunlaştırmada, acılık gidermede,
	Lipaz	Daha hızlı peynir olgunlaştırmada, Özelleştirilmiş peynir tadımında, Laktozu azaltılmış süt ve peynir altı suyu ürünleri üretilmesinde,
	Laktaz(β –galaktosidaz)	Daha hızlı peynir olgunlaştırmada,
	Aminopeptidaz	Peynir işlemede,
	Katalaz	Protein çapraz bağlamada kullanılırlar.
	Transglutaminaz	
Fırıncılık	Amilaz	Un ayarında, ekmek yumuşatılmasında
	Maltojenik	Ekmeklerin raf ömrünü arttırmada
	α -Amilaz	Hamuru forma sokmada
	Ksilanaz	Hamur kararlılığında ve forma sokmada
İçecekler	Lipaz	Hamuru güçlendirmede kullanılırlar.
	Glukoz oksidaz	Depektinatasyonda,
	Pektinaz	Biradan oksijen alınmasında,
	Glukoz oksidaz	Meyve sıvılaştırılmasında,
	Selülaz	Nişasta hidrolizinde,
	α -Amilaz	Nişasta hidrolizinde,
	β -Amilaz	Bulanıklık gidermede,
	β -Glukanaz	Bulanıklık gidermede,
	Proteinaz	Nişasta Şekerlendirmesinde,
	Pülulanaz	Acılık gidermede,
Naringinaz		

Çizelge 1.2. (Devamı)

	Aminopeptidazlar	Acılık gidermede kullanılırlar.
Yem Endüstri	Fitas Ksilanaz	Fitik asit hidrolizinde, Nişastanın sindirilebilirliğini arttırmada kullanılır.
Kağıt ve kağıt hamuru	β -Glukanaz Lipaz Proteinaz Amilaz Ksilanaz Lakkaz Selülaz	Sindirim yardımında, Zift kontrolünde, Biyofilm çıkarımında, Mürekkep gidermede, drenajda, Ağartma takviyesinde, Klorsuz ağartmada, delignifikasyonda, Mürekkep gidermede, drenajda kullanılırlar.
Polimer	Lipaz Lakkoz Glukoz oksidaz Transglutaminaz Tirozinaz	Polikondansasyonda, Bisfenol A polimerizasyonunda, Anilinlerin polimerizasyonunda, Proteinin çapraz bağlanmasında, Lignin ve kitosan Polimerizasyonunda kullanılırlar.
Deterjan	Amilaz Lipaz Proteinaz Selülaz Kütinaz Mannaz	Karbonhidrat lekesi çıkarmada, Yağ lekesi çıkarmada, Protein lekesi çıkarmada, Renk açılmasında, Trigliserid gideriminde, Mannan lekesi çıkarmada kullanılırlar.
Deri Endüstrisi	Alkalin proteaz Nötr proteaz Lipaz Amilaz	Kıl gideriminde, Kıl gideriminde, ıslatmada, Yağ almada, Elyaf ayırımında kullanılırlar.
Kozmetik	Süperoksit dismitaz Proteaz Endoglikozidaz Lakkaz Lipaz	Serbest redikal süpürmede, cilt bakımında, Ölü cildi temizlemede, Diş ve dişeti dokusu bakımında, Saç boyasında, Cilt bakımında kullanılırlar.
Organik Sentez	Lipaz Glikoz tranforaz	İlaçların sentezin, polimerler biyodizeller, biyolojik yüzeyi aktif malzemelerde, oligosakkarid sentezinde,

Çizelge 1.2. (Devamı)

	Nitril hidrotaz	Akrilamid sentezi, bütiramit, nikotinamid
	Glükoz isomeraz	Yüksek fruktozlu mısır şurubu üretiminde,
	Asiltransferaz	Hidroksamik asitler sentezinde
	Lakkaz	Kozmetik pigmentler ve böcek öldürücülerde kullanılırlar.
Atık Yönetimi	Amidaz	Atıkları içeren nitrillerin bozulmasında,
	Amilaz	Sebze atıklarının biyoremediasyonunda,
	Aminoglikosidaz	Biyoremediasyon için nişasta hidrolizinde,
	Lipaz	Ham petrol hidrokarbonların bozulmasında
	Nitril hidretaz	Atıkları içeren nitrillerin bozulmasında,
	Proteaz	Keratinik atıkların biyoremediasyonunda,
	Lakkaz	Olefin birimi atıkların bozulmasında, poliüreten ve fenolik birleşiklerde,
	Kütinaz	Plastiklerin bozulmasında,
	Manganez peroksidaz	Fenolik birleşiklerin bozulmasında,
	Lignin peroksidaz	Fenolik birleşiklerin bozulmasında,
	Oksijenaz	Halojenle kirleticilerin bozulmasında kullanılırlar.

1.3. Endüstriyel Uygulamalarda Önemli Enzimler

Selülitik enzimler; çok yönlü uygulamalarından dolayı en önemli endüstriyel enzimdir. Özellikle biyoetanol üretiminde ve önemli organik bileşiklerin üretiminde araştırmacıların yoğun ilgi göstermektedir. Selülitik enzimler kompleks enzimlerdir. En önemle tipleri; endoglukonaz, karboksimetilselülaz, ekzoglukanaz ve selobiazdır (Dhillon *et al.* 2016).

Lipazlar; lipitlerin ester bağlarının hidrolizini katalizleyen esterazların bir alt sınıfını oluşturan enzim olarak bilinmektedir. Lipazların yaygın olarak kullanıldığı sektörler, gıda, deterjan, ilaç, deri, tekstil, kozmetik ve kağıt sektörüdür.

Amilazlar; α –amilaz enzimi nişasta molekülündeki **α -1,4** bağlarını parçalayıp glukoz, maltotrioz, maltoz ve **α** -limit dekstrinlerin oluşumunu sağlamaktadır. Amilazlar biyoteknolojik açıdan en önemli enzim grubudur.

Fibrinolitik enzimler; klinik uygulamalar için önemli olan bu enzim kemoterapötik ajan olarak kanın pıhtılaşmasında rol alır. Bununla birlikte proteazın bir alt sınıfı olan fibrinolitik enzimler fibrin indirgeme yeteneğine sahiptir.

Dekarboksilaz (biyojen aminler); hayvan, bitki ve mikroorganizmaların metabolik aktiviteleri sonucunda sonucunda, amino asitlerin dekarboksilasyonu veya aldehit ve ketonların aminasyonu ve transaminasyonu ile oluşan düşük molekül ağırlıklı azotlu bileşiklerdir (Yüce vd 2017).

Ksilan ve ksilanazlar; kağıt ve kağıt hamuru başta olmak üzere gıda ve hayvan yemi endüstrisi alanlarında esas endüstriyel enzim olmaları hasebiyle çok büyük öneme sahiptir.

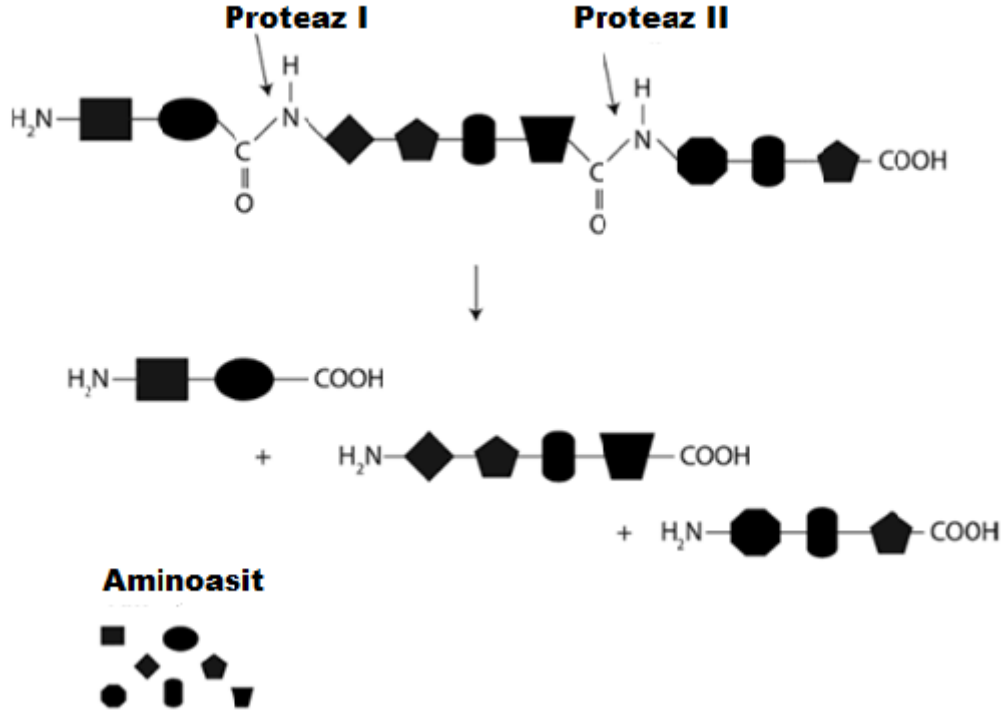
Pektolitik enzimler; evlerde kullanılan ilk enzimler olarak bilinen pektinazlar, meyve ve tekstil sektöründe ve çeşitli biyoteknolojik uygulamalar için son derece önemli bir endüstriyel enzimdir.

Proteazlar; proteinleri hidrolize eden bu enzimler hem fizyolojik hem de ticari alandaki uygulamaları açısından çok önemli bir yere sahiptir. Günümüzde proteazlar, dünyada endüstriyel olarak satılan üç büyük enzim grubundan biridir (Yüce vd 2017).

1.3.1. Proteolitik enzimler

Proteolitik enzimler, proteinlerin yapısındaki peptit bağlarını amino asitler ve küçük peptitlere parçalamak üzere hidrolizleyen enzimlerdir (Fu-Li Li 2015). Proteolitik enzimler EC numaralarına göre; sınıf 3 (hidrolazlar) ve alt sınıf 3.4 (peptidazlar ya da

peptid hidrolazlar) grubuna ait enzimlerdir ve EC 3.4 başlığıyla ifade edilirler (Gençkal 2004). Proteoliz olarak adlandırılan; peptid bağlarının proteazlar tarafında hidrolizi şekil 1.1’de gösterilmiştir.



Şekil 1.1. Proteolitik enzimlerin peptid bağlarını parçalama modeli (Fu-Li Li 2015)

Proteazlar, tüm organizma türlerinde mevcut olan toplam protein sayısının %2'sini oluştururlar. Peptidazları kodlayan toplam yaklaşık 500 insan geni vardır. MEROPS (<http://merops.sanger.av.uk>) veritabanı peptidazlar ve onları kodlayan genler hakkında oldukça zengin bir bilgi kaynağıdır. Bu veritabanı bilgiyi depolama ve bilgiye erişimi hiyerarşik sınıflandırma sistemini kullanarak kolaylaştırmaktadır (Yıldırım 2014).

Proteazlar, proteinleri parçalayarak hücre çoğalması, hücre döngüsü, DNA replikasyonu, doku yenilenmesi, hücre ölümü, hemostasis (koagülasyon), immün yanıt ve yara iyileşmesi gibi bir çok fizyolojik sürecin kontrolünde önemli rol oynamaktadırlar.

Proteolitik enzimler, hücrel metabolik süreçlerde önemli rol oynamalarının yanısıra endüstriyel çevrelerin de oldukça dikkatini çekmektedir. Endüstrinin çeşitli alanlarında kullanılan enzimlerin dünya genelindeki toplam satışının 1 milyar doların üzerinde olduğu tahmin edilmektedir. Endüstriyel enzimlerin en önemli ve en büyük sınıfını proteolitik enzimler oluşturmaktadır ve endüstride en çok kullanılan üç enzimin içerisinde yaklaşık %60lık pazar payıyla başı çekmektedir (Işık 2014).

Aktif merkezinin yapısına göre proteazlar serin proteazlar, sistein(tiyol) proteazlar, asit (aspartik) proteazlar ve metal (metallo) proteazlar olmak üzere 4 gruba ayrılmaktadır (Atav ve Karaboğa 2017).

1.3.1.a. Serin proteazlar

Serin proteazlar (EC 3.4.21.), günümüzde endüstriyel amaçlarda kullanılan termostabil proteazlar arasında büyük öneme sahiptir (Fu-Li Li 2015). Serin proteazlar alkali pH değerlerinde aktitirler ve geniş bir substrat çeşitliliğine sahiptirler. Bu özellikleri sayesinde farklı ve geniş endüstriyel uygulama alanlarına sahiptirler (Alpan 2008).

Serin proteazlar gerçekleştirdiği peptit bağlarının hidrolizi; taşıyıcı proteinlerden önder dizilerin taşınmasının, polipeptit hormon sürecinin, yeni taşınmış proteinlerden N-terminal metiyoninin taşınmasının, viral enfeksiyonda poliprotein sürecinin, yabancı proteinlerin sindirilmesinin, apoptozisde hücrel protein sindiriminin ve diğer pek çok sürecin temelini oluşturur. (Öztekin 2011).

Serin proteazlar yapılarında serine grubunun varlığı ile karakterize edilebilmektedir. Bu enzimler PMSF, DFP, TLCK, 3,4 DCI inhibitörleri ile geri dönüşümsüz olarak inhibe olmalarıyla tanınırlar ve moleküler ağırlıkları 18-35 kDa arasındadır. Serin alkali proteazlar birçok bakteri, maya, küf ve mantardan üretilirler (Turus 2011). Alkalifilik özelliklerinden dolayı endüstride (daha çok çamaşır deterjanı endüstrisinde) geniş kullanım alanlarına sahip serin proteazların çoğu *Bacillus* suşlarından izole edilmektedir. 1947'de Carlsberg Laboratory'de bulunan ve ticari adı "Subtilisin

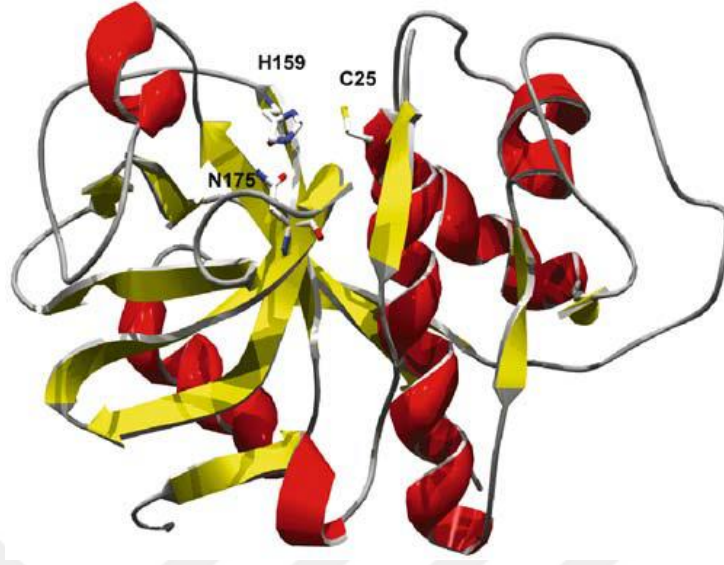
Carlsberg” olan ticari alkali proteazın endüstriyel üretimi 1960’larda başlamıştır. İkinci ticari öneme sahip serin proteaz *Bacillus licheniformis*’den “Subtilisin Novo” dur (Ercan 2007).

1.3.1.b. Sistein proteazlar

Sistein proteazlar (EC.3.4.22) prokaryot ve ökaryotlar tarafından üretilen proteazlardır. Bu tip proteazların yaklaşık 20 alt sınıfı tanımlanmıştır ve bunların birçoğu (papain, bromelain, fisin ve hayvansal katepsinler gibi) endüstriyel açıdan çok önemlidir. Tripsin benzeri tiyol proteazlar, papain benzeri tiyol proteazlar, glutamik aside özel ve diğer tiplerdeki tiyol proteazlar olmak üzere dört grupta incelenmektedir. Bunlardan en iyi bilinen grup papain benzeri endoproteazlardır. Sistein proteazlar, aktif merkezlerinde bulunan -SH (tiyol) grubu, okside edici ajanlarla ve ağır metal iyonları kolayca inhibe edilebilmesinden dolayı önemli enzimlerdir (Özden 2014).

Son zamanlarda sistein proteazlar, ilaç endüstrisinin ilgisini çekmektedir. Lizozomal proteinazlar olan katepsinler, endopeptidazların ve/veya ekzopeptidazların bir ailesi olarak belirtilmektedir. Bazı katepsinler asidik pH ortamında aktifken, bazıları da nötral pH ortamında aktif kalabilmektedirler. Katepsinler; osteoporoz, romatoid artrit, damar sertliği, kanser, inflamatuvar ve otoimmün hastalıklar gibi pek çok hastalık için ilaç olarak umut vericidir (Sarı 2011).

Papain (EC. 3.4.22.2) en iyi bilinen sistein proteazlardandır (Şekil 1.2). Carica papaya'nin meyvelerinden 1879 yılında izole edilmiştir ve aynı zamanda kristalografik yapısı belirlenen ilk proteazdır. Papaya meyvesinin kurutulmuş ham lateksi en az dört sistein proteazın (papain, kimopapain, karikain ve gisil endopeptidaz) ve diğer enzimlerin bir karışımını içermektedir. Papain 212 amino asidin üç disülfid köprüsüyle birleşmesiyle oluşur ve molekül kütlesi 23,4 kDa'dur (Sarı 2011).



Şekil 1.2. Sistein proteazlardan papainin üç boyutlu gösterimi (Grzonka *et al.* 2007).

1.3.1.c. Aspartik proteazlar

Aspartik proteazlar (EC 3.4.23) asidik proteazlar olarak tanımlanırlar ve katalitik aktivitelerini aspartik asit kökleri üzerine etki ederek gösteren endopeptidazlardır. Aspartik proteazları birçoğu pH 3,0-4,0 gibi düşük pH değerlerinde aktivite gösterirler ve molekül ağırlıkları 30-45 kDa arasında değişmektedir. Aspartik proteazlar Diazoasetilnorlösın-DL-norleucine metil ester (DAN) ve 1,2-epoksi-3-(p-nitrofenoksi) propan (EPNP) gibi bakır iyonlarını içeren diazoketon bileşiklerine karşı hassastırlar (Tekin 2008).

Aspartik proteazlar; bitki, retrovirüslerde ve bitki virüsleri bulunurlar. Asidik proteazların doğada bulunabilirliği serin proteazlara oranla daha azdır. Asidik proteazlar 3 gruba ayrılırlar. Bunlar pepsin (A1) , retropepsin (A2), pararetrovirüslerden (A3) elde edilen enzimlerdir. A1 ve A2 nin birbirleriyle yakın ilgisi vardır fakat A3 bunlardan farklıdır. Aspartik asitler maksimum aktiviteyi pH 3,0-4,0 izoelektrik noktayı ise 3,0 ile 4,5 civarında gösterir (Sevinç 2010).

1.3.1.d. Metalloproteaz

Metalloproteazlar, tanımlanmış 30 sınıfıyla katalitik proteazların en çok çeşitlilik gösteren grubudur. +2 değerlikli metal iyonları varlığında aktivite göstermeleriyle karakterize edilirler. Metalloproteazlar EDTA gibi jelat yapıcı ajanlar tarafından inhibe olurlar (Ahmetoğlu 2011). Metalloproteazların bilinen en iyi tipleri serralizin gibi matriks metalloproteazları ve hücre zarının yapısında bulunan yüzey membran proteinleri olan ADAM (A disintegrin And Metalloproteinase) proteinleridir (Edwards *et al.* 2008).

1.3.2. Proteaz kaynakları

Proteazlar doğada oldukça yaygın bulunan önemli enzim gruplarından birini oluşturmaktadır. Bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar gibi canlı gruplarında geniş çeşitlilik göstermektedirler.

Proteaz kaynağı olan bitkilerden proteaz izolasyonu yüksek verimli olmakla birlikte zaman gerektiren bir işlemdir. Kültür koşullarının devamlılığı ve gelişme için gerekli olan iklim koşulları gibi faktörler bitkisel proteazların kullanımını kısıtlamaktadır. Papain, bromelin, fisin ve keratinazlar gibi enzim grupları iyi bilinen bitki orijinli proteazlardır.

Hayvansal orijinli proteazları pankreatik tripsin, kimotripsin, renin ve pepsin oluşturmaktadır. Hayvansal kaynaklı proteazlar büyük hacimlerde fazla miktarda saflaştırılabilmektedir. Ancak bunların üretimi fazla miktarda çiftlik hayvanının kesimini gerektirdiği için tarımsal politikalar gerektirmektedir.

Bitkisel ve hayvansal proteazların elde edilmesindeki kısıtlamalardan dolayı mikrobiyal proteazlara karşı ilgi tüm dünyada artmaktadır (Sonuç 2011).

Mikroorganizmalar, fermantasyon yöntemi ile kısa sürede fazla miktarlarda üretilmeleri nedeni ile cazip proteaz kaynaklarıdır. Mikrobiyal kaynaklı proteazların istenilen endüstri koşullarına göre enzim üretebilmeleri endüstrisini mikroorganizmalara yöneltmektedir. Örneğin termofilik bakteriler kullanılarak termosabil proteazlar sentzlenebilmektedir. Bunun yanında alkalifilik bakteriler kullanılarak alkalın proteazlar sentzlenebilmektedir.

Proteazlar, mikroorganizmalar tarafından hücre içi (endoselüler) ve hücre dışı (ekstraselüler) olarak sentzlenirler. Hücre içi proteazlar sporulasyon, farklılaşma, enzimlerin ve hormonların olgunlaşması, protein katlanması gibi hücresel ve metabolik olaylarda görev yapmaktadır. Hücre dışı proteazların hücre dışı koşullarda hidrolitik ürünlerin hücre içine alınmasına imkan sağlamak gibi rolleri vardır. Hücre dışı üretilen ve fermantasyon besiyerine direkt olarak salgılanan mikrobiyal proteazlar üretilmelerindeki kolaylık nedeni ile bitkisel ve hayvansal proteazlara karşı tercih edilmektedirler .

Mikrobiyal proteazlar dünya piyasasındaki enzim satışlarında yaklaşık olarak %40'ını kapsamaktadır. Mikroorganizma kaynaklı proteazlar biyoteknolojik metodlarla elde edilmesini sağlayan özellikleri nedeni ile bitkisel ve hayvansal proteazlara karşı tercih edilmektedir (Deshpande *et al.* 1998).

1.3.3. Bakteriyel alkalın proteazlar ve özellikleri

Hidrolitik enzimler günümüz endüstrisinin önemi olan enzimlerin %80'nini oluşturmaktadır (Divakar *et al.* 2010). Mikrobiyal kaynaklı enzimlerin istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, katalitik aktivitelerinin yüksek olması, büyüme koşullarının kolay optimize olması, maliyetinin düşük olması gibi avantajlarından dolayı dünya enzim pazarının üçte ikisi mikroorganizmalar tarafından izole edilen enzimlerden oluşmaktadır. Mikroorganizma, biyokimyasal çeşitliliklerinden dolayı proteaz üretiminde kullanılan oldukça iyi kaynaktır (Yıldırım 2014).

Bakterilerde alkalın proteaz üreticisi olarak *Bacillus* cinsi mikroorganizmalar önemli yer işgal ederler. Bu cinsin suşlarının çoğunun patojen olmaması, izolasyonunun ve tanısının kolay gerçekleşmesi, sentezledikleri proteini dış ortama verebilmeleri (ekstraselüler), fermentasyon yöntemi ile kısa sürede, fazla miktarda ürün üretebilmelerinden dolayı endüstriyel alanda sürekli ilgi odağı haline gelen mikroorganizmalardır (Boyce and Walsh 2007).

1.4. *Bacillus* cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri

Carl Woese tarafından 16 ve 18S rRNA dizilerinin karşılaştırılmasıyla oluşturulmuş sınıflandırmaya göre *Bacillus* cinsi mikroorganizmalar Bakteri (Eubakteri) domainine içerisine dahil edilmiştir (Woese and Wolfe 1985; Woese 1999). *Bacillus* grubu mikroorganizmalar; hareketli, zorunlu veya fakültatif aerob, Gram pozitif ve çubuk şekillidir. Gıda, ilaç, deterjan gibi birçok endüstriyel alanda kullanılan enzimler, *Bacillus* bakterileri tarafından üretilmektedir. *Bacillus*'lar amilaz, lipaz, kitinaz, pektinaz, ksilanaz, proteaz ve selüloz gibi farklı ekstrasellüler enzimleri üretebilme yeteneğine sahiptirler (Katı 2016).

Bacillus cinsinin üyeleri vejetatif formları düz, kenarları birbirine paralel, ucu yuvarlak veya küt biten 0,5-1,2 μm boyutlarındadırlar. Tek tek veya uzun zincirler şeklinde görülebilirler ve endosporları silindirik, oval, yuvarlak veya böbrek şeklinde olup türlere göre santral, terminal veya subterminal konumda bulunurlar. Çoğu *Bacillus* türlerinde katalaz pozitifdir. Basillerin çoğu basitrasın, tirozidin, polimiksin, sirkulin ve gramisidin gibi antibiyotikler üretir. Çoğunluğu mezofil şartlarda yaşayabilirken, termofil, psikrofilik, asidofil ve halofil cinsler de bulunmaktadır. *Bacillus* cinsinin hepsi spor oluşturma yeteneğindedir.

Bacillus cinsine ait bakteriler kolay ve hızlı üretilibilmeleri, antibiyotik, enzim gibi önemli metabolik ürünler sentezleyebilmeleri ve patojen olmamaları gibi özelliklerinden dolayı endüstriyel alanda büyük öneme sahiptirler. Nötrofilik ve alkalofilik *Bacillus*'lar özellikle yüksek oranlarda alkali proteaz üreticisi olmaları

nedeniyle büyük öneme sahiptir. Özellikle bu grubu üyelerinden asidofilik ve nötrofilik olanlar yüksek oranda alkali proteaz üreticisi olduklarından endüstriyel alanlarda önemlidirler.

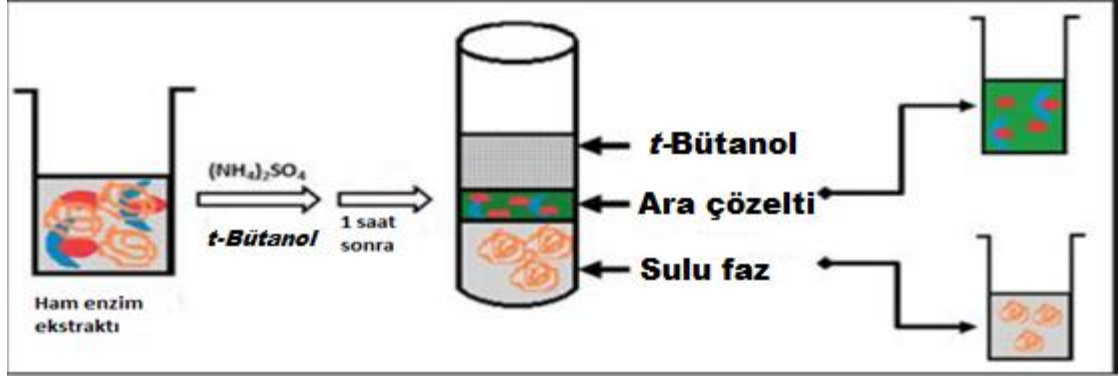
1.5. Üçlü Faz Ayırma Sistemi (TPP)

TPP, ilk olarak Lovrien ve arkadaşları tarafından (1987) açıklanan bir tekniktir. TPP, enzim stabilitesi ve katalitik aktivitesini arttıran geniş bir uygulama yelpazesine sahip, yeni bir biyoseperasyon yöntemi olarak hızla gelişmektedir. Bu teknik yoğun olarak çeşitli hedef makromoleküllerin çöktürülmesinde kullanılmıştır; ancak son zamanlarda çok yönlü ve yaygın bir biyoseperasyon yöntemidir (Gagaoua and Hafid 2016).

TPP; hedef proteinleri kompleks karışımlardan ayırma ve saflaştırmada kullanılan; basit, hızlı, etkili ve genellikle tek adımda gerçekleştirilen bir yöntemdir. Bu teknik proteinlerin; salting out izoionik çöktürme ko-solvent çöktürme ozmolitik ve kozmotropik çöktürme gibi ilkelerin bütününe içerir (Kaya 2014).

Sıvı-sıvı üçlü faz sistemleri; proteinlerin sulu çözeltisine, tuz (sülfat tuzları, genellikle amonyum sülfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ve bir organik çözücü (C4 alkoller, genellikle *t*-bütanol) eklenmesiyle oluşur.

TPP işlemi; ham ekstrakta önce tuz ve ardından organik çözücü eklenerek uygun ortam koşulları sağlandıktan yaklaşık bir saat sonra üç faz oluşması şeklinde özetlenebilir. Bunlar; alt faz, ara faz ve üst faz olarak adlandırılır (Şekil 1.4).



Şekil 1.3. Üçlü faz ayırma yöntemi (TPP) çalışma prensibinin şematik gösterimi

Üst faz; organik çözüge zengin fazdır ve pigmentler, lipidler ve diğer hidrofobik maddeler gibi polar olmayan bileşikler bu fazda toplanır. Alt faz; tuzca zengin faz olup proteinler, sakkaritler gibi polar bileşikler içerir. Ara faz; ise genellikle su ve organik çözüge ara yüzeyinde oluşan fazdır ve çöken proteinleri içerir.

1.4.1. Üçlü faz ayırma yönteminin avantajları

- TPP; kısa proses süresine sahip basit bir işlemdir.
- Amonyum sülfat ve *t*-bütanol ucuz kimyasallardır ve bu TPP protokolünü ekonomik yapar.
- TPP koşulları ılımlıdır ve proteinleri denatüre etmez.
- Genellikle oda sıcaklığında gerçekleştirilir.
- Küçük ölçüklere uygulanabildiği gibi büyük hacimlerle de çalışılabilmektedir.
- Saflaştırılmış proteini seyrelten kromatografinin aksine TPP; proteinleri saflaştırır aynı zamanda proteinleri konsantre hale getirir.
- TPP'de elde edilen saflaştırma katsayısı diğer tuzla çöktürme (salting out) prosedürlerinden çok daha yüksektir.
- TPP direk ham ekstrakta uygulanabilir.

1.4.2. Üçlü faz ayırma yönteminin dezavantajları

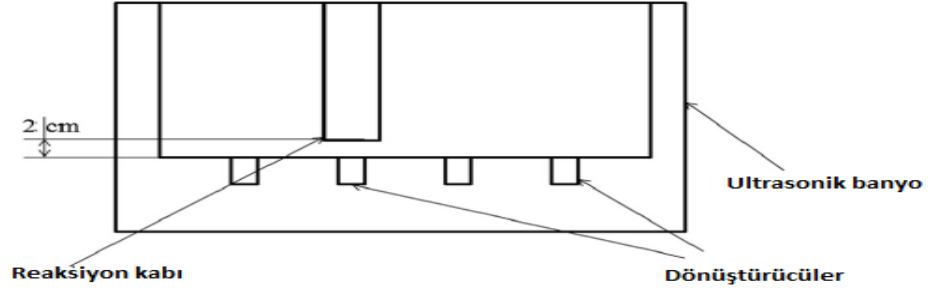
Üçlü faz ayırma yönteminin birçok avantajının yanısıra TPP işlemine maruz kalan bazı hassas proteinler *t*-bütanol varlığında denatüre olabilmesi, ham ekstrakta eklenen tuzun enzimin aktivitesini düşürmemesi için diyaliz yoluyla tuzun uzaklaştırılması gerekmesi ve IgG antibodileri veya 5µg dan daha az protein olması durumunda TPP ile saflaştırma uygun olmaması gibi dezavantajları da bulunmaktadır.

1.4.3. Üçlü faz ayırma yönteminin modifikasyonları

İki adımlı TPP; Tpp işlemi gerçekleştirilen ham ekstrakta bazı durumlarda ara faza kontamine proteinler toplanır ve hedef protein veya enzim sulu fazda kalır. Böyle durumlarda hedef protein veya enzimi daha iyi bir verimle saflaştırmak için sulu faza tekrar tuz ve *t*-bütanol eklenerek ikinci TPP işlemi uygulanır ve bu adımda hedef protein saflaştırılmış olur.

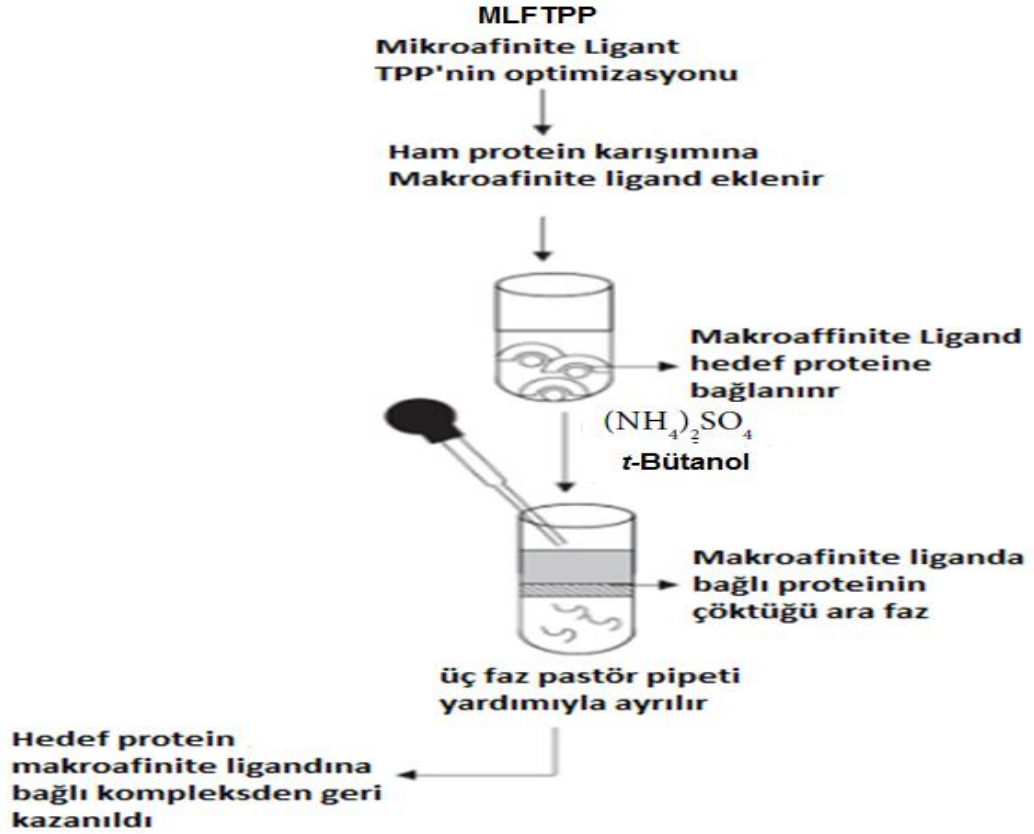
Metal-afinite bazlı TPP; bu yöntemde hedef protein sulu fazda kalacak şekilde ham ekstrakta TPP işlemi uygulanır. İlk TPP'nin sonunda hedef proteini içeren sulu faz diyaliz işleminden geçirilir ve daha sonra hedef proteine birleşme eğilimi olan metal içeren tuzdan milimolar seviyede eklenerek ikinci TPP uygulanır. İkinci TPP boyunca hedef protein saflaştırılmış olur. Literatürde bu yöntemle STI proteini Cu/Zn tuzu kullanılarak %72 verimle 13 kat saflaştırıldığı görülmektedir.

Ultrasonik destekli TPP; bu yöntem Şekil 1.5'te gösterilen bir ultrason banyosunda gerçekleştirilir. Banyo içerisinde bulunan 250mL kapasiteli cam kap içerisine ham ekstrakt eklenerek klasik TPP işlemi uygulanır. Klasik TPP yönteminden farklı olarak ultrason banyosu içerisinde bulunan TPP düzeneği belirli güçte belirli frekansta ses titreşimine maruz bırakılarak hedef protein veya enzim çok daha verimli bir şekilde ve çok daha kısa bir sürede saflaştırılabilmektedir. Klasik TPP yöntemi optimizasyonuna ek olarak bu yöntemde ekstraktın maruz bırakılacağı elektrik gücü (Watt) ve titreşim frekansı (Hertz) optimize edilmelidir.



Şekil 1.4. Ultrason destekli TPP posesinde kullanılan ultrason banyosu (Avhad *et al.* 2014)

Makro afinite ligand bazlı TPP; suda çözünür polimerlere ayrıca amonyum sülfat ve tert-butanol varlığında TPP uygulanır. Bu, üç fazı kolaylaştıran makroafinite ligandı denilen bir saflaştırma protokolünün geliştirilmesine yol açmıştır. Bu yöntem TPP'nin bir iyileştirilmesi olarak düşünülebilir. MLFTPP'nin aşamalarının şematik gösterimi Şekil 1.5'te gösterildiği gibidir.



Şekil 1.5. MLFTPP prosesinin şematik gösterimi

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Puntambekar *and* Dake (2017) sıcak su kaynaklı bakteri izolatu "A" dan bir termofil alkalın proteazın endüstriyel uygulamalarını incelemiş ardından optimizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. İzole edilen alkalın proteaz enzimi, homojenattan iyon değişim kromatografisi, DAE-Selüloz ve CB Selüloz kolonu kullanılarak 16 kat saflaştırılmıştır. Optimizasyon çalışmaları, % 1'lik glikoz ve% 1'lik kazinenin alkalın proteaz üretimini başlattığını ortaya koymuştur. Saflaştırılmış enzimin, etanol, metanol aseton gibi organik çözeltiler ve % 0,5 (w/v) sodyum dodesil sülfat (SDS) , % 0,5 (w/v) Triton-X-100 gibi yüzey aktif maddelerin varlığında stabil kaldığı tespit edilmiştir.

Katı *ve ark.* (2016), yaptıkları çalışmada Giresun adalarından temin ettikleri toprak örneklerinden *Bacillus* izolasyonu gerçekleştirmişler ve izolasyon sonrasında yapılan morfolojik, biyokimyasal ve moleküler tanımlamanın sonucunda 7 izolatu *B. thuringiensis*, 38 izolatu *B. cereus* grubu üyesi, 6 izolatu *B. pumilus*, 10 izolatu *B. megaterium* ve 12 izolatu *Bacillus sp.* olarak tanımlamışlardır. Ayrıca 38 izolatu amilaz, 53 izolatu lipaz/esteraz, 16 izolatu kitinaz, 7 izolatu ksilanaz, 2 izolatu pektinaz, 73 izolatu proteaz ve 35 izolatu selülaz enzim aktivitesini pozitif olarak bulmuşlardır.

Gagaoua *et al.* (2015) tarafından yapılan çalışmada, *Zingiber officinale* rizomlarından süt pıhtılaştırıcı bir enzim olan zingibain'in saflaştırılması ve geri kazanılması için kromatografik olmayan bir yöntem üç fazlı ayırma sistemi (TPP), kullanmışlardır. Bu amaçla, (NH₄)₂SO₄ doygunluğu, ham ekstraktın t-bütanol oranı ve zingibain saflaştırılmasında pH gibi saflaştırma verimliliğini etkileyen faktörler araştırılmıştır. Optimum saflaştırma parametreleri, pH 7,0'da ham ekstre t-bütanolün 1.0:1.0 oranında % 50 (NH₄)₂SO₄ doygunluğu olarak belirlenmiştir. Enzimin % 215'lik bir geri kazanımla 14.91 kat saflaştırma katında saflaştırıldığı bildirilmiştir. Enzimin sadece sulu fazda olduğu bulunmuştur. Enzimin molekül ağırlığı, SDS-PAGE ile 33.8 kDa olarak belirlenmiştir. Enzim pH 7,0 ve 60°C sıcaklıkta maksimum proteolitik aktivitesini göstermiştir. Enzimin birçok metal iyonuna karşı oldukça kararlı olduğu ve enzimin aktivitesinin Ca²⁺, K⁺ ve Na⁺ iyonları tarafından arttırıldığı bildirilmiştir.

Enzimin Cu^{2+} ve Hg^{2+} gibi ağır metal iyonları tarafından tamamen inhibe edildiği, Cd^{+2} ile kısmen inhibe edildiğini rapor etmişlerdir.

Ketnawa *et al.* (2014), yapmış oldukları bir çalışmada çiftlik balığı iç organlarından izole ettikleri alkalın proteazı, TPP yöntemiyle geri kazanmışlardır. Bunun için tuz, organik çözen, pH ve inkübasyon sıcaklıklarının optimizasyonunu yapmışlar ve inkübasyon sıcaklığını $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH:8,0, %50 sodyum sitrat, organik çözen olarak t-bütanol (1,0:0,5) olarak belirlemişlerdir. Bu parametreler doğrultusunda, TPP işlemi ile yüksek verimde enzim kazanımı % 154 olarak sağlamışlardır. Ayrıca proteazın protein parçalama yetenekleri üzerine çalışmalar da yapmışlardır. Ekstrakte edilen alkalın proteazlar protein hidrolizinde, nispeten yüksek etkinlik gösterdiği bildirilmiştir.

Papgianni *and* Sergedilis (2014) yaptıkları çalışmada, *Penicillium nalgiovense* PNA9'dan yeni bir alkalın proteaz enzimi saflaştırmışlardır. Enzimi, amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve ultrafiltrasyon ile 12,1 kat saflaştırmışlardır. Saflaştırılan enzimin molekül kütesini, 45,2 kDa olarak tayin etmişlerdir. Enzimin $10\text{-}45^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkları arasında, pH 4,0-10,0 aralığında ve 0-3 M tuz varlığında aktif olduğunu fakat maksimum aktiviteyi 35°C 'de, pH 8,0'de ve 0,25 M tuz varlığında gösterdiğini rapor etmişlerdir. 5 mM Mn^{2+} ve Zn^{2+} metalleri ve %0,5 SDS varlığında da enzimin inhibe olduğunu belirtmişlerdir. Enzimin PMSF ile inhibe olması, serin proteaz enzimi olduğunu göstermiştir.

Yıldırım (2014) yaptığı çalışmada, termofilik bakteri olarak tanımlanan *Aeribacillus pallidus* C10'dan, ekstra selüler alkalın proteaz enzimini saflaştırmış ve karakterizasyonu yapılmıştır. Enzim, amonyum sülfat çöktürmesi-diyaliz sonrasında DE52 anyon değişim kromatografisi ve ProbondTM afinite kromatografisi teknikleri ile sırasıyla %26,9 verimle 4,85 kat ve %19,56 verimle 17,32 kat saflaştırmıştır. Enzimin molekül kütesi SDS-PAGE ile, yaklaşık 38,35 kDa olarak tayin edilmiştir. Enzim için optimum pH ve sıcaklık sırasıyla 9 ve 60°C olarak belirlenmiş ve enzimin $20\text{-}80^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkları arasında 1 saat sonunda aktivitesinin %80'den fazlasını özellikle 60, 70 ve 80°C sıcaklıklarda kararlılığını büyük oranda koruduğu tespit edilmiştir.

Panda *et al.* (2013) tarafından yapılan çalışmada; termofilik bakteriler Hindistan'ın Tarabalo kaplıcasından izole etmişlerdir. Yüksek sıcaklıklara tolerans gösterebilen bu bakteriler, morfolojik, biyokimyasal ve 16S rRNA gen dizilimi ile karakterize edilmiştir. İzolatlarda proteaz ve amilaz aktivitesi açısından tarama yapılmıştır. Yüksek sıcaklıklara dayanma kabiliyeti olan bakteri, 16S rRNA geninin dizilişi, morfolojisi ve biyokimyası açısından *Bacillus sp.* olarak tanımlanmıştır. Dizinin BLAST analizi sonucunda maksimum benzerliği *B. amyloliquefaciens* (%99 benzerlik) ile vermiştir. Bu türün önemli oranda proteaz aktivitesi sergilediği gözlemlenmiştir.

Toplak *ve ark.* (2013) Genom analizi ile, termofilik bakteri *Coprothermobacter proteolyticus*'da subtilazların, termitaz alt grubunda (EC 3.4.21.66) bir serin proteazını kodlayan gen tespit etmişlerdir. Gen, *Escherichia coli*'de işlevsel olarak eksprese edip, proteolizin olarak adlandırdıkları enzimi, tek bir ısıl işlem basamağı ile ham hücre lizatı arasında homojenizasyona yakın saflaştırmışlardır. Proteolizin geniş bir pH toleransına sahip olup, 80 ° C'ye kadar olan sıcaklıklarda aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir. Buna ek olarak enzim, organik çözücüler, deterjanlar ve ditiyotreitil (DTT) varlığında iyi bir aktivite ve kararlılık göstermekte olup 6M guanidin hidroklorit de bile aktif kaldığını bildirmişlerdir.

Anbu (2013), Güney Kore'de deterjan atıklarından izole ettikleri *B. koreensis* (BK-P21A) olarak tanımladıkları toplam 18 adet proteaz üreten suşun morfolojik, biyokimyasal ve moleküler karakterizasyonunu gerçekleştirmiştir. Organizmanın büyüme ve proteaz üretim koşullarını optimize etmişlerdir. Enzimi amonyum sülfat çöktürmesi, Superdex 200 10/300 ve Superdex 75 10/300 GL kromatografik teknikleri kullanılarak %23 verimle 5 kat saflaştırmışlardır. Enzimin molekül kütlelerini 48 kDa olarak tespit etmişlerdir. Enzimin optimum pH'sını 9,0 ve optimum sıcaklığını 60°C olarak tayin etmişlerdir. Enzimin Ca^{2+} ve Co^{2+} metalleri ile aktive olduğunu göstermişlerdir. Enzimin %1 H_2O_2 varlığında, %81 aktivitesini muhafaza ettiğini vurgulamışlardır. Ayrıca enzimin, hidrofilik organik çözücülerde oldukça aktif ve kararlı olduğunu rapor etmişlerdir.

Gomaa (2013), *Ficus nitida* atıklarında, alkaline proteaz ve karboksimetil-selülaz üretimi için 23 bakteri örneği elde etmiş ve bunlardan *Bacillus pumillus* ATCC7061 ırkının bu enzimlerin üretiminde potansiyelini araştırmıştır. Yapılan testler sonucunda, bu ırkın optimum enzim üretimini, 30 C°'de %5 *Ficus nitida* yaprakları içeren atıklarda 72 saatlik inkübasyon sonucunda gerçekleştirdiği gözlemlenmiştir. Ayrıca, maksimum proteaz ve karboksimetil-selülaz üretimi, ayrı ayrı pH 9,0 ve pH 10,0'da olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre bu enzimler, pH 8,0-10,0 ile 30-50 C° aralıklarında ve Triton X-100 gibi iyonik olmayan yüzey aktif maddelerine karşı, stabilitelerini büyük oranda koruduğu gözlemlenmiştir. EDTA ve sistein'in bu enzimlerin aktivitesini önemli oranda etkilemediği de ayrıca belirtilmiştir.

Chaudhari and Patil (2013) hidrokarbon ile kontamine olmuş toprak örneklerinden elde edilmiş ve 16S rRNA gen sekanslamasına bağlı olarak, *B. circulans* MTCC 7942 olarak belirlenmiş, bakteri ırkının, alkaline proteaz üretim potansiyelini araştırmışlardır. Bu çalışmada elde edilen ırkın, organik çözeltilere karşı oldukça toleranslı olduğu ve maksimum alkaline proteaz (412 U/ml) üretimini, soya kütlesi, nişasta ve çeşitli oranlarda farklı tuz içeren optimize edilmiş besiyerinde gerçekleştirdiği tespit edilmiştir. Organik solventlere karşı, dirençli olması nedeniyle, bu ırkın çeşitli kimyasal sentezlerde ve su içermeyen reaksiyonlarda, proteaz kaynağı olarak kullanılabilmesi belirtilmiştir.

Wang *et al.* (2013) yaptıkları çalışma ile, *B. amyloliquefaciens* SYB-001'den nötral metallo proteaz enzimi saflaştırmışlardır. Enzimi amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişim, hidrofobik etkileşim ve jel filtrasyon kromatografisi tekniklerini kullanarak, 4 basamakta 5,6 kat saflaştırmışlardır. Enzimin molekül kütlesini 36,8 kDa olarak tespit etmişlerdir. Enzimin en yüksek aktivitesi, pH 7,0'de ve 50°C'de gösterdiğini bulmuşlardır. Ca²⁺, Mg²⁺ ve Mn²⁺ gibi metallerin, enzimi aktive ettiğini göstermişlerdir. Enzim, EDTA tarafından tamamen inhibe olduğu için, enzimin metallo proteaz olduğunu tespit etmişlerdir.

Nam *et al.* (2013), Kore ginseng rizosferde izole edilen *Serratia marcescens* S3-R1 suşundan alkalın proteaz enzimini saflaştırmışlardır. Enzimi, üç aşamada amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE anyon değişim kromatografisi, Mono Q karomatografisi ile 5,8 kat saflaştırmışlar ve tek bant için, dördüncü aşama olarak, sıvı kromatografisini kullanmışlardır. Enzimin moleköl kütlesini 50,3 kDa olarak tespit etmişlerdir. Enzimin en yüksek aktivitesi 40°C ve pH 7,0-9,0 arasında gösterdiğini bildirmişlerdir. Enzimin N-terminal ucundaki aminoasitleri Ala-Val-Thr-Ile-Glu-Asp-Ala-Val-Asp-Asp olarak belirlemişler ve enzimin bir metallo proteaz olduğuna bildirmişlerdir.

Ketnawa *et al.* (2013), üç fazlı ayırma tekniği ile, yayın balığının iç organlarından alkalın proteaz enzimini saflaştırmışlardır. TPP yönteminin optimizasyon çalışmaları için, saflaştırma verimini etkileyen tuz, solvent tipi, pH ve inkübasyon sıcaklığı gibi faktörler araştırılmıştır. Ham enzim ekstraktı: t-butanol oranı 1:0,5 (w/v), % 50 sodyum sitrat içeren pH 8,0 ve inkübasyon sıcaklığı 25 C° olan sistemin %220 ile en yüksek enzim geri kazanım oranını gösterdiğini saptanmıştır. Elde edilen alkalın proteazların protein hidrolizinde nispeten yüksek aktivite ortaya koyduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, kullanılan tekniğin yüksek enzim geri kazanımı sağladığı ve diğer enzimlerin geri kazanımında da bu tekniğin kullanılabileceğini göstermişlerdir.

Sepahy *et al.* (2011), tarafından yapılan çalışmada 18 adet proteaz üreten, farklı türde bakteri izole etmişler ve bunlardan 16S rRNA'nin kısmi sekanslanmasına bağlı olarak suşu *Bacillus* CR-179 olarak belirlenmiş ve örnek ileri karakterizasyon için kullanılmıştır. Yapılan testler sonucunda bu *Bacillus* suşu ile proteaz üretimi 340,904 U/ml ile 24 saat içerisinde maksimuma ulaşmıştır. Nişasta ve maltoz varlığında proteaz üretimi gözlemlenirken glikoz, fruktoz ve sükrozun üretimi etkilemediğini saptanmıştır. Ham proteazın maksimum aktiviteyi pH 9.0 ve 60 C°'de göstermesi nedeniyle enzimin termoalkaline proteaz olduğu kanısına varılmıştır.

Adıgöznel ve ark. (2009), Van-Erciş Hasanabdal kaplıcasından getirdikleri su örneklerinden termofilik bakteri izole etmiş, fenotipik ve genotipik yöntemlerle karakterize etmişlerdir. Yaptıkları bu çalışma ile, 5 farklı bakteriyel tür, (*Geobacillus*

pallidus, *Bacillus licheniformis*, *B. pumilus*, *Brevibacillus brevis* ve *Bacillus borstelensis*) elde etmişlerdir.

Haddar ve ark. (2008) yaptıkları çalışma ile, deniz suyu örneğinden izole ettikleri *B. mojavensis* A21'in ağartıcılara karşı kararlı ve hücre dışı alkalın proteaz ürettiğini rapor etmişlerdir. Saflaştırma yöntemi olarak sırasıyla aseton çöktürmesi, Sephadex G-75 jel filtrasyon ve CM-Sepharoz iyon değişim kromatografisi kullanmışlar ve enzimi %16,4 verimle 6,43 kat saflaştırmışlardır. Enzimin molekül kütesini, 20 kDa olarak tayin etmişlerdir. Enzimin optimum sıcaklığını 60°C olarak belirlemişler ve enzimin en aktif olduğu pH'yı 8,5 olarak belirlemişlerdir. %0,1 SDS, %1 ve %5 Tween-80, %1 Triton-X-100 varlığında enzimin kararlılığını koruduğunu bildirmişlerdir. Okside edici ve ağartıcı ajanlar ile bir saat inkübasyondan sonra (%1 H₂O₂ ve %0,1 sodyum perborat) kalan aktiviteyi sırasıyla %79 ve %70 olarak bulmuşlardır. Bu yüzden saflaştırdıkları enzimin katı-sıvı deterjanlar için potansiyel olarak uygulanabilir bildirmişlerdir. Enzim Ca²⁺ ve Mg²⁺ varlığında, aktivitesinin arttığını kaydetmişlerdir. Ticari olarak satılan Ariel, Axion, Dixan, Nadhif ve New Det gibi çamaşır deterjanları ile farklı sıcaklıklarda enzimi, bir saat inkübasyona bırakmışlar ve 30 ve 40°C de, aktivitelerini muhafaza ettiğini, fakat 50°C'de Axion ve Ariel'de enzimin başlangıçtaki aktivitesinin, %80'nini koruduğunu, Nadhif ve New Det'de ise aktivitesinin %75'ini kaybettiğini bildirmişlerdir..

Ateş ve ark. (2007), Van gölünden elde ettikleri ve 16S rRNA gen sekanlamasına bağlı olarak, türünü *Bacillus lincheniformis* olarak belirlenmiş, bakterilerin alkalın proteaz üretim aktivitelerini incelemişlerdir. Bu türün pH'sını 5,7 ile 10,0 aralığında büyüdüğü gözlemlenmiş ve optimum büyüme sıcaklığının, 37 C° olduğu saptanmıştır. Ayrıca, % 20'ye kadar, NaCl içeren ortamlarda büyümesi nedeniyle, bu türün halotolerant olduğu kanısına varılmıştır. Optimum proteaz üretimi, % 0,5 maya ekstraktı ve maltoz ile çeşitli oranlarda tuz içeren besiyerinde olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, bu türe ait maksimum alkalın proteaz aktivitesinin pH'sı 11,0 ve 60 C°'de olduğu belirtilmiştir.

Chu (2007),süt işleme tesisi ve mezbaha yakınlarındaki toprak ile ve atık sudan, ekstraselüler alkalın proteazları salgılayan 35 suş izole etmiştir. En yüksek verime sahip alkalın proteazlar, APP1 soyunda, *Bacillus sp.* olarak tanımlanmıştır. Kültürel koşullar maksimum enzim üretimi için optimize edilmiştir. Ortamın başlangıç pH'sı, 9.0 olduğunda, kültür 50°C'de 48 saat için 2.560 U/mg spesifik aktiviteyle maksimum proteolitik aktivite gösterdiği bildirilmiştir.Alkalın proteazın, SDS ve oksitleyici ajanlara karşı aşırı derecede kararlılık gösterdiği belirtilmiştir.

2.1. Tezin Amacı

Canlı yaşamı için son derece önemli olan, proteolizden sorumlu proteazlar, endüstriyel uygulamalarda en önemli enzim grubudur. Günümüzde endüstriyel açıdan önemli birçok kimyasal proses, yüksek sıcaklık ve yüksek pH değerleri gibi ekstrem koşullarda gerçekleştiğinden, endüstriyel uygulamalar için, ekstrem koşullara dayanıklı enzimlere gerek duyulmaktadır. Termofilik mikroorganizmalardan elde edilen enzimler, ekstrem koşullara daha dayanıklı olduklarından, enzim sentezi için önemlidirler.

Bu tez kapsamında; Van Çaybağı ve Hasanabdal kaplıcalarından alınan su örneklerinden, termofilik bakterilerin izolasyonu, identifikasyonu, *B. licheniformis* EA10'dan proteaz enziminin kromotografik olmayan hızlı, basit, genellikle tek adımda gerçekleştirilen bir yöntem olan üçlü faz ayırma (TPP) sistemi ile saflaştırılması ve biyokimyasal karakterizasyonu yapılarak saflaştırılan biyoteknolojik açıdan uygulanabilirliğinin araştırılması hedeflenmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Tez çalışmasında, Alkalın Proteaz üretimi için mikrobiyal kaynak olarak kullanılan su örnekleri Van iline bağlı Erciş ve Saray ilçelerinden temin edildi (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Örneklerin alındığı istasyonlar.

İSTASYON	KAYNAKTAKİ SUYUN SICAKLIĞI
Saray Çaybağı Köyü	61°C
Hasanabdal Kaplıcası	66°C

3.1.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasallar ve Kitler

Tez kapsamında kullanılan kimyasallar ve kitler Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. tez kapsamında kullanılan kimyasallar, kitler ve şirket adı.

KİMYASALLAR ve KİTLER	ŞİRKET
Agaroz	Sigma
Agaroz DNase-RNase-Protease free	Sigma
Amfisilin	Sigma
Amonyum sülfat	Sigma
DTNB	Sigma
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Sigma
Distile Su	Thermo
DNA Marker	Thermo
DNTP	Thermo
Etidyum Bromür	Sigma
Etil Alkol	Sigma

Çizelge 3.2. (devamı)

Etilendiamintetraasetikasit (EDTA)	Sigma
Gliserol	Sigma
Hidroklorik Asit (HCl)	Sigma
Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	Sigma
Isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG)	Sigma
İzopropanol	Sigma
Kalsiyum Klorür (CaCl ₂)	Sigma
Lizozim	Sigma
Magnezyum Klorür (MgCl ₂)	İnvitrogen
N,N,N'',N''-Tetrametilendiamin (TEMED)	Sigma
Promega WizardR Plus Minipreps DNA Purification Systems (Plazmit izolasyon kiti)	Promega
Promega WizardR Plus Minipreps DNA Purification Kit (DNA İzolasyon Kiti)	Promega
RNaz A	Invitrogen
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Sigma
t-Bütanol	Ensure

3.1.2. Tez Kapsamında Kullanılan Materyal ve Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan ekipmanlar Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. Tez çalışmasında kullanılan laboratuvar ekipmanları.

EKİPMAN ADI	ŞİRKET
Hassas terazi	Ohaus Pioneer
Çalkalayıcı İnkübatör (55°C)	ZHWY – 2102C
Spektrofotometre	Beckman coulter
Santrifüj	Hettich
Buzdolabı (+4°C, –20°C)	Vestel
Kuru Hava Sterilizatörü	Telstar Bio II-A
Otoklav	HMC Hirayama

Çizelge 3.3. (Devamı)

Su Banyosu	PolyScience
Mikroskop	Leica
Jel Görüntüleme Cihazı	Quantum Vilber Courmat
Su Banyosu	Memmert
Çoklu Blok Isıtıcı	Lab-Line
Dijital Isıtıcı	VWR
Etüv	Binder
PCR Cihazı	SensoQuest
Manyetik Karıştırıcı	Heidolph
pH Metre	Mettler Toledo
Vorteks	Fisons
Mini Santrifüj	Hangzhou Allheng
SDS-PAGE Elektroforez Cihazı	Bio-rad
Agaroz Jel Elektroforez cihazı	Thermo EC
Çalkalayıcı İnkübatör (37°C)	Edmund Bühler GmbH
Mikrodalga Fırın	Beko
Saf Su Cihazı	MP Minipure
Çeker ocak	TÜV-SÜD
Deep- Freeze (-86°C)	Glacier

3.1.3. Tez Kapsamında Yapılan Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

3.1.3.a. Bakteri İzolasyonu İçin Kullanılan Çözelti ve Tamponlar

%0.9'luk Fizyolojik Su Çözeltisi; 9 gr NaCl 1000 mL didistile su içerisinde çözüldü ve 121 °C 15 dakika otoklavlandı.

3.1.3.b. Bakteri İzolatlarının Moleküler Analizi İçin Kullanılan Çözelti Ve Tamponlar

EDTA Tamponu (50mM pH:8.0); 1.46 gr EDTA 90 mL didistile su içerisinde çözüldü, 1 N HCl ve 1 N NaOH ile pH'sı 8,0'e ayarlandı. Daha sonra tamponun son hacmi 100 mL olacak şekilde didistile su ile tamamlandı.

%70'lik EtOH; 70 mL EtOH 30 mL didistile su ile son hacim 100 mL olacak şekilde tamamlandı.

CaCl₂ Solüsyonu (100mM); 1,11 gr CaCl₂, didistile su içinde çözdürüldü, ağzı pamukla kapatılarak otoklavlandı ve buzdolabında +4°C'de kullanılıncaya kadar muhafaza edildi.

Amfisilin Solüsyonu; 20 mg/mL olacak şekilde steril didistile su ile hazırlandı ve 0,22 µm çaplı milipor filtreden geçirilerek steril edildi. Steril edilen çözelti, kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

X-Gal Solüsyonu; 40 mg/mL olacak şekilde hazırlanan çözelti, ışık almayacak şekilde -20°C'de kullanılıncaya kadar muhafaza edildi.

IPTG Solüsyonu; 23,8 mg/mL olacak şekilde steril didistile su ile hazırlandı ve 0,22 µm çaplı milipor filtreden geçirildi. Steril edilen çözelti -20°C'de kullanılıncaya kadar muhafaza edildi.

3.1.3.c. Bakteri İzolatlarının Morfolojik, Fizyolojik Ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözelti Ve Tamponlar

%3'lük KOH çözeltisi; 6 g KOH 200 mL steril didistile su içerisinde çözüldü.

%7'lik H₂O₂ çözeltisi; 7 mL H₂O₂'in hacmi, steril didistile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.d. Enzim Tayini İçin Kullanılan Çözelti Ve Tamponlar

Tris – HCl Tamponu (100mM pH:8,5); 1,21 gr Tris(hydroxymethyl)aminomethane 90 mL didistile su içerisinde çözüldü ve 10M HCl ile pH'sı 8,5'a ayarlandı, ardından tamponun son hacmi 100 mL olacak şekilde didistile su ile tamamlandı.

Glisin – NaOH Tamponu (100mM pH:9,0); 0,75 gr glisin, 90 mL didistile su içerisinde çözüldü ve 10M NaOH ile pH'sı 9,0'a ayarlandı daha sonra tamponun son hacmi 100 mL olacak şekilde didistile su ile tamamlandı.

Sodyum Fosfat Tamponu (100mM pH:6,0); 1,15 gr sodyum fosfat, 90 mL didistile su içerisinde çözüldü ve 10M NaOH ve HCl ile pH'sı 6,0'a ayarlandı sonrasında tamponun son hacmi 100 mL olacak şekilde didistile su ile tamamlandı.

%0,65 (w/v)'lik kazein Çözeltisi; 0,65 gr kazein tartılarak,

90 mL pH'sı 8,5 olan 100 mM Tris-HCl tampon çözeltisinde, ısıtmalı manyetik karıştırıcıda düşük ısıda (30°C-50°C), pH dengesi korunarak damla damla HCl ve NaOH eklendi. Kazein tam çözüldükten sonra, son pH 8,5 olacak şekilde ve son hacim 100 mL olacak şekilde tamamlandı.

Triklorik Asit (TCA) Çözeltisi (110mM); 1,79 gr TCA tartılarak 100 mL didistile suda çözüldü.

Sodyum Karbonat Çözeltisi (0.5M Na₂CO₃); 5,29 gr Na₂CO₃ tartılarak 100 mL didistile suda çözüldü.

Folin-Ciocalteu (F-C Reaktifi 0,5M); 12,5 mL F-C reaktifi son hacim 50 mL olacak şekilde didistile su ile tamamlandı.

3.1.3.e. Protein Analizi İçin Kullanılan Çözelti Ve Tamponlar

Bradford Çözeltisi; 0,1 gr Commensie Brillant Blue G-250 tartılarak, balon joje içerisinde 50 mL %95'lik EtOH ile çözüldü. Daha sonra bu çözeltiye, 100 mL %95'lik fosforik asit eklendi ve çözeltinin son hacmi 1000 mL olacak şekilde didistile su ile tamamlandı. Çözelt, karanlık ortamda hazırlandı ve kullanıncaya kadar oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Standart serum albumin çözeltisi (1 mg/mL); 1 mg standart serum albuminin 1 mL didistile suda çözülmesiyle hazırlandı.

3.1.3.f. SDS-PAGE İçin Kullanılan Çözelti Ve Tamponlar

Tris-HCl (1M pH:8,8); 12,1 gr Tris(hydroxymethyl)aminomethane 90 mL didistile su içerisinde çözüldü ve 10M HCl ile pH'sı 8,8'e ayarlandı daha sonra tamponun son hacmi 100 mL olacak şekilde didistile su ile tamamlandı.

Tris-HCl (1M pH:6,8); 12,1 gr Tris(hydroxymethyl)aminomethane 90 mL didistile su içerisinde çözüldü ve 10M HCl ile pH'sı 6,8'e ayarlandı daha sonra tamponun son hacmi 100 mL olacak şekilde didistile su ile tamamlandı.

Akrilamid - Bisakrilamid Çözeltisi(%30-%0,8); 6 gr akrilamid ve 0,16 gr bisakrilamid tartılarak 13,84 mL didistile su çözüldü.

SDS Çözeltisi (%10); 0,5 gr sodyum dodesil sülfat tartılarak, 4,5 mL didistile suda çözüldü.

PER Çözeltisi (%10); 0,5 gr amonyum persülfat tartılarak, 4,5 mL didistile suda çözüldü.

Yürütme Tamponu; 3 gr Tris, 14,4 gr glisin tartıldı ve üzerine 10 mL %10'luk SDS eklenerek son hacim 1000 mL tamamlandı.

Numune Tamponu; 650 μ L Tris-HCl (1M pH:6,8), 100 μ L %10'luk SDS, 1000 μ L gliserin ve 1000 μ L %1'lik BromFenol mavisi 50 mL'lik bir erlen içerisine pipetlendi ve çözeltinin son hacmi 10 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan tamponun içerisine 500 μ L β -Merkaptoetanol pipetlendi ve kullanıncaya kadar -20°C 'de muhafaza edildi.

3.1.3.g. Gümüş Boyama İçin Kullanılan Çözelti Ve Tamponlar

Tespit Çözeltisi; 60 mL didistile su, 30 mL %96'lık EtOH ve 10 mL asetik asit 250 mL'lik bir erlen içerisinde karıştırılarak hazırlandı.

Redüksiyon Çözeltisi; 80 mL didistile su 45 mL EtOH ile karıştırıldı. Hazırlanan bu karışıma 4,8 gr sodyum asetat eklendi ve asetik asit ile pH'sı 6,0 olacak şekilde ayarlandı. 0,15 gr sodyum tiyosülfat ve 4 mL glutaraldehit eklenip, çözeltinin son hacmi 150 mL olacak şekilde didistile su ile tamamlandı.

Boyama Çözeltisi; 50 mL didistile su , 20 μ L Formaldehit ve 0,1 gr gümüş nitrat 100 mL'lik bir beher içerisinde karanlık ortamda karıştırılarak hazırlandı.

Yıkama 1 Çözeltisi; 3,75 gr sodyum karbonat, 270 mL didistile su ile karıştırıldı ve üzerine 120 μ L formaldehit ilave edilerek hazırlandı.

Yıkama 2 Çözeltisi; 1 mL gliserol ve 12,5 mL asetik asit karıştırıldı ve çözeltinin son hacmi 270 mL olacak şekilde didistile su ile tamamlandı.

3.1.3.h. Metal İyon Solüsyonları

MnCl₂ (10 mM); 0,0162 gr MnCl₂.2H₂O 10 mL, 100 mM Tris-HCl pH 8,5 tamponunda çözüldü.

MgCl₂ (10 mM); 0,0203 gr MgCl₂.6H₂O 10 mL, 100 mM Tris-HCl pH 8,5 tamponunda çözüldü.

KCl (10 mM); 0,0075 gr KCl 10 mL, 100 mM Tris-HCl pH 8,5 tamponunda çözüldü.

NiCl₂ (10 mM); 0,0238 gr NiCl₂.6H₂O 10 mL, 100 mM Tris-HCl pH 8,5 tamponunda çözüldü.

ZnCl₂ (10 mM); 0,0136 gr ZnCl₂ 10 mL, 100 mM Tris-HCl pH 8,5 tamponunda çözüldü.

FeSO₄ (10 mM); 0,0278 gr FeSO₄.7H₂O 10 mL, 100 mM Tris-HCl pH 8,5 tamponunda çözüldü.

CaCl₂ (10 mM); 0,0147 gr CaCl₂ 10 mL, 100 mM Tris-HCl pH 8,5 tamponunda çözüldü.

3.1.4. Tez Kapsamında Yapılan Deneylerde Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanışı

3.1.4.a. Tryptone Soy Broth (TSB)

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

3.1.4.b. Tryptone Soy Agar (TSA)

15 gr/L tripton, 5gr/L soya pepton, 5gr/L sodyum klorid, 12gr/L agar içerikli hazır besiyerinden (LabM) tartılıp 1000 mL didistile suda çözüldü ve 121°C 15 dakika otoklavlandı.

3.1.4.c. Proteaz Katı Besiyeri

1 gr/L K_2HPO_4 , 0,05 gr/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 gr/L KCl, 37 gr/L TSA tartılarak 500 mL didistile suda çözüldü ve 121°C 15 dakika otoklavlandı. 48 gr/L Skim Milk Powder tartılarak, 500 mL didistile suda 5 dakika manyetik karıştırıcıda çözdürüldükten sonra 121°C 5 dakika otoklavlandı. Steril SKM kuru hava sterilizatörü içinde steril agar içerisine eklendi ve petrilere döküldü.

3.1.4.d. Proteaz Sıvı Besiyeri

1 gr/L K_2HPO_4 , 0,05 gr/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 gr/L KCl, 30 gr/L TSB tartılarak 500 mL didistile suda çözüldü ve 121°C 15 dakika otoklavlandı. 48 gr/L Skim Milk Powder tartılarak 500 mL didistile suda 5 dk manyetik karıştırıcıda çözdürüldükten sonra, 121°C 5 dk otoklavlandı. Hazırlanan SKM kuru hava sterilizatörü içinde sıvı besi yerine eklendi.

3.2. Yöntem

3.2.1. Örneklerin Toplanması

Yapılan tez çalışmasında alkalen proteaz üretimi için Van ilinde yer alan iki ayrı kaplıcadan alınan sıcak su örnekleri termos içerisinde muhafaza edilerek, aseptik koşullar altında laboratuvar ortamına getirildi ve araştırma yapılincaya kadar, oda ısısında kısa süre muhafaza edildi.

3.2.2. Mikroorganizmaların izolasyonu

Termofilik bakteri izolasyonu için toplanan su örneklerinden 100'er mL alınarak erlenlere konuldu. Üzerlerine belli miktarlarda TSB besiyeri ilave edilerek 55°C'ye ayarlı çalkalamalı inkübatörde 24 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. 24 saatlik inkübasyonun sonunda 55°C'de büyüyen bakterilerin izolasyonu ve identifikasyonu için bölüm 3.1.3.a' da anlatıldığı gibi hazırlanan %0,9'luk serum fizyolojik su kullanılarak bu örneklerden bir seri ($10^{-1} - 10^{-7}$) dilisyon tüpleri hazırlandı. Dilüe edilen bakteriler katı besiyerine (TSA) yayma ekim yöntemiyle inoküle edildi. İnoküle edilen petripler 55°C'ye ayarlı etüvde 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda gelişen tipik görünümlü kolonilerden hücre ve koloni morfolojisi bakımından farklı olduğu düşünülen izolatlar seçildi. Seçilen izolatlar TSA katı besiyerlerine 4 faz çizgi ekim yöntemi kullanılarak inoküle edildi ve 55°C'de inkübasyona bırakıldı (Adıgüzel 2008). Bu işlem petrilere tek koloni düşene kadar tekrarlandı.

3.2.3. İzolatların Konvensiyonel Özelliklerinin Belirlenmesi

3.2.3.a. Seçilen İzolatların Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

İzole edilen bakterilerin morfolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla stoktan alınan izolatlar 3-4 faz çizgi ekimi ile TSA besiyerine aktarıldı ve 55°C'de 1 gece inkübe edildi. Gelişen kolonilerden alınan örnekler mikroskopta incelendi. Bu sayede bakterilerin morfolojik özellikleri tespit edildi.

3.2.3.b. Seçilen İzolatların %3'lük KOH Çözeltisi ile Gram Özelliklerinin Belirlenmesi

Bakterilerin izolasyonu sonrasında elde edilen izolatların, konvensiyonel özelliklerinin belirlenmesi amacıyla Gram özellikler %3'lük KOH çözeltisi ile belirlendi. Bu amaç doğrultusunda bir öze dolusu bakteri bir damla KOH solüsyonu ile boş bir petride muamele edildi. İşlem sonrasında sakız gibi bir uzayanlar Gram (-), uzamayanlar ise Gram (+) olarak değerlendirildi.

3.2.3.c. Katalaz Testi

Katalaz enzim varlığının araştırılması amacıyla izole edilen bakteriler TSA besiyerine inoküle edilerek 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. TSA besiyerinde büyütülen bakterilerden bir öze dolusu alınarak lam üzerine konuldu. Daha sonra %5'lik H_2O_2 bir damla şeklinde lam üzerine bırakıldı. Öze yardımıyla dairesel hareketlerle H_2O_2 'nin bakteri içerisine nüfuz etmesi sağlandı ve kabarcık oluşup oluşmaması durumu gözlemlendi. Kabarcık oluşumuna neden olan bakteriler katalaz pozitif, kabarcık oluşturmayan bakteriler katalaz negatif olarak değerlendirildi. (Arda 2000; Harley and Prescott 2002; Adıgüzel 2006).

3.2.3.d. Oksidaz Testi

Yapılan oksidaz testleri, canlının elektron transferi sırasında sitokrom c proteinlerine sahip olup olmadığını gösterir. Eğer oksidaz c sistemi bulunuyorsa, enzimin reaksiyon vermesi sonucunda ortamda mavi renk oluşumu gözlenir. Bu test için hazır kitler kullanılır. %1 tetra methyl-p-phenylendiamine dihydrochloride içeren bu kitler, 1 damla saf su ile aktiveleştirildi. Üzerine steril öze ile 24-48 saat inkübasyonda büyütülen bakteri kültürlerine damlatıldı. Oksidaz pozitif bakteriler mavi-mor renk oluşumu verirken, oksidaz negatiflerde renk oluşumu gözlenmedi (Acar 2009).

3.2.4. Bakteri İzolatlarının Moleküler Analizi

3.2.4.a. 16S rRNA Gen Bölgesinin Klonlanması

1. Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA bir hücredeki ve/veya virüsteki bütün genleri içeren DNA örneğine denir. Genomik DNA bütün hücrelerde bulunur ve bu hücreler genomik DNA analizleri için kullanılabilir. Genomik DNA izolasyonu için stokta muhafaza edilen bakteri izolatları TSA besiyerine steril öze yardımıyla çizgi ekim yöntemine göre ekimi yapılarak inokülasyon gerçekleştirildi ve $55^{\circ}C$ 'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. 24 saatlik inkübasyon

sonunda petrilere büyütülen bakteriler TSB sıvı besiyeri içerisine inoküle edildi. Daha sonra bakteri inoküle edilen cam tüpler 55°C'lik çalkalayıcı inkübatörde 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. İkinci bir inkübasyonun ardından genomik DNA izolasyonuna başlandı. İzolasyon için Promega wizardR genomic DNA purification kit (A2360) protokolü uygulandı:

- 24 saat inkübasyona bırakılan 5 mL TSB besiyerlerinden 2 mL'lik ependorflara aktarıldı ve 16000 rpm'de 2 dk çöktürüldü. Hücreler çöktürüldükten sonra süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı. Daha sonra 50 mM EDTA'dan çökelti üzerine 480 µL eklendi. 10 mg/mL olan 120 µL lizozim ilave edilerek 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Gram (-) bakterilerde hücre duvarı olmadığından lizozim eklenmeden ikinci aşamaya geçildi.
- İnkübasyon sonrası karışım 13000 rpm'de 2 dk santfirüj edilip, süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı. Üzerine 600 µL Nüklei Lizis eklendi ve homojen hale getirmek için hafifçe pipetajlandı.
- Ependorf 5 dk boyunca 80°C'lik çoklu blok ısıtıcıda inkübe edildikten sonra, oda sıcaklığına gelinceye kadar soğumaya bırakıldı ve daha sonra üzerine 3 µL RNase A eklendi. Elde edilen karışımın tam çözünebilmesi için dikkatli bir şekilde alt üst edildi ve 30 dk 37°C'de inkübe edildi.
- Oda sıcaklığında soğutulan karışıma Protein Presipitasyon Solüsyonundan 200 µL pipetlendi ve 20 sn vortekslendi.
- Ependorflar buzda 5 dk bekletildikten sonra, 13000 rpm'de 30 sn santfirüj edildi. Elde edilen süpernatant, içinde 600 µL izopropanol bulunan yeni ependorf içerisine alındı ve pellet oluşumu görünür oluncaya dek ependorf dikkatlice alt üst edildi.
- Pellet oluşumu görünür olduktan sonra tüpler tekrar 13000 rpm'de 2 dk santfirüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Kurutma kağıdında içindeki sıvı tamamen uzaklaşmaya kadar bekletildi.
- Üzerine %70'lik etanolden 600 µL eklendi ve 13000 rpm'de 2 dk santfirüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra 20 dk 37°C'de inkübe edildi.
- Ependorflara 100'er µl DNA Rehidrasyon solüsyonu eklenerek, 65°C'lik çoklu blok ısıtıcı içerisinde 1 saat boyunca inkübe edildi.
- Hazır olan DNA içerikli ependorflar kullanılabildiği kadar +4°C'de muhafaza edildi.

2. rep-PCR Yöntemiyle Bakterilerin Gen Profillerinin Belirlenmesi

Bakteri DNA'sı içerisinde sürekli tekrarlayan elementler bulunmaktadır. DNA içindeki değişken sayıda tekrarlayan ve ökaryotik organizmalarda rep olarak isimlendirilen bu elementler bakteri hücrelerinde merkezi korunmuş palindromik yapıya sahip sekanslardır (Kıran ve Osmanağaoğlu 2011). rep-PCR tiplendirme yönteminde birçok bakteri genomunda pek çok kopya halinde bulunan, doğal olarak var olan ve yüksek oranda korunmuş, tekrarlayan DNA dizilerine komplementer olan primerler kullanılmaktadır. Bu primerlerin ve PCR'ın kullanımı REP, ERIC, BOX ve GTG5 elemanları arasındaki farklı genomik bölgelerin selektif amplifikasyonu ile karakterizedir (Baltacı 2016). Tez çalışmasında sıcak su örneklerinden izole edilen bakteri izolatlarının gen profillerinin belirlenmesi amacıyla (GTG)₅-PCR yöntemi kullanılmıştır.

- (GTG)₅-PCR yöntemiyle bakterilerin gen profillerinin belirlenmesi

Bakteri izolatlarının genomik parmak izi analizleri için kullanılan yöntemlerden ilki (GTG)₅-PCR yöntemidir. Bu yöntem evrensel primer kullanılarak gerçekleştirildi.

Çizelge 3.4. (GTG)₅- PCR işleminde kullanılan reaktiflerin yoğunluk ve miktarları

Reaktif	Konsantrasyon	Kullanılan Miktar (µL)
10X Buffer	10X	5
dNTP	25 mM	1,25
BSA	-	1,25
Primer GTG ₅	-	4
Taq DNA Polimeraz	5 unit/µL	0,3
DMSO	%99	2,5
ddH ₂ O	-	12,7
Kalıp DNA	70 ng/µL	3

(GTG)₅- PCR yönteminde de ilk olarak steril bir ependorf içerisine çizelge 3.4'te verilen oranlar örnek sayısına göre miktarları hesaplanarak pipetlendi. Daha sonra bu karışım mini santrifüjde spinlenerek PCR tüplerine 27'şer µL pipetlendi. Üzerlerine her bir örnek için izole edilmiş kalıp

DNA'dan 3'er μL eklenerek spinlendi ve PCR cihazına yerleştirildi. PCR cihazında Çizelge 3.5'te verilen değerlere göre bir program oluşturuldu ve çalıştırıldı.

Çizelge 3.5. (GTG)₅- PCR programı, sıcaklık döngüsü

Aşamalar	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	95	7	1
Denatürasyon	94	1	35
Bağlanma	53	1	35
Uzama	65	8	35
Son Uzama	65	16	1
Saklama	4	∞	

- **(GTG)₅-PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi**

(GTG)₅-PCR ürünlerinin elektroforezi için agaroz jel hazırlandı. Bunun için ilk olarak 0,8 gr agaroz tartılarak 80 mL kovantrasyonu %1 olacak şekilde 1X TAE tamponu içerisinde çözüldü. Çözünme işlemi mikrodalga fırında 2 dk süreyle ısıtılarak gerçekleştirildi ve elle tutulur sıcaklığa gelince içerisine 4mg/ml etidyum bromür eklendi. (Etidyum bromür mutajen olduğu için bu işlem çeker ocak içerisinde gerçekleştirildi). Agaroz jel tankının içerisi ve tüm kenarları 1X TAE tamponu ile ıslatıldıktan sonra tank elektroforeze jel kenarlardan dökülmeyecek şekilde yerleştirildi. Hazırlanmış olan jel tankın köşesinden kabarcık oluşmayacak şekilde dikkatlice döküldü. Daha sonra taraklar yerleştirilerek polimerleşmeye bırakıldı. Jel polimerleştikten sonra, taraklar dikkatlice çıkartıldı jelin ilk kuyucuğuna 10 kb'lık DNA markırından diğer kuyucuklara (GTG)₅- PCR ürünleri 6X yükleme boyası ile onluk pipet ucu yardımıyla karıştırılarak belirli bir sırayla yüklendi. Elektroforez jel düzeneği 90 volta ayarlanarak örnekler 120 dk yürütüldü. Jel üzerinde bulunan ve etidyum bromür ile boyanan DNA bantları jel dökümantasyon sistemi ile görüntülenip bilgisayar ortamında (Quantum Vilber Lournat Gel Documentation System) analiz edildi (Adıgüzel 2006).

3. 16S rRNA PCR İşlemi

16S rRNA gen bölgesi bakteri sistematığı açısından çok önemlidir ve evrimsel açıdan da korunmuş bölge olma özelliği taşımaktadır (Arslan 2017). 16S rRNA dizisini PCR yöntemiyle çoğaltabilmek için öncelikle kullanılacak primerlerin belirlenmesi gerekmektedir (Marul 2007). Her bir izolattan saflaştırılan genomik DNA'dan, 16S rRNA gen bölgesi UNI16S-L (5'-ATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCA) ve UNI16S-R (5'-ATGGTACCGTGTGACGGGCGGTGTGTA) primerleri kullanılarak PCR yardımı ile çoğaltıldı (Yanmış ve Adıgüzel 2014).

Çizelge 3.6. 16S rRNA PCR işleminde kullanılan reaktiflerin yoğunluk ve miktarları

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

16S rRNA PCR hazırlık aşamaları şu şekildedir: İlk olarak steril bir ependorf içerisine çizelge 3.6'de verilen oranlar örnek sayısına göre miktarları hesaplanarak pipetlendi. Daha sonra bu karışım mini santrifüjde spinlenerek PCR tüplerine 27'şer μ L pipetlendi. Üzerlerine her bir örnek için izole edilmiş kalıp DNA'dan 3'er μ L eklenerek spinlendi ve PCR cihazına yerleştirildi. PCR cihazında Çizelge 3.7'de verilen değerlere göre bir program oluşturuldu ve çalıştırıldı.

Çizelge 3.7. PCR Programı, sıcaklık döngüsü

Aşamalar	Sıcaklık (°C)	Süre(dk)	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	94	2	1
Denatürasyon	94	1	36
Bağlanma	49	1	36
Uzama	72	2	36
Son Uzama	72	5	1
Saklama	4	∞	

- **16S rRNA PCR ürünlerinin jel elektroforezi**

16S rRNA PCR tekniği ile çoğaltılan genomik DNA agaroz jel elektroforez tekniği ile görüntüledi. Agaroz ile hazırlanan jelin ilk kuyucuğuna 10 kb DNA markırı (Sigma D-7058) konuldu. Diğer PCR ürünleri 6X yükleme boyası ile onluk pipet ucu yardımıyla karıştırılarak belirli bir sırayla yüklendi. Elektroforez jel düzeneği 90 volta ayarlanarak örnekler 120 dk yürütüldü. Jel üzerinde bulunan ve etidyum bromür ile boyanan DNA bantları jel dökümantasyon sistemi ile görüntülenip bilgisayar ortamında (Quantum Vilber Lournat Gel Documentation System) analiz edildi (Adıgüzel 2006).

3. Kompetant Hücre Hazırlanması

Serbest DNA'yı içine alabilen bakterilere kompetant bakteri adı verilir. *Escherichia coli* hücreleri plazmid DNA'sı ile transformasyonu için sıklıkla kullanılan bir kompetent bakteridir. Kompetent hücre hazırlama prosedürü şu şekildedir:

- Kompetent hücre hazırlamak amaçlı stokta muhafaza edilen *E. coli* JM101 suşu LB katı besiyerine 3-4 faz ekim yapılarak canlandırıldı ve 16-24 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı.
- Daha sonra bu besi yerinde oluşan tek bir koloni öze yardımıyla LB Broth sıvı besi yerine inoküle edildi ve bir gece 37°C'de çalkalamalı inkübatörde büyüme bırakıldı.
- 30 mL'lik LB Broth sıvı besiyerine inoküle edilmesi gereken hücre miktarını mililitre cinsinden hesaplamak amacıyla 300 µL kültür 2700 µL su ile seyreltilip spektrofotometede 600 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. Çıkan değer seyreltme oranı olan 10 ile çarpıldı ve 3/zX10

formülü kullanılarak elde edilen sonuca göre ön kültürden 30 mL'lik besiyerine steril pipet yardımıyla inoküle edilip 37°C'de 60-90 dk 150 rpm'de inkübasyona bırakıldı.

- Yaklaşık 40 dk sonrasında kültürden örnek 3 kat seyreltilerek 600 nm'de 0,044-0,055 olana dek belirli zaman aralıklarında ölçüm yapıldı.
- Uygun değere ulaşan kültürden steril tüpler içerisine 8'er mL eklendi ve kültür içerisindeki hücreler 4400 rpm'de 7 dk çöktürülüp süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı.
- Çökelti üzerine 10 mL soğuk CaCl₂ (100 mM) pipetlendi ve 30-40 dk buzda bekletildi.
- Süre sonunda +4°C'de 4400 rpm'de 10 dk süreyle santrifüjle çöktürüldü ve süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldıktan sonra üzerine 2 mL CaCl₂ (100 mM) eklenip +4°C'de bir gece bekletildi.

4. Ligasyon işlemi

Çizelge 3.8. Ligasyon işleminde kullanılan reaktiflerin yoğunluk ve miktarları

Reaktif	Kullanılan Miktar (µl)
Ligasyon Buffer 2X	5
PCR ürünü	3
Vektör	1
T ₄ DNA Ligaz	1

0,2 mL'lik steril bir tüplerde Çizelge 3.8'de verilen oranlar örnek sayısına göre miktarları hesaplanarak pipetlendi. Daha sonra bu karışım mini santrifüjde spinlenerek PCR cihazında 16°C'de 13-15 saat bekletildikten sonra, kullanılıncaya kadar +4°C'de muhafaza edildi.

5. Transformasyon işlemi

Klonlama işleminde vektörün bakteri hücrelerine transformasyonu için yapılan işlemler şöyledir:

- Önceden hazırlanıp bir gece +4 °C'de bekletilen kompetent hücrelerden 200'er µL örnek sayısı kadar ependorfların herbirine pipetlendi.

- Her bir ependorf tüplerinin üzerlerine 2,5 μ L ligasyon ürünü eklenerek 30 dk buzda bekletildi.
- Karışım ısı şokuna uğratılmak amacıyla buzdan dikkatlice çıkarılıp 42°C'de sabit bir şekilde 2 dk tutuldu.
- Daha sonra üzerlerine LB Broth sıvı besiyerinden 200 μ L konulup yaklaşık 1 saat 40 dk süre ile 37°C'lik etüvde inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon süresi sırasında önceden otoklavlanmış amfisilinli katı besi yeri oda ısısına geldikten sonra steril kabin içerisinde 40 μ L X-Gal ve 40 μ L IPTG pipetlenip petrilere döküldü.
- Hazırlanmış petrilere inkübasyon süresi dolan karışımdan 150 μ L eklendi ve drigalski özesi ile iyice yayılımı sağlandı.
- Yayma ekim yapılan petrilere 37°C'de 12-14 saat süreyle inkübasyona bırakıldı.

6. Kolonilerin Seçilmesi ve Sıvı Kültüre Alınması

37°C'ye ayarlanmış inkübasyona bırakılan petrilere 14 saatin sonunda etüvden alınıp +4°C'ye bırakıldı ve bir gecede burada bekletildi. Mavi beyaz koloniler oluşumu gözlemlendikten sonra, beyaz koloniler steril bir pipet ucu ile alındı ve içinde 3 mL amfisilinli LB broth besiyeri bulunan tüplere inoküle edildikten sonra 37°C'lik çalkalyıcıda bir gece inkübasyona bırakıldı.

7. Koloni PCR İçin Örneklerin Hazırlanması ve PCR İşlemi

Amfisilinli LB broth sıvı besiyerinde bir gece inkübasyona bırakılan kültürden 4 μ L alınıp, içinde 16 μ L steril didistile su bulunan tüplere konularak seyreltildi. Seyreltme işleminden sonra ısı şokuna maruz bırakılmak amacıyla önce su banyosuna alınarak, 10 dk kaynatıldı ve hemen sonra 2 dk buzda bekletildi. Elde edilen bu karışım 12000 rpm'de 5 dk süre ile santfirüj edildi. Daha sonra Çizelge 3.10'da verilen reaktifler ve miktarlara göre PCR tüpleri hazırlandı.

Çizelge 3.9. Koloni PCR işleminde kullanılan reaktiflerin yoğunluk ve miktarları

Reaktif	Kullanılan Miktar (μL)
Tampon	3
dNTP	0,6
MgCl ₂	1,8
T7 Primer	2
SP6 Primer	2
DMSO	1,2
ddH ₂ O	16,1
Taq Polimeraz	0,3
Süpernatant	3

Hazırlanan tüpler PCR cihazına yerleştirilip Çizelge 3.10'de verilen program değerleri girilerek koloni PCR programı olarak kaydedildi ve çalıştırıldı.

Çizelge 3.10. Koloni PCR programı, sıcaklık döngüsü

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

PCR işlemi sonunda ürünlerinin elektroforezi için agaroz jel hazırlandı. EtBr ilaveli %1'lik agaroz jele, markır ve içerisinde istenen geni içeren (pozitif)- içerisinde gen bulunmayan (negatif) kontroller yüklenerek 90 volta 1 saat süre ile yürütüldü. Görüntülenen jele bakılarak istenen aralıkta bant veren koloniler seçilerek plazmit izolasyonu için amfisilinli LB broth'a inoküle edildi.

8. Plazmit İzolasyonu

Plazmit izolasyonu için Promega (A1330) plazmit izolasyon kitine ait protokol uygulandı. Buna göre;

- LB broth besi yerinde bir gece inkübasyona bırakılan kültürden 4 ml alınarak 11000 rpm'de santrifüj edilerek çöktürüldü ve süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı.
- Çöken pelletin üzerine Cell Resuspension Solüsyonu eklendi ve pipetajlanarak homojen hale getirildi.
- Homojen hale getirildikten sonra karışımın üzerine 250 μ L Cell Lysis Solüsyonundan eklendi alt üst edilerek oda sıcaklığında 5 dk bekletildi.
- Süre sonunda üzerine Alkaline Protease Solüsyonundan 10 μ L ilave edildi ve oda sıcaklığında 5 dk beklemeye bırakıldı.
- Daha sonra üzerine 350 μ L Nötralizasyon çözeltisinden eklenip 13000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
- Kullanılacak olan süpernatanttan yaklaşık 650–750 μ L alındı ve içerisinde kolon bulunan ependorf tüpüne aktarıldı ardından 13000 rpm'de 1 dk süre ile santrifüjlendi.
- Santrifüj sonunda kolonun üstte kalan kısmına 750 μ L Wash Solution eklendi ve tekrar 13000 rpm'de 1 dk santrifüjlendi.
- Ardından kolonun üzerine 250 μ L Wash Solüsyonundan eklendi ve 13000 rpm'de 2 dk santrifüjlendi.
- Alta geçen sıvı uzaklaştırılıp 1 dk 13000 rpm'de tekrar santrifüj edildikten sonra kolon yeni bir ependorfa aktarıldı ve üzerine Nuclease-Free Water Solüsyonundan 100 μ L eklendikten hemen sonra 13000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
- Son olarak kolon çıkarılıp uzaklaştırıldı ve tüpler ölçüm yapılmıncaya kadar -20°C 'de muhafaza edildi

9. Plazmit Konsantrasyonunun Belirlenmesi

- 2 μ L plazmit, 998 μ L didistile su ile karıştırılarak, spektrofotometrede OD_{260} nm dalga boyunda konsantrasyonu tespit edildi.
- $A_{260} \times 50$ (sabit katsayı) $\times 500$ (dilüsyon oranı) denkleminde göre hesaplama yapılarak plazmit konsantrasyonunun 100-200 ng olması sağlandı.

- Uygun konsantrasyona sahip örneklerden 30-50 µL alınarak sekans analizi için MacroGen (Hollanda) firmasına gönderildi.

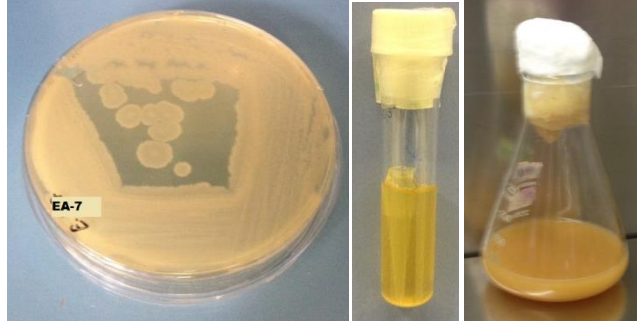
3.2.5. Proteaz Enziminin Tayini, Saflaştırılması ve Karakterizasyon Çalışmaları

3.2.5.a. Alkalın Protez Enzimi Üreten Bakteri İzolatlarının Skim Milk Agar Besiyerinde Belirlenmesi

Stokta (-86°C) muhafaza edilen bakteri izolatları (EA1, EA2, EA3, EA4, EA5, EA6, EA7, EA8, EA9, EA10) stoktan çıkartılarak önceden hazırlanıp petrilere dökülen TSA katı agar besiyerlerine, steril öze yardımıyla 3-4 faz ekim yöntemiyle inoküle edilip canlandırıldı ve 55°C'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Etüvde bir gece büyüyen bakteriler, Skim Milk agar besi yerlerine wel difüzyon metodu kullanılarak inoküle edilip, 55°C'de 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi boyunca 24. saat ve 48. saat sonunda zon veren petrilerin görüntüleri kaydedildi.

3.2.5.b. Alkalın Proteaz Üretimi

Alkalın proteaz üreten bakteri izolatlarından Skim Milk agar besiyerinde, en iyi zon veren bakteri *B. licheniformis* EA10 suşu seçilerek bundan sonraki işlemlerde bu bakteri izolatı kullanıldı. *B. licheniformis* EA10 suşu TSA katı besiyerine inoküle edilip 55°C'de 24 saat süreyle etüvde bir gece inkübasyona bırakıldı. Daha sonra bu suş sıvı besiyerine alınıp 55°C'lik çalkalamalı inkübatörde bir gece üremeye bırakıldı. Sıvı besiyerinde büyüyen bakterilerin hücre miktarını mililitre cinsinden hesaplamak amacıyla 300 µl kültür 2700 µl su ile seyreltilip spektrofotometede 600 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. Çıkan değer seyreltme oranı olan 10 ile çarpıldı ve 3/zX10 formülü kullanılarak elde edilen sonuca göre ön kültürden 100 mL'lik bölüm 3.1.3.d'de anlatıldığı gibi hazırlanan proteaz sıvı besiyerine inoküle edildi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Alkalın proteaz üretim şeması

1)TSA Katı Besiyeri 2)Ön Çoğalma Ortamı (8mL) 3)Alkalın Proteaz Üretim Ortamı 55°C’de 24 saat 55°C’de 24 saat (100mL)

3.2.4.c. Alkalın proteaz enziminin aktivitesinin belirlenmesi

Alkalın proteaz aktivitesi Takami *et al.* (1989) tarafından kazeinin, substrat olarak kullanıldığı yöntemin kısmen modifiye edilmesiyle belirlendi.. Bu yöntemin uygulama aşamaları şu şekildedir;

- 0,5mL enzim çözeltisi üzerine Tris-HCl tampon (100 mM pH:8,5) çözeltisiyle hazırlanan %0,65’lik kazein çözeltisinden 2,5mL eklenerek reaksiyon çözeltisi 37°C’lik su banyosunda 10 dakika süre ile inkübasyona bırakıldı. Kör olarak enzim çözeltisi yerine, Tris-HCl tampon (100 mM pH:8,5) çözeltisi ilave edilen reaksiyon karışımı kullanıldı.
- İnkübasyon süresinin sonunda reaksiyon karışımlarına, reaksiyonu sonlandırmak amacıyla trikloroasetik asit (TCA) (110 mM) çözeltisinden 2,5mL ilave edildi ve karışım 37°C’lik su banyosunda 30 dakika boyunca bekletildikten sonra 5000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası elde edilen süpernatanttan 1mL alınarak başka bir tüpe aktarıldı ve üzerine Na₂CO₃ (0,5 M) çözeltisinden 2,5mL ve Folin-Ciocalteu (0,5 M) reaktifinden 0,5mL eklenerek, karışım 37°C’lik su banyosunda 30 dakika bekletilip 660 nm’de spektrofotometrik olarak absorbans köre karşı ölçüldü.

Kazeinin hidrolizi sonucu dakikada 1µg tirozinin açığa çıkması için gerekli enzim miktarı bir ünite alkale proteaz aktivitesi (U/ml) olarak belirlendi. Bu hesaplama önceden oluşturulmuş tirozin standart grafiğinin eğimi kullanılarak aşağıdaki formüle göre yapıldı. Enzim aktivitesi ölçümünde kullanılan çözeltilerin hazırlanışı bölüm 3.1.2.4'te gösterilmiştir

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

3.2.5.d. Protein Tayini

Protein tayini, Bradford yöntemi (Bradford 1976) yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde göre, Coomassie brilliant blue (parlak mavisi) G-250 boyasının farklı konsantrasyonlardaki proteinlere bağlanarak, değişik renk şiddetinde mavi renkli çözeltiler ortaya koymasından yararlanılarak geliştirilmiştir. Mavi rengin oluşmasında proteinin aminoasit bileşimi önemlidir. Boyanın özellikle arjinin gibi bazı amino asitlere ve bazı aromatik amino asitlere bağlanma eğiliminde olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla bu yöntemde proteinin primer yapısının önemi vardır. Yöntemde boyaya bağlanmış protein 595 nm dalga boyunda maksimum absorbanans verir. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır.

Protein miktarını belirlemek amacıyla standart grafiğin hazırlanması için ;

- (1 : 1ml/mg) protein ihtiva eden standart BSA hazırlandı. Bu çözeltilerden 10 ayrı tüpe sırayla 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL alınarak, distile su ile tüm tüplerin hacmi 0,1mL'ye tamamlandı.
- Tüpteki karışımlara 4,9mL renklendirme reaktifi ilave edilip, vortekslendi ve 10 dk beklemeye bırakıldı. Sürenin sonunda 595 nm'de 3mL'lik küvetlerde köre karşı absorbanans değerleri okundu. Kör olarak 0,1 mL aynı tampon ve 4,9 mL renklendirme reaktifinden oluşan karışım kullanıldı. Okunan absorbanans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri kullanılarak standart grafik elde edildi.

➤ Protein tayini yapılan numuneler için aynı şekilde 0,1 mL enzim çözeltisi üzerine 4,9 mL boya çözeltisi eklendi ve 10 dk sonra 595 nm’de absorbans değeri okundu. Elde edilen absorbans değeri ve standart grafiğin eğimi kullanılarak, protein miktarı hesaplandı. Proteaz enziminin üçlü faz ayırma yöntemiyle saflaştırma basamaklarında gerekli protein tayinleri bu yöntemle göre yapılmıştır.

3.2.5.e. Alkalın Proteazın Üçlü Faz Ayırma (TPP) Sistemi İle Saflaştırılması

Alkalın proteaz enziminin izolasyonu ve kısmi saflaştırılmasında ilk olarak 24°C’de 6000 rpm’de 25 dk santrifüjleme işlemi yapıldı. Elde edilen bu ham ekstrakt, üçlü faz saflaştırma sisteminde enzim kaynağı olarak kullanıldı.

Üçlü faz ayırma sistemleri yeni gelişen bir biyoayırım tekniğidir. Sistem proteinlerin salting out, izoionik presipitasyon, kosolvent presipitasyonu, ozmolitik ve kozmotropik presipitasyonu gibi birçok farklı tekniğin prensiplerini kolektif bir şekilde içermektedir (Kati 2013). TPP işlemi; ham ekstrakta önce tuz ve ardından organik çözügen eklenerek uygun ortam koşulları sağlandıktan yaklaşık bir saat sonra, üç faz oluşması esasına dayanır.

Alkalın proteaz enziminin saflaştırılmasında kullanılan TPP sisteminde, organik çözügen olarak t-bütanol ve tuz olarak amonyum sülfat tercih edildi.

a. TPP işlemi için uygun tuz yüzdesi ve organik çözügen oranının belirlenmesi;

TPP işlemiyle saflaştırmada en iyi verimi elde edebilmek için en uygun amonyum sülfat yüzdesi ve en uygun t- bütanol oranı optimize edilmelidir. Bunun için aşağıdaki formüle göre %20, %30, %40, %50, %60, %70, %80 olmak üzere 7 farklı tuz oranı; (Ham enzim ekstraktı:t- bütanol; (1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5, 1.0:2.0) olmak üzere, 4 farklı alkol oranıyla denendi. Her bir denemede alt ve ara faz dikkatlice ayrılıp bölüm 3.2.3.4’te anlatıldığı gibi aktivite tayini ve bradford yöntemiyle protein miktarı hesaplandı. Elde edilen veriler kullanılarak saflaştırma katsayısına karşı, % geri kazanım grafikleri

oluşturuldu. Çıkarılan grafikler incelenerek en uygun tuz yüzdesi ve organik çözügen miktarı belirlendi.

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

b. TPP işlemi için pH optimizasyonu

TPP işleminde en uygun tuz yüzdesi ve organik çözügen oranı belirlendikten sonra bu değerlere göre farklı pH değerlerinde işlemler tekrarlandı. Bunun için 2mL ham özüt içine %70 oranında tuz eklendikten sonra karışımın pH değeri 9 farklı değerde ayarlandı (pH:4-12). pH değerleri, farklı her bir tüpün üzerine 1.0:0.5 oranında *t*-bütanol eklenerek 30 sn vortekslenip 37°C'de 1 saat beklemeye bırakıldı. Süre sonunda fazlar ayrıştırılarak aktivite tayini ve protein tayini yapıldı. Elde edilen veriler kullanılarak saflaştırma katsayısına karşı % geri kazanım grafikleri oluşturuldu. Çıkarılan grafikler incelenerek TPP işlemi için pH belirlendi.

c. Alkalın proteazın TPP işlemi ile saflaştırılması

Optimize edilen koşullarda proteaz enzimi saflaştırıldı. Bu işleme göre ilk olarak 2 mL ham özüt bir tüpe alındı. Üzerine %70 oranında amonyum sülfat (0,873 gr) eklendi ve yavaşça vortekslendi. Karışımın pH'sı 6'ya ayarlandıktan sonra üzerine, 1mL *t*-bütanol eklendi ve 30 sn yavaşça vortekslendi. Daha sonra karışım, 37°C'de 1 saat süreyle beklemeye bırakıldı. Süre sonunda üst organik faz, pastör pipetiyle ayrıştırıldı. Alkalın proteazın saflaştırıldığı alt faz ayrıştırılarak karakterizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere, +4°C 'de muhafaza edildi.

* TPP işleminde kullanılan *t*-bütanol tekrar tekrar kullanılabilir.

3.2.5.f. Alkalın Proteaz Enzimiyle İlgili Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları

1. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile Enzimin Molekül Kütlesinin Belirlenmesi

TPP işleminde saflaştırılan alt ve ara faz örnekleri, enziminin saflığını kontrol etmek ve yaklaşık molekül ağırlığını belirlemek amacıyla SDS-PAGE analizi yapıldı (Laemmli 1970). Yürütme jeli için %10'luk, yığma jeli için %4'lük akrilamid jel hazırlandı. Protein bantlarının gözlenmesi için gümüş boyama metodu uygulandı.

Elektroforez plakaları önce su ve daha sonra alkol ile iyice yıkandı. İki cam plaka arada jel aralığı olacak şekilde kısıkaçlarla tutturuldu. Sabitleştirilen plakalar, içindeki jeli dışarı sızdırmayacak şekilde, jel hazırlama kabinine konuldu. Çizelge 3.12'de verilen kimyasallar sırası ile cam bir beherde hazırlandı. Jel bileşenlerinden amonyum persülfat son aşamada eklendi. Hızlıca pipetaj yapılarak toplam hacmi 4,5mL olan ayırma jeli polimerleşme başlamadan önce süratle hazırlanan plakalara dikkatlice döküldü. Jelin üst kısmı izopropil alkol ile düzgünleştirilerek, 20–30 dakika süre ile jelin polimerleşmesi beklendi. Jel polimerleştikten sonra üzerindeki alkol uzaklaştırıldı ve bir kurutma kağıdı yardımıyla jelden tamamen ayrılması sağlandı. Bu işlemde sonra yığma jeli yine amonyum persülfat sonda eklenmek üzere hazırlanıp, ayırma jelinin üzerine döküldükten hemen sonra numune kuyucuklarının oluşması için tarak dikkatlice yerleştirildi ve 20 dakika süre ile yükleme jeli polimerleşmeye bırakıldı.

Örneklerin hazırlanması: Elektroforeze yüklenecek örneklerden (Ham enzim ekstraktı, alt faz, ara faz) 20'şer µl ve hazırlanan numune çözeltisinden 20 µL alınarak bir eppendorfta karıştırıldı. Hazırlanan örnekler kaynayan suda 5 dk süre ile bekletilerek denatüre edildi.

Polimerleşen jel önce saf su, daha sonra da yürütme tamponuyla yıkandı ve jel plakaları birlikte elektroforez tankına içine dökülen yürütme tamponu dışarıya sızmayacak şekilde yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme

tamponu dolduruldu, yukarda anlatıldığı gibi hazırlanan enzim örneklerinden 18 µL kuyucukları eklendi. İlk kuyucuğa markırdan 1µl olacak şekilde yüklendi. Elektroforez tankı kapatılarak alt tarafı (+) anota, üst tarafı ise (-) katota yerleştirildi. Önce 60 voltta 30 dakika yürütüldü ve akrilamid yoğunluğunun düşük olması ve pH 6,8 olduğundan dolayı örnekler ayırma jeline kadar hızlıca yürüdü. Ardından 120 volt akımda numuneler jelin alt sınırına gelinceye kadar yürütüldü (1 saat). Ayırma jelinde akrilamid yoğunluğunun fazla olması ve pH 8,8 olması sebebiyle proteinler yavaş yürüyerek molekül kütesine göre ayrılacaklardır. Yürütme işlemi bittikten sonra akım kesilerek plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı. Daha sonra gümüş boyama yöntemiyle boyanarak en uygun görüntüsü kaydedildi

Çizelge 3.11. Yürütme jeli bileşenleri

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

Örneklerin gümüş boyama yöntemiyle boyanması

Örnekler jel elektroforezi ile yürütüldükten sonra plakalar yürütme kabından çıkartıldı. Kaset açıldıktan sonra jel, cam bloklardan dikkatlice ayrılıp zemini düz bir kap içerisine bırakıldı. Jel, gümüş boyama kabında hazırlanan tespit çözeltisiyle 30 dk boyunca karanlık ortamda çalkalandı. Sürenin sonunda tespit çözeltisi dökülüp, jel didistile su ile yıkandı. Yıkama işleminden hemen sonra redüksiyon çözeltisi kaba eklenerek, yine 30 dk boyunca karanlık ortamda çalkalamaya bırakıldı. Daha sonra redüksiyon çözeltisi

kaptan uzaklaştırılarak yıkama işlemine geçildi. Bu işlem didistile su ile 5'er dakika olmak üzere, üç kez tekrarlandı. Bu süre sırasında hazırlanan boyama çözeltisi yıkama işlemleri bittikten sonra kaba eklendi ve 20 dk çalkalamaya bırakıldı. Gümüş boyama çözeltisiyle muamele edilen jel bantlar belirginleşinceye kadar yıkama 1 çözeltisinde el yordamıyla hafifçe çalkalandı. Jelde bantların görünmeye başladığı andan itibaren en iyi görüntü kaydedildi ve jel yıkama 2 çözeltisine aktarılarak boyama işlemi sonlandırıldı.

2. Alkalın proteaz enziminin zimogram analizi

B. licheniformis EA10 suşundan üretilen alkalın proteaz enziminin zimogramı için, SDS-PAGE jel elektroforezi kullanıldı. Yığıma ve ayırma jeli hazırlanarak ve elektroforez tankına döküldü. Zimogram analizinde SDS-PAGE işleminden farklı olarak numune çözeltisi β – Merkaptotanol eklenmeden hazırlandı. Örnekler hazırlanırken ependorf tüplerine (1:1:1) oranında olacak şekilde numune çözeltisinde 20 μ L, %0,65'lik kazein çözeltisinden 20 μ L ve örneklerden de 20 μ L eklendi ve kaynatma işlemi olmadan direk kuyucuklara yüklendi. Elektroforez sisteminde önce 60 voltta 30 dakika, ardından voltu 120 voltta 1 saat süreyle numunelerin jelin alt sınırına kadar yürütülmesi sağlandı. Numuneler, numune tamponuna katılan brom timol mavisi yardımıyla takip edildi. Yürütme işlemi bittikten sonra akım kesilerek plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı. Çıkarılan jelden SDS'nin uzaklaştırılması için jel düz zeminli bir kapta %2'lik Triton-X-100 çözeltisinde 37°C 150 rpm hızındaki çalkalayıcıda 30 dakika bekletildi. Ardından jel 100 Tris-HCl (100 mM pH:8,5) tamponunda 37°C 150 rpm hızındaki çalkalayıcıda 20 dakika bekletildi. Daha sonra jel, %0,65'lik kazein çözeltisinde 37°C 150 rpm hızındaki çalkalayıcıda 30 dakika bekletildi ve süre bitiminde gümüş boyama yapılarak jelin fotoğrafı çekildi (Kazan *et al.* 2005).

3. Alkalın proteaz enzimi için optimum pH ve pH kararlılığının belirlenmesi

Proteaz enziminin optimum pH'sını belirlemek amacıyla 0,5mL enzim çözeltisi ile 0,1 M farklı pH değerlerindeki sodyum fosfat (pH:6,0-7,5), Tris-HCl (pH:8,0-9,0) ve Glisin-NaOH (pH:9,0-11,0) tampon çözeltilerinde hazırlanan 2,5mL %0,65'lik kazein

çözeltisiyle karıştırıldı. Aktivite tayini yapıldı. Enzimin pH profilinin grafik çiziminde en yüksek aktivitenin gözlendiği pH değeri 100 olarak kabul edildi ve diğer sonuçlar ona göre bağlı aktivite (%) cinsinden birbiriyle kıyaslandı (Yıldırım 2014).

Enzimin stabil olduğu pH'yı belirlemek amacıyla farklı pH değerlerindeki sodyum fosfat (pH:6,0-7,5), Tris-HCl (pH:8,0-9,0) ve Glisin-NaOH (pH:9,0-11,0) tampon çözeltileri kullanıldı. Belirtilen pH'lardaki 2mL tampon çözeltisine 2mL enzim çözeltisi ilave edilerek oda sıcaklığında 2 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon öncesinde ve sonrasında aktivite tayini yapıldı. Her bir deneme, 3 kez tekrarlandı. Enzimin pH stabilitesi grafiğinin çiziminde, farklı pH değerlerinde, inkübasyondan önceki aktivite miktarı 100 olarak kabul edilerek, inkübasyon sonrası elde edilen değerler kalan aktivite yüzdesi (%) olarak ifade edildi (Rahman *et al.* 2006; Venugapol and Saramma 2007).

4. Alkalın proteaz enzimi için optimum sıcaklığın ve sıcaklık kararlılığının belirlenmesi

Proteaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla 0,5mL enzim çözeltisi ile Tris-HCl (100 mM pH:8,5) tamponunda hazırlanan %0,65'lik kazein çözeltisinin 2,5mL'si karıştırıldı ve 20°C'den 90°C'ye kadar olan sıcaklık aralıklarında 10 dakika süreyle su banyosunda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası her bir sıcaklık değeri için bölüm 3.2.3.4'te anlatıldığı gibi aktivite tayini yapıldı (Yıldırım 2014). Enzimin optimum sıcaklığını belirlemek için çizilen grafikte en yüksek aktivitenin gözlendiği sıcaklık değeri 100 olarak kabul edildi ve diğer sonuçlar ona göre bağlı aktivite (%) cinsinden birbiriyle kıyaslandı.

Enzimin sıcaklık kararlılığının belirlenmesi için; 1,5mL enzim çözeltisi 20°C'den 90°C'ye kadar olan sıcaklık aralıklarında her bir sıcaklık için 30, 60, 90 ve 120 dk'lık inkübasyon sonunda aktivite tayini yapıldı. Enzim sıcaklık kararlılığını gösteren grafiğinin çiziminde, farklı sıcaklık değerlerinde, inkübasyondan önceki aktivite miktarı

100 olarak kabul edilerek, inkübasyon sonrası elde edilen değerler kalan aktivite yüzdesi (%) olarak ifade edildi.

5. Bazı metal iyonlarının alkalın proteaz enziminin aktivitesine etkisinin belirlenmesi

Bölüm 3.1.3.h'de anlatıldığı gibi hazırlanan Co^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Li^{2+} gibi +2 değerlikli metal iyonlarının ve K^{+} gibi +1 değerlikli metal iyonunun alkalın proteaz enziminin aktivitesine etkisi incelendi. Bunun için bu iyonların klorlu tuzları kullanıldı. Hazırlanmış olan 10 mM'lık stok metal iyonu solüsyonları Tris-HCl (100 mM, pH:8,5) tamponu ile seyreltilerek 1,5 ve 10 mM'lık metal iyon solüsyonlarından 450 μL üzerine 50 μL enzim çözeltisi eklenerek 30 dk inkübasyona bırakıldı. Daha sonra üzerine alınara %0,65'lik kazeinin 2,5 mL'si karıştırılıp aktivite tayini yapıldı. Metal iyonları içermeyen enzim çözeltisinin aktivite miktarı 100 olarak kabul edildi ve metal iyonu içeren örneklerin aktivitesi kalan aktivite olarak hesaplandı (Özden 2010).

6. Bazı Organik Çözücülerin Alkalın Proteaz Enziminin Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Proteaz enziminin organik çözücüler varlığında aktivitedeki değişimini incelemek için; metanol, etanol, kloroform, izopropanol, *t*-bütanol, aseton, DMSO gibi organik çözücülerin %15 ve %50'lik konsantrasyonları kullanıldı. Her bir organik çözücü Tris-HCl (100 mM pH:8,5) tamponu içinde hazırlandı. 50 μL enzim çözeltisi üzerine, 450 μL organik çözücülerden oluşan tampon çözeltisi eklendi. 1 ve 24 saatlik inkübasyon sonunda aktivite tayini yapıldı. Kör olarak tampon çözeltisi yerine, her bir organik çözücülerin hazırlanmış farklı yüzde konsantrasyonlarından 50 μL eklenerek, tayin işleminde kullanıldı. Kontrol için de 50 μL enzim çözeltisi üzerine 450 μL Tris-HCl (100 mM pH:8,5) tamponu kullanılarak aynı şartlarda inkübasyona bırakıldı. Organik çözücü içermeyen enzim çözeltisinin aktivite miktarı 100 olarak kabul edildi ve organik çözücü içeren örneklerin aktivitesi kalan aktivite olarak hesaplandı (Yıldırım 2014).

7. Bazı inhibitörlerin alkalın proteaz enziminin aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi

Alkalın proteaz enziminin aktif bölgesinde yer alan enzimatik katalizden sorumlu amino asitlerin belirlenmesi için enzim preparatları amino asit modifikasyonu için kullanılan aktif bölge yönelimli inhibitörler ile muamele edilerek enzimin geri dönüşümsüz inhibisyona uğraması sağlandı (Öner 2010). Alkalın proteaz enziminin aktif bölgesinde hangi grubun yer aldığını belirlemek amacı ile inhibitörlerden; serin proteaz inhibitörü PMSF (2mM ve 5mM), metalloproteaz inhibitörü EDTA (2mM ve 5mM), β -mekaptoetonal (%1 ve %5) sistein proteaz inhibitörü DTNB (2 mM ve 5 mM) ve IAA (2 mM ve 5mM) kullanıldı. EDTA, β -merkaptotanol, DTNB, IAA Tris-HCl (100 mM, pH:8,5) tamponunda hazırlanırken PMSF %96 etanol çözeltisinde hazırlandı. 50 μ l enzim çözeltisi üzerine hazırlanan çözeltilerden 450 μ l eklenip 180 rpm'de 30 dk süreyle 37°C'lik çalkalayıcıda bekletildikten sonra bölüm aktivite ölçümü yapıldı. 50 μ l enzim çözeltisine 450 μ l Tris-HCl (100 mM, pH:8,5) tamponu eklenerek aynı koşullarda inkübe edilen, inhibitör içermeyen çözeltinin aktivite miktarı 100 olarak kabul edildi ve inhibitör içeren örneklerin aktivitesi kalan aktivite olarak hesaplandı (Ferrero *et al.*1996).

8. Alkalın proteaz enziminin aktivitesi üzerine yüzey aktif maddelerinin ve okside edici ajanın etkisinin belirlenmesi

Yüzey aktif maddelerinden SDS (%1 ve %5), Triton X-100 (%1 ve %5), Tween-20 (%1 ve %5), Tween-80 (%1 ve %5) ve okside edici ajan H_2O_2 (%1 ve %5) varlığında alkalın proteaz enziminin aktivitesinde meydana gelen değişim incelendi. 50 μ L enzim çözeltisi belirlenen konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerin 450 μ L'si ile karıştırıldı ve 30 dk 180 rpm hızındaki 37°C'lik çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında aktivite tayini yapıldı. 50 μ L enzim çözeltisine 450 μ L Tris-HCl (100 mM pH:8,5) tamponu eklenerek aynı koşullarda inkübe edilen örneğin aktivitesi 100 olarak kabul edildi ve inkübasyon sonrası aktiviteler kalan aktivite olarak değerlendirildi (Johnvesly and Naik 2001; Kazan *et al.* 2005; Shah *et al.* 2010).

9. Alkalın proteaz enziminin doğal substratlara olan özgünlüğünün belirlenmesi

Alkalın proteaz enziminin doğal substratlara olan özgünlüğünün belirlenmesi için kazein, azokazein, hemoglobün, sığır serum albumini (BSA) ve jelatin kullanıldı. Substratların %0,65'lik çözeltileri 100 mM Tris-HCl pH'sı 8,5 olan tamponda hazırlandı. 0,5mL enzim çözeltisi ile 2,5mL substrat çözeltisi karıştırıldı ve aktivite tayini yapıldı. En yüksek aktivite gösteren substratın aktivitesi 100 olarak kabul edildi ve diğerleride ona göre hesaplandı (Johnvesly and Naik 2001).

10. Proteaz enzimin için K_M ve V_{max} parametrelerinin bulunmasına yönelik çalışmalar

Proteaz enziminin K_M ve V_{max} değerlerini belirlemek amacıyla 0,5mL enzim çözeltisi, Tris- HCl (100 mM, pH:8,5) tamponunda %0,02-0,6 aralığında 6 farklı konsantrasyonda hazırlanmış kazein çözeltilerinin 2,5mL'si ile karıştırıldı. Aktiviteleri ölçüldü. Elde edilen değerlerle Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve bu grafikten yararlanılarak K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı (Laemmli 1970; Rao *et al.* 2008).

11. Ticari olarak satılan bazı katı ve sıvı deterjanların alkalın proteaz enzimi üzerine etkilerinin belirlenmesi

Alkalın proteaz enziminin Ariel, Bingo, Omo, Alo, Persil gibi katı endüstriyel deterjanlar varlığında ve Ariel sıvı ve Perwoll sıvı gibi sıvı endüstriyel deterjanlar varlığında aktivitesinin durumu tespit edildi. Bu deterjanlardan %1 (w/v) konsantrasyonlarındaki çözeltileri çeşme suyu ile hazırlandı. 50 µl enzim çözeltisine 450 µl deterjanları içeren çözeltilerden eklenerek, 37°C'de bir saat inkübasyona bırakıldı. İçinde deterjan çözeltisi olmayan bir örnek kontrol olarak aynı şartlarda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra aktivite tayini yapıldı. Kontrolün aktivitesi 100 olarak kabul edildi ve diğer örneklerin aktiviteleri buna göre hesaplandı (Yıldırım 2014).

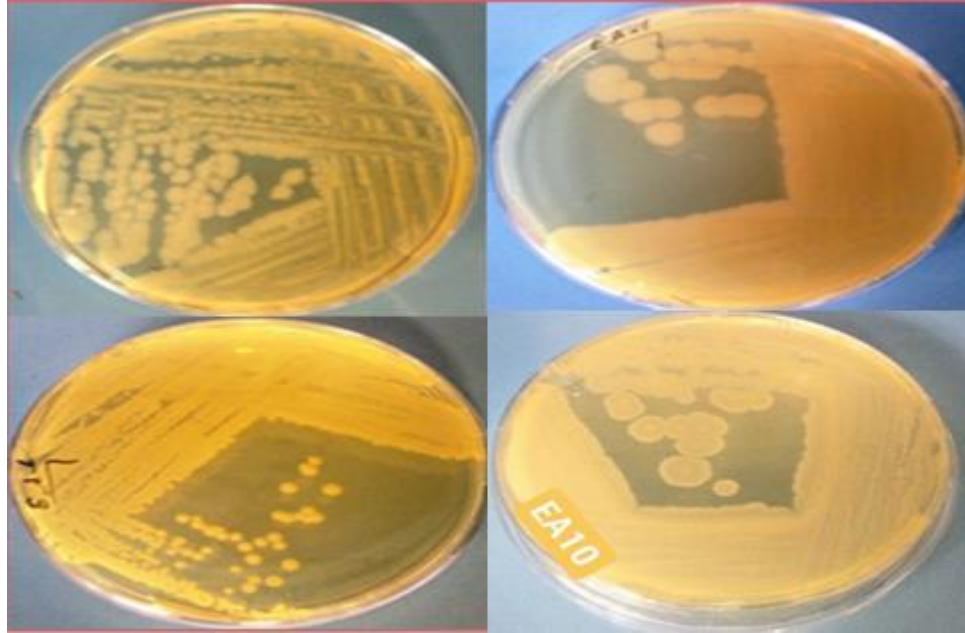
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Mikroorganizmaların İzolasyonu

Bu çalışma kapsamında Van iline bağlı Çaybağı Köyü ve Hasanabdal Kaplıcasından temin edilen sıcak su örneklerinden toplam 10 adet termofilik bakteri izole edildi(Çizelge 4.1). İzolatlara EA kodlu numaralar verilerek tümü gliserinli LB broth ihtiva eden cryo tüplerde -86°C 'de muhafaza edildi. Saf kültürleri izole edilen bakterilere ait petri görüntüleri Şekil 4.1'de verildi.

Çizelge 4.1. Termofilik bakteri suşları ve izole edildikleri istasyonlar

İSTASYON	KAYNAK SUYUN SICAKLIĞI	İZOLAT KODU
Saray Çaybağı Köyü	61°C	EA1, EA2, EA3 EA4, EA5,EA6, E-7
Hasanabdal Kaplıcası	66°C	EA8, EA9, EA10



Şekil 4.1. EA1, EA5, EA8 ve EA10 suşlarına ait petri görüntüleri

İzole edilen bakterilerin öncelikle morfolojik ve biyokimyasal özellikleri belirlendi. Ardından bu izolatlar farklı moleküler yöntemler (16S rRNA gen analizi ve rep-PCR) kullanılarak tanımlanmıştır. Daha sonra SKM agar besiyeri kullanılarak yapılan petri deneyleri sonucunda en yüksek aktiviteyi veren EA10 kodlu izolatlar ile çalışılmaya devam edildi. *Bacillus licheniformis* EA10'dan izole edilen enzim üçlü faz ayırma (TPP) sistemi ile saflaştırıldı ve karakterizasyon işlemleri yapıldı.

4.2. Konvansiyonel Test Sonuçları

Bakterilerin izolasyonu sonrasında elde edilen izolatların, çözültüsü ile belirlendi. Bu amaç doğrultusunda, bir öze dolusu bakteri bir damla KOH solüsyonu ile boş bir petride muamele edildi. İşlem sonucunda sakız gibi uzayanlar Gram (-) uzamayanlar ise Gram (+) olarak değerlendirildi. Yapılan analizler sonucunda izolatlardan biri hariç tümünün Gram(+) olduğu gözlemlendi. Daha sonra izolatların biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla katalaz ve oksidaz testi yapıldı. Yapılan çalışmaların sonucunda izole edilen tüm bakterilerin katalaz ve oksidaz pozitif olduğu tespit edildi (Çizelge 4.2). Ayrıca test suşlarının hücre morfolojilerinin tespitine yönelik yapılan çalışmalar sonucunda; tüm izolatların çubuk hücre morfolojisine sahip olduğu gözlemlendi.

Çizelge 4.2. İzolatların morfolojik ve biyokimyasal özellikleri

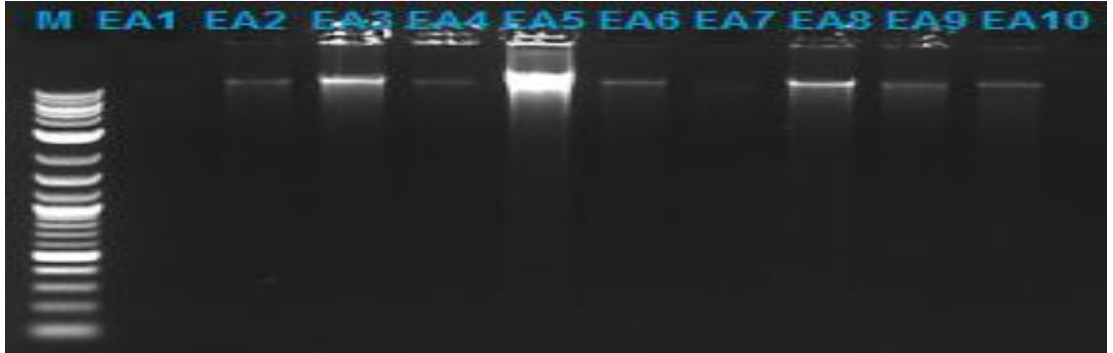
Stok kodu	Morfolojisi	Gram	Oksidaz	Katalaz
EA1	Çubuk	+	+	+
EA2	Çubuk	+	+	+
EA3	Çubuk	+	+	+
EA4	Çubuk	+	+	+
EA5	Çubuk	+	+	+
EA6	Çubuk	+	+	+

Çizelge 4.2. (devam)

EA7	Çubuk	+	+	+
EA8	Çubuk	-	+	+
EA9	Çubuk	+	+	+
EA10	Çubuk	+	+	+

4.3. Seçilen İzolatların Moleküler Yöntemlerle Tanılarının Yapılması

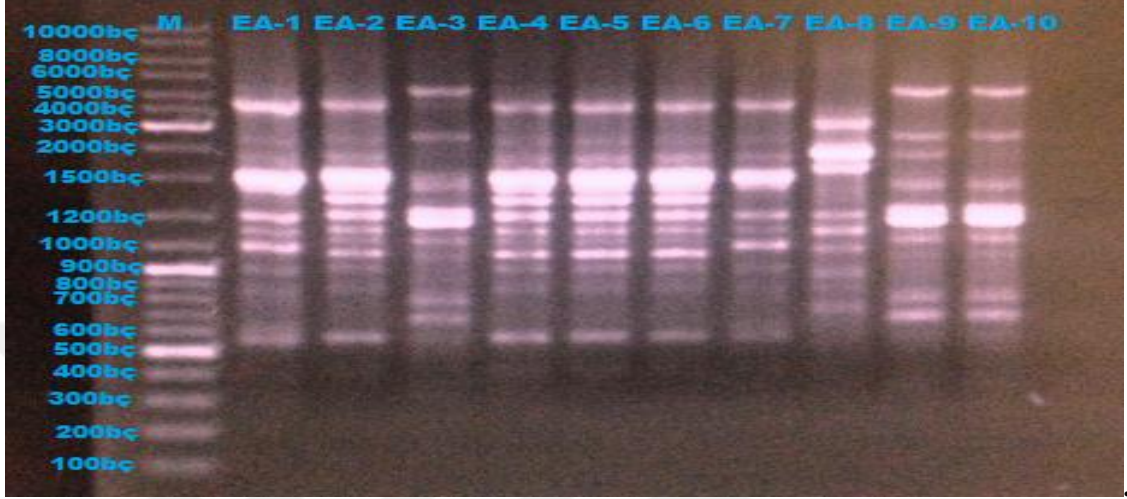
Sıcak su kaynaklarından izole edilen bakterilerin konvensiyonel yöntemlerle identifikasyonu gerçekleştirildikten sonra, izolatları moleküler yöntemlerle tanı aşamasına geçildi. Bunun için öncelikle genomik DNA'ları izole edildi (Şekil 4.2). Daha sonra izolatların gen profillerinin belirlenmesi amacıyla (GTG)₅-PCR analizleri yapıldı.

**Şekil 4.2.** İzolatların DNA jel görüntüsü

4.3.1. (GTG)₅-PCR Yöntemiyle İzolatların Gen Profillerinin Belirlenmesi

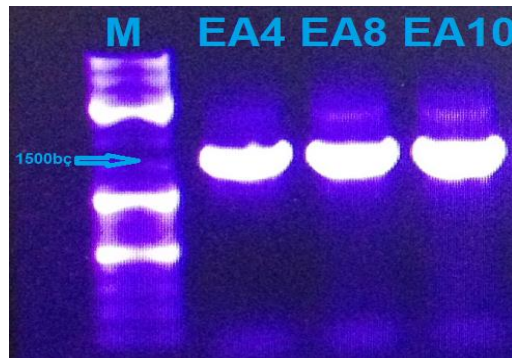
Bakteri DNA'sı içerisinde sürekli tekrarlayan diziler bulunmaktadır. DNA'da değişken sayıda tekrarlayan ve rep olarak isimlendirilen bu elementler, bakteri hücrelerinde korunmuş palindromik yapıya sahiptir (Kıran ve Osmanağaoğlu 2011). Yapılan (GTG)₅-PCR analizi sonucunda (Şekil 4.3). Elde edilen polimorfik bant profillerine göre yapılan inceleme sonucunda: EA1, EA2, EA4, EA5, EA6 ve EA7 kodlu izolatların aynı türe ait farklı suşlara ait olduğu tespit edildi; bunlardan klonlama amacıyla EA4;

EA3, EA9 VE EA10 suşlarından ise rastgele EA10 ve en son olarak tüm izolatlardan farklı bir bant profili sergileyen EA8 suşu seçilerek 16S rRNA bölgeleri çoğaltıldı.



Şekil 4.3. Örneklerle ait (GTG)₅-PCR jel görüntüsü [M: Marker (N0550S- Biolabs), sırasıyla 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 800, 900, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bç).

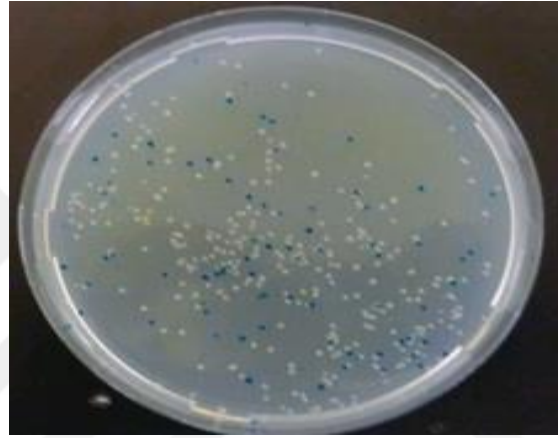
İzolatlarda bulunan 16S rRNA gen bölgesi, 27F ve 1492R evrensel primerleri kullanılarak amplifiye edildi. Daha sonra elde edilen PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve tüm izolatların 1500 bç büyüklüğünde tek bant verdiği gözlemlendi. (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. İzolatların 16S rRNA jel görüntüsü

4.3.2. Amplifiye Edilen 16S rRNA Bölgesinin Klonlanması

Transformasyon işlemi, Klonlama işlemi için 16S rRNA PCR ürünlerine ligasyon işlemi yapıldı. Daha sonra vektörün bakteri hücrelerine transformasyonu gerçekleştirildi. *E. coli* izolatları amfisilin, X-gal ve IPTG içeren petrilere yayıldı ve 14-16 saat inkübasyona bırakıldı. Sürenin sonunda mavi-beyaz koloni taraması yapıldı. Transformasyon işlemi sonucu oluşan mavi-beyaz koloni petri görüntüsü Şekil 4.5'te verildi.



Şekil 4.5. Mavi-beyaz koloni örnek görüntüsü

Koloni PCR; incelenen petrillerdeki beyaz kolonilerden birkaç adet seçildi ve ilgili genin transformasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek amacıyla koloni PCR yapıldı. Elde edilen ürünler, %1'lik agaroz jelde yürütüldü. Görüntüleme işlemi sonucunda 1500 bç'lik bölgede bant veren koloniler seçilerek klonlama işlemine bunlar ile devam edildi(Şekil 4.6).

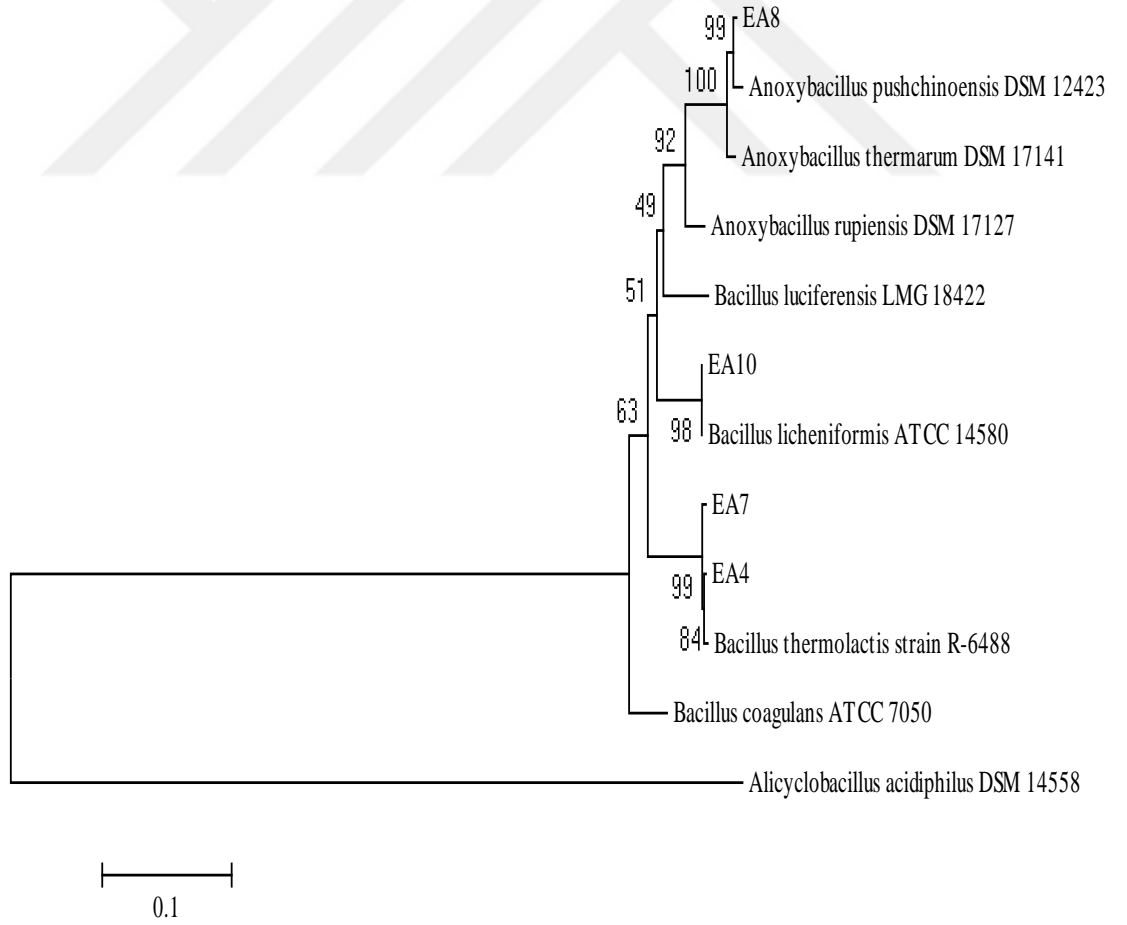


Şekil 4.6. Koloni PCR jel görüntüsü

DNA Dizi Analiz Sonuçları; Macrogen (Hollanda) firmasından gelen 16S rRNA sekans dataları anlamlı hale getirildi

Çizelge 4.3. DNA dizi analizi sonucu belirlenen bakterilerin benzerlik yüzdeleri

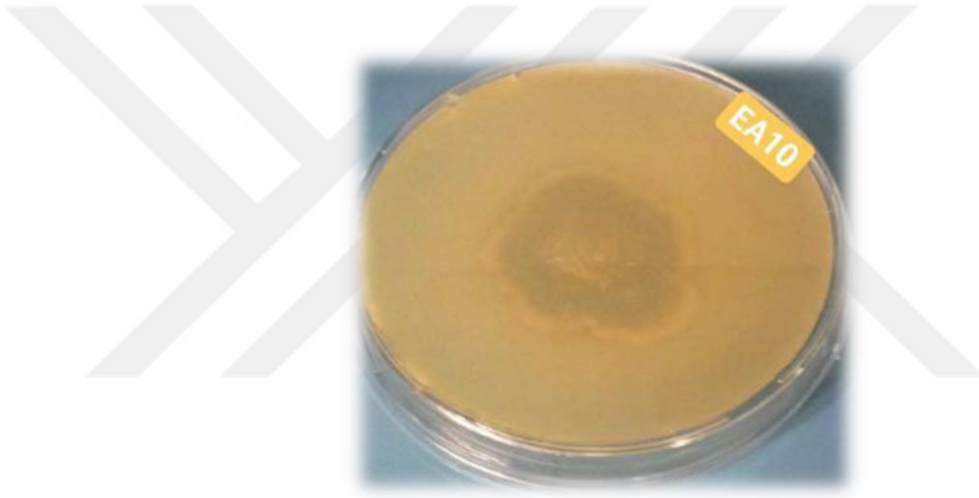
İzolat Kodu	İzolat İsmi	Benzerlik Oranı
EA4	<i>Bacillus thermolactis</i>	%99
EA8	<i>Anoxybacillus pushchinoensis</i>	%99
EA10	<i>Bacillus licheniformis</i>	%99



Şekil 4.7. Filogenetik ağaç

4.4. Petride Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi

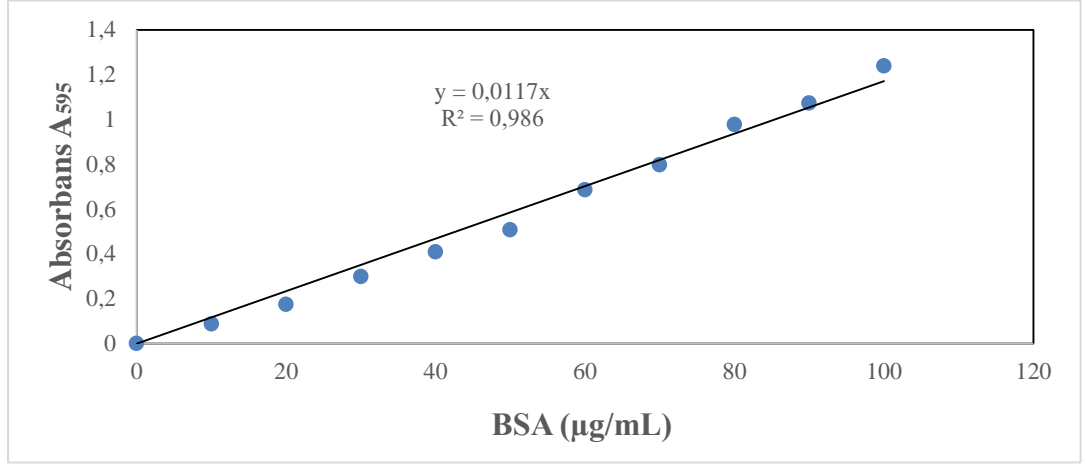
Sıcak su kaynaklarından izole edilen bakteriler bölüm 3.1.4.c'de anlatıldığı şekilde hazırlanan Skim Milk agar besi yerlerine wel difüzyon metodu kullanılarak inoküle edilip, 55°C'de 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. 24. Saat ve 48. Saat sonunda zon veren petrilerin görüntüleri kaydedildi. Yapılan incelemeler sonucunda, EA3, EA9 ve EA10 suşlarına ait petrilerde zon görülürken, diğer izolatların (EA1, EA2, EA4, EA5, EA6, EA7 ve EA8)) hiç zon vermediği tespit edildi. Zon büyüklüğüne göre en yüksek enzim aktivitesinin EA10 suşuna ait petri olduğu belirlendi ve devam eden çalışmalarda bu bakteri suşu kullanıldı (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Skim Milk Agar petrisindeki EA10 suşuna ait proteaz aktivite görüntüsü

4.5. Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

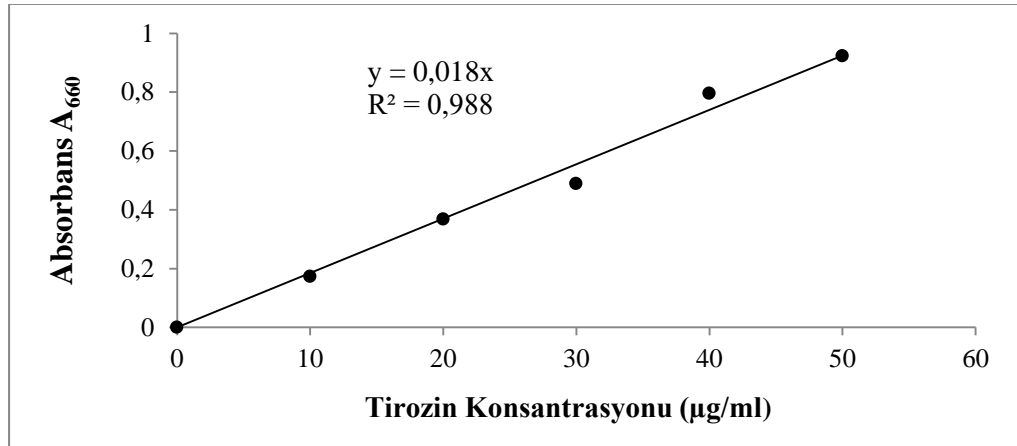
Tez Kapsamında elde edilen enzim çözeltilerindeki protein tayini Bradford yöntemiyle yapıldı. Bunun için bölüm 3.2.5.d'de anlatıldığı şekilde standart grafik oluşturuldu (Şekil 4.9)



Şekil 4.9. Protein tayininde kullanılan standart grafik

4.6. Proteaz aktivitesi hesaplamasında kullanılan tirozin standart grafiği

Enzim aktivitesinin hesaplanmasında Yıldırım (2014) tarafından oluşturulan tirozin standart grafiği kullanıldı (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Proteaz aktivitesi için standart tirozin grafiği (Yıldırım 2014)

4.7. Üçlü Faz Ayırma (TPP) Sistemi ile Alkali Proteazın Saflaştırılması

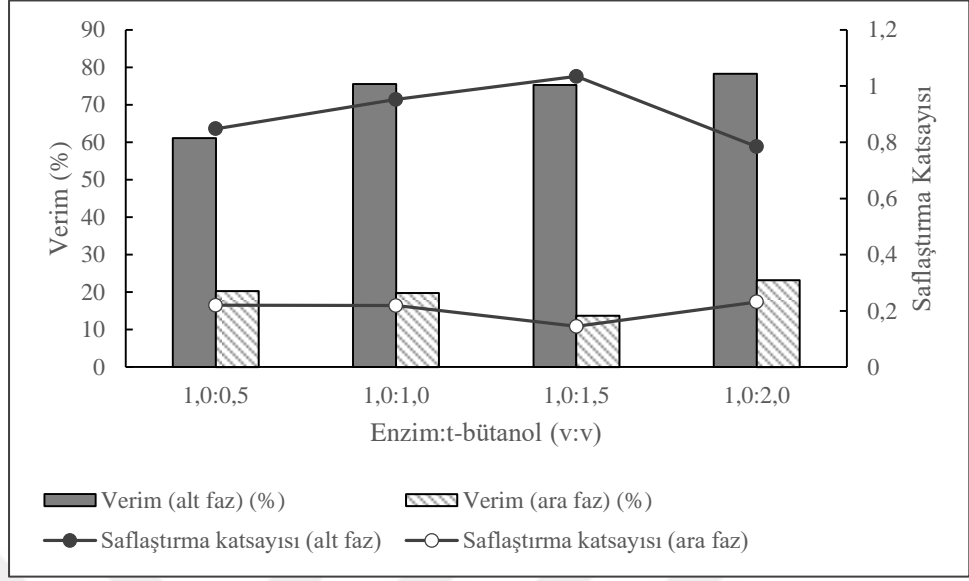
Üçlü faz ayırma sisteminde (TPP) proteaz enziminin iyi bir verimle yüksek oranda saflaştırılabilmesi için, tuz konsantrasyonu, enzim miktarının organik çözügene oranı ve pH gibi

sistemi etkileyen temel sistemi etkileyen parametrelerin optimizasyonu gereklidir. Bu yüzden bu tez kapsamında farklı ham enzim çözeltisi:organik çözügen oranları, farklı tuz konsantrasyonları ve farklı pH'ların saflaştırma katsayısı ve aktivitenin geri kazanımı üzerine etkileri incelenmiştir. Proteaz enziminin saflaştırılmasında kullanılan TPP sisteminde organik çözügen olarak *t*-bütanol ve tuz olarak amonyum sülfat tercih edildi.

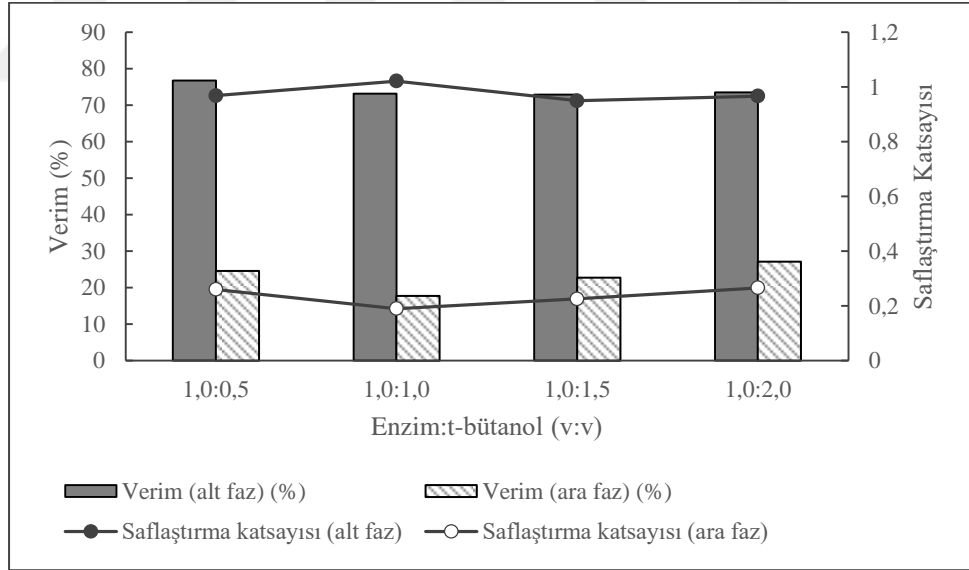
4.7.1. TPP Sisteminde Amonyum Sülfat Konsantrasyonu ve Organik Çözügen Oranının Etkisinin Belirlenmesi

TPP sistemlerinde proteinleri ara yüzeyde etkin bir şekilde toplayabilmek için amonyum sülfat ve *t*-bütanol arasındaki karşılıklı ilişkiden yararlanılır. Proteinlerin salting-out etkinliği amonyum sülfat konsantrasyonu ve proteinlerin net yüküne bağlıdır. Bu nedenle amonyum sülfat doyumluğu önemli bir parametre olup optimize edilmelidir (Bayraktar 2011).

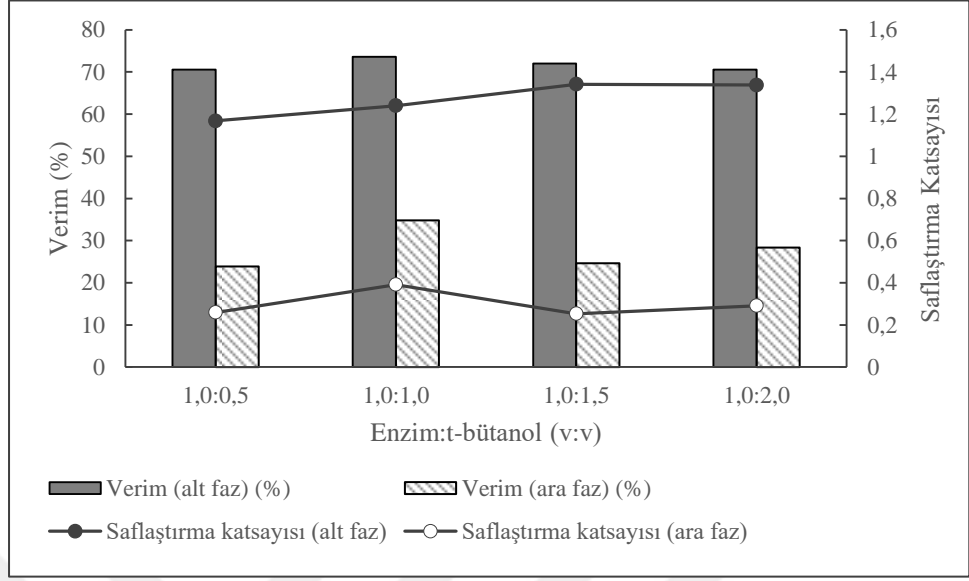
TPP proseslerinde optimizasyon çalışmaları farklılık gösterebilmektedir. Literatürlerde sabit bir tuz konsantrasyonu seçilip bu tuz konsantrasyonlarıyla farklı homojenat:*t*-bütanol oranları deneyerek alkol oranı belirlendikten sonra bu alkol oranıyla farklı tuz konsantrasyonları çalışılarak gerekli olan tuz miktarı belirlenmektedir. Optimizasyon işlemi için kullanılan diğer bir yöntem de her bir tuz konsantrasyonunda farklı homojenat:*t*-bütanol oranlarının denemesidir. Bu tez kapsamında farklı amonyum sülfat konsantrasyonları (%20, %30, %40, %50, %60, %70 ve %80) ve farklı homojenat:*t*-bütanol oranları (1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:1,2) kullanılarak 37°C'de gerçekleştirildi. Bunun sonucunda düşük tuz konsantrasyonlarında yüksek alkol oranı eklendiği durumlarda yüksek verim görülürken yüksek tuz konsantrasyonlarında alkol oranı düşüğe verim artmıştır. Yapılan çalışmaların grafiksel gösterimi sırasıyla Şekil 4.11-4.17'deki gibidir. Gösterilen şekiller incelendiğinde; saflaştırılan alkalın proteazın alt fazda kaldığı en yüksek verimin ve saflaştırma katsayısının %70 amonyum sülfat konsantrasyonunda ve 1,0:0,5 homojenat:*t*-bütanol oranında elde edildiği görülmektedir. Bu aşamadan sonraki saflaştırma prosesine bu oranlarla devam edildi.



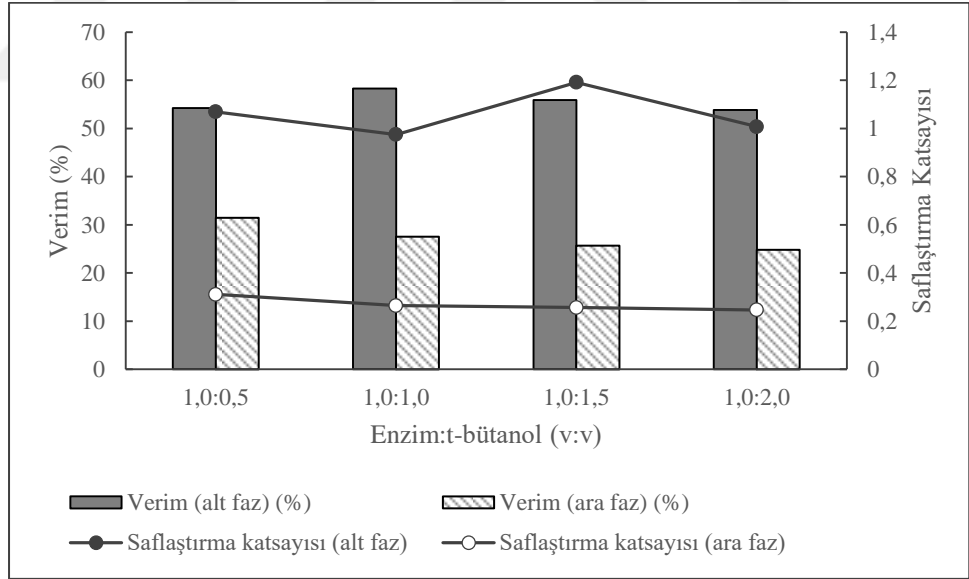
Şekil 4.11. Tpp prosesinin %20 amonyum sülfat konsantrasyonu varlığında farklı *t*-bütanol oranının (Homojenat:*t*- bütanol; 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) alkalın proteazın saflaştırma katsayısına ve verime etkisi



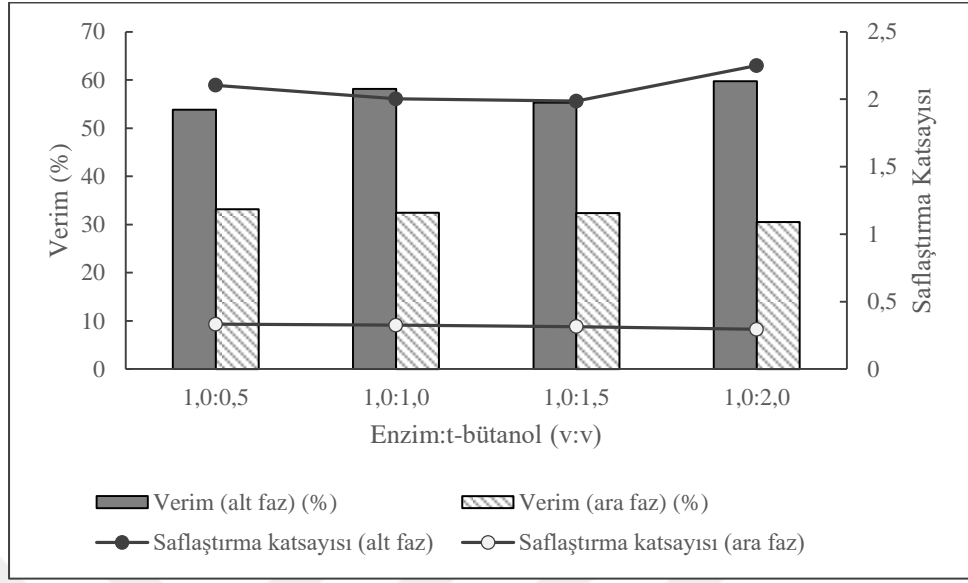
Şekil 4.12. Tpp prosesinin %30 amonyum sülfat konsantrasyonu varlığında farklı *t*-bütanol oranının (Homojenat:*t*- bütanol; 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) alkalın proteazın saflaştırma katsayısına ve verime etkisi



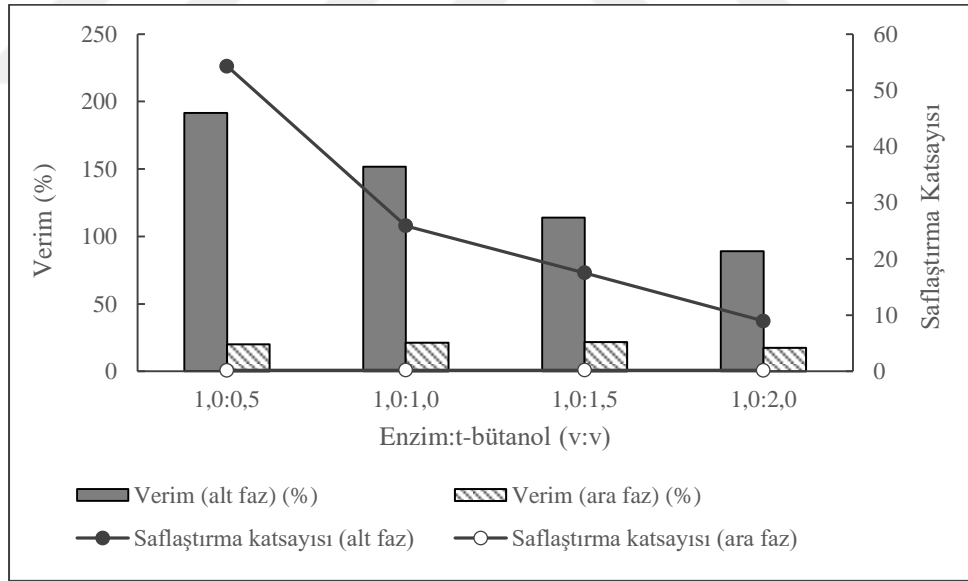
Şekil 4.13. Tpp prosesinin %40 amonyum sülfat konsantrasyonu varlığında farklı *t*-bütanol oranının (Homojenat:*t*- bütanol; 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) alkalın proteazın saflaştırma katsayısına ve verime etkisi



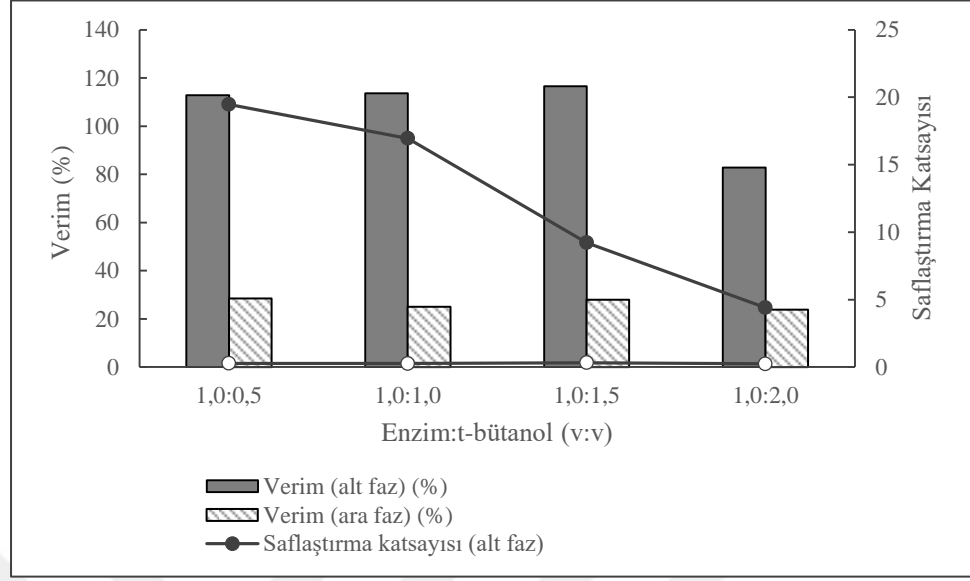
Şekil 4.14. Tpp prosesinin %50 amonyum sülfat konsantrasyonu varlığında farklı *t*-bütanol oranının (Homojenat:*t*- bütanol; 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) alkalın proteazın saflaştırma katsayısına ve verime etkisi



Şekil 4.15. Tpp prosesinin %60 amonyum sülfat konsantrasyonu varlığında farklı *t*-bütanol oranının (Homojenat:*t*- bütanol; 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) alkalın proteazın saflaştırma katsayısına ve verime etkisi



Şekil 4.16. Tpp prosesinin %70 amonyum sülfat konsantrasyonu varlığında farklı *t*-bütanol oranının (Homojenat:*t*- bütanol; 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) alkalın proteazın saflaştırma katsayısına ve verime etkisi

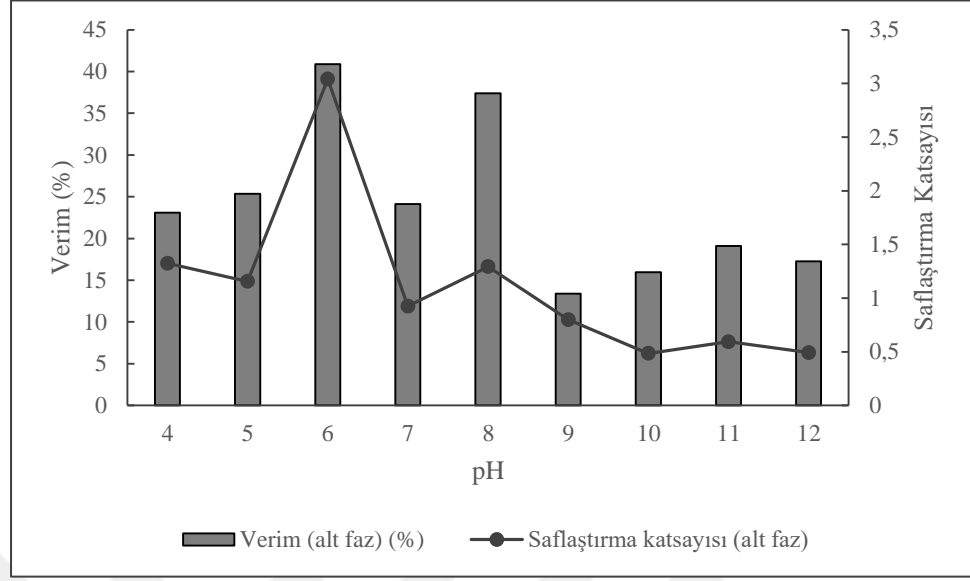


Şekil 4.17. Tpp prosesinin %80 amonyum sülfat konsantrasyonu varlığında farklı *t*-bütanol oranının (Homojenat:*t*- bütanol; 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) alkalın proteazın saflaştırma katsayısına ve verime etkisi

4.7.2. Alkalın Proteazın Saflaştırılmasında TPP Sistemine pH'nın Etkisi

Üçlü faz ayırma sistemlerinde önemli bir diğer parametre sistemin pH'sı ve hedef proteinin izoelektrik noktasıdır. Ortamın pH'sı ayrımı gerçekleştirecek preparat içerisindeki biyomoleküllerin dağılımını önemli ve etkin bir biçimde değiştirmektedir. Saflaştırılması hedeflenen proteinin ve iyon kompozisyonunun yüküne, kontaminantların yüzey karakteristiğine pH etki eder ve fazlar arasında dağılımın farklılaşmasına sebep olur (Kadıoğlu 2013). Bu nedenle sistemin pH'sı TPP sistemini etkileyen önemli parametrelerden biridir ve optimize edilmesi gerekmektedir.

TPP işleminde en uygun tuz yüzdesi ve organik çözügen belirlendikten (%70 tuz konsantrasyonu ve 1,0:0,5 oranında *t*-bütanol) sonra bu değerlere göre farklı pH değerlerinde işlemler tekrarlandı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.18'de gösterilmiştir.



Şekil 4.18. Alkalın proteazın saflaştırılmasında TPP sistemine pH'nın etkisi

4.7.3. Alkalın Proteazın Üçlü Faz Yöntemiyle Saflaştırma Sonuçları

B. licheniformis EA10'dan alkalın proteaz enzimi TPP prosesinin optimizasyonunun hemen ardından belirlenen parametreler ışığında saflaştırıldı. Saflaştırma sonuçları Çizelge 4.4'te verildi (Çizelge 4.4). % 70 (w/v) amonyum sülfat doygunluğu, 1,0:0,5 (v/v) homojenat:*t*-bütanol oranı ve pH 6,0'da enzim %191,5'lik verimle 54,1 kat TPP sisteminin alt fazından saflaştırıldı.

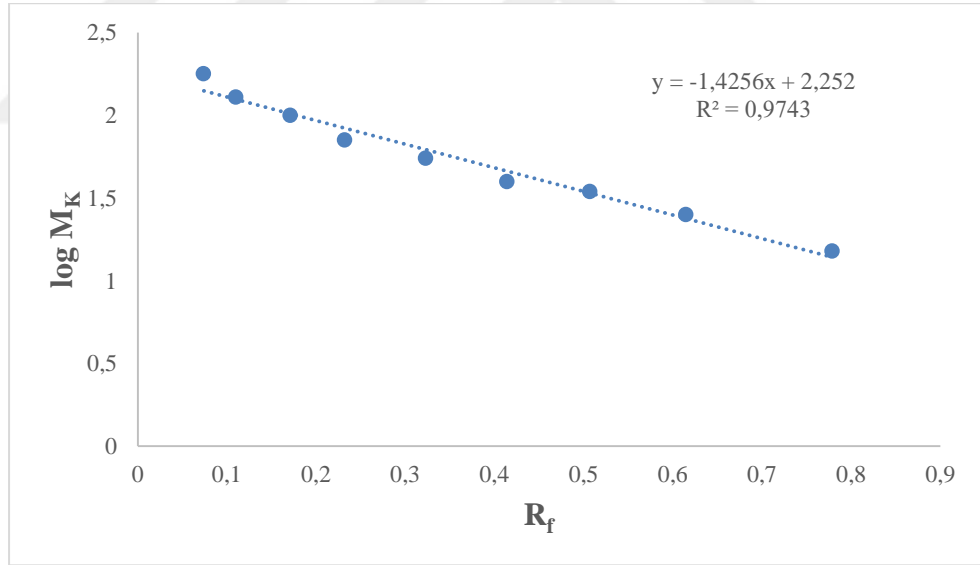
Çizelge 4.4. *Bacillus licheniformis* EA10'dan izole edilen alkalın proteazın saflaştırma tablosu

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
Homojenat	2	27	12,46	54	24,92	2,17	100	1
TPP-Alt faz	2	51,7	0,44	103,4	0,88	117,5	191,6	54,1
TPP-Ara Faz	2	5,4	12,65	10,8	25,3	0,43	20	0,19

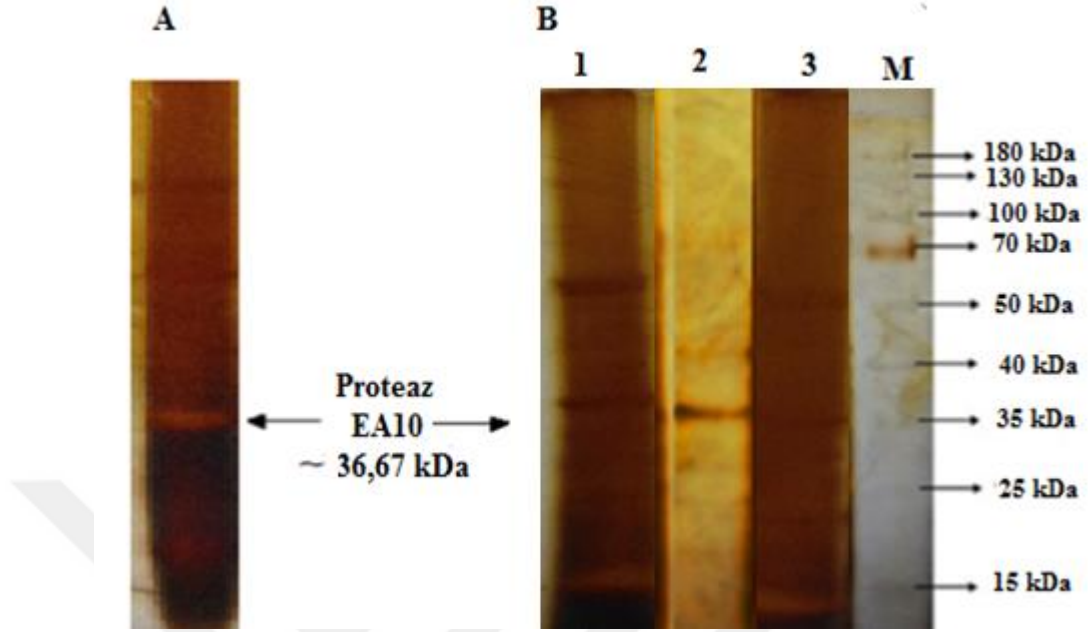
4.5. SDS-PAGE İle Enzimin Saflık Kontrolü, Molekül Kütlesinin Tayini ve Zimogramı Analizi

B. licheniformis EA10'dan üçlü faz ayırma yöntemiyle saflaştırılan proteaz enziminin saflığının kontrolü için SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. Elde edilen bantları gösteren fotoğraf Şekil 4.18'de gösterildi. Standart proteinlerin ve enzimin jelde yürüdükleri mesafeler ölçülerek R_f değerleri hesaplandı. Log MK- R_f değerleri ile çizilen grafik Şekil 4.19'de gösterildi. Enzimin molekül kütlesi 37,67 olarak hesaplandı.

Proteaz enzimi SDS-PAGE sisteminde yürütülerek zimogram analizi yapıldı. Yapılan analiz sonucunda Şekil 4.20'de görülen proteaz enziminin bulunduğu yer daha açık renkte görünmektedir. Enzimin kazeini parçalamasından dolayı jelde diğer bölgelere göre daha açık renkteki görüntü proteaz enziminin varlığını doğrulamaktadır.



Şekil 4.19. SDS-PAGE sonucu çizilen Log MK-R_f grafiği



Şekil 4.20. *B. licheniformis* EA10'dan üçlü faz ayırma yöntemiyle saflaştırılan proteaz enziminin SDS-PAGE ve zimogram görüntüsü

A)Zimogram analiz sonucu B) SDS-Page Görüntüsü 1) Homojenat 2) Alt faz 3) Ara faz

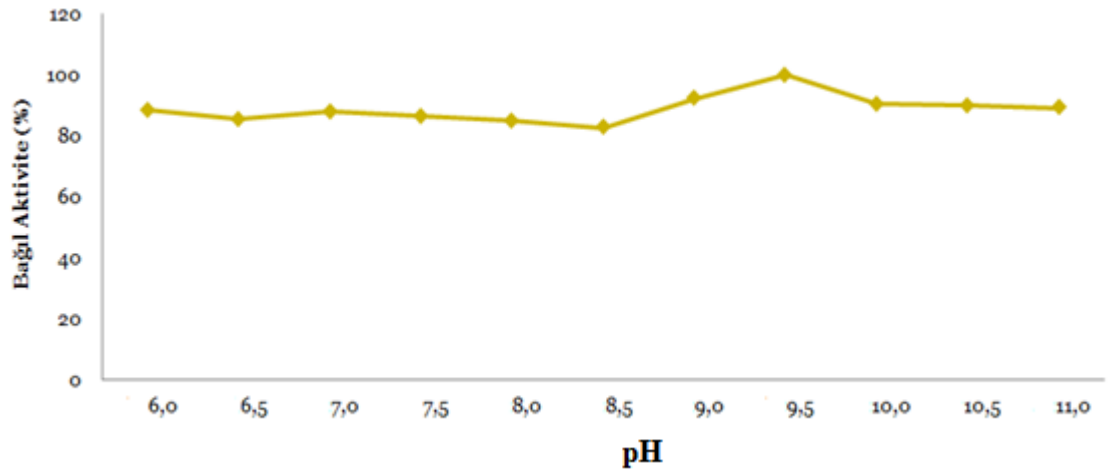
B. licheniformis EA10'dan üçlü faz ayırma yöntemiyle saflaştırılan proteaz enziminin SDS-PAGE ve zimogram görüntüsü incelendiğinde enzimin alt fazda kaldığı görüldü.

4.6. Proteaz Enzimi İçin Optimum pH ve Stabil pH Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar

B. licheniformis EA10'dan üçlü faz ayırma yöntemiyle saflaştırılan proteaz enziminin optimum pH'sı optimum pH'sı belirlendi. Elde edilen verilere göre çizilen grafik incelendiğinde proteaz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği Glisin-NaOH tamponu ve optimum pH 9,5 olarak belirlendi.

Çizelge 4.5. *B. licheniformis* EA10'dan üçlü faz ayırma yöntemiyle saflaştırılan proteaz enziminin 0,1 M sodyum fosfat (pH6,0–8,0), Tris-HCl (pH 7,0–9,0) ve glisin-NaOH (pH 9,011,0) tampon çözeltileri kullanılarak optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları.

pH	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0	9,5	10,0	10,5	11,0
Bağlı Aktivite (%)	88,5	85,74	87,99	86,63	85,17	82,78	92,26	100	90,38	89,91	89,26

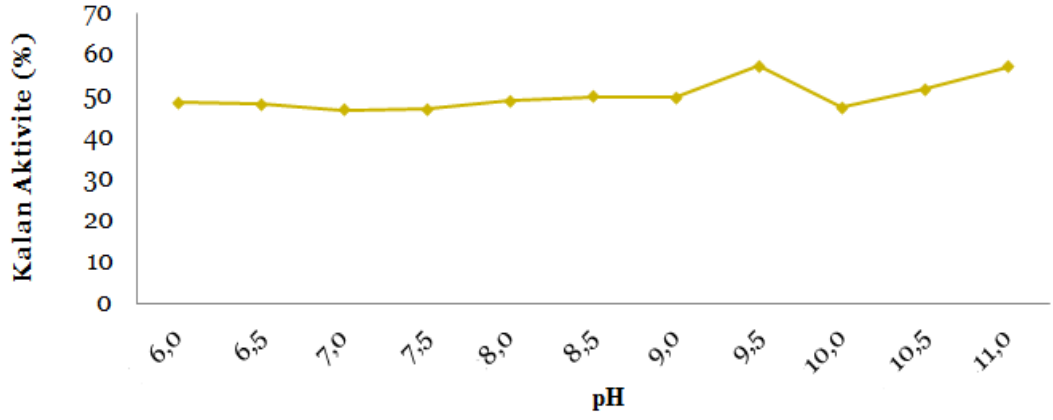


Şekil 4.21. Proteaz enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm grafiği

Bacillus licheniformis EA10'dan üçlü faz ayırma yöntemiyle saflaştırılan proteaz enziminin bölüm 3.2.3.6.3 yönteme göre stabil pH'sı belirlendi. Enzimin pH stabilitesi için 0,1 M sodyum fosfat (pH 6,0–8,0), Tris-HCl (pH 7,0–9,0) ve glisin-NaOH (pH 9,0–11,0) tampon çözeltileri kullanıldı. Elde edilen verilere göre grafik oluşturuldu ve proteaz enzimi için stabil pH glisin-NaOH tamponu pH 9,5 olarak belirlendi

Çizelge 4.6. *Bacillus licheniformis* EA10'dan üçlü faz ayırma yöntemiyle saflaştırılan proteaz enziminin 0,1 M sodyum fosfat (pH6,0–8,0), Tris-HCl (pH 7,0–9,0) ve glisin-NaOH (pH 9,0–11,0) tampon çözeltileri kullanılarak stabil pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları

pH	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0	9,5	10,0	10,5	11,0
Kalan Aktivite (%)	48,52	48,04	46,62	46,71	48,95	49,8	49,76	57,33	47,28	51,71	57



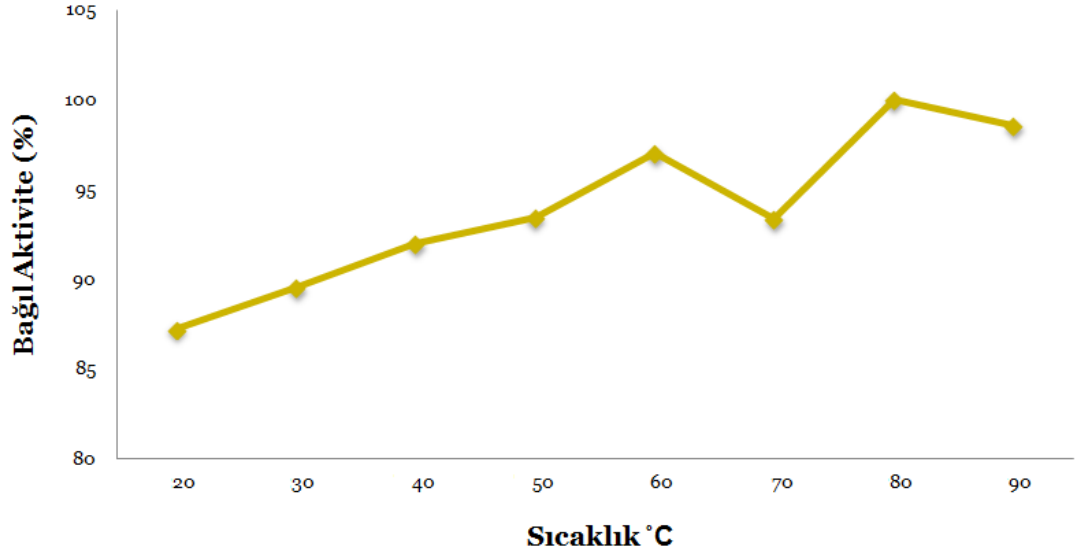
Şekil 4.22. Proteaz enzimi için elde edilen stabil pH grafiği

4.7. Proteaz Enzimi İçin Optimum Sıcaklığın ve Stabil Sıcaklığın Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar

B. licheniformis EA10'dan üçlü faz ayırma yöntemiyle saflaştırılan proteaz enziminin sıcaklık profili ve kararlılığı belirlendi. Enzimin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla 20°C ile 90°C arasındaki sıcaklıklar denendi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.21 ve Çizelge 4.7'de gösterildi. Sonuçlar incelendiğinde *B. licheniformis* EA10'dan üçlü faz ayırma sistemi ile saflaştırılan proteaz enziminin optimum sıcaklığı 80°C olarak tespit edildi.

Çizelge 4.7. *B. licheniformis* EA10'dan üçlü faz ayırma yöntemiyle saflaştırılan proteaz enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık- bağıl aktivite (%) ölçüm sonuçları çizelgesi

Sıcaklık (°C)	20	30	40	50	60	70	80	90
Bağıl Aktivite (%)	87,25	89,58	92,04	93,48	97,04	93,4	100	98,56

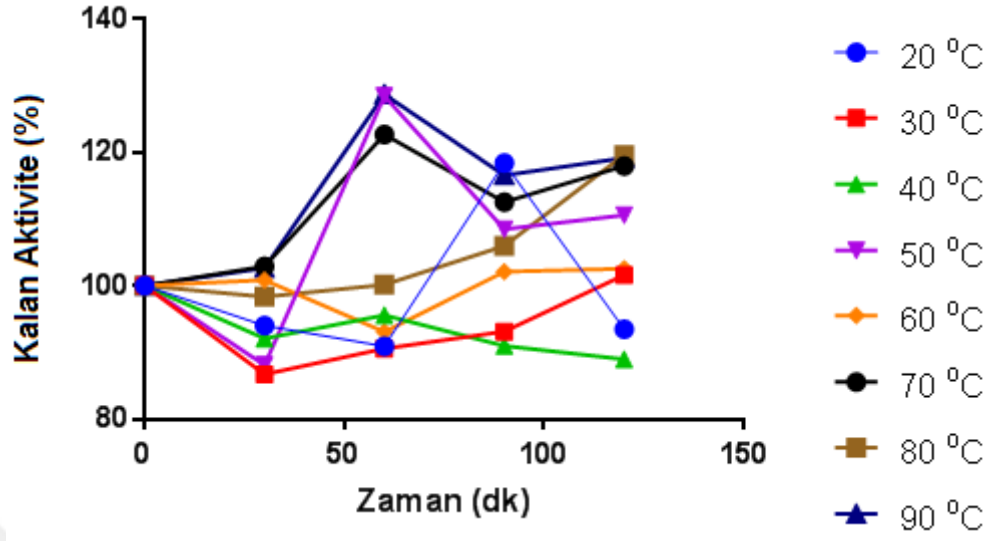


Şekil 4.23. Proteaz enzimi optimum sıcaklık ölçülmesi için çizilen sıcaklık-bağlı aktivite grafiği

B. licheniformis EA10'dan üçlü faz ayırma yöntemiyle saflaştırılan proteaz enziminin stabil sıcaklığını belirlemek amacıyla 20°C'den 90°C'ye kadar olan sıcaklık aralığında 30, 60, 90 ve 120 dk'lık inkübasyon sürelerinde bekletildikten sonra aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen veriler Şekil 4.24 ve Çizelge 4.8'de gösterildi. Enzimin her bir sıcaklık aralığında iki saat inkübasyon sonunda aktivitesini muhafaza ettiği ve sıcaklığa karşı oldukça toleranslı olduğu görüldü. Özellikle 50, 70, 80 ve 90°C sıcaklıklarda enzimin daha kararlı olduğu ve inkübasyon süresinin artmasıyla tüm sıcaklıklarda kararlılığının arttığı belirlendi.

Çizelge 4.8. *B. licheniformis* EA10'dan üçlü faz ayırma yöntemiyle saflaştırılan proteaz enziminin sıcaklık kararlılığını belirlemek için zaman-sıcaklık- kalan aktivite (%) ölçüm sonuçlarının gösterimi

İnkübasyon Sonrasında Kalan Aktiviteler (%)								
Süre (dk)	20°C	30°C	40°C	50°C	60°C	70°C	80°C	90°C
30	94,08	86,76	92,12	88,16	100,88	102,93	98,36	102,65
60	90,96	90,58	95,62	128,44	93,1	122,7	100,19	128,71
90	118,93	93,15	91,00	108,49	102,14	112,54	106,01	116,55
120	93,51	101,63	88,99	110,58	102,56	117,94	119,63	119,16



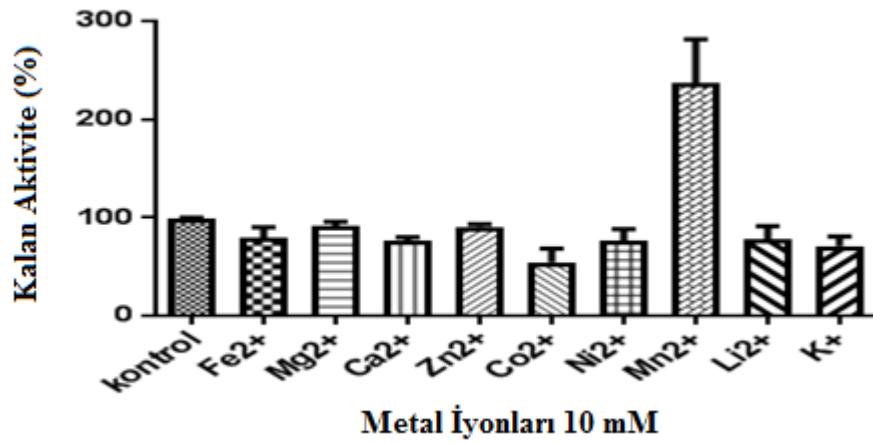
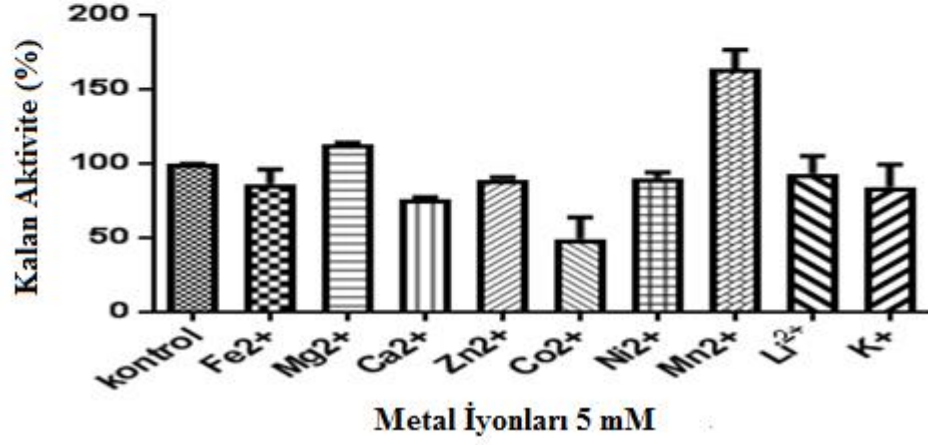
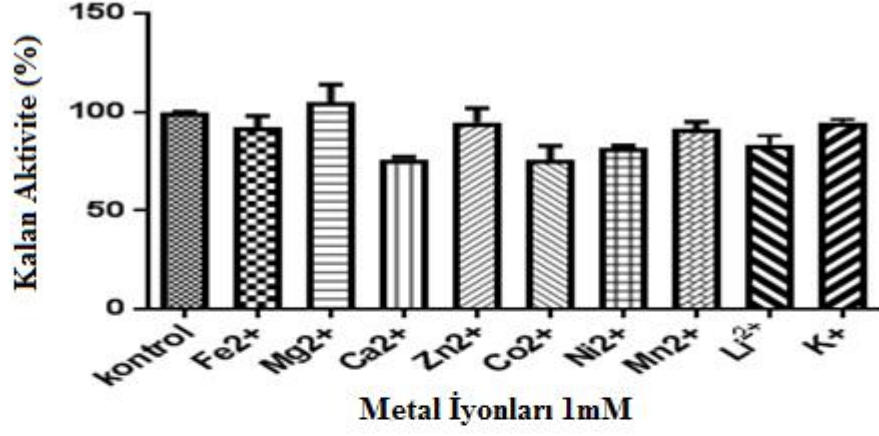
Şekil 4.24. Sıcaklığın proteaz enzim kararlılığı üzerine etkisi.

4.9. Bazı Metal İyonlarının Proteaz Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkisine Yönelik Sonuçlar

Metal iyonlarının proteaz enzimi aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla, 1, 5 ve 10 mM'lık konsantrasyonlarda Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Li^{2+} , Ca^{2+} ve K^{+} metal iyonları kullanılarak bölüm 3.2.12.e'de belirtilen yöntemle göre proteaz aktivitesi belirlendi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.9'da ve Şekil 4.25'te verildi. 1mM'lık konsantrasyonda Ca^{2+} ve Co^{2+} iyonları dışında diğer metal iyonlarının varlığında enzimin aktivitesini yüksek kararlılıkta koruduğu gözlemlendi 5 mM ve 10 mM konsantrasyonlarda Mn^{2+} iyonu varlığında enzim aktivitesinde önemli bir artış olduğu görüldü. 10 mM konsantrasyonda Co^{2+} enzimi, %46 oranında inhibe ettiği tespit edildi.

Çizelge 4.9. Bazı metal iyonlarının proteaz aktivitesi üzerine etkisi

Metal iyonları	1 mM	5 mM	10 mM
Kontrol	100±0,00	100±0,00	100±0,00
Fe²⁺	91,93 ± 6,007	86,2 ± 9,937	79,69 ± 10,4
Mg²⁺	104,9 ± 8,866	113,1 ± 1,057	91,67 ± 4,043
Ca²⁺	76,04 ± 1,135	76,04 ± 1,135	76,3 ± 3,646
Zn²⁺	94,79 ± 7,165	89,32 ± 1,378	90,63 ± 2,387
Co²⁺	75,52 ± 7,306	49,22 ± 14,66	54,69 ± 13,72
Ni²⁺	81,77 ± 1,135	90,36 ± 3,783	76,04 ± 12,27
Mn²⁺	91,15 ± 3,783	164,1 ± 12,51	237,2 ± 44,07
Li²⁺	83,59 ± 4,303	93,23 ± 11,9	77,6 ± 13,43
K⁺	94,79 ± 1,378	84,38 ± 14,87	70,83 ± 9,73



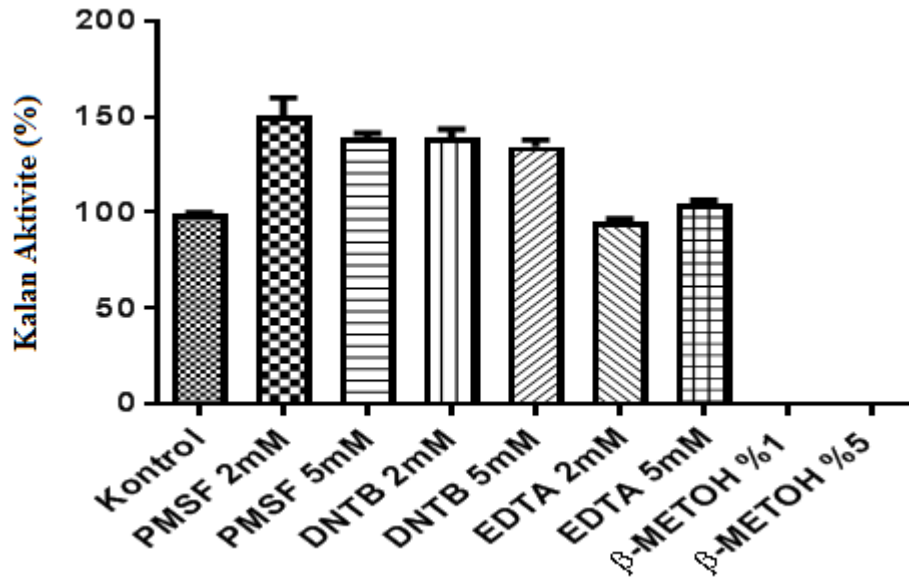
Şekil 4.25. Bazı metal iyonlarının proteaz aktivitesi üzerine etkisi

4.10. Bazı İnhibitörlerin Proteaz Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar

B. licheniformis EA10'dan saflaştırılan proteaz enziminin üzerine inhibisyon ajanlarının etkisinin belirlenmesi amacıyla 2-5 mM'lık konsantrasyonlarında EDTA, PMSF, DNTB ve %1 -5'lik konsantrasyonların β -Merkaptoetanol kullanıldı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.10 ve Şekil 4.26'da verildi. Bu sonuçlara göre, β -Merkaptoetanol 'ün her iki konsantrasyonun da enzimin tamamen inhibe olduğu görüldü.

Çizelge 4.10. *B.licheniformis* EA10'dan elde edilen proteaz enzimi üzerine inhibisyon ajanlarının etkisi

İnhibitörler	2 mM	5 mM
Kontrol	100±0.00	100±0.00
EDTA	94,87 ± 1,849	104,6 ± 1,776
DTNB	39 ± 4,471	134,4 ± 3,59
PMSF	150,8 ± 9,015	139,5 ± 1,849
İnhibitör	%1	%5
β-Merkaptoetanol	0	0



Şekil 4.26. *B.licheniformis* EA10'dan elde edilen proteaz enzimi üzerine inhibitörlerin etkisi

4.11. Bazı Organik Çözücülerin Proteaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar

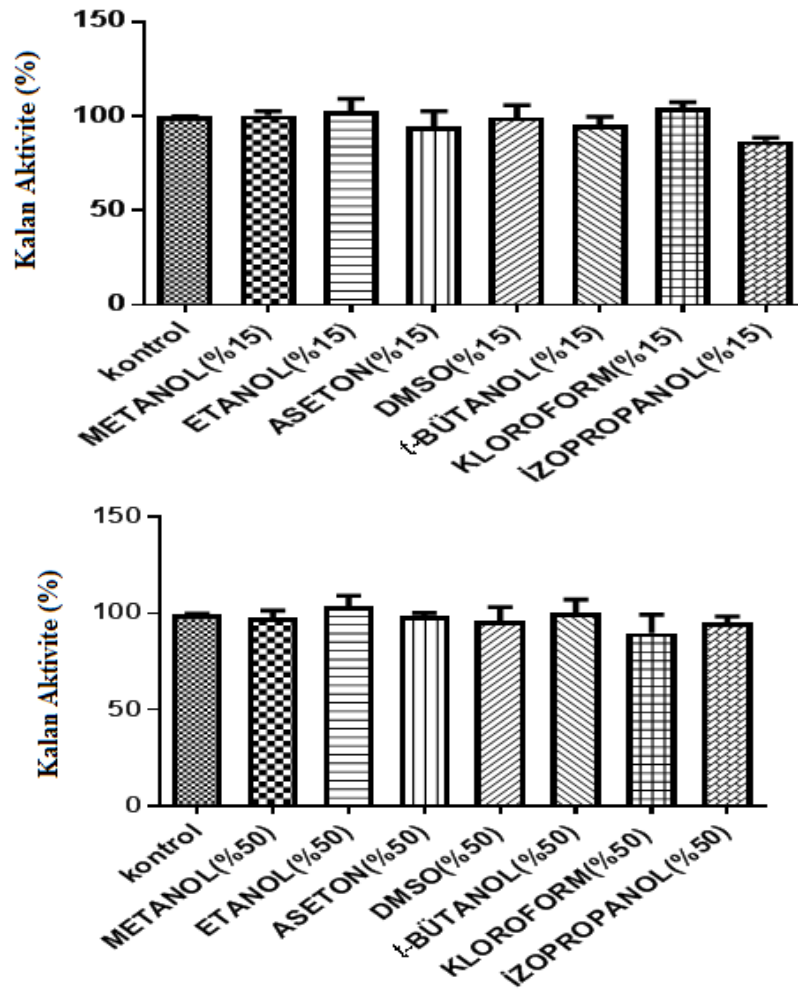
DMSO, kloroform, etanol, metanol, *t*-bütanol, izopropanol ve aseton gibi organik çözücülerin %15-%50'lik konsantrasyonlarda 1 ve 24 saatlik inkübasyon süresinde proteaz enzimi üzerine etkisi araştırıldı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.12 ve Şekil 4.27'de verildi. 1 saatlik inkübasyon süresi sonunda %15'lik konsantrasyonda Kloroform'un enzim aktivitesini arttırdığı, %50'lük konsantrasyonda ise önemli düzeyde olmamakla beraber aktiviteyi azalttığı gözlemlendi. Her iki konsantrasyon değerinde de etanolün aktiviteyi artırıcı bir etkiye sahip olduğu belirlenirken, *t*-bütanolün %50'lik konsantrasyonunda ise enzimin kararlılığını koruduğu tespit edildi. 24 saat inkübasyon süresinin sonunda ise %15'lik konsantrasyonda kloroform varlığında enzim aktivitesinin %25'ini etanol varlığında ise % 8'ini kaybettiği görüldü. Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde kullanılan organik çözücülerinin hemen hemen tümünde 1 ve 24 saat inkübasyon süresi boyunca proteaz enziminin kararlılığını koruduğu görüldü.

Çizelge 4.11. Bazı organik çözücülerin 1 saatlik inkübasyon süresinde proteaz aktivitesi üzerine etkisi

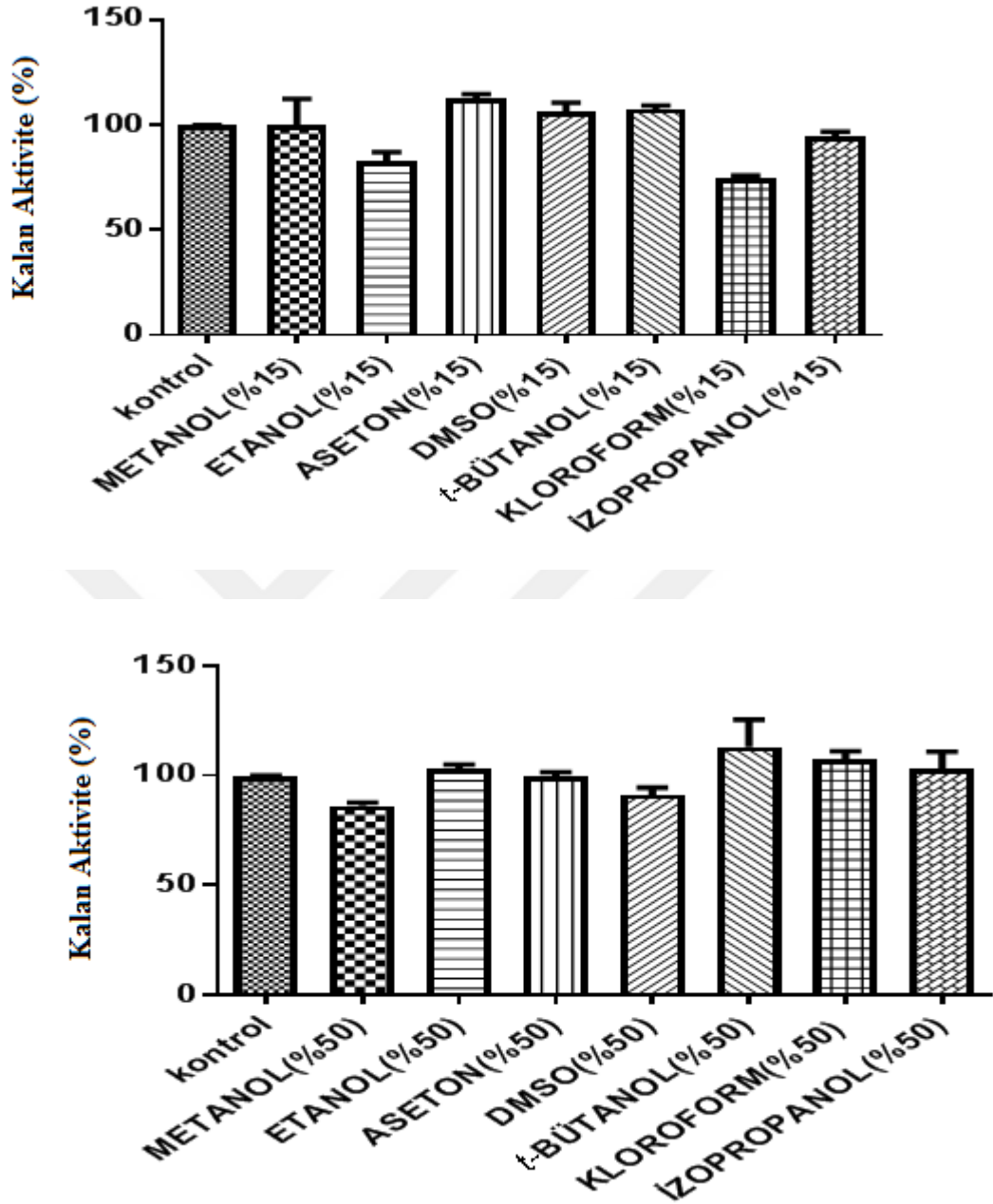
Organik çözücüler	%15	%50
Kontrol	100±0.00	100±0.00
Metanol	100,4 ± 2,137	97,86 ± 3,651
Etanol	102,6 ± 6,579	103,8 ± 5,338
Aseton	94,44 ± 8,254	98,72 ± 1,48
DMSO	99,15 ± 6,716	96,15 ± 7,138
<i>t</i>-Bütanol	95,3 ± 4,209	100 ± 7,138
Kloroform	104,3 ± 2,991	89,74 ± 9,679
İzopropanol	86,75 ± 1,863	95,3 ± 3,082

Çizelge 4.12. Bazı organik çözücülerin 24 saatlik inkübasyon süresinde proteaz aktivitesi üzerine etkisi

Organik çözücüler	%15	%50
Kontrol	100±0.00	100±00
Metanol	100 ± 12,45	86,11 ± 1,604
Etanol	82,41 ± 4,56	102,8 ± 2,122
Aseton	112,5 ± 2,122	99,54 ± 1,852
DMSO	106 ± 4,416	91,2 ± 3,241
Bütanol	107,4 ± 1,669	113 ± 12,43
Kloroform	74,54 ± 1,225	107,4 ± 3,616
İzopropanol	94,44 ± 2,406	103,2 ± 7,62



Şekil 4.27. Proteaz enziminin organik çözücülerdeki 1 saat inkübasyon sonundaki sonuçları



Şekil 4.28. Proteaz enziminin organik çözücülerdeki 24 saat inkübasyon sonundaki sonuçları

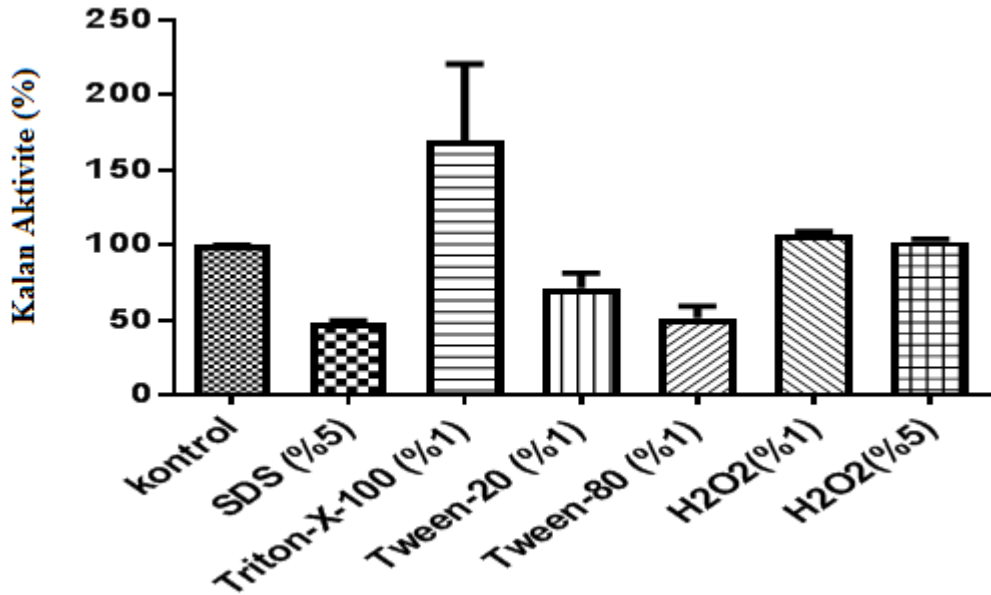
4.12. Proteaz Enziminin Aktivitesi Üzerine Yüzey Aktif Maddelerinin ve Okside Edici Ajanının Etkisinin Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar

B.licheniformis EA10'dan proteaz enziminin üzerine yüzey aktif maddelerin etkisini ve okside edici ajanın etkisini incelemek için %1-5'lik konsantrasyonlarda SDS, Tween-20, Tween-80,

Triton-X-100 ve H₂O₂ kullanıldı. Yapılan deney sonuçları Çizelge 4.14’de verildi. %1’lik konsantrasyonlarda Tween-20, Tween-80 ve %5’lik konsantrasyonda SDS varlığında sırasıyla %28 ve %69, %52 aktivite kaybı gözlemlendi. Ancak Tween-20, Tween-80 ve Triton-X-100 %5’lik konsantrasyonlarında ve SDS’nin %1’lik konsantrasyonda enzimin aktivitesinin tamamen inhibe olduğu görüldü. Okside edici ajan olarak kullanılan H₂O₂ varlığında enzimin aktivitesinin arttığı tespit edildi.

Çizelge 4.13. *B.licheniformis* EA10’dan saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine yüzey aktif maddelerin ve okside edici ajanın etkisi

Yüzey aktif maddeler	%1	%5
Kontrol	100±0.00	100±0.00
Tween-20	71,43 ± 9,91,	0
Tween-80	51,28 ± 7,983	0
Triton-X-100	169,2 ± 51,32	47,99 ± 1,597
SDS	0	
Okside edici ajan	%1	%5
H₂O₂	107 ± 2,039, n=3	102,2 ± 1,679, n=3



Şekil 4.29. *B.licheniformis* EA10’dan saflaştırılan proteaz enzimi üzerine yüzey aktif maddelerin ve okside edici ajanın etkisi

4.13. *B.licheniformis* EA10'dan Saflaştırılan Proteaz Enzimin Doğal Substratlara Olan Özgünlüğün Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar

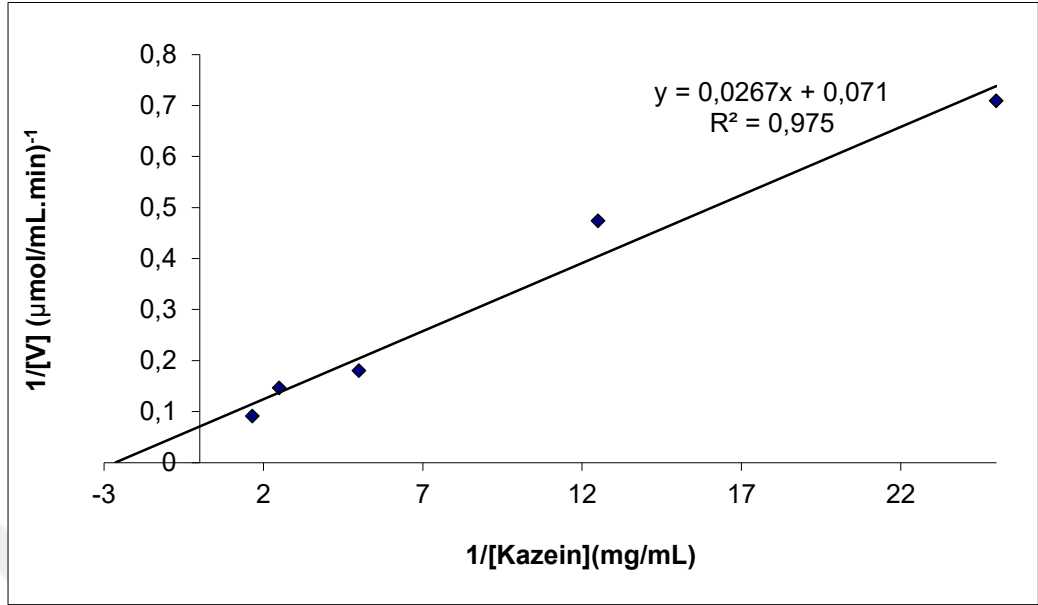
B.licheniformis EA10'dan saflaştırılan proteaz enziminin kazein, azokazein, hemogloblin, jelatin ve sığır serum albümin (BSA) gibi substratlar varlığında aktivitesi incelendi. Enzimin en yüksek aktiviteyi kazein ve jelatin substratlarında gösterdiği belirlendi.

Çizelge 4.14. *B.licheniformis* EA10'dan saflaştırılan proteaz enziminin doğal substratlara varlığında aktivitesi

Doğal substratlar (%0,65 w/v)	Bağlı aktivite %100
Kazein	100
Azokazein	64
BSA	17
Jelatin	106
Hemogloblin	52

4.8. K_M ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar

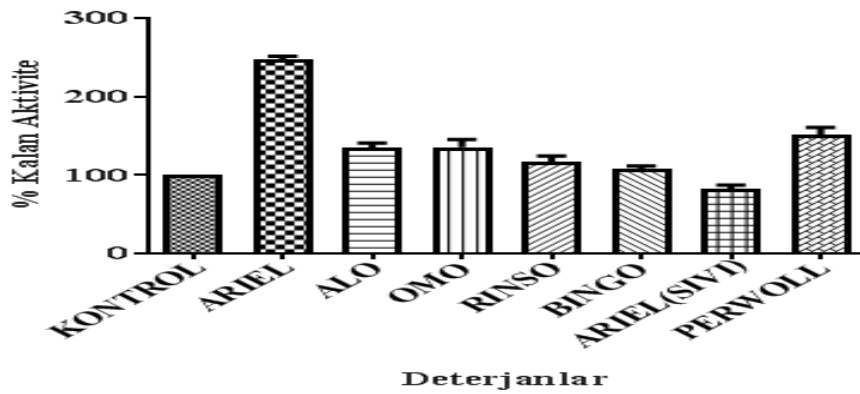
B. licheniformis EA10'dan üçlü faz ayırma yöntemiyle saflaştırılan proteaz enziminin kazein substratı varlığında K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanılarak kazein substratı için K_M 1,48 mg/ml ve V_{max} değeri 15,87 mmol.ml⁻¹.dk⁻¹ ve diğer sonuç olarak tespit edildi. Elde edilen değerler Şekil 4.30'da gösterildi.



Şekil 4.30. Kazein substratı için KM ve Vmax bulunmasına yönelik Lineweaver-Burk grafiği

4.14. *B.licheniformis* EA10'dan Saflaştırılan Proteaz Enzimin Aktivitesi Üzerine Bazı Endüstriyel Deterjanların Etkisinin Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar

B.licheniformis EA10'dan saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesi üzerine bazı ticari olarak satılan deterjanların etkisi yöntemine göre belirlendi. Kullanılan tüm deterjanların , ariyel sıvı deterjanı haricinde enzim aktivitesini artırdığı tespit edildi.



Şekil 4.31. *B.licheniformis* EA10'dan saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesi üzerine bazı ticari olarak satılan deterjanların etkisi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Ekstrem koşullara dayanıklı mikroorganizmalar ile ilgili son yıllarda yapılan birçok çalışmada en çok termofilik mikroorganizmalar grubu dikkat çekmektedir. Sıcak su kaplıcalarından izole edilen termofilik bakterilerin en önemli özelliği ekstrem şartlarda dayanıklı enzimlere sahip olmasıdır ve bu özellikleri ile biyoteknolojik açıdan dikkat çekmektedir. Termofilik mikroorganizmaların enzimleri üzerinde birçok araştırmalar yapılmıştır (Güven 2011).

Endüstriyel enzimlerden olan proteazlar gıda ve deterjan gibi pek çok alanda yaygın olarak kullanıldıkları için endüstride en baskın olan enzimdir. (Gurung ve ark. 2013). Proteazlar, hem fizyolojik hem de ticari alandaki uygulamaları açısından çok önemli bir yere sahip olan, proteinleri hidrolize eden enzimler olarak tanımlanmaktadır. Proteolitik enzimler proteinler arasındaki peptit bağlarının parçalanmasını katalize etmektedirler.

Bu tez çalışması kapsamında; ekstrem koşullara dayanıklı proteaz enzimi üretmek amacıyla Van Çaybağı ve Hasanabdal Kaplıcalarından temin edilen sıcak su örneklerinden toplam 10 adet termofilik bakteri izole edilmiştir. İzolasyon sonrasında yapılan konvensiyonel ve moleküler analizler sonucunda 10 izolat (EA1, EA2, EA4, EA5, EA6, EA7: *Bacillus thermolactis*; EA3, EA9, EA10: *Bacillus licheniformis*; EA8: *Anoxybacillus pushchioensis*) tür düzeyinde tanımlanmıştır. Literatür incelendiğinde Adıgüzel ve ark. (2009)'da aynı kaplıcada (Hasanabdal Kaplıcasından) aldıkları su örneklerinden termofilik bakteri izole ederek, fenotipik ve genotipik yöntemlerle karakterize etmişlerdir. Yaptıkları bu çalışma ile 5 farklı bakteriyel tür (*Geobacillus pallidus*, *Bacillus licheniformis*, *B. pumilus*, *Brevibacillus brevis* ve *Bacillus borstelensis*) elde etmişlerdir.

Yapılan bu çalışmada izole edilen bakterilerin petri denemesi sonucunda 3 suşun proteaz enzim aktivitesi bakımından pozitif olduğu gözlemlenmiş, en yüksek aktiviteyi ise EA10 izolatının verdiği tespit edilmiştir. *B. licheniformis* EA10'dan proteaz

enziminin saflaştırılması TPP yöntemiyle ilk kez bu çalışmada uygulanmış ve bunun için tuz, organik çözen ve pH optimizasyonu yapılmıştır. Alkalın proteaz enzimi pH 6,0'da, 1,0:0,5 (ham enzim çözeltisi:t-bütanol oranı) ve %70 doygun amonyum sülfat kullanılarak uygulanan TPP sistemi ile %191,6 verimle 54,1 kat saflaştırılmıştır. Literatürdeki çalışmalara bakıldığında Gagaoua M, (2014) incir ağacı kauçuk sütünden izole ettiği fisin enzimini üçlü faz ayırma yönteminde %40 amonyum sülfat varlığında ve 1,0:1,075 t-bütanol kullanarak pH'sı 6,5 'da ara fazda %167 verimle 6,04 kat saflaştırmıştır. Chaiwuta *et al.* (2010) kuru papaya yapraklarından papini %40 amonyum sülfat, 1,0:0,5 alkol oranı ve pH:7,0 koşullarında %253 verimle alt fazda 15,8 kat saflaştırmıştır. Rawdkuen (2010) ipek otundan izole ettiği proteaz enzimini %65 amonyum sülfat, 1,0:0,5 oranında t-bütanol değerleriyle %132 verimle 6,92 kat saflaştırmış ve enzimin alt fazda kaldığını bildirmiştir. Ketnawa *et al.* balık iç organlarından izole ettiği alkalın proteazı %50 amonyum sülfat, 1,0:0,5 t-bütanol oranı ve pH:8,0 koşullarında üçlü faz ayırma yöntemiyle %154 verimle geri kazanmıştır. Literatür ile karşılaştırıldığında *B. licheniformis* EA10 suşundan saflaştırılan proteaz enzimin TPP prosesiyle yüksek saflıkta ve yüksek verimle elde edildiği görülmektedir. Bununla birlikte literatür incelendiğinde bu yöntem kullanılarak enzimler yüksek verimle saflaştırılabilmiş ancak saflaştırma katsayısı 54,6 değerinde olan sonuca rastlanmamıştır.

B. licheniformis EA10 suşundan saflaştırılan proteaz enzimin saflığı ve üçlü faza ayırma yönteminde enzimin alt fazda kaldığı SDS-PAGE analizinde tek bant ile teyit edilmiştir. Saflaştırılan proteazın molekül kütlesi 37,67 kDa olarak belirlenmiştir. Subtilisinlerin molekül kütleleri 20-45 kDa, serin proteazların ise molekül kütleleri 18-35 kDa arasında değişmektedir (Yıldırım 2014). Literatürdeki çalışmalara bakıldığında bu değerlerden farklı sonuçlar görmek mümkündür. SDS-PAGE yöntemini kullanarak molekül kütlelerini belirlemeye yönelik yapılan benzer çalışmalarda Jaouadi *et al.* (2008) 34 kDa, Heidari *et al.* (2008) 36 kDa, Kandasamy *et al.* (2011) 36 kDa, Jayakumar *et al.* (2012)'de 36 kDa ve Joshi and Satyaranarayana (2012) 39 kDa'luk proteazlar elde etmişlerdir. Embaby *et al.* (2016), *B. licheniformis* SHG10 DSM 28096 suşundan izole ettikleri enzimin moleküler ağırlığını 30,4 kDa; Öztürk (2007) ise Van Gölünden izole

ettiği *B. licheniformis* BA-17'den saflaştırılan alkalen proteazın molekül ağırlığının 19,7 kDa olarak tespit etmişlerdir.

B. licheniformis EA10 suşundan saflaştırılan proteaz enzimin karakteristik özelliklerini belirlemek amacıyla pH ve sıcaklık profili incelenmiştir. Endüstriyel açıdan önemli enzimlerin yüksek pH stabilitesi göstermesi ve yüksek sıcaklıklarda kararlı kalabilmesi istenen önemli özelliklerdendir. *B. licheniformis* EA10 suşundan saflaştırılan proteaz enzimi için optimum pH 9,5 olarak belirlenmiştir. Bu sonuç bize enzimin alkalın proteaz olduğunu göstermektedir. Nadeem *et al.* (2013), *Bacillus licheniformis* UV-9 suşundan optimum pH'sı 11,0 olan serin proteaz izole etmişlerdir. Jaouadi *et al.* (2009), *Bacillus pumilis* CBS kaynaklı enzimin optimum pH'sını 10,6 olarak kaydetmiştir. Toplak *et al.* (2013), *Coprothermobacter proteolyticus* türünden pH 8,0 olan proteolisin saflaştırmıştır. Dib *et al.* (1998) *Pyrococcus abyssi* 549 suşundan saflaştırdığı enzimin optimum pH'sını 9,0 olarak kaydetmişlerdir. *B. licheniformis* EA10 suşundan saflaştırılan proteaz enzimin optimum pH değeri literatürdeki verilerle uyumludur. Enzimin alkali pH'larda yüksek aktivite göstermesi enzimi deterjan endüstrisinde önemli kılar.

B. licheniformis EA10 suşundan saflaştırılan proteaz enziminin sıcaklık profili incelendi ve optimum sıcaklık 80°C olarak belirlendi. Literatür çalışmalarına bakıldığında; Toplak *et al.* (2013), *Coprothermobacter proteolyticus* türünden izole ettiği enzimin optimum sıcaklığını 85 °C, Freidrich *and* antranikian (1996) *Fervidobacterium pennivorans* türünden izole ettiği enzimin optimum sıcaklığını 80°C, Roncari *et al.* (1976), *Bacillus stearothermophilus* türünden izole ettiklerin metallo proteaz enziminin optimum sıcaklığını 80 °C, Matsuzawa *et al.* (1988) *Thermus aquaticus* T-351 suşundan izole ettikleri enzimin optimum sıcaklığını 80 °C olarak belirlemişlerdir. Literatürdeki bu çalışmalarda belirlenen optimum sıcaklık değerleri, saflaştırdığımız enzimin optimum sıcaklık değeri ile örtüşmektedir.

B. licheniformis EA10 suşundan saflaştırılan proteaz enziminin sıcaklık kararlılığını belirlemek için 20-90°C sıcaklık aralığında 30, 60, 90, ve 120. dakikalarda aktivite

ölçümü yapılarak belirlenmiştir. Enzimin sıcaklık kararlılığına bakıldığında tüm sıcaklıklarda inkübasyon süresinin enzimin aktivitesinde arttırıcı etki gösterdi. Yapılan literatür çalışması sonucunda; Nadeem *et al.* (2013), *B. licheniformis* UV-9 suşundan 70 °C 'de 30 dakika kararlılığını koruyabilen proteaz enzimi izole ettiklerini bildirmişlerdir. Jaouadi *et al.* (2009), *B. pumilis* CBS kaynaklı enzimin stabil sıcaklığını 80 dk'lık inkübasyon süresi için 60 °C olarak kaydetmişlerdir. Toplak *et al.* (2013), *Coprothermobacter proteolyticus* türünden saflaştırdığı proteaz enzimi 80 °C iki saatlik inkübasyon süresi boyunca aktivitesini korumuştur bu da bizim çalışmamızla örtüşmektedir. Heidari *et al.* (2008) saflaştırdıkları enzimin 60 °C üstünde aktivitesini kaybettiğini bildirmişlerdir. Annamalai *et al.* (2012)'de *B. halodurans* CAS6'dan elde ettikleri proteaz enzimin 1 saatlik inkübasyon sonucunda 70 °C'de %100, 80 °C'de %83 ve 95 °C'de %40 aktiviteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir. *B. licheniformis* EA10 suşundan saflaştırılan proteaz enziminin iki saatlik inkübasyon süresi sonunda 50 °C'de kararlılığını %110,58 korurken; 70 °C'de %117,94, 80 °C'de %119,63, 90 °C'de ise %119,16 koruduğu kaydedilmiştir. Tüm bu sonuçlar, *B. licheniformis* EA10 suşundan saflaştırılan proteaz enziminin sıcaklığa karşı uzun süre oldukça yüksek seviyede bir kararlılık sergilediğini göstermektedir ve literatürdeki diğer çalışmalar ile karşılaştırıldığında sıcaklığa toleransının oldukça fazla olduğu açıktır. *B. licheniformis* EA10 suşundan saflaştırılan proteaz enziminin yüksek sıcaklıklarda uzun süreli kararlı kalabilmesi bu enzimin endüstriyel açıdan oldukça önemli bir enzim olduğunu göstermektedir.

Metal iyonları proteaz üretiminde karakterize edilmesi gereken önemli bir parametredir. Büyüme ortamına eklenen bazı metal iyonları mikroorganizmanın büyümesini ve daha yüksek verimde enzim üretimini sağlamaktadır. *B. licheniformis* EA10 suşundan saflaştırılan proteaz enzimine metal iyonlarının etkisi incelendiğinde Mn^{2+} metalinin 1mM konsantrasyonunda enzimin aktivitesini korurken 5 ve 10 mM'lık konsantrasyonda ise enzimin aktivitesini artırdığı tespit edilmiştir. Mg^{2+} metal iyonunun 1 ve 5 mM'lık konsantrasyonlarda enzimi aktive ettiği 10 mM'lık konsantrasyonda ise enzimin aktivitesini %91 oranında koruduğu belirlenmiştir. Co^{+2} metalinin 5 mM'lık konsantrasyonun enzimin aktivitesini %51 oranda azalttığı gözlemlendi. Metal

iyonlarının proteaz enzimi üzerine etkisi incelendiğinde Ca^{2+} ve Co^{2+} iyonları dışında denenen diğer tüm iyon varlığında aktivitesini koruduğu görülmüştür. Yapılan çalışmalar incelendiğinde Siriporn ve ark. *B. megaterium*'dan saflaştırılan alkalın proteazın aktivitesinin Mn^{2+} , Ca^{2+} ve Mg^{2+} varlığında artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Yılmaz ve ark. (2015) yapmış oldukları bir çalışmada *B. licheniformis*'ten saflaştırdıkları termostabil alkalın proteazın aktivitesinin Mg^{2+} , Mn^{2+} , K^+ metal iyonlarının varlığında arttığını bildirmişlerdir. Fe^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} ve Ag^+ metal iyonlarının enzim aktivitesini düşürdüğü ve Ca^{2+} iyonu varlığında proteaz enziminin kararlılığını koruduğu tespit edildi. Sonuç (2011) *B. subtilis*'ten saflaştırdığı enzimin Mg^{+2} ve Mn^{+2} metal iyonları varlığında aktivitesinin arttığını bildirmiştir. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde; Ca^{+2} , Mg^{+2} ve Mn^{+2} metallerinin varlığında enzimin aktive olduğunu, Rao *et al.* (2008)'de, Divakar *et al.* (2010)'da, Annamalai *et al.* (2012)'de yaptıkları çalışmalarda göstermişlerdir. Literatürün aksine *B.licheniformis* EA10 dan izole edilen enzimin Ca^{+2} iyonu varlığında aktivitesini %24 oranında kaybettiği tespit edilmiştir.

B. licheniformis EA10 suşundan saflaştırılan proteaz enzim aktivitesi üzerine bazı inhibitörlerin etkisinin belirlenmesi amacıyla; serin spesifik inhibitörü olan PMSF; SH-grubu inhibitörü olan β -merkaptetanol; sistein spesifik inhibitörü ve sülfidril oksidasyon ajanı olan DTNB kullanıldı (Ölmez 2017). Elde edilen veriler sonucunda yalnızca β -merkaptetanol varlığında proteaz enziminin inhibe olduğu görüldü. Yapılan literatür taramasında serin alkalın proteazın PMSF varlığında tamamen inhibe olduğu görülürken bu tez çalışmasında proteaz enziminin PMSF'den etkilenmediği hatta aktivitesinin arttığı gözlemlendi. Ancak *B. licheniformis* EA10 suşundan izole edilen proteaz enziminin gösterdiği diğer özelliklerinden göz önünde bulundurularak alkalın serin proteaz olabileceği düşünülmektedir. Yapılan literatür taramasında Gessesse *et al.* (2003) yapmış oldukları çalışmalarında *Nesternkonio sp.*Al-20 suşundan izole ettikleri proteaz enziminin PMSF inhibitörünün 1-10 mM konsantrasyonlarında 1 saat muamele sonucu aktivitesinin 1mM konsantrasyonda kararlı kaldığı; 10 mM konsantrasyonda ise aktivitesinin %108 arttığını bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada *Nesternkonio sp.*Al-20 suşundan izole edilen proteaz enzimi bir diğer serin proteaz

inhibitörü olan 3,4- diklorokomarin ile muamele etmiş ve enzimin bu inhibitörde aktivitesini %70 oranında kaybetmesi sonucunda enzimin serin proteaz olduğunu idda etmişlerdir. Bu çalışma sonucuna bakılarak *B. licheniformis* EA10 suşundan izole edilen proteaz enziminin PMSF'den etkilenmeyen bir alkalın proteaz enzim olabileceği düşünülmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında *B. licheniformis* EA10 suşundan saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkisi incelendiğinde enzimin organik çözücülerde önemli derecede kararlılık gösterdiği tespit edilmiştir. Enzimin 1 saatlik inkübasyon süresi sonunda; %15'lik konsantrasyon etanol çözeltisinde %102, aseton çözeltisinde %94, DMSO çözeltisinde %99, *t*-bütanol çözeltisinde %95, kloroform çözeltisinde %104 ve izopropanol çözeltisinde %86 oranında aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. %15'lik konsantrasyonlarda 24 saat sonunda metanol, etanol, aseton, DMSO, bütanol, kloroform varlığında sırasıyla %100, %82, %112, %106, %107, %74, %94 oranında enzim aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. %50'lik konsantrasyonlarda belirtilen organik çözücülerde 24 saat sonunda metanol, etanol, aseton, DMSO, bütanol, kloroform varlığında sırasıyla %86, %102, %99, %91, %113, %107, %103 oranında enzim aktivitesini koruduğu tespit edildi. Bu sonuçlara bakıldığında *B. licheniformis* EA10 suşundan izole edilen proteaz enziminin solvent tolerant enzim olabileceğini desteklemektedir. Ibrahim ve ark. *Bacillus pumilus* TMS55 tarafından üretilen alkalın proteazın %25'lik benzen heksan ve toluen gibi organik çözücüler varlığında kararlılıklarının koruduğunu bildirmişlerdir. Laura Dipasquale ve ark. *Bacillus thermantarcticus* M1'den saflaştırılan proteaz enziminin DMSO, metanol, etanol, asetonitril, izopropanol mevcudiyetinde bir hafta boyunca kararlı olduğu bulunmuştur. Literatürde Rai and Mukherjee (2008)'de yaptığı çalışmada *B. subtilis* strain DM-04'dan izole ettikleri proteaz enziminin aktivitesi üzerine %20'lik organik çözücülerin etkisini incelemiş ve izopropanol, etanol ve metanolde sırasıyla %102, %97 ve %105 aktivitesini koruduğunu bildirmişlerdir. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde Yıldırım (2014) *A. pallidus* C10'dan elde ettiği proteaz enziminin organik çözücüler varlığında yüksek konsantrasyonda ve uzun süreli inkübasyon sürelerinde kararlılığını koruduğu tespit edilmiştir. Bu tez kapsamında elde ettiğimiz

proteaz enzimi endüstriyel proseslerdeki uygulamalar için oldukça güçlü bir aday olduğu söylenebilir.

B. licheniformis EA10'dan proteaz enziminin üzerine yüzey aktif maddelerin etkisini ve okside edici ajanın etkisini incelemek için %1-5'lik konsantrasyonlarda SDS, Tween-20, Tween-80, Triton-X-100 ve H₂O₂ kullanılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda %1'lik Tween-20 ve Tween-80 varlığında enzim aktivitesini sırasıyla %71 ve %51 oranlarında koruduğu ve Triton-X-100 yüzey aktif maddesinin enzim aktivitesini artırıcı etki gösterdiği (%169) kaydedilmiştir. SDS'in %1'lik konsantrasyonunda enzim tamamen aktivitesini kaybederken %5'lik konsantrasyonda enzim aktivitesini %47 oranında muhafaza ettiği kaydedildi. %5'lik Tween-20, Tween-80 ve Triton-X-100 varlığında ise enzim aktivitesini tamamen kaybettiği tespit edilmiştir. Enzimin okside edici ajan H₂O₂ varlığında ise kararlılığını %1'lik konsantrasyonunda %107 ve %5'lik konsantrasyonunda %102 oranında koruduğu tespit edilmiştir. Literatür incelendiğinde Muhammad Nadeem ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada, Mutant suşu *B. licheniformis* UV-9 tarafından üretilen alkalın proteaz saflaştırılmış ve saflaştırılan enzim, Tween-20, Tween-45, Tween-65 ve Triton X-45 gibi çeşitli yüzey aktif maddelere karşı aşırı kararlılık göstermiştir. Buna ek olarak, oksitleyici maddeler, H₂O₂ ve sodyum perborat varlığında %100'den fazla aktivite gösterdiği kaydedilmiştir. Bu biyokimyasal özellikler *B. licheniformis* UV-9 'dan üretilen enzimin çamaşır deterjanları olarak potansiyel kullanımının olduğu yorumuna varmışlardır. *B. licheniformis* EA10'dan izole edilen proteaz enziminin yüzey aktif ajanlar varlığında aktivitesini koruyamadığı ancak oksitleyici madde olan H₂ O₂ varlığında aktivitesini önemli ölçüde koruduğu kaydedilmiştir. Enzimin bu özelliği göz önünde bulundurularak birçok endüstriyel alanda cazip bir tercih olduğu düşünülmektedir.

B. licheniformis EA10'dan saflaştırılan proteaz enziminin doğal substratlara olan spesifitesini belirlemek amacıyla %0,65'lik (w/v) BSA, kazein, azokazein, jelatin ve hemoglobin doğal substratların kullanılmasıyla yapılan aktivite ölçümleri sonucunda enziminin en iyi kazein ve jelatin varlığında aktivite gösterdiği tespit edildi. Enzimin diğer substratların karşısında spesifitesi sırasıyla azokazein (%64), BSA (%17) ve

hemoglobinin (%52) olarak belirlendi. Jaouadi *et al.* (2008)'de *B. pumilus* CBS 'den izole ettikleri proteazın doğal substratlara ilgisini sırasıyla BSA (%52), jelatin (%95), azokazein (%80), kazein (%100) olarak bildirmişlerdir. Divakar *et al.* (2010)'da *Aeromonas veronii* PG01'den izole ettikleri proteaz enzimi için substrat spesifitesini kazein %100, jelatin %83 ve BSA %45 olarak tespit etmişlerdir. Jayakumar *et al.* (2012) *B. pumilus* MCAS8'den proteaz enziminin kazeine (%100), jelatine (%84), hemoglobine (%71), BSA (%55) ve azokazeine (%40) şeklinde spesifite gösterdiğini belirlemişlerdir. Sarı *ve ark.* (2015) yapmış oldukları bir çalışmada kazein %100 keratin %11 ovalbumin %82, jelatin %68 ve BSA'da %41 oranında aktivite gösterdiği bildirildi. Bu sonuçlar bu tez kapsamında yapılan çalışmayla örtüşmektedir.

Bu tez çalışmasında *B. licheniformis* EA10 suşundan saflaştırılan proteaz enzimi için kazein varlığında kinetik parametreleri K_M ve V_{max} değerleri Lineweaver-burk grafiği kullanılarak sırasıyla 0,376 mg/ml ve 14,085 $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{dk}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Öztürk (2007), yapmış olduğu bir çalışmada *B. licheniformis* BA17'den saflaştırdığı alkalın proteazın K_M ve V_{max} değerlerini sırasıyla 0,209 mg/mL ve 5,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{dk}^{-1}$ ve Sarı (2011), *B. circulans* M34'ten saflaştırdığı enzimin K_M değerini 0,96 mg/mL ve V_{max} değerini ise 9,548 $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{dk}^{-1}$ olarak hesapladığı görülmüştür.

Yapılan bu tez çalışmasında *B. licheniformis* EA10'dan saflaştırılan proteaz enzimi üzerine ticari olarak satılan sıvı ve katı deterjanların etkisi incelenmiştir. Bunun için Ariel, Alo, Omo, Rinso, Bingo markalı katı deterjanlar ve Ariyel sıvı ve Perwol markalı sıvı deterjanlar kullanılmıştır. Enzim aktivitesinin'de ariel sıvı deterjan haricinde diğer tüm deterjanlarda kararlılığını koruduğu kaydedilmiştir. Bununla birlikte enzim aktivitesinin ariel katı deterjan varlığında önemli artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Bu çalışmada elde edilen veriler sonucunda; *B. licheniformis* EA10 suşundan izole edilen proteaz enziminin organik çözücüler varlığında dayanıklı, alkalın ve termostabil özelliklere sahip olduğu görülmektedir. Günümüzde endüstriyel uygulamalarda kullanımı için alkalın termostabil proteazların kolay ve düşük maliyetle

saflaştırılabilme, yüksek ısıl kararlılık gösterebilme ve aktivitenin pH'dan etkilenmemesi gibi özelliklere sahip olması beklenmektedir.

Bu tez kapsamında *B. licheniformis* EA10'dan proteaz enziminin üçlü faz ayırma sistemi (TPP) ile saflaştırılması literatürde ilk olma niteliğindedir. TPP sisteminde; tuz, organik çözügen ve pH optimizasyonu yapıldı ve pH 6,0'da, 1,0:0,5 (ham enzim çözeltisi:t-bütanol oranı) ve %70 doymuş amonyum sülfat kullanılarak uygulanan TPP sistemi sonucunda %191,6 verimle 54,1 kat saflaştırılmıştır. Enzimin saflaştırma katsayısı diğer proteaz çalışmalarından daha yüksek bulunmuştur. Saflaştırma sürecinin özellikle yüksek saflıkta enzim elde edilebilmesi, hızlı, ucuz ve tek basamakta yapılabilir olması bu sistemin potansiyelini endüstriyel ölçekteki enzim saflaştırma uygulamaları için yüksek tutmaktadır.

Literatürde proteaz enzimi yüksek sıcaklık aktivitesi ve stabilitesiyle özellikle deterjan endüstrisi başta olmak üzere yüksek sıcaklık toleransına ihtiyaç duyulan bütün endüstriyel alanlar için uygun bir enzim olarak düşünülmektedir. Özellikle alkalın, termostabil ve yüzey aktif ajanlara dayanıklı enzimler, deterjan formülasyonunda öncelikli bir yere sahiptir. Sonuç olarak *B. licheniformis* EA10 proteaz enziminin sahip olduğu biyokimyasal özellikleri ile endüstriyel alanlarda kullanım için iyi bir potansiyele sahip olduğu ve ekonomik açıdan değerlendirilebilir özellikte olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKÇA

- Acar, D.Ö., Üreaz Enziminin Ca-Alginat Üzerine İmmobilizasyon Kosullarının İncelenmesi, Adnan Menderes Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Adıgüzel, A., 2001. Erzuruma bağlı bazı köylerden toplanan süt örneklerinde brucella abortus antikorlarının ELISA ile araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Adıgüzel, A., 2006. Bazı Termal Tesislerden Alınan Su Örneklerinden Ėzole Edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Adıgüzel, A., Inan, K., Sahin, F., Arasođlu, T., Gulluce, M., Belduz, A.O., Baris, O., 2011. Molecular diversity of thermophilic bacteria isolated from Pasinler hot spring (Erzurum, Turkey). Turk J Biol, 35, 267-274.
- Adıgüzel, A., Ozkan, H., Baris, O., Inan, K., Gulluce, M., Sahin, F., 2009. Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot springs in Turkey. J Microbiol Methods, 79, 321-328.
- Adıgüzel, G., Gulluce, M., Bozoglu, C., Yanmis, D., Gormez, A., Atasever, M., Adıgüzel, A., 2012. Molecular Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from retail beef in Erzurum, Turkey. Journal of Pure and Applied Microbiology, 6(3), 1033-1041.
- Adiyanaraya, K., Babi Raju K.V.V.S.N., Ellaiyah P., 2004. Investigations on Alkaline Protease Production With *B.Subtilis* PE-11 İmmobilized in Calcium Alginate Gel Beads. Process Biochemistry No:1331-1339.
- Aehle, W., 2004. Enzymes in Industry Production and Application. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 484s.
- Ahmetoğlu, N. Haziran 2011 *Bacillus cereus* KG5' in proteaz enzimi üzerine çalışmalar. Yüksek Lisans Tezi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Diyarbakır.
- Alphan, L.G. 2008. Bazı Exstrem Termofil Anaerobik Bakterilerin Alkali Proteazlarının Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Fakültesi, Ankara.
- Anbu, P., 2013. Characterization of solvent stable extracellular protease from *B. koreensis* (BK-P21A). International Journal of Biological Macromolecules, 56 (2013), 162– 168
- Annamalai, N., Rajeswari, M.V., Thavasi, R., Vijayalakshmi, S., Balasubramanian, T., 2012. Optimization, purification and characterization of novel thermostable, haloalkaline, solvent stable protease from *B. halodurans* CAS6 using marine shellfish wastes: a potential additive for detergent and antioxidant synthesis. Bioprocess Biosyst Eng, (2013) 36, 873–883.
- Annelie, S., Kenia, W., Frank, S., and Karen, J.. 2002 Limnol. Oceanogr., by the American Society of Limnology and Oceanography, Inc. Microbial glucose uptake and growth along a horizontal nutrient gradient in the North Pacific. 47(6), 1676–1683 .

- Arslan, A., 2014, Removal of Some Textile Dyes from Aqueous Solution by Using A Catalase-Peroxidase from *Aeribacillus Pallidus* P 26, Journal of Pure and Applied Microbiology. No: 2629-2640.
- Arslan, S., 2017. Türkiye'nin Farklı Yörelerinden Toplanan Beyaz Peynir Örneklerinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Ası, T., 1996. Tablolarla Biyokimya, Tayf Ofset, 71-116.
- Atav, R., Karaboğa S.E., 2017., Proteazlarla Enzimatik Modifikasyon Yoluyla İpek Liflerinin Boyanabilirliğinin Geliştirilmesi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, No: 015301- 138-146.
- Ateş, Ö., Öner E.T., Arıkan B., Denizci A.A., Kazan D., 2007. Isolation and İdentification of Alkaline Protease Producer Halotolerant *Bacillus licheniformis* strain BA17. Annals of Microbiology No:57 ,3, 369-375.
- Ayhan, K. 2000. Gıdalarda Bulunan Mikroorganizmalar, Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölüm Yayını, 43-44. Sim Matbaacılık Ltd. Ankara.
- Baltacı, O., Genç, B., Arslan, S., Adiguzel, A. 2016. "Isolation, characterization of thermophilic bacteria from geothermal areas in Turkey and preliminary." Research an biotechnological enzyme potential 10.1080/01490451.2015.1137662.
- Bamforth, C.W., 2003. Barley and Malt Starch in Brewing: A General Review. MBAA TQ Vol. 40, No. 2, pp. 89-97.
- Bayraktar, H. 2011.α-Galaktozidaz Enziminin Üçlü Faz Sistemi ile Saflaştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Bornova - İzmir
- Bender, H., 1993. Purification and characterization of a cyclodextrin-degrading enzyme from *Flavobacterium* sp., Appl. Microbiol. Biotechnol., 39, 714-719. Jaouadi B., 2016. İnternational Journal of Biological Macromolecules. No:961-972.
- Benmrad, M.O., Moujehed E., Elhoul M.B., Jaouadi N.Z., Mechri S., Rekik H., Kourdali S., Hattab A.B., Badis A., Sayadi S., Bejar S.,
- Bertoldo, C., and Antranikian, G., 2002. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. Current Opinion in Chemical Biology., 6, 151-160.
- Bıçak, Ö., Ekmekçi, Z., 2005. Polisakkaritlerin Flotasyonda Bastırıcı Olarak Kullanımı ve Soğurum Mekanizmaları. Madencilik. Cilt 44, Sayı 1, Sayfa 19-31.
- Bollag, D.M., Rozycki, M.D., Edelstein, S.J., 1996. Protein Methods (2nd Edt). Viley-Liss Press, USA. 414s.
- Boyer, F.W., Ingle, M.B., and Mercer, G.D. 1972. Starch. 31:66-71
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-54.
- Çerçi, B., Koçyiğit A., Karaboz İ.,2011. Gıdaların İşlenmesinde Kullanılan Enzimlerin Rekombinant DNA Teknolojisi ile Üretimi, Sayı:3 Sayfa: 1-7.
- Çetinkaya, E., 2011. Gıdalardan izole edilen *Enterobacter* sp. ve *Cronobacter sakazakii* suşlarının biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle tanımlanması. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 88s.(Basılmamış).

- Chatterjee, S., 2015. Production and Estimation of Alkaline Protease by Immobilized *Bacillus Licheniformis* Isolated from Poultry Farm Soil of 24 Parganas and its Reusability. Original Article. 197.27.49.142.
- Cho SA, Cho JC, Han SH (2007) Cosmetic composition containing enzyme and amino acid. Amorepacific Corporation. No. 11/990,431.
- Cowan, D., 1996. Industrial enzyme technology, TIBTECH, No. 14, 177-178.
- Cowan, D.A., 1997. Thermophilic Proteins: Stability and function in aqueous and organic Solvents. Comp. Biochem., Physiol. Vol. 118A, No:3,429-438.
- Crabb, W.D., Mitchinson, C., 1997, Enzymes involved in the processing of starch to sugars, Trends Biotechnology, No. 15, 349-352.
- Datta, S., Christena L.R., Rajaram Y.R.S., 2013. Enzyme Immobilization: An Overview on Techniques and support Materials. 3 Biotech No:3:1-9.
- Demain, A.L., and Solomon, N.A., 1981. In Industrial Microbiology.
- Deshpande, V.V., Rao, M., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiology and Molecular Biology Reviews, Vol. 62, No.3, p. 597-635.
- Dhillon KS, Dhillon SK (2014) Development and mapping of seleniferous soils in northwestern India. Chemosphere 99:56-63.
- Dib, R., Chobert, J.M., Dalgarrondo, M., Barbier, G. and Haertle, T. 1998. Purification, molecular properties and specificity of a thermoactive and thermostable proteinase from *Pyrococcus abyssi*, strain st 549, hyperthermophilic archaea from deep-sea hydrothermal ecosystem. Federation of European Biochemical Societies, 431:279-284.
- Divakar, K., Priya, J.D.A., Gautam, P., 2010. Purification and characterization of thermostable organic solvent-stable protease from *Aeromonas veronii* PG01. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 66, 311–318.
- Eichler, J., 2001. Biotechnological uses of archaeal extramozyme. Biotechnology Advances, 19: 261-278.
- Elleuche, S., Schafers C., Blank S., Schroder C., Garabed A., 2015., Exploration of extremophiles for High Temperature biotechnological Processes. Current Opinlon in Microbiology, No:1369-5274.
- Elleuche, S., Schröder C., Sahm K., Antranikian G., 2014, Extremozymes- Biocatalysts With Unique Properties from Extremophilic Microorganisms. Current Opinion in Biotechnology. 116-123.
- Embaby, E.M. , Ayaat, N.M., Abd El-Galil, M.M., Abdel-Hameid, N. Allah, M. M. Gouda. Middle East J. Appl. Sci. (2015), Mycoflora and mycotoxin contaminated chicken and fish feeds: pp. 1044-1054.
- Embaby, M.A., Saeed H., Hussein A., 2016. SHG 10 Keranalytic Alcaline Protease from *Bacillus Licheniformis* SHG 10 DSM 28096: Robust Stability and Unusual Non- Cumbersome Purification. Journal of Basic Microbiology 1317-1330.
- Ercan, S, Giresi, PG, Whittle, C.M., Zhang, X., Green, R.D., Lieb, J.D. 2007 Mar. X chromosome repression by localization of the *C. elegans* dosage compensation machinery to sites of transcription initiation. 39(3):403-8.
- Erich, H., 1975. Chromatography, A laboratory Handbook of Chromatographic and Electrophoretic Methods. Van Reinhold Comp., New York. 968s.
- Everly, C., and Alberto, J., 2000. Stressors, stress and survival: overview. Front. Biosci. 5, 780–786.

- Fontana, J.D., Gebara, M., Blumel, M., Schineider, H., Mackenzie, C.R., Fohnson, K.G., 1988. α -4-O-methyl-D-glucuronidase component of xylanolytic complexes. *Methods Enzymol.* 160: 560-571.
- Friedrich, A. and Antranikian, G. 1996. Keratin degradation by *Fervidobacterium pennavorans*, a novel thermophilic anaerobic species of the order Thermotogales. *Appl Environ Microbiol*, 62:2875-2882.
- Fujiwara, S., 2002. Extremophiles: Developments of their special functions and potential resource. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94(6): 518-525.
- Gagaoua, M., Hafid, K.J. 2016. Three Phase Partitioning System, an Emerging Non-Chromatographic Tool for Proteolytic Enzymes Recovery and Purification. 5(1):2090-4967
- Garrity, G.M., Holt, J.G., 2001. The road map to the manual, p. 119–166. In G. M. Garrity (ed), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer-Verlag, New York, N.Y.
- Gazel, N., 2016, Ditiyenopirol (DIP) Tip İletken Polimerleri Kullanarak Özgün Kolesterol Biyosensörlerin Yapımı, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Konya.
- Gessesse, A., Hatti-Kaul R., Gashe B.A., Mattiasson B. 2003. Novel Alkaline Proteases from Alkaliphilic Bacteria Grown on Chicken Feather. *Enzyme and Microbial Technolohy* No:519-524.
- Gheorghiu Alpan, L. 2008. Bazı Ekstrem Termofil Anaerobik Bakterilerin Alkali Proteazlarının Özelliklerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Sayfa: 5-13.
- Göksungur, Y., and Güvenç, U., 2002. Kalsiyum Aljinatta Hücre Gömmobilizasyonu ve biyoteknolojideki Uygulamaları. *Gıda* 27(6): 511-518.
- Gomaa, E.Z., 2013. Optimization and Characterization of Alkaline Protease and Carboxymethyl-Cellulase Produced by *Bacillus pumillus* Grown on Ficus Nitida Wastes. *Brazilian Journal of Microbiology*, No:44, 2, 529-537.
- Gomes, J. and Steiner, W., 2004. The biocatalytic Potential of Extremophiles and Extremozymes. *Food Technology and Biotechnology*, 42(4): 223- 235.
- Guo, B., Bi, Y., 2002. "Cloning PCR Products", in: Chen, B.Y. and Janes, H.W, Editors, "PCR Cloning Protocols", Humana.
- Gurung, N., Ray S., Bose S., Rai V., 2013. A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond. *Hindiwai* 329121.
- Güven, R.G., 2011. Termofilik Bakteriler ve Biyoteknolojik Açıdan Önemli Bazı Enzimleri. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, 09, 1-10.
- Haddar A, Agrebi R, Bougatef A, Hmidet N, Sellami-Kamoun A, Nasri M. Two detergent stable alkaline serine-proteases from *Bacillus mojavensis* A21: Purification, characterization and potential application as a laundry detergent additive. *Bioresour Technol* 2009;100(13):3366-73.
- Haki, G.D., Rakshit, S.K., 2003. "Developments in industrially important thermostable enzymes: a review", *Bioresource Technology*, 89, 17-34.
- Haliskaranfil, S. 2012. Termoalkalifilik Amilaz Ve Selülaz Enzim (Multi Enzim) Üreticisi *Bacillus* Sp. İzolasyonu, Enzimlerin Karakterizasyonu Ve Biyoteknolojik Uygulanabilirliği. Sayfa: 163.

- Hamer, R.J., 1995. Enzymes in the baking industry. In: Tucker G. A, Woods L. F. J., editors. Enzymes in food processing. Galsgow: Blackie Academic and Professional. 190-222.
- Hames, B.D. and Rickwood, D., 1996. Gel Electrophoresis of Proteins A Practical Approach. Oxford University Press, Oxford.383s.
- Hames, B.D., Rickwood, D., 1990. Gel electroforesis of proteins, A practical approach, Oxford University Press, 1-149.
- Harmsen, D., Karch, H., 2004. 16S rDNA for diagnosing pathogens: a living tree. Am. Soc. Microbiol. New., 70: 19–24.
- Hatazawa J, [to M, Matsuzawa T, et al: J Cereb Blood Flow and Metab,1988.Measurement of the ratio of cerebral oxygen consumption to glucose utilization by positron emission tomography: Its consistency with the values determined by the Kety-Schmidt method in normal volunteers. 8:426–432
- Heidari, H.R.K., Amoozegar, M.A., Hajighasemi, M., Ziaee, A.A., Ventosa, A., 2008.Production, optimization and purification of a novel extracellular protease from the moderately halophilic bacterium Halobacillus karajensis. J. Ind. Microbiol Biotechnol, 36, 21–27.
- Horikoshi, K., 1996. Alkaliphiles-from an industrial point of view. FEMS Microbiology Reviews, 18:259-270.
- Hough, D.W., Danson, M.J., 1999. “Extremozymes”, Current Opinion in Chemical Biology, 3, 39-46.
- Işık, B. 2014.Biyosensörlere Farklı Bir Bakış Açısı Enzim Aktivitesi Tayinlerine Yönelik Sistemler. Yüksek Lisans Tezi .Tekirdağ.
- Itkoor, P., Shida, O., Tsukagoshi, N., and Udaka, S., 1989. Screening for raw starch digesting bacteria, Agricultural Biology and Chemistry, 53, 53-60.
- Jaouadi B, Ellouz-Chaabouni S, Rhimi M, Bejar S.2008. Biochemical and molecular characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus pumilus* CBS with high catalytic efficiency. Biochimie.90:1291–1305
- Jellouli, K., Ghorbel-Bellaaj., Ayed H.B., Manni L., Agrebi R. Nasri M. 2011. Alkaline-Protease from *Bacillus licheniformis* MP1: Purification, Characterization and Potential Application as a Detergent Additive and For Shrimp Waste Deproteization, Process Biochemistry, 1248-1256.
- Johnvesly, B. and Naik, G.R., 2001. Studies on Production of Thermostable Alkaline Protease from Thermophilic and Alkaliphilic Bacillus sp. JB-99 in a Chemically Defined Medium. Process Biochemistry, 37, 139-144.
- Joshi, S, Satyanarayana, T., 2013 Mar.Characteristics and applications of a recombinant alkaline serine protease from a novel bacterium Bacillus lehensis. Bioresour Technol; 131:76-85.
- Kahn, M., House, B., (2004), “Method for cloning PCR products without restriction or ligation enzymes”, United States Patent Application, 20040166512.
- Kalaycıoğlu, L., Serpek, B., Nizamioğlu, M., Başpınar, N., Tiftik, A.M., 2000. Biyokimya, Nobel Yayın Dağıtım, 163-165, 246-247.
- Kandasamy, N., Hardy, B., Page, L., Schaffner, M., Graggaber, J., Powlson, A. S., et al. (2014). Cortisol shifts financial risk preferences. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111, 3608–3613.

- Karaca, N., 2008. Poli (N,N-Dimetila Krilamit-ko-Akrilamit)/k-Karragenan Polimerleri Kullanılarak Lipaz Enziminin İmmobilizasyonu, Gazi Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Karademir, A., Akgül, M., Tutuş, A., 2002. Kağıt Endüstrisinde Enzim Kullanımına Genel Bir Bakış: Enzimlerin Kabuk Soyma, Liflerin Modifikasyonu, Çözünebilir Kağıt Hamuru ve Selüloz Üretiminde Kullanımı (Bölüm 1). KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi 5(1).
- Karademir, G., Karademir B. 2003. Yem Katkı Maddesi Olarak Kullanılan Biyoteknolojik Ürünler (Derleme). Lalahan hay. Araşt. Enst. Derg., 43 (1) 61-74.
- Katı, H., Karaca B., Gülşen Ş.H., 2016. SAÜ Fen Bilimleri Dergisi Sayı:2 No:281-290.
- Kaur, J., Sharma, R., (2006), "Directed evolution: An approach to engineer enzymes", Critical Reviews in Biotechnology, 26, 165–199.
- Kaya, E. 2014. Kurutulmuş Nohut Granüllerinden (*cicer arietinum*) β -Galaktosidaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Kocaeli
- Kazan, D., Denizci, A.A., Kerimak Öner, M.N. and Eraslan, A. 2005. Purification and characterization of a serine alkaline protease from *Bacillus clausii* GMBAE-42. J Ind Microbiol Biotechnol, 32:335-344.
- Ketnawa, S., Benjakul S., Martinez-Alvarez O., Rawdkuen Si., 2014. Three-phase Partitioning and Proteins Hydrolysis Patterns of Alkaline Proteases Derived From Fish Viscera, Separation and Purification Technology. No:174-181.
- Kıran, F., Osmanoğlu, Ö., 2011. Laktik asit bakterilerinin identifikasyonunda kullanılan moleküler yöntemler. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 27: 62-74.
- Kolbert, C.P., Persing, D.H., 1999. Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. Curr. Opin. Microbiol., 2: 299–305.
- Kumar, H.D. and Nussinov, R., 2001. How Do Thermophilic Proteins Deal with Heat? A review. Cellular and Molecular Life Sciences, 58: 1216- 1233.
- Kumar, S., and Nussinov, R., 2001. How do thermophilic proteins deal with heat? A review. Cell. Mol. Life Sci., 58, 1216–1233.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the heat of bacteriophage T4. Nature, London, 227,680.
- Lario, L.D., Chaud L., Almeida M.G., Sette L.D., Pessoa A., 2015. Production, Purification, and Characterization of an Extracellular Acid Protease from the Marine Antarctic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* L7. British Mycological. 1878-6146.
- Leemhuis, H., Dijkstra, B.W. and Dijkhuizen, L. 2002. Mutations converting cyclodextrin glycosyltransferase from a transglycosylase into a starch hydrolase. FEBS Letters, 514:189-192.
- Li, C., Evans, R. M., 1997. "Ligation independent cloning irrespective of restriction site compatibility", Nucleic Acids Research, 25 (20), 4165–4166.
- Li, S., Yang X., Yang S., Zhu M., Wang X., 2012. Technology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing and Engineering. No:2 Issue: 3.
- Lowry, O.H., Rosebough, N.J. Farr, A.L. and Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent, Journal of Biology and Chemistry, 193, 265-275.

- Lupski, J.R. and Weinstock, G.M. 1992. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *Journal of Bacteriology*. 174, 4525– 4529.
- M., Venugopa and A. V. Saramma. *Indian J Microbiol*. 2007 Dec. An alkaline protease from *Bacillus circulans* BM15, newly isolated from a mangrove station: characterization and application in laundry detergent formulations. 47(4): 298–303.
- M.A. Ferrero, G. R. Castro, C. M. Abate, M. D. Baigorí F. Siñeriz. April 1996. Thermostable alkaline proteases of *Bacillus licheniformis*. *MIR 29*: isolation, production and characterization. Volume 45, pp 327–332| .
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J., 2000. *Brock Biology of Microorganisms*. Prentice-Hall Inc., New Jersey.
- Maghsoodi, V., Kazemi A., Nahid P., Yaghmaei S., Sabzevari M.A., 2012. Alkaline Protease Production by Immobilized Cells Using *B.Licheniformis*. *Scientia Iranica* 1026-3098.
- Marul, B. 2007. Fabrika Atıklarından İzole Edilen *Bacillus* sp.'den Aktıf ve Kararlı Lipaz Üretim Koşullarının ve Üretilen Enzimin Deterjan Endüstrisinde Kullanımının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara
- Menzel, C., Lerch, T., Schneider, K., Weideman, R., Tollnick, C., Kretzmer, G., Scheper, T., Schugert, K., 1998. Application of biosensors with an electrolyte isolator semiconductor capacitor (EISCAP) transducer for process monitoring. *Process Biochemistry*, 33: 175- 180.
- Metin, K., 2007. Moleküler Biyoloji Teknikleri II: Protein Analiz Teknikleri. *Moleküler Biyoloji (Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karatağ, M. ve Tanyolaç, B.)*, Nobel Yayıncılık, Sayfa 555-598, Ankara.
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars, *Analitic Chemistry*, Nq. 31, 426-428.
- Nadeem, M., Qazi, J.I., Baig, S., Syed, Q., 2008. Effect of Medium Composition on Commercially Important Alkaline Protease Production by *Bacillus licheniformis*. *N-246 (4)* 388–394.
- Nam, M.S., Whang, K.S., Choi, S.H., Bae, H.C., Kim, Y.K., Park, Y.W., 2013. Purification, characterization, and properties of an alkaline protease produced by 82 *Serratia marcescens* S3-R1 inhabiting Korean ginseng rhizosphere. *J Sci Food Agric*, 93, 3876–3882.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2004. *Enzymes*. *Lehninger Principles of Biochemistry* (Nelson, D.L., Cox, M.M) W. H. Freeman, p. 190-249.
- Nugent, A.P., 2005. Health properties of resistant starch. *British Nutrition Foundation Nutrition Bulletin*, 30: 27-54.
- Öner, Z., Karahan, A. G., Aloğlu, H. 2006. Changes in the microbiological and chemical characteristics of an artisanal Turkish white cheese. *Food Sci. Technol.*, 39; 449-454.
- Outtrup, H and Jorgensen, S.T., 2002. The Importance of *Bacillus* species in the production of industrial enzymes. (R.Berkley editör) *Applications and systems of Bacillus and relatives*. Blackwell Science Inc., Malden, Mass., 206-218.
- Özçelik, B., Aytar P., Gedikli S., Yardımcı E., Çalışkan F., Çabuk A., 2014. Production of an Alkaline Protease Using *Bacillus Pumilus* D3 Without Inactivation by SDS, its Characterization and Purification. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 388-396.

- Özçelik, S., 1995. Genel Mikrobiyoloji, Isparta, 1-33s.
- Özden, S., 2014. *Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'den proteaz enziminin saflaştırılması, aktivitesinin tayini ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gazi Üniversitesi, Ankara.
- Öztekin, A., 2011. Tirit Mantarından (*Lactarius volemus*) Bazı Vitaminlerden (A, E, C), Proteaz Enziminin Tanımlanması ve Enzimin Endüstriyel Uygulanabilirliğinin Araştırılması. Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Ozturk, M.H., 2004. Partial Purification and Characterization of Alkaline Proteases from Isolated *Bacillus* Strains, Yüksek Lisans Tezi, İ.T.U. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul
- Ozturk, S., Morgan, M., Dılgimen, A. S., Denizci, A., Arıkan, B., 2009. Alkaline serine protease from halotolerant *Bacillus licheniformis* BA17. *Annals of Microbiology*, 59: 83-90.
- Panda, M.K., Sahu M.K., Tayung K., 2013. Isolation and Characterization of a Thermophilic *Bacillus sp.* With Protease Activity Isolated From Hot Spring of Tarabalo, Odisha, India. *Iranian Journal of Microbiology* No:2 159-165.
- Papagianni, M., Sergelidis, D., 2014. Purification and Biochemical Characterization of a Novel Alkaline Protease Produced by *Penicillium nalgiovense*. *Appl Biochem Biotechnol*, 172, 3926–3938.
- Parker, K., Salas, M., Nwosu, V.C., 2010. High fructose corn syrup: Production, uses and public health concerns. *Biotechnology and Molecular Biology Review*. 5(5): 71 – 78.
- Patel, A.K., Singhania R.R., Pandey., 2016. Novel Enzymatic Processes Applied to the Food Industry. *Current Opinion in Food Science*, 2214-7993.
- Pathak, A., B. Deshmukh., 2012., Alkaline Protease Production, Extraction and Characterization From Alkaliphilic *Bacillus licheniformis* KBDL4: A Lonar soda Lake Isolate, *Indian Journal of Experimental Biology* pp.569-576.
- Patil, U., Chaudhari A., 2013, Production of Alkaline Protease by Solvent-Tolerant Alkaliphilic *Bacillus Circulans* MTCC 7942 Isolated From Hydrocarbon Contaminated Habitat: Process Parameters Optimization, Hindawi Publishing Corporation, Article ID 942590, 10 Pages.
- Pfister, P., Hobbie, S., Vicens, Q., Bottger, EC., Westhof, E. 2003b. The molecular basis for A-site mutations conferring aminoglycoside resistance :relationship between ribosomal susceptibility and X-ray crystal structures. *Biochem.*, 4: 1078– 1088.
- Pfister, P., Risch, M., Brodersen, DE., Bottger, EC. 2003a. Role of 16S rRNA helix 44 in ribosomal resistance to hygromycin B. *Antimicrob. Agents Ch.*, 47: 1496– 1502.
- Polaina, J. and MacCabe, A. P. 2007. *Industrial Enzymes Structure, Function and Applications*. Springer, 161-243, Spain.
- Poole, C.F., 2003. *The Esence of Chromatography*. Elsevier Science B.V. Amsterdam, 925s.
- Puntambekar, A. Dake M., 2017., Isolation, Purification, and Optimization of Thermophilic and Alkaliphilic Protease Originating From Hot Water Spring Bacteria, *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, Print- 0974-2441.

- Rahman, R., Geok, L., Basri, M. and Salleh, A. 2006. An organic solvent-stable alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa* strain K: Enzyme purification and characterization. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 1484-1491
- Rai, S.K., Mukherjee, A.K., 2010. *Biochem. Eng. J.*40:173-180.
- Rao, J.L.U.M., Satyanarayana, T, Aool. 2008. *Biochem. Biotechnol.* 150, 205-219.
- Rao, K. and Narasu, M. 2007. Alkaline protease from *Bacillus firmus* 7728. *African Journal of Biotechnology*, 6 (21), 2493-2496.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S. and Deshpande, V.V., 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62:597-635.
- Rao, S., Sathish, T., Ravichandra, P. and Prakasham, R. 2009. Characterization of thermo- and detergent stable serine protease from isolated *Bacillus circulans* and evaluation of eco-friendly applications. *Process Biochemistry*, 44, 262–268.
- Rawdkuen, S., Pintathong, P., Chaiwut, P., Benjakul, S. January 2011. The partitioning of protease from *Calotropis procera* latex by aqueous two-phase systems and its hydrolytic pattern on muscle proteins. Volume 89, Issue 1, Pages 73–80.
- Reddy, L.V.A., Wee Y.J., Yun J.S., Ryu H.W. 2008. *Bioresource Technology*. 2242-2249.
- Renge, V.C., Khedkar, S.N.V., Nandurkar, R., 2012. Enzyme Synthesis By Fermentation Method: A Review. *Sci. Revs. Chem. Commun.*: 2(4), 2012, 585-590.
- Riisgaard, S., 1990. "The enzyme industry and modern biotechnology", In: Proceedings of the Fifth European Congress on Biotechnology, 1C. Christiansen, L. Munck, J., Villadsen (Ed.), 31408-71610-617-2, Copenhagen.
- Roncari, G. & Zuber, H. (1976) Thermophilic aminopeptidase I. *Methods Enzymol.* 45, 522-530.
- Rüdiger, A., Sunna, A., and Antranikian, G., 1994. Enzymes from extreme thermophilic and hyperthermophilic archaea and bacteria. *Carbohydrases*, 946-961.
- Sajilata, M.G., Singhal, R.S., Kulkarni P. R. 2006. Resistant Starch—A Review *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety* Vol. 5.
- Sarı, Esmâ., Loğoğlu E., Öktemer A., 2015. Purification and Characterization of Organic Solvent stable Serine alkaline Protease from Newly Isolated *Bacillus circulans* M34, *Biomedical Chromatography*. 1356-1363.
- Sarıkaya, S.B.Ö., 2006. Yabani Çuha (*Primula Veris*) Bitkisinin Çiçeklerinden Proteaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Peynir Üretiminde Kullanılabilirliğinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Schallmey, M., Singh, A. and Ward, O.P., 2004. Developments in the Use of *Bacillus* Species for Industrial Production. *Canadian Journal of Microbiology*, 50:1-17.
- Sepahy, A. A., Ghazi, S. and Sepahy, M. A. Volume 2011 (2011), Cost-Effective Production and Optimization of Alkaline Xylanase by Indigenous *Bacillus mojavensis* AG137 Fermented on Agricultural Waste.
- Sevinç, N., 2010. Türkiye topraklarından izole edilen *Bacillus sp.* suşlarından proteaz üretimi, kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.

- Sevinç, N., 2010. Türkiye topraklarından izole edilen *Bacillus sp.* suşlarından proteaz üretimi, kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
- Shah, K., Mody, K., Keshri, J. and Jha, B. 2010. Purification and characterization of a solvent, detergent and oxidizing agent tolerant protease from *Bacillus cereus* isolated from the Gulf of Khambhat. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 67, 85-91
- Sharp, R.J., Scawen, M.D. Atkinson, T., 1989. Fermentation And Down Stream Processing Of *Bacillus*. In: Harwood CR (&d) *Bacillus*. Biotechnology Handbooks, Vol 2. Plenum Press, New York, pp 255-292.
- Shine, K., Kanimozhi K., Panneerselvam A., Muthukumar C., Thajuddin N., 2016. Production and Optimization of Alkaline Protease by *Bacillus cereus* RS 3 Isolated from Desert soil. *Internatiol Journal of Advanced Research in Biological Sciences*. 2348-8069.
- Shuang Li,A., Xiaofeng Yang,A., Shuai Yang,A., Muzi Zhu,A., Xiaoning Wan,B.2012.
- Singh, J., Batra, N. and Sobti, R. 2001. Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus sp.* SSR1. *Process Biochemistry*, 36, 781–785.
- Singh, J., Vohra, R. and Sahoo, D. 1999. Alkaline protease from a new obligate alkalophilic isolate of *Bacillus sphaericus*. *Biotechnology Letters*, 21, 921-924.
- Singh, R., Kumar M., Mittal A., Mehta P.K., 2016., *Microbial Enzymes: Industrial Progress in 21 st Century*. Review Article No:10.1007.
- Sneath, P.H.A., 1986. “Section 13: Endospore-forming Gram-positive rods and cocci”/ Section 16: Identification of Unknown Bacteria”, In: Krieg N.R, editor, “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology”, 2nd edition, Williams and Wilkins.
- Sonuç, M., 2011. *Bacillus subtilis* M33’den hücre dışı alkali proteaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu. Yüksek lisans tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Souza, P.M, Bittencourt M.L., Caprara C.C., Freitas M., Almeida D.S., Silveira D., Fonseca Y.M., Filho E.X.F., Junior A.P., Magalhaes P.O., 2015, *A Biotechnology Perspective of Fungal Proteases*. No:46,2,337-346.
- Szilagyi, A., Ad Zavodszky, P. 2000. Structural differences between mesophilic, moderately thermophilic and extremely thermophilic protein subunits: results on a comprehensive survey. *Structure*. 8:493-504.
- Technology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing and Engineering. 3(2): e201209017
- Tekinşen, O., Atasever, M., Keleş, A., Tekinşen, K., 2002. Süt, Yoğurt, Tereyağı, Peynir Üretim Kontrolü, 2.Baskı. Konya Selçuk Üniversitesi Basımevi.
- Temizkan, G. ve Arda, N., 2004. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Nobel Tıp Kitabevi, İst.345s.
- Thieme, F., Engler, C., Kandzia, R., Marillonnet, S., 2011. “Quick and clean cloning: a ligation-independent cloning strategy for selective cloning of specific PCR products from non-specific mixes”, 6 (6), 1-12.
- Topal, Ş., 1985. Enzimler, Mikrobiyolojik Yolla Enzim Üretimi ve bu Teknolojide Rennin’in Yeri. Araştırma Makalesi. Kocaeli.
- Toplak, A., Wu B., Fusetti F., Quaedflieg P.J.L.M., Janssen D.B., 2013. Proteolysin, a Novel Highly Thermostable and Cosolvent-Compatible Protease From the

- Thermophilic Bacterium *Coprothermobacter*. American Society for Microbiology. No: 5625-5632.
- Tortoli, E., 2003. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin. Microbiol. Rev.*, 16: 319–354.
- Turus, N. 2011. Alkali Soğukta Aktif Proteaz Üreticisi *Bacillus* Sp.Suşlarının İzolasyonu, Enzim Üretimi, Karakterizasyonu ve Enzimin Biyoteknolojik Kullanım Olanakları. Yüksek Lisans Tezi.Fen Bilimleri Enstitüsü.Adana.
- Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F.J. and Lupski, J.R. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based PCR (rep-PCR). *Methods in Molecular and Cellular Biology*. 5, 25–40.
- Wang, Q., Hou Y., Xu Z., Miao J., Li G., 2008. Optimization of Cold-Active Protease Production By the Psychrophilic Bacterium *Colwellia* sp. NJ341 With Response Surface Methodology. *Bioresource Technology*. 1926-1931.
- Wang, Y., W., Nema, S., Teagarden, D., 2010. “Protein aggregation Pathways and influencing factors”, *International Journal of Pharmaceutics*, 390 (2), 89-99.
- Wilson, K., and Goulding, K.H., 1986. *A Biologist’s Guide to Principles and Techniques of Practical Biochemistry*. Edward Arnold, London.396s.
- Woese, C.R. and R.S. Wolfe, 1985, *Archaeobacteria: The Urkingdom* , in: *The Bacteri* , Vol.8, eds C.R. Woese and R.S. Wolfe (Academic Press,Orlando,FL) p.459.
- Wolfe, M. 2009. Intramembrane-cleaving proteases. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(21), 13969–13973.
- Yılmaz, E., 2010. Farklı Teknikler Kullanarak Değişik Destek Materyallerine Lipaz İmmobilizasyonu ve Bir Anti-İnflammatör Olan *S.Naproxen*in Oluşumunda Kullanılması, Selçuk Üniversitesi, Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Yılmaz, M. 2003. Topraktan izole edilen *Bacillus* cinsi bakterilerin bazı metabolik özelliklerinin belirlenmesi, plazmid DNA ve protein profillerinin incelenmesi, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Sayfa: 4-56.
- Yüce, S., Tahtacı S., Kılıç G.B., 2017. Halofilik Laktik Asit Bakterilerinin Ürettiği Hidrolitik Enzimler.
- Zanphorlin, L.,M., Facchini F.D.A., Vasconcelos F.,Bonigli-Santos R., Rodrigues A., Sette L.D., Gomes E., Bonilla-Rodriguez G.O. 2010. *The Journal of Microbiology* No:3 pp.331-336.
- Zeikus, J.G., 1979. *Enzyme Microb. Technol.* 3,243.
- Zhou, M.Y., Gomez-Sanchez, C.E., 2000. “Universal TA cloning”, *Current Issues in Molecular Biology*, 2 (1), 1-7.
- Zihnioğlu, F., 1996. Protein saflaştırması ve karakterizasyonu elektroforetik yöntemler, *Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu, Çeşme İzmir*, 150.

ÖZGEÇMİŞ

04.11.1991 yılında Van'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Van'da tamamladı. 2009 yılında kazandığı Fırat Üniversitesi Biyomühendislik Bölümünden 2013 yılında mezun oldu. 2015 yılında Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı.

