

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bacillus pacificus PROTEOLİTİK VE LİPOLİTİK ENZİMLERİNİN
ENDÜSTRİYEL UYGULAMALAR İÇİN EŞ ZAMANLI ÜRETİM
OPTİMİZASYONU

DOKTORA TEZİ

Meral BELDÜZ KOLCU

MART 2024

TRABZON



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bacillus pacificus PROTEOLİTİK VE LİPOLİTİK ENZİMLERİNİN
ENDÜSTRİYEL UYGULAMALAR İÇİN EŞ ZAMANLI ÜRETİM
OPTİMİZASYONU

Meral BELDÜZ KOLCU

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
"DOKTOR (BİYOLOJİ)"
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 15 / 02 / 2024

Tezin Savunma Tarihi : 22 / 03 / 2024

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI

Trabzon 2024

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Biyoloji Anabilim Dalında
Meral BELDÜZ KOLCU Tarafından Hazırlanan**

***Bacillus pacificus* PROTEOLİTİK VE LİPOLİTİK ENZİMLERİNİN
ENDÜSTRİYEL UYGULAMALAR İÇİN EŞ ZAMANLI ÜRETİM
OPTİMİZASYONU**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 29 / 02 / 2024 gün ve 2043
sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
DOKTORA TEZİ
olarak kabul edilmiştir.**

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ

Üye : Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI

Üye : Prof. Dr. Kadriye İNAN BEKTAŞ

Üye : Prof. Dr. Elif SEVİM

Üye : Prof. Dr. Fatih Şaban BERİŞ

**Prof. Dr. Asim KADIOĞLU
Enstitü Müdürü**

ÖNSÖZ

“*Bacillus pacificus* Proteolitik ve Lipolitik Enzimlerinin Endüstriyel Uygulamalar İçin Eş Zamanlı Üretim Optimizasyonu” İsimli Bu Tez Çalışması Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Programı’nda hazırlanmıştır.

Doktora eğitimim süresince, çok büyük emekleri olan, her açıdan kendisini örnek aldığım, daima desteğini hissettiğim ve öğrencisi olmaktan gurur duyduğum, çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI’ya, tez izleme komitemde yer alan çalışmamı onurlandıran, konuyla ilgili önemli katkılarda bulunan, doktora eğitimimde çok emeği olan değerli hocam Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ’e, doktora tez izleme komitesi üyesi olarak, tezimin hazırlanmasında katkıları ve eleştirileri ile bana yön gösteren değerli hocam, Prof. Dr. Kadriye İNAN BEKTAŞ’a, laboratuvara ilk adım attığım andan itibaren, hayatıma dokunan, bilgisine sevgi katan, değerli arkadaşlarım Doç. Dr. Halil İbrahim GÜLER’e, Dr. Öğr. Üyesi Dilşat Nigar ÇOLAK’a, Dr. Öğr. Üyesi Fulya AY’a, Öğr. Gör. Dr. Ayşegül ÖZER’e, Arş. Gör. Esmâ CEYLAN’a ve Arş. Gör. Aleyna NALÇAOĞLU ŞENOCAK’a, bilgi ve tecrübesi ile tez çalışmamın istatistiksel değerlendirmelerine katkılarından dolayı Öğr. Gör. Asiye Zuhal BALTACI’ya teşekkür ederim.

Ayrıca bana tez yazımında her daim desteğini esirgemeyen değerli abim ve hocam Prof. Dr. Mehmet Cankat KARA’ya, Moleküler Biyoloji Laboratuvarındaki tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Hayatım boyunca fedakarlıklarını ve sevgilerini esirgemeyen, bugünlere gelmemde büyük emekleri olan, haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim ve her şeyden çok sevdiğim canım annem Fatma BELDÜZ’e, canım babam Fevzi BELDÜZ’e değerli ablalarım Yasemin AKDENİZ ve Nihal BELDÜZ KARA’ya,

Varlığı ile bana güven veren, her koşulda yanımda olan, hayatıma renk katan, mutluluk veren sevgili eşim Ogün KOLCU’ya, hayatımın neşesi, dünyalar tatlısı kızım Eylül KOLCU’ya

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Meral BELDÜZ KOLCU
Trabzon 2024

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum “*Bacillus pacificus* Proteolitik ve Lipolitik Enzimlerinin Endüstriyel Uygulamalar İçin Eş Zamanlı Üretim Optimizasyonu” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI’nın sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 22/03/2024

Meral BELDÜZ KOLCU

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VIII
SUMMARY	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
TABLolar DİZİNİ.....	XII
KISALTMALAR DİZİNİ	XIII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1 Giriş	1
1.2. Proteazların Genel Özellikleri	3
1.2.1. Proteaz Kaynakları	3
1.2.2. Proteazların Sınıflandırılması.....	5
1.2.3. Proteazların Uygulama Alanları.....	10
1.3. Lipazların Genel Özellikleri	13
1.3.1. Lipaz Kaynakları	14
1.3.2. Lipazların Sınıflandırılması.....	16
1.3.3. Lipazların Uygulama Alanları.....	19
1.4. Eş Zamanlı Üretim.....	22
1.5. <i>Bacillus</i> Cinsinin Genel Özellikleri ve Proteaz ve Lipaz Üretimindeki Yeri	24
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	27
2.1. Materyal	27
2.1.1. Kullanılan Kimyasallar	27
2.1.2. Kullanılan Mikroorganizma ve Plazmitler	27
2.2. Metot.....	28
2.2.1. Enzim Tarama Çalışmaları.....	28
2.2.2. Bakteri İzolatların Tanımlanması.....	28
2.2.3. Enzimlerin Eş Zamanlı Üretim Şartlarının Optimizasyonu	29
2.2.4. Enzim Üretimi	32

2.2.5. Enzimin Konsantre Edilmesi/Yoğunlaştırılması	33
2.2.6. Enzimlerin Saflaştırılması	33
2.2.7. Protein Miktarının Tayini	35
2.2.8. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi	35
2.2.9. Enzimlerin Zimogram Analizi	36
2.2.10. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	37
2.2.11. Enzim Karakterizasyonu	38
2.2.12. Endüstriyel Alan Çalışmaları	41
2.2.13. Tüm Genom Analizi	42
2.2.14. Lipaz ve Proteaz Genlerinin Dizilerinin Belirlenmesi	43
2.2.15. Lipaz ve Proteaz Genlerinin PZR ile Çoğaltılması	44
2.2.16. Lipaz ve Proteaz Genlerine ait PZR ürünlerinin pJET 1.2 TA Klonlama Vektörüne Klonlanması	45
2.2.17. Proteaz Genin pET-20b(+) ve Lipaz Geninin pET-28a(+) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması	46
2.2.18. Proteaz ve Lipaz Genlerinin Ekspresyonu	47
2.2.19. İstatistiksel Analiz	47
3. BULGULAR	48
3.1. Enzim Tarama Çalışmaları	48
3.2. Bakteri İzolatının Tanımlanması	49
3.2.1. 16S rRNA Gen Dizisinin Eldesi, TA Klonlama Vektörüne Klonlanması, Baz Dizisinin Ortaya Çıkarılması ve Gen Bank'taki Dizilerle Karşılaştırılması	49
3.2.2. Tüm Genom Dizisinin Belirlenmesi	51
3.3. Enzimlerin Eş Zamanlı Üretim Şartlarının Optimizasyonu	53
3.3.1. Besiyeri İçeriğinin Optimizasyonu	53
3.3.2. Kültivasyon Şartlarının Optimizasyonu	60
3.3.3. En Fazla Üretimin Olduğu İnkübasyon Sıcaklığının Belirlenmesi	61
3.3.4. En Fazla Üretimin Olduğu Sürenin Belirlenmesi	62
3.4. Enzim Üretimi	63
3.5. Enzimin Konsantre Edilmesi	64
3.6. Enzimlerin Saflaştırılması	64
3.6.1. Proteaz Enziminin Saflaştırılması	64
3.6.2. Lipaz Enziminin Saflaştırılması	65

3.7. Enzimlerin Karakterizasyonu	65
3.7.1. Optimum Sıcaklık	65
3.7.2. Optimum pH.....	66
3.7.3. Isıl Kararlılığı	67
3.7.4. pH Kararlılığı	68
3.7.5. Substrat Spesifikliği	70
3.7.6. Metal İyon Etkisi	70
3.7.7. İnhibitör ve Aktivatörlerin Enzim Aktivitesi üzerine Etkisinin İncelenmesi	72
3.7.8. Deterjan Stabilitesi	73
3.7.9. Kinetik Parametreler	75
3.8. Endüstriyel Alan Çalışmaları.....	77
3.8.1. Proteaz Enziminin Dehairing (Deriden Kıl Giderimi) Kapasitesinin Belirlenmesi	77
3.8.2. Enzimlerin Deterjan Katkısı Olarak Kullanım Kapasitelerinin Belirlenmesi	77
3.8.3. Proteaz Enziminin Süt Koagülasyonunda Kullanımı.....	80
3.9. Tüm Genom Dizisi Üzerindeki Proteaz ve Lipaz Genlerinin Analizi	81
3.9.1. Lipaz ve Proteaz Genlerinin PZR ile Çoğaltılması	81
3.9.2. Lipaz ve Proteaz Genlerine ait PZR ürünlerinin pJet 1.2 TA Klonlama Vektörüne Klonlanması ve Dizi Analizi	82
3.9.3. Proteaz ve Lipaz Genlerinin Ekspresyon Vektörüne Klonlanması	82
3.10. Enzimlerin Zimogram Analizi	84
4. TARTIŞMA.....	85
5. SONUÇLAR.....	108
6. ÖNERİLER	113
7. KAYNAKLAR.....	114
8. EKLER	135
ÖZGEÇMİŞ	

Doktora Tezi

ÖZET

Bacillus pacificus PROTEOLİTİK VE LİPOLİTİK ENZİMLERİNİN ENDÜSTRİYEL UYGULAMALAR İÇİN EŞ ZAMANLI ÜRETİM OPTİMİZASYONU

Meral Beldüz KOLCU

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI
2024, 134 Sayfa, 3 Ek Sayfa

Ön çalışmada, topraktan izole edilen mezofilik bakteriler proteaz ve lipaz enzimleri açısından tarandı ve çalışma sonucunda 2NP6 izolatının proteaz ve lipaz üretimi açısından pozitif olduğu tespit edildi. 2NP6 izolatının türünün belirlenmesi için 16S rRNA gen dizi analizi gerçekleştirildi ve *Bacillus* cinsine ait bakterilere %99'un üzerinde benzer olduğu görüldü. 2NP6 izolatının kesin tür tayini ve sahip olduğu proteaz ve lipaz gen sekanslarının belirlenmesi amacıyla tüm genom dizi analizi yapıldı. Analiz sonucunda izolatın *Bacillus pacificus* türüne %88,35 ANI ve %84,8 dDDH benzerlik gösterdiği tespit edildiğinden izolat *Bacillus pacificus* 2NP6 olarak adlandırıldı. İzolatın her iki enzimi üretiminin optimizasyonu amacıyla üretim koşulları optimize edildi. Eş zamanlı üretim koşulları; karbon kaynağı açısından %1 g/mL skim milk ve ilave olarak lipaz için %0,5 (v/v) susam yağı olarak belirlendi. Her iki enzim açısından en iyi üretimin sağlandığı azot kaynağı ise %0,5 g/mL maya özütü olarak belirlendi. %4'lük gece kültürü inokülasyonu ve 30 °C'de 48 saat inkübasyonla her iki enzim açısından optimum üretim elde edildi. Optimize şartlar altında üretilen proteazın optimum sıcaklık ve pH değerleri sırasıyla 55 °C ve pH 10,0, lipazın ise optimum sıcaklık ve pH değerleri sırasıyla 60 °C ve pH 8,0 olarak belirlendi. Lipaz enziminin *p*-nitrofenil butirat substratı için *K_m* ve *V_{max}* değerlerinin sırasıyla 0,053185 mM ve 4349,01 U/mg; proteazın azokazein için *K_m* değerinin 5,841085 mg/mL ve *V_{max}* değerinin 13514,54 U/mg olduğu hesaplandı. Endüstriyel kullanım potansiyelinin araştırılması amacıyla proteazın deriden kıl giderme ve süt pıhtılaştırma potansiyeli ile proteaz ve lipazın çeşitli lekeler üzerinde leke çıkarma potansiyeli değerlendirildi.

Anahtar Kelimeler: Eş zamanlı üretim, *Bacillus pacificus*, lipaz, proteaz, besiyeri optimizasyonu, saflaştırma, karakterizasyon

PhD. Thesis

SUMMARY

OPTIMIZATION OF CONCAMINANT PRODUCTION OF *Bacillus pacificus* PROTEOLYTIC AND LIPOLYTIC ENZYMES FOR INDUSTRIAL APPLICATIONS

Meral Beldüz KOLCU

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI
2024, 134 Pages, 3 Appendix Pages

In the preliminary study, mesophilic bacteria isolated from soil were screened for protease and lipase enzymes and as a result of the study, 2NP6 isolate was found to be positive for protease and lipase production. 16S rRNA gene sequence analysis was performed to determine the species of 2NP6 isolate and it was found to be over 99% similar to bacteria belonging to the genus *Bacillus*. Whole genome sequence analysis was performed to determine the exact species of 2NP6 isolate and to determine its protease and lipase gene sequences. As a result of the analysis, it was determined that the isolate showed 88,35% ANI and 84,8% dDDH similarity to *Bacillus pacificus* species, so the isolate was named *Bacillus pacificus* 2NP6. Production conditions were optimized to optimize the production of both enzymes of the isolate. Simultaneous production conditions were determined as 1 g/mL 1% skim milk for carbon source and 0,5% (v/v) sesame oil for lipase. The nitrogen source for both enzymes was 0,5% g/mL yeast extract. 4% overnight culture inoculation and incubation at 30 °C for 48 hours resulted in optimum production of both enzymes. The optimum temperature and pH values of protease produced under optimized conditions were determined as 55 °C and pH 10,0, respectively, while the optimum temperature and pH values of lipase were determined as 60 °C and pH 8,0, respectively. The *K_m* and *V_{max}* values of lipase enzyme for p-nitrophenyl butyrate substrate were 0,053185 mM and 4349,01 U/mg, respectively; the *K_m* value of protease for azocasein was 5,841085 mg/mL and *V_{max}* value was 13514,54 U/mg. In order to investigate the potential for industrial use, the potential of protease for hair removal from skin and milk coagulation and the stain removal potential of protease and lipase on various stains were evaluated.

Key Words: Concaminant production, *Bacillus pacificus*, Lipase, Protease, medium optimization, purification, characterization

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.	2NP6 izolatının %10'luk UHT süt LB agar üzerindeki proteaz aktivitesinin gösterilmesi.....	48
Şekil 2.	2NP6 izolatının %2.5 (w/v) zeytinyağı-Rhodamine B'li LB agar üzerindeki lipaz aktivitesinin gösterilmesi	49
Şekil 3.	2NP6 izolatı ve yakın akraba <i>Bacillus</i> türleri ile 16S rRNA bölgesi açısından yakınlık derecesini gösteren filogenetik ağaç.....	51
Şekil 4.	2NP6 tüm genom analizi sonucu filogenetik ağaç	52
Şekil 5-a.	<i>B. pacificus</i> 2NP6'nın proteaz üretiminde karbon kaynaklarının belirlenmesi.	54
Şekil 5-b.	<i>B. pacificus</i> 2NP6 izolatının proteaz üretiminin optimizasyon besiyerindeki Skim milk konsantrasyonunun ayarlanması.....	54
Şekil 6-a.	<i>B. pacificus</i> 2NP6'nın eş zamanlı enzim üretiminde lipaz karbon kaynaklarının her iki enzim yönünden belirlenmesi.....	56
Şekil 6-b.	<i>B. pacificus</i> 2NP6 izolatının lipaz üretiminin optimizasyonunda susam yağının besiyerindeki konsantrasyonun ayarlanması	56
Şekil 7-a.	<i>B. pacificus</i> 2NP6'nın Eş zamanlı enzim üretiminde azot kaynağının belirlenmesi.....	57
Şekil 7-b.	<i>B. pacificus</i> 2NP6 izolatının lipaz ve proteaz üretiminin optimizasyonunda besiyerindeki maya özütü konsantrasyonunun ayarlanması.....	58
Şekil 8.	<i>B. pacificus</i> 2NP6'nın eş zamanlı proteaz ve lipaz üretiminde optimum pH değerinin belirlenmesi	59
Şekil 9.	<i>B. pacificus</i> 2NP6'nın eş zamanlı proteaz ve lipaz üretiminde % inokülasyon miktarının belirlenmesi	61
Şekil 10.	<i>B. pacificus</i> 2NP6'nın eş zamanlı proteaz ve lipaz üretiminde kültürasyon şartı olarak sıcaklığın etkisinin belirlenmesi	62
Şekil 11.	<i>B. pacificus</i> 2NP6'nın eş zamanlı proteaz ve lipaz üretiminde kültürasyon şartı olarak inkübasyon süresinin etkisinin belirlenmesi	63
Şekil 12.	<i>B. pacificus</i> 2NP6 lipaz ve proteaz zimogramı.....	64
Şekil 13.	<i>B. pacificus</i> 2NP6 izolatının proteaz ve lipaz enzimlerinin optimum sıcaklık grafiği	66
Şekil 14.	<i>B. pacificus</i> 2NP6 izolatının proteaz ve lipaz enzimlerinin optimum pH grafiği	67
Şekil 15-a.	<i>B. pacificus</i> 2NP6 izolatına ait proteaz enziminin ısı kararlılık grafiği.....	67
Şekil 15-b.	<i>B. pacificus</i> 2NP6 izolatına ait lipaz enziminin ısı kararlılık grafiği.....	68
Şekil 16-a.	<i>B. pacificus</i> 2NP6 izolatına ait proteaz enziminin pH kararlılık grafiği.....	69
Şekil 16-b.	<i>B. pacificus</i> 2NP6 izolatına ait lipaz enziminin pH kararlılık grafiği.....	69

Şekil 17. <i>B. pacificus</i> 2NP6 izolatına ait lipaz enziminin substrat spesifikliği grafiği	70
Şekil 18-a. <i>B. pacificus</i> 2NP6 proteaz aktivitesine metal iyonlarının etki grafiği	71
Şekil 18-b. <i>B. pacificus</i> 2NP6 lipaz aktivitesine metal iyonlarının etki grafiği	72
Şekil 19-a. İnhibitör-aktivatör maddelerin <i>B. pacificus</i> 2NP6 proteazına etkisi	73
Şekil 19-b. İnhibitör-aktivatör maddelerin <i>B. pacificus</i> 2NP6 lipazına etkisi	73
Şekil 20-a. <i>B. pacificus</i> 2NP6 proteaz aktivitesine ticari deterjanların etkisi	74
Şekil 20-b. <i>B. pacificus</i> 2NP6 lipaz aktivitesine ticari deterjanların etkisi	74
Şekil 21-a. <i>B. pacificus</i> 2NP6 proteazının Michaelis-Menten eğrisi	75
Şekil 21-b. <i>B. pacificus</i> 2NP6 proteazının Lineweaver-Burk eğrisi	75
Şekil 22-a. <i>B. pacificus</i> 2NP6 lipazının Michaelis-Menten eğrisi	76
Şekil 22-b. <i>B. pacificus</i> 2NP6 lipazının Lineweaver-Burk eğrisi	76
Şekil 23. <i>B. pacificus</i> 2NP6'dan elde edilen ham ve saf haldeki proteaz enzimi yardımıyla dana derisinden kıl giderimi	77
Şekil 24. <i>B. pacificus</i> 2NP6'ya ait saf proteazın pamuklu kumaştan kan lekesi çıkartma performansının ticari deterjanlar ile karşılaştırılması	78
Şekil 25-a. <i>B. pacificus</i> 2NP6'ya ait saf lipazın pamuklu kumaştan zeytinyağı lekesi çıkartma performansının ticari deterjanlar ile karşılaştırılması	79
Şekil 25-b. <i>B. pacificus</i> 2NP6'ya ait saf lipazın pamuklu kumaştan yumurta sarısı lekesi çıkartma performansının ticari deterjanlar ile karşılaştırılması	80
Şekil 26. <i>B. pacificus</i> 2NP6 izolatından elde edilen proteazın 20-100 mM aralığındaki CaCl_2 konsantrasyonunda süt pıhtılaşması üzerine etkisi	80
Şekil 27. <i>B. pacificus</i> 2NP6 genomik DNA kalıp olarak kullanılarak proteaz ve lipaz için belirlenen primer çiftleri ile gerçekleştirilen PZR reaksiyon sonucu.	82
Şekil 28. pET-20b(+) vektörüne klonlanan proteaz geninin <i>XhoI</i> ve <i>NcoI</i> kesimleri ile pET-28a(+) vektörüne klonlanan lipaz geninin <i>XhoI</i> ve <i>NcoI</i> kesimleri ile kontrolü	83
Şekil 29. SDS-PAGE poliakrilamid jel görüntüsü	83
Şekil 30-a. <i>B. pacificus</i> 2NP6'ya ait proteaz zimogramı	84
Şekil 30-b. <i>B. pacificus</i> 2NP6'ya ait lipaz zimogramı	84

TABLÖLER DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1.	Bakteriyel Enzimlerin Endüstriyel Alanlarda Kullanımı	2
Tablo 2.	16S rRNA Üniversal Primerleri	29
Tablo 3.	16S rRNA PZR Reaksiyon Şartları	29
Tablo 4.	Minimal Besiyeri	30
Tablo 5.	Optimum Besiyeri İçeriği	33
Tablo 6.	Enzimlerin Deterjan Olarak Kullanım Kapasitelerinin Belirlenmesi için Reaksiyon Şartları.....	42
Tablo 7.	Dizayn Edilen Ekspresyon Primerleri	44
Tablo 8.	pJet1.2 vektörüne ligasyon reaksiyon şartları.....	45
Tablo 9.	<i>Bacillus</i> cinsine ait 2NP6 izolatının ve yakın akraba olduğu <i>Bacillus</i> türlerinin 16S rRNA gen dizilerine olan benzerlik yüzdesi.....	50
Tablo 10.	Proteaz karbon kaynaklarının her iki enzim birlikte üretimine etkisi.....	53
Tablo 11.	Lipaz karbon kaynaklarının her iki enzimin birlikte üretimine etkisi	55
Tablo 12.	Eş zamanlı üretimde besiyerindeki azot kaynağının belirlenmesi.....	57
Tablo 13.	Eş zamanlı üretimde besiyerinin pH değerinin belirlenmesi.....	59
Tablo 14.	Eş zamanlı üretimde % inokülasyon miktarının belirlenmesi	60
Tablo 15.	Eş zamanlı üretimde kültürasyon şartları üzerine sıcaklığın belirlenmesi.....	61
Tablo 16.	Eş zamanlı enzim üretiminde inkübasyon süresinin belirlenmesi.....	62
Tablo 17.	<i>B. pacificus</i> 2NP6 proteazının saflaştırma tablosu	65
Tablo 18.	<i>B. pacificus</i> 2NP6 lipazının saflaştırma tablosu	65
Tablo 19.	<i>B. pacificus</i> 2NP6'dan elde edilen proteaz ve lipaz aktivitelerine metal iyonların etkisi	71
Tablo 20.	<i>B. pacificus</i> 2NP6 lipaz ve proteaz aktivitelerine organik çözücülerin etkisi ...	72
Tablo 21.	<i>B. pacificus</i> 2NP6 lipaz ve proteaz aktivitelerine ticari deterjanların etkisi.....	74

KISALTMALAR DİZİNİ

a.a	: Amino asit
Amp	: Amfisilin
<i>B. pacificus</i>	: <i>Bacillus pacificus</i>
Bcp	: <i>Bacillus pacificus</i>
BSA	: Bovin Serum Albumin
CM	: Karboksimetil
dCTP	: Deoksisitidintrifosfat
ddATP	: Dideoksiadenintrifosfat
ddH ₂ O	: Çift distile su
ddTTP	: Dideoksitimidintrifosfat
DFP	: Diizopropil florofosfat
dGTP	: Deoksiguanozintrifosfat
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DTT	: Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EDTA	: Etilendiaminotetraasetik asit
FAME	: Gliserol ve yağ asidi metil esterleri
g	: gram
Kan	: Kanamisin
kDa	: Kilodalton
LB	: Luria Bertani Broth
MCE	: Süt pıhtılaşma enzimi
mg	: miligram
mL	: mililitre
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
PMSF	: Fenilmetilsülfonil florür
PNPB	: p-nitrofenilbutirat
PNPD	: p-nitrofenildekonat

PNPL	: p-nitrofenillaurat
PNPM	: p-nitrofenilmristat
PNPO	: p-nitrofeniloctanat
PNPP	: p-nitrofenilpalmitat
PUF	: Çoklu doymuş yağ asidi
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik Asit
SDS- PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
TCA	: Trikloroasetik asit
UHT	: Uzun Ömürlü Süt
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Enzimler, belirli bir biyokimyasal reaksiyon meydana getirmek için katalizör görevi gören, canlı bir organizma tarafından üretilen biyolojik madde veya biyolojik makromoleküllerdir. Bunlar, hücre içindeki ve dışındaki biyolojik/biyokimyasal reaksiyonları hızlandırmaya yardımcı olan, kimyasal bir reaksiyondaki kimyasal katalizörler gibidir. Genellikle “biyokatalizör” olarak bilinirler (Gurung, 2015). Hücre içi ve hücre dışı aktivitelerine göre ikiye ayrılmaktadır. Sentezlendikten sonra hücrede biriken ve hücre içindeki reaksiyonları katalizleyen tipine hücre içi enzimler, sentezlendikten sonra hücre dışına salgılanan tiplerine ise hücre dışı enzimler denilmektedir. Hücre dışı enzimler, besinler hücre zarından geçemeyecek büyüklükte olduğu zaman aktivite göstermektedir ve makro molekülleri hücre zarından geçebilecek büyüklükteki mikro moleküllere parçalamaktadır. Hücre dışı aktiviteleri nedeniyle mikroorganizmalar tarafından büyük miktarlarda üretilen enzimler izole edilmekte ve çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır. Enzimlerin etkileri genellikle çok spesifik olup biyolojik aktivitelerini optimum pH ve sıcaklık değerlerinde gösterebilmektedirler. Sıcaklık, pH, enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu ve herhangi bir inhibitör ve aktivatörün varlığı, enzimatik reaksiyonların başlangıcında enzimatik varlığı etkileyebilmektedir. Enzimler endüstriyel uygulamalarda geleneksel proseslere göre daha çok tercih edilmektedir. Bunun nedeni enzimlerin katalitik güçlerinin çok yüksek olması, spesifiklikleri ve ekonomik olmalarıdır (Dayısoylu & Yeşiltoprak, 2020).

Antik çağlardan beri enzimler bira, şarap, sirke, peynir ve ekşi hamur gibi farklı gıda ürünlerinin imalatında ve deri, keten ve çivit gibi ürünlerin üretiminde kullanılmıştır (Kirk vd., 2002). Biyokataliz, aktif farmasötiklerin, zirai kimyasal ve farmasötik ara ürünlerin, kimyasalların (yeşil kimya) ve gıda bileşenlerinin endüstriyel üretiminde gerekli bir araç olarak gelişmiştir (Schoemaker vd., 2003). Son zamanlarda; gıda, yem, tarım, kağıt, deri ve tekstil endüstrileri, enzim teknolojisi için çok uygundur çünkü ürünler ve ham maddeler enzimatik işlemlerle üretilen, parçalanabilen veya değiştirilebilen biyomoleküllerden oluşur (van Beilen vd., 2002).

Enzimler, düşük pH değerleri ve sıcaklıklar altında; düşük konsantrasyonlarda hızlı ve verimli etki, yüksek substrat özgülüğü, düşük toksisite ve aktiviteyi sonlandırabilme kolaylığı gibi değerli özelliklerinden dolayı endüstride çok önemli hale gelmiştir. Bazı mikrobiyal suşlar, yüksek konsantrasyonlarda hücre dışı enzimler üretir. Endüstriyel olarak kullanılan yüz kadar enzimin yarısından fazlası mantarlardan, üçte birinden fazlası bakterilerden, geri kalanı ise hayvan (%8) ve bitki (%4) kaynaklıdır. Mikrobiyal enzimler, ucuz ortam ve kısa fermantasyon döngüleri nedeniyle büyük ölçekte ekonomiktir (Sanchez & Demain, 2011).

Enzimler kullanılarak 500'ün üzerinde ticari ürün üretilmektedir. Endüstriyel enzim pazarı; teşhis ve tedavi edici enzimler hariç, gıda %45, deterjanlar %34, tekstil %11, deri %3, kağıt hamuru ve kağıt %1,2 gibi uygulama alanlarına bölünerek 1998'de 1,6 milyar dolara kadar yükselmiştir. Endüstriyel enzim pazarı 2000 yılında 2 milyar dolara, 2003 yılında 2,3 milyar dolara, 2006 yılında 3,7 milyar dolara, 2014 yılında 4,2 milyar dolara ve 2020 yılında ise 5,9 milyar dolara kadar çıkmıştır. Dünya enzim talebinin 2003'ten 2020'ye neredeyse üç katı bir hızla büyümüş olduğu görülmektedir. 2026 yılında 11,03 milyar dolara ulaşacağı tahmin edilmektedir (Zeren, 2020; Demir 2020). Bakteriyel enzimlerin bazı uygulamaları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Bakteriyel enzimlerin endüstriyel alanlarda kullanımı

Enzim	Kaynak	Uygulama Alanı
α -amilaz	<i>Bacillus</i>	Fırıncılık endüstrisi
Asparajinaz	<i>Escherichia</i>	Farmasötik
Selülaz	<i>Clostridium</i>	Bitki atık arıtımı
Desktranaz	<i>Leuconostoc</i>	Farmasötik
Glukoz izomeraz	<i>Bacillus</i>	Fruktoz şurubu
Oksidoreduktaz	<i>Bacillus</i>	Gıda, deterjan
Penisilin amidaz	<i>Bacillus</i>	Farmasötik
Penisilin asilaz	<i>Escherichia</i>	Farmasötik
Proteaz	<i>Bacillus</i>	Deterjan
Pullulanaz	<i>Klebsiella</i>	Fırıncılık
Subtilisin	<i>Bacillus</i>	Farmasötik, deterjan

1.2. Proteazların Genel Özellikleri

Proteazlar, katalitik işlevi proteinlerin peptit bağlarını hidrolize etmek olan bir enzim grubunu ifade etmektedir. Ayrıca proteolitik enzimler veya proteinazlar olarak da adlandırılmaktadırlar (Rani vd., 2012). Proteazların fizyolojik işlevi virüslerden insanlara kadar tüm canlı organizmalar için gereklidir (Motyan vd., 2013) ve hem fizyolojik hem de ticari alanlardaki uygulamalarına göre önemli bir rol oynamaktadır (Rani vd., 2012). Proteolitik enzimler, enzimlerin hidrolaz sınıfına (EC 3) girmekte olup peptit hidrolazlar veya peptidazların (EC 3.4) alt sınıfında gruplandırılmıştır. Enzimin etki alanına bağlı olarak, proteazlar ayrıca ekzopeptidazlar veya endopeptidazlar olarak alt bölümlere ayrılabilir. Ekzopeptidazlar, substratın N- veya C-terminal uçlarına yakın peptit bağlarının hidrolizini katalize etmektedir. Endopeptidazlar, bir polipeptit zincirinin uçlarının içindeki ve uçlarından uzaktaki peptit bağlarını ayırmaktadır (Rao vd., 1998). Proteazlar, katalitik mekanizmaya ve aktif bölgedeki amino asit rezidülerinin varlığına göre aspartik proteazlar, sistein proteazlar, glutamik proteazlar, metaloproteazlar, asparagin proteazlar, serin proteazlar, treonin proteazlar ve karışık veya bilinmeyen katalitik mekanizmaya göre de sınıflandırılmaktadır (Rawlings vd., 2012). Proteazlar ayrıca aktivite gösterdikleri pH'a göre asidik (pH 2,0–6,0), nötr (pH 6,0–8,0) ve alkalın (pH 8,0–13,0) enzimler olarak sınıflandırılabilirler (Ama vd., 2018; Souza vd., 2015).

1.2.1. Proteaz Kaynakları

Çeşitli biyolojik kaynaklar içerisinde büyük oranda bulunan proteazlar, bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar gibi birçok canlı organizmaların fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri açısından büyük bir öneme sahiptirler.

Hayvansal kaynaklı en iyi bilinen proteazlar; pankreatik tripsin, kimotripsin, pepsin ve rennindir (Rani vd., 2012).

Bitkisel kaynaklı en iyi bilinen bazı proteazlar; papain, keratinaz, bromelain ve fisindir. Bitkilerin bir proteaz kaynağı olarak kullanımı, ekim için arazinin mevcudiyeti ve büyüme için iklim koşullarının uygunluğu gibi çeşitli faktörler tarafından yönetildiği için zaman alıcı bir işlemdir (Mala vd., 1998). Bitki dokusunda enzim konsantrasyonu genellikle düşük olduğundan, büyük miktarda bitki numunesinin işlenmesi gerekmektedir (Rani vd., 2012).

Bitki ve hayvan proteazlarının mevcut dünya taleplerini karşılayamaması, mikrobiyal proteazlara olan ilginin artmasına neden olmuştur. Mikroorganizmalar, geniş biyokimyasal çeşitlilikleri ve genetik manipülasyona duyarlılıkları nedeniyle mükemmel bir enzim kaynağını temsil etmektedir. Mikrobiyal proteazlar, dünya çapındaki toplam enzim satışlarının yaklaşık %40'ını oluşturmaktadır. Mikrobiyal kaynaklardan elde edilen proteazlar, biyoteknolojik uygulamalarda istenen hemen hemen tüm özelliklere sahip oldukları için bitki ve hayvan kaynaklı enzimlere tercih edilmektedir (Rani vd., 2012).

Özellikle nötr ve alkali olmak üzere çoğu ticari proteaz, *Bacillus* cinsine ait organizmalar tarafından üretilmektedir. Bakteriyel nötr proteazlar, dar bir pH aralığında (pH 5 ila 8) aktiftir ve nispeten düşük ısı toleransına sahiptir. Orta düzeyde reaksiyon hızları nedeniyle, nötr proteazlar gıda proteinlerini hidrolize ettiklerinde hayvansal proteinazlara göre daha az acılık oluşturur ve bu nedenle gıda endüstrisinde kullanım için değerlidirler. Nötr bir proteaz olan nötraz, doğal bitki proteinaz inhibitörlerine karşı duyarsızdır ve bu nedenle biracılık endüstrisinde faydalı olmaktadır. Bakteriyel nötr proteazlar, hidrofobik amino asit çiftlerine yüksek afiniteleri ile karakterize edilirler. Düşük termotoleransları, düşük derecede hidroliz ile gıda hidrolizatlarının üretimi sırasında reaktivitelerini kontrol etmek için avantajlıdır. Nötr proteazların bir kısmı metalloproteaz tipine aittir ve aktiviteleri için iki değerlikli metal iyonları gerektirirken, diğerleri şelatlayıcı ajanlardan etkilenmeyen serin proteinazlardır (Rani vd., 2012). Bakteriyel alkalin proteazlar, örneğin pH 10 gibi alkalin pH'ta yüksek aktiviteleri ve geniş substrat özgüllükleri ile karakterize edilirler. Optimum sıcaklıkları yaklaşık 60 °C'dir. Bakteriyel alkali proteazlar, yüksek üretim kapasiteleri ve katalitik aktiviteleri nedeniyle çamaşır, gıda, deri ve ipek endüstrilerinde ticari öneme sahiptir. Bakteriyel alkalin proteazlar, alkalin pH'ta (8-12) yüksek etkinlikleri ile karakterize edilirler ve optimum sıcaklıkları 50 °C ile 70 °C arasındadır. Bakteriyel alkalin proteazların bu özellikleri, deterjan endüstrisinde kullanım için uygun olmalarını sağlar (Veloortalappil vd., 2013). *Pseudomonas*, proteolitik enzim kaynağı olan Gram negatif bir bakteridir. Bu bakteri tarafından salgılanan baskın proteazlar, alkalin proteazlardır. *Pseudomonas aeruginosa* türüne ait birden fazla suştan saflaştırılmış ve karakterize edilmiş bir dizi farklı proteaz bulunmaktadır (Rani vd., 2012). Proteaz üreten bakterilerin bazıları *Bacillus subtilis* (Romsomsa vd., 2010; Santos, vd., 2018), *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus clausii*, *Bacillus halodurans*, *Bacillus lentus* ve *Bacillus*

licheniformis (Khan, 2013), *Bacillus pumilus* (Al-Qodah vd., 2013), *Bacillus circulans* (Jaswal vd., 2008) ve *Bacillus safensis*'tir (Rekik vd., 2019).

1.2.2. Proteazların Sınıflandırılması

Proteazların sınıflandırılması, kökenlerine, katalitik mekanizmalarına, özgülüklerine veya katalitik bölgedeki reaktif grubun yapısına dayanır. Polipeptit zincirleri üzerindeki etki bölgesine dayanarak, proteazlar iki gruba ayrılmakta olup bunlar ekzopeptidazlar ve endopeptidazlardır.

1. Etki Alanlarına Bağlı Olarak Proteazlar

- a. Ekzopeptidazlar: Ekzopeptidazlar, sadece polipeptit zincirlerinin uçlarına yakın hareket etmekte ve ayrıca amino veya karboksil terminalindeki hareket yerine göre amino ve karboksipeptidazlar olarak alt sınıflara ayrılmaktadır (Li vd., 2013; Singh vd., 2016).
 - Aminopeptidazlar: Aminopeptidazlar, polipeptit zincirinin serbest N ucunda hareket etmekte ve reaksiyonları sonucunda tek bir amino asit kalıntısı, bir dipeptit veya bir tripeptiti serbest bırakmaktadır. Heterolog şekilde eksprese edilen proteinlerde bulunabilen ancak doğal olarak oluşan pek çok olgun proteinde bulunmayan N-terminal Metiyoninin çıkarılmasında da aktivite göstermektedirler. Aminopeptidazlar, bakteri ve mantarları içeren çok çeşitli mikrobiyal türlerde ortaya çıkmıştır. Hücre içi enzimler olan aminopeptidazların yanında *Aspergillus oryzae* tarafından üretilen hücre dışı bir aminopeptidazda bildirilmiştir. *Escherichia coli* kaynaklı olan aminopeptidaz I, büyük bir proteazdır (400 kDa). Geniş bir pH değeri aralığında (7,5-10,5) aktivite gösterebilen *E. coli* aminopeptidazı, optimum aktivite için Mg^{+2} veya Mn^{+2} ye gereksinim duymaktadır. *Bacillus licheniformis* aminopeptidazının ise moleküler ağırlığı 34,00 kDa olup aktivitesinin ise Co^{+2} iyonları ile arttırıldığı bilinmektedir (Rani vd., 2012).
 - Karboksipeptidazlar: Karboksipeptidazlar polipeptit zincirinin C terminalleri üzerinde aktivite göstermekte olup, reaksiyon sonrasında tek bir amino asit veya bir dipeptit serbest bırakılmaktadır. Karboksipeptidazlar, enzimlerin aktif bölgesindeki amino asit

rezidülerinin doğasına bağlı olarak serin karboksipeptidazlar, metalokarboksipeptidazlar ve sistein karboksipeptidazlar şeklinde olmak üzere üç ana gruba ayrılmaktadır. *Penicillium sp.*, *Saccharomyces sp.* ve *Aspergillus sp.*'den izole edilen serin karboksipeptidazların substrat özellikleri benzer olmakla birlikte, optimum pH, stabilite, moleküler ağırlık ve inhibitörlerin etkisi gibi diğer özellikler açısından birbirlerinden ayrılmaktadırlar. Metalokarboksipeptidazlar olan *Saccharomyces sp.* ve *Pseudomonas sp.* proteazları aktiviteleri için Zn^{+2} veya Co^{+2} 'ye gereksinim duymaktadır. Enzimler ayrıca, peptidil grubunun bir pteroil yarımı veya açıl grupları ile değiştirildiği peptidleri hidrolize etmektedir (Rani vd., 2012).

- b. Endopeptidazlar: Endopeptidazlar, polipeptit zincirlerinin iç bölgelerinde her iki uç terminalinden uzakta olan peptit bağlarını kırmaktadır (Li vd., 2013). Bunlar ayrıca, katalitik mekanizmalarına bağlı olarak serin proteazlar, aspartik proteazlar, sistein proteazlar ve metalloproteazlar olmak üzere dört alt gruba ayrılmaktadır (Rao vd., 1998).
2. Katalitik Aktivitelerine Bağlı Olarak Proteazlar
- a. Serin Proteazlar: Serin proteazlar, aktif bölgelerinde bir serin grubunun varlığı ile karakterize edilmektedir. Serin proteazların tümü aktif bölgelerinde üç rezidü içerir: serin, histidin ve aspartat. Bunlar karakteristik katalitik üçlüyü oluşturmaktadır. Virüsler, bakteriler ve ökaryotlar arasında çok sayıda ve yaygın olmaları, organizmalar için hayati öneme sahip olduklarını düşündürmektedir. Serin proteazlar ekzopeptidaz, endopeptidaz, oligopeptidaz ve omega peptidaz gruplarında bulunmaktadır. Serin proteazlar genellikle nötr ve alkali pH'ta aktiftir ve optimum pH 7 ile 11 arasındadır. Esterolitik ve amidaz aktivitesi de dahil olmak üzere geniş substrat spesifikliklerine sahiptirler (Rani vd., 2012).
 - Serin Alkalın Proteazlar: Mikrobiyal alkali serin proteazlar ve serin alkali proteazlar küf, maya, bakteri ve mantarlardan elde edilebilmektedir. Bu proteazlar, Diizopropil florofosfat (DFP) veya bir başka ana proteaz inhibitörü tarafından devre dışı bırakılmaktadırlar. Hidrolize ettikleri peptit bağının karboksil tarafında tirozin, fenilalanin veya lösine sahiptirler. Çoğu alkalın proteazın optimum pH'sı 10 civarında olup ve

izoelektrik noktaları ise pH 9 civarında bulunmaktadır (Rao vd., 1998). Serin alkalın proteazların moleküler ağırlıkları 15-30 kDa aralığında olduğu bulunmuştur. Alkalın serin proteazları *Arthrobacter*, *Streptomyces* ve *Flavobacterium spp.* gibi çeşitli bakteriler tarafından üretilse de (Mienda vd.,2014) *Bacillus spp.*'nin bilinen en iyi subtilisin üreticisi olduğu bildirilmiştir (Rao vd., 1998).

- Subtilisinler: *Bacillus* orijinli subtilisinler, ikinci en büyük serin proteaz ailesini temsil etmektedir. İki farklı alkalın proteaz türü, subtilisin Carlsberg (*Bacillus licheniformis* tarafından üretilmektedir) ve subtilisin Novo veya bakteriyel proteaz Nagase, BPN9 (*Bacillus amyloliquefaciens* tarafından üretilir) tanımlanmıştır (Rani vd., 2012). Her iki enzimde, geniş substrat spesifikliğine sahip Ser221, His64 ve Asp32'den oluşan aktif bir bölgenin özelliklerini gösterir. Carlsberg enzimi, kararlılığı için Ca^{+2} 'ya bağımlı olmadığından benzersiz bir özelliğe sahiptir ve bu nedenle geniş substrat spesifikliğı bulunmaktadır. Ek olarak, subtilisinlerin aktif bölgesindeki konformasyonun tripsin ve kimotripsinine benzer olduğu, ancak bir bütün olarak moleküler düzenlemelerinde farklılıklar bulunduğu bilinmektedir (Rao vd., 1998).
- b. Aspartik Proteazlar: Asit proteazlar olarak bilinen aspartik proteazlar bir endopeptidaz çeşididir. Bu endopeptidaz çeşidinin katalitik aktivitesi yüksek korunumlu iki aspartik asit rezidülerine bağlıdır. Çoğu aspartik proteazlar asidik pH'da (pH 3 ila 4) optimum olarak aktiftir ve pH 3,0 ila 4,5 aralığında izoelektrik noktalara sahiptir. Bu proteazlar, polar olmayan amino asit rezidüleri arasındaki peptit bağlarını tercihen hidrolize etmektedir (Domingos vd., 1992). Bu proteazlar, pepstatin ve diazoketon bileşikler ile bakır iyonları tarafından inhibe edilmektedir (Singh vd., 2016).
- c. Sistein/Tiyol Proteazlar: Sistein tipi proteazlar hem prokaryotlar da hem de ökaryotlarda gözlenmektedir. Yaklaşık 20 sistein proteaz ailesi tanımlanmıştır (Barett, 1994). Sistein proteazlar, sistein ve histidinden oluşan katalitik bir ikili sayesinde aktivite göstermektedirler (Singh vd., 2016). Cys ve His (Cys-His veya His-Cys) rezidülerinin sırası aileler arasında farklılık göstermektedir (Barett, 1994). Genel olarak, sistein proteazları sadece HCN veya sistein gibi indirgeyici ajanların varlığında aktiftirler. Yan zincir özelliklerine göre, dört

büyük gruba ayrılmakta olup bunlar: (i) papain benzeri, (ii) arginin kalıntısında peptit bağı hidrolizini tercih eden tripsin benzeri, (iii) glutamik aside özgü ve (iv) diğerleri. Papain en bilinen sistein proteazdır. Sistein proteazların optimum pH'ları nötrdür, ancak bunların bir kısmı, örneğin lizozomal proteazlar asidik pH'da maksimum aktivite gösterirler. 4-kloromerküribenzoik asit (PCMB) gibi sülfidril maddelerine karşı hassastırlar, ancak DFP'den ve EDTA gibi metal şelatlama ajanlarından etkilenmemektedirler (Rani vd., 2012).

- d. Metalloproteazlar: Metalloproteazlar, katalitik proteaz tiplerinden en çeşitli olanlarıdır (Barett, 1994). Bunlardan 17'si sadece endopeptidazlar, 12'si sadece ekzopeptidazlar ve 1'i (M3) hem endo hem de ekopeptidazlar ihtiva eden yaklaşık 30 metalloprotein ailesi kabul edilmiştir. Bu enzim grubu, katalitik aktiviteleri için çinko, kobalt veya manganez gibi çift değerli metal iyonları gerektirmektedir (Vranova vd., 2013). Metalloproteazlar, 5 ila 9 arasında değişen optimum pH'a sahiptir. Bu proteazlar, şelatlama maddelerinin, katalitik mekanizmada yer alan metal iyonları üzerindeki şelatlayıcı etkisinden dolayı EDTA gibi şelatlama maddelerine karşı duyarlıdırlar ancak sistein inhibitörlerine veya sülfidril'e karşı duyarsızdırlar (Ellaiah vd., 2002). Çok çeşitli substrat spesifikliğine sahiptirler ve ilaç geliştirme de dahil olmak üzere farklı endüstrilerde çok çeşitli uygulamalar içinde yer almaktadırlar (Srilakshmi, 2014). Etkilerinin özelliğine bağlı olarak, metalproteazlar dört gruba ayrılabilir: (i) nötr, (ii) alkalın, (iii) *Myxobacter* I ve (iv) *Myxobacter* II. Nötr proteazlar hidrofobik amino asitler için spesifiklik gösterirken, alkalın proteazlar çok geniş bir spesifikliğe sahiptir.

3. Faaliyet Gösterdikleri pH aralığına Göre Proteazlar

- a. Asidik Proteazlar: Asidik proteazlar, pH 3,8 ile 5,6 arasında stabil ve aktiftir ve sıklıkla soya sosu, protein hidrolizat ve sindirim yardımcılarında ve baharat malzemesi üretiminde kullanılır. Asidik proteazların optimum pH'ı 3-4'tür ve izoelektrik noktaları 3 ile 4,5 aralığında, moleküler ağırlıkları 30-45 kDa arasında bulunmaktadır (Razzaq vd., 2019). Ayrıca asidik proteazlar, bira ve meyve suyunun temizlenmesinde, un hamurunun dokusunun iyileştirilmesinde ve fibril kasının yumuşatılmasında da kullanılmaktadır

(Zhang vd., 2010). Hücre dışı asidik proteazlar alkali proteazlarla karşılaştırıldığında çoğunlukla *Aspergillus niger* (Sielecki vd., 1991), *Aspergillus oryzae* (Yongquan, 2001), *Aspergillus awamori* (Ottesen & Rickert, 1970), *Aspergillus fumigatus* (Shinmyo vd., 1972) ve *Aspergillus saitoi* (Sodek & Hofmann, 1970) gibi mantar türleri tarafından üretilmektedir. Fungal hücre dışı asidik proteazlarının çoğu *Aspergilla opepsins* olarak bilinmektedir. Endopeptidazlar içerisinde bulunan asidik proteazlar, üç aileye ayrılmaktadır. Bunlar: pepsin (A1), retropepsin (A2) ve Pararetrovirüslerinin enzimleridir (A3) (Razzaq vd., 2019).

- b. Nötral Proteazlar: Nötral proteazlar, nötr veya zayıf asidik veya zayıf alkali pH da aktif olarak tanımlanmaktadır. Çoğunlukla nötr proteazlar *Bacillus* cinsine aittir ve pH 5 ila 8 arasında değişen, nispeten düşük bir termotoleransa sahiptir. Orta reaksiyon hızından dolayı gıda proteinlerinin hidrolizinde daha az acılık üretirler; bu nedenle, gıda endüstrisinde daha değerli olarak kabul edilmektedirler. Nötral proteazlar, bitki proteinaz inhibitörlerine karşı duyarsızlığı nedeniyle bira endüstrisi kapsamında kullanılmaktadır. Hidrofobik amino asitlere karşı yüksek afiniteye dayalı olarak, nötral proteazlar olarak tanımlanmakta ve karakterize edilmektedirler. Gıda hidrolizatının üretimi sırasında, düşük termotoleransları nedeniyle nötral proteazların reaktivitesini kontrol etmek biraz daha avantajlı olmaktadır.
- c. Alkali Proteazlar: Bu grup proteazlar, 9 ile 11 arasında değişen alkalın pH'ta aktiftir. Ticari açıdan önemli alkalın proteazlar için *Bacillus* cinsi hayati önem taşır (Razzaq vd., 2019). Alkali proteazlar hem terminal karboksil grubuna yakın olan tirozin, fenilalanin ve lösin içeren bağları, hem de aktif bölgelerinde aspartat, histidin ve serin içeren bağları hidrolize edebilirler (Gupta vd., 2002; Rao vd., 1998). Alkalın proteazlar, aktiviteleri bakımından kendilerine özgü olup farmasötik, gıda ve diğer ilgili endüstrilerdeki farklı formülasyonlarda sıkça kullanılmaktadırlar. Bununla birlikte bu farklı fomülasyonlardaki alkali pH'larını koruyabilmektedirler (Banerjee & Ray, 2017; Joo vd., 2002; Dias vd., 2008). Bu alkalın proteazların geniş bir uygulama yelpazesi bulunmakta olup benzersiz özelliklere ve önemli aktiviteye sahip yeni türler keşfetme umuduyla araştırmacıların dikkatlerini daha fazla çekmektedirler (Najafi vd., 2005; Saeki vd., 2007). Hayvan derisi

üzerindeki kıl giderimi için *Bacillus* sp.'nin istenen hidrolitik, elastolitik ve keratinolitik özellikleri sağladığı bildirilmiştir (Bhaskar vd., 2007; Deng vd., 2010; Shankar vd., 2011). *Bacillus* suşları, yüksek enzimatik aktiviteye sahip salgılanan büyük miktarda enzim ile dünya genelinde ticari olarak kullanılmaktadır (Razzaq vd., 2019).

1.2.3. Proteazların Uygulama Alanları

Proteazlar, dünya yıllık enzim pazarının yaklaşık %65'ini oluşturan hem endüstriyel hem de akademik açıdan enzimlerin en önemli gruplarından biridir (Prakasham vd., 2005). Mikrobiyal kaynaklı proteazlar, en önemli hidrolitik enzimler olarak kabul edilirken, alkalik proteazlar, enzim pazarında en yüksek sırada yer almaktadır. Proteazlar ile çalışmak, yalnızca metabolik süreçlerin düzenlenmesi nedeniyle değil endüstriyel topluluktaki önemli kullanımı nedeniyle de artmıştır (Razzaq vd., 2019). Tüm proteolitik enzimler, sıcaklık, pH, iyon gereksinimi, özgüllük, aktivite ve kararlılık açısından karakteristik özelliklere sahiptir. Bu biyokimyasal parametreler, üretim ve geliştirme maliyeti, pazarlar ve uygulama ekonomisi gibi diğer faktörlerden ayrı olarak endüstride proteaz uygulamasını belirlemektedir. Proteazların çok çeşitli endüstrilerde büyük önemi olduğu kanıtlanmıştır (Rani vd., 2012).

Enzimler, çok çeşitli lekeleri çıkarma yeteneklerinden dolayı deterjan endüstrisinde büyük ilgi görmektedir. Deterjan endüstrisi, alkalik pH aralığında çalışan birkaç hidrolitik enzim kullanmaktadır. Alkali proteaz enzimi, çamaşır deterjanlarının yanı sıra ev tipi bulaşık deterjanlarında, kontakt lens temizliğinde, kurumsal ve endüstriyel temizlik deterjanlarının formülasyonunda da kullanılmaktadır (Sharma vd., 2019). İdeal deterjan proteazları, çok çeşitli lekelerin (yiyecek, kan, çimen ve vücut salgıları) çıkarılmasını kolaylaştırmak için geniş substrat özgüllüğüne sahiptir. Yüksek pH ve sıcaklıkta, aktivite ve kararlılık, deterjana eklenen diğer şelatlayıcı ve oksitleyici ajanlarla uyumluluk, proteazların deterjanlarda kullanılmasının başlıca ön koşulları arasındadır. Bir deterjanda bir proteazın en iyi performansı için anahtar parametre onun izoelektrik noktası yani PI değeridir. Deterjan proteazlarının deterjan çözeltisinin pH değerinin enzimin PI değeri ile aynı olduğunda en iyi performansı gösterdiği bilinmektedir (Rani vd., 2012).

Metalik siyah gümüş içeren X-ışınlarının atık fotoğraf filmleri gümüşün geri kazanımı için çok iyi bir kaynaktır. Alkali hidroksitlerden ve farklı mikroorganizmalardan

Üretilen proteolitik enzimler, gmn geri kazanımı için sıyırma yöntemleriyle kullanılabilir (Wahab vd., 2017).

Gıda endüstrisinde proteazlar, fırınlama, peynir yapımı, et yumuşatma, soya hidrolizatlarının hazırlanması gibi çeşitli işlemlerde yer almaktadır (Srilakshmi vd., 2014).

Proteazlar süt endüstrisinde peynir yapımında kullanılmaktadırlar. Sütü pıhtılatıran enzimler dört ana kategoriye ayrılmaktadır: hayvansal peynir mayası, mikrobiyal süt pıhtılatırıcıları, bitkisel peynir mayası ve genetiği değitirilmi kimozi. Hem hayvan hem de mikrobiyal süt pıhtılatırıcı proteazlar, bir asit aspartat proteaz sınıfına aittir. Mikrobiyal enzimler iki önemli dezavantaja sahip olmakta olup bunlar: peynirde, yüksek düzeyde spesifik olmayan ve ısıya dayanıklı proteazların varlığı ve düşük verim nedeniyle depolamadan sonra acılık oluşmasıdır. Bu konudaki kapsamlı araştırmalar, normal pastörizasyon sıcaklıklarında tamamen inaktive olan ve çok düşük seviyelerde spesifik olmayan proteazlar içeren enzimlerin üretilmesiyle sonuçlanmıştır. Peynir yapımında, proteazların birincil işlevi, para-kazein ve makropeptitler oluşturmak için spesifik peptit bağını (Phe105-Met106 bağı) hidrolize etmektir. Kimozi, peynir yapımında mükemmelen performansından sorumlu olan kazeine karşı yüksek özgüllüğü nedeniyle tercih edilmektedir (Rani vd., 2012).

Buğday unu, pişirme işlemlerinin önemli bir bileşenidir. Unlu mamullerin özelliklerini belirleyen glüten adı verilen çözünmez bir protein içermektedir. *Aspergillus oryzae*'den elde edilen endo- ve ekzoproteinazlar, sınırlı proteoliz ile buğday gltenini modifiye etmek için kullanılmıştır. Hamurun enzimatik olarak işlenmesini kolaylaştırır ve daha geniş bir ürün yelpazesinin üretilmesine yardımcı olur (Rani vd., 2012).

Soya fasulyesi, yüksek kaliteli protein içeriği nedeniyle zengin bir besin kaynağı olarak hizmet etmektedir. Proteazlar eski zamanlardan beri soya sosu ve diğer soya ürünlerinin hazırlanması için kullanılmıştır (Rani vd., 2012).

Proteazlar biracılık endüstrisinde bulanıklığı gidermek için kullanılmaktadır (Thakur vd., 2018). Biradaki belirli proteinlerin varlığı nedeniyle donma sıcaklığında biraz puslu görünmekte ve ayrıca bu durum biranın raf ömrünü etkilemektedir. Dolayısıyla bu proteinlerin biradan çıkarılması, daha berrak görünmesine yardımcı olmaktadır (Paranthaman vd., 2009).

Protein yapılı olan serin ya da diğer adı olan ipek zambının ham ipekten uzaklaştırılması için alkali sabun çözeltisi kullanılmaktadır, bu ilemdede alkali proteazların

liflere zarar vermeden serisini uzaklaştırmak için önemli bir seçenek olduğu belirtilmektedir (Naveed vd., 2020).

Proteazlar, enfeksiyonlara neden olan çok sayıda organizmanın yaşam döngüsünde yer alan tüm canlı organizmalarda her zaman mevcuttur, bu da onları tümör, edinilmiş immün yetmezlik sendromu (AIDS), sıtma, bakteriyel enfeksiyon gibi ciddi hastalıklara karşı artan iyileştirici ajanlar için olası bir işaret haline getirmektedir. Mikrobiyal kaynaklardan üretilen proteazlar cilt ülserleri, kanser, kistik fibroz, kalp problemleri, sindirim bozuklukları ve iltihaplanma gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Chanalia vd., 2011).

Kozmetik endüstrisinde proteazlar, ciltte bulunan keratin, elastin ve kollajeni birleştiren peptit bağlarının hidrolizini katalize eder. Bromelain, papain ve daha birçok proteaz, cildin yumuşatılması ve soyulmasında kullanılmıştır (da Silva, 2017).

Proteaz, çeşitli gıda işleme endüstrilerinden ve evsel faaliyetlerden kaynaklanan atıkların yönetimi için potansiyel uygulama sağlamaktadır (Razzaq vd., 2019).

Alkalın proteaz enzimi, deri endüstrisinde geniş uygulamalara sahiptir. Deri işlemede ıslatma, tüy alma, yaralama ve tabaklama gibi farklı adımlar yer alır. Geleneksel olarak deri işleme, sodyum sülfür ve kireç gibi kimyasalların kullanımını içerir. Bu kimyasallar tehlikeli ve pahalıdır. Bu kimyasalların kullanımı, atık su bertarafında karşılaşılan sorunlar nedeniyle çevre dostu olarak görülmemektedir (Sharma vd., 2019).

Tabakhanelerde ham derinin işlenmesinde proteazlar hayati bir rol oynamaktadır. ıslatma, derilerden kan, gübre ve kirin uzaklaştırılmasını ve bazı yapısal değişiklikleri içermektedir. Deri işlemenin en etkili yolu alkali serin proteazların kullanılmasıdır. Alkalın proteazlar albümin ve globülinin çözünmesinde, kasılmış lifli proteinlerin açılmasında ve ıslatma aşamasında kiri ve fazla yağı yıkamada önemli rol oynamaktadır.

Deri tabaklanması için kullanılan geleneksel yöntem, sodyum sülfür ve hidratlı kireç kullanımını içerir ve kireç-sülfür işlemi olarak tanımlanmaktadır. Derinin et tarafına sodyum sülfür ve hidratlı kireçten yapılan bir macun sürülmektedir. Bu işlemin amacı, mukoidlerin hidrolizi, kollajen liflerinin şişmesi ve elastin sindirimi ile tüylerin alınmasıdır. Tehlikeli kimyasal bileşiklerin büyük miktarlarda salınması nedeniyle bu sürecin artık dünya çapında sakıncalı olduğu belirtilmiştir.

Çoğunlukla bakteriler tarafından üretilen ve alkalın aralıkta stabil olan proteazların, derinin tüy dökmesi ve açılması için kullanılması giderek yaygınlaşmaktadır. Enzimatik destekli tüy alma işlemleri, yüzey alanını artırmaya yardımcı olur ve derinin

temizlenmesini ve boyanmasını kolaylaştırmaktadır. Yüksek pH aktivitesine sahip olan proteazların deriye daha rahat girebiliyor olmasının, derinin temizlenmesini kolaylaştırdığı belirtilmektedir. *Bacillus subtilis*'den deri endüstrisinin tüy alma işleminde sodyum sülfidin yerini alan keratinolitik aktiviteye sahip proteazlar üretilmiştir (Sundus vd., 2016).

1.3. Lipazların Genel Özellikleri

Son yıllarda, enzimlerin çeşitli kimyasal işlemlerde daha geniş uygulamaları nedeniyle enzimoloji alanındaki çalışmalar önemli ölçüde artmıştır. Çok yönlü uygulamaları nedeniyle lipazlar; proteazlar ve amilazlardan (karbohidrazlar) sonra en çok kullanılan üçüncü enzimdir (Ülker vd., 2011). Lipaz (E.C.3.1.1.3), yağ parçalama, gliserol ester hidrolaz veya triaçilgliserol asilhidrolaz olarak da bilinir ve hidroliz reaksiyonlarını (hidrolazlar) katalize eden enzimler sınıfına ait bulunmaktadır. Lipaz, trigliseritlerin hidrolizini katalize ederek onları bir yağ-su arayüzünde gliserol ve yağ asitlerine dönüştürmektedir. Lipazlar ayrıca sulu ve susuz ortamda bu reaksiyonu tersine çevirme özelliğine sahiptir (Faouzi vd., 2015b; Lee vd., 2015; Priji vd., 2015; Ramos-Sanchez vd., 2015; Ullah vd., 2015). Bazı lipazlar, enantiyoselektif özellikler gösterirler ve esterleşme, interesterifikasyon, transesterleşme, asidoliz ve aminoliz işlemlerini katalize etmek için kullanılmaktadırlar (Hasan vd., 2009). Lipazların substratları (uzun zincirli triaçilgliseroller) suda çözünmemektedir, dolayısıyla bunlar önce organik çözücülerde çözünmekte, ardından tamponla karıştırılmaktadır (iki fazlı sistem). Ancak lipazlar suda çözünürler ve reaksiyonlarını sulu ve organik ortam olmak üzere iki tip sistemde katalize edebilmektedir. Organik çözücüler, lipaz yapısında denatürasyona neden olabilmekte ve konformasyonel değişikliklere neden olabilmektedir ve dolayısıyla fonksiyonel ve katalitik aktivitelerini etkileyebilmektedir (Borrelli & Trono, 2015).

Lipazlar, esterazların bir alt sınıfıdır ve uzun zincirli triaçil-gliseroller içermektedir. Bu triaçil-gliserollerin sudaki çözünürlüğü çok düşük olup, reaksiyonu lipid-su arayüzünde katalize edilmektedir (Aulakh & Prakash, 2010; Kumar & Kanwar, 2012, Bharathi & Rajalakshmi, 2019). Lipazlar, aşırı sıcaklık, pH ve organik çözücülerdeki yüksek stabiliteleri nedeniyle hem sulu hem de susuz ortamlarda katalizleme reaksiyonlarında oldukça etkilidir (Tan vd., 2018). Lipazların, ara yüzey aktivitesi için gerekli olan hidrofobik bir kısım içerdiği bilinmektedir (Khan vd., 2017).

Lipolitik enzimler, açılgliserolleri hidrolize eden karboksilesterazlar olarak tanımlanabilmektedir. 10 karbondan küçük zincirli yağ asitlerinin açılgliserollerini hidrolize eden enzimler, esterazlar veya karboksilaz (EC 3.1.1.1) olarak; 10 karbon ve 10 karbondan fazla zincirli yağ asitlerinin açılgliserollerini hidrolize edenler ise lipaz veya triaçilgliserol asilhidrolaz (EC 3.1.1.3) olarak tanımlanmaktadır. Esterazlar sulu çözeltilerde aktifken, gerçek lipazlar sulu fazdan ziyade lipid-su arayüzeylerinde daha aktiftir ve çoğu esteraz substratlarını hidrolize edebilmektedir (Chen vd., 2003).

Lipazlar, endüstride çeşitli biyokimyasal süreçleri teşvik etmede dikkate değer uygulamalara sahip en popüler biyokatalizörlerdir. Gıda, ilaç, deri, kozmetik, deterjan, tıbbi teşhis, süt ürünleri, içecek, yağ asidi ve kağıt endüstrileriyle ilgili çok sayıda işlemi katalize etmede başarılı oldukları görülmüştür. Çeşitli endüstriyel olarak ilgili işlemlerde biyokatalizörler olarak kullanımlarının sürekli olarak genişlemesi, lipazların üretimi için artan bir talebe neden olmaktadır. Literatür kaynaklarında, son yıllarda yıllık bazda lipazlar hakkında yayınlanan 1200'den fazla makale olduğu not edilmekte olup, bu da lipazların çeşitli yönlerini ve bunların dikkate değer uygulama potansiyellerini incelemeyi amaçlayan araştırma miktarını etkili bir şekilde göstermektedir (Sharma vd., 2016).

Lipazlar birçok bitki, hayvan, böcek ve mikroorganizma türünde tespit edilmiştir (Sahu & Martin, 2011; Sarmah vd., 2018). Lipazlar, özellikle mikrobiyal lipazlar, arzu edilen özellikleri ve ekstrem koşullarda fonksiyonel yetenekleri, organik çözücüdeki stabiliteleri, kemo-seçicilikleri, enantio seçicilikleri ve herhangi bir kofaktör gerektirmemeleri nedeniyle bitki ve hayvanlardan elde edilenlerden endüstriyel olarak daha fazla ilgi çekmiştir (Thapa vd., 2019; Ramyasree & Dutta, 2013). Biyoteknoloji alanında en önemli biyokatalizör grubu olarak kabul edilen lipazların yüksek orandaki bu çok yönlülüğü gıda, deterjan, ilaç, deri, tekstil, kozmetik, biyodizel üretimi ve kağıt endüstrileri gibi farklı endüstrilerde uygulamalarına olanak sağlamaktadır (Bharathi & Rajalakshmi, 2019). Lipazların çok spesifik kimyasal ve biyolojik dönüşüm gerçekleştirme yetenekleri, onları bu endüstrilerde giderek daha popüler hale getirmektedir (De Abreu vd., 2014; Joseph vd., 2008; Maiangwa vd., 2015).

1.3.1. Lipaz Kaynakları

Birçok biyolojik kaynaklar içerisinde bulunan lipazlar; bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar gibi birçok canlı organizmaların fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri açısından büyük bir öneme sahiptirler

Bitkilerde, lipazlar diğer kaynaklara göre tohumlarda veya tahıllarda, meyvelerde, yapraklarda bulunmaktadır. Bununla birlikte, enzimin ana kaynağı, aynı zamanda daha önemli bir hidrolitik aktivite sergileyen tohumlardır, çünkü tohumlarda genellikle bitkinin daha sonraki gelişimi için bir enerji kaynağı olacak olan büyük oranda yağ bulunmaktadır. Bitkisel lipazlar düşük üretim maliyetine sahip olup, interesterleşme reaksiyonlarında iyi bir stabiliteye sahip olmanın yanı sıra tarımsal artıkların kullanımı için iyi bir alternatif sunmaktadır (Filho vd., 2019).

Hayvansal kaynaklı lipazlar, lipazları sentezleyen spesifik hücreler tarafından veya hayvanlarda gastrointestinal kanalda bulunan ve işlevi yağların ve lipidlerin sindirimi olan diğer simbiyotik organizmalar tarafından üretilmektedir (Filho vd., 2019). Hayvansal lipazların tamamı balıklar ve memelilerden elde edilmektedir (Patel vd., 2022).

Mikrobiyal lipazlar mantar, maya ve bakteri lipazlarını içermektedir. Mikrobiyal lipazların biyoteknolojik olarak önemli olmasının nedenleri; yüksek sıcaklıklarda kararlı olmaları, geniş substrat seçiciliğine sahip olmaları, genetik manipülasyon kolaylığına sahip olmaları, organik çözücülerde kararlı olmaları, kofaktör gerektirmemeleri ile ayrıca mikroorganizmaların bol ve kolay üretilmesi ve yüksek verim olasılığıdır (Patel vd., 2022).

Bakteriyel lipazlar hücre dışı, hücre içi veya zara bağlı olarak bulunabilmektedir (Sharma vd., 2017). *Bacillus clausii* basit lipidler ve gliserol üzerinde etkin olabilen, ancak uzun zincirli trigliseritler üzerinde etki gösteremeyen, hücre içi bir lipaz iken, *Bacillus* sp. ise hem hücre dışı hem de hücre içi lipaz üretebilmektedir (Sharma vd., 2016). Birçok mikroorganizma, farklı zincir uzunluğundaki yağ asitlerini, özellikle kısa zincirli yağ asitlerini hidrolize eden birden fazla hücre dışı lipaz üretebilmektedir. Sıcaklık, pH, azot ve lipid kaynakları, inorganik tuzların konsantrasyonu ve oksijenin mevcudiyeti gibi koşulların tümü, üretilen lipaz seviyelerini ve hücre dışı lipaz aktivitesinin hücre içi lipaz aktivitesine oranını etkilemektedir (Chen vd., 2003). Lipazların çoğu glikoproteinlerdir, ancak bazı hücre dışı bakteriyel lipazlar lipoproteinlerdir. Bakteriyel lipazların bol miktarda bulunmalarının yanı sıra daha sıklıkla substrat spesifik olmadığı ve termostabil oldukları bildirilmektedir (Vaquero vd., 2016; Dhake vd., 2013).

Lipaz üreten bakteri suşları, petrol endüstrisi atıkları, bitkisel yağ işleme fabrikaları, süt fabrikaları, kağıt endüstrileri ve petrolle kirlenmiş toprak gibi farklı habitatlarda bulunmuştur. Tripathi ve arkadaşları (2014), kağıt hamuru ve kağıt fabrikası endüstrilerinden sekiz farklı lipaz üreten bakteri izole etmiştir. Son zamanlarda, Bharathi ve arkadaşları (2018), petrol dökülmüş topraktan beş farklı lipaz üreten bakteri suşu izole

etmiştir. Literatür raporlarına göre, lipaz üreten bakteri suşlarının izolasyonu için petrolle kirlenmiş bölgeler tercih edilmektedir. Ayrıca, toksik olmayan ve çevre dostu olan lipazlar, diğer kimyasal veya sentetik katalizörlere kıyasla daha uygun kabul edilmektedir. Bu nedenle gıda, süt, aroma, deterjan, ilaç, biyoyakıt ve kozmetik endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Javed vd., 2018).

Bakteriyel lipazlar arasında *Bacillus* spp. lipazları çeşitli biyoteknoloji tabanlı endüstriyel çalışmalarda onları güçlü kılan çekici özellikler göstermektedirler. *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis* (Coradi vd., 2013), *Bacillus licheniformis* (Romo-Sanchez vd., 2010), *Bacillus stearothermophilus* (El-Moniem, 2008) ve *Bacillus amyloliquefaciens* (Sangiliyandi & Gunasekaran, 1996) bakteriyel lipazların potansiyel kaynaklarıdır. Ayrıca, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas* sp. (Mirón vd., 2010), *Bacillus cepacia* (Ogino vd., 2000), *Staphylococcus pasteurii* (Sumantha vd., 2006), *Burkholderia multivorans* (Gopinath vd., 2002) ve *Staphylococcus caseolyticus* (Verma vd., 2012) bakteri lipaz üreticisi olarak da bildirilmiştir (Sztajer vd., 1998).

1.3.2. Lipazların Sınıflandırılması

Lipazların ve esterazların üç boyutlu yapısı, karakteristik α/β -hidrolaz katlanması (Ollis vd., 1992) ve belirli bir α -heliks ve β -tabaka grubunu göstermektedir. Bakteriyel lipolitik enzimler, amino asit dizilimlerindeki ve biyolojik özelliklerindeki farklılıkları göz önüne alınarak sekiz aileye (Aile I – VIII) ayrılmıştır (Arpigny & Jaeger 1999). Sekiz farklı lipolitik aileden Aile I ("gerçek" lipazlar) en büyük grubu oluşturmaktadır ve kendi içinde altı alt aileye ayrılmaktadır. Diğer gruplar ise; Aile II (GDSL [dizi motifi] ailesi olarak da adlandırılmaktadır), Aile III, Aile IV (aynı zamanda HSL [hormona duyarlı lipaz] ailesi), Aile V, Aile VI, Aile VII ve Aile VIII'dir (Arpigny & Jaeger 1999; Ramnath vd., 2016).

- a. Aile I: Yaklaşık olarak 27 üye ile yedi alt aileye bölünmüş en çok temsil edilen aile olarak bilinmektedir. Bu ailenin lipazları, bir Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly korunmuş dizisine sahip bulunmaktadır (Kanaya vd., 1998; Østerlund vd., 1996) ve genellikle uzun zincirli açıl substratları (≥ 10 C atomu) katalize etmektedirler. Gram-negatif *Pseudomonas* lipazları ve gram-pozitif *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptomyces* ve *Propionibacterium*, bu aileye ait gerçek lipazların örnekleridir (Ramesh vd., 2020; Ramnath vd., 2016; Albayati vd., 2020; Kovacic vd., 2019).

- b. Aile II: Bu ailenin üyeleri, N-terminallerinde korunmuş pentapeptit GX SXG motifi yerine modifiye tetrapeptit GDS(L) motifi sergileyen GDSL/SGNH enzimlerini içermektedir. Aile II'nin lipazları ve esterazları önemli homoloji sergileyen dört yapısal bloğa sahiptir. Bu dört bloğun her bloğunda serin, glisin, asparagin ve histidinden oluşan ve çoğunda katalitik aktivite için çok önemli olan, yani olan, korunmuş bir amino asit bölgesi tanımlanmıştır. Bu nedenle, bu enzimler SGNH hidrolazlar olarak adlandırıldı. Korunmuş amino asitlerin ilk bloğu, GDSL motifi içinde yer alan katalitik olarak aktif serini taşımaktadır (Akram vd., 2023; Kovacic vd., 2019). Klasik α/β hidrolaz katlanması ile SGNH hidrolaz katlanmasının karşılaştırılması, aktif yan oluşumunda yer alan kalıntıların farklı bir konumunu ortaya çıkarmaktadır. Bunun da katalitik üçlünün merkezi paralel β -tabakasına göre farklı bir göreceli oryantasyon oluşturduğu belirtilmiştir. α/β -hidrolazlarda katalitik üçlü, tabakaya paralel hizalanırken, SGNH hidrolazlarda neredeyse dik bir hizalanma tespit edilmiştir (Mølgaard vd., 2000, Kovacic vd., 2019). Yani tüm geleneksel lipazlarda bulunan bir yapı olan nükleofilik bir dirsek içermezler. Bir dizi alt tabakayı barındıracak şekilde kendi kendini şekillendirebilen esnek aktif bölgeleri sayesinde geniş bir alt tabaka aralığına sahiptir. Örnekler arasında *Streptomyces rimosus*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* ve *Pseudomonas putida*'dan elde edilen lipolitik enzimler yer almaktadır (Akram vd., 2023).
- c. Aile III: Aile III'ün lipolitik enzimleri, korunmuş konsensüs pentapeptit motifi GX SXG, α/β hidrolaz katlanması ve katalitik üçlü içermektedir. Çoğu, düşük sıcaklıklarda (<15 °C) yüksek aktivite sergilemektedir. Moleküler ağırlığı, 32–35 kDa ve insan trombosit aktive edici faktör asetilhidrolazın (PAF-AH) izoformlarıyla dizi homolojisine sahiptir. Bu aileye ait *Moraxella* sp., *Streptomyces albus*, *Streptomyces exfoliatus*, *Thermobifida fusca* ve *Kineococcus radiotolerans*, vb. organizmalara ait enzimler yer almaktadır (Akram vd., 2023).
- d. Aile IV: Memeli HSL'sine (Hausmann & Jaeger, 2010) yüksek sekans benzerliği nedeniyle hormona duyarlı lipaz (HSL) lipolitik ailesi (aile IV) olarak da bilinen Aile IV, altı adet karakterize edilmiş üyeye sahiptir. Bu aile, oksianyon deliği oluşumunda rol oynayan ortak GX SXG ve HGG olmak üzere yüksek düzeyde korunmuş iki konsensüs motife sahiptir (Mohamed vd., 2013). Enzimlerin bir

α/β -hidrolaz katlanması sergilediği bilinmektedir (Ngo vd., 2013). Bu aileden enzimler, *Pseudomonas* sp., *Alcaligenes eutrophus*, *Moraxella* sp. *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Escherichia coli* ve *Archaeoglobus fulgidus*'tan tanımlanmıştır (Ramnath, vd., 2016). Bu aileden bakteriyel enzimler ayrıca iki yapısal motif temelinde alt ailelere ayrılır: GDSAG ve GTSAG. Ayrıca üyeler, GSSAG, GQSAG, GDSGG, GESGG, GTSGG ve GTSTG gibi çok sayıda yapısal motif varyasyonu içermektedir (Liu vd., 2022).

- e. Aile V: Aile V, psikrofilik, mezofilik ve ayrıca termofilik türlerden kaynaklanan enzimlere sahiptir. GX SXG motifine ek olarak, bu enzimler, GDSAG (Gly-Asp-Ser-Ala-Gly) motifinin yukarısında yer alan korunmuş HGGG (His-Gly-Gly-Gly) motifi olan PTL motifini içermektedir. Kısa zincirli substratları (p-nitrofenol esterler C2–C6 ve C4 trigliseritler) tercih ederler ve arayüz aktivasyonu yerine Michaelis-Menten reaksiyon kinetiği sergilemektedirler. *Psychrobacter immobilis*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia proteamaculans* ve *Helicobacter pylori* vb. bu ailede sınıflandırılan lipolitik enzimleri üretmektedir (Ramnath vd., 2017; Kovacic vd., 2019).
- f. Aile VI: VI–VIII ailelerine ait enzimler ağırlıklı olarak esterazlardır. Bu aile, ökaryotik lizofosfolipazlarla ~ %40 sekans homolojisine sahip, 23–26 kDa moleküler ağırlıklı küçük boyutlu esterazları içermektedirler. Katalitik üçlüye ve tipik α/β hidrolaz katlanmasına sahiptirler. Kısa zincirli substratlar için özgül olup uzun zincirli trigliseridleri katalize etmezler. Örnekler arasında *Anabaena variabilis*, *Xanthomonas campestris* ve *Bordetella avium*'dan elde edilen enzimler yer almaktadır (Ramnath vd., 2016; Kovacic vd., 2019).
- g. Aile VII: Yaklaşık 55 kDa moleküler ağırlığa sahip olan ve asetilkolin esterazlara ve karaciğer/bağırsak karboksilesterazlarına yüksek sekans homolojisi sergileyen küçük bir esteraz ailesidir. Yapılarında klasik pentapeptit GX SXG'ye sahiptirler ve üyeleri arasında *Bacillus* sp., *Bacillus pumilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus stearothermophilus*, vb. kaynaklı enzimler bulunmaktadır (Ramnath vd., 2016; Kovacic vd., 2019).
- h. Aile VIII: Bu ailedeki enzimler, yaklaşık 42 kDa moleküler ağırlığa ve ek bir GX SXG konsensüs motifine sahip olarak C sınıfı β -laktamazlara benzemektedir. Ayrıca bu tip enzimleri üretebilen organizmalar genomlarında çoğu penisilin, sefoksitin, sefalotin, sefazolin vb. dirençli ajanları kodlayan ampC genini

içermektedirler. Örnekleri arasında *Pseudomonas fluorescens*, *Arthrobacter aureus*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas gingeri*, vb. kaynaklı esterazlar yer almaktadır (Akram, vd., 2023).

1.3.3. Lipazların Uygulama Alanları

Lipazlar çeşitli endüstriyel işlemlerde kullanılmaktadır. Mikrobiyal kaynaklardan elde edilen lipazlar, bitki veya hayvan kaynaklarından elde edilen lipazlara kıyasla farklı endüstrilerde büyük öneme sahiptir. Mikroorganizmalar (bakteriler gibi) kolayca üretilbildiği, istenilen özellikleri sağlamak için genetiği değiştirilebildiğinden, yüksek verim, kolay ve ekonomik işleme ile istenen ürünlerin sürekli tedariki sağlanabilmektedir. Mikrobiyal lipazlarla ilişkili üretken etkiler, pazar büyümelerini ve çeşitli endüstriyel işlemlerdeki uygulamalarını motive etmektedir (Ali vd., 2023). Biyoteknolojik bir bakış açısıyla, bakteriyel lipazlar, toplam enzim talebinin %5'ini paylaştıkları, proteazlar ve karbohidrazlardan sonra üçüncü en büyük ticari enzim grubu oldukları için endüstriyel potansiyele sahip en önemli enzimler arasında yer almaktadır (Casas-Godoy vd., 2012). Mikrobiyal lipazlar, gıda, tekstil, deri, kozmetik, kağıt, deterjan, ilaç endüstrileri gibi farklı endüstrilerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Ali vd., 2023).

Lipazlar, modern gıda endüstrisinin ayrılmaz bir parçası haline gelmiştir. Gıda endüstrisinde lipazların çeşitli uygulamaları, mikrobiyal lipazlara olan küresel talebi artırmıştır. Mikrobiyal lipazlar, bitkisel yağların hazırlanması yanında, peynirin lezzetinin iyileştirilmesinde, etin ve yağ içeren gıdaların işlenmesinde, ayrıca diğer süt ürünlerinin lezzet gelişiminde büyük önem taşımaktadır (Aravindan vd., 2007; Ali vd., 2023).

Mikrobiyal lipazlar, yağ asidi zincirinin uzunluğunu değiştiren, peynirin lezzetini artıran ve özellikle yumuşak peynir oluşumuna yardımcı olan sütteki yağların hidrolizi için yaygın olarak kullanılmaktadır (Seyed-Moslemi vd., 2021; Akram vd., 2023). Son zamanlarda, kaliteli peynirlerin hazırlanmasında bireysel mikrobiyal lipazlar veya mikrobiyal lipazların karışımları kullanılmaktadır (Mahboob vd., 2022).

Ayrıca, mikrobiyal orijinli lipazlar sıklıkla pirincin aromasını rafine etmede, elma şarabının kokusunu arttırmada ve soya fasulyesi sütünü modifiye etmede kullanılmaktadır (Adetunji & Olaniran, 2021; Medeiros vd., 2014).

Siyah çay işleme endüstrisinde lipazlar, membran lipitlerinin hidrolitik parçalanmasının uyarılması ve benzersiz bir tada sahip uçucu ürünlerin sentezinin

başlatılması için de kullanılmaktadır. Siyah çayın kalitesi, çay yapraklarının dehidrasyonuna ve enzimatik fermentasyonuna dayanır. Ramarethinam ve ark., siyah çayın aromasını arttırmak için *Rhizomucor miehei*'den mantar lipazlarının kullanıldığını bildirmiştir. Lipazlar, toplam lipid içeriğini azaltarak çoklu doymamış yağ asidi (PUF) seviyesini artırmaktadır (Ramarethinam vd., 2002).

Modern tekstil endüstrisinde, mikrobiyal lipazlar, genellikle yağ düzeltme olarak adlandırılan yağ giderme amacı için kullanılmaktadır. Yağ alma işleminde, tekstil hammaddelerinin yüzeyindeki yağ/gres uzaklaştırılarak performans ve boyama işleminin verimi artırılmaktadır (Yao vd., 2019). Benzer şekilde yün kalitesi yün yüzeyindeki yağ asitlerinin uzaklaştırılması için susuz alkalın lipaz kullanımı ve kot aşındırma sistemindeki çatlakların sınırlandırılmasıyla da artırılmaktadır (El-Fiky vd., 2022).

Lipazlar, hem kozmetik bir materyalin formülasyonunda aktif bileşenler olarak hem de kozmetikte kullanılan belirli kimyasalların sentezinde biyokatalizörler olarak önemli oldukları için, farklı kozmetik türlerinin üretiminde en önemli enzimler olarak kabul edilmektedirler. Aktif lipazlar esas olarak kozmetikte yüzeysel temizlik (Hube & Wu, 2021), selülit önleyici tedavi, genel vücut inceltme ve keratinleşmiş ölü derinin veya kirin uzaklaştırılması için kullanılmaktadır (Ali vd., 2023).

Lipazlar, kağıt endüstrisinde ham nişastanın modifikasyonunda kullanılmaktadır. Ayrıca ahşabın çözünmeyen bir bileşeni olan ve çoğunlukla trigliseritler ve mumlar içeren ziftin uzaklaştırılmasında da kullanılmaktadır (Houde vd., 2004; Joshi & Kuila, 2018). 1990'ların başından beri, lipaz, kağıt hamuru ve kağıt endüstrilerinde 'zift' veya 'reçine yapışkanlarının' çıkarılması için yaygın olarak kullanılmaktadır (Akram vd., 2023). Kağıt fabrikalarında lipazın uygulanması, hamurlaştırma oranını arttırmakta ve kimyasal kullanımını azaltmaktadır, böylece atıklardaki toksik seviyeleri azaltmakta, ekipman ömrünü uzatmakta ve bakım maliyetlerini düşürmekte, enerji tasarrufu sağlamakta ve kompozit maliyetleri düşürmektedir (Adetunji & Olaniran, 2021; Chandra vd., 2020; Mahboob vd., 2022).

Deri imalatında, derinin dış tabakası ile iç tabakası arasındaki yağ, normalde güçlü organik çözücülerle kuru temizleme yoluyla giderilmektedir. Ancak kuru temizleme işlemi pahalıdır ve cilde zarar verebilir. Yağların temizlenmesi için çeşitli deterjan türleri de kullanılmaktadır. Bu daha güvenli bir teknik olarak kabul edilir, ancak kuru temizleme kadar etkili değildir. Deri endüstrisinde lipazların kullanımı daha güvenli, daha hızlı ve daha ekonomik bir teknik olarak kabul görmektedir. Ek olarak, lipazlar dolgu ve boya

penetrasyonunu iyileştirerek deriye üniform bir görünüm vermektedir (Moujehed vd., 2022).

Enzimlerin çamaşır, bulaşık makinesi ve endüstriyel deterjanlara eklenmesi günümüzde gelişmiş ülkelerde yaygın bir uygulamadır ve ticari enzim uygulamaları için en büyük pazar olmaya devam etmektedir. Öncelikle proteazlar deterjan formülasyonlarına dahil edilmiştir. Ticari başarılarının ardından diğer enzimler de bu endüstriye girmeye başlamıştır. Günümüzde birçok deterjan, proteazlar, selülozlar, amilazlar ve lipazlar dahil Choudhury & Bhunia vd., 2015). Lipazlar, deterjan endüstrisinde çok önemli oyuncular ve toplam lipaz satışının yaklaşık %32'sini oluşturmaktadır (Ramesh vd., 2020). Ticari olarak kullanılan, lipaz enzimlerinin aşağıdaki kriterleri karşılaması gerekmektedir: (i) yüksek pH'ta stabilite ve aktivite (çünkü endüstriyel yıkamanın çoğu alkalik pH'ta gerçekleşmektedir); (ii) termostabilite; (iii) sürfaktanlar, metal iyonları, oksitleyici-şelatlayıcı ajanlar ve diğer enzimler gibi deterjan bileşenleri ile uyumluluk; (iv) geniş substrat özgüllüğü; (v) suda çözünürlük vb. (Ramesh vd., 2020, Anobom vd., 2014; Akram vd., 2023). Lipazlar; katı ve sıvı yağlar gibi sert yağ artıklarını, yaka ve manşetlerdeki lekeleri çıkarmak ve tıkanmış drenaj borularını temizlemek için deterjan katkı maddesi olarak gereklidirler (Priji vd., 2016; Mehta vd., 2021, Hasan vd., 2010). Bunların eklenmesi ayrıca deterjanı daha çevre dostu hale getirmektedir, çünkü lekeleri çıkarmak daha az zaman almakta, ve proses daha az enerji tüketmektedir, bunlara ek olarak kumaşlara yumuşaklık, anti-statiklik kazandırır ve kumaş kalitesini de korumaktadır. (Hasan vd., 2010). Birçok bakteriyel lipaz, yukarıda belirtilen kriterlere göre izole edilmiş ve test edilmiştir ve ticari olarak deterjan katkı maddeleri olarak kullanılmaktadır. 1995 yılında, Genecor International (şimdiki adıyla Du Pont), ticari potansiyeli olan iki adet lipazı piyasaya sürmüştür: *Pseudomonas alcaligenes*'ten Lipomax ve *Pseudomonas mendocina*'dan Lumafast (Sharma vd., 2014). *Burkholderia cepacia* RGP-10'dan ticari deterjanlara karşı stabilite sergileyen yeni bir lipaz bildirmişlerdir (Rathi vd., 2001; Priji vd., 2016). *Aeromonas caviae* LipT51'den elde edilen yeni hücre dışı lipazın geniş pH ve sıcaklık aralıklarında aktif olduğu ve çamaşır deterjanlarıyla birlikte kullanıldığında yüksek stabilite ve aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir (Akram vd., 2023). *Bacillus licheniformis* NCU CS-5'ten elde edilen bir başka yeni lipazın, sırasıyla 8,0 ve 40 °C optimum pH ve sıcaklığa sahip olduğu ve deterjan endüstrisinde uygulama potansiyeline sahip olduğu rapor edilmiştir. Bu enzimin, ticari deterjanların varlığında 5 saat boyunca %80 aktivitesini korumuş olduğu bildirilmiştir (Zhao vd., 2021; Akram vd., 2023).

Transesterifikasyon reaksiyonu, trigliseritleri ve kısa zincirli alkolü, aynı zamanda biyodizel olarak da adlandırılan gliserol ve yağ asidi metil esterlerine (FAME) dönüştürmek için kullanılmaktadır. Bu reaksiyon asit, alkali veya lipaz katalizli gerçekleşebilmektedir (Sharma vd., 2014; Singh vd., 2019). Sürekli artan çevresel kaygılarla, lipaz katalizli transesterifikasyon yeni bir odak noktası olmuştur. Lipaz katalizli transesterifikasyonların kimyasal katalizli transesterifikasyonlara göre birtakım avantajları bulunmaktadır. Bu avantajlar şunlardır: Reaksiyonun düşük optimum sıcaklıkta gerçekleşebilmesi (35-45 °C), yan ürün oluşmaması, kolay ürün geri kazanımı ve biyokatalizörün yeniden kullanılabilirliği (Abbaszaadeh vd., 2012).

Küresel olarak, yüzey (okyanuslar, nehirler ve göller, vb.) ve yer altı suyu kirliliğine neden olan endüstriler genel olarak, gıda, petrokimyasallar, deri gübreleri, böcek ilaçları, enerji ve güç organik kimyasalların işlenmesiyle açığa çıkan tehlikeli ve zararlı yan ürünlerdir (Szymczak vd., 2021, Basha, 2020; Akram vd., 2023). Bu kirleticileri ortadan kaldırmak için birkaç farklı yaklaşım geliştirilmiştir. Ancak, bu prosedürler etkili veya çevre dostu değildir. Kimyasal ve fiziksel işlemlerle karşılaştırıldığında, enzim bazlı biyoremediasyon, tehlikeli bileşenleri doğal ekosistemimizden uzaklaştırmak için kolayca uyarlanabilir bir yöntemdir. Bununla birlikte, bu tür enzimlerin üretim zorlukları ve fahiş maliyetleri, biyoremediasyondaki uygulamalarını sınırlandırmaktadır. Bu nedenle, biyoremediasyon için mikrobiyal enzimlerin kullanımı küresel önem kazanmaktadır (Ali vd., 2023).

1.4. Eş Zamanlı Üretim

Endüstriyel sektör başta olmak üzere; biyoteknoloji, tıbbi ve temel araştırma alanlarında geniş uygulamalara sahip olan mikrobiyal enzimler küresel enzim pazarında büyük paya sahiptir (Saxena & Singh, 2014). Bu mikrobiyal enzimlerin endüstriyel olarak üretilmesi maliyetlidir. Bu maliyeti aşmak içinse uygun mikroorganizmaların seçilerek fermantasyon koşullarının optimizasyonu gereklidir. Endüstriyel enzimlerin tek bir ekonomik üretim ortamında mikroorganizmalardan eş zamanlı üretimi de yeni bir zorluktur. Fakat artan endüstriyel enzim talebini karşılamak için, bazı enzimlerin mikroorganizmalar tarafından tek bir yetiştirme ortamında ucuz substratlarla birlikte üretilmesi gerekli hale gelmektedir (Niyonzima, 2019).

Mikroorganizmalardan endüstriyel enzim üretimi ve mikroorganizmaların kültür koşullarının optimizasyonuna yönelik bazı önemli çalışmalar bildirilmiş olmasına rağmen spesifik bir rapor bulunmamaktadır. Ancak, mikroorganizmalardan önemli miktarlarda endüstriyel enzim üretmek için kültür üretimi ve fermantasyon koşullarının optimizasyonunun yapılması gerekmektedir. Tek bir ekonomik üretim ortamında mikroorganizmalardan eş zamanlı üretimi zordur, fakat buna rağmen endüstriyel enzimler mikroorganizmalardan eş zamanlı olarak üretilmekte ve endüstride kullanılmaktadır. Nitekim bakteri veya mantarlar tarafından iki, üç veya daha fazla endüstriyel enzimin benzer koşullar altında birlikte üretilmesi halinde tüm sürecin nisbeten daha ucuz olduğu belirtilmektedir. Ayrıca eş zamanlı olarak üretilen bu enzimlerin kendi aralarında da stabil oldukları bildirilmektedir (Niyonzima, 2019).

Eş zamanlı enzim üretimi, çoklu substratlı ortam, sıcaklık, pH, nem içeriği, fermantasyon süresi ve katı hal fermantasyonunda kültür yoğunluğundan kaynaklanan karmaşık indüksiyon ve baskı modellerine sahip, büyümeyle ilişkili olmayan çok karmaşık bir süreçtir. Dolayısıyla üretim sürecinin optimizasyonu özellikle biyoteknoloji açısından önemli bir adım haline gelmektedir (Saxena & Singh, 2014).

Fermentasyon teknolojisindeki son zamanlardaki trend iki ya da daha fazla ürünün aynı anda üretilmesidir. Bu teknikte iki veya daha fazla ürün tek bir organizma tarafından aynı veya farklı şartlarda tek bir fermentasyonda üretilmektedir. Çok sayıda çalışmada bu teknik başarılı bir biçimde uygulanmıştır (Schaeffer, 1969; Hari Krishna & Chowdary, 2000; Rick & Stegbauer, 1974). Bu fermentasyon tekniğinde zaman, iş gücü ve enerji tasarrufu yapılarak minimum girdi kullanılarak, maksimum verim elde edilmektedir (Mukhtar & Ikram 2012). Farklı ürünlerin bir organizma tarafından aynı şartlar altında belli seviyelerde üretimi, birçok parametrenin dikkate alınmasını gerektirmektedir. Bu amaç doğrultusunda literatürler incelendiğinde deterjan katkısı olarak kullanım potansiyeli bulunan enzimlerin birçoğunun deterjan uyumları, karakterizasyonları ve üretimlerini konu alan çok sayıda çalışmanın bulunduğu görülmüştür. Bu enzimlerden birçoğunun *Bacillus* cinsi orijinli olduğu da tespit edilmiştir (Niyonzima & More 2014; Benkiar vd., 2013). Herhangi bir deterjana eklenen enzim, deterjanın temizleme kapasitesini artırmasına rağmen, deterjan formulasyonlarında enzimlerin kullanımı, üretim maliyetleri sebebiyle sınırlanmaktadır. Deterjanlardaki enzim kullanımının artmasına paralel olarak, bu tip enzimlerin tek bir kültüvasyonda üretimine yönelik çalışmalarda da artışlar ortaya çıkmaktadır. Rasyonel düşünüldüğünde, deterjanla uyumlu olabilecek iki, üç veya daha

fazla enzim benzer şartlar altında bir mikroorganizma tarafından üretililebilirse, bu organizmadan elde edilecek olan hücresiz süpernatant, deterjan preperasyonlarında kullanılabilir ve böylece tüm proses, scale up uygulamaları için verimli, elverişli ve kolay olur (Kumar vd., 2012; Niyonzima & More 2014; Saxena & Singh, 2014). Deterjanlarla uyumlu birkaç enzimin aynı anda aynı organizmada kullanımına yönelik çok çalışma olmamasına karşılık her bir enzimin tek tek üretimine yönelik de çok sayıda çalışma mevcuttur (Niyonzima & More 2014; Niyonzima & More 2015; Hasan vd, 2010; Niyonzima & More 2015). Literatürler incelendiğinde bir organizmada aynı anda ve ortamda oluşturulan ürünler arasında stabilite açısından bir problem olmadığı önerilmektedir. Örneğin proteolitik aktiviteye sahip proteaz enzimi normal şartlarda protein yapıdaki birçok substratı degrede edebilmektedir. Ancak birlikte üretim sürecinde üretilen birçok enzimin proteazların degradasyonuna karşı dirençli olduğu ifade edilmektedir (Caparrós vd., 2012). Ortam bileşimi optimizasyonunun rolü, farklı ortam bileşenleri arasındaki dengeyi korumak ve böylece fermantasyon işleminin sonunda kullanılmayan bileşenlerin miktarını önlemektir. Ayrıca, bakteri veya mantarlar tarafından optimum endüstriyel enzim üretimi için spesifik bir üreme ortamı olmadığını bilinmektedir. Her bakteri veya mantar türünün, endüstriyel enzimleri önemli miktarda üretmek için kendi üreme koşulları vardır. Endüstriyel enzimlerin yeterli miktarlarda üretilmesi için istatistiksel yöntemler de kullanılmaktadır. Endüstriyel enzimlerin ucuz üretilmesi için farklı endüstriyel mikroorganizmaların doğru seçimi ve fermentasyon koşullarının optimizasyonu gereklidir. Arzu edilen özelliklere sahip enzimleri elde etmek için optimize edilmiş koşullar altında mikrobiyal endüstriyel enzimlerin üretimi sürekli olarak yapılmaya çalışılmaktadır. Mikroorganizmalardan tek, ekonomik bir üretim ortamında endüstriyel enzimlerin birlikte üretilmesi de yeni bir alandır. Yapılan literatür araştırmalarında farklı çalışmalarda proteaz, lipaz, birlikte üretiminin fazla olduğu anlaşılmıştır (Sangeetha vd., 2010; Niyonzima & More, 2014). Ayrıca, deterjan uyumlu enzimlerin *Bacillus* türlerinde birlikte üretimlerinin maliyetinin ucuz olduğu ifade edilmektedir.

1.5. *Bacillus* Cinsi Genel Özellikleri ve Proteaz ve Lipaz Üretimindeki Yeri

Bacillaceae familyasına ait *Bacillus* cinsi, bu bakteri sınıfı içindeki en eski ve en çeşitli cinstir. *Bacillus* türleri Gram-pozitif, çubuk şekilli endospor oluşturmaya yeteneklidir ve

fakültatif anaeroplara veya aeroplardır. Mevcut veriler, geniş fizyolojileri, bu türlerin toprak, hava, göl çökeltileri, su ve yem dahil olmak üzere hemen hemen tüm doğal ortamların yanı sıra termal asitli su, tuzlu bataklıklar, kaplıcalar, yeraltı suları gibi aşırı ortamlarda üreyebildiğini ve kolonize olabildiğini ve yaklaşık 327 tür (LPSN www.bacterio.net) içerdiğini göstermektedir (Gopal vd., 2015).

Bacillus türleri, %35 ila %46 arasında değişen % G+C içeriği ve 3.35 ila 5.5Mb'den fazla genom boyutları ile çok yüksek bir çeşitlilik ile karakterize edilmektedirler (Alcaraz vd., 2008)

Endüstriyel bakış açısından, *Bacillus* cinsinin üyeleri önemli endüstriyel bakteriler olarak kabul edilmektedir. *Bacillus* cinsi gıda, içecek, deri, ilaç, medikal ve deterjan endüstrileri dahil olmak üzere farklı sektörlerde kullanılmaktadır. (Gupta vd., 2002, Sumantha vd., 2006). Bu cinse özel endüstriyel ilgi, kısa fermantasyon döngüleri oluşturan hızlı üreme hızları ve hücre dışı ortama önemli miktarlarda protein salgılama kapasitelerinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca, *B. subtilis* ve *B. licheniformis* suşlarına, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi tarafından GRAS (Genel Olarak Güvenli Olarak Kabul Edildi) statüsü verilmiştir (Sewalt vd., 2016). *Bacillus* türlerinin kayda değer bir endüstriyel uygulaması enzim üretimidir ve üretimlerinde kullanılan suşların çok yönlülüğü nedeniyle farklı uygulamalara sahip birkaç enzim elde edilebilir. Bunlar lipazları, karbonhidrat aktif enzimleri ve proteazları içerir. İlgilenilen enzimler arasında *Bacillus* türlerinden elde edilen proteolitik enzimler dünya pazarında önemli bir yere sahiptir (Schallmey vd., 2004).

Biyoteknolojide, homolog ve heterolog proteinler üretmek için kullanılan moleküler biyoloji teknikleriyle eş zamanlı olarak *Bacillus* türlerine olan ilgi artmıştır. 1958'in başlarında, ilk protokol Spizizen tarafından rekombinant proteinler için konakçı olarak *B. subtilis* kullanılarak tanımlandı (Rahmer & Heravi, 2015).

Literatürde, eş zamanlı lipaz ve proteaz üretimi yapılan çalışmalara bakıldığında *Bacillus* sp. türleri olduğu görülmektedir. Eş zamanlı üretim için kullanılan *Bacillus* türlerine bakıldığında *Bacillus licheniformis* VSG1'in (Sangeetha R. vd., 2010) *Bacillus pumilus* G2'nin (Sangeetha vd., 2010), *Bacillus flexus* XJU-1 (Niyonzima & More, 2014) rapor edilmiştir. Bunun yanında proteaz ve lipaz yönünden yapılan tekli optimizasyon, saflaştırma, karakterizasyon gibi çalışmaları da bulunmaktadır. Bu çalışmalarda kullanılan *Bacillus* türlerine bakıldığında, *Bacillus subtilis* PCSIRNL-39 (Mazhar vd., 2017) hücre dışı lipazı, *Bacillus methylotrophicus* PS3 lipazı (Sharma vd., 2017), *Bacillus subtilis* LP2

lipazı (Yasar vd., 2020), *Bacillus cereus* ATA179 lipazı (Demirkan vd., 2021), *Bacillus* sp. strain 42 (Eltaweel vd., 2005) lipazı, *Bacillus subtilis* E6-5 (Zeren, 2020) proteaz, *Bacillus* sp. EBTA6 proteazı (Demir, 2020), *Bacillus cereus* proteazı (Ullah vd., 2022), *Bacillus brevis* MWB-01'den elde edilen serin alkalın metalloproteazı (Olajuyigbe & Falade, 2014), *Bacillus thuringiensis* proteazı (İdil vd., 2021), *Bacillus* sp. NPST-AK15 alkali serin proteazı (İbrahim vd., 2015), *Bacillus cereus* S8 (Lakshmi vd., 2018), rapor edilmiştir. Bu bağlamda bakıldığında *Bacillus* sp. türlerinin endüstriyel alanlardaki önemini göstermektedir. Bunun yanında *Bacillus* sp. türlerinin güçlü hücre dışı lipaz ve proteaz üreticisi olarak kabul edilmektedir. Çeşitli sıcaklık, pH ve tuz konsantrasyonu aralıklarında büyüme yeteneği göstermekte olup, stabilitesinden dolayı lipazlar ve proteazlar büyük endüstriyel öneme sahiptirler (Mazhar vd., 2017; Mushtaq vd., 2023).

Bu çalışmanın amacı, ortam bileşenlerinin proteaz ve lipazın birlikte üretimi üzerindeki etkisini analiz etmek ve *Bacillus* 2NP6 suşu kullanılarak ortak bir üretim ortamında üretilen hem proteaz hem de lipazı saflaştırmak ve karakterize etmektir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Tripton (Merck), Maya özütü (Yeast Ekstrakt)(Conda), NaCl (Merck), K₂HPO₄ (Merck), 4-nitrophenyl butyrate (Sigma), 4- nitrophenyl myristate (Sigma), 4- nitrophenyl deconoate (Sigma), 4- nitrophenyl laurate (Fluka), 4- nitrophenyl octanoate (Sigma), 4- nitrophenyl palmitate (Sigma), Trizma Baz (Sigma T1503), Akrilamid (Sigma), Bis-akrilamid (Promega), Bromofenol mavisi (Gerbü), β-Merkaptoetanol (Merck), Metanol, Asetik asit (Riedel-dan Haen 27225), Gliserol (Merck), sodyum dodesil sülfat (SDS), TEMED (Janssen Chimica), Ethanol (Sigma), Skim Milk Powder (Fluka), D(+) Glukoz (Sigma), D-Fruktoz (Sigma), Pepton (Oxoid), Nutrient Borth (Merck), CaCl₂ (Merck), MgSO₄ (Sigma), KCl (Merck), CoCl₂ (Merck), ZnCl₂ (Merck), MgCl₂ (Sigma), CaCl₂ (Aktar Kimya), Glisin (Serva), Sodyum asetat (Sigma), EDTA (Merck), DTT (Gerbü), PMSF (Amresco), Tween-20 (Merck), Triton X-100 (Merck), Trichloroacetic acid (Trikloroasetik asit) (TCA) (Sigma), NaOH (Sigma), Sodyum sitrat (Horsan Kimya), DMSO (SAFC), Susam Yağı, Hindistan cevizi yağı (Shiffa Home) kimyasalları kullanılmıştır.

*Nco*I (NEB), *Xho*I (Promega) restriksiyon endonükleazları kullanılmıştır.

2.1.2. Kullanılan Mikroorganizma ve Plazmitler

2NP6 izolatu, *Escherichia coli* JM101, *Escherichia coli* BL21(DE3), pGEM-T Easy vektörü, pJET 1.2 vektörü, pET-28a(+) vektörü, pET-20b(+) vektörü.

2.2. Metotlar

2.2.1. Enzim Tarama Çalışmaları

2NP6 izolatının petride proteaz taraması için kullanılan besiyerde LB agar %10'luk UHT (Ultra Yüksek Isı) süt eklenerek hazırlandı. Hazırlanan besiyerlere 2NP6 izolatının inokülasyonu gerçekleştirildi ve 37 °C de inkübasyona bırakıldı. 3 gün boyunca kolonilerin etrafında açık zon oluşumu için inkübasyona devam edildi ve zon oluşturan suş proteaz aktivitesi pozitif olarak değerlendirildi.

2NP6 izolatının lipaz taraması için petride gerçekleştirilen testte besiyeri olarak Rhodamine B ve substrat olarak zeytinyağı içeren LB agar kullanıldı. 1 mg/mL'lik Rhodamine B, ddH₂O ile hazırlanarak filtreden geçirildi. Otoklavda steril edilen LB agar besiyeri sıcaklığı 60 °C'ye düşürüldüğünde, filtre edilmiş Rhodamine B çözeltisi ve %2,5 (w/v) olacak şekilde filtre edilerek steril edilen zeytinyağı ilave edildi ve iyice karışması için hızlı bir şekilde sallayıcıda karıştırıldı. Hazırlanan besiyerine 2NP6 izolatının inokülasyonu yapılarak 37 °C de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası UV ışık altında ışıma açısından test edildi. UV altında ışıma yapma pozitif sonuç olarak değerlendirildi.

2.2.2. Bakteri İzolatların Tanımlanması

1. 16S rRNA Geninin PZR ile Çoğaltımı: Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarı tarafından daha önce topraktan izole edilen 2NP6 izolatından, Sambrook ve arkadaşları tarafından oluşturulan yöntem ile izole edilen genomik DNA, universal 16 S rRNA ileri ve geri primerleri (Tablo 2) kullanılarak PZR aracılığı ile çoğaltıldı. PZR reaksiyonu, 12 ng kalıp DNA, 5 µl 10X PZR tamponu (100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 500 mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, 1 U Taq DNA Polimeraz, 0,25 mM ileri primeri, 0,25 mM geri primeri, 170 mM dATP, 170 mM dCTP, 170 mM dGTP, 170 mM dTTP karışımı steril ddH₂O ile 50 µl'ye tamamlandı. PZR ile çoğaltma işlemi "Biometra Personal Thermacycler" cihazı ile gerçekleştirildi. Reaksiyon süreleri ve sıcaklıkları Tablo 3'de belirtilen şartlarda gerçekleştirildi. Elde edilen PZR ürününün 5 µl'si %1'lik agaroz jelde yürütüldü, ardından, etidyum bromür (0,5 µg/mL) ile boyanarak "BIO-RAD Gel DocTM XR⁺" sistemi ile görüntülendi.

Tablo 2. 16S rRNA üniversal primerleri

26-F	5'-ATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCA-3'
1393-R	5'-ATGGTACCGTGTGACGGGCGGTGTGTA-3'

Tablo 3. 16S rRNA PZR reaksiyon şartları

Prosedür	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	95 °C	2 dakika	1
Denatürasyon	94 °C	1 dakika	36
Hibridizasyon	56 °C	1 dakika	
Uzatma	72 °C	1,5 dakika	
Son Uzatma	72 °C	5 dakika	1

2. 16S rRNA Geninin Klonlanması, Baz Dizisinin Ortaya Çıkarılması ve Gen Bank'taki Dizilerle Karşılaştırılması: PZR reaksiyonu ile çoğaltılan 16S rRNA genleri, pGEM-T Easy klonlama kiti kullanılarak, firmanın öngördüğü koşullar doğrultusunda pGEM-T Easy vektörüne klonlandı. Ardından oluşan kolonilerden rekombinant plazmitler, plazmit izolasyon yöntemi ile izole edildi. İzole edilen plazmitlerin istenilen parçayı taşıdığını teyit amaçlı *EcoRI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesim yapıldı. Kesim işlemi sonucu doğruluğu tespit edilen plazmitlerin baz dizisi, otomatik dizi analizatörleri (Macrogen, Hollanda) ile belirlendi.

2.2.3. Enzimlerin Eş Zamanlı Üretim Şartlarının Optimizasyonu

Topraktan izole edilen 2NP6 izolatının hem lipaz hem de proteaz yönünden eş zamanlı üretimini optimize etmek için bir minimal besiyeri (Tablo 4) literatür taramaları sonucunda seçildi ve seçilen besiyerinde diğer tüm faktörleri değiştirmeden her seferinde bir faktör optimize edilerek ve bir sonraki çalışmada optimize edilen şart kullanıldı.

Tablo 4. Minimal Besiyeri

Kullanılan Kimyasallar	g/L
Maya Özü	5 g
Glukoz	5 g
K ₂ HPO ₄	0,05 g
CaCl ₂	0,01 g
MgSO ₄	0,01 g

- a. Besiyeri İçeriğinin Optimizasyonu: Topraktan izole edilen 2NP6 izolatının proteaz üretiminin optimizasyonu için öncelikle en iyi üretimin gerçekleştirilecek olduğu karbon kaynağı belirlendi. Bu amaçla, seçilen minimal besiyerine karbon kaynağı olarak; Casein, D-Galaktoz, D-Glukoz, D-Fruktoz, Pepton ve Skim milk 0,5 gr/mL olacak şekilde ayrı ayrı eklendi ve besiyerinin pH'sı 7,4 olacak şekilde ayarlandı. Toplamda altı farklı karbon kaynağı ile hazırlanan besiyerleri 200 ml erlenlerde 50 mL besiyeri içerisine %2 (v/v) kültür inoküle edilerek 37 °C'de 48 saat çalkalayıcı inkübatörde inkübe edildi. Süre sonunda bir 1 mL örnek alınarak 10 000 rpm'de 5 dakika +4 °C'ye ayarlı santrifüj de çöktürme işlemi yapıldı. Çöktürme işlemi sonunda supernatant alınarak hem proteaz hem de lipaz aktivitesi bakılarak sonuç kaydedildi.

Elde edilen veriler sonucu en yüksek enzimatik aktivite veren karbon kaynağı seçilerek konsantrasyon ayarlanması yapıldı. Bunun içinde karbon kaynağından %0,5, 1, 1,5 ve 2 g/mL (w/v) oranında her bir besiyerine eklendi. Hazırlanan besiyerleri 200 mL erlende 50 ml besiyeri içerisine %2 kültür inoküle edilerek 37 °C'de 48 saat inkübe edildi ve 1 mL örnek alınarak 10 000 rpm'de 5 dakika +4 °C'ye ayarlı santrifüjde çöktürme işlemi yapıldı. Çöktürme işlemi sonunda süpernatant alınarak hem proteaz hem de lipaz aktivitesi ölçülerek sonuç kaydedildi.

Revize edilen besiyeri üzerinden lipaz için belirlenen karbon kaynağı hem lipaz hem de proteaz için uygun karbon kaynağı belirlendi. Bunun için revize edilen besiyerinin sterilizasyon aşaması sonrasında filtre ile steril edilen susam yağı, hindistan cevizi yağı ve zeytinyağından %1 (v/v) oranında aseptik koşullarda ayrı ayrı eklendi ve besiyerlerin pH'sı 7,4 olacak şekilde ayarlandı. Sterilizasyon sonrası her bir besiyerinden 200 mL'lik erlenlerde 50 mL besiyeri içerisine %2 kültür inoküle edilerek 37 °C'de 48 saat inkübe edildi Çöktürme işlemi

sonucunda süpernatant alınarak hem lipaz hem de proteaz aktivitesi ölçülerek sonuç kaydedildi.

Elde edilen ölçüm verileri sonucunda hem lipaz hem de proteaz yönünden aktivitesi en yüksek sonucu veren karbon kaynağı seçilerek konsantrasyon ayarlanması yapıldı ve bunun için filtre ile steril edilen %0,5, %1, %1,5, %2 ve %2,5 (v/v) oranında lipaz karbon kaynağı her bir besiyerine eklendi. Besiyeri içerisine %2 oranında kültür inoküle edilerek 37 °C'de 48 saat inkübe edildi. Süre sonunda her bir kültür ortamından alınan örnekler 10.000 rpm'de 5 dakika +4 °C'ye ayarlı santrifüj de çöktürme işlemi yapıldı. Çöktürme işlemi sonunda süpernatant alınarak hem lipaz hem de proteaz aktivitesi ölçülerek sonuç kaydedildi. Elde edilen sonuç doğrultusunda minimal besiyeri revize edilerek bir sonraki parametreye geçildi.

En yüksek aktivitenin sağlandığı karbon kaynağı yapılan testler sonucunda belirlenerek revize edilen besiyerinde diğer bir parametre olan azot kaynağı belirlendi. Azot kaynağı olarak; pepton, maya özütü ve triptone 0,5 g/mL ayrı ayrı besiyerlerine ilave edildi ve besiyeri pH'ları pH 7,4 olarak ayarlandı. Steril edilen besiyerleri 200 mL'lik erlenlerde 50 mL besiyeri içerisine %2 kültür inoküle edilerek 37 °C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda 10.000 rpm'de 5 dakika +4 °C'ye ayarlı santrifüjde çöktürme işlemi yapıldı. İşlem sonunda süpernatant alınarak hem proteaz hem de lipaz aktivitesi ölçüldü. En iyi aktiviteyi veren azot kaynağı belirlendi.

Ardından her iki enzim yönünden en yüksek aktiviteye sahip olan azot kaynağının konsantrasyonunun belirlenmesine geçildi. Bu konsantrasyonun belirlenmesinde 0,25, 0,5, 0,75 ve 1 g/mL oranında her bir besiyerine ilgili azot kaynağı eklendi. Hazırlanan besiyerleri 200 ml erlende 50 mL besiyeri içerisine %2 kültür inoküle edilerek 37 °C'de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda her bir kültür 10.000 rpm'de 5 dakika +4 °C'ye ayarlı santrifüjde çöktürme işlemi yapıldı. Santrifügasyon sonucunda süpernatant alınarak hem proteaz hem de lipaz aktivitesi ölçüldü. En yüksek aktivite veren azot konsantrasyonu belirlenerek besiyeri revize edildi.

Revize edilen besiyerinde diğer parametreler sabit bırakılıp, sadece pH değerleri değiştirilerek eş zamanlı üretimde bu değerlerin etkisi belirlendi. Besiyerinin pH'ı 7,4 yerine 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0, 11,0 ve 12,0 değerlerine ayarlanarak izolat 7

farklı pH'daki besiyerlerine aynı koşullarda inoküle edildi. İnkübasyon süresi sonunda santrifüj işlemi ile süpernatant alınarak lipaz ve proteaz aktivite tayin yöntemleri ile en yüksek aktiviteyi veren pH aralığı analiz edildi.

- b. Kültürasyon Şartlarının Optimizasyonu: Besiyerine yapılan inokülasyon miktarının etkisinin araştırılması için yukarıda verilen parametre şartları revize edilen besiyerine gece kültüründen %2, 3, 4 ve 5 (v/v) oranlarında inokülasyon gerçekleştirildi. İnkübasyon sonunda elde edilen kültürün santrifüjlenmesi ile elde edilen süpernatant ile lipaz ve proteaz aktivite tayin yöntemleri kullanılarak en yüksek aktivite veren oran analiz edildi.
- c. En Fazla Üretimin Olduğu İnkübasyon Sıcaklığının Belirlenmesi: Revize edilen besiyeri ve kültürasyon şartları elde edildikten sonra üretimin en iyi olduğu sıcaklığı belirlemek amacıyla 30 °C, 37 °C ve 40 °C üretim yapıldı ve üretimler sonucu çöktürme işlemi ile süpernatantlar alınarak bunlardan hem lipaz hem de proteaz aktivitesi bakıldı. Her iki enzim yönünden en yüksek aktiviteyi veren sıcaklık belirlendi.
- d. En Fazla Üretimin Olduğu Sürenin Belirlenmesi: Besiyeri, kültürasyon ve sıcaklık şartları elde edildikten sonra enzimlerin en yüksek saatte üretimin belirlenmesi için 24, 48 ve 72 saatlerde örnek alınarak, en yüksek aktivitenin olduğu saat belirlendi.

2.2.4. Enzim Üretimi

2NP6 izolatu 50 mL LB besiyerine inoküle edilerek gece boyunca üremeye bırakıldı. Elde edilen gece kültürü daha önceden belirlenen optimum inokülasyon miktarı ile optimize edilen konkamitant besiyerine aşılama yapılarak fazla miktarda üretimi sağlandı. Taze kültür 48 saat üremeye bırakıldı. İnkübasyon sonrası üretilen hücreler 10.000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek çöktürüldü ve hücre süpernatantı daha sonraki çalışmalar için elde edilerek derin dondurucuda saklandı.

Tablo 5.Optimum Besiyeri İçeriği

Kullanılan Kimyasallar	g/L
Skim Milk	10 g
Maya Özü	5 g
K ₂ HPO ₄	0,05 g
CaCl ₂	0,01 g
MgSO ₄	0,01 g
Susam Yağı	5 mL
pH	11,0

2.2.5. Enzimin Konsantre Edilmesi/Yoğunlaştırılması

Elde edilen ham protein ekstratını konsantre etmek için etanol ile yoğunlaştırma işlemi uygulandı. %95 soğuk etanol 4:1 oranında ham ekstrakta eklenerek -20 °C’de 1 saat inkübe edildi. Süre sonunda 4000 xg’de 30 dakika santrifüj edildi. Çöktürme işlemi sonunda pellet kısmı alındı. Pellet kısmı az miktarda tekrar etanol ile çözüldü ve evaporatör cihazı ile kurutma (etanol uçurma) işlemi uygulandı. Elde edilen pellet 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) tamponunda çözüldü (Parc vd., 2017). Enzimin aktivitesini koruduğundan emin olmak için süpernatanttan tekrar lipaz ve proteaz aktivitesi ölçümleri gerçekleştirildi.

Proteaz ve lipaz aktivitelerinden emin olunduktan sonra protein konsantrasyonu ile spesifik aktiviteyi belirlemek ve protein jel elektroforezinde kullanmak üzere 200 µl örnek ayrılarak enzim saflaştırma basamağına geçildi.

2.2.6. Enzimlerin Saflaştırılması

- Proteaz Enziminin Saflaştırılması: Eş zamanlı üretim sonucu elde edilen ham enzimden proteaz enziminin saflaştırılması için jel filtrasyon kolon kromatografisi yöntemi kullanıldı. Literatür incelemesi sonucu proteaz eldesi için jel filtrasyon kolon kromatografisi kullanıldığından dolayı bu yöntem seçilmiştir. Jel filtrasyon kolon kromatografisi için 50 cm uzunluğundaki ve 1,5 cm çapındaki bir kolon kullanıldı. Bu çalışmada kolon maddesi olarak Sephadex-G-150 kullanıldı. Hareketli faz olarak 20 mM Tris-HCl pH 8,0 kullanıldı. Kolon maddesinin ve saflaştırma işlemi için kullanılan tüm tamponların gazı bir vakum

pompası ile alındı ve sonrasında pastör pipeti kullanılarak kolona yavaş bir şekilde dolduruldu. Kolon 500 mL 20 mM Tris-HCl pH 8,0 tamponu ile dengeye getirildi. Ham protein ekstraktı kolondan geçirilerek içerisinde bulunan proteinlerin kolon dolgu malzemesine bağlanmaları sağlandı. Daha sonra kolondan 20 mM Tris-HCl pH 8,0 tamponu geçirilmeye devam edildi. Tamponun akış hızı 1 mL/dk olarak ayarlandı ve kolondan çıkan fraksiyonlar cam tüpler içerisinde 1 mL olacak şekilde toplandı. Tüm tüplerde proteaz taraması yapılarak aktivite veren tüpler toplandı. Bu tüpler arasından en fazla enzim bulunduranlar seçilerek birleştirildi. Birleştirilen enzim özütü vivaspin konsantrator kullanılarak 3500 g'de 15 dk santrifüj edilerek yoğunlaştırıldı ve SDS-PAGE'de saflığı kontrol edildi. Proteaz aktivitesinden emin olduktan sonra protein konsantrasyonu, spesifik aktiviteyi belirlemek ve protein jel elektroforezinde kullanılmak üzere 200 µl örnek ayrıldı.

- b. Lipaz Enziminin Saflaştırılması: Eş zamanlı üretim ile elde edilen ham enzim özütünden lipaz enziminin saflaştırılması için iyon değişim kromatografisi yöntemi kullanıldı. İyon Değişim Kromatografisi için 20 cm uzunluğundaki ve 0,75 cm çapındaki bir kolon kullanıldı. Yapılan literatür araştırmaları sonucu karboksimetil (CM) katyonik iyon değiştirici kullanıldığı saptanmıştır. Bundan dolayı çalışmada kolon malzemesi olarak katyonik iyon değiştirici olan karboksimetil (CM) kullanıldı. Hareketli faz olarak 20 mM Tris-HCl (pH 8,0) tamponu kullanıldı. Kolon malzemesinin ve deneyde kullanılan tüm tamponların gazı bir vakum pompası ile alındı ve sonrasında bir pastör pipeti kullanılarak kolona yavaş bir şekilde dolduruldu. Doldurma işlemi bittikten sonra kolon 100 mL 20 mM Tris-HCl (pH 8,0) tamponu ile dengeye getirildi. Enzim özütü kolondan geçirilerek içerisinde bulunan proteinlerin kolon maddesine bağlanmaları sağlandı. İşlem sonunda kolondan 20 mL daha tampon geçirilerek kolona tutunmayan proteinler uzaklaştırıldı. Ardından kolonun tuz (NaCl) içeriği 0 molardan 0,6 molara kadar çıkarıldı. Bunun için 80 mL'lik NaCl gradient köprüsü kullanıldı. Tamponun akış hızı 1 mL/dk olarak ayarlandı ve kolondan çıkan fraksiyonlar cam tüpler içerisinde 1 mL olacak şekilde toplandı. Elde edilen tüplerde lipaz taraması yapılarak aktivite veren tüpler toplandı. Bu tüpler arasında en iyi lipaz aktivitesi verenler seçilerek birleştirildi. Birleştirilen enzim özütü vivaspin konsantrator kullanılarak 3500 g'de 15 dk santrifüj edilerek

yoğunlaştırıldı ve SDS-PAGE'de saflığı kontrol edildi. Lipaz aktivitesinden emin olduktan sonra protein konsantrasyonu, spesifik aktiviteyi belirlemek ve protein jel elektroforezinde kullanılmak üzere 200 µl örnek ayrıldı.

2.2.7. Protein Miktarının Tayini

Bradford'un geliştirdiği yöntem ile protein miktar tayini yapıldı. 1000 mL boya solusyonu hazırlanırken 100 mg Commassie Brilliant Blue G-250 boyası önce 50 mL % 95'lik etanol içinde iyice çözülerek, üzerine 100 mL %85'lik fosforik asit eklendi. Daha sonra oluşan karışım saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti karanlık bir yerde filtre kağıdı ile filtre edildi. Bu boya ile ilk olarak BSA (Bovin Serum Albumin) kullanılarak 595 nm dalga boyunda protein konsantrasyonu standardı grafiği oluşturuldu. Standart grafik için 12, 4, 6,10, 15, 20, 40, 60, 80 µg BSA içeren çözeltiler 0,15 M NaCl ile 100 µl'ye tamamlandı. Her bir örneğin üzerine 5 mL hazırlanan boyadan eklenildi. Protein ve boya karışımları vortekslenildi ve oda sıcaklığında 15 dk bekletildi. Standart grafik oluşturulduktan sonra, örneklerin ölçümü yapılırken değişik miktarlarda örnek 0,15 M NaCl ile 100 µl'ye tamamlandı ve üzerine 5 ml boya eklendi. Protein ve boya karışımı vortekslenildikten sonra oda sıcaklığında 15 dk bekletildi. Süre sonunda standart grafiğin yüklendiği Agilent Technologies Cary 60 UV-visible Spectroscopy System cihazı kullanılarak 595 nm'de ölçümler yapıldı ve protein konsantrasyonu µg/µl cinsinden hesaplandı.

2.2.8. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Protein jel elektroforezleri C.B.S (800) 243-4959 marka elektroforez ünitesinde % 12'lik SDS-PAGE jel kullanılarak 15 mA'lık akım altında gerçekleştirildi. 2NP6 izolatında bulunan proteaz ve lipazın denatüre durumdaki moleküler ağırlığını hesaplamak ve saflığını kontrol etmek amacıyla saflaştırılan enzimler, moleküler ağırlığı belli olan bir protein markırı ile SDS poliakrilamid jel elektroforezinde yürütüldü. Her bir kuyucuğa örneklerden 50 µg protein yüklendi. Her bir örneğin üzerine eşit miktarlarda muamele (0,15 M Tris-HCl pH 6,8; % 4 SDS; %20 Gliserol; % 6 β-Merkaptoetanol) tamponu ilave edildi ve sonrasında 99°C'de 4 dakika bekletilerek Maniatis ve arkadaşları (1982)

tarafından tanımlanan %12'lik sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jeline (SDS-PAGE) yüklendi ve 15 mA akım altında, yürütme boyası jelden çıkana kadar yürütüldü. Yürütme işlemi sonrasında jel, Commasie Brilliant Blue (% 0,125 Commasie Brilliant Blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit) boyası ile 1 saat boyandı ve hemen ardından 1. yıkama solüsyonunda (%50 metanol, %10 asetik asit %40 ddH₂O) 1 saat bekletildi. Daha sonra 2. yıkama solüsyonunda (%7 asetik asit ve %5 metanol) bantlar belirginleşinceye kadar bekletildikten sonra bilgisayar tarayıcısı ile fotoğraflandı.

2.2.9. Enzimlerin Zimogram Analizi

Jelde proteaz aktivitesini belirlemek için gerçekleştirilen zimogram analizi Shams (1994) ve arkadaşları ile Twining (1993) ve arkadaşlarının belirlemiş olduğu yöntemle yapıldı. Çalışmada substrat olarak jelatin kullanıldı. %0,1 oranında jelatin içeren %10'luk SDS-PAGE jel olarak kullanıldı. Ancak kullanılan bu SDS-PAGE proteaz zimogram yönteminde, jel yürütme boya içeriğinde bulunan denatüre edici ajan olan β -Merkaptoetanol kullanılmadı ve örnekler 95 °C'de kaynatma işlemi uygulanmadı. Bu farklılıkları haricinde, normalde uygulanan SDS-PAGE yöntemi zimogram için de aynen devam ettirildi. Yürütme işleminden sonra jel, % 2,5'lik Triton X-100 ile 15 dk iki kez yıkama işlemine tabii tutuldu. Yıkama işleminden sonra jel, 24 saat 50 °C'de jelatin jel substrat tamponu (50 mM Glisin-NaOH pH 11,0, 10 mM CaCl₂, 150 mM NaCl, 1 μ M ZnCl₂) içerisinde inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda jel, Commasie Brilliant Blue (%0,125 Commasie Brilliant Blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit) boyası ile 30 dk boyandı. Boyama işlemi sonunda jelin üzerinde zon oluşuncaya kadar distile su ile yıkandı. Jelde lipaz aktivitesini belirlemek için %10'luk Native-PAGE yöntemi kullanıldı. Jel yürütme işlemi sonrasında jel naftil asetat (18 mL 0,1 M Tris-HCl pH 7,5 +8 mg naftil asetat) ve Fast Red tuzu (20 mL 0,1 M Tris-HCl pH 7,5 +20 mg Fast Red) ile muamele edildi. Jel, koyu kahverengi bant gözlemlenene kadar solüsyonda bekletildi (Borkar vd., 2009).

2.2.10. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

- a. **Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi:** Proteolitik aktivite, M. Kunitz'in kazeinolitik yöntemi ile belirlendi. Proteolitik aktivitenin belirlenmesi için substrat olarak %1'lik azokazein kullanıldı. %1 lik azokazein 0,01 gr tartılan azokazeinin 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) tamponu içerisinde çözülmesiyle elde edildi ve substrat çözeltisi taze olarak kullanıldı. Enzim reaksiyonunun sonlandırılmasında %10'luk trikloroasetik asit (TCA) kullanıldı ve 5 g TCA'nın 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) tampon içerisinde son hacim 50 mL olacak şekilde çözülmesiyle hazırlandı (Tripathi vd., 2011). Proteaz aktivitesinin ölçümünde numune ve kontrol olarak kör tüpleri hazırlandı. Numune tüpüne 50 µl ham enzim ve %1'lik hazırlanan azokazein substratı (50 µl) konulurken kontrol (kör) tüpünde ise 50 µl 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) tamponu, %1'lik hazırlanan azokazein substratı (50 µl) konuldu. Tüpler, 60 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Reaksiyonu sonlandırmak için her bir tüpe 200 µl %10'luk trikloroasetik asit eklendi ve oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. Süre sonunda kontrol ve numune tüpleri 10.000 g'de +4 °C'de 5 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonunda elde edilen 100 µl süpernatant üzerine 100 µl 1 M NaOH eklenerek 440 nm dalga boyundaki absorbans değeri, spektrofotometri ile köre karşı ölçüldü. Bir ünite proteaz aktivitesi, deney koşulları altında 1 cm'lik küvette 1,0' lik bir absorbans değişikliği üretmek için gereken enzim miktarı olarak tanımlandı. Reaksiyonun gerçekleştirildiği tüm koşullar (reaksiyon sıcaklığı, reaksiyon pH'sı, enzim miktarı) enzim karakterize edildikçe yeniden düzenlendi.
- b. **Lipaz Aktivitesinin Belirlenmesi:** Enzim aktivitesinin spektrofotometrede tayini için substrat çözeltisi; 1:4:95 (v/v/v) oranında olacak şekilde sırasıyla; asetonitrilde çözülmüş PNPB, etanol, tampon bileşenlerinden hazırlandı. Rutin çalışmalarda Agilent Technologies Cary 60 UV-visible Spectroscopy System cihazında kör olarak; 900 µl substrat çözeltisi ve 300 µl 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) tamponu, numune olarak 900 µl substrat çözeltisi, 270 µl 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) tamponu ve 30 µl enzim kullanılarak 20 dakika 60 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası bekleme yapılmaksızın önce kör ardından numune tüpleri 410 nm de ölçümleri yapıldı (Lee, vd., 1999).

Lipaz ünitesi, hazırlanan enzim özütü ile pH 8,0 ve 60 °C'de PNPB' den 1 dakikada oluşan 1 μ mol p-nitrofenolat olarak tanımlanmıştır. 410 nm de PNP'nin molar absorblama katsayısı, $1,457 \times 10^5 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ dir. Her saflaştırma basamağında elde edilen enzimin spesifik aktivitesi bu formülle hesaplandı. Reaksiyonun gerçekleştirildiği tüm koşullar (reaksiyon sıcaklığı, reaksiyon pH'sı, enzim miktarı) enzim karakterize edildikçe yeniden düzenlendi.

2.2.11. Enzim Karakterizasyonu

- a. Optimum Sıcaklık: 2NP6 izolatından elde edilen lipazın en iyi çalıştığı sıcaklık değeri standart aktivite tayin yöntemi ile 30, 40, 50, 55, 60, 70, 80 °C'ye ayarlanmış ısıtıcı bloklarda gerçekleştirildi. Bu reaksiyon serisinde enzimin çalıştığı en iyi sıcaklık değeri daha sonraki çalışmalarda kullanılacak olan reaksiyon sıcaklığı olarak belirlendi.

2NP6 izolatından elde edilen proteazın en iyi çalıştığı sıcaklık değeri standart aktivite tayin yöntemi ile 30, 40, 50, 55, 60, 70, 80 °C'ye ayarlanmış ısıtıcı bloklarda gerçekleştirildi. Bu reaksiyon serisinde enzimin çalıştığı en iyi sıcaklık değeri daha sonraki çalışmalarda kullanılacak olan reaksiyon sıcaklığı olarak belirlendi.

- b. Optimum pH: 2NP6 izolatından elde edilen lipaz enziminin aktivitesine pH'nın etkisinin araştırılması amacıyla, pH 4,0-5,0 aralıkları için 50 mM asetat tamponu, pH 6,0 için 50 mM sitrat tamponu, pH 7,0-7,5-8,0-8,5 aralıkları için 50 mM Tris-HCl, pH 9,0 için Glisin-NaOH tamponu kullanıldı. Reaksiyonlar belirlenen optimum sıcaklıkta gerçekleştirilerek, optimum pH aktivite değeri belirlendi. Belirlenen optimum pH değeri sonraki çalışmalarda reaksiyon pH'sı olarak kullanıldı.

2NP6 izolatından elde edilen proteazın aktivitesine pH'nın etkisinin araştırılması için, pH 4,0-5,0 aralıkları için 50 mM asetat tamponu, pH 6,0 için 50 mM sitrat tamponu, pH 7,0-7,5-8,0-8,5 aralıkları için 50 mM Tris-HCl, pH 9,0-10,0-11,0-12,0 aralıkları için Glisin-NaOH tamponu kullanıldı. Reaksiyonlar belirlenen optimum sıcaklıkta gerçekleştirilerek, optimum pH aktivite değeri belirlendi. Belirlenen optimum pH değeri sonraki çalışmalarda reaksiyon pH'sı olarak kullanıldı.

- c. Isıl Kararlılık: 2NP6'dan elde edilen lipazın kararlılığına ısıнын etkisini belirlemek amacıyla 30, 60, 90, 120 ve 150 dakikalık sürelerde optimum pH olan 50 mM Tris-HCl pH 8,0 tamponunda, 50 °C, 60 °C ve 70 °C'de inkübe edildi. Belirlenen sürelerde tüplerden alınan örnekler, optimum pH ve sıcaklıkta kalan aktiviteyi belirlemek için standart aktivite tayin metodu ile ölçüldü.
- 2NP6'dan elde edilen proteazın kararlılığına ısıнын etkisini incelemek için 30, 60, 90, 120 ve 180, optimum pH olan 50 mM Glisin-NaOH pH 10,0 tamponunda, 40 °C, 50 °C, 60 °C ve 70 °C'de inkübe edildi. Belirlenen sürelerde tüplerden alınan örnekler, optimum pH ve sıcaklıkta kalan aktiviteyi belirlemek için standart aktivite tayin metodu ile ölçüldü.
- d. pH Kararlılığı: 2NP6'dan elde edilen lipazın pH kararlılığını belirlemek için enzim, pH'sı 6,0 olan 50 mM sitrat tamponunda; pH'sı 7,0 ve 8,0 olan 50 mM Tris-HCl ve pH'sı 9,0 olan 50 mM Glisin-NaOH tamponunda, 60, 120, 240, 480 ve 1440 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sırasında belirlenen sürelerde kalan aktiviteyi belirlemek için, optimum pH ve sıcaklıkta standart aktivite metodu ile ölçüldü.
- 2NP6'dan elde edilen proteazın pH kararlılığını belirlemek için enzim, pH'sı 7.0 ve 8,0 olan 50 mM Tris-HCl tamponlarında, pH'sı 9,0, 10,0, 11,0 ve 12,0 olan 50 mM Glisin-NaOH tamponunda 30, 60, 90, 120, 180 ve 1440 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sırasında belirlenen sürelerde kalan aktiviteyi belirlemek için, optimum pH ve sıcaklıkta standart aktivite metodu ile ölçüldü.
- e. Substrat Spesifikliğı: 2NP6 izolatından elde edilen lipazın substrat spesifikliğıfarklı zincir uzunluğundaki pNP esterleri olan *p*-nitrofenilbütirat (4C), *p*-nitrofeniloktanat (8C), *p*-nitrofenildekonat (10C), *p*-nitrofenillaurat (12C) *p*-nitrofenilmiristat (14C) ve *p*-nitrofenilpalmitat (16C) substratları kullanılarak optimum pH ve sıcaklıkta standart aktivite metodu ile ölçülerek ortaya çıkarıldı.
- f. Metal İyon Etkisi: 2NP6 izolatından elde edilen lipaz ve proteaz aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi; Zn^{+2} , Co^{+2} , Mg^{+2} , Ca^{+2} ve K^{+} metal iyonlarının klorür tuzları ile gerçekleştirildi. Enzimlere ilave edilen 1 mM ve 5 mM metal iyonları 1 saat lipaz için 60 °C'de, proteaz için 55 °C'de inkübe edildi. İlgili metal iyonları ile birlikte bekletilen enzimlerin aktiviteleri inkübasyon süresi sonunda optimum pH ve sıcaklıkta standart aktivite metotları ile ölçüldü. Her iki enzimin

metalsiz hali 100 kabul edilerek metal içeren enzimlerin % kalan aktivitesi hesaplandı.

- g. İnhibitör ve Aktivatörlerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi: 2NP6 izolatından elde edilen lipaz ve proteaz aktivitesi üzerine inhibitör ve aktivatörlerin etkileri incelendi. Hem lipaz hem de proteaz, 5 mM EDTA, DTT, PMSF; %1 (v/v) DMSO, β - Merkaptotanol, etanol; %0,1 (v/v) SDS, Tween-20, Triton X-100 içerecek şekilde proteaz için 55 °C de ve lipaz için ise 60 °C de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda kalan aktivite, her iki enzimin kendi optimum pH ve sıcaklıklarında standart aktivite tayin metodu ile ölçüldü. Enzimlerin kimyasalları içermeyen hali 100 kabul edilerek kimyasalları içeren enzimin % kalan aktivitesi hesaplandı.
- h. Deterjan stabilitesi: Ticari deterjanların 2NP6 izolatından elde edilen lipaz ve proteaz aktivitesi üzerine etkileri incelendi. Ticari deterjan olarak; OMO, Bingo ve BORON kullanıldı. Her bir ticari deterjan 5 mg/mL olacak şekilde hazırlandı. Ticari deterjanların içerisinde olması muhtemel olan proteaz ve lipaz enzimleri 60 °C'de 1 saat inkübe edilerek inaktive edildi. Ardından 50 μ l enzim (lipaz/proteaz) ve 50 μ l inaktive edilmiş ticari deterjan birleştirilerek her bir enzim kendisine ait optimum sıcaklıkta 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda her bir enzim kendi standart aktivite tayin metodu ile aktivitesi ölçüldü.
- i. Kinetik Parametreler: 2NP6 izolatından eş zamanlı üretim sonucu saflaştırılarak elde edilen proteaz ve lipazın kinetik parametrelerini belirleyebilmek amacıyla, lipaz enzimi için 25-600 μ M arasındaki *p*-nitrofenilbütirat substrat konsantrasyonları ile pH 8,0 olan 50 mM Tris-HCl tamponu kullanılarak 60 °C'de, proteaz enzimi için ise 1-40 mg/mL arasındaki azokazein substrat konsantrasyonları ile pH 10,0 olan 50 mM Glisin-NaOH tamponu kullanılarak 55 °C'de, bir seri reaksiyon gerçekleştirildi. Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) değerleri hazırlanan Lineweaver–Burk eğrisinde x ve y eksenlerini kestiği noktalara karşılık gelen değerlerin tersi olarak belirlendi (Lineweaver & Burk, 1934).

2.2.12. Endüstriyel Alan Çalışmaları

- a. Proteaz Enziminin Dehairing (Deriden Kıl Giderimi) Kapasitesinin Belirlenmesi: 2NP6 izolatından elde edilen proteaz enziminin, ham ve saflaştırılmış konsantre hallerinin dana derisinden kıl giderme potansiyeli belirlendi. Kıl yoğunluğunun fazla olduğu deri bölgesi seçilerek kullanıldı. Deriler öncelikle alt tabakada bulunan et parçaları temizlenerek musluk suyu ile yıkandı ve her bir deney grubu için $3 \times 3 \text{ cm}^2$ parçalara ayrıldı. Ham enzim uygulanan deri örneği, içerisinde 30 mL ham enzim bulunan petriye, derinin kıllı yüzeyi petri tabanına bakacak şekilde yerleştirildi. Saflaştırılma sonrası konsantre edilen enzim ise 50 mM Glisin-NaOH pH 10,0 tamponu içerisine %2 enzim ilave edilerek hazırlanan petriye, derinin kıllı yüzeyi petri tabanına bakacak şekilde yerleştirildi. Kontrol grubu olarak 50 mM Glisin-NaOH pH 10,0 olan tamponu bulunan petriye deri batırıldı. Deney grupları kıl dökümü olana kadar oda sıcaklığında inkübe edildi. Deney gruplarında kıl dökülmesi olup olmadığı belli aralıklar ile kontrol edildi. İşlem sonunda tüyleri alınmış deriler; tüy dökümü ve beyazlık yönünden incelendi.
- b. Enzimlerin Deterjan Katkısı Olarak Kullanım Kapasitelerinin Belirlenmesi: 2NP6'dan elde edilen proteaz ve lipazın deterjan katkısı olarak kullanım kapasitelerinin belirlenmesi için iki farklı deney ortamı tasarlandı. Proteaz deneyi için 10 µl kan emdirilmiş $3 \times 3 \text{ cm}^2$ boyutlarında beyaz pamuklu kumaş parçaları kullanıldı. Hazırlanan örnek kumaşların üzerindeki lekeleri zorlaştırmak amaçlı 90 °C 10 dk bekletildi. Süre sonunda deneydeki gerekli örnek kaplarına 600 µl saflaştırılmış proteaz enzimi direkt olarak distile su içerisine ilave edildi ve yine gerekli örnek kaplarına 5 mg/mL olacak şekilde distile su ile çözündürülen ticari deterjan ilave edildi.
Lipaz deneyi için 10 µl zeytinyağı emdirilmiş $3 \times 3 \text{ cm}^2$ boyutlarında mavi pamuklu kumaş parçaları kullanıldı. Yumurta sarı ile lekelen dirilen $3 \times 3 \text{ cm}^2$ boyutlarındaki beyaz pamuklu kumaş parçaları kullanıldı. Deneydeki gerekli örnek kaplarına 600 µl saflaştırılmış lipaz enzimi direkt olarak distile su içerisine ilave edildi ve yine gerekli örnek kaplarına 5 mg/mL olacak şekilde distile su ile çözündürülen ticari deterjan ilave edildi. Her iki deney düzeneği aşağıdaki Tablo

6'daki gibi yapıldı. Tüm deney düzenekleri optimum sıcaklıklarında 30 dk çalkalayıcı inkübatörde (120 rpm) inkübe edildi.

Tablo 6. Enzimlerin deterjan olarak kullanım kapasitelerinin belirlenmesi için reaksiyon şartları

	PROTEAZ DENEYİ	LİPAZ DENEYİ	
KONTROL	Kan+ 30 mL Distile Su	Zeytinyağı+ 30 mL Distile Su	Yumurta Sarısı+ 30 mL Distile Su
1.ÖRNEK	Kan + Ticari deterjan+ 30 mL Distile Su	Zeytinyağı + Ticari deterjan+ 30 mL Distile Su	Yumurta Sarısı+ Ticari deterjan + 30 mL Distile Su
2.ÖRNEK	Kan + 600 µl enzim özütü + 30 mL Distile Su	Zeytinyağı + 600 µl enzim özütü + 30 mL Distile Su	Yumurta Sarısı + 600 µl enzim özütü + 30 mL Distile Su
3.ÖRNEK	Kan + 600 µl enzim özütü + Ticari deterjan + 30 mL Distile Su	Zeytinyağı + 600 µl enzim özütü + Ticari deterjan + 30 mL Distile Su	Yumurta Sarısı + 600 µl enzim özütü + Ticari deterjan + 30 mL Distile Su

- c. Proteaz Enziminin Süt Koagülasyonunda Kullanımı: 2NP6'dan elde edilen proteazın süt pıhtılaşma aktivitesinin belirlenmesi, Merheb-Dini ve arkadaşlarına (2010) göre UHT süt kullanılarak yapıldı. Kontrol tüpünde yalnızca süt olmak koşuluyla, 2 ml süt içeren her bir deney tüpüne son hacim 20, 30, 40, 50 ve 100 mM olacak şekilde CaCl_2 eklendi. CaCl_2 ilaveli süt bulunan deney tüpleri 37 °C'ye gelinceye kadar çalkalayıcı inkübatörde (120 rpm) inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kontrol hariç her bir tüpe 200 µl enzim ilave edilerek, tüpler vortekslendi. Ardından 37 °C'de çalkalayıcı inkübatörde inkübasyona bırakılan tüplerin pıhtılaşma süreleri kronometre ile takip edildi. Bir süt pıhtılaşma ünitesi (U), 37 °C'de 40 dakika içinde 1 mL substratı pıhtılaştırmak için gereken enzim miktarı olarak tanımlandı. Tüplerdeki pıhtılaşma aktiviteleri Shata'nın (2005) belirlediği $(U) = 2400/T \times S/E$ formül ile hesaplandı. Burada T; pıhtı oluşumu için gerekli süreyi, S; süt hacmini ve E; kullanılan enzim hacmini göstermektedir.

2.2.13. Tüm Genom Analizi

2NP6 izolatına ait tüm genom dizisi MicrobesNG servisinden hizmet alımı yardımıyla elde edildi. Tüm genom analizi yapılacak olan 2NP6 izolatının genomik DNA izolasyonu, Promega Genomik DNA İzolasyon Kiti kullanılarak yapıldı, izolasyonun son aşamasında Elution Buffer yerine, Tris-HCl kullanıldı. Nanodrop ile konsantrasyonu ve

saflığı belirlenerek stok tüpleri içerisinde, firmadan tedarik edilen barkot tüpe yapıştırılarak MicrobesNG (UK) servisine gönderildi.

Illumina HiSeq 2500 yeni nesil dizileme platformu kullanılarak, izolatin genom dizi analizi gerçekleştirildi. Minimum 30x kapsama alanı ve 250 bp eşleştirilmiş sonlanma protokolü ile dizilenen sekanslarda yer alan adaptör molekülleri Trimmomatic 0.30 kullanılarak kesildi (Bolger vd, 2014). Buna ek olarak, NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) yardımı ile adaptörlerin belirlenmesi ve kesilmesi sağlandı. MicrobesNG servisinde basit biyoinformatik analizler kapsamında SPAdes sürüm 3.7 (Bankevich vd, 2012) kullanılarak birleştirildi ve kontekstler Prokka 1.11 (Seemann, 2014) ile yapıldı. Ayrıca MicrobesNG servisi tarafından elde edilen organizmalara ait fastq uzantılı okuma dosyaları kullanılarak Patric Server (Wattam vd, 2017) ile birleştirme yapıldı. Kaynak olarak yakın akraba türlerinin genomları kullanılarak, izolata ait kontik sayıları Medusa web server (Bosi vd, 2015)'da sıralanarak izolatin kontik sayıları ve sonuç olarak izolata ait elde edilen kontik sayıları azaltıldı. Elde edilen genom dizinleri ve bu dizinlerin işlevleri hakkında ayrıntılı bilgiler RAST Server (Brettin vd, 2015) veri tabanında analiz edildi. Bu veri tabanı ile organizmaya ait; RNA ve protein sayıları, genomunun uzunluğu, sahip olduğu kontik sayısı, içerdiği G+C oranı gibi veriler bulunmaktadır. Ayrıca bu bilgilerden genoma ait her bir genin dizinlerine de ulaşılabilmektedir. İzolatin yakın akraba türlerinin genom verisi; Genom Portal (URL-1, 2019), NCBI (URL-2, 2019) ve Patric Server (Wattam vd, 2017) veritabanları kullanılarak sonuçlandırıldı. Genom sekansına dayalı filogenetik ağaçlar CSIPhylogeny (Kaas vd, 2014), Realphy (Bertels vd, 2014), Type Strain Genome Server (Meier-Kolthoff & Göker, 2019) ve Patric Server (Wattam vd, 2017) veritabanları ile ortaya çıkarıldı.

2.2.14. Lipaz ve Proteaz Genlerinin Dizinlerinin Belirlenmesi

Üzerinde çalışmalar gerçekleştirilen her iki enzim de üretilen bakteri kültürünün süpernatant kısmından yani hücre dışından elde edildiği için tüm genom analizi sonucu elde edilen verilerden her iki enzim için hücre dışı ortama, enzimleri yönlendirebilecek dizilere sahip lipaz ve proteazlar öncelikle analiz edildi. Karakterizasyon çalışmaları ile edilen bilgiler doğrultusunda proteaz için metalloproteaz enzimleri üzerinde yoğunlaşıldı. Bu analizlere göre izolata ait genom sekansında hedef olabilecek lipaz ve proteaz sekansları toplandı. Genlere ait protein sekanlarının eldesi uygun biyoinformatik metotlar

ile sağlandı. Ardından, tüm dizilerin Expasy Bioinformatics Resource Portal online programı ile moleküler ağırlıkları ve izoelektrik noktaları belirlenerek daha önce gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmalarından elde edilen veriler çerçevesinde istenilen diziler seçildi.

Yapılan analizler sonucunda üretim optimizasyonu sonrasında karakterize edilen enzimlere ait genler olduğu kabul edilen 2NP6 izolatına ait lipaz ve proteaz (metalloproteaz) genlerinin çoğaltılması için uygun primerler dizayn edildi. Bu primerler, tüm genom analizi sonucu seçilen dizinler baz alınarak dizayn edildi.

Proteaz için elde edilen gen dizisinin, pET-20b(+) ekspresyon vektörüne klonlanmasına karar verildi ve ekspresyon primerleri dizayn edilirken gerekli restriksiyon enzim kesim bölgeleri primerlere ilave edildi. Lipaz gen dizisi için ise, pET-28a(+) ekspresyon vektörüne klonlanmak üzere, gerekli kesim bölgelerini içeren ekspresyon primerleri dizayn edildi. Ekspresyon sonrası enzimlerin kolay saflaştırılabilmesi için, her iki enzimin primerinde klonlamadan sonra N terminal bölgesine His-Tag kuyruğu yerleştirilecek şekilde tasarlandı. Proteaz ve lipaz için primer çiftleri oluşturulurken, ileri primerine *NcoI* enzimi kesim bölgesi, geri primerine ise *XhoI* enzimi kesim bölgesi eklendi. Tasarlanan primer çiftleri Tablo 7’de belirtilmiştir.

Tablo 7. Dizayn edilen ekspresyon primerleri

Primer Adı	DNA Sırası (5’-3’)	Baz Büyüklüğü (nt)
ZincMetF	5’- <u>CCA Tgg</u> ATg TAg CAT ATA AAT TTg g-3’	25 nt
ZincMetR	5’- <u>CTC gAg</u> TAC AAg gCC AAA AAT Agg C-3’	25 nt
GDSLipF	5’- <u>CCA Tgg</u> gCT ATT TTg AAA AgA ACg ATg AgA C-3’	31 nt
GDSLipR	5’- <u>CTC gAg</u> ATA TTT gTA ggC CAA CAC-3’	24 nt

2.2.15. Lipaz ve Proteaz Genlerinin PZR ile Çoğaltılması

Sambrook ve arkadaşlarının (2001) yöntemine göre izole edilen genomik DNA’dan proteaz için ZincMetF- ZincMetR primer çifti, lipaz için ise GDSLipF- GDSLipR primer çifti kullanılarak PZR reaksiyonu gerçekleştirildi. PZR reaksiyonlarında, 12 ng kalıp DNA, 5 µl 10X PZR tamponu (100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 500 mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, 1 U Taq DNA Polimeraz, 0,25 mM ileri primeri, 0,25 mM geri primeri, 170 mM dATP, 170

mM dCTP, 170 mM dGTP ve 170 mM dTTP karışımı steril ddH₂O ile 50 µl'ye tamamlandı.

Proteaz geninin çoğaltılmasında kullanılan PZR şartları; 95 °C'de 2 dk'lık ilk denatürasyon basamağından sonra 36 döngü; 94 °C'de 45 sn denatürasyon, 52 °C'de 30 sn bağlanma (annealing), 72 °C'de 45 sn yeni sentezlenen DNA zincirinin uzatılması (extention) ve son basamak 72 °C'de 7 dk olacak şekilde gerçekleştirildi.

Lipaz geninin çoğaltılmasında kullanılan PZR şartları; 95 °C'de 2 dk'lık ilk denatürasyon basamağından sonra 36 döngü; 94 °C'de 45 sn denatürasyon, 55 °C'de 30 sn bağlanma (annealing), 72 °C'de 45 sn yeni sentezlenen DNA zincirinin uzatılması (extention) ve son basamak 72 °C'de 7 dk olacak şekilde gerçekleştirildi. PZR reaksiyonları sonucunda elde edilen PZR ürünleri, %0,7'lik agaroz jelde uygun DNA markırları kullanılarak elektroforoze tabii tutuldu ve görüntülendi.

2.2.16. Lipaz ve Proteaz Genlerine Ait PZR Ürünlerinin pJET 1.2 TA Klonlama Vektörüne Klonlanması

PZR reaksiyonları ile elde edilen DNA fragmentleri, baz dizilimi belirlenmesi için, pJet 1.2 klonlama vektörü ile Thermo Fisher Scientific firmasının öngördüğü şartlar ile ligasyon gerçekleştirildi. Ligasyon şartı Tablo 8'de belirtildiği şekliyle yapılarak, transformasyon ile *E.coli* JM101 hücrelerine aktarıldı.

Tablo 8. pJet 1.2 vektörüne ligasyon reaksiyon şartları

2X Reaksiyon Tamponu	10 µl
DNA Blunting Enzim	1 µl
Kalıp DNA	3 µl
ddH ₂ O	4 µl
Tüm bileşenler bir tüpün içinde karıştırılarak 3-5 sn santrifüj yapıldı. 70 °C'de 5 dk inkübe edildi. Inkübasyon sonrası buza alındı. Bu aşamadan sonraki işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi.	
pJET1.2/blunt Cloning Vector (50 ng/µl)	1 µl
T4 DNA Ligaz	1 µl
Toplam hacim	20 µl
Tüp bileşenler karıştırıldıktan sonra 30 dk oda sıcaklığında bekletildi. Ardından transformasyon işlemine geçildi.	

Transformasyon için; 200 µl kompetan konak hücresi içeren santrifüj tüpüne, 20 µl ligasyon ürünü eklendi ve 30 dk. buz üzerinde bekletildi. Inkübasyon sonunda numune, 42

°C'lik ısıtıcı blokta 2 dk. bekletildi ve süre sonunda her bir tüpe 200 µl LB sıvı besiyeri eklendi. Numuneler, 37 °C'de 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda, 50 µg/mL ampisilin içeren LB agar petrilere yayılarak, 37 °C'de bir gece inkübe edildi (Sambrook vd., 1989). İnkübasyon sonucunda oluşan kolonilerin rekombine olmuş plazmitleri içeren koloniler olduğu kabul edilmektedir. Zira, pJET 1.2 çoklu klonlama bölgesinde letal bir gen içermektedir. Klonlamanın başarılı olduğu ve letal genin bütünlüğünün bozulduğu durumda koloniler oluşmakta aksi takdirde ise koloni oluşumu gözlenmemektedir. Bekleme süresi sonunda petrilere meydana gelen kolonilerden seçilerek plazmit izolasyonu yapıldı. Klonlama işleminin başarılı olup olmadığını kontrol etmek için *Bgl*III restriksiyon enzimi ile kesim gerçekleştirildi. Elde edilen restriksiyon enzimi kesim ürünleri %0,7'lik agaroz jelde elektroforeze tabii tutularak analiz edildi ve doğruluğu teyit edilen klonların baz dizisi, sekanslama (Macrogen, Hollanda) ile belirlendi.

2.2.17. Proteaz Genin pET-20b(+) ve Lipaz Geninin pET-28a(+) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

pJet 1.2 klonlama vektörüne klonlanan proteaz geni pET-20b(+) ekspresyon vektörüne, lipaz geni ise pET28a(+) ekspresyon vektörüne klonlamak üzere, öncelikle *Xho*I enzimi ile kesildi. 80 °C'de 20 dk ısı şoku yapıldı, ardından *Nco*I ile kesildi. Kesilen gen reaksiyon sonucu jelle yüklenerek Qiagen Jelden Çıkarma kiti ile firmanın öngördüğü yöntemle jelden çıkarıldı.

Jelden çıkarma işlemi sonunda *Xho*I ve *Nco*I kesimleri ile elde edilen genler, proteaz geni pET-20b(+)’e, lipaz geni pET-28a(+)’ya T4 DNA ligaz kullanılarak firmanın öngördüğü şartlar altında ligasyon işlemi yapıldı. Süre sonunda ligasyon ürünleri, T7 promotorunun çalışmasına ve proteaz/lipaz ekspresyonunu sağlayan *E. coli* BL21(DE3) LysS suşuna, CaCl₂’lü yöntem ile transformasyon işlemi yapıldı. Transformasyon ürünleri pET-20b(+) için 50 µg/mL ampisilin, pET-28a(+) için ise 50 µg/mL kanamisin içeren LB agar petrilere yayılarak, 37 °C'de bir gece inkübe edildi. İnkübasyon sonunda elde edilen kolonilerden, klonun varlığı, restriksiyon endonükleaz kesimleri ile kesim gerçekleştirildi. Kesim sonuçları %0,7'lik agaroz jelde elektroforeze tabii tutularak analiz edilerek kontrol edildi. Elde edilen klonlar proteaz için pET20b(+)-BcpPro-His ve lipaz için ise pET28a(+)-BcpLip-His olarak isimlendirildi.

2.2.18. Proteaz ve Lipaz Genlerinin Ekspresyonu

E. coli BL21(DE3)/pET20b(+)-BcpPro-His ve *E. coli* BL21(DE3)/pET28a(+)-BcpLip-His'in gece kültürlerinden LB besiyerine OD 600'si 0,1 olacak şekilde inokülasyon işlemi yapıldı. Bu kültürlerin hücre yoğunlukları OD 600'de spektrofotometrede ölçülerek 0,6-0,9 oluncaya kadar inkübe edildi ve ardından ilgili genlerin ekspresyonları 1 mM IPTG ile indüklendi.

E. coli BL21(DE3)/pET20b(+)-BcpPro-His gece boyu 37 °C'de inkübasyona bırakıldı ve ardından 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Santrifüj işlemi sonunda süpernatant alındı ve enzimin ekspre olup olmadığı SDS-PAGE yüklenerek kontrol edildi.

E. coli BL21(DE3)/pET28a(+)-BcpLip-His 3-4 saat 37 °C'de inkübasyona bırakıldı ve ardından 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Santrifüj işlemi sonunda pellet 50 mM Tris-HCl pH 8,0 tamponunda çözündürüldü ve 5 dk. Sartorius Labsonic marka sonikatör kullanılarak %80 güçte 0,6 döngü aralığında patlatılarak 14.800 rpm'de 15 dk. santrifüj edildi. Pellet kısımları atılarak süpernatant kısımları saklandı ve izole edilen enzimin ekspre olup olmadığı SDS-PAGE yöntemi ile kontrol edildi.

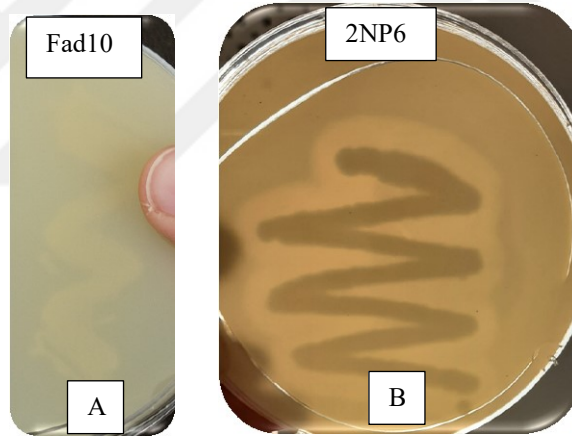
2.2.19. İstatistiksel Analiz

Enzim aktivite ölçüm sonuçlarının normal dağılıma sahip olup olmadığı ($p < 0,05$) analiz edildi. Bu sebeple tanımlayıcı istatistikler verilirken aritmetik ortalama ve standart sapmanın yanı sıra medyan, en küçük, en büyük değerler gösterilmiştir. Gruplar arası farklılık incelenirken üç ve daha fazla bağımsız grup için Kruskal Wallis H testi kullanılmıştır. Anlamlılık seviyesi 0,05 olarak belirlenmiştir. Tüm analizler SPSS 27.0.0 paket programlarında yapılmıştır.

3. BULGULAR

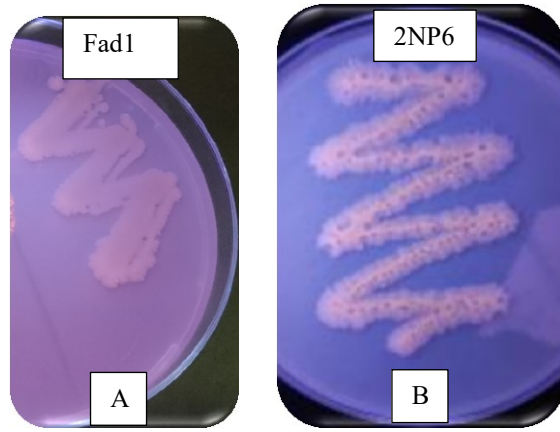
3.1. Enzim Tarama Çalışmaları

2NP6 izolatının proteaz aktivitesine sahip olduğu yapılan petri deneyi ile gösterildi. Deneyde kontrol grubu olarak daha önce izole edilen proteaz negatif olduğu bilinen *Pseudocitrobacter faecalis* Fad10 suşu kullanıldı. 37 °C’de 48 saat inkübasyon sonucunda *P. faecalis* Fad10 izolatının proteaz aktivitesi göstermediği, 2NP6 izolatının proteaz aktivitesi gösterdiği gözlemlenmiştir. %10’luk UHT süt LB agar üzerinde üreyen bakteri kolonilerinin etrafında oluşan zon 2NP6 izolatının proteaz pozitif olduğunu göstermektedir (Şekil 1).



Şekil 1. 2NP6 izolatının %10’luk UHT süt LB agar üzerindeki proteaz aktivitesinin gösterilmesi. A. Proteaz negatif Fad10 suşu. B. Proteaz pozitif 2NP6.

%2,5 (w/v) zeytinyağı ilave edilerek hazırlanan Rhodamine B agarlı petride 2NP6 izolatının lipaz aktivitesi test edildi. Deneyde kontrol grubu olarak daha önceden izole edilen lipaz aktivitesi negatif olan *Klebsiella* sp. Fad1 suşu kullanıldı. 37 °C’de 24 saat inkübasyon sonucunda *Klebsiella* sp. Fad1 izolatının lipaz aktivitesi göstermediği, 2NP6 izolatının lipaz aktivitesi gösterdiği gözlemlenmiştir. İnkübasyon sonucunda oluşan koloniler etrafında U.V altındaki ışıma, testin sonucunun pozitif olduğunu, ifade etmektedir (Şekil 2).



Şekil 2. 2NP6 izolatının %2,5 (w/v) zeytinyağı- Rhodamine B'li LB agar üzerindeki lipaz aktivitesinin gösterilmesi. A. Fad 1 lipaz negatif, B. 2NP6 lipaz pozitif.

3.2. Bakteri İzolatının Tanımlanması

Yukarıda belirtilen petri deneyi ile proteaz ve lipaz aktivitesi açısından pozitif olduğu görülen 2NP6 izolatının tür tayininin gerçekleştirilmesi için öncelikle 16S rRNA gen dizin analizi yapıldı.

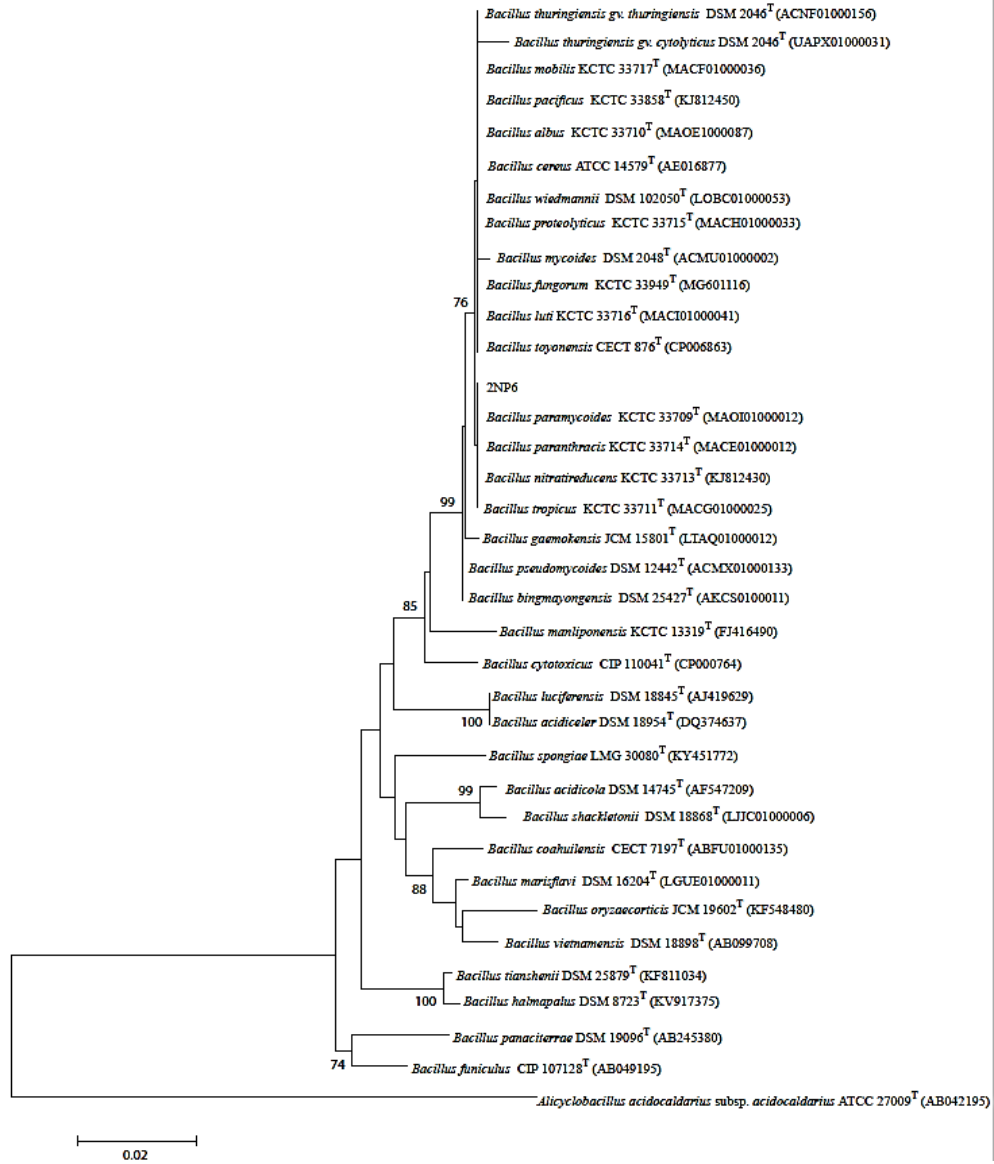
3.2.1. 16S rRNA Gen Dizisinin Eldesi, TA Klonlama Vektörüne Klonlanması, Baz Dizisinin Ortaya Çıkarılması ve Gen Bank'taki Dizilerle Karşılaştırılması

2NP6 izolatının tür tayininin yapılması için gerekli olan genotipik bilginin ilk adımı 16S rRNA genlerinin baz dizisinin belirlenip elde edilen 16S rRNA gen dizisinin GenBank'ta var olan diğer bakteriyel 16S rRNA gen dizileri ile karşılaştırılmasıdır. Karşılaştırma sonucu 2NP6 izolatının *Bacillus* cinsine ait olduğu belirlendi. EzTaxon programı kullanılarak, 2NP6 izolatının 16S rRNA gen dizisi ile ait olduğu cinse ait yakın akraba türlerin 16S rRNA gen dizileri arasındaki benzerlik oranları belirlendi ve bu değer Tablo 9'da gösterildi.

2NP6 izolatının ait olduğu *Bacillus* cinsine ait yakın akraba türler ile aralarındaki ilişkileri ortaya çıkarmak için 16S rRNA genine ait baz dizinleri MEGA 4 paket programı kullanılarak değerlendirildi ve Neighbour-joining programıyla 16S rRNA geni açısından yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaç çizildi (Şekil 3). Ayrıca 2NP6 izolatının 16S rRNA gen dizisi Ekler bölümünde verilmiştir.

Tablo 9. *Bacillus* cinsine ait 2NP6 izolatının ve yakın akraba olduğu *Bacillus* türlerinin 16S rRNA gen dizilerine olan benzerlik yüzdesi

	2NP6
<i>Bacillus</i> türleri	16S rRNA
<i>Bacillus paramycoides</i>	99,36
<i>Bacillus paranthracis</i>	99,36
<i>Bacillus nitratreducens</i>	99,36
<i>Bacillus cerus</i>	99,29
<i>Bacillus tropicus</i>	99,29
<i>Bacillus fungorum</i>	99,29
<i>Bacillus anthracis</i>	99,29
<i>Bacillus wiedmannii</i>	99,22
<i>Bacillus albus</i>	99,22
<i>Bacillus luti</i>	99,22
<i>Bacillus sanguinis</i>	99,22
<i>Bacillus basileensis</i>	99,22
<i>Bacillus proteolyticus</i>	99,14
<i>Bacillus pacificus</i>	99,07
<i>Bacillus clarus</i>	99,07
<i>Bacillus pseudomycoides</i>	99,00
<i>Bacillus toyonensis</i>	99,00
<i>Bacillus mobilis</i>	99,00
<i>Bacillus thuringiensis</i> gv. <i>thuringiensis</i>	99,00
<i>Bacillus arachidis</i>	98,96
<i>Bacillus paramobilis</i>	98,91
<i>Bacillus hominis</i>	98,84
<i>Bacillus mycoides</i>	98,79



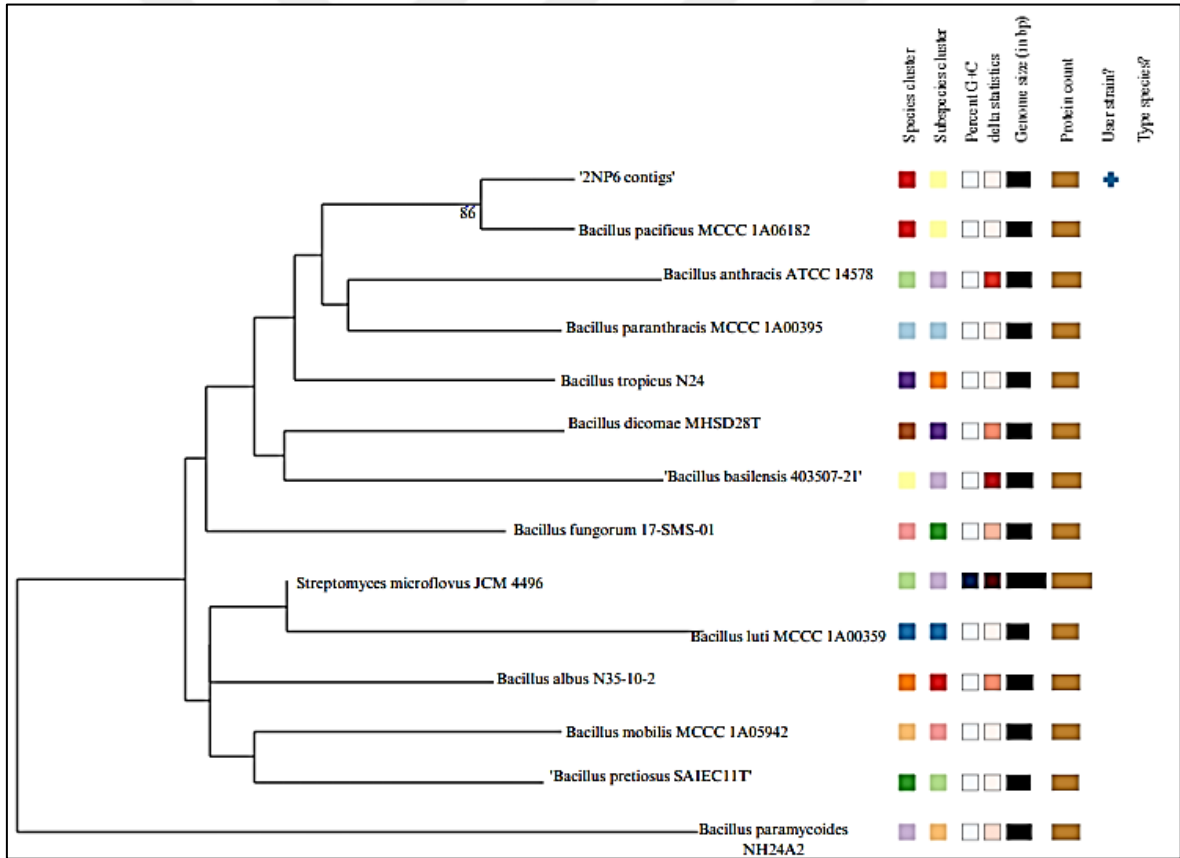
Şekil 3. 2NP6 izolatu ve yakın akraba *Bacillus* türleri ile 16S rRNA bölgesi açısından yakınlık derecesini gösteren filogenetik ağaç.

Yapılan 16S rRNA dizi analizi ve filogenetik ağaç çizimi sonucu 2NP6 izolatının *Bacillus* cinsine ait bakterilere %99'un üzerinde benzer olduğu görülmektedir.

3.2.2. Tüm Genom Dizisinin Belirlenmesi

Bacillus sp. 2NP6 izolatının tüm genom dizisi Illumina HiSeq 2500 yeni nesil dizileme yöntemi kullanılarak MicrobesNG şirketine hizmet alımı yoluyla ortaya çıkarıldı. Elde edilen genom dizisi verileri GenBank'a JAZHPJ000000000 erişim numarası altında

yüklenmiştir. İzolat için üretilen FASTQ formatındaki sekans verilerinin adaptör dizileri BV-BRC (<http://www.bv-brc.org>) sunucunda tıraşlanarak temizlendi. Tüm genom analizi sonucu, *Bacillus* sp. 2NP6 izolatının genomunun toplam 53 kontig (contig), 5.285.402 bp olduğu görüldü. Genomun G+C içeriğinin % 35,2 olduğu, protein kodlayan gen sayısının (CDS) 5.471 adet olduğu, patric cinsler arası aile atamalarına sahip protein sayısının (PGfam) 5375 adet olduğu ve toplamda 72 adet fonksiyonel RNA genine sahip olduğu bulunmuş olup, bunlardan 68'inin tRNA, 4'ü rRNA (2'si 5S rRNA, 1'i 16S rRNA, 1'i 23S rRNA) olduğu tespit edilmiştir. *Bacillus* sp. 2NP6 izolatının TYGS (<http://tygs.dsmz.de/>) veri tabanındaki tüm genom analizi sonucu dijital DNA:DNA hibridizasyon (dDDH) değerinin *Bacillus pacificus* MCC 1A06182'e %84,8 oranında benzerlik göstermiştir. ANI değerinin ise %98,35 oranında benzer olması da bu sonucu desteklemektedir (Şekil 4).



Şekil 4. 2NP6 tüm genom analizi sonucu filogenetik ağacı

3.3. Enzimlerin Eş Zamanlı Üretim Şartlarının Optimizasyonu

3.3.1. Besiyeri İçeriğinin Optimizasyonu

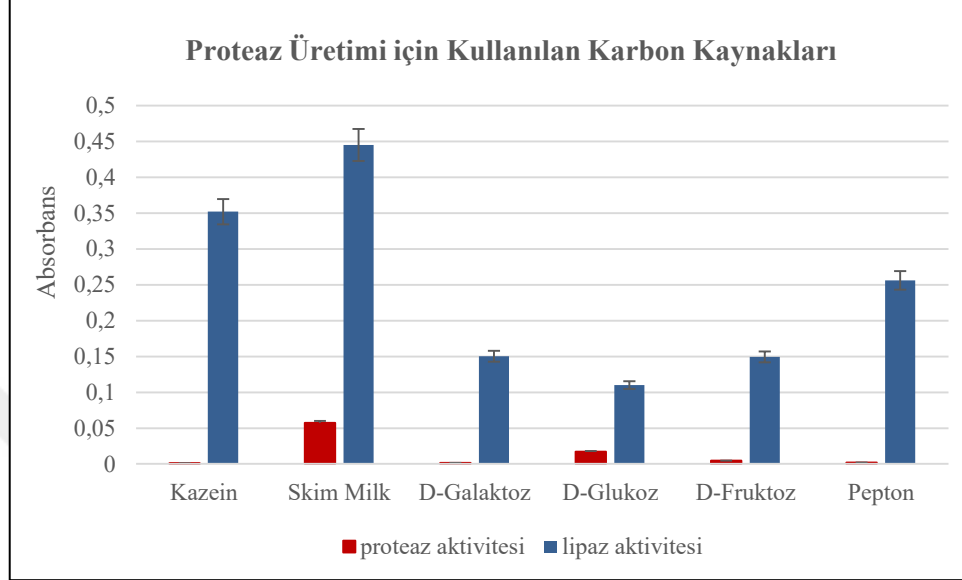
Topraktan izole edilen *Bacillus pacificus* 2NP6 izolatının aynı besiyeri içerisinde eş zamanlı (konkaminant üretim) hem lipaz hem de proteaz üretimi ortamda bulunan besin faktörlerine bağlı olduğundan seçilen minimal besiyeri baz alınarak farklı karbon kaynakları ve azot kaynakları test edildi. İlk olarak proteaz üretiminde karbon kaynağının seçimi için Casein, D-Galaktoz, D-Glukoz, D-Fruktoz, Pepton ve Skim milk olmak üzere 6 farklı karbon kaynağı kullanıldı. İlgili karbon kaynağını içeren minimal besiyerinde *B. pacificus* 2NP6 izolatının 48 saat inkübasyonun ardından kültür santrifüjlenerek hücre dışı proteinleri ihtiva eden süpernatant alınarak hem proteaz hem de lipaz aktivitesi yönünden test edildi.

Tablo 10. Proteaz karbon kaynaklarının her iki enzimin birlikte üretimine etkisi

ENZİM	Proteaz Karbon Kaynağı	n	Ort. ± s.sapma	Medyan (min-max)	Test İstatistiği**	p*
LİPAZ	Kazein	3	0,352000±0,0423083 ^a	0,369800 (0,3037-0,3825)	9,701	0,021
	Skim milk	3	0,444933±0,0209001 ^b	0,457000 (0,4208-0,4570)		
	D-Galaktoz	3	0,150400±0,0292163 ^c	0,163700 (0,1169-0,1706)		
	D-Glukoz	3	0,110000±0,0192873 ^c	0,118000 (0,0880-0,1240)		
	D-Fruktoz	3	0,149367±0,0038786 ^c	0,147700 (0,1466-0,1538)		
	Pepton	3	0,256067±0,0235245 ^d	0,250100 (0,2361-0,2820)		
	TOPLAM	18	0,243794±0,0235245	0,118000 (0,0880-0,4570)		
PROTEAZ	Kazein	3	0,001000±0,0000000 ^a	0,001000 (0,0010-0,0010)	10,211	0,017
	Skim milk	3	0,057333±0,0035119 ^b	0,057000 (0,0540-0,0610)		
	D-Galaktoz	3	0,001333±0,0005774 ^{ac}	0,001000 (0,0010-0,0020)		
	D-Glukoz	3	0,017333±0,0011547 ^d	0,018000 (0,0160-0,0180)		
	D-Fruktoz	3	0,004667±0,0025166 ^c	0,005000 (0,0020-0,0070)		
	Pepton	3	0,002000±0,0010000 ^{ac}	0,002000 (0,0010-0,0030)		
	TOPLAM	18	0,013944±0,0208509	0,002500 (0,0010-0,0610)		
*p<0,05 istatistiksel bakımdan anlamlı farklılığı, **Kruskal-Wallis H Testi değeri, n: Tekrar sayısı Enzimlerin karbon kaynakları grupları bakımından kendi içlerinde tespit edilen farklılık farklı harflerle ifade edilmiştir.						

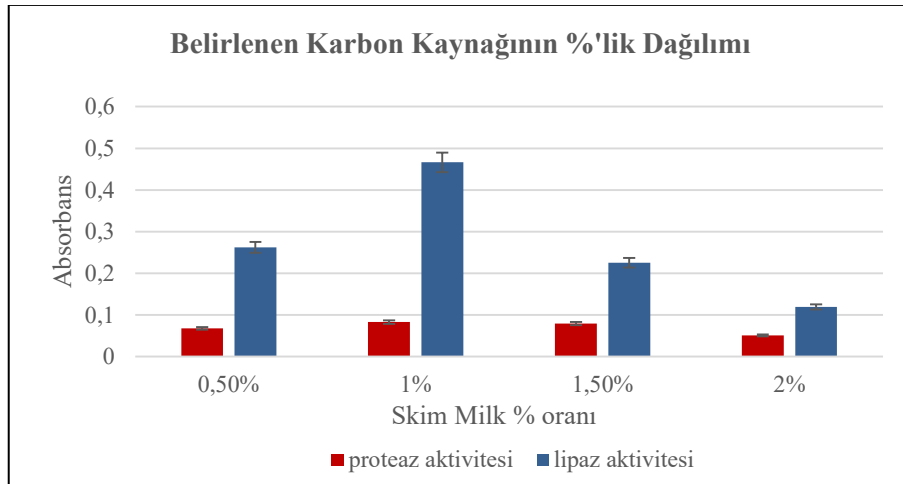
İstatistiki olarak Tablo 10'a bakıldığında proteaz karbon kaynaklarından biri olan skim milk'in her iki enzim yönünden tüm karbon kaynakları ile anlamlı bir farklılık

gösterdiği görülmektedir ($p<0,05$). Bunun yanında her iki enzimin en iyi aktiviteyi skim milk karbon kaynağı ile verildiği Şekil 5-a'da görülmektedir.



Şekil 5-a. *B. pacificus* 2NP6'nın proteaz üretiminde karbon kaynaklarının belirlenmesi.

Ardından proteaz üretimi için en iyi karbon kaynağı olarak belirlenen skim milk'in konsantrasyon miktarı ayarlanması amacıyla % 0,5, 1, 1,5 ve 2 g/mL (w/v) oranında skim milk besiyerlerine eklendi. İnkübasyon sonucunda her iki enzim aktivitesi yönünden en iyi aktiviteyi veren konsantrasyon miktarının %1 g/mL olduğu belirlendi (Şekil 5-b).



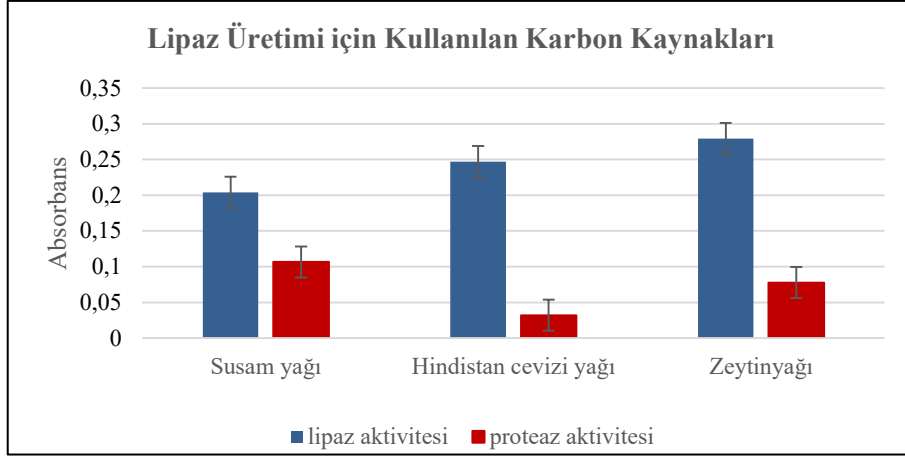
Şekil 5-b. *B. pacificus* 2NP6 izolatının proteaz üretiminin optimizasyon besiyerindeki Skim milk konsantrasyonunun ayarlanması.

Proteaz üretimi açısından revize edilen minimal besiyeri ortamına lipaz üretimi açısından en iyi karbon kaynağının belirlenmesi için susam yağı, hindistan cevizi yağı ve zeytinyağından %1 (v/v) filtre edilerek eklendi. İnkübasyon sonunda elde edilen kültürün süpernatantındaki hücre dışı protein ekstaktı kullanılarak her iki enzim aktivitesi de ölçüldü.

Tablo 11. Lipaz karbon kaynaklarının her iki enzimin birlikte üretimine etkisi

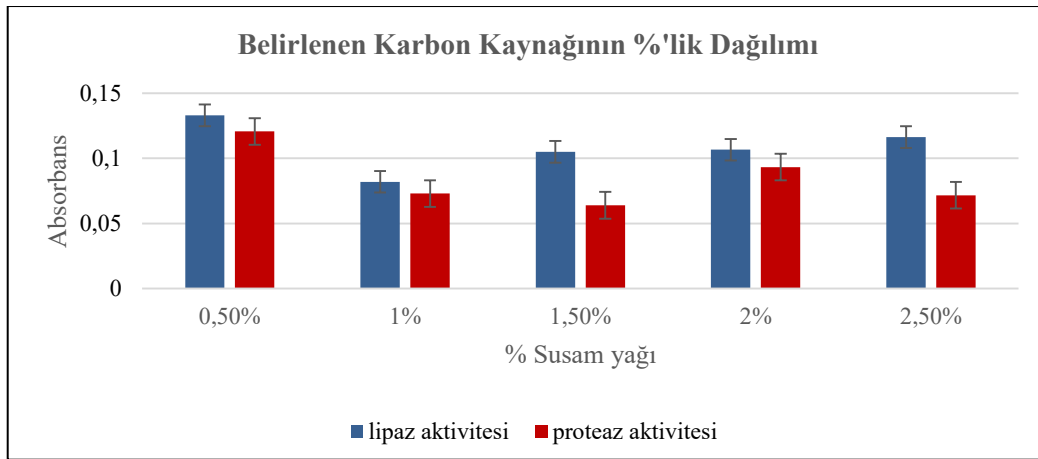
Enzim	Lipaz Karbon Kaynağı	n	Ort. $\pm$ s.sapma	Medyan (min-max)	Test İstatistiği**	p*
LİPAZ	Susam Yağı	3	0,2040 $\pm$ 0,03477 ^a	0,1990(0,17-0,24)	5,067	0,079
	Hindistan cevizi Yağı	3	0,2470 $\pm$ 0,02364 ^a	0,2370(0,23-0,27)		
	Zeytin Yağı	3	0,2793 $\pm$ 0,03225 ^a	0,2840(0,25-0,31)		
	TOPLAM	9	0,2434 $\pm$ 0,04211	0,2410(0,17-0,31)		
PROTEAZ	Susam Yağı	3	0,1067 $\pm$ 0,01137 ^a	0,1100(0,09-0,12)	7,261	0,027
	Hindistan cevizi Yağı	3	0,0320 $\pm$ 0,00458 ^b	0,0310(0,03-0,04)		
	Zeytin Yağı	3	0,0777 $\pm$ 0,00462 ^c	0,0750(0,08-0,08)		
	TOPLAM	9	0,0721 $\pm$ 0,03325	0,0750(0,03-0,12)		
*p<0,05 istatistiksel bakımdan anlamlı farklılığı, **Kruskal-Wallis H Testi değeri, n: Tekrar sayısı Enzimlerin karbon kaynakları grupları bakımından kendi içlerinde tespit edilen farklılık farklı harflerle ifade edilmiştir.						

Sonuçlar incelendiğinde, lipazın karbon kaynağı yönünden anlamlı bir farklılık göstermediği, proteaz enziminin lipaz karbon kaynaklarına göre anlamlı farklılık gösterdiği gözlenmiştir (p<0,05). Proteaz için tüm kaynakların birbirinden anlamlı farklılıklarının bulunduğu görülmektedir (Tablo 11). Bu bağlamda, proteaz yönünden en yüksek ölçülebilir lipaz karbon kaynağının susam yağı olması ve lipaz yönünden kaynakların hepsinin hemen hemen aynı enzim aktivitesini vermesinden dolayı, lipaz kaynağı olarak susam yağı seçilmiştir (Şekil 6-a).



Şekil 6-a. *B. pacificus* 2NP6'nın eş zamanlı enzim üretiminde lipaz karbon kaynaklarının her iki enzim yönünden belirlenmesi

Belirlenen susam yağının içeriği revize edilen minimal besiyeri içerisindeki konsantrasyonun belirlenmesi amacıyla %0,5, %1, %1,5, %2 ve %2,5 (v/v) oranında susam yağı besiyerine eklenerek *Bacillus pacificus* 2NP6 inokülasyonları gerçekleştirildi ve 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucu her iki enzim aktivitesi yönünden en yüksek aktiviteyi veren susam yağı konsantrasyon miktarının %0,5 (v/v) olduğu belirlendi (Şekil 6-b).



Şekil 6-b. *B. pacificus* 2NP6 izolatının lipaz üretiminin optimizasyonunda susam yağının besiyerindeki konsantrasyonun ayarlanması

Elde edilen veriler sonucunda revize edilen besiyeri ortamına, enzim üretimlerinin optimizasyonu amacıyla diğer bir parametre olarak ilave edilecek azot kaynaklarının

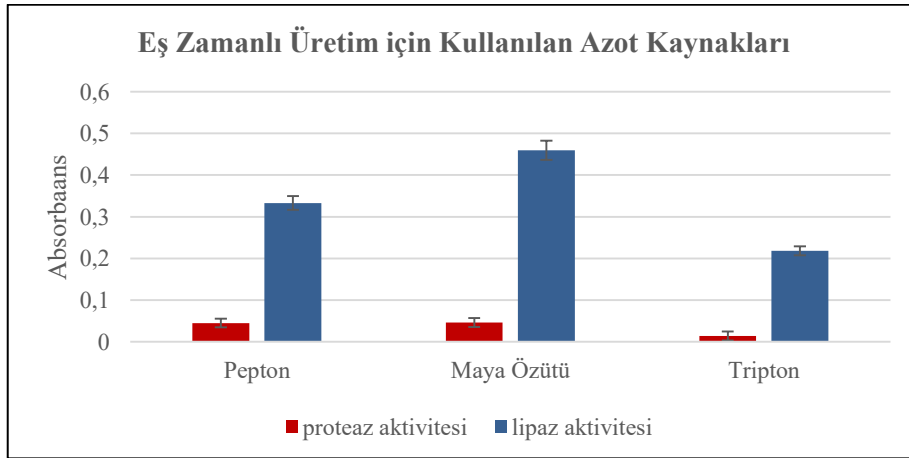
çeşitleri ve besiyerlerindeki konsantrasyonları belirlenmeye çalışıldı. Bu amaçla Pepton, Maya Özütü ve Tripton olmak üzere 3 farklı azot kaynağı test edildi. İnkübasyon süresi sonunda elde edilen hücre dışı protein özütünden hem lipaz hem de proteaz aktivitesi bakıldı.

Tablo 12. Eş zamanlı üretimde besiyerindeki azot kaynağının belirlenmesi

Enzim	Azot Kaynağı	n	Ort. $\pm$ s.sapma	Medyan (min-max)	Test İstatistiği**	p*
LİPAZ	Pepton	3	0,3329 $\pm$ 0,0267 ^a	0,3223(0,3130-0,3633)	7,200	0,027
	Maya Özütü	3	0,4596 $\pm$ 0,0187 ^b	0,4499(0,4478-0,4812)		
	Tripton	3	0,2181 $\pm$ 0,0096 ^c	0,2192(0,2080-0,2273)		
	TOPLAM	9	0,3369 $\pm$ 0,1059	0,3223(0,2080-0,4812)		
PROTEAZ	Pepton	3	0,0450 $\pm$ 0,0051 ^a	0,0420(0,0420-0,0510)	5,695	0,058
	Maya Özütü	3	0,0460 $\pm$ 0,0026 ^a	0,0450(0,0440-0,0490)		
	Tripton	3	0,0130 $\pm$ 0,0011 ^b	0,0136(0,0130-0,0150)		
	TOPLAM	9	0,0348 $\pm$ 0,1619	0,0420(0,0130-0,0510)		

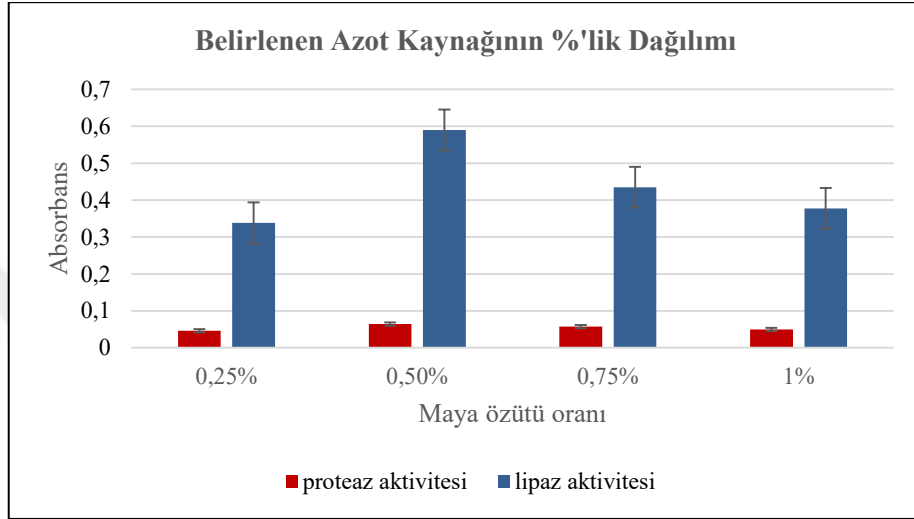
*p<0,05 istatistiksel bakımdan anlamlı farklılığı, **Kruskal-Wallis H Testi değeri, n: Tekrar sayısı
Enzimlerin azot kaynakları grupları bakımından kendi içlerinde tespit edilen farklılık farklı harflerle ifade edilmiştir.

Yapılan test sonucunda, lipaz ve proteaz enzimlerinin azot kaynaklarına göre anlamlı farklılık gösterdiği görülmektedir (p<0,05). Lipaz için tüm kaynakların birbirinden farklı olduğu görünürken proteaz için ise anlamlı farklılık triptone kaynağından görülmektedir (Tablo 12). Bu bağlamda her iki enzim için de yüksek enzim aktivite ortalamasına sahip olan maya özütü azot kaynağı olarak seçilmiştir (Şekil 7-a).



Şekil 7-a. *B. pacificus* 2NP6'nın Eş zamanlı enzim üretiminde azot kaynağının belirlenmesi

Gerçekleştirilen çalışma sonucunda her iki enzim için en yüksek aktivite üretiminin sağlandığı azot kaynağı olarak seçilen maya özütünün besiyerindeki konsantrasyonunun ayarlanması için ortama 0,25, 0,5, 0,75 ve 1 g/mL oranında maya özütü eklendi. İnkübasyon sonucu her iki enzim aktivitesi yönünden en yüksek aktiviteyi veren konsantrasyon miktarının 0,5 g/mL olduğu belirlendi (Şekil 7-b).



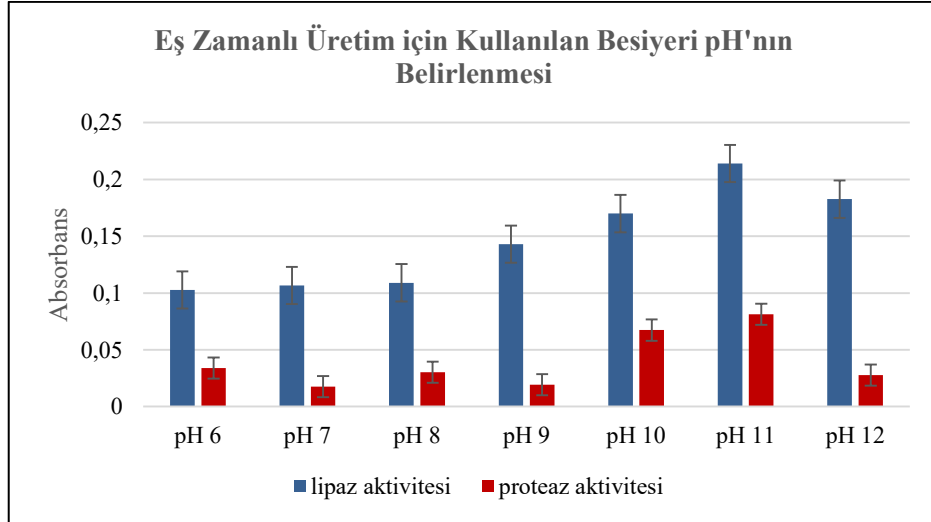
Şekil 7-b. *B. pacificus* 2NP6 izolatının lipaz ve proteaz üretiminin optimizasyonunda besiyerindeki maya özütü konsantrasyonunun ayarlanması

Yukarıda ifade edilen aşamalarda besiyeri içeriği revize edilen minimal besiyerinde enzim aktiviteleri üzerine pH değerinin etkisinin araştırılması amacıyla 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0, 11,0 ve 12,0 değerleri kullanılarak en yüksek enzim üretimlerinin sağlandığı optimum pH değeri belirlendi. Tablo 13'teki istatistiksel verilere göre, her iki enzim arasında anlamlı bir farklılık olduğu görülmektedir. Bu bağlamda her iki enzim yönünden en yüksek aktiviteyi veren değerin pH 11,0 olduğu görüldü (Şekil 8).

Tablo 13. Eş zamanlı üretimde besiyerinin pH değerinin belirlenmesi.

Enzim	pH	n	Ort. $\pm$ s.sapma	Medyan (min-max)	Test İstatistiği**	P*
LİPAZ	6	3	0,102667 $\pm$ 0,007094 ^a	0,104000(0,0950-0,1090)	18,574	0,005
	7	3	0,106667 $\pm$ 0,0049329 ^a	0,109000(0,1010-0,1100)		
	8	3	0,109000 $\pm$ 0,0081854 ^a	0,1110008(0,1000-0,1100)		
	9	3	0,143000 $\pm$ 0,0110000 ^b	0,143000(0,1320-0,1540)		
	10	3	0,170000 $\pm$ 0,0095394 ^{bc}	0,175000(0,1590-0,1760)		
	11	3	0,214000 $\pm$ 0,0363731 ^{bcd}	0,193000(0,1930-0,2560)		
	12	3	0,182667 $\pm$ 0,0066583 ^{bcd}	0,181000(0,1770-0,1900)		
	TOPLAM	21	0,146857 $\pm$ 0,0432831	0,143000(0,0950-0,2560)		
PROTEAZ	6	3	0,034000 $\pm$ 0,0052915 ^a	0,036000(0,0280-0,0380)	16,875	0,010
	7	3	0,017667 $\pm$ 0,0045092 ^b	0,018000(0,0130-0,0220)		
	8	3	0,030333 $\pm$ 0,0120554 ^{ab}	0,029000(0,0190-0,0430)		
	9	3	0,019333 $\pm$ 0,0005774 ^b	0,019000(0,0190-0,0200)		
	10	3	0,067333 $\pm$ 0,0032146 ^{bc}	0,066000(0,0650-0,0710)		
	11	3	0,081333 $\pm$ 0,0161658 ^{bc}	0,084000(0,0640-0,0960)		
	12	3	0,027667 $\pm$ 0,0015275 ^{ab}	0,028000(0,0260-0,0290)		
	TOPLAM	21	0,039667 $\pm$ 0,0244158	0,029000(0,0130-0,0960)		

*p<0,05 istatistiksel bakımdan anlamlı farklılığı, **Kruskal-Wallis H Testi değeri, n: Tekrar sayısı
Enzimlerin besiyerinin farklı pH değerleri bakımından kendi içlerinde tespit edilen farklılık farklı harflerle ifade edilmiştir.

Şekil 8. *B. pacificus* 2NP6'nın eş zamanlı proteaz ve lipaz üretiminde optimum pH değerinin belirlenmesi.

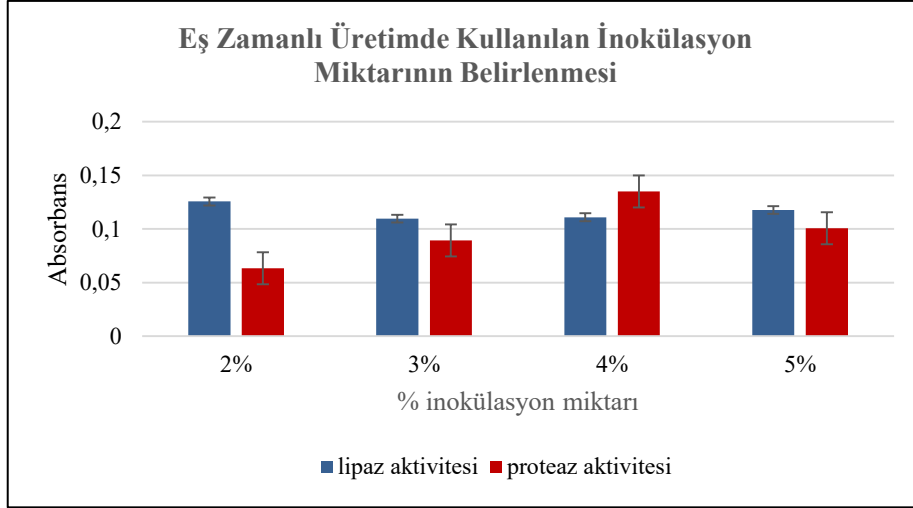
3.3.2. Kültürasyon Şartlarının Optimizasyonu

İnokülasyon miktarının her iki enzim üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla içeriği revize edilen besiyerine *B. pacificus* 2NP6 gece kültüründen %2, 3, 4 ve 5 (v/v) oranlarında inoküle edilerek 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucu kültürün santrifüjlenmesi sonucu elde edilen süpernatanttaki hücre dışı proteinler her iki enzim aktivitesi açısından araştırıldı.

Tablo 14. Eş zamanlı üretimde % inokülasyon miktarının belirlenmesi

Enzim	Kültür Miktarı	n	Ort. $\pm$ s.sapma	Medyan (min-max)	Test İstatistiği**	p*
LİPAZ	%2	3	0,125667 $\pm$ 0,0055076 ^a	0,123000(0,1220-0,1320)	5,535	0,063
	%3	3	0,109667 $\pm$ 0,0030551 ^a	0,109000(0,1070-0,1130)		
	%4	3	0,111000 $\pm$ 0,0091652 ^a	0,113000(0,1010-0,1190)		
	%5	3	0,117667 $\pm$ 0,0051316 ^a	0,119000(0,1120-0,1220)		
	TOPLAM	12	0,116000 $\pm$ 0,0084423	0,116000(0,1010-0,1320)		
PROTEAZ	%2	3	0,063333 $\pm$ 0,0094516 ^a	0,060000(0,0560-0,0740)	7,200	0,027
	%3	3	0,089333 $\pm$ 0,0106927 ^b	0,095000(0,0770-0,0960)		
	%4	3	0,135000 $\pm$ 0,0112694 ^c	0,129000(0,1280-0,1480)		
	%5	3	0,100667 $\pm$ 0,0068069 ^b	0,103000(0,0930-0,1060)		
	TOPLAM	12	0,097083 $\pm$ 0,0281278	0,095500(0,0560-0,1480)		
*p<0,05 istatistiksel bakımdan anlamlı farklılığı, **Kruskal-Wallis H Testi değeri, n: Tekrar sayısı Enzimlerin inokülasyon miktarları bakımından kendi içlerinde tespit edilen farklılık farklı harflerle ifade edilmiştir.						

İstatistiki olarak Tablo 14'e bakıldığında, lipaz yönünden anlamlı bir farklılığın olmadığı (p>0,05), ancak proteaz yönünden diğer miktar ile karşılaştırıldığında %4 inokülasyon miktarının anlamlı bir farklılığının olduğu gösterilmektedir (p<0,05). Bunun yanında enzim aktivitelerine bakıldığında en yüksek aktivitenin %4 inokülasyon miktarında olduğu belirlendi (Şekil 9).



Şekil 9. *B. pacificus* 2NP6'nın eş zamanlı proteaz ve lipaz üretiminde % inokülasyon miktarının belirlenmesi.

3.3.3. En Fazla Üretimin Olduğu İnkübasyon Sıcaklığının Belirlenmesi

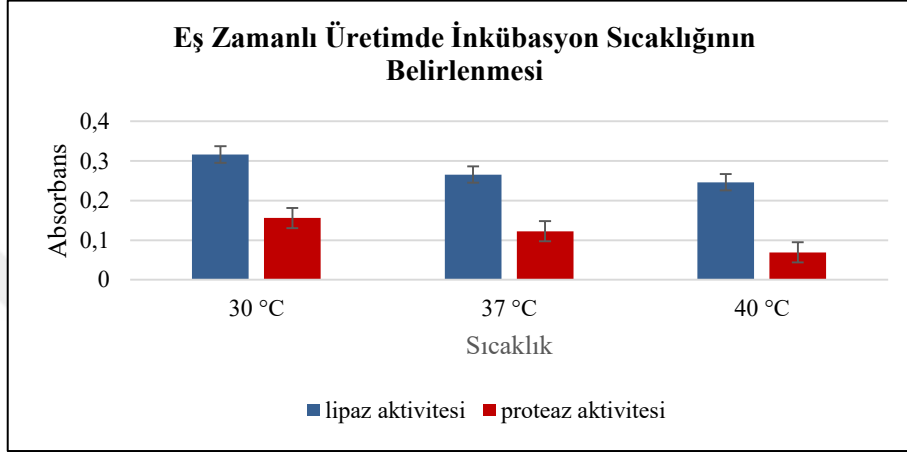
Revize edilen besiyeri ve kültürasyon şartları kullanılarak her iki enzim üretimi açısından en uygun sıcaklığın belirlenmesi amacıyla 30 °C, 37 °C ve 40 °C sıcaklık değerleri kullanılarak üretilen *Bacillus pacificus* 2NP6 izolatının her iki enzimi en yüksek seviyede ürettiği optimum sıcaklık değeri belirlendi. Belirlenen parametreler kullanılarak gerçekleştirilen inkübasyonlar neticesinde elde edilen hücre dışı protein ekstraktı kullanılarak lipaz ve proteaz aktiviteleri test edildi.

Tablo 15. Eş zamanlı üretimde kültürasyon şartları üzerine sıcaklığın belirlenmesi

Enzim	İnkübasyon Sıcaklığı	n	Ort. $\pm$ s.sapma	Medyan (min-max)	Test İstatistiği**	p*
LİPAZ	30 °C	3	0,1560 $\pm$ 0,00346 ^a	0,1540(0,15-0,16)	7,322	0,026
	37 °C	3	0,1227 $\pm$ 0,00503 ^b	0,1220(0,12-0,13)		
	40 °C	3	0,0693 $\pm$ 0,00462 ^c	0,0720(0,06-0,07)		
	TOPLAM	9	0,1160 $\pm$ 0,03805	0,1220(0,06-0,16)		
PROTEAZ	30 °C	3	0,3163 $\pm$ 0,01290 ^a	0,3200(0,30-0,33)	7,200	0,027
	37 °C	3	0,2657 $\pm$ 0,00643 ^b	0,2630(0,26-0,27)		
	40 °C	3	0,2463 $\pm$ 0,00737 ^c	0,2490(0,24-0,25)		
	TOPLAM	9	0,2761 $\pm$ 0,03234	0,2630(0,24-0,33)		

*p<0,05 istatistiksel bakımdan anlamlı farklılığı, **Kruskal-Wallis H Testi değeri, n: Tekrar sayısı
Enzimlerin kültürasyon şartları üzerine sıcaklığı bakımından kendi içlerinde tespit edilen farklılık farklı harflerle ifade edilmiştir.

İstatistiki olarak Tablo 15'e bakıldığında, her iki enzim yönünden inkübasyon sıcaklıklarının anlamlı bir farklılık gösterdiği söylenebilir ($p<0,05$). Tüm inkübasyon sıcaklıklarının da birbirinden anlamlı bir farklılık olduğu gösterilmektedir. Ancak her iki enzimin açısından aktivitelere bakıldığında en yüksek aktivitenin 30 °C olduğu belirlendi (Şekil 10).



Şekil 10. *B. pacificus* 2NP6'nın eş zamanlı proteaz ve lipaz üretiminde kültüvasyon şartı olarak sıcaklığın etkisinin belirlenmesi.

3.3.4. En Fazla Üretimin Olduğu Sürenin Belirlenmesi

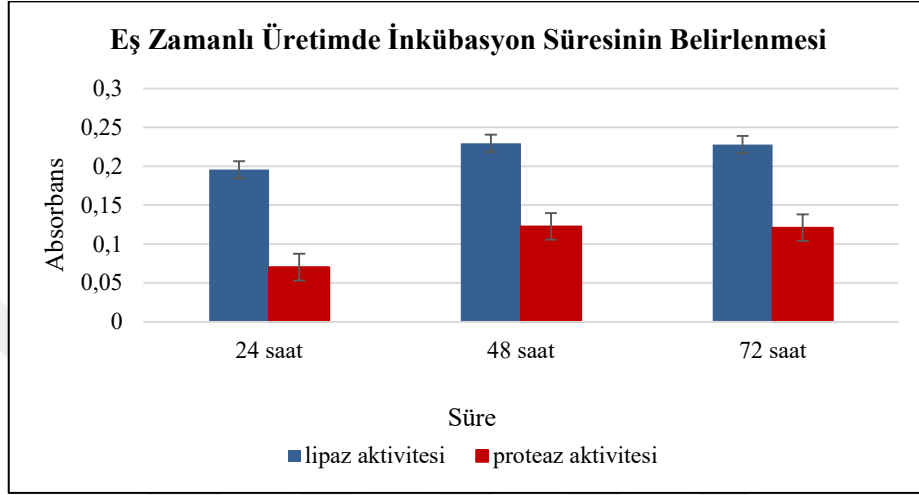
B. pacificus 2NP6 izolatının lipaz ve proteaz üretimine inkübasyon süresinin etkisinin belirlenmesi amacıyla 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlar neticesinde alınan kültür örneklerinin santrifüjlenmesi ile elde edilen kültür süpernatantı içindeki protein ekstraktı kullanılarak iki enzimin aktivitesine bakıldı.

Tablo 16. Eş zamanlı enzim üretiminde inkübasyon süresinin belirlenmesi

Enzim	İnkübasyon Süresi	n	Ort. $\pm$ s.sapma	Medyan (min-max)	Test İstatistiği**	p*
LİPAZ	24	3	0,0703 $\pm$ 0,00289 ^a	0,0720(0,07-0,07)	5,468	0,065
	48	3	0,1227 $\pm$ 0,00503 ^a	0,1220(0,12-0,13)		
	72	3	0,1210 $\pm$ 0,00985 ^a	0,1240(0,11-0,13)		
	TOPLAM	9	0,1047 $\pm$ 0,02639	0,1180(0,07-0,13)		
PROTEAZ	24	3	0,1957 $\pm$ 0,00473 ^a	0,1940(0,19-0,20)	5,422	0,066
	48	3	0,2297 $\pm$ 0,01762 ^a	0,2320(0,21-0,25)		
	72	3	0,2280 $\pm$ 0,00721 ^a	0,2300(0,22-0,23)		
	TOPLAM	9	0,2178 $\pm$ 0,01928	0,2200(0,19-0,25)		

* $p<0,05$ istatistiksel bakımdan anlamlı farklılığı, **Kruskal-Wallis H Testi değeri, n: Tekrar sayısı
Enzimlerin üretiminde inokülasyon süresi bakımından kendi içlerinde tespit edilen farklılık farklı harflerle ifade edilmiştir.

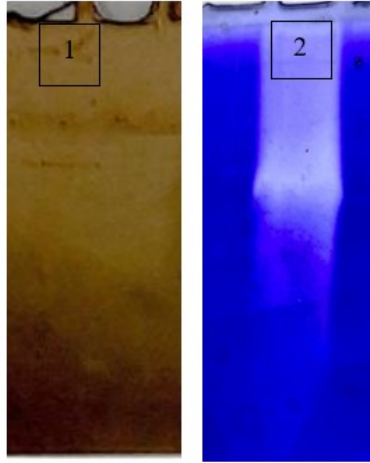
Hem lipaz hem de proteaz üretimi ve aktivitesi yönünden istatistiksel analizler (Tablo 16) göz önünde bulundurulduğunda süreler açısından anlamlı bir farklılık olmadığı görülmektedir ($p>0,05$). Ancak elde edilen aktivite değerlerinin karşılaştırılması sonucu inkübasyon süresi 48. saat olarak belirlendi (Şekil 11).



Şekil 11. *B. pacificus* 2NP6'nın eş zamanlı proteaz ve lipaz üretiminde kültürasyon şartı olarak inkübasyon süresinin etkisinin belirlenmesi.

3.4. Enzim Üretimi

Lipaz ve proteaz üretiminin maksimum şekilde aynı sürede, şartlarda ve ortamda yapılabilmesi amacıyla karbon kaynakları, azot kaynakları, kültürasyon şartları (pH, inokülasyon miktarı), inkübasyon süresi, inokülasyon sıcaklığı optimize edildi. Buna göre, proteaz karbon kaynağı olarak %1 Skim milk, lipaz karbon kaynağı olarak %0,5 (v/v) Susam yağı, azot kaynağı olarak %0,5 (w/v) Maya özütü kullanılarak pH 11,0 ayarlanmış, gece kültüründen %4 (v/v) inoküle edilerek 30 °C de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kültür 10000 rpm'de 5 dk santrifüj yapılarak çöktürüldü ve üzerinde çalışma gerçekleştirilecek olan lipaz ve proteaz hücre dışı enzimler olduğundan süpernatant alınarak pellet kısmı atıldı. Elde edilen süpernatantta lipaz ve proteaz varlığının teyidi için standart aktivite tayin metotları ile proteaz ve lipaz aktiviteleri test edildi ve Şekil 12'deki gibi gösterildi.



Şekil 12. *B. pacificus* 2NP6 lipaz ve proteaz zimogramı. 1.kaba-lipaz zimogram, 2. kaba proteaz zimogram

3.5. Enzimin Konsantre Edilmesi

Yukarıda ifade edilen şekilde elde edilen ham protein ekstraktının saflaştırma işlemine geçilmeden önce olabildiğince yoğun olması saflaştırmanın başarısı açısından önemlidir. Bu amaçla, elde edilen ham protein ekstraktını konsantre etmek için etanol ile yoğunlaştırma işlemi yapıldı. Yoğunlaştırma işlemi sonucunda özütte protein konsantrasyon tayini ile lipaz ve proteaz için spesifik aktivite tayini yapıldı.

3.6. Enzimlerin Saflaştırılması

3.6.1. Proteaz Enziminin Saflaştırılması

Enzim yoğunlaştırma işlemi sonrasında elde edilen hücre özütünün bir kısmı proteaz enziminin saflaştırması için jel filtrasyon kolon kromatografisinden (Sephadex G-150) geçirildikten sonra, proteaz aktivitesi içeren tüplerin belirlenmesi için aktivite tesiti ile tüpler tarandı ve proteaz aktivitesi gösteren tüpler belirlendi. Ardından en iyi proteaz aktivitesinin görüldüğü fraksiyonlar birleştirildi. Fraksiyonlar birleştirildikten sonra saflaştırılan özütte protein konsantrasyon tayini ve spesifik aktivite tayini yapıldı. Elde edilen proteinlerin SDS-PAGE’de analizine ait jel görüntüsü Şekil 29’da görülmektedir.

Tablo 17. *B. pacificus* 2NP6 proteazının saflaştırma tablosu

Saflaştırma basamağı	Hacim (ml)	[Protein] (mg/ml)	T. Protein (mg)	T. Aktivite ($\mu\text{mol/dk} = \text{Ünite}$)	Spesifik aktivite (U/mg)	Verim	Saflaştırma katı
Kaba ekstrakt	100	0,02205	2,205	909,342	412,4	100	1
Etanol yoğunlaştırma	4,5	0,4413	1,98585	898,994295	452,7	98,86206675	1,09772066
Sephadex G-150	1,5	0,3882	0,5823	471,37185	809,5	51,83658623	1,962900097

3.6.2. Lipaz Enziminin Saflaştırılması

Enzim konsantrasyonu işlemi sonrasında elde edilen hücre özütünün diğer bir kısmı lipaz enziminin saflaştırılması amacı ile katyonik iyon değıştirici olan Karboksimetil (CM) kolonundan geçirildikten sonra, elde edilen fraksiyonlara ait tüplerdeki lipaz aktivitesi standart lipaz aktivite tayin metodu ile test edildi. Ardından, en iyi aktivite veren fraksiyonlar birleştirildi. Fraksiyonlar birleştirildikten sonra saflaştırılan özütte protein konsantrasyon tayini ve spesifik aktivite tayini yapıldı. Elde edilen proteinlerin SDS-PAGE’de analizine ait jel görüntüsü Şekil 29’da görölmektedir.

Tablo 18. *B. pacificus* 2NP6 lipazının saflaştırma tablosu

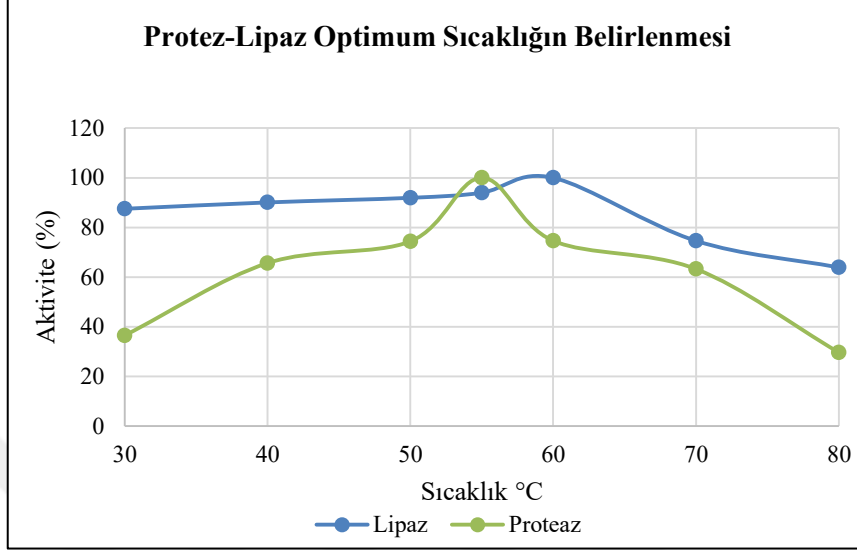
Saflaştırma basamağı	Hacim (ml)	[Protein] (mg/ml)	T. Protein (mg)	T. Aktivite ($\mu\text{mol/dk} = \text{Ünite}$)	Spesifik aktivite(U/mg)	Verim	Saflaştırma katı
Kaba ekstrakt	100	0,02205	2,205	52,7323545	23,9149	100	1
Etanol yoğunlaştırma	4,5	0,4413	1,98585	47,83177886	24,0863	90,06122449	1,00716708
CM_Sepharose	1,5	0,3882	0,5823	46,62190773	80,0651	26,40816327	3,347916989

3.7. Enzimlerin Karakterizasyonu

3.7.1. Optimum Sıcaklık

B. pacificus 2NP6 izolatından optimize besiyerde optimize şartlar altında üretilen hücre dışı protein özütünden yukarıda ifade edilen şekilde saflaştırılan proteaz ve lipaz enzimlerinin optimum çalışma sıcaklığının ortaya çıkarılması amacıyla 30, 40, 50, 55, 60, 70 ve 80 °C’de aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. Sıcaklık-Aktivite grafiğı oluşturularak

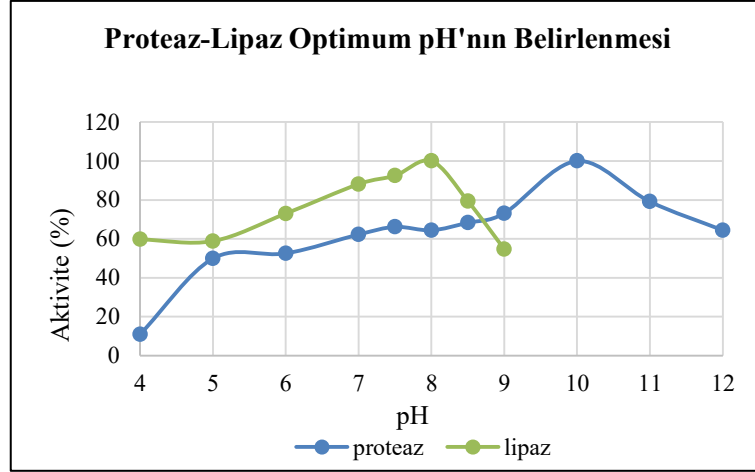
enzimlerin optimum sıcaklıkları; proteaz için 55 °C, lipaz için 60 °C olarak belirlendi ve sonraki deneylerde reaksiyonlar bu sıcaklıklarda gerçekleştirildi (Şekil 13).



Şekil 13. *B. pacificus* 2NP6 izolatının proteaz ve lipaz enzimlerinin optimum sıcaklık grafiği.

3.7.2. Optimum pH

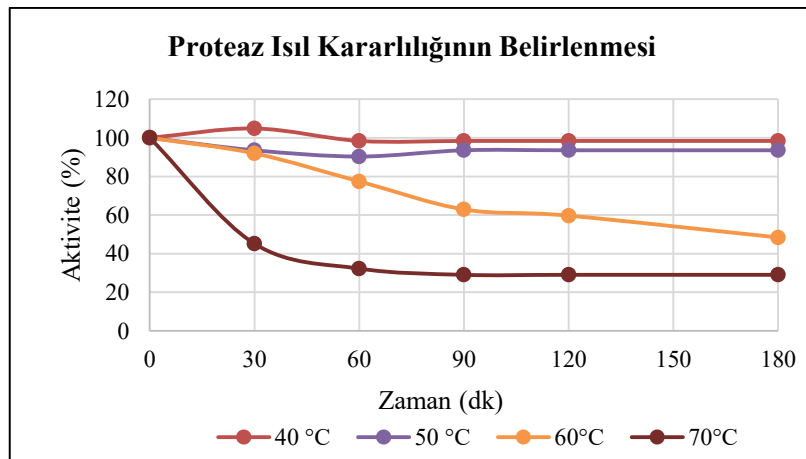
B. pacificus 2NP6 izolatından optimize besiyerde optimize şartlar altında üretilen hücre dışı protein özütünden yukarıda ifade edilen şekilde saflaştırılan proteaz ve lipaz enzimlerinin optimum çalışma pH değerleri belirlendi. Bu amaçla, pH'ın proteaz aktivitesi üzerine etkisi pH 4,0-12,0 aralığındaki tamponlarda, pH'ın lipaz aktivitesi üzerine etkisi pH 4,0-9,0 aralığındaki tamponlarda gerçekleştirilen bir seri reaksiyon ile incelendi. Elde edilen aktivite ölçümlerine göre pH-Aktivite grafiği oluşturularak enzimlerin optimum pH'ları; proteaz için pH 10,0, lipaz için pH 8,0 olarak belirlendi ve sonraki deneylerde reaksiyonlar bu pH'larda gerçekleştirildi (Şekil 14)



Şekil 14. *B. pacificus* 2NP6 izolatının proteaz ve lipaz enzimlerinin optimum pH grafiği.

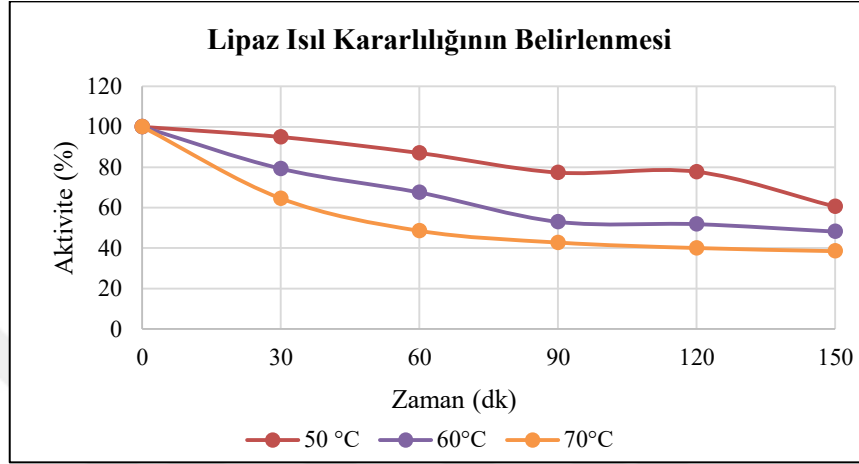
3.7.3. Isıl Kararlılığı

B. pacificus 2NP6 izolatından optimize besiyerde optimize şartlar altında üretilen hücre dışı protein özütünden yukarıda ifade edilen şekilde saflaştırılan proteaz ve lipaz enzimlerinin ısı kararlılıkları belirlendi. Bu amaçla, elde edilen proteaz enziminin ısı kararlılığı enzimin 40 °C, 50 °C, 60 °C ve 70 °C’de 180 dakika inkübasyonu ve sonrasında standart aktivite tayin metodu ile aktivitenin ölçülmesiyle ortaya çıkarıldı. Gerçekleştirilen çalışma sonunda 40 °C, 50 °C’de aktivitenin azalmadığı, 60 °C’de %48’e, 70 °C’de ise %29’a düştüğü belirlendi. Sonuçlar Şekil 15-a’da gösterildi.



Şekil15-a. *B. pacificus* 2NP6 izolatına ait proteaz enziminin ısı kararlılık grafiği

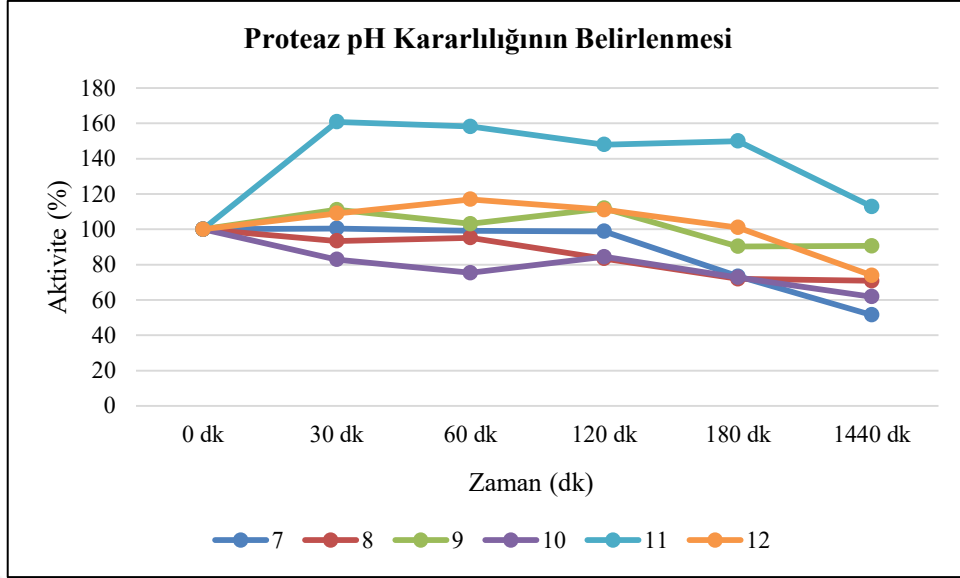
Bacillus pacificus 2NP6 izolatından elde edilen lipaz enziminin kararlılığına ısıнын etkisini incelemek amacıyla enzim, 50 °C, 60 °C ve 70 °C’de 150 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda aktivitenin 50 °C’de %60’a, 60 °C’de %48’e ve 70 °C’de ise %38’e düştüğü belirlendi. Sonuçlar Şekil 15-b’de gösterildi.



Şekil 15-b. *B. pacificus* 2NP6 izolatına ait lipaz enziminin ısıl kararlılık grafiği

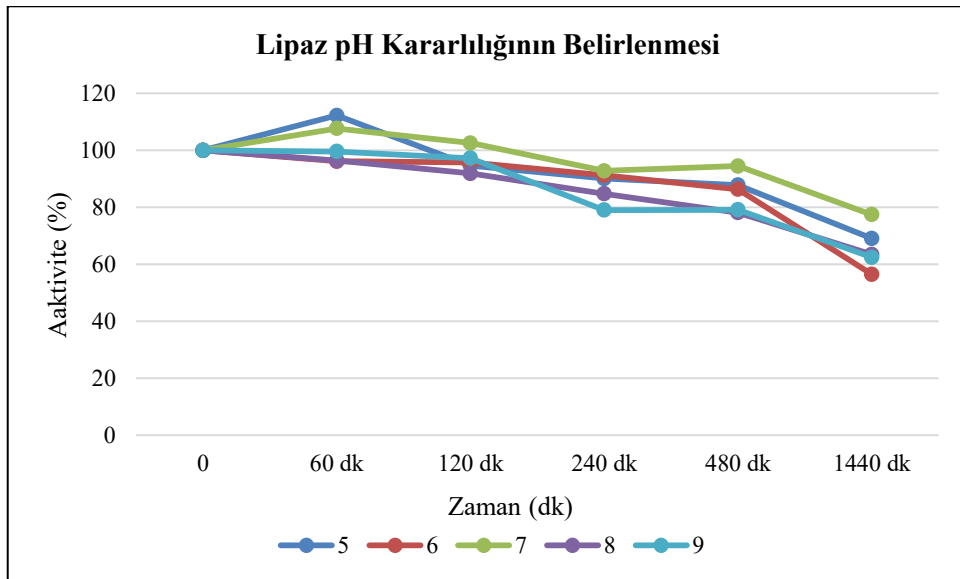
3.7.4. pH Kararlılığı

B. pacificus 2NP6 izolatından elde edilen proteaz enziminin kararlılığına pH’ın etkisinin belirlenmesi amacıyla saf enzim özütü oda sıcaklığında pH 9,0-12,0 aralığındaki tamponlarla inkübe edildi ve % kalan aktiviteleri hesaplandı. 1440 dakikalık (24 saat) inkübasyon sonrasında pH 11,0’deki kalan aktivitenin %113’e çıktığı, pH 7,0’ın %51’e, pH 8,0’ın %70’e, pH 9,0’ın %90’a pH 10,0’ın %62’ye ve pH 12,0’ın %74’e düştüğü belirlendi. Sonuçlar Şekil 16-a’da gösterildi.



Şekil 16-a. *B. pacificus* 2NP6 izolatına ait proteaz enziminin pH kararlılık grafiği

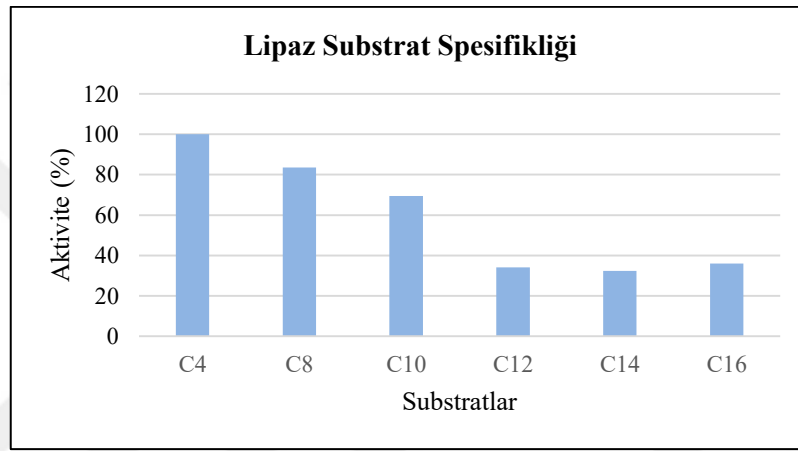
B. pacificus 2NP6 izolatından elde edilen lipaz enziminin kararlılığına pH'ın etkisinin belirlenmesi amacıyla saf enzim özütü oda sıcaklığında pH 5,0-9,0 aralığındaki tamponlarda inkübe edildi ve % kalan aktiviteleri hesaplandı. 1440 dakikalık (24 saat) inkübasyon sonrasında pH 5,0'deki aktivitenin %69'a, pH 6,0'da %56'ya, pH 7,0'de %77'ye, pH 8,0'de %63 ve pH 9,0'da ise %62'ye düştüğü belirlendi. Sonuçlar Şekil 16-b'da gösterildi.



Şekil 16-b. *B. pacificus* 2NP6 izolatına ait lipaz enziminin pH kararlılık grafiği

3.7.5. Substrat Spesifikliği

B. pacificus 2NP6 izolatından elde edilen lipaz enziminin substrat spesifikliğinin incelenmesi amacıyla farklı zincir uzunluğundaki *p*NP esterleri (4C, 8C, 10C, 12C, 14C, 16C) kullanıldı. Saf enzimle gerçekleştirilen aktivite testlerinde en yüksek aktivitenin kısa zincirli *p*-nitrofenol esteri olan *p*NPB varlığında ortaya çıktığı Şekil 17’de görüldü. Bu sonuçlara bağlı olarak bu aşamadan sonra gerçekleştirilen tüm karakterizasyon işlemlerinde substrat olarak *p*NPB kullanıldı.



Şekil 17. *B. pacificus* 2NP6 izolatına ait lipaz enziminin substrat spesifikliği grafiği

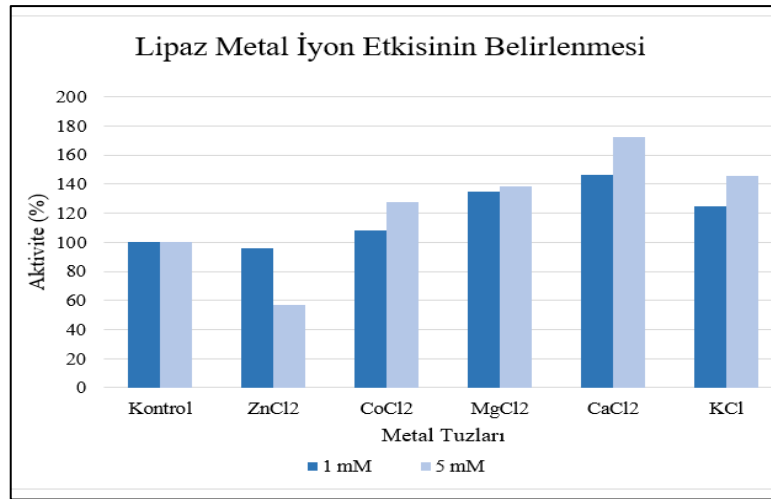
3.7.6. Metal İyon Etkisi

B. pacificus 2NP6 izolatından elde edilen proteaz ve lipaz aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi Zn^{+2} , Co^{+2} , Mg^{+2} , Ca^{+2} ve K^{+} metal iyonları kullanılarak 1 saat optimum sıcaklıkta inkübasyon neticesinde ortaya çıkarıldı. İnkübasyon süresi sonunda metal iyonlarının proteaz aktivitesi üzerine aktivatör etki gösterdiği belirlendi. Aktiviteyi, Zn^{+2} metal iyonunun 1 mM varlığında %100, 5 mM varlığında ise %75 arttırmış olduğu; Co^{+2} iyonunun 1 mM varlığında %20, 5 mM varlığında ise %24 arttırmış olduğu; Mg^{+2} iyonunun 1 mM varlığında %100, 5 mM varlığında ise %182 arttırmış olduğu; Ca^{+2} iyonunun 1 mM varlığında %217, 5 mM varlığında ise %195 arttırmış olduğu; K^{+} iyonunun 1 mM varlığında %93 ve 5 mM varlığında ise %111 arttırmış olduğu belirlendi (Tablo 19, Şekil 18-a).

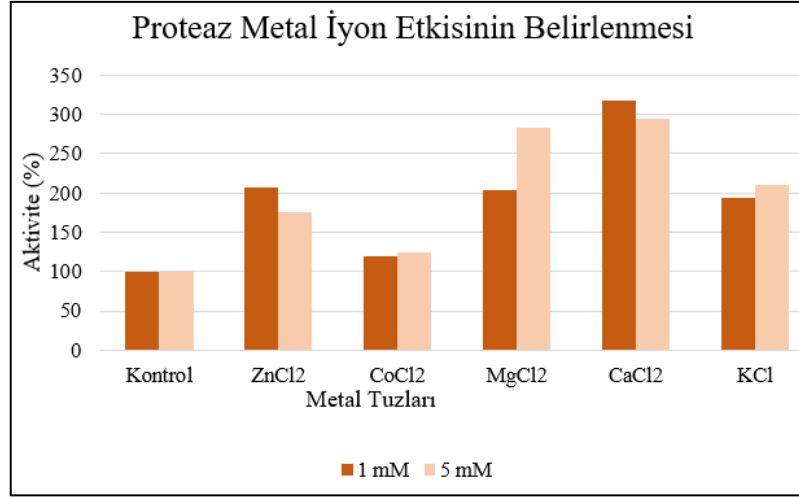
İnkübasyon süresi sonunda metal iyonlarının lipaz aktivitesi üzerine etkisine bakıldığında, Zn^{+2} metal iyonunun enzim aktivitesini inhibe ettiği ve 1 mM varlığında %96'ya, 5 mM varlığında ise %57'ye düşürdüğü belirlendi. Co^{+2} , Mg^{+2} , Ca^{+2} ve K^{+} metal tuzlarının ise aktivatör etki yapmış olduğu ve Co^{+2} iyonunun aktiviteyi 1mM varlığında %8, 5 mM varlığında ise %27 arttırmış olduğu; Mg^{+2} iyonunun 1 mM varlığında %35, 5 mM varlığında ise %38 arttırmış olduğu; Ca^{+2} iyonunun 1 mM varlığında %47, 5 mM varlığında ise %72 arttırmış olduğu ve K^{+} iyonunun ise aktiviteyi 1 mM varlığında %25, 5 mM varlığında ise %45 arttırmış olduğu belirlendi (Tablo 19, Şekil 18-b).

Tablo 19. *B. pacificus* 2NP6'dan elde edilen proteaz ve lipaz aktivitelere metal iyonların etkisi

Metal iyon / Aktivite(%)	Proteaz		Lipaz	
	1 mM	5 mM	1 mM	5 mM
Kontrol	100	100	100	100
$ZnCl_2$	206	175	96	57
$CoCl_2$	120	124	108	127
$MgCl_2$	204	282	135	138
$CaCl_2$	317	295	147	172
KCl	193	211	125	145



Şekil 18-a. *B. pacificus* 2NP6 proteaz aktivitesine metal iyonlarının etki grafiği



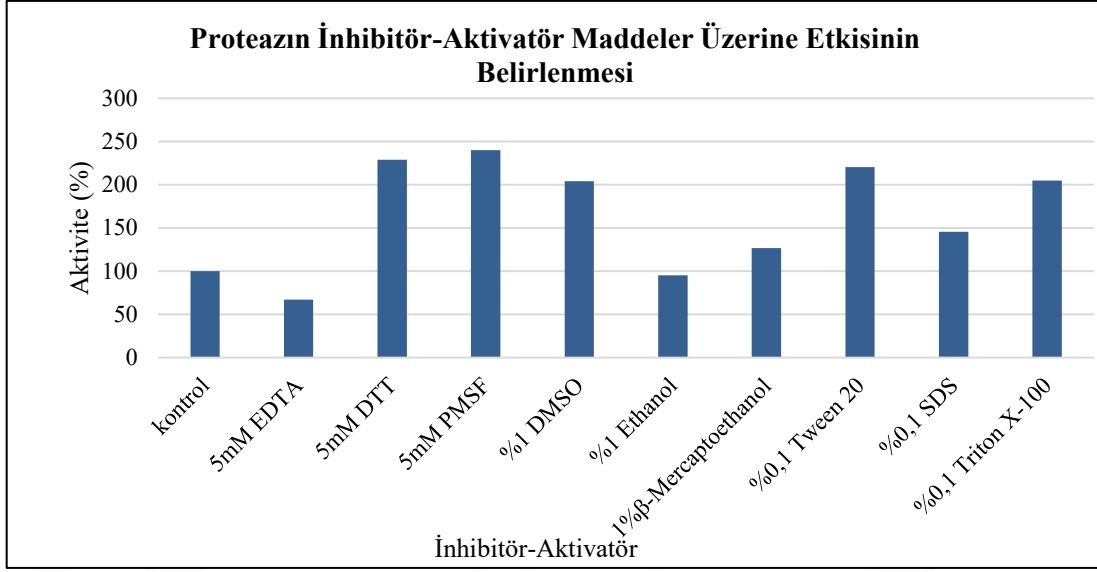
Şekil 18-b. *B. pacificus* 2NP6 lipaz aktivitesine metal iyonlarının etki grafiği

3.7.7. İnhibitör ve Aktivatörlerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi

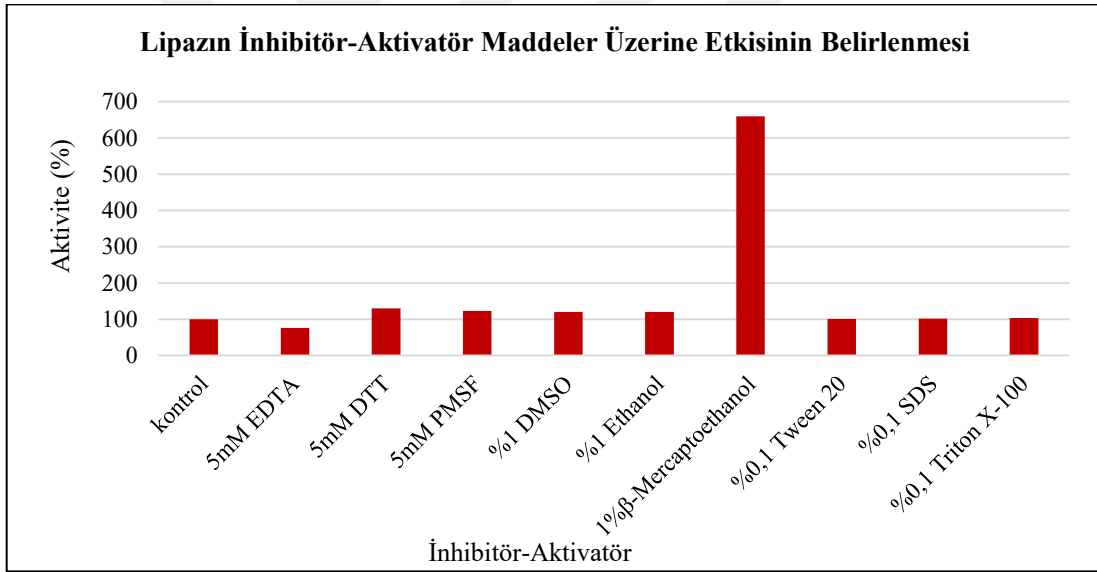
B. pacificus 2NP6 izolatından elde edilen proteaz ve lipaz aktiviteleri üzerine 5 mM EDTA (şelatlayıcı ajan), DTT (S-S inhibitörü), PMSF (serin inhibitörü); %1 (v/v) DMSO (organik çözücü), β - Merkaptotanol (S-S inhibitörü), etanol (organik çözücü); Anyonik deterjanlar olan %0,1 (v/v) SDS, Tween-20, Triton X-100 etkilerini gözlemlemek için 1 saat optimum sıcaklıklarda bekletildikten sonra hiç bekletilmeden % kalan aktiviteleri hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Tablo 20 ve Şekil 19- a ve b de gösterildi.

Tablo 20. *B. pacificus* 2NP6 lipaz ve proteaz aktivitelerine organik çözücülerin etkisi

		Konsantrasyon	Proteaz	Lipaz
Etki şekli	Kontrol	0 mM	100	100
Şalatlayıcı ajan	EDTA	5 mM	67	76
S-S inhibitörü	DTT	5 mM	229	130
	β -Mercaptoethanol	%1 (v/v)	127	659
Serin inhibitörü	PMSF	5 mM	240	123
Organik Çözücü	DMSO	%1 (v/v)	204	121
	Ethanol	%1 (v/v)	95	121
Anyonik deterjanlar	Tween 20	%0,1 (v/v)	220	101
	SDS	%0,1 (v/v)	145	101
	Triton X-100	%0,1 (v/v)	205	103



Şekil 19-a. İnhibitör-aktivatör maddelerin *B. pacificus* 2NP6 proteazına etkisi



Şekil 19-b. İnhibitör-aktivatör maddelerin *B. pacificus* 2NP6 lipazına etkisi

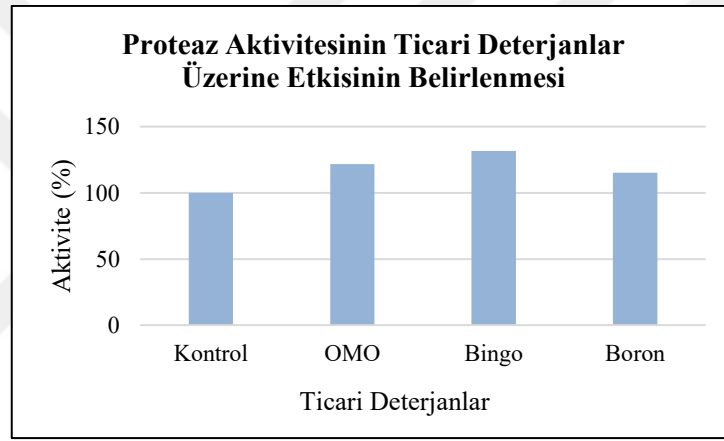
3.7.8. Deterjan Stabilitesi

B. pacificus 2NP6 izolatından elde edilen lipaz ve proteaz aktivitesi üzerine ticari deterjanların (OMO, Bingo, Boron) etkileri incelendi. Ticari deterjanlarla 30 dakika inkübasyon sonunda her bir enzimin kendi standart aktivite metodu ile aktivite ölçümleri gerçekleştirildiğinde deterjanların lipaz aktivitesini inhibe ettiği, proteaz aktivitesinde ise

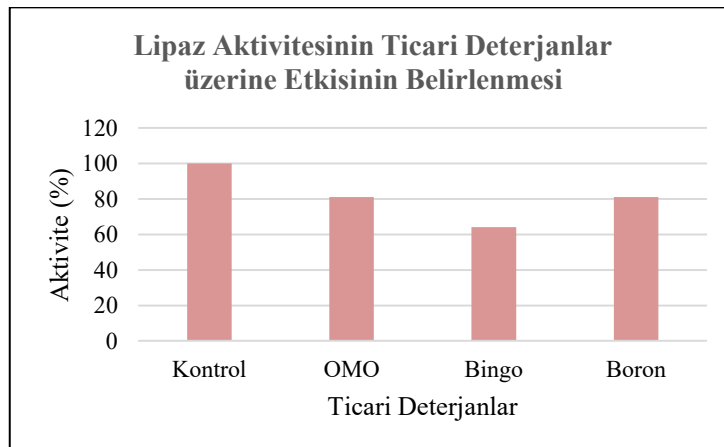
belli bir oranda aktivatör etki yaptığı tespit edildi. Elde edilen sonuçlar Tablo 21 ve Şekil 20-a ve b de gösterildi.

Tablo 21. *B. pacificus* 2NP6 lipaz ve proteaz aktivitelere ticari deterjanların etkisi.

Ticari Deterjan \ Aktivite (%)	Konsantrasyon	Proteaz	Lipaz
Kontrol	0	100	100
OMO	5 mg/mL	122	81
Bingo	5 mg/mL	132	64
Boron	5 mg/mL	115	81



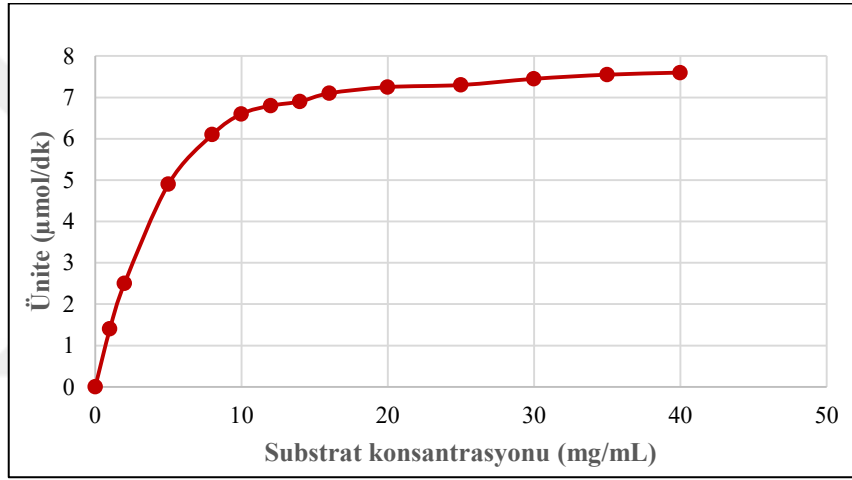
Şekil 20-a. *B. pacificus* 2NP6 proteaz aktivitesine ticari deterjanların etkisi.



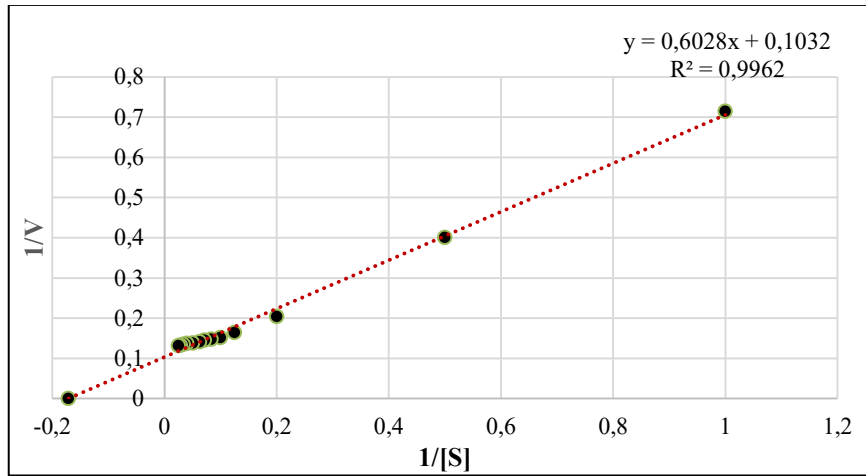
Şekil 20-b. *B. pacificus* 2NP6 lipaz aktivitesine ticari deterjanların etkisi.

3.7.9. Kinetik Parametreler

B. pacificus 2NP6 izolatından elde edilen proteazın kinetik parametrelerinin incelenmesinde substrat olarak azokazein varlığında substrat-aktivite grafiği çizilerek enzimin basit Michaelis- Menten kinetiğine uyduğu tespit edildi. Substrat olarak azokazein için çizilen Lineweaver-Burk eğrilerinin oluşturduğu doğrunun x-eksenini kestiği nokta $-1/K_m$ 'ye eşitlenerek K_m değeri 5,841085 mg/mL, y-eksenini kestiği nokta ise $1/V_{max}$ 'a eşitlenerek V_{max} değeri 13514,54 U/mg olarak hesaplandı. Michaelis- Menten eğrisi Şekil 21-a'da, Lineweaver-Burk eğrisi ise Şekil 21-b'de gösterilmektedir.

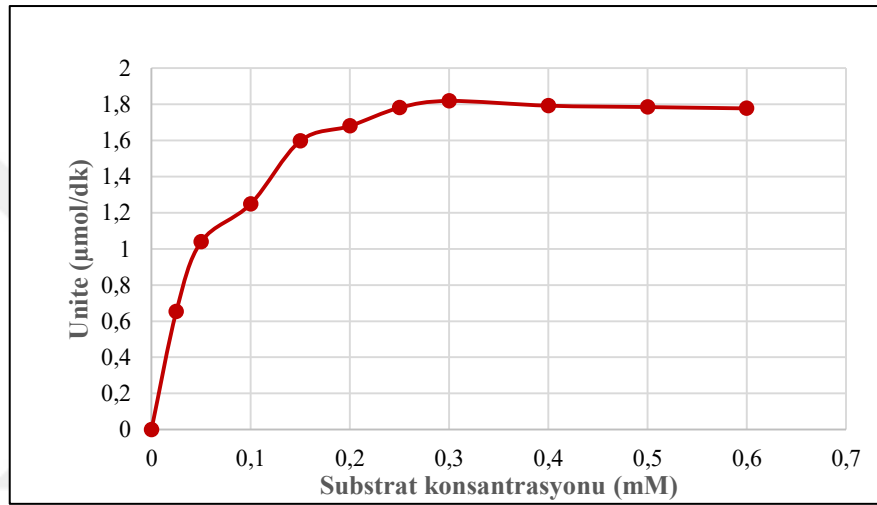


Şekil 21-a. *B. pacificus* 2NP6 proteazının Michaelis-Menten eğrisi

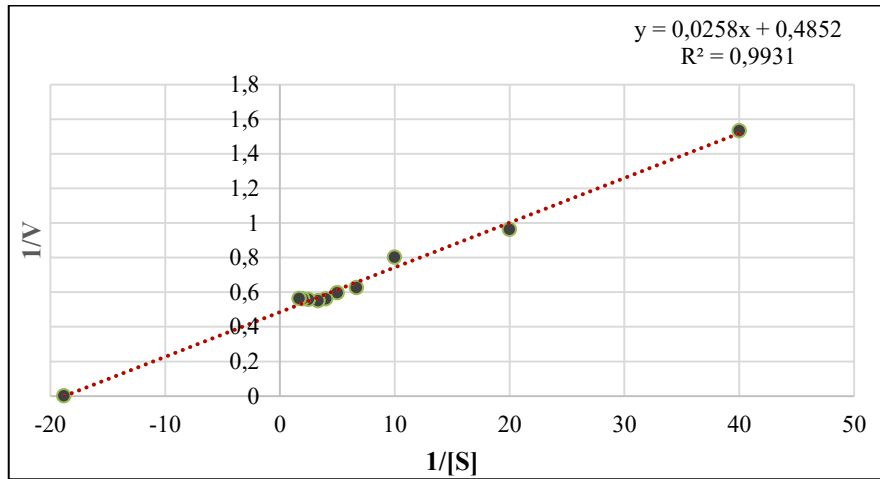


Şekil 21-b. *B. pacificus* 2NP6 proteazının Lineweaver-Burk eğrisi.

B. pacificus 2NP6 izolatından elde edilen lipazın kinetik parametrelerinin incelenmesinde substrat olarak *p*-nitrofenilbutirat varlığında substrat-aktivite grafiği çizilerek enzimin basit Michaelis- Menten kinetiğine uyduğu tespit edildi. Substrat olarak *p*-nitrofenilbutirat için çizilen Lineweaver-Burk eğrilerinin oluşturduğu doğrunun x-eksenini kestiği nokta $-1/K_m$ 'ye eşitlenerek K_m değeri 0,053185 mM, y-eksenini kestiği nokta ise $1/V_{max}$ 'a eşitlenerek V_{max} değeri 4349,01 U/mg olarak hesaplandı. Michaelis-Menten eğrisi Şekil 22-a'da, Lineweaver-Burk eğrisi ise Şekil 22-b'de gösterilmektedir.



Şekil 22-a. *B. pacificus* 2NP6 lipazının Michaelis-Menten eğrisi.



Şekil 22-b. *B. pacificus* 2NP6 lipazının Lineweaver-Burk eğrisi.

3.8. Endüstriyel Alan Çalışmaları

3.8.1. Proteaz Enziminin Dehairing (Deriden Kıl Giderimi) Kapasitesinin Belirlenmesi

B. pacificus 2NP6 izolatından elde edilen ham ve saflaştırılmış konsantre haldeki proteaz enzimlerinin dana derisinden kıl giderme potansiyeli araştırıldı. Deneyde, kontrol grubu olarak 50 mM Glisin-NaOH pH 10,0 tamponuna deri batırma işlemi yapıldı. Deney grupları her 24 saatte bir kıl giderimi olup olmadığı kontrol edilerek 96 saat bekletildi. Tam bir tüy dökümünün hem saf hemde ham özütteki proteaz enzimlerinden oluşan her iki deney grubunda aynı saatte olduğu belirlendi. Deney grupları birbirleri ile karşılaştırıldığında ham enzimde bekletilen dana derisi parçasında 96. saatte tüy dökümünün gerçekleştiği ancak deri yüzeyinin yer yer lekeli bir görüntüde olup çok temiz bir görüntünün olmadığı tespit edilmiş ve sonuç Şekil 23'te görülmektedir. Diğer taraftan saflaştırıldıktan sonra konsantre edilen proteaz enziminde bekletilen dana derisi parçasında da tüy dökülmesinin 96. saatte olduğu belirlendi. Saflaştırılmış enzim ile elde edilen dana derisinin daha beyaz ve lekesiz olduğu Şekil 23'te gösterildi. Bunun yanında kontrol grubu olarak tamponda bekletilen dana derisinde yapılan kontrollerde derideki kıllarda herhangi bir dökülmenin olmadığı belirlendi.



Şekil 23. *B. pacificus* 2NP6'dan elde edilen ham ve saf haldeki proteaz enzimi yardımıyla dana derisinden kıl giderimi.

3.8.2. Enzimlerin Deterjan Katkısı Olarak Kullanım Kapasitelerinin Belirlenmesi

Proteaz enziminin deterjan katkısı olarak kullanım potansiyeli araştırıldı. Bu amaçla, kontrol ile birlikte toplamda 4 adet deney grubu oluşturuldu. Her bir beyaz pamuklu kumaş

parçasına 10 µl kan emdirildi ve 90 °C’ de 10 dk bekletilerek lekenin iyice kumaşa nüfuz etmesi sağlandı. Ardından kontrol grubu olarak 30 mL distile su içerisinde lekeli kumaş parçası, 2. Grupta 30 mL distile su içerisinde 5 mg/mL olacak şekilde ticari deterjan içerisinde lekeli kumaş parçası, 3. Grupta 30 ml distile su içerisinde 600 µl saf enzim özütü olacak şekilde lekeli kumaş parçası ve 4. Grupta 30 mL distile su içerisinde 5 mg/mL olacak şekilde ticari deterjan ve 600 µl saf enzim özütü olacak şekilde lekeli kumaş parçası konularak 30 dakika boyunca 120 rpm çalkalayıcı inkübatörde proteaz enziminin optimum sıcaklığı olan 55 °C’de bekletildi. Süre sonunda kontrol grubundaki kumaş parçasının sarı bir renk aldığı ve lekenin tamamen çıkmadığı, 2. grup olan ticari deterjan ile muamele edilen kumaş parçasında lekenin tamamen çıktığı ve kumaş renginin beyaz olduğu, 3. grup olan enzim ile muamele edilen kumaş parçasında lekenin tamamen çıktığı fakat kumaş renginin sarıya dönük bir renk aldığı ve son grup olan 4. grupta ise lekenin tamamen çıktığı fakat kumaş renginin enzim ile muameleye göre daha açık bir sarı renk aldığı görüldü ve sonuçlar Şekil 24’te gösterildi. Çıkan sonuçlar karşılaştırıldığında ticari deterjanların içeriğinde beyazlatıcı maddelerin bulunduğundan dolayı kumaş renginin beyaz olduğu, kumaştan leke çıkartma yönünden enzim özütünün ticari deterjan ile aynı derecede işlem yaptığı gözlemlendi.



Şekil 24. *B. pacificus* 2NP6’ya ait saf proteazın pamuklu kumaştan kan lekesi çıkartma performansının ticari deterjanlar ile karşılaştırılması.

B. pacificus 2NP6 Lipaz enziminin deterjan katkısı olarak kullanım potansiyeli araştırıldı. Bu amaçla, kontrol ile birlikte toplamda 4 adet deney grubu oluşturuldu. Her bir mavi pamuklu kumaş parçasına 10 µl zeytin yağı emdirildi ve ardından kontrol grubuna 30 ml distile su içerisinde lekeli kumaş parçası, 2. gruba 30 mL distile su içerisinde 5 mg/mL olacak şekilde ticari deterjan içerisinde lekeli kumaş parçası, 3. gruba 30 mL distile su

içerisinde 600 µl saf enzim özütü olacak şekilde lekeli kumaş parçası ve 4. gruba 30 mL distile su içerisinde 5 mg/ml olacak şekilde ticari deterjan ve 600 µl saf enzim özütü olacak şekilde lekeli kumaş parçası konularak 30 dakika boyunca 120 rpm çalkalayıcı inkübatörde optimum sıcaklık olan 60 °C’de bekletildi. İnkübasyonun ardından, kumaş parçaları oda sıcaklığında kurutulduktan sonra elde edilen sonuçlar incelendiğinde Şekil 25-a’da görüldüğü gibi, kontrol grubunda lekenin tamamen mevcut olduğu, sadece enzim ve sadece deterjan ile muamele edilen gruplarda kontrole nazaran daha az lekenin kaldığı, enzim ve deterjanın aynı anda içinde bulunduğu grupta ise deney düzeneğindeki tüm gruplara göre daha az leke görüldüğü gözlemlendi.

B. pacificus 2NP6 lipazı ile oluşturulan diğer bir enzim deney düzeneğinde ise, biri kontrol grubu olmak üzere 4 adet grup oluşturuldu. Her bir beyaz pamuklu kumaş parçasına yumurta sarısı emdirildi ve ardından kontrol grubuna 30 mL distile su içerisinde lekeli kumaş parçası, 2. gruba 30 mL distile su içerisinde 5 mg/ml olacak şekilde ticari deterjan içerisinde lekeli kumaş parçası, 3. gruba 30 ml distile su içerisinde 600 µl saf enzim özütü olacak şekilde lekeli kumaş parçası ve 4. gruba 30 ml distile su içerisinde 5 mg/mL olacak şekilde ticari deterjan ve 600 µl saf enzim özütü olacak şekilde lekeli kumaş parçası konularak 30 dakika boyunca 120 rpm çalkalayıcı inkübatörde optimum sıcaklık olan 60 °C’de bekletildi. Kumaş parçalarının oda sıcaklığında kurutulmasından sonra elde edilen sonuçlara incelendiğinde, kontrol grubunda lekenin tamamen mevcut olduğu, sadece enzim ve sadece deterjan ile muamele edilen gruplarda lekenin hemen hemen hepsinin çıkmış olduğu, enzim ve deterjanın aynı anda içinde bulunduğu grupta ise tamamen lekenin çıkmış olduğu görünmekte olup sonuçlar Şekil 25-b.’verilmektedir.



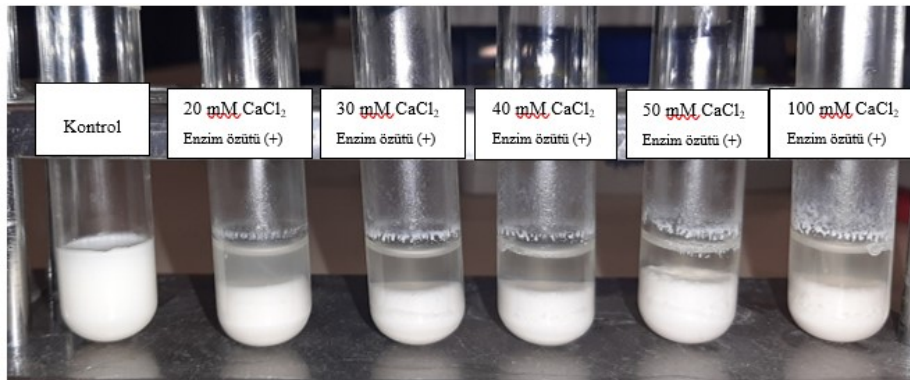
Şekil 25-a. *B. pacificus* 2NP6’ya ait saf lipazın pamuklu kumaştaki zeytinyağı lekesi çıkartma performansının ticari deterjanlarla karşılaştırılması.



Şekil 25-b. *B. pacificus* 2NP6'ya ait saf lipazın pamuklu kumaştan yumurta sarısı lekesi çıkartma performansının ticari deterjanlar ile karşılaştırılması

3.8.3. Proteaz Enziminin Süt Koagülasyonunda Kullanımı

B. pacificus 2NP6 izolatından elde edilen proteaz enziminin yardımıyla kalsiyumun süt pıhtılaşma üzerine etkisinin araştırılması amacıyla 20-100 mM aralığındaki CaCl_2 konsantrasyonları kullanıldı. Yapılan deney sonucunda kontrol hariç her bir konsantrasyondaki sütte pıhtılaşma olduğu gözlemlendi. İlk pıhtılaşmanın olduğu süre kaydedilerek Shata'nın belirlediği formül ile aktiviteleri belirlendi. Sonuçlara bakıldığında 20 mM konsantrasyonda aktivite 11,05 U/mL; 30 mM konsantrasyonda aktivite 16,6 U/mL; 40 mM konsantrasyonda aktivite 19,43 U/mL; 50 mM konsantrasyonda aktivite 20,77 U/mL; 100 mM konsantrasyonda aktivite 22,22 U/mL olduğu belirlendi. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde 20 mM'dan 100 mM doğru gidildikçe süt pıhtılaşma aktivitesinin arttığı belirlendi. Buna göre en berrak peynir altı suyunun 50 mM konsantrasyonda olduğu Şekil 26'da gösterildi.



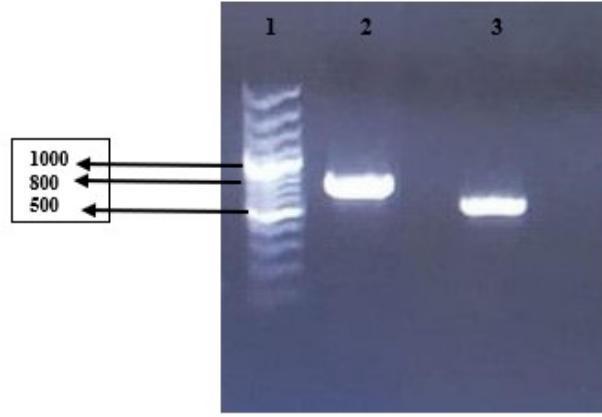
Şekil 26. *B. pacificus* 2NP6 izolatından elde edilen proteazın 20-100 mM aralığındaki CaCl_2 konsantrasyonunda süt pıhtılaşması üzerine etkisi.

3.9. Tüm Genom Dizisi Üzerindeki Proteaz ve Lipaz Genlerinin Analizi

B. pacificus 2NP6'nın genom dizisi incelendiğinde, içerisinde 58 tane proteaz, 10 tane lipaz geninin olduğu, proteaz genlerinden 10 tanesinin ise metalloproteaz olduğu tespit edilmiştir. Üreme optimizasyonları sonucunda elde edilen yüksek proteaz aktiviteli enzimlerin metalloproteaz tipinde olduğu yapılan aktivite testlerinde ortaya çıkarılmıştır. Buradan yola çıkılarak hem saflaştırma çalışmalarında hemde saflaştırılan enzime ait genin bulunması çalışmalarında genomdaki metalloproteazlar hedeflenmiştir. Belirtildiği gibi genomdaki proteaz genlerinden on tanesin metalloproteaz olduğu görülmüştür. Bu proteazlar arasından hedefteki deterjan stabil proteazın ortaya çıkarılması çalışmasında hücre dışı enzimler üzerinde çalışıldığından öncelikle metalloproteazların bakteriyel hücre dışı protein salınım sinyalleri araştırılmıştır. Ayrıca deterjan stabil enzimlerin alkalın pH'larda aktif olması beklenildiğinden gen sekanslarından yola çıkılarak elde edilen protein sekanları yardımıyla herbir genin izoelektrik noktası bulunmuş olup bu iki kriter göz önüne alınarak hedef genin proteaz için “fig|1396.3717.peg.4631| Uncharacterized membrane zinc metalloprotease YwhC” olduğu düşünülmüştür. Ayrıca hem hücre dışı salınım sinyali hem de alkalın pH'larda aktivitede bir gösterge olabilecek olan yüksek izoelektrik nokta dikkate alınarak lipaz için ise hedef gen olarak “>fig|1396.3717.peg.483| Lipase/Acylhydrolase with GDSL-like motif” seçilerek uygun ekspresyon vektörlerine göre dizayn edilen primer çifti ile PZR reaksiyonu gerçekleştirilerek genler elde edilmiştir.

3.9.1. Lipaz ve Proteaz Genlerinin PZR ile Çoğaltılması

Tüm genom analizi sonucu elde edilen veriler doğrultusunda hem lipaz hem de proteaz genlerinin eldesi için dizayn edilen primer çiftleri ile izole edilen *Bacillus pacificus* 2NP6 genomik DNA'sından belirlenen şartlarda PZR reaksiyonu gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar marker (şahit) DNA ile yürütülerek istenilen ağırlıktaki gen bölgelerinin elde edildiği Şekil 27'de gösterildi.



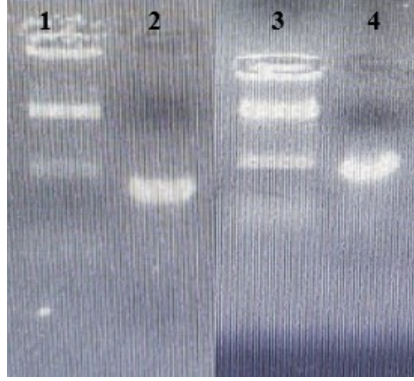
Şekil 27. *B. pacificus* 2NP6 genomik DNA kalıp olarak kullanılarak proteaz ve lipaz için belirlenen primer çiftleri ile gerçekleştirilen PZR reaksiyon sonucu. 1. Marker, 2. BcpLip, 3. BcpPro.

3.9.2. Lipaz ve Proteaz Genlerine Ait PZR Ürünlerinin pJET 1.2 TA Klonlama Vektörüne Klonlanması ve Dizi Analizi

PZR reaksiyonu sonucu elde edilen proteaz ve lipaz PZR ürünleri uygun şartlar altında pJET 1.2 TA klonlama vektörüne klonlandı. Gerçekleştirilen transformasyonlar neticesinde elde edilen kolonilerden plazmid DNA'sı izolasyonları gerçekleştirilerek *Bgl*III restriksiyon enzimi ile kesildi. Kesim sonucunda ilgili genleri içerdiği teyit edilen klonların baz dizileri MacroGen firmasına sekans analizi için gönderilerek gen dizileri belirlendi. Dizin analizi sonucunda 585 bp proteaz, 723 bp lipaz klonlarının beklenildiği gibi doğru genleri içeren klonlar olduğu belirlendi ve bu genlere ait nükleotit ve amino asit dizileri Ek'ler kısmında verildi.

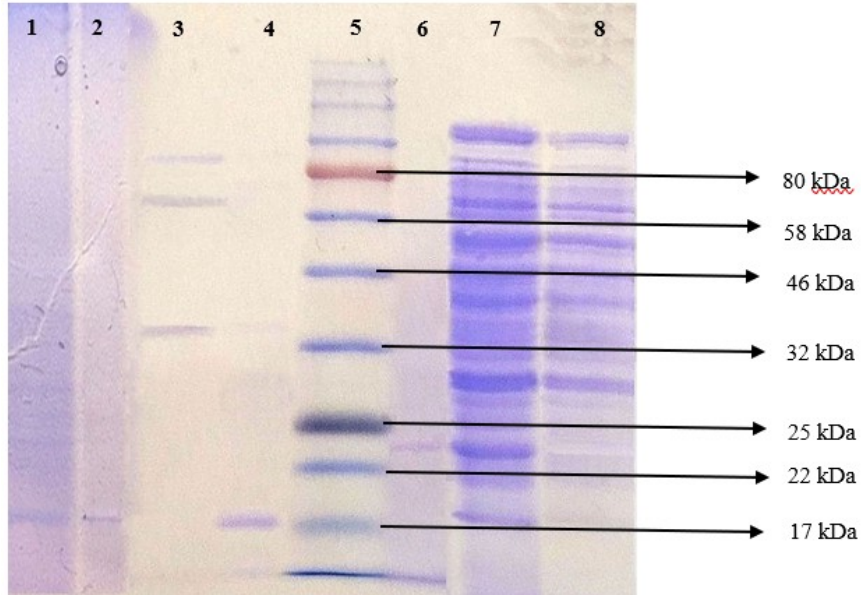
3.9.3. Proteaz ve Lipaz Genlerinin Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

pJET 1.2 TA klonlama vektörüne klonlanan proteaz ve lipaz genleri ile ekspresyon vektörü olarak klonlamanın gerçekleştirilecek olduğu proteaz geni için pET-20b(+) ekspresyon vektörü, lipaz geni için ise pET-28a(+) ekspresyon vektörü belirlenen kesim bölgelerinden restriksiyon enzimleri ile kesildi ve ardından jelden çıkartma işlemi yapıldı. Belirlenen şartlar ile proteaz geni pET-20b(+) vektörüne, lipaz geni ise pET-28a(+) vektörüne ligasyon yapıldı. Transformasyon sonrası elde edilen klonlar belirlenen restriksiyon enzimleri ile kesim işlemi yapılarak doğruluğu teyit edildi (Şekil 28).



Şekil 28. pET-20b(+) vektörüne klonlanan proteaz geninin *Xho*I ve *Nco*I kesimleri ile pET-28a(+) vektörüne klonlanan lipaz geninin *Xho*I ve *Nco*I kesimleri ile kontrolü. 1. *E. coli* JM101/pET20b(+)-BcpPro-His, 2. BcpPro/PZR, 3. *E. coli* JM101/pET28a(+)-BcpLip-His, 4. BcpLip/PZR.

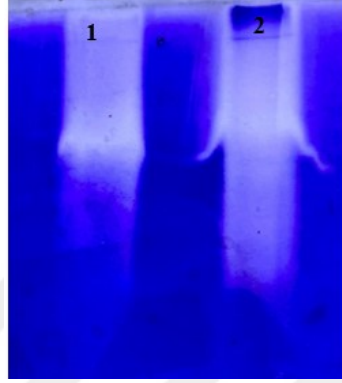
Kesim sonuçları ile doğruluğu teyit edilen klonlar *E. coli* BL21(DE3) hücrelerine aktarılarak ekspres edildi. Ekspresyon sonuçları SDS-PAGE yardımıyla analiz edildi. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda klonlanarak elde edilen lipaz ve proteaz enzimleri ile eş zamanlı üretim sonucu saflaştırılarak elde edilen lipaz ve proteaz enzimlerinin aynı ağırlıkta protein bantları oldukları SDS-PAGE ile doğrulandı (Şekil 29).



Şekil 29. SDS-PAGE poliakrilamid jel görüntüsü. 1. *Bacillus pacificus* 2NP6 Ham hücre özütü, 2. *Bacillus pacificus* 2NP6'dan saflaştırılmış proteaz, 3. *E. coli* BL21(DE3)/pET20b(+), 4. *E. coli* BL21(DE3)/pET20b(+)-BcpPro-His,, 5. Marker(NEB-P7712), 6. *Bacillus pacificus* 2NP6'dan saflaştırılmış lipaz, 7. *E. coli* BL21(DE3)/pET28a(+)-BcpLip-His, 8. *E. coli* BL21(DE3)/pET28a(+)

3.10. Enzimlerin Zimogram Analizi

B. pacificus 2NP6 izolatından eş zamanlı üretim ile elde edilen ham özüt ile yine eş zamanlı üretim sonrası saflaştırma basamağı sonrasında elde edilen proteazın SDS-PAGE yöntemi ile zimogram analizi gerçekleştirildi. Aktivite sonuçları Şekil 30-a'da gösterildi.



Şekil 30-a. *B. pacificus* 2NP6'ya ait proteaz zimogramı. 1. Ham hücre özütü, 2. Saflaştırılmış proteaz

B. pacificus 2NP6 izolatından eş zamanlı üretim ile elde edilen ham özüt ile yine eş zamanlı üretim sonrası saflaştırma basamağı sonrasında elde edilen lipazın belirtilen Native-PAGE yöntemi ile zimogram analizi gerçekleştirildi. Aktivite sonuçları Şekil 30-b'da gösterildi.



Şekil 30-b. *B. pacificus* 2NP6'ya ait lipaz zimogramı. 1. Ham hücre özütü, 2. Saflaştırılmış lipaz

4. TARTIŞMA

Enzimlerin özellikle lipaz ve proteaz enzimlerinin eş zamanlı üretiminin sağlanabilmesi için besiyeri ortamının stabilite, karşılaştırma ve maliyet açılarından en uygun hale getirilmesi gerekmektedir. Tek bir fermantasyon sistemi ile çoklu enzim ve metabolit üretimi sağlayabilmek için kolay bulunan besiyeri içerikleri kullanımı hem ekonomik hem de çabuk üretim açısından kolaylık sağlamaktadır. Bu durum dikkate alınarak uygun ortam şartlarının optimizasyonu sağlanarak, lipaz ve proteaz enzimlerini üretebilme kabiliyetine sahip bakteri izolatının eldesi sonucunda üretilcek enzimlerin endüstriyel kullanım potansiyellerinin ortaya çıkarılmasını amaçladığımız çalışmamızda, ön araştırmalarımız ve değerlendirmelerimiz doğrultusunda lipaz ve proteaz aktivitesi gösteren “*B. pacificus* 2NP6 izolatı” seçilerek, lipaz ve proteaz enzimlerinin optimize şartlarda eş zamanlı üretimi yapıldı ve her iki enzimin karakterizasyonları ve endüstriyel kullanım potansiyelleri araştırılarak elde edilen sonuçlar değerlendirildi.

Çalışmada öncelikle her iki enzimi üretebilme kabiliyetindeki bakteriyal izolatın tür tayini çalışmaları gerçekleştirildi. Türü bilinmeyen bakterinin sınıflandırılması için öncelikle 16S rRNA genlerinin baz dizilerinin belirlenmesi gerekmektedir (Lilburn & Garrity, 2004). Bu amaçla gerçekleştirilen 16S rRNA gen sekans analizi sonucunda elde edilen gen dizini kullanılarak filogenetik ağaçlar oluşturuldu ve böylece suşun ait olduğu tür belirlenmeye çalışıldı. 16S rRNA gen dizisi açısından aralarında %97’den daha fazla benzerlik bulunan bakterilerin, kesin olarak aynı tür bakteriler olmayabileceği belirtilmektedir (Cho & Tiedje; 2001; İnan, 2011). Fakat Son zamanlarda bu değer %98,7-99 aralığına çıkarılmıştır (Stackebrandt & Ebers, 2006; Saygın, 2019). Bu bağlamda bakıldığında 2NP6 izolatının 16S rRNA dizi analizi sonucu %99,36 oranında *Bacillus paramycoides*’e benzerlik gösterdiği görülmektedir. Literatürler incelendiğinde, 16S rRNA gen sekansına göre yeni bakteri türlerinin belirlenmesinin güvenilir olmayacağı belirtilmiştir (Stackebrandt vd., 2002). 16S rRNA genleri arasındaki benzerliğin karşılaştırılması tek başına yeterli olmadığı için, kesin tür tayininin gerçekleştirilmesi ve suşun sahip olduğu lipaz ve proteaz gen sekanslarının ortaya çıkarılması amacıyla tüm genom sekansı gerçekleştirildi. Bu analiz sonucu suşun %84,8 olan DDH değerinde dikkate alınarak *Bacillus pacificus* MCC 1A06182 türüne ait olduğu ortaya çıkarıldı. Literatürler

incelendiğinde bu tür üzerinde proteaz ve lipaz açısından bir çalışmanın bulunmuyor olması çalışmanın özgün yönüne katkı sunmaktadır.

Karbon kaynakları, mikroorganizmaların üremesi ve dolayısıyla enzim üretimi için birincil enerji kaynağı görevi görmektedir (Niyonzima, 2019). Çalışmamızda da eş zamanlı üretim için öncelikle karbon kaynakları değerlendirilerek, kullandığımız 2NP6 izolatının, ilgili enzimleri optimum olarak üretebileceği karbon kaynakları seçilmiştir. Üretimin gerçekleştirildiği kültür ortamlarında lipazlara göre proteazların aktiviteleri daha düşüktür. Bu durum dikkate alınarak öncelikle proteazın karbon kaynağının düzenlenmesi yoluna gidilmiştir. Yapılan farklı araştırmalarda,

- *Bacillus cereus*'ta proteaz üretimi için en iyi karbon kaynağının skim milk ve glukoz (Beena vd., 2012),
- *Bacillus subtilis* E6-5 ve *Bacillus* sp. Gs-3 için süktroz (Zeren, 2020; George-Okafor & Odibo, 2011),
- *Bacillus cereus* SIU1 ve *Bacillus circulans* MTCC7906 için glukoz (Singh vd., 2011; Jaswal & Kocher, 2007),
- *Bacillus licheniformis* KBDL4 ve *Bacillus flexus* XJU-1 için ise kazein (Pathak & Deshmukh, 2012; Niyonzima & More, 2014) olduğu belirtilmiştir.

Bu çalışmaların sonuçları ışığında ve yaptığımız değerlendirmeler sonucunda çalışmamızda benzer şekilde, her iki enzimin karbon kaynağı açısından en yüksek aktivite değerlerine “skim milk” kullanarak ulaşıldı.

Proteaz ve lipaz enzimlerinin en yüksek üretimini sağlayan proteaz karbon kaynağının belirlenmesinin ardından, lipaz için en yüksek üretimini sağlayan karbon kaynağı her iki enzim yönünden araştırılmıştır. Yapılan araştırmada,

- *Bacillus salmalaya* 139SI suşu ve *Bacillus stearothermophilus*'den lipaz üretimi için zeytinyağı (Al Mohaini vd., 2022; Massadeh & Sabra, 2011),
- *Bacillus* sp. 42 suşu ve *Bacillus flexus* XJU-1 için pamuk yağı (Eltaweel vd., 2005; Niyonzima & More, 2014) olduğu görüldü.

Bu çalışmalar ile benzer şekilde çalışmamızda da her iki enzim açısından ek olarak susam yağı kullanılarak üretim veriminin optimizasyonu sağlanmıştır.

Azot kaynakları, mikrobiyal üreme ve dolayısıyla endüstriyel enzim üretimi için ikincil enerji kaynağı olarak görev yapmakta olup, mikroorganizmaların çoğunda hücre duvarı bileşenlerini, amino asitleri, peptitleri, proteinleri (endüstriyel enzimler dahil) ve nükleotitleri/nükleik asitleri sentezlemek için önemli bir rol oynamaktadır. Bu amaçla,

bakteriyel endüstriyel enzimlerin üretimi için sıklıkla tripton, pepton, maya özütü ve sığır ekstraktı kullanılmaktadır (Niyonzima, 2019). Araştırmalarda,

- *Bacillus subtilis* PCSIRNL-39 ve *Bacillus flexus* XJU-1'in hücre dışı lipazının üretiminde kullanılan en iyi azot kaynağının pepton (Mazhar vd., 2017; Niyonzima & More, 2014),
- *Bacillus* sp. 42 suşu için tripton (Eltaweel vd., 2005),
- Eş zamanlı olarak serin proteaz ve metallolipaz üretimi sağlanan *Bacillus pumilus* G2 (Sangeetha vd., 2010) ile eş zamanlı lipaz ve proteaz üretimi sağlanan *Bacillus licheniformis* VSG1 için maya özütü (Sangeetha vd., 2010),
- *Bacillus* sp. Gs-3'ten proteaz üretiminde azot kaynağının maya özütü ve pepton ikilisi (George-Okafor & Odibo, 2011) olduğu bildirilmiştir.

Çalışmamızda, *B. pacificus* 2NP6 izolatının besiyeri içeriğindeki belirtilen azot kaynağı literatürdeki diğer azot kaynakları ile uyumluluk gösterdiğinden, her iki enzim açısından en yüksek aktiviteye sahip olan azot kaynağının maya özütü olduğuna karar verilmiştir.

Kültürün ve fermantasyon ortamının başlangıç pH'ı, endüstriyel mikrobiyal enzimlerin salgılanmasını düzenleyen önemli bir faktördür. Besin substratlarının mevcudiyetini veya çeşitli besin bileşenlerinin bakteriyel veya fungal membranlardan taşınmasını etkileyebilir, bu da mikrobiyal üremeyi dolayısıyla endüstriyel enzim üretimini teşvik etmekte olduğu (Niyonzima, 2019) ve eş zamanlı üretimi için de pH 7,5 ile 11,0 arasında değiştiği (Niyonzima & More, 2015) bildirilmiştir. Literatürler incelendiğinde,

- Eş zamanlı olarak proteaz, lipaz ve amilaz üretimi sağlanan *Bacillus flexus* XJU-1 pH'ının 11,0 olduğu (Niyonzima & More, 2014) ve 2NP6 izolatından eş zamanlı proteaz ve lipaz üretimi ile uyumluluk gösterdiği görülmüştür.
- Lipaz ve proteaz üretimi sağlanan *Bacillus licheniformis* VSG1'in pH'ının 7,0 (Sangeetha vd., 2010),
- Serin proteaz ve metallolipaz üretimi sağlanan *Bacillus pumilus* G2 için 9,0 (Sangeetha vd., 2010),
- Proteaz ve lipaz üretimi sağlayan *Bacillus licheniformis* ve *Geobacillus* sp. için 9,0 (Amara vd., 2009),
- *Bacillus subtilis* E6-5'den proteaz üretimi için 8,0 (Zeren, 2020),
- *Bacillus subtilis* PCSIRNL-39'ın lipaz üretimi için 7,0 (Mazhar vd., 2017) olduğu bildirilmiştir.

Çalışmamızda *B. pacificus* 2NP6 izolatından proteaz ve lipaz aktivitesi yönünden eş zamanlı üretimi en iyi pH 11,0 değerinde sağlanmıştır.

Kültürün inokülasyon miktarı da, mikrobiyal büyüme ve dolayısıyla endüstriyel enzim üretimi için temel parametrelerden biridir. Mikroorganizmalar tarafından bakteriyel endüstriyel enzim üretimi için %0,6 ile %4 arasında değişen inokülasyon miktarları bildirilmiştir (Niyonzima., 2019). Bu kapsamda yapılan çalışmalarda,

- *Bacillus licheniformis* VSG1'den eş zamanlı lipaz ve proteaz üretimi için inokülasyon miktarının %2 (Sangeetha vd., 2010),
- *Bacillus flexus* XJU-1 proteaz, lipaz ve amilaz üretimi için %2 (Niyonzima vd., 2014),
- *Bacillus salmalaya* 139SI lipaz üretimi için %1,2 (Al Mohaini vd., 2022),
- *Bacillus subtilis* PCSIRNL-39 lipaz üretimi ve *Bacillus* sp. Gs-3 proteaz üretimi için %5 (George-Okafor & Odibo, 2011),
- *Virgibacillus* sp. EMB13 ile *Bacillus subtilis* E6-5 proteaz üretimleri için %4 (Sinha & Khare, 2012; Zeren, 2020) olduğu bildirilmiştir.

Çalışmamızda da *B. pacificus* 2NP6 izolatından eş zamanlı olarak proteaz ve lipaz üretimi için belirlenen inokülasyon miktarı literatürle uyumlu olarak %4 olarak belirlenmiştir.

Endüstriyel enzim üretiminde kritik bir diğer faktörde inkübasyon süresi olarak kabul edilmekte olup, bakteri ve mantarların ait oldukları türlerinin bu süreçte önemli bir rol oynadığı belirtilmektedir. Optimal inkübasyon süresi, çoğunlukla bakteri türlerine özgü olarak 24 ila 48 saat arasında değişmekte olup, endüstriyel enzim üretiminde fermantasyon maliyetini düşürmek ve daha ekonomik hale getirmek için kısa süreli inkübasyon tercih edilmektedir (Niyonzima, 2019). Akademik değerlendirmelerde,

- Eş zamanlı lipaz ve proteaz üretimi sağlanan *Bacillus licheniformis* VSG1'in optimum inkübasyon süresinin 30 saat (Sangeetha vd., 2010),
- Proteaz, lipaz ve amilaz üretimi sağlanan *Bacillus flexus* XJU-1 için 48 saat (Niyonzima & More, 2014),
- *Bacillus salmalaya* 139SI izolatından lipaz üretimi için 48 saat (Al Mohaini vd., 2022),
- Serin proteaz ve metallolipaz üretimi sağlanan *Bacillus pumilus* G2 için 26 saat (Sangeetha vd., 2010),
- *Bacillus subtilis* PCSIRNL-39 lipaz üretimi için 72 saat (Mazhar vd., 2017),

- *Bacillus flexus* XJU-1 alkalın lipazının üretimi için 36 saat (Niyonzima & More, 2014) olduğu bildirilmiştir.

Bu bilgiler doğrultusunda, *B. pacificus* 2NP6 izolatı üzerine yapılan optimizasyon çalışmalarında eş zamanlı olarak proteaz ve lipaz üretimi için uygun inkübasyon süresinin 48 saat olduğu tespit edilmiştir. Bu inkübasyon süresi sayesinde de, *B. pacificus* 2NP6 izolatının endüstriyel uygulamalarda başarılı bir şekilde kullanılabileceği de gösterilmiştir

Mikroorganizmalar tarafından endüstriyel enzimlerin üretiminde, bakteri ve mantarların üreme hızını etkileyen inkübasyon sıcaklığı, önemli ve kritik bir çevresel faktördür. Genellikle, bakteriyel endüstriyel enzim üretimi için en uygun inkübasyon sıcaklığı 30 ile 50 °C aralığındadır (Niyonzima, 2019). Literatürler incelendiğinde,

- Eş zamanlı lipaz ve proteaz üretimi sağlanan *Bacillus licheniformis* VSG1 için optimum inkübasyon sıcaklığının 40 °C (Sangeetha vd., 2010),
- Proteaz, lipaz ve amilaz üretimi sağlanan *Bacillus flexus* XJU-1 ile birlikte serin proteaz ve metallolipaz üretimi sağlanan *Bacillus pumilus* G2 için 37 °C (Niyonzima & More, 2014; Sangeetha vd., 2010),
- *Bacillus subtilis* PCSIRNL-39'ın lipaz üretimi için 45 °C (Mazhar vd., 2017),
- *Bacillus licheniformis* KBDL4 alkali proteaz üretimi için 30 °C (Pathak & Deshmukh, 2012) olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmalar ve araştırmalarımız doğrultusunda, *B. pacificus* 2NP6 izolatından eş zamanlı enzim üretimi için optimum bakteriyel üreme sıcaklığı 30 °C olarak belirlenmiştir.

Mikroorganizmalardan eş zamanlı olarak proteaz ve lipaz üretimi sonrası enzimler farklı saflaştırma basamakları ile saflaştırılmalı ve ayrı ayrı karakterize edilmelidirler. Yapılan araştırmalar incelendiğinde,

- Eş zamanlı lipaz ve proteaz üretimi sağlanan *B. licheniformis* VSG1'in proteaz karakterizasyonunda optimum çalışma sıcaklığının 45 °C (Sangeetha vd., 2010),
- *Bacillus brevis* MWB-01 için 40 °C (Olajuyigbe & Falade, 2014),
- *Bacillus cereus* suşu için 55 °C (Ullah vd., 2022),
- *Bacillus thuringiensis* için 55 °C (İdil vd., 2021),
- *Geobacillus* SBS4S için 60 °C (Ahmad vd., 2020),
- *Bacillu scereus* S8 için 70 °C (Lakshmi vd., 2018),
- *Bacillus* sp. EBTA6 için 50 °C (Demir, 2020),
- *Bacillus subtilis*E6-5 için 60 °C (Zeren, 2020) olduğu görülmüştür.

B. pacificus 2NP6 izolatından elde edilen proteazın optimum sıcaklığının literatürdeki diğer proteazlar ile uyumlu olması doğrultusunda, çalışmamızda *B. pacificus* 2NP6 izolatından elde edilen saf proteazın optimum aktivite gösterme sıcaklığının 55 °C olduğu görülmüştür.

Lipaz üretimi için yapılan araştırmalar incelendiğinde ise,

- *Bacillus licheniformis* VSG1 lipazının optimum sıcaklığının 55 °C (Sangeetha vd., 2010),
- *Bacillus methylotrophicus* PS3 için 55 °C (Sharma vd., 2017),
- *Aspergillus flavus* fungusundan elde edilen lipaz için 45 °C (Kareem, vd., 2017),
- Petrolle kirlenmiş topraktan izole edilen *Bacillus subtilis* lipazı için 60 °C (Femi-Ola vd., 2018),
- Toprak ve petrol atığından izole edilen *Bacillus* spp G14, B10 ve 01 için sırasıyla 40, 75 ve 60 °C (Shart & Elkhailil, 2020),
- *Micrococcus luteus* EMP48-D için 40 °C (Nur vd., 2023) olduğu görülmüştür.

Bu araştırmalar ile uyumlu olarak, çalışmamızda *B. pacificus* 2NP6 izolatından elde ettiğimiz saf lipazın optimum aktivite gösterdiği sıcaklık 60 °C olarak tespit edilmiştir.

Mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin iyi ve kaliteli bir şekilde çalışması için ortamın pH değeri de önemlidir. Proteaz karakterizasyonunda ortam pH'nın değerlendirildiği çalışmalarda,

- *Bacillus licheniformis* VSG1 için 9,0 (Sangeetha vd., 2010),
- *Bacillus brevis* MWB-01 için 8,0 (Olajuyigbe & Falade, 2014),
- *Bacillus cereus* S8 için 10,0 (Lakshmi vd., 2018),
- *Geobacillus* SBS4S için 9,0 (Ahmad vd., 2020),
- *Bacillus* sp. EBTA6 için 8,0 (Demir, 2020),
- *Bacillus subtilis* E6-5 için 7,0 (Zeren, 2020),
- *Bacillus thuringiensis* için 7,0 (İdil vd., 2021),
- *Bacillus cereus* suşu için 10,0 (Ullah vd., 2022) olduğu tespit edilmiştir.

Lipaz enzimi açısından bakıldığında ise,

- *Bacillus licheniformis* VSG1 lipazının optimum pH'ın 9,0 (Sangeetha vd., 2010),
- *Bacillus methylotrophicus* PS3 için 7,0 (Sharma vd., 2017),
- *Aspergillus flavus* için 7,0 (Kareem, vd., 2017),

- Toprak ve petrol atığından izole edilen *Bacillus* spp. G14, B10 ve 01 için sırasıyla 8,0, 6,0 ve 6,0 (Shart & Elkhail, 2020),
- *Geobacillus stearothermophilus* ve *Anoxybacillus flavithermus* için 7,5 ve 8,0 (Najm & Walsh, 2022),
- *Bacillus subtilis* LP2 için 7,0 (Yasar vd., 2020), *Bacillus cereus* ATA179 için 6,0 (Demirkan vd., 2021),
- *Micrococcus luteus* EMP48-D için 5,0 (Nur vd., 2023) olduğu bildirilmiştir.

B. pacificus 2NP6 izolatu proteazının bu özelliği dikkate alındığında alkali ortamda daha etkili bir performans sergilediği ve literatüre bakıldığında incelenen çoğu proteazında alkali ortamda iyi çalıştığı görölmektedir. Yapılan optimum pH çalışmaları sonucunda araştırmamızda da *Bacillus pacificus* 2NP6 izolatından elde edilen proteazın optimum pH değeri 10,0, lipaz için ise pH 8,0 olduğu görölmüştür.

Termostabilite, endüstriyel enzimler için hayati bir özelliktir ve mikrobiyal kirlilik ve soğutma maliyetlerini azaltma potansiyeli nedeniyle çok fazla avantaj sağlamaktadır. Bu sebeple, bakteriyel kaynaklardan elde edilen proteazların ticari uygulanabilirlik açısından arzu edilen özelliklere sahip olup olmadığının araştırılması ve endüstriyel süreçlerde daha etkili ve ekonomik enzimlerin geliştirilmesi için kaçınılmaz bir ihtiyaç olduğu belirtilmektedir (Lakshmi vd., 2018). Yapılan çalışmalarda, *B. pacificus* 2NP6 proteazının ısı kararlılığında 180 dakika sonunda 40 ve 50 °C’de belirgin bir düşüş olmadığı, 60 °C’de %48, 70 °C’de ise %29 oranında aktivitenin kaldığı gösterilmiştir. Bu amaçla yapılan araştırmalarda,

- *Bacillus licheniformis* KBDL4’ten elde edilen alkali proteazın 120 dakika sonunda 50 °C’de aktivitesinin %80’e, 60 °C’de ise %20’ye düştüğü (Pathak & Deshmukh, 2012),
- *Planomicrobium* sp.’den izole edilen proteazın 50 °C’de 60 dakika sonunda ve 60 °C’de 40 dakika sonunda aktivitesinin tamamen kaybolduğu (Liu vd., 2013),
- *Geobacillus* SBS-4S için 110 dakika sonunda 60 °C’de %50 aktivitesinin kaldığı (Ahmad vd., 2020),
- *Bacillus* sp. EBTA6 için 150 dakika sonunda 50 °C’de %55’e ve 60°C’de 180 dakika bekletme sonunda %33’e düştüğü (Demir, 2020),
- *Bacillus subtilis* E6-5 için 60 °C’de 180 dakika sonunda %45’e düştüğü (Zeren, 2020),

- *Bacillus cereus* için 1 saat sonucunda 60 °C'de %46'ya düştüğü, 80 °C'de ise aktivitesinin %0 olduğu (Ullah vd., 2022) bildirilmiştir.

Bu açıdan bakıldığında, *B. pacificus* 2NP6 izolatından elde edilen proteazın ısı kararlılığının literatürdeki diğer proteazlarla karşılaştırıldığında daha iyi olduğu görülmektedir.

Termostabil lipazlar, yüksek sıcaklıklardaki stabilitelerinden dolayı gıda endüstrisi için avantajlıdır. Isıya dayanıklı bakterilerden elde edildiği için yüksek ısı toleransına sahiptirler ve sıvı veya katı yağlarda substratları çözünür tutmak amacıyla kullanılabilirler (Najm & Walsh, 2022). Bu anlamda *B. pacificus* 2NP6 lipazının ısı kararlılığı çalışmaları sonuçları incelendiğinde, 150 dakika sonucunda aktivitenin 50 °C'de %60'a, 60 °C'de %48'e ve 70 °C'de ise %38'e düştüğü tespit edilmiştir. Literatürdeki diğer çalışmalara bakıldığında ise,

- *Bacillus cereus* ATA179 için 55 °C'de 50 dakikalık süre sonunda aktivitenin %90'ını koruduğu, 120 dakika sonunda ise aktivitenin %50'sini koruduğu (Demirkan vd., 2021).
- *Bacillus subtilis* LP2 için 80 °C'de 20, 40 ve 60 dakikalık süre sonlarında sırasıyla aktivitenin %75, %30 ve %17'sini koruduğu (Yasar vd., 2020),
- *Bacillus subtilis* lipazının 120 dakika sonunda, 40 ve 50 °C'de aktivitenin %90, 60 °C'de 120 dakika boyunca %80'ini, 80 °C'de aktivitenin %80'ini kaybettiği ve 90 °C'de ise aktivitesini tamamen kaybettiği (Femi-Ola vd., 2018),
- *Geobacillus stearothermophilus* için 24 saat sonunda 20°C ile 60 °C'de nispeten stabil olduğu, 50 °C'de aktivitenin %80'e düştüğü, 3. saat sonunda 80 ve 90 °C'de aktivitenin %40 civarına düştüğü, 70 °C'de 12 saat sonra aktivitenin %46 düştüğü (Najm & Walsh, 2022),
- *Anoxybacillus flavithermus* için 24 saat sonunda, 20 °C ile 60 °C aktivitenin %60'a düştüğü, 80 °C'de aktivitenin %50 civarına düştüğü (Najm & Walsh, 2022) bildirilmiştir.

Bu çalışmalar doğrultusunda *B. pacificus* 2NP6 lipazının literatürdeki diğer lipazlar ile uyumlu olduğu görülmektedir.

B. pacificus 2NP6 izolatından elde edilen proteazın oda sıcaklığında 24 saatlik süre sonunda pH kararlılığına bakıldığında, aktivitenin pH 11,0'de %113'e çıktığı, pH 7,0'de %51'e, pH 8,0'de %70'e, pH 9,0'da %90'a pH 10,0'da %62'ye ve pH 12,0'de ise %74'e düştüğü görülmüştür. Literatürdeki diğer çalışmalar incelendiğinde,

- *Bacillus brevis* MWB-01'den elde edilen serin alkalın metalloproteazın pH kararlılığının pH 9,0-11,0 aralığında %70'e, pH 12,0'de ise %54'e düştüğü (Olajuyigbe & Falade, 2014),
- *Geobacillus* sp. SBS-4S'den izole edilen proteazın 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyon sonucunda aktivitenin pH 5,0 ila 10,0 arasında %50'den fazla aktivite ile stabil kaldığı ve maksimum stabilitenin pH 9,0'da olduğu (Ahmad vd., 2020),
- *Bacillus* sp. EBTA6 izolatından elde edilen proteazın 60 dakika oda sıcaklığında inkübasyon sonucunda aktivitesinin pH 8,0'da kararlılığını koruduğu, pH 7,0'de %82'ye, pH 9,0 ile 10,0'da %93'e düştüğü (Demir, 2020),
- *Bacillus subtilis* E6-5'den elde edilen proteazın 6 saat sonunda aktivitesinin %70'e düştüğü (Zeren, 2020) bildirilmiştir.

Bu çalışmalar göz önüne alındığında *B. pacificus* 2NP6 proteazının 1440 dakikalık inkübasyon sonrası yüksek bir pH stabilitesine sahip olduğu görülmektedir.

B. pacificus 2NP6 izolatından elde edilen lipazın oda sıcaklığında 1440 dakikalık süre sonunda pH kararlılığına bakıldığında, aktivitenin pH 5,0'da %69'a, pH 6,0'da %56'ya, pH 7,0'de %77'ye, pH 8,0'de %63 ve pH 9,0'da ise %62'ye düştüğü tespit edilmiştir. Bu kapsamda yapılan çalışmalarda,

- *Geobacillus stearothermophilus* lipazının 24 saat süre sonunda pH 6,0 ile 11,0 arasında aktivitesinin %80'inden fazlasının kaldığı, ancak enzim aktivitesinin pH 5,0'te azaldığı (Najm & Walsh, 2022),
- *Anoxybacillus flavithermus* için pH 9,0'da en yüksek stabiliteyi gösterdiği ve aktivitenin pH 6,0 ile 8,0'de %70 ve pH 10 ile 11'de ise %90 oranında düştüğü (Najm & Walsh, 2022),
- *Bacillus subtilis* LP2 lipazının pH 6,0, 7,0 ve 8,0'de 1 saatlik inkübasyonunda aktivitesinin sırasıyla %12'ye, %27'ye ve %13'e düştüğü, pH 9,0'da tüm aktivitesini kaybettiği, 2 saatlik inkübasyon sonunda pH 7'de, %9'a düştüğü, pH 6,0'da aktivitesini tamamen kaybettiği (Yasar vd., 2020),
- *Aspergillus flavus* fungusundan elde edilen lipazın pH 7,0 – 8,0 değerlerinde daha stabil olduğu, 6 saatlik inkübasyonun ardından pH 7,0 ve 8,0 değerlerinde sırasıyla %86 ve %80 oranlarında aktivitelerini koruduğu, pH 5,0, 6,0 ve 9,0'da 6 saat sonunda aktivitesinin %40 ve üzerinde düştüğü (Kareem vd., 2017) bildirilmiştir.

Bu çalışmalar ile *B. pacificus* 2NP6 lipazının pH stabilitesi karşılaştırıldığında enzimin iyi bir pH stabilitesine sahip olduğu görülmektedir.

Metal iyonlarının aminoasitlerdeki aktif bölge konformasyonunun korunmasında önemli rolleri olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalara bakıldığında,

- *Bacillus licheniformis* KBDL4'ten elde edilen alkali proteazın 30°C'de 30 dakika metal iyonları ile inkübasyon sonunda aktiviteyi 5 mM CaCl_2 'ün %9, MgCl_2 'ün %4 düşürdüğü, KCl ile ZnCl_2 aktivite de herhangi bir değişiklik yapmadığı (Pathak & Deshmukh, 2012),
- *Bacillus brevis* MWB-01'den elde edilen serin alkalın metalloproteazın 40 °C'de 30 dakika sonunda aktivitenin 5 mM ZnCl_2 ile %86'ya düştüğü, 5 mM CaCl_2 ile %110 arttığı (Olajuyigbe & Falade, 2014),
- *Geobacillus* sp.SBS-4S'den izole edilen proteazın aktivitesini 1 mM CaCl_2 'ün %33, MgCl_2 'ün %15 artırdığı, CoCl_2 'ün aktiviteyi %66'ya, ZnCl_2 ise %54'e düşürdüğü (Ahmad vd., 2020),
- *Bacillus* sp. EBTA6 izolatından elde edilen proteazın oda sıcaklığında 60 dakika bekletilmesinden sonra 1 mM KCl'nin aktiviteyi %92'ye 5 mM'ın ise %96'ya düşürdüğü, 1 mM MgCl_2 'de aktivitenin stabil kaldığı, 5 mM'ın aktiviteyi %5 artırdığı, 1 mM CaCl_2 'ün %7'ye, 5 mM'ın ise %10 çıkardığı, 1 mM ZnCl_2 'ün %95'e, 5 mM'ın ise %84'e düşürdüğü (Demir, 2020) bildirilmiştir.

Bu bilgiler ışığında, *B. pacificus* 2NP6 proteazının aktivitesi üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla ZnCl_2 , CoCl_2 , MgCl_2 , CaCl_2 , KCl metal iyonları ile 60 dakika 55 °C'de inkübasyon gerçekleştirilmiştir.

- 1 mM ZnCl_2 ile MgCl_2 metal iyonlarının aktiviteyi %100 artırdığı,
- 1 mM CaCl_2 %20, KCl %217 ve CoCl_2 metal iyonlarının %93 artırdığı
- 5 mM ZnCl_2 , CoCl_2 , MgCl_2 , CaCl_2 , KCl metal iyonlarının sırasıyla, %75, %24, %182, %195 ve %111 artırdığı tespit edilmiştir.

B. pacificus 2NP6 proteazının metal iyonlarıyla etkileşimi neticesinde elde edilen veriler ile literatürde bulunan sonuçlar karşılaştırıldığında, incelenen metal iyonlarının enzim aktivitesini artırdığı görüldüğünden bu veriler enzimin metalloproteaz grubuna ait olduğunu desteklemektedir. Ayrıca periyodik cetvelde Mg^{+2} ile Ca^{+2} metal iyonlarının alkalın grubu olması yine K^{+} metal iyonun ise alkali metal iyonu olması ve sonuçlara bakıldığında diğerlerine nazaran bu üç metal iyonlarındaki aktivite artışının daha fazla

olmasından dolayı bu sonuçlar, *B. pacificus* 2NP6 proteazının alkali grubuna ait olduğunu desteklemektedir.

Çeşitli enzimlerin aktivitesi, metal iyonlarının varlığından etkilenir. Bu etki ya metal iyonlarının enzim katalizlemesine direkt katılımı ile ya da enzimlerin yapılarında bazı modifikasyonlar meydana getirerek olmaktadır (Sharma vd., 2017). Yapılan çalışmalar,

- *Bacillus methylotrophicus* PS3 lipazının 1 mM Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} ve Zn^{2+} metal iyonları ile 30 dakika inkübasyon sonrası aktivitelerindeki değişikliğe bakıldığında, Mg^{2+} ve Ca^{2+} sırasıyla %100 ve %98,40 bağıl aktiviteyle lipaz etkisini artırdığı ve metal iyonu olarak Cu^{2+} kullanıldığında bağıl aktivitede %52'lik bir azalma olduğu, Fe^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} kullanıldığında ise yaklaşık %35,36, %24,60 ve %16,91 oranlarında lipaz aktivitesinde azalmalar olduğu bildirilmiştir (Sharma vd., 2017).
- *Bacillus subtilis* LP2 lipazının 5 mM MgSO_4 , MnSO_4 , FeSO_4 ve CuSO_4 metal iyonlarıyla 80 °C'de 20 dakika inkübasyon sonrası aktivitedeki değişikliklerin araştırıldığı bir çalışmada, FeSO_4 ile enzimin aktivitesinin stabil kaldığı, MgSO_4 , MnSO_4 ve CuSO_4 ile sırasıyla aktivitelerin %40,6, %90,1 ve %31,8 düştüğü bildirilmiştir (Yasar vd., 2020).
- *Bacillus cereus* ATA179 lipazının 1 mM ve 5 mM FeSO_4 , MnSO_4 , MgSO_4 , ZnSO_4 , CuSO_4 , CaCl_2 , NaCl , LiSO_4 , BaCl_2 , KCl metal iyonlarının etkisi araştırıldığı başka bir çalışmada, CaCl_2 , MnSO_4 ve BaCl_2 'nin hem 1 hem de 5 mM konsantrasyonda lipaz aktivitesini artırdığı ve genel olarak 1 mM'lik metal iyon konsantrasyonunun 5 mM'den daha etkili olduğu sonucuna ulaşılarak NaCl ve KCl 'nin ise inhibitör etki gösterdiği bildirilmiştir (Demirkan vd., 2021).

Bu bağlamda metal iyonlarının, *B. pacificus* 2NP6 lipazının aktivitesi üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla Zn^{+2} , Co^{+2} , Mg^{+2} , Ca^{+2} , K^{+} metal iyonları ile 60 dakika 60 °C'de inkübasyonlar gerçekleştirilmiştir.

- Zn^{+2} metal iyonunun 1 mM konsantrasyonda aktiviteyi %96'ya, 5 mM'da ise %57'ye düşürdüğü,
- Co^{+2} iyonunun 1 mM konsantrasyonda aktiviteyi %8, 5 mM'da ise %27 artırdığı,
- Mg^{+2} iyonunun 1 mM konsantrasyonda aktiviteyi %35, 5 mM'da ise %38 artırdığı,
- Ca^{+2} iyonunun 1 mM konsantrasyonda aktiviteyi %47, 5 mM'da ise %72 artırdığı,

- KCl iyonunun 1 mM konsantrasyonda aktiviteyi %25, 5 mM'da ise %45 artırdığı tespit edilmiştir.

Buradan çıkan sonuçlar değerlendirildiğinde, Zn^{+2} 'nin enzim üzerine inhibitör etki oluşturduğu, kullanılan diğer metal iyonları olan Co^{+2} , Mg^{+2} , Ca^{+2} ve K^{+} 'nin ise aktivatör etki yaptığı görülmektedir.

Inhibitör ve aktivatörlerin *B. pacificus* 2NP6 proteazının aktivitesi üzerine etkisinin araştırılmasında enzimin optimum sıcaklıkta 60 dakika 5 mM EDTA içeren ortamda inkübasyonu sonucu enzim aktivitesinin %67'ye düştüğü tespit edilmiştir. EDTA'nın metal iyonlarını şelatlama özelliği ve yukarıdaki sonuç dikkate alındığında *B. pacificus* 2NP6 proteazının bu sonuca göre metalloprotein olduğu bilgisi desteklenmektedir. Literatürde bununla paralellik gösteren

- *Bacillus* sp. EBTA6 proteazında 5 mM EDTA'nın aktiviteyi %52'ye düşürdüğü (Demir, 2020),
- *Bacillus brevis* MWB-01'den elde edilen serin alkalın metalloproteazının aktivitesinin 5 mM EDTA ile %92,5'e düştüğü (Olajuyigbe & Falade, 2014),
- *Bacillus thuringiensis* proteazının 5 mM EDTA ile aktivitesinin %94,8'e düştüğü (İdil vd., 2021) bildirilmiştir.

Bir serin proteaz inhibitörü olan PMSF'nin 5 mM'lık konsantrasyonun *B. pacificus* 2NP6 proteazı üzerine etkisine bakıldığında PMSF'nin aktiviteyi %140 artırdığı tespit edilmiştir. Bu sonuçtan 2NP6 proteazının serin proteaz olmadığı sonucuna varılmıştır. Literatürde

- *Bacillus brevis* MWB-01'den elde edilen serin alkalın metalloproteazın 5 mM PMSF ile aktivitenin %91,7'ye düştüğü (Olajuyigbe & Falade, 2014),
- *Bacillus thuringiensis* kaynaklı proteazın aktivitesinin 5 mM PMSF ile %97,2'ye düştüğü (İdil vd., 2021) bildirilmiştir.

SH- ve disülfid (-S-S-) grubu inhibitörü olarak işlev gören, aynı zamanda antioksidan özelliklere sahip olan DTT ile aynı özellikte olan β - Merkaptotanol'un *Bacillus pacificus* 2NP6 proteazına etkisine bakıldığında sırasıyla; aktiviteyi %129, %27 artırdığından dolayı bu enzimin aktivitesini sürdürebilmesi için serbest SH gruplarına ya da S-S köprülerine gereksinim duymadığı söylenebilir. Araştırmalarda,

- *Bacillus brevis* MWB-01'den elde edilen serin alkalın metalloproteazın aktivitesinin 5 mM β -Merkaptotanol ile %90,4'e düştüğü (Olajuyigbe & Falade, 2014),

- *Bacillus subtilis* E6-5'de 5 mM β -Merkaptoetanol ile %32'ye düştüğü (Zeren, 2020),
- *Bacillus cereus* S8'de 5 mM DTT'nin etki etmediği (Lakshmi vd., 2018) bildirilmiştir.

Anyonik bir deterjan olan SDS'in, anyonik ve emülgatör etki gösteren Tween-20'nin ve anyonik ve hidrofobik grubu içeren Triton X-100'ün *B. pacificus* 2NP6 proteazının üzerine etkisine bakıldığında aktiviteyi sırasıyla; %45, %120 ve %105 artırdığı tespit edilmiştir. Literatürde,

- *Bacillus cereus* S8 suşundan elde edilen proteazın %0,1 konsantrasyonda SDS, Tween-20 ve Triton X-100'ün aktivitede bir değişiklik yapmadığı (Lakshmi vd., 2018),
- *Bacillus thuringiensis*'de SDS ile Tween 20'nin 37 °C'de 30 dakika sonunda sırasıyla %82, %85'e düşürdüğü ve Triton X-100'ün aktiviteyi %4,6 artırdığı (İdil vd., 2021)
- *Geobacillus* sp. SBS-4S'de %1 konsantrasyondaki SDS, Tween-20 ve Triton X-100 ile aktivitesinin sırasıyla; %92'ye, %82'ye ve %87'ye düştüğü (Ahmad vd., 2020),
- *Bacillus* sp. EBTA6'nın %1 konsantrasyonundaki SDS ile oda sıcaklığında 60 dakika inkübe edildiğinde aktivitenin %61'e düştüğü, aynı şartlardaki Tween-20'nin ise aktiviteyi %3 artırdığı (Demir, 2020) bildirilmiştir.

B. pacificus 2NP6 proteaz aktivitesinin %1'lik konsantrasyondaki etanol ile %95'e düştüğü tespit edilmiştir. Literatüre bakıldığında,

- *Bacillus* sp. NPST-AK15 alkali serin proteazının 40°C'de 1 saat sonunda %12,5'lik etanol konsantrasyonunda aktivitesinin %75,8'e, %25'lik konsantrasyonda ise %55,1'e düştüğü (İbrahim vd., 2015),
- *Bacillus cereus* S8'de %40'a düştüğü (Lakshmi vd., 2018) bildirilmiştir.

B. pacificus 2NP6 proteaz aktivitesini %1'lik konsantrasyondaki DMSO'nun %104 artırdığı tespit edilmiştir. Bu bağlamda yapılan diğer çalışmalara bakıldığında,

- *Bacillus cereus* S8 izolatından elde edilen proteazın aktivitesinde DMSO'nun herhangi bir değişiklik yapmadığı (Lakshmi vd., 2018),

- *Bacillus licheniformis* NCIM-2042’de %25’lik DMSO ile oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmesi sonrası başlangıç aktivitesinin %88’den fazlasını koruduğu (Bhunja vd., 2011) rapor edilmiştir.

İnhibitör ve aktivatörlerin *B. pacificus* 2NP6 lipazının aktivitesi üzerine etkisinin araştırılmasında, 5 mM EDTA varlığında optimum sıcaklıkta 60 dakika bekletilmesi sonucu enzim aktivitesinin %76’ya düştüğü tespit edilmiştir. EDTA’nın metal iyonlarını şelatlaması göz önüne alındığında 2NP6 lipazının da proteazda olduğu gibi metalloprotein olduğu söylenebilir. Enzim aktivitesine EDTA’nın etkisi yönünden literatürdeki diğer çalışmalara bakıldığında,

- Eş zamanlı üretim sonucu *Bacillus licheniformis* VSG1’den elde edilen lipazın EDTA ile muamelesinin aktiviteyi %48’e düşürdüğü (Sangeetha vd., 2010),
- *Bacillus methylotrophicus* PS3’de ise aktiviteyi %16,95’e düşürdüğü (Sharma vd., 2017) ve *Bacillus pacificus* 2NP6 lipazı ile uyumlu bir sonucun olduğu,
- *Bacillus cereus* ATA179 için 55 ve 60 °C’de ve %5’lik konsantrasyonda her ikisinde de %13’lük bir artış olduğu (Demirkan vd., 2021)
- *Micrococcus luteus* EMP48-D’de ise aktiviteyi %66,6’a düşürdüğü bildirilmiştir (Nur vd., 2023).

Serin rezidülerinin lipaz aktivitesi üzerindeki rolünü değerlendirmek için kullanılan sentetik bir serin proteaz inhibitörü olan PMSF’nin 5 mM’lık konsantrasyonun *B. pacificus* 2NP6 lipazının aktivitesinde %23’lük bir artış oluşturduğu tespit edilmiştir. Literatürler incelendiğinde,

- *Bacillus licheniformis* VSG1’den elde edilen lipazın PMSF ile inkübasyonu sonucu aktivitede %1’lik bir düşüş olduğu (Sangeetha vd., 2010).
- Termo-halofilik bir bakteriden elde edilen lipazın (PLS-80) PMSF ile inkübasyonu sonucu aktiviteyi %0,8’e düşürdüğü (Febriani vd., 2020) rapor edilmiştir.

Antioksidan özelliklere sahip olan ve SH- ve disülfid (-S-S-) grubu inhibitörü olarak işlev gösteren DTT’nin *B. pacificus* 2NP6 üzerine etkisine bakıldığında aktiviteyi %30 artırdığı ve disülfid bağlarını indirgeyici özellikte olan β - Merkaptoetanol’un aktiviteyi %559 artırdığı bulunmuştur. Bu sonuçlar doğrultusunda enzimin aktivitesini sürdürebilmesi için serbest SH gruplarına ya da S-S köprülerine gereksinim duymadığı gösterilmektedir. Literatürler incelendiğinde,

- *Bacillus licheniformis* VSG1'den elde edilen lipazın DTT ile muamelesi sonucu aktivitede herhangi bir değişikliğin olmadığı ve aktivitenin stabil olduğu (Sangeetha vd., 2010),
- *Chryseobacterium polytrichastri* ERM1:04'de aktiviteyi %50'ye düşürdüğü (Kumar vd., 2020),
- *Kocuria flava* Y4'de %1'lik β - Merkaptotanol ile 60 °C'de 30 dakika muamele sonucunda aktivitesini tamamen kaybettiği (Barik vd., 2022) rapor edilmiştir.

Polar bir çözücü olan DMSO'nun *B. pacificus* 2NP6 lipazının aktivitesini %21 artırdığı tespit edilmiştir.

- *Bacillus licheniformis* VSG1'den elde edilen lipazın aktivitesini DMSO'nun %5 oranında düşürdüğü (Sangeetha vd., 2010),
- Termofilik ve organik çözücü kararlı *Bacillus* lipazının %50 (v/v) konsantrasyonundaki DMSO ile aktivitesini tamamen kaybettiği (Li & Liu, 2017) bildirilmiştir.
- *Bacillus licheniformis* PAL05'den elde edilen lipazın aktivitesini ise %25 konsantrasyondaki DMSO'nun %27 artırdığı, %50 konsantrasyonda ise aktiviteyi %74,5 düşürdüğü (Anbu & Hur, 2014),

%1 konsantrasyonundaki etanolün *B. pacificus* 2NP6 lipaz aktivitesini %21 oranında artırdığı tespit edilmiştir. Yapılan diğer çalışmalara bakıldığında,

- *Micrococcus luteus* EMP48-D'de %13,5 arttığı (Nur vd., 2023),
- *Kocuria flava* Y4'te ise aktivitenin %55,18'e düştüğü (Barik vd., 2022) bildirilmiştir.

Anyonik bir deterjan olan SDS'in, anyonik ve emülgatör etki gösteren Tween-20'nin ve anyonik ve hidrofobik grubu içeren Triton X-100'ün *B. pacificus* 2NP6 lipazı üzerine etkisine bakıldığında, aktiviteyi fazla etkilememekle birlikte sırasıyla %1, %1 ve %3 olarak az bir artış olduğu tespit edilmiştir. Yapılan diğer çalışmalara bakıldığında,

- *Bacillus licheniformis* VSG1'den elde edilen lipazın aktivitesini SDS'in %91'e düşürdüğü ve Triton X-100'ün herhangi bir etki yapmadığı (Sangeetha vd., 2010),
- *Kocuria flava* Y4'te SDS'in aktiviteyi %96,18'e, Tween 80'in %71,76'ya düşürdüğü (Barik vd., 2022),
- *Bacillus methylotrophicus* PS3'de SDS'in %10,71'e, Tween-80'nin %30,73'e düşürdüğü, Triton X-100'ün ise %6,16 oranında artırdığı (Sharma vd., 2017),

- *Micrococcus luteus* EMP48-D'de TritonX-100, Tween-80, Tween-20 ve SDS ile sırasıyla %39,3'e, %31,6'ya %7,2'ye ve %7,9'a düşürdüğü (Nur vd., 2023) rapor edilmiştir.

Km değeri, substratın enzime olan ilgisinin bir göstergesidir. Bu bağlamda proteaz enzimi yönünden yapılan çalışmalara bakıldığında;

- *Bacillus* sp. NPST-AK15 elde edilen alkalın serin proteazın kazein substratı varlığında Km değerinin, 2,5 mg/mL (İbrahim vd., 2015),
- Pitaya (*Hylocereus polyrhizus*; Ejder meyvesi) atığından elde edilen alkali-termostabil proteazın azokazein substratı varlığında Km değerinin, 2,8 mg/mL (Amid vd., 2014),
- *Bacillus thuringiensis* Sero var *Sichuansis*'ten elde edilen alkalın termolisın benzeri proteaz olan BtsTLP1'in azokazein substrat varlığında Km değerinin 1,57 mg/mL (Zhang vd., 2015),
- *Bacillus* sp. EBTA6 suşundan elde edilen proteazın kazein substratı varlığında Km değerinin 2,762 mg/mL (Demir, 2020),
- *Cerrena albocinnamomea* elde edilen hücre dışı nötral metalloproteazın azokazein substrat varlığında Km değerinin 2,46 mg/mL (Hamada vd., 2017),
- *Aspergillus tamaris* URM4634 suşundan elde edilen hücre dışı serin proteazının azokazein substrat varlığında Km değerinin 0,434 mg/mL (da Silva vd., 2018),
- *Bacillus subtilis* E6-5 suşu proteazının kazein substratı varlığında Km değerinin 1 mM olduğu bildirilmiştir.

B. pacificus 2NP6 izolatu proteazının Km değerinin 5,841085 mg/mL olması ile hem endüstriyel açıdan hem de literatürdeki diğer çalışmalar yönünden tercih edilebilir nitelikte bir değere sahip olduğu görülmüştür.

B. pacificus 2NP6 lipazının Kinetik parametreleri yönünden yapılan çalışmalar incelendiğinde Km değerinin 0,053185 mM olduğu tespit edilmiştir. Literatürdeki diğer çalışmalara bakıldığında ise,

- *Bacillus aureus*'tan elde edilen lipazın *p*-nitrofenilpalmitat varlığında Km değerinin 2,13 mM (Saun vd., 2014),
- *Bacillus cereus* ATA179 elde edilen lipazın tribütrin substratı varlığında Km değerinin 0,11 mM (Demirkan vd., 2021),

- Toprak ve petrol atığından izole edilen *Bacillus* spp G14, B10 ve 01 *p*-nitrofenillaurat varlığında Km değerleri sırasıyla; 1,3, 1,6 ve 0,681 mM (Shart & Elkhalil,2020),
- *Kocuria flava* Y4 lipazının *p*-nitrofenilasetat varlığında Km değerinin 4,625 mM (Barik vd., 2022) olduğu görülmektedir.

Endüstriyel işlemlerinin hızlı ve daha kolay gerçekleştirilmesinde Km değerinin düşük olması önem arz ettiğinden *B. pacificus* 2NP6 lipazının literatürdeki çalışmalara göre daha tercih edilebilir nitelikte olduğu sonucuna varılmaktadır.

Ticari deterjanlar kullanılarak yapılan deterjan stabilitesi deneyinde, Omo, Bingo ve Boron marka deterjanlarının *B. pacificus* 2NP6 proteazı ile kurulan reaksiyona 5 mg/mL konsantrasyonda ilave edilmesi ve 55 °C’de 30 dakika inkübasyon sonrası standart aktivite metodu ile test edildi. Deney sonucunda OMO markasının aktiviteyi %22, Bingo’nun %32, Boron’un ise %15 artırdığı tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalara bakıldığında,

- *Caldicoprobacter guelmensis*’ten izole edilen serin-alkalin proteazının 40 °C’ de 1 saat sonunda, 7 mg/mL OMO, Dixan ve Le Chat ticari deterjanları ile muameleleri sonucunda aktivitenin %90’dan fazlasını koruduğu, Ariel’in aktiviteyi %75’in altına düşürdüğü, Persil ile ise aktivitenin stabil kaldığı (Bouacem vd., 2015),
- *Bacillus* sp. NPST-AK15’de 40 °C’ de 1 saat sonunda aktivitenin %1’lik OMO ve Ariel ile muamelede aktivitenin sırasıyla %45,9’a, %36,2’ye düştüğü (İbrahim vd., 2015),
- *Bacillus subtilis* IAS 01’de 5 mg/mL Ariel, Henko, Rin marka ticari deterjanlar ile 50 °C’ de 1 saat sonunda aktivitenin sırasıyla, %75,45’e, %88,9’a, 64,6’ya düştüğü (Saminathan & Sriman Narayanan, 2015),
- *Bacillus brevis* MWB-01’de 60 °C’de 1 saat sonunda 5 mg/mL olacak şekilde OMO, Sun light ve Ariel ile enzimin bekletilmesi sonucu enzim aktivitesinin sırasıyla, %40, %76 ve %11’e düştüğü (Olajuyigbe & Falade, 2014),
- *Aeromonas veronii* OB3 alkalin proteazın 30 °C, 40 °C ve 50 °C’de 1 saat sonunda ticari deterjanlardan 7 mg/mL olacak şekilde Tide, Ariel, El Kef ve OMO muamelesinde, 30 °C’de Tide (%113), Ariel (%110), El Kef (%109) ve OMO’da (%107) artış olduğu, 40°C’de maksimum aktivitesini koruyan Ariel, Tide ve El kefin varlığında da kayda değer bir stabilite kaydedildiği, OMO’da

aktivitede düşüş olduğu ve 50 °C’de ise her bir deterjanda belirgin bir düşüş olduğu (Manni vd.,2020) bildirilmiştir.

Diğer araştırmalara kıyasla, *B. pacificus* 2NP6 proteazının ticari deterjanlar ile muamelesinde aktivitesinde gözlemlenen artış, bu enzimin endüstriyel deterjanlarla kullanılabilirliğinin, literatürdeki diğer proteazlara göre daha yüksek olduğu sonucunu göstermektedir.

5 mg/mL konsantrasyonda ticari deterjan ile 60 °C’ de 30 dakika inkübasyon sonrası standart aktivite metodu ile ölçümler gerçekleştirilen *B. pacificus* 2NP6 lipazının deterjan stabilitesi deneyi sonucunda

- OMO’nun aktiviteyi %81’e,
- Bingo’nun %64’e,
- Boron’un ise %81’e düşürdüğü tespit edilmiştir.

Literatürler incelendiğinde,

- *Bacillus* BSK-L izolatından elde edilen lipazın 7 mg/mL olacak şekilde Ariel, Tide, Fena ve Henko ile 65 °C’ de 60 dakika muamelesi sonucunda aktivitesinin sırasıyla; %93, %97, %98 ve %88’e düştüğü (Saraswat vd., 2017),
- *Bacillus stearothermophilus* lipazının 7 mg/mL olacak şekilde OMO, Ariel, Tide ve Daxon ile 40 °C’de 60 dakika muamelesi sonucunda aktivitesinin sırasıyla; %92, %90, %87 ve %95’e düştüğü (Bacha vd., 2015),
- Domuz pankreasından elde edilen lipaz aktivitesi üzerine ismi belirtilmeyen 4 tip toz deterjanın 40 °C’de 1 saat muamelesi sonucunda aktiviteyi; 1.’de %64, 2.’de %88, 3.’de %89 ve 4.’de %68’e düşürdüğü (Gülmez vd., 2022) rapor edilmiştir.

B. pacificus 2NP6 lipazının substrat spesifikliğine bakıldığında en iyi aktiviteyi 4 karbonlu olan *p*NPB (4C) substratı ile verdiği tespit edilmiş olup *B. pacificus* 2NP6 lipazının küçük karbon zincirlerine karşı daha fazla afiniteye sahip olduğu düşünülmektedir. Literatürdeki diğer çalışmalara bakıldığında,

- *Bacillus* sp. ITP-001’den elde edilen lipazın çeşitli yağ asitleri ve alkoller kullanılarak bir esterifikasyon reaksiyonunu katalize etme yeteneğinin araştırıldığı bir çalışmada, 24 saatlik reaksiyondan sonra en iyi dönüşümlerin asetik asit (2C) ve metanol (1C) kullanılarak elde edildiği (Barbosa vd., 2012),
- Termofilik *Bacillus aerius* lipazının en yüksek aktiviteyi uzun karbon zincirli olan 16C’luk *p*-nitrofenilpalmitat ile verdiği (Saun vd., 2014),

- *Micrococcus luteus* EMP48-D'de en yüksek aktivitenin verildiği substratın 8C olan *p*-nitrophenylcaprylate olduğu (Nur vd., 2023),
- Termo-halofilik bir bakterinin (PLS-80)'de metil laurate olduğu (Febriani vd., 2020),
- *Bacillus pumilus* WSS5'de ise en iyi aktiviteyi 8C'lu substrat ile gösterdiği (Khan vd., 2021) bildirilmiştir.

Deterjan proteazları büyük çözünmeyen proteinleri hidrolize etme yeteneğine sahiptir. Bu, deterjanların katı yüzeylere bağlı protein substratları üzerinde etki göstermeleri gerektiğinden önemli bir özelliktir. Bu da onları sert yüzey temizleyicileri için cazip katkı maddeleri haline getirmektedir. Ayrıca çamaşırlarda sıklıkla karşılaşılan protein kaynaklı lekelerin çıkarılmasına da böylece katkıda bulunurlar (Bouacem vd., 2015). Bu amaçla yapılan çalışmalarda kullanılan ticari deterjanlar deney düzeneğinde kullanılmadan önce 1 saat 65 °C'de ısı ile muamele edilerek ortamda bulunan endojen proteazları etkisiz hale getirilmektedir. Literatürde gerçekleştirilen bu tip çalışmalara bakıldığında,

- *Bacillus licheniformis* ALW1 alkalın proteazın ticari deterjanlar varlığında ve deterjansız olarak 50 °C'de 30 dakika bekletilerek yıkama performansına bakıldığında enzimin ısıyla inaktive edilmiş deterjana eklenmesinin, ticari deterjan kadar etkili bir şekilde lekeyi çıkarma kabiliyetine sahip olduğu (Emran vd., 2020),
- *Bacillus safensis* RH12 suşundan elde edilen serin-alkalin proteaz (SAPRH) ile ticari olarak satılan proteaz Alcalase 2,5 L, tip DX'in deterjana eklenmesinin, içerisine enzim ilave edilmeyen deterjanla karşılaştırıldığında hızlı kan lekesi çıkarma aktivitesiyle yıkama sürecini iyileştirdiği (Rekik vd., 2019),
- *Caldicoprobacter guelmensis*'ten elde edilen serin- alkalın proteazının (SAPCG) kan lekesini çıkarma kabiliyeti açısından performansının değerlendirildiği bir çalışmada, yalnızca deterjanla (iSiS) yapılan bir yıkama performansı ile deterjana SAPCG veya ticari proteaz subtilisin Novo eklenmesi sonucu elde edilen performansların karşılaştırılmasında enzimlerin kanın temizlenmesini önemli ölçüde artırdığı (Bouacem vd., 2015) bildirilmiştir.

Yukarıda ifade edilen literatürlere ait örnekler dikkate alınarak *B. pacificus* 2NP6 proteazının kan lekesini çıkarması yönünde yıkama performansını test ettiğimiz çalışmamızda, izolatımıza ait proteazın ticari deterjan ile karşılaştırıldığında, ticari

deterjandaki ile aynı seviyede kan lekesini çıkardığı fakat beyazlatma yapmadığı tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda da görüldüğü üzere pamuklu kumaştan kan lekelerinin çıkarılmasının kolaylaştırılmasında alkalın proteazların yararlı olduğu belirtilmiştir (Bouacem vd., 2015). *B. pacificus* 2NP6 proteazının üzerine yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucunda görüldüğü üzere enzimin alkali özellikte olmasından dolayı, bu proteazın da deterjan formülasyonlarında temizlik katkı maddesi olarak gelecekteki endüstriyel uygulamalarda kullanışlı olabileceği düşünülmektedir.

B. pacificus 2NP6 lipazının zeytin yağı lekesi üzerine etkisine baktığımız çalışmamızın diğer bir aşamasında, sadece enzim ve sadece ticari deterjan kullanımıyla çok fazla bir leke çıkarımının olmadığı, fakat enzim ve ticari deterjan ikilisinin birlikte daha iyi performans gösterdiği tespit edilmiştir. Yumurta sarısı lekesine sadece enzim ve sadece ticari deterjan kullanımında hemen hemen hepsinin çıkmış olduğu, enzim ile ticari deterjan ikilisinin bir arada kullanımında ise lekenin tamamen çıkmış olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda *B. pacificus* 2NP6 lipazının bitkisel bir yağ olan zeytinyağına karşı az afiniteye sahip olduğu bunun yanında hayvansal bir yağ olan yumurta sarısına karşı daha fazla afinitesi olduğu tespit edilmiştir. Literatürdeki diğer çalışmalara bakıldığında,

- *Fusarium annulatum* Bugnicourt FAL ve GZEL lipazlarının domates sosu, ketçap ve yumurta sarısı lekelerine etkisine, FAL lipazı + ticari deterjan karışımı ve GZEL lipazı + ticari deterjan karışımının etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, karışımın sadece ticari deterjan kullanımına kıyasla lekeyi tamamen çıkardığı rapor edilmiştir. Bunun yanında domates sosu lekesinde ticari deterjan + ticari lipaz (Lipolase) karışımının etkisinin, funguslardan elde edilen lipazlı karışımlara göre daha az bir leke çıkarımı sağladığı, diğer leke türlerinde ise benzer bir sonucu verdiği bildirilmiştir (Dab vd., 2023),
- *Bacillus metilotrophicus* PS3 lipazı ve ticari deterjan karışımının sadece ticari deterjan kullanımına göre gres yağı, tereyağı, bitkisel yağ, zeytinyağı lekeli kumaşlar üzerinde daha iyi bir leke çıkarma yeteneğine sahip olduğu (Sharma vd., 2017),
- *Candida albicans* ve *Acremonium sclerotigenum* lipazları ve ticari deterjan karışımının sadece ticari deterjan kullanımına göre gres yağı, yumurta sarısı, ketçap, zeytinyağı ve tereyağı lekeleri üzerinde çok daha iyi performans gösterdiği, bunun yanında iki enzim arasında kıyaslama yapıldığında

Acremonium sclerotigenum elde edilen lipazın performansının daha iyi olduğu (Safdar vd., 2023),

- *Aspergillus niger* MH078571.1 ve *Aspergillus niger* MH079049.1 lipazlarının, makine yağı, balık yağı ve çikolata lekelerinde sıcak su+ticari deterjan+enzim ve soğuk su+ticari deterjan+enzim içerikli karışımlarının diğer leke örneklerine kıyasla balık yağı lekesi üzerinde en iyi leke çıkarma performansı gösterdiği (Alabdallal vd., 2021), bildirilmiştir.

Peynir üretim süreci, büyük ölçüde, nihai ürünün verimini, lezzetini ve dokusunu etkileyebilen süt pıhtılaşma enzimine (MCE) dayanmaktadır. Geleneksel olarak, süt pıhtılaştırıcı özellikte olan buzağı mayası, süt emen buzağların dördüncü bağırsağından çıkarılmakta olup peynir üretiminde sıkça kullanılmaktadır. Ancak, artan peynir talebini karşılamak amacıyla üreticiler, hayvan refahı endişeleri nedeniyle sınırlı miktarlarda üretilen buzağa peynir mayası yerine alternatif arayışına girmiştir. Bu amaçla, hayvanlardan, bitkilerden ve mikroorganizmalardan elde edilen MCE'ler ile genetik olarak değiştirilmiş organizmalardan üretilen rekombinant kimozenler araştırılmıştır. Hayvan bazlı peynir mayası alternatifleri, sıklıkla vejetaryen dostu olmadıklarından, dini veya etik nedenlerden dolayı reddedilerek birçok ülke tarafından rekombinant MCE kullanımı yasaklanmıştır. Bitki bazlı proteazların ise genellikle aşırı proteolitik aktiviteye (PA) sahip olmalarından dolayı son ürünlerde acı bir tat oluşturabilmekte ve bu durumda onlar için bir eleştiri olarak göze çarpmaktadır. Son dönemde mikrobiyal MCE'ler, buzağı peynir mayası yerine potansiyel bir alternatif olarak büyük ilgi görmektedir. Mantar kökenli peptidazların sütü pıhtılaştırma aktivitesi gözlemlenmiştir. Ayrıca, peynir altı suyu fermantasyonunun daha kolay yönetilebilir olduğu rapor edilmiştir (Wang vd., 2023). Süt pıhtılaşmasının ikinci aşamasında (enzimatik olmayan) kazein misellerinin negatif kalıntıların (fosfoserin ve karboksilik gruplar) Ca^{2+} ve kalsiyum-fosfat kompleksleri tarafından nötralizasyonundan kaynaklanan kazein agregasyonunda kalsiyumun önemli bir işlevi olduğu bilinmekte ve konsantrasyonundaki artışın pıhtılaşma oranında bir artışa yol açtığı da rapor edilmiştir (Merheb-Dini vd., 2010).

B. pacificus 2NP6 proteazının sütü pıhtılaştırma aktivitesini test ettiğimiz çalışmamızda en yüksek pıhtılaşma aktivitesini 100 mM $CaCl_2$ konsantrasyonunda gösterdiği ve aktivitenin 22,22 U/mL olduğu görülmüştür. Fakat bununla birlikte pıhtılaşma sonucu oluşan en berrak peynir altı suyunun 50 mM $CaCl_2$ konsantrasyonlu örnekte olduğu tespit edilmiştir. Bu yönde yapılan literatürdeki çalışmalara bakıldığında,

- *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 mantarından elde edilen proteazın 40 mM CaCl_2 konsantrasyonda (Merheb-Dini vd., 2010),
- *Paenibacillus* spp. BD3526 metalloproteazının 30 mM CaCl_2 konsantrasyonda (Hang vd., 2016),
- *Bacillus* sp. EBTA6 proteazın 100 mM CaCl_2 konsantrasyonda (Demir, 2020),
- *Bacillus megaterium* LY114 proteazının 40 mM CaCl_2 konsantrasyonda (Zhang vd., 2023) en yüksek pıhtılaşmanın sağlandığı bildirilmiştir.

Et endüstrisinin bir yan ürünü olan derinin işlenmesi, hem sosyo-ekonomik hem de çevresel etkileri olan bir işleme endüstrisi olup deri ürünlerinin satışı daha fazla kar sağlamaktadır. Fakat, endüstriyel işlemeyle ilişkili olarak atıklardan kaynaklanan olumsuz etkileri de bulunmaktadır. Tabakhanelerde ham deri, tabaklama öncesinde bir dizi kimyasal işleme tabi tutulmakta ve son olarak işlenmiş deriye dönüştürülmektedir. Proteazların deri endüstrisinde geniş uygulamalara sahip olması öngörülmektedir. Alkalın proteazlar, özellikle ıslatma ve tüy alma işleminde kullanılan tehlikeli kimyasalların yerini alarak işlemden hayati bir rol oynamaktadır. Kıl alma ve azaltma işlemlerinde enzim kullanımının artması, kirlilik sorunlarını önlemenin yanı sıra, daha kaliteli deri elde edilmesinde ve zamandan tasarruf edilmesinde de etkili olmaktadır (Zambare vd., 2011). Bu bağlamda yapılan çalışmalara bakıldığında,

- *Bacillus subtilis* SCK6 metalloproteazının keçi derisinde 33-35°C’de 6 saatlik süre sonunda kıl giderimini sağladığı (Tian vd., 2019),
- *Conidiobolus brefeldianus* alkali proteazının 16 saat sonunda koyun derisinden kıl giderimini sağladığı ve derinin daha parlak bir görünüm aldığı (Khandelwal vd., 2015),
- *Bacillus cereus* VITSN04 proteazının 16 saat sonunda kıl giderimini sağladığı (Shakilanishi & Shanthi 2017),
- Alkalifilik *idiomarina* sp. C9-1 alkali proteazının keçi derisinden kıl giderme işlemini 40 °C’de 12 saatte, herhangi bir yabancı parçacık birikmesi veya tanecik hasarı olmaksızın gerçekleştirdiği (Zhou vd., 2018),
- *Bacillus subtilis* E6-5 proteaz enziminin dana ve koyun derisinden kıl gideriminin 24. saatte tamamen gerçekleştirdiği, keçi derisinde ise 18. saatte kıl gideriminin olduğu, üç örnekte de kıl giderimi sonrasında derinin yumuşak, ipeksi, esnek, beyaz ve lekesiz olduğu (Zeren, 2020) bildirilmiştir.

B. pacificus 2NP6 proteazı ham enzim özütü ve saflaştırılmış hücre özütü ile dana dersinden kıl giderimi işlemi oda sıcaklığında yapılmış olup, 96. saatte kıl gideriminin olduğu gözlenmiştir. Ham hücre özütü ile saflaştırılmış hücre özütü arasında kıyaslama yapıldığında, saflaştırılmış proteazın kullanıldığı deri örneğinin daha pürüzsüz ve renginin her tarafında aynı eşitlikte olduğu tespit edilmiştir.

Çoklu enzim kompleksleri, yakın ilişki içinde çalışan iki veya daha fazla enzimi içermektedir. Böylece karmaşık substratların tekli enzim sistemlerine göre daha yüksek verimlilikle parçalanması sağlanarak sinerjistik olarak çok sayıda ürün elde edilebilmektedir. Değerlendirme ve araştırma sonuçlarımız doğrultusunda, bu çalışmanın en önemli katkısı, tek fermentasyon sistemi ile çoklu enzim üretimi sağlanarak üretim maliyetinin düşmesidir. Çoğunlukla, ucuz kaynaklardan üretim sonrasında, enzimlerin saflaştırılması zaman alıcı ve pahalı olması nedeni ile işlemin genel maliyetini çok etkilemektedir. Eş zamanlı üretimde, enzimlerin bakımı ve stabilitesi için daha az manipülasyon gerekmekte olup, iki enzimin birbiriyle olan ilişki ve stabilitesi, işlem sırasında sentetik olarak karıştırılmaları durumunda da sorun yaratabilmektedir. Gıda, deri, deterjan vb. endüstrileri hedefleme doğrultusunda, çalışmamız proteaz ve lipazın birlikte üretiminin, bu enzimlerin sinerjistik bir sistem içinde kullanılabileceğini göstermektedir. Kullanılan *B. pacificus* 2NP6 tarafından proteaz ve lipazın eş zamanlı üretiminin benzersiz özelliği, türün biyoteknolojik uygulamaları için bir potansiyel sağlamaktadır.

5. SONUÇLAR

Bu çalışma ile topraktan izole edilen ve gerçekleştirilen ön çalışmalarda proteaz ve lipaz enzimlerinin her ikisini birden ürettiği ortaya çıkarılan *B. pacificus* 2NP6 izolatının bu enzimler yönünden eş zamanlı üretimi için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Çalışma kapsamında öncelikle 2NP6 izolatının tür teşhisi 16S rRNA gen sekans analizine göre gerçekleştirildi. Bu analize göre %99,36 oranında 16S rRNA gen sekans benzerliğine dayanılarak izolatın *Bacillus paramycoides* türüne ait bir suş olduğuna karar verildi. Tür tayininin gerçekleştirilmesi ve suşun sahip olduğu lipaz ve proteaz gen sekanslarının ortaya çıkarılması amacıyla tüm genom sekansı gerçekleştirildi. Bu analiz sonucunda suşun kesinlikle %84,8 olan DDH değerinde dikkate alınarak *Bacillus pacificus* türüne ait olduğu ortaya çıkarılmıştır. Ardından, optimize edilen besiyeri şartlarında üretilerek elde edilen enzimler saflaştırılarak karakterizasyon ve endüstriyel uygulamalarda kullanım potansiyellerinin araştırılması çalışmaları yapıldı.

Eş zamanlı üretim için besiyeri optimizasyonunda öncelikli olarak proteaz karbon kaynağı olarak skim milk belirlendi. Yapılan çalışmalar ile besiyerinde kullanılması gereken skim milk konsantrasyon miktarının her iki enzim yönünden en yüksek aktivite veren %1 gr/mL olduğu belirlendi.

Revize edilen besiyeri ortamında, lipaz üretimi için karbon kaynağı olarak seçilecek en uygun bileşen belirlendi. Yapılan araştırmaların sonucunda, her iki enzimin aktivitesi de belirlenen farklı karbon kaynakları üzerinde değerlendirildi. Lipazın üç farklı kaynakta da etkili bir aktivite göstermesi üzerine, proteaz aktiviteleri de göz önüne alınarak en iyi aktiviteye sahip olan karbon kaynağı olarak susam yağı seçildi. Belirlenen susam yağının besiyeri içerisindeki konsantrasyonu her iki enzim aktivitesi yönünden araştırılarak %0,5 (v/v) olduğu belirlendi.

Revize edilen besiyeri ortamında, her iki enzim yönünden azot kaynağı seçimi gerçekleştirildi. Farklı azot kaynakları üzerinden değerlendirildiğinde her iki enzimin aktivitesi yönünden en iyi azot kaynağının maya özütü olduğu tespit edildi. Besiyeri ortamında seçilmiş olan maya özütünün konsantrasyonunun ise her iki enzim yönünden en yüksek aktiviteyi veren %0,5 g/mL olduğu belirlendi.

Revize edilen besiyerinde enzim aktiviteleri üzerine pH değerinin etkisinin araştırılması yapıldığında her iki enzim yönünden en yüksek aktiviteyi veren pH değerinin pH 11,0 olduğu belirlendi. Revize edilen besiyeri üzerine *B. pacificus* 2NP6 izolatının besiyeri ortamına eklenecek olan inokülasyon miktarının her iki enzim yönünden %4 olduğu yapılan çalışmalar sonucunda tespit edildi. Yapılan çalışmalar ile her iki enziminde en iyi üretiminin olduğu inkübasyon sıcaklığının 30 °C olduğu ve inkübasyon süresinin her iki enzim üretimi açısından 48. saat olduğu yapılan çalışmalar ile tespit edildi.

Lipaz ve proteaz üretiminin maksimum şekilde sağlandığı modifiye besiyerinde belirlenen şartlar ile üretimleri gerçekleştirilerek elde edilen ham protein ekstraktının konsantre edilmesi etanol çöktürmesi işlemi yapıldı. Enzimlerin konsantre işlemi sonrasında elde edilen hücre özütünün bir kısmı proteaz enziminin saflaştırması için Jel filtrasyon kolon kromatografisinden (SephadexG-150), diğer kısmı ile de lipaz enziminin saflaştırılması amacı ile katyonik iyon değiştirici olan Karboksimetil (CM) kullanılarak gerçekleştirildi. Her iki saflaştırma yöntemi ile enzimlerin en yüksek aktivite veren fraksiyonları toplanarak birleştirildi ve karakterizasyon çalışmaları için kullanıldı.

B. pacificus 2NP6 izolatının saflaştırma aşamaları sonrasında elde edilen özütlerin proteaz ve lipaz yönünden optimum çalışma sıcaklığı, proteaz için 55 °C, lipaz için 60 °C olarak tespit edildi. *B. pacificus* 2NP6 proteazın optimum pH değerinin pH 10,0, *B. pacificus* 2NP6 lipazının optimum pH değerinin ise pH 8,0 olduğu tespit edildi.

B. pacificus 2NP6 izolatından elde edilen proteazın kararlılığına ısının etkisi incelendiğinde, inkübasyon sonunda 40 °C, 50 °C’de aktivitenin azalmadığı, 60 °C’de %48’e, 70 °C’de ise %29’a düştüğü belirlendi. *B. pacificus* 2NP6 izolatından elde edilen lipazın kararlılığına ısının etkisi incelendiğinde, inkübasyon sonunda 50 °C’de %60’a, 60 °C’de %48’e ve 70 °C’de ise %38’e düştüğü belirlendi.

B. pacificus 2NP6 izolatından elde edilen proteazın ve lipazın kararlılığına pH’ın etkisi oda sıcaklığında incelendi. *B. pacificus* 2NP6 izolatından elde edilen proteazın aktivitesinin 1440 dakikalık inkübasyon sonrasında pH 11,0’de %113’e çıktığı, pH 7,0’de %51’e, pH 8,0’de %70’e, pH 9,0’da %90’a pH 10,0’da %62’ye ve pH 12,0 ise %74’e düştüğü belirlendi. 2NP6 izolatından elde edilen lipazın 1440 dakikalık inkübasyon sonrasında pH 5,0’de %69’a, pH 6,0’da %56’ya, pH 7,0’de %77’ye, pH 8,0’in %63 ve pH 9,0’un ise %62’ye düştüğü belirlendi.

B. pacificus 2NP6 izolatından elde edilen proteaz ve lipaz aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi; Zn^{+2} , Co^{+2} , Mg^{+2} , Ca^{+2} ve K^{+} metal iyonlarının klorür tuzları ile 1 saat

optimum sıcaklıklarda bekletilerek gerçekleştirildi. Süre sonunda, Zn^{+2} metal iyonunun *Bacillus pacificus* 2NP6 proteazının aktivitesini 1 mM varlığında %100, 5 mM varlığında ise %75 arttırmış olduğu; Co^{+2} iyonunun 1 mM varlığında %20, 5 mM varlığında ise %24 arttırmış olduğu; Mg^{+2} iyonunun 1mM varlığında %100, 5 mM varlığında ise %182 arttırmış olduğu; Ca^{+2} iyonunun 1 mM varlığında %217, 5 mM varlığında ise %195 arttırmış olduğu; K^{+} iyonunun 1 mM varlığında %93 ve 5 mM varlığında ise %111 arttırmış olduğu belirlendi. Aynı şekilde *B. pacificus* 2NP6 lipazının metal iyon tuzları ile reaksiyonun sonunda, Zn^{+2} metal iyonunun enzim aktivitesini inhibe ettiği ve 1 mM varlığında %96'ya, 5 mM varlığında ise %57'ye düşürdüğü belirlendi. Co^{+2} , Mg^{+2} , Ca^{+2} ve K^{+} metal iyonlarının ise aktivatör etki yapmış olduğu ve Co^{+2} iyonunun 1 mM varlığında % 8, 5 mM varlığında ise %27 arttırmış olduğu; Mg^{+2} iyonunun 1 mM varlığında %35, 5 mM varlığında ise %38 arttırmış olduğu; Ca^{+2} iyonunun 1mM varlığında %47, 5 mM varlığında ise % %72 arttırmış olduğu ve K^{+} iyonunun 1 mM varlığında %25, 5 mM varlığında ise %45 arttırmış olduğu belirlendi.

Organik çözücülerin *B. pacificus* 2NP6 izolatından elde edilen proteaz ve lipaz aktiviteleri üzerine etkileri optimum sıcaklıklarda 60 dakika inkübasyon sonucu belirlendi. 5 mM EDTA proteaz aktivitesini %67'ye düşürürken, lipaz aktivitesini ise %76'ya düşürdüğü tespit edildi. 5 mM PMSF proteaz aktivitesini %140, lipaz aktivitesini ise %23 artırdığı tespit edildi. 5 mM DTT ve %1 (v/v) β -Mercaptoethanolün proteaz aktivitesini sırasıyla %129, %27 artırdığı, lipaz aktivitesini ise sırasıyla, %30 ve %559 artırdığı belirlendi. %0,1 (v/v) SDS, Tween-20 ve Triton X-100'ün proteaz aktivitesini sırası ile %45, %120 ve %105 artırdığı, lipaz aktivitesini ise sırasıyla, %1, %1 ve %3 gibi az bir oranda artırdığı gözlemlendi. %1'lik etanolün proteaz aktivitesini %95'e düşürdüğü, lipaz aktivitesini ise %21 oranında artırdığı belirlendi. %1'lik konsantrasyondaki DMSO'nun ise proteaz ve lipaz aktivitesini sırasıyla %104 ve %21 oranlarında artırdığı tespit edildi.

Ticari deterjanlar ile yapılan deterjan stabilitesi deneyi ile *B. pacificus* 2NP6 proteazının ve lipazının 5 mg/mL konsantrasyondaki ticari deterjan ile optimum sıcaklıklarında 30 dakika inkübasyon sonrası proteaz aktivitesini, OMO, Boron ve Bingo'nun sırasıyla, %22, %32 ve %15 artırdığı, lipaz aktivitesini ise sırasıyla %81'e, %81'e ve %64'e düşürdüğü tespit edildi.

B. pacificus 2NP6 izolatından elde edilen lipazın substrat spesifikliği incelendiğinde kısa zincirli *p*-nitrofenol esteri olan *p*NPB ile karşı iyi aktivite verdiği belirlendi.

Proteaz substratı olarak azokazein ile ilgili kinetik parametreleri incelendi ve bu substrat için K_m değeri 5,841085 mg/mL ve V_{max} değeri 13514,54 U/mg olarak, Lipaz substratı paranitrofenil butirat ile ilgili kinetik parametreleri incelendi ve bu substrat için K_m değeri 0,053185 mM ve V_{max} değeri 4349,01 U/mg olarak belirlendi.

B. pacificus 2NP6 proteazının çeşitli endüstriyel alanlardaki kullanım potansiyelinin araştırılmasında, kan lekesini çıkarması yönünde yıkama performansına optimum çalışma sıcaklığında 30 dk çalkalayıcı inkübatörde (120 rpm) inkübe edildi. *B. pacificus* 2NP6 proteazının ticari deterjan ile karşılaştırıldığında, ticari deterjandaki ile aynı seviyede kan lekesini çıkardığı fakat beyazlatma yapmadığı gözlemlendi.

B. pacificus 2NP6 proteazının sütü pıhtılaştırma yönünden yapılan çalışmalarda ise en iyi pıhtılaşma aktivitesini 100 mM CaCl_2 konsantrasyonda verdiği ve aktivitenin 22,22 U/mL olduğu hesaplandı fakat en berrak peynir altı suyunun 50 mM konsantrasyonda olduğu gözlemlendi.

B. pacificus 2NP6 izolatından elde edilen ham ve saflaştırılmış konsantre haldeki proteaz enzimlerinin dana derisinden kıl giderme potansiyeli incelendi. *B. pacificus* 2NP6 proteazı ile dana derisinden oda sıcaklığında yapılan kıl giderimi işleminde kullanılan ham enzimde bekletilen dana derisi parçasında 96. saatte tüy dökümünün olduğu ancak deri yüzeyinde yer yer lekeli bir görüntü olduğu çok temiz bir görüntünün olmadığı gözlemlendi. Bunun yanında saflaştırıldıktan sonra konsantre edilen proteaz enziminde bekletilen dana derisi parçasında da tüy dökülmesinin aynı şekilde 96. saatte olduğu, ancak saflaştırılmış enzim ile elde edilen dana derisinin daha beyaz ve lekesiz olduğu gözlemlendi.

B. pacificus 2NP6 lipazının deterjan endüstrisinde kullanımını araştırmak amacıyla, zeytinyağı lekeli ve yumurta sarısı lekeli kumaş parçaları üzerine enzimin direkt etkisine karşılaştırmalı olarak ticari deterjanın lekeler üzerine etkisine ve ticari deterjan ile enzimin bir arada kullanımının etkisi test edildi. Belirtilen deney düzeneğindeki örneklerin sonuçları incelendiğinde, zeytin yağı lekeli kumaşın enzim ve ticari deterjan ile muamelesi sonucu kontrol ve diğer deney gruplarına göre daha yüksek performans gösterdiği, yumurta sarı lekesinin sadece enzim kullanımında ve sadece ticari deterjan kullanımda lekenin hemen hemen hepsinin çıkmış olduğu enzim ile ticari deterjanın bir arada kullanımında ise lekenin tamamen çıkmış olduğu gözlemlendi.

Tüm genom analizi sonucu elde edilen veriler doğrultusunda hem lipaz hem de proteaz için dizayn edilen primer çiftleri ile *B. pacificus* 2NP6 genomik DNA'sından

belirlenen şartlarda PZR reaksiyonları gerçekleştirildi. PZR sonucunda elde edilen PZR ürünleri, pJet 1.2 TA klonlama vektörüne klonlanarak MacroGen firmasında sekans analizi yapıldı. Dizi analizleri sonucunda istenilen boyutlardaki proteaz (585 bp) ve lipaz (723 bp) genlerinin varlığı tespit edildi. Sonuçlar doğrultusunda proteaz geni pET-20b(+) vektörüne, lipaz geni ise pET-28a(+) vektörüne *XhoI* ve *NcoI* kesim bölgeleri yardımıyla klonlandı. Kesim sonuçları ile doğruluğu teyit edilen klonlar *E. coli* BL21(DE3) hücrelerine aktararak ekspres edildi.

Ekspresyon sonuçları SDS-PAGE poliakrilimid jel elektroforezinde analiz edildi. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda klonlanarak elde edilen lipaz ve proteaz enzimleri ile eş zamanlı üretim sonucu saflaştırılarak elde edilen lipaz ve proteaz enzimlerinin benzer moleküler ağırlıkta olduğu belirlendi. SDS-PAGE jel sonucuna bakıldığında hem eş zamanlı üretim sonucu elde edilen proteazın hem de pET-20b(+) vektörüne klonlanan proteazın moleküler ağırlığının 17 kDa civarında olduğu, hem eş zamanlı üretim sonucu elde edilen lipazın ise pET-28a(+) vektörüne klonlanan lipaz ile moleküler ağırlığının ise yaklaşık olarak 24 kDa büyüklüğünde olduğu belirlendi.

6. ÖNERİLER

1. *B. pacificus* 2NP6 izolatından elde edilen proteazın ve lipazın daha farklı endüstriyel alanlarda kullanımı yönünden çalışmalar genişletilebilir.
2. *B. pacificus* 2NP6 izolatından elde edilen proteazın *E. coli* BL21(DE3)/pET20b(+)-BcpLip-His'e ve lipazın *E. coli* BL21(DE3)/pET28a(+)-BcpLip-His'e klon formlarının ekspresyon şartlarının daha iyi hala getirilmesi, ekspresyon sonrası enzimlerin His-Tag kuyruğu sayesinde saflaştırılıp, karakterizasyonu yapılması önerilmektedir.
3. *B. pacificus* 2NP6 izolatından elde edilen proteazın ve lipazın *in silico* olarak eş zamanlı üretiminin sağlanması ve *in vitro* şartlarla elde edilen veriler ile karşılaştırılması yapılabilir.

7. KAYNAKLAR

- Abbaszaadeh, A., Ghobadian, B., Omidkhah, M. R., & Najafi, G. (2012). Current biodiesel production technologies: A comparative review. *Energy Conversion Managament*, 63, 138–148. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2012.02.027>.
- Adetunji, A. I., & Olaniran, A. O. (2021). Production strategies and biotechnological relevance of microbial lipases: A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52, 1257–1269. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00503-5>.
- Ahmad, W., Tayyab, M., Aftab, M. N., Hashmi, A. S., Ahmad, M. D., Firyal, S., Wasim M., & Awan, A. R. (2020). Optimization of conditions for the higher level production of protease: characterization of protease from *Geobacillus* SBS-4S. *Waste and Biomass Valorization*, 11, 6613–6623. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-00935-4>.
- Akram, F., Mir, A. S., Haq, I. ul, & Roohi, A. (2023). An appraisal on prominent industrial and biotechnological applications of bacterial lipases. *Molecular Biotechnology*. doi:10.1007/s12033-022-00592-z.
- Al Mohaini, M., Farid, A., Muzammal, M., Ghazanfar, S., Dadrasnia, A., Als Salman, A. J., Al Hawaj, M. A., Alhashem, Y. N., & Ismail, S. (2022). Enhancing lipase production of *Bacillus salmalaya* strain 139SI using different carbon sources and surfactants. *Applied Microbiology*, 2(1), 237–247. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol2010017>.
- Alabdalall, A. H., Al-Anazi, N. A., Aldakheel, L. A., Amer, F. H., Aldakheel, F. A., Ababutain, I. M., ... & Al-Khaldi, E. M. (2021). Application and characterization of crude fungal lipases used to degrade fat and oil wastes. *Scientific Reports*, 11(1), 19670. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98927-4>.
- Albayati, S. H., Masomian, M., Ishak, S. N., Mohamad Ali, M. S., Thean, A. L., Mohd Shariff, F. binti, Muhd Noor D. binti, & Raja Abd Rahman, R. N. (2020). Main structural targets for engineering lipase substrate specificity. *Catalysts*, 10(7), 747. doi:10.3390/catal10070747.
- Alcaraz, L. D., Olmedo, G., Bonilla, G., Cerritos, R., Hernández, G., Cruz, A., Ramí rez, E., Putonti, C., Jimé nez, B., Martí nez, E., Lo pez, V., Arvizu, J. L., Ayala, F., Razo, F., Caballero, J., Siefert, J., Eguarte†, L., Vielle, J.-P., Martí nez, O., Souza, V., Herrera-Estrella, A., & Herrera-Estrella, L. (2008). The genome of *Bacillus coahuilensis* reveals adaptations essential for survival in the relic of an ancient marine environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(15), 5803–5808.

- Ali, S., Khan, S. A., Hamayun, M., & Lee, I.-J. (2023). The recent advances in the utility of microbial lipases: A Review. *Microorganisms*, 11(2), 510. doi:10.3390/microorganisms11020510.
- Al-Qodah, Z., Daghistani, H., & Alananbeh, K. (2013). Isolation and characterization of thermostable protease producing *Bacillus pumilus* from thermal spring in Jordan. *Afr J Microbiol Res.*, 7(29), 3711–3719.
- Ama, M., Ma, A., & Tiwari, K. (2018). Isolation and screening of extracellular protease enzyme from fungal isolates of soil. *J Pure Appl Microbiol.*, 4, 2059.
- Amara, A. A., Salem, S. R., & Shabeb, M. S. (2009). The possibility to use bacterial protease and lipase as biode detergent. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, 4(2), 104-114.
- Amid, M., ABD Manap, M. Y., & Zohdi, N. K. (2014). Purification and characterization of alkaline-thermostable protease enzyme from pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) waste: a potential low cost of the enzyme. *BioMed research international*, 2014.
- Anbu, P., & Hur, B. K. (2014). Isolation of an organic solvent-tolerant bacterium *Bacillus licheniformis* PAL05 that is able to secrete solvent-stable lipase. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 61(5), 528-534. DOI: 10.1002/bab.1202.
- Anobom, C. D., Pinheiro, A. S., De-Andrade, R. A., Aguiéiras, E. C., Andrade, G. C., Moura, M. V., Almeida, R. V., & Freire, D. M. (2014). From structure to catalysis: Recent developments in the biotechnological applications of lipases. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2014/684506>.
- Aravindan, R., Anbumathi, P., & Viruthagiri, T. (2007). Lipase applications in food industry. *Indian J. Biotechnol.*, 6, 141–158.
- Arpigny, J.L. & Jaeger, K.E. (1999). Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem. J.*, 343, 177-183.
- Aulakh, S. S., & Prakash, R. (2010). Optimization of medium and process parameters for the production of lipase from an oil-tolerant *Aspergillus* sp. (RBD-01). *Journal of Basic Microbiology*, 50(1), 37-42.
- Bacha, A. B., Moubayed, N., & Abid, I. (2015). Thermostable, alkaline and detergent-tolerant lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus stearothermophilus*. *Indian Journal of biochemistry & Biophysics*, 52, 172-188.
- Banerjee, G., & Ray, A. K. (2017). Impact of microbial proteases on biotechnological industries. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 33, 119–143.

- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S. & Pyshkin, A. V. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*, 19(5), 455-477.
- Barbosa, J. M. P., Souza, R. L., Melo, C. M. D., Fricks, A. T., Soares, C. M. F., & Lima, Á. S. (2012). Biochemical characterisation of lipase from a new strain of *Bacillus* sp. ITP-001. *Química Nova*, 35(6), 1173-1178.
- Barett, A. J. (1995). Proteolytic enzymes: aspartic and metallopeptidases. *Methods Enzymol.*, 248(183).
- Barik, A., Sen, S. K., Rajhans, G., & Raut, S. (2022). Purification and optimization of extracellular lipase from a novel strain *Kocuria flava* Y4. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2022, 10. <https://doi.org/10.1155/2022/6403090>.
- Basha, P. A. (2020). Oil degrading lipases and their role in environmental pollution, in *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*, 269–277 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821406-0.00025-4>.
- Beena, A. K., Geevarghese, P. I., & Jayavardanan, K. K. (2012). Detergent potential of a spoilage protease enzyme liberated by a psychrotrophic spore former isolated from sterilized skim milk. *American Journal of Food Technology*, 7(2), 89-95.
- Benkiar, A., Nadia, Z. J., Badis, A., Rebzani, F., Soraya, B. T., Rekik, H., Naili, B., Ferradji, F. Z., Bejar, S., & Jaouadi, B. (2013). Biochemical and molecular characterization of a thermo-and detergent-stable alkaline serine keratinolytic protease from *Bacillus circulans* strain DZ100 for detergent formulations and feather-biodegradation process. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 83, 129-138.
- Bertels, F., Silander, O. K., Pachkov, M., Rainey, P. B., & Van Nimwegen, E. (2014). Automated reconstruction of whole-genome phylogenies from short-sequence reads. *Molecular biology and evolution*, 31(5), 1077-1088.
- Bharathi, D., & Rajalakshmi, G. (2019). Microbial lipases: An overview of screening, production and purification. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 22, 101368. doi:10.1016/j.bcab.2019.101368.
- Bharathi, D., Rajalakshmi, G., & Komathi, S., (2018). Optimization and production of lipase enzyme from bacterial strains isolated from petrol spilled soil. *J. King Saud Univ. Sci.*, 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.12.018>.
- Bhaskar, N., Sudeepa, E., Rashmi, H., & Selvi, A. T. (2007). Partial purification and characterization of protease of *Bacillus proteolyticus* CFR3001 isolated from fish processing waste and its antibacterial activities. *Bioresour. Technol.*, 98, 2758–2764.

- Bhunia, B., Dutta, D., & Chaudhuri, S. (2011). Extracellular alkaline protease from *Bacillus licheniformis* NCIM-2042: Improving enzyme activity assay and characterization. *Engineering in Life Sciences*, 11(2), 207-215.
- Bolger, A. M., Lohse, M. & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120.
- Borkar, P. S., Bodade, R. G., Rao, S. R., & Khobragade, C. N. (2009). Purification and characterization of extracellular lipase from a new strain: *Pseudomonas aeruginosa* SRT 9. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, 358-366.
- Borrelli, G.M., & Trono, D. (2015). Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. *Int. J. Mol. Sci.*, 16, 20774–20840.
- Bosi, E., Donati, B., Galardini, M., Brunetti, S., Sagot, M. F., Lió, P., & Fondi, M. (2015). MeDuSa: a multi-draft based scaffolder. *Bioinformatics*, 31(15), 2443-2451.
- Bouacem, K., Bouanane-Darenfed, A., Laribi-Habchi, H., Elhoul, M. B., Hmida-Sayari, A., Hacene, H., Ollivier, B., Fardeau, M.-L., Jaouadi, B., & Bejar, S. (2015). Biochemical characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from *Caldicoprobacter guelmensis*. *International journal of biological macromolecules*, 81, 299-307. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.08.011>.
- Brettin, T., Davis, J. J., Disz, T., Edwards, R. A., Gerdes, S., Olsen, G. J., & Shukla, M. (2015). RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Scientific Reports*, 5, 8365.
- Caparrós, C., Lant, N., Smets, J., & Cavaco-Paulo, A. (2012). Effects of adsorption properties and mechanical agitation of two detergent cellulases towards cotton cellulose. *Biocatalysis and Biotransformation*, 30(2), 260-271.
- Casas-Godoy, L., Duquesne, S., Bordes, F., Sandoval, G., & Marty, A. (2018). Lipases: An Overview. *Methods in Molecular Biology*, 1835. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8672-9_1
- Chanalia, P, Gandhi, D., & Jodha, D. (2011). Applications of microbial proteases in pharmaceutical industry: an overview. *Rev Med Microbiol.*, 22(4), 96–101.
- Chandra, P., Singh, R., & Arora, P. K. (2020). Microbial lipases and their industrial applications: A comprehensive review. *Microbial Cell Factories*, 19(169), 1–42. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01428-8>.
- Chen, L., Daniel, R. M., & Coolbear, T. (2003). Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *International Dairy Journal*, 13(4), 255–275. doi:10.1016/s0958-6946(02)00171-1.

- Cho, J. C., & Tiedje, J. M. (2001). Bacterial species determination from DNA-DNA hybridization by using genome fragments and DNA microarrays. *Applied and environmental microbiology*, 67(8), 3677-3682.
- Choudhury, P., & Bhunia, B. (2015). Industrial application of lipase: A review. *Biopharm. J.*, 1, 41-47.
- Coradi, G. V., Visitação, V. L. D., Lima, E. A. D., Saito, L. Y. T., Palmier, D. A., Takita, M. A., Oliva Neto, P. D., & Lim, V. M. G. D. (2013). Comparing submerged and solid-state fermentation of agro-industrial residue for the production and characterization of lipase by *Trichoderma harzianum*. *Annals of Microbiology*, 63(2), 533-540. <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0500-1>.
- da Silva, O. S., de Almeida, E. M., de Melo, A. H. F., & Porto, T. S. (2018). Purification and characterization of a novel extracellular serine-protease with collagenolytic activity from *Aspergillus tamaritii* URM4634. *International journal of biological macromolecules*, 117, 1081-1088.
- da Silva, R.R. (2017). Bacterial and fungal proteolytic enzymes: production, catalysis and potential applications. *Appl Biochem Biotechnol.*, 183(1), 1-19.
- Dab, A., Hasnaoui, I., Mechri, S., Allala, F., Bouacem, K., Noiriel, A., Bouanane-Darenfed, A., Saalaoui, E., Asehraoui, A., Wang, F., Abousalham, A., & Jaouadi, B. (2023). Biochemical characterization of an alkaline and detergent-stable Lipase from *Fusarium annulatum* Bugnicourt strain CBS associated with olive tree dieback. *Plos one*, 18(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0286091>.
- Dayısoylu, K. S., & Yeşiltoprak, B. (2020). Recent developments of industrial enzyme production in food biotechnology. *International Journal of Agriculture, Forestry and Life Sciences*, 4(1), 21-28.
- De Abreu L., Fernandez-Lafuente R., Rodrigues R.C., Volpato G., & Ayub M.A.Z., (2014). Efficient purification-immobilization of an organic solvent-tolerant lipase from *Staphylococcus warneri* EX17 on porous styrene-divinylbenzene beads. *J. Mol. Catal B:Enzym*, 99, 51-55.
- Demir, S. (2020). *Bacillus sp. EBTA6 ile Proteaz Üretiminin Optimizasyonu ve Enzimin Endüstriyel Kullanım Olanaklarının Araştırılması*, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans, Sakarya.
- Demirkan, E., Çetinkaya, A. A., & Abdou, M. (2021). Lipase from new isolate *Bacillus cereus* ATA179: optimization of production conditions, partial purification, characterization and its potential in the detergent industry. *Turkish Journal of Biology*, 45(3), 287-300.
- Deng, A., Wu, J., Zhang, Y., Zhang, G., & Wen, T. (2010). Purification and characterization of a surfactant-stable high-alkaline protease from *Bacillus* sp. B001. *Bioresour. Technol.*, 101, 7100-7106.

- Dhake, K. P., Thakare, D. D., & Bhanage, B. M. (2013). Lipase: A potential biocatalyst for the synthesis of valuable flavour and fragrance ester compounds. *Flavour and Fragrance Journal*, 28(2), 71-83.
- Dias, D. R., Vilela, D. M., Silvestre, M. P. C., & Schwan, R. F. (2008). Alkaline protease from *Bacillus* sp. isolated from coffee bean grown on cheese whey. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 24, 2027–2034.
- Domingos, A., Miguel, G., Clemente, A. & Pais, M.S. (1992). Production of Clotting Enzymes by *Centaurea Calcitrapa* L. (Compositae). In Vardar-Sukan F. & Sukan S. (Eds.), *Recent Advances in Biotechnology* (pp. 511-513). NATO ASI Series.
- El-Fiky, A.F., Khalil, E.M., Mowafi, S., Zaki, R.A., & El-Sayed, H. (2022). A novel approach towards removal of lipid barrier from wool fibers' surface using thermophilic lipase. *J. Nat. Fibers*, 19, 9471–9485.
- Ellaiah P., Srinivasulu, B. & Adinarayana, K. (2002). A review on microbial alkaline proteases. *J Sci Ind Res.*, 61(9), 690–704.
- El-Moniem, E. A. (2008). Production and characterization of mesophilic lipase isolated from *Bacillus stearothermophilus* AB-1. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11(8), 1100-1106. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2008.1100.1106>.
- Eltaweel, M. A., Rahman, R. N. Z. R. A., Salleh, A. B., & Basri, M. (2005). An organic solvent-stable lipase from *Bacillus* sp. strain 42. *Annals of Microbiology*, 55(3), 187.
- Emran, M. A., Ismail, S. A., & Hashem, A. M. (2020). Production of detergent stable thermophilic alkaline protease by *Bacillus licheniformis* ALW1. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 26, 101631.
- Faouzi, L., Fatimazahra, E.B., Moulay, S., Adel, S., Wifak, B., Soumya, E., Iraqui, M., & Saad, K.I., (2015b). Higher tolerance of a novel lipase from *Aspergillus flavus* to the presence of free fatty acids at lipid/water interface. *African J. Biochem. Res.*, 9, 9–17.
- Febriani, Aura, N., Kemala, P., Saidi, N., & Iqbalsyah, T. M. (2020). Novel thermostable lipase produced by a thermo-halophilic bacterium that catalyses hydrolytic and transesterification reactions. *Heliyon*, 6(7). doi:10.1016/j.heliyon.2020.e04520
- Femi-Ola, T. O., Odeyemi, A. T., Olaiya, B. S., & Ojo, O. O. (2018). Characterization of lipase from *Bacillus subtilis* Isolated from oil contaminated soil. *J. Appl. Environ. Microbiol.*, 6(1), 10-17. DOI:10.12691/jaem-6-1-2.
- Filho, D. G., Silva, A. G., & Guidini, C. Z. (2019). Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 103, 7399-7423. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10027-6>.

- George-Okafor, U. O., & Odibo, F. J. C. (2011). Purification and some properties of thermo-stable alkaline serine protease from thermophilic *Bacillus* sp. Gs-3. *J Biol Sci*, 11, 299-306.
- Gopal, N., Hill, C., Ross, P. R., Beresford, T. P., Fenelon, M. A., & Cotter, P. D. (2015). The prevalence and control of *Bacillus* and related spore-forming bacteria in the dairy industry. *Frontiers in microbiology*, 6, 1418.
- Gopinath, S. C. B., Hilda, A., Priya, T. L., & Annadurai, G. (2002). Purification of lipase from *Cunninghamella verticillata* and optimization of enzyme activity using response surface methodology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(5), 449-458. <https://doi.org/10.1023/A:1015579121800>.
- Gupta, R. Beg, Q., & Lorenz, P. (2002). Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and industrial applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 59, 15–32.
- Gurung, N., Ray, S., Bose, S., & Rai, V. (2013). A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond. *BioMed Research International*, 2015, 2013, 18.
- Gülmez, C., & Atakisi, O. (2022). Investigation of compatibility of lipase with commercial detergents, surfactants and oxidizing agent as a detergent additive. *International Journal of Chemistry and Technology*, 6(1), 33-38. DOI: <http://dx.doi.org/10.32571/ijct.1085417>.
- Hamada, S., Kubota, K., & Sagisaka, M. (2017). Purification and characterization of a novel extracellular neutral metalloprotease from *Cerrena albocinnamomea*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 63(1), 51-57.
- Hang, F., Wang, Q., Hong, Q., Liu, P., Wu, Z., Liu, Z., Zhang, H., & Chen, W. (2016). Purification and characterization of a novel milk-clotting metalloproteinase from *Paenibacillus* spp. BD3526. *International journal of biological macromolecules*, 85, 547-554.
- Hari Krishna, S., & Chowdary, G. V. (2000). Optimization of simultaneous saccharification and fermentation for the production of ethanol from lignocellulosic biomass. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(5), 1971-1976.
- Hasan, F., Shah, A. A., & Hameed, A. (2009). Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. *Biotechnol. Adv.*, 27, 782–798.
- Hasan, F., Shah, A. A., Javed, S., & Hameed, A. (2010). Enzymes used in detergents: Lipases. *African Journal of Biotechnology*, 9(31), 4836–4844. <https://doi.org/10.5897/AJBx09.026>.
- Hausmann, S., & Jaeger, K.-E. (2010). Lipolytic enzymes from bacteria. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, 1099–1126. doi:10.1007/978-3-540-77587-4_77.

- Houde, A., Kademi, A., & Leblanc, D. (2004). Lipases and their industrial applications: An overview. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 118, 155–170.
- Hube, S., & Wu, B. (2021). Mitigation of emerging pollutants and pathogens in decentralized wastewater treatment processes: A review. *Sci. Total Environ.*, 779, 146545.
- Ibrahim, A. S., Al-Salamah, A. A., El-Badawi, Y. B., El-Tayeb, M. A., & Antranikian, G. (2015). Detergent-, solvent-and salt-compatible thermoactive alkaline serine protease from halotolerant alkaliphilic *Bacillus* sp. NPST-AK15: purification and characterization. *Extremophiles*, 19, 961-971. DOI 10.1007/s00792-015-0771-0.
- İdil, Ö., Söylemez, Ü., Çelikoğlu, E., & Çelikoğlu, U. (2021). Purification and characterization of protease from *Bacillus thuringiensis* isolated from soil. *International Journal of Science Letters*, 3(1), 18-31. <https://doi.org/10.38058/ijsl.842485>.
- İnan K. (2011). *İzmir ve Aydın İllerindeki Bazı Kaplıcalardan İzole Edilen Termofilik Bakteri İzolatlarının Moleküler Taksonomisi ve D1021 İzolatının Glukoz İzomerazının Karakterizasyonu*, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Trabzon.
- Jaswal, R., Kocher, G., & Virk, M. (2008). Production of alkaline protease by *Bacillus circulans* using agricultural residues: a statistical approach. *Ind J Biotechnol.*, 7, 356–360.
- Javed, S., Azeem, F., Hussain, S., Rasul, I., Siddique, M. H., Riaz, M., Afzal, M., Kouser, A., & Nadeem, H. (2018). Bacterial lipases: A review on purification and characterization. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 132, 23–34. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2017.07.014>.
- Joo, H.-S., Kumar, C. G., Park, G.-C., Kim, K. T., Paik, S. R., & Chang, C.-S. (2002). Optimization of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*. *Process Biochem.*, 38, 155–159.
- Joseph, B., Ramteke, P. W., & Thomas, G. (2008). Cold active microbial lipases: some hot issues and recent developments. *Biotechnology advances*, 26(5), 457-470.
- Joshi, R., & Kuila, A. (2018). Lipase and their different industrial applications: A review. *Braz. J. Biol. Sci.*, 5, 237–247.
- Kaas, R. S., Leekitcharoenphon, P., Aarestrup, F. M., & Lund, O. (2014). Solving the problem of comparing whole bacterial genomes across different sequencing platforms. *PLoS One*, 9:8, e104984.
- Kanaya, S., Koyanagi, T., & Kanaya, E. (1998). An esterase from escherichia coli with a sequence similarity to hormone-sensitive lipase. *Biochemical Journal*, 332(1), 75–80. doi:10.1042/bj3320075.

- Kareem, S. O., Adebayo, O. S., Balogun, S. A., Adeogun, A. I., & Akinde, S. B. (2017). Purification and Characterization of Lipase from *Aspergillus flavus* PW2961 using Magnetic Nanoparticles. *Nigerian Journal of Biotechnology*, 32, 77-82.
- Khan, F. (2013). New microbial proteases in leather and detergent industries. *Innov Res. Chem.*, 1(1), 1–6.
- Khan, F.I., Lan, D., Durrani, R., Huan, W., Zhao, Z., & Wang, Y. (2017). The lid domain in lipases: Structural and functional determinant of enzymatic properties. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 5, 16.
- Khan, S. S., Verma, vijeshwar, & Rasool, S. (2021). Purification and Characterization of Lipase Enzyme from Endophytic *Bacillus Pumilus* WSS5 for Application in Detergent Industry. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 50, 1-27. doi:10.21203/rs.3.rs-216333/v2.
- Khandelwal, H. B., More, S. V., Kalal, K. M., & Laxman, R. S. (2015). Eco-friendly enzymatic dehairing of skins and hides by *C. brefeldianus* protease. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 17, 393-405.
- Kirk, O., Borchert, T. V., & Fuglsang, C. C. (2002). Industrial enzyme applications. *Curr Opin Biotechnol.*, 13, 345–351.
- Kovacic, F., Babic, N., Krauss, U., & Jaeger, K.-E. (2018). Classification of lipolytic enzymes from bacteria. Aerobic Utilization of Hydrocarbons, *Oils and Lipids*, 1–35. doi:10.1007/978-3-319-39782-5_39-1.
- Kumar, A., & Kanwar, S. S. (2012). Lipase production in solid-state fermentation (SSF): recent developments and biotechnological applications. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology*, 6(1), 13-27.
- Kumar, A., Mukhia, S., Kumar, N., Acharya, V., Kumar, S., & Kumar, R. (2020). A broad temperature active lipase purified from a psychrotrophic bacterium of sikkim himalaya with potential application in detergent formulation. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8(642). doi: 10.3389/fbioe.2020.00642.
- Kumar, D. J. M., Priyadharshini, D. A., Suresh, K., Saranya, G. M., Rajendran, K., & Kalaichelvan, P. T. (2012). Production, purification and characterization of α -amylase and alkaline protease by *Bacillus* sp. HPE 10 in a concomitant production medium. *Asian J. Plant Sci. Res*, 2(3), 376-382.
- Kunitz, M. (1947). Crystalline soybean trypsin inhibitor. *Journal of General Physiology*, 30(4), 291–310. doi:10.1085/jgp.30.4.291.
- Lakshmi, B.K.M., Kumar, D. M., & Hemalatha, K. P. J. (2018). Purification and characterization of alkaline protease with novel properties from *Bacillus cereus* strain S8. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), 295-304.

- Lee, D. W., Koh, Y. S., Kim, K. J., Kim, B.C., Choi, H. J., Kim, D. S., Suhartono, M. T., & Pyun, Y. R. (1999). Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiology Letters*, 179(2), 393-400.
- Lee, L.P., Karbul, H.M., Citartan, M., Gopinath, S.C.B., Lakshmi priya, T., & Tang, T.-H. (2015). Lipase-secreting *Bacillus* species in an oil-contaminated habitat: Promising strains to alleviate oil pollution. *Biomed Res. Int.*, 1–9.
- Li, J., & Liu, X. (2017). Identification and characterization of a novel thermophilic, organic solvent stable lipase of *Bacillus* from a hot spring. *Lipids*, 52(7), 619-627.
- Li, Q., Yi, L., Marek, P., & Iverson, B. L. (2013). Commercial proteases: present and future. *FEBS letters*, 587, 1155-1163.
- Lilburn, T.G., & Garrity, G.M. (2004). Exploring Prokaryotic Taxonomy, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54, 7-13.
- Lineweaver, H., & Burk, D. (1934). The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American chemical society*, 56(3), 658-666.
- Liu, Q., Sun, S., Piao, M., & Yang, J. Y. (2013). Purification and Characterization of a Protease Produced by a *Planomicrobium* sp. L-2 from Gut of Octopus vulgaris. *Preventive nutrition and food science*, 18(4), 273.
- Liu, X., Zhou, M., Xing, S., Wu, T., He, H., Bielicki, J. K., & Chen, J. (2022). Identification and biochemical characterization of a novel hormone-sensitive lipase family esterase Est19 from the Antarctic bacterium *Pseudomonas* sp. E2–15. *Biomolecules*, 11, 1552. <https://doi.org/10.3390/biom11111552>.
- Mahboob, S., Tahir, K., & Ali, S. (2022). A systematic overview on the upstreaming, downstreaming and industrial applications of microbial lipases. *International Journal of Biology and Biotechnology*, 19, 171–182.
- Maiangwa J, Ali M.S.M, Salleh A.B, Rahman R.N.Z.R, Shariff F.M, & Leow T.C., (2015). Adaptational properties and applications of cold-active lipases from psychrophilic bacteria. *Extremophiles*, 19 (2), 235–247.
- Mala, B.R., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., & Deshpande, V.S. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 68, 597-635.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., & Sambrook, J., 1982. Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, Newyork.

- Manni, L., Misbah, A., Zouine, N., & Ananou, S. (2020). Biochemical characterization of a novel alkaline and detergent stable protease from *Aeromonas veronii* OB3. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 48(3), 358-365. <http://dx.doi.org/10.4014/mb.1912.12015> pISSN 1598-642X eISSN 2234-7305.
- Massadeh, M. I., & Sabra, F. M. (2011). Production and characterization of lipase from *Bacillus stearothermophilus*. *African Journal of Biotechnology*, 10(61), 13139-13146. DOI: 10.5897/AJB11.1481 ISSN 1684-5315.
- Mazhar, H., Abbas, N., Ali, S., Sohail, A., Hussain, Z., & Ali, S. S. (2017). Optimized production of lipase from *Bacillus subtilis* PCSIRNL-39. *African Journal of Biotechnology*, 16(19), 1106-1115. 2017 DOI: 10.5897/AJB2017.15924.
- Medeiros, A., Rossi, S., Bier, M., Vandenberghe, L., & Soccol, C. (2014). Enzymes for flavor, dairy and Baking Industries. *Food Composition and Analysis*, 37-48. doi:10.1201/b16843-5.
- Mehta, A., Guleria, S., Sharma, R., & Gupta, R. (2021). The lipases and their applications with emphasis on food industry, in Microbial biotechnology in Food and Health. *Academic Press*, 143-164. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819813-1.00006-2>.
- Meier-Kolthoff, J. P., & Göker, M. 2019. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nature communications*, 10:1, 2182.
- Merheb-Dini, C., Gomes, E., Boscolo, M., & da Silva, R. (2010). Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. *Food Chemistry*, 120(1), 87-93.
- Mienda, B. S., Yahya, A., Galadima, I. A., & Shamsir, M. S. (2014). An overview of microbial proteases for industrial applications. *Res J Pharm Biol Chem Sci.*, 5(1), 388-396.
- Mirón, J., Vazquez, J., Gonzalez, P., & Murado, M. A. (2010). Enhancement glucose oxidase production by solid-state fermentation of *Aspergillus niger* on polyurethane foams using mussel processing wastewaters. *Enzyme Microbial Technology*, 46(1), 21-27. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.07.008>.
- Mohamed, Y. M., Ghazy, M. A., Sayed, A., Ouf, A., El-Dorry, H. & Siam, R. (2013). Isolation and characterization of a heavy metal-resistant, thermophilic esterase from a Red Sea brine pool. *Scientific Reports* 3, 3358-3366.
- Mølgaard, A., Kauppinen, S., & Larsen, S. (2000). Rhamnogalacturonan acetylsterase elucidates the structure and function of a new family of hydrolases. *Structure* 8, 373-383.

- Motyan, J.A., Toth, F., & Tozser, J. (2013). Research applications of proteolytic enzymes in molecular biology. *Biomolecules*, 3(4), 923-942.
- Moujehed, E., Zarai, Z., Khemir, H., Miled, N., Bchir, M.S., Gablin, C., Bessueille, F., Bonhommé, A., Leonard, D., & Carrière, F. (2022). Cleaner degreasing of sheepskins by the *Yarrowia lipolytica* LIP2 lipase as a chemical-free alternative in the leather industry. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 211, 112292.
- Mukhtar, H., & Ikram-ul-Haq. (2012). Concomitant production of two proteases and alpha-amylase by a novel strain of *Bacillus subtilis* in a microprocessor controlled bioreactor. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43, 1072-1079.
- Mushtaq, H., Ganai, S. A., Jehangir, A., Ganai, B. A., & Dar, R. (2023). Molecular and functional characterization of protease from psychrotrophic *Bacillus* sp. HM49 in North-western Himalaya. *PloS one*, 18(3), e0283677.
- Najafi, M. F., Deobagkar, D., & Deobagkar, D. (2005). Potential application of protease isolated from *Pseudomonas aeruginosa* PD100. *Electron. J. Biotechnol.*, 8, 79–85.
- Najm, T. A., & Walsh, M. K. (2022). Characterization of Lipases from *Geobacillus stearothermophilus* and *Anoxybacillus flavithermus* cell Lysates. *Food and Nutrition Sciences*, 13(3), 238-251.
- Naveed, M., Nadeem, F., Mehmood, T., Bilal, M., Anwar, Z., & Amjad, F. (2020). Protease—A Versatile and Ecofriendly Biocatalyst with Multi-Industrial Applications: An Updated Review. *Catalysis Letters*, 151(6).
- Ngo, T. D., Ryu, B. H., Ju, H. S., Jang, E. J., Park, K. S., Joo, S. B., Kim, K.K., & Kim, D. H. (2013). Crystal Structure of Est25 - a Bacterial Homolog of Hormone-Sensitive Lipase from a Metagenomic Library. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 69(9), 1726-1737. doi:10.1107/S0907444913013425.
- Niyonzima, F. N., & More, S. (2014). Biochemical properties of the alkaline lipase of *Bacillus flexus* XJU-1 and its detergent compatibility. *Biologia*, 69, 1108-1117.
- Niyonzima, F. N., & More, S. (2015). Detergent-compatible proteases: microbial production, properties, and stain removal analysis. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 45(3), 233-258.
- Niyonzima, F. N., & More, S. S. (2014). Concomitant production of detergent compatible enzymes by *Bacillus flexus* XJU-1. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45, 903-910.
- Niyonzima, F. N., & More, S. S. (2014). Detergent-compatible bacterial amylases. *Applied biochemistry and biotechnology*, 174, 1215-1232.

- Niyonzima, F. N., & More, S. S. (2015). Coproduction of detergent compatible bacterial enzymes and stain removal evaluation. *Journal of Basic Microbiology*, 55(10), 1149-1158.
- Niyonzima, F. N., (2019). Production of Microbial Industrial Enzymes. *Acta Scientific Microbiology*, 2(12), 75–89. doi:10.31080/asmi.2019.02.0434.
- Nur, N., Suwanto, A., Meryandini, A., Suhartono, M. T., Puspitasari, E., & Kim, H. K. (2023). Cloning and characterization of an acidic lipase from a lipolytic bacterium in tempeh. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 21(1), 157.
- Ogino, H., Nakagawa, S., Shinya, M. T., Fujimura, N., Yasuda, M., & Ishikawa, H. (2000). Purification and characterization of organic solvent-stable lipase from organic solvent-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* LST-03. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89(5), 451-457. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(00\)89095-7](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(00)89095-7).
- Olajuyigbe, F. M., & Falade, A. M. (2014). Purification and partial characterization of serine alkaline metalloprotease from *Bacillus brevis* MWB-01. *Bioresources and Bioprocessing*, 1(8), 1-10.
- Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., ... Goldman, A. (1992). The α/β hydrolase fold. *Protein Engineering, Design and Selection*, 5(3), 197–211. doi:10.1093/protein/5.3.197.
- Østerlund, T., Danielsson, B., Degerman, E., Contreras, J. A., Edgren, G., Davis, R. C., Schotz, M., & Holm, C. (1996). Domain-structure analysis of recombinant rat hormone-sensitive lipase. *Biochemical Journal*, 319(2), 411–420. doi:10.1042/bj3190411.
- Ottesen, M., & Rickert, W. (1970). The isolation and partial characterization of an acid protease produced by *Mucor miehei*. *C. R. Trav. Lab. Carlsberg*, 37, 301–325.
- Paranthaman, R., Alagusundram, K., & Indhumati, J. (2009). Production of proteases from rice mill wastes by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *World Journal of Agricultural Sciences*, 5, 308-312.
- Parc, A. L., Karav, S., Rouquié, C., Maga, E. A., Bunyatratchata, A., & Barile, D. (2017). Characterization of recombinant human lactoferrin N-glycans expressed in the milk of transgenic cows. *PLoS One*, 12(2), e0171477. DOI:10.1371/journal.pone.0171477.
- Patel, R., Trivedi, U., & Patel, K. C. (2022). Lipases: An efficient biocatalyst for biotechnological applications. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*, 11(5), e2498-e2498. <https://doi.org/10.55251/jmbfs.2498>.
- Pathak, A. P., & Deshmukh, K. B. (2012). Alkaline protease production, extraction and characterization from alkaliphilic *Bacillus licheniformis* KBDL4: a Lonar soda lake isolate. 50(8), 569–576.

- Prakasham, R.S., Subba, R. C. H., Sreenivas, R. R., Rajesham, S., & Sarma, P. N. (2005). Optimization of alkaline protease production by *Bacillus* sp using Taguchi methodology. *Appl Biochem Biotechnol.*, 120(2), 133–144.
- Priji, P., Sajith, S., Faisal, P. A., & Benjamin, S. (2016). Microbial lipases– properties and applications. *Journal of Microbiology and Biotechnology Food Science*, 6, 799–807. [https:// doi. org/ 10. 15414/ jmbfs. 2016.6. 2. 799- 807.](https://doi.org/10.15414/jmbfs.2016.6.2.799-807)
- Priji, P., Unni, K.N., Sajith, S., Binod, P., & Benjamin, S. (2015). Production, optimization, and partial purification of lipase from *Pseudomonas* sp. strain BUP6, a novel rumen bacterium characterized from Malabari goat. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 62(1), 71–78.
- Rahmer, R., & Heravi, K.M. (2015). Altenbuchner J. Construction of a super-competent *Bacillus subtilis* 168 using the PmtIA-comKS inducible cassette. *Front Microbiol.*, 6, 1431.
- Ramarethinam, S., Latha, K., & Rajalakshmi, N. (2002). Use of a fungal lipase for enhancement of aroma in black tea. *Food Sci. Technol. Res.*, 8, 328–332.
- Ramesh, A., Harani Devi, P., Chattopadhyay, S., & Kavitha, M. (2020). Commercial applications of microbial enzymes. *Microbial enzymes: roles and applications in industries*, 11, 137-184. . [https:// doi. org/ 10. 1007/ 978- 981- 15- 1710-5_6.](https://doi.org/10.1007/978-981-15-1710-5_6)
- Ramnath, L., Sithole, B. & Govinden, R. (2016). Classification of Lipolytic Enzymes and their Biotechnological Applications in the Pulping Industry. *Can. J. Microbiol.*, 63, 179–192. <https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0447>.
- Ramos-Sanchez, L.B., Cujilema-Quitio, M.C., Julian-Ricardo, M.C., Cordova, J., & Fickers, P., (2015). Fungal Lipase Production by Solid-State Fermentation. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 5(2), 203. [https://doi.org/ 10.4172/2155-9821.1000203.](https://doi.org/10.4172/2155-9821.1000203)
- Ramyasree, S., & Dutta, J.R. (2013). The effect of process parameters in enhancement of lipaseproduction by co-culture of lactic acid bacteria and their mutagenesis study. *Biocatal.Agric Biotechnol*, 2 (4), 393-398.
- Rani, K., Rana, R., & Datt, S. (2012). Review on Latest Overview of Proteases. *International Journal of Current Life Sciencs*, 2(1), 12– 18.
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998). Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology And Molecular Biology Rev.*, 62(3), 597–635.
- Rathi, P., Saxena, R., & Gupta, R. (2001). A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation. *Process Biochemistry*, 37, 187–192. [https:// doi. org/ 10. 1016/ S0032- 9592\(01\) 00200-X.](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00200-X)

- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., & Bateman, A. (2012). MEROPS: The database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.*, 40, 343–350.
- Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A., & Ashraf, M. (2019). Microbial Proteases Applications. *Frontier in Biyoengineering and Biotechnology*, 7 (110).
- Rekik, H., Jaouadi, N. Z., Gargouri, F., Bejar, W., Frikha, F., Jmal, N., Bejar, S., & Jaouadi, B. (2019). Production, purification and biochemical characterization of a novel detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus safensis* strain RH12. *International journal of biological macromolecules*, 121, 1227-1239.
- Rick, W., & Stegbauer, H. P. (1974). α -Amylase measurement of reducing groups. *In Methods of enzymatic analysis*, 885-890.
- Romsomsa, N., Chim-anagae, P., & Jangchud, A. (2010). Optimization of silk degumming protease production from *Bacillus subtilis* C4 using Plackett-Burman design and response surface methodology. *Sci Asia.*, 36, 118–124.
- Saeki, K., Ozaki, K., Kobayashi, T., & Ito, S. (2007). Detergent alkaline proteases: enzymatic properties, genes, and crystal structures. *J. Biosci. Bioeng.*, 103, 501–508.
- Safdar, A., Ismail, F., & Imran, M. (2023). Characterization of detergent-compatible lipases from *Candida albicans* and *Acremonium sclerotigenum* under solid-state fermentation. *ACS omega*, 8(36), 32740–32751. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c03644>.
- Sahu, G.K., & Martin, M. (2011). Optimization of growth conditions for the production of extracellular lipase by bacterial strains from dairy industry effluents. *Biotechnol. Bioinf. Bioeng.*, 1 (3), 305-311.
- Sambrook, J., Maccallum, P. ve Rusell, D., (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, NewYork.
- Saminathan, D., & Sriman Narayanan, J. (2015). Purification and characterization of blood stain decolorizing alkaline metalloprotease from *Bacillus subtilis* IAS 01 for promising bio-detergent. *Int J Recent Sci*, 6(3), 3010-3015.
- Sanchez, S., & Demain, A. L. (2011). Enzymes and bioconversions of industrial, pharmaceutical, and biotechnological significance. *Organic Process Research & Development*, 15(1), 224-230.
- Sangeetha, R., Geetha, A., & Arulpandi, I. (2010). Concomitant production, partial purification and characterization of a serine protease and a proteolysis-resistant metallolipase from *Bacillus pumilus* SG2. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 65(1-2), 61-65. <https://doi.org/10.1515/znc-2010-1-211>.

- Sangeetha, R., Geetha, A., & Arulpandi, I. (2010). Concomitant production of protease and lipase by *Bacillus licheniformis* VSG1: production, purification and characterization. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 179-185.
- Sangiliyandi, G., & Gunasekaran, P. (1996). Extracellular lipase producing *Bacillus licheniformis* from an oil mill refinery effluent. *Indian Journal Microbiology*, 36, 109-110.
- Santos Aguilar, D., Sato J.G., & Sato, H. H. (2018). Microbial proteases: production and application in obtaining protein hydrolysates. *Food Res Int.*, 103, 253–262.
- Saraswat, R., Verma, V., Sistla, S., & Bhushan, I. (2017). Evaluation of alkali and thermotolerant lipase from an indigenous isolated *Bacillus* strain for detergent formulation. *Electronic Journal of Biotechnology*, 30, 33-38.
- Sarmah, N., Revathi, D., Sheelu, G., Rani, K.Y., Sridhar, S., Mehtab, V., & Sumana, C. (2018). Recent advances on sources and industrial applications of lipases. *Biotechnology progress*, 34(1), 5-28. doi:10.1002/btpr.2581.
- Saun, N. K., Mehta, P., & Gupta, R. (2014). Purification and physicochemical properties of lipase from thermophilic *Bacillus aerius*. *Journal of oleo science*, 63(12), 1261-1268.
- Saxena, R., & Singh, R. (2014). Contemporaneous production of amylase and protease through CCD response surface methodology by newly isolated *Bacillus megaterium* strain B69. *Enzyme Research*, 2014, 1–12. doi:10.1155/2014/601046.
- Saygın H. (2019). *Karakum Çölü (Türkmenistan) Kültürlenebilir Aktinobakteri Biyoçeşitliliğinin Genoma Dayalı Polifazik Taksonomisi*, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Samsun.
- Schaeffer, P. (1969). Sporulation and the production of antibiotics, exoenzymes, and exotoxins. *Bacteriological reviews*, 33(1), 48-71.
- Schallmeyer, M., Singh, A., & Ward, O.P. (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can J Microbiol.*, 50, 1–17.
- Schoemaker, H. E., Mink, D., & Wubbolts, M. G. (2003). Dispelling the myths--biocatalysis in industrial synthesis. *Science*, 299(5613), 1694-1697.
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*. 30(14), 2068-2069.
- Sewalt, V., Shanahan, D., Gregg, L., La Marta, J., & Carrillo, R. (2016). The generally recognized as safe (GRAS) process for industrial microbial enzymes. *Industrial Biotechnology*, 12(5), 295-302.

- Seyed-Moslemi, S.A., Hesari, J., Peighambaroust, S.H., & Peighambaroust, S.J. (2021). Effect of microbial lipase and transglutaminase on the textural, physicochemical, and microbial parameters of fresh quark cheese. *J. Dairy Sci.*, 104, 7489–7499.
- Shakilanishi, S., & Shanthi, C. (2017). Specificity studies on proteases for dehairing in leather processing using decorin as model conjugated protein. *International journal of biological macromolecules*, 103, 1069-1076.
- Shams, N. B., Hanninen, L. A., & Kenyon, K. R. (1994). Increased gelatinolytic and caseinolytic activity in the thermally injured, nutritionally compromised rat cornea: detection of a 27-kDa lymphoreticular cell-associated caseinase. *Current eye research*, 13(1), 11-19.
- Shankar, S., Rao, M., & Laxman, R. S. (2011). Purification and characterization of an alkaline protease by a new strain of *Beauveria* sp. *Process Biochem.*, 46, 579–585.
- Sharma, A. K., Sharma, V., & Saxena, J. (2016). Review on applications of microbial lipases. *International Journal of Biotech Trends and Technology*, 6(4), 1-5.
- Sharma, M., Gat, Y., Arya, S., Kumar, V., Panghal, A., & Kumar, A. (2019). A Review on Microbial Alkaline Protease: An Essential Tool for Various Industrial Approaches. *Industrial Biotechnology*, 15 (2).
- Sharma, P., Sharma, N., Pathania, S., & Handa, S. (2017). Purification and characterization of lipase by *Bacillus methylotrophicus* PS3 under submerged fermentation and its application in detergent industry. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(2), 369-377.
- Sharma, S., & Kanwar, S. S. (2014). Organic solvent tolerant lipases and applications. *The Scientific World Journal*. <https://doi.org/10.1155/2014/625258>.
- Shart, A. O., & Elkhailil, E. A. (2020). Biochemical characterization of lipase produced by *Bacillus* spp. isolated from soil and oil effluent. *Advances in Enzyme Research*, 8(04), 39-48. <https://doi.org/10.4236/aer.2020.84004>.
- Shata, H. M. A. (2005). Extraction of milk-clotting enzyme produced by solid state fermentation of *Aspergillus oryzae*. *Polish Journal of Microbiology*, 54, 241–247.
- Shinmyo, A., Mitsushima, K., & Terui, G. (1972). Kinetic studies on enzyme production by microbes. IX. Some properties of auto-induction of acid protease in *Aspergillus niger*. *J. Ferment. Technol.*, 50, 647–654.
- Sielecki, A., Fujinaga, M., Read, R., & James, M. (1991). Refined structure of porcine pepsinogen at 1 · 8 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 219, 671–692.

- Singh, D., Sharma, D., Soni, S. L., Sharma, S., Sharma, P. K., & Jhalani, A. (2019). A review on feedstocks, production processes, and yield for different generations of biodiesel. *Fuel*, 262, 116553. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.116553>.
- Singh, R., Mittal, A., Kumar, M., & Mehta, P. K. (2016). Microbial Proteases in Commercial Applications. *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, 4(3), 365-374.
- Singh, S. K., Tripathi, V. R., & Garg, S. K. (2011). An oxidant, detergent and salt stable alkaline protease from *Bacillus cereus* SIU1. *African journal of Biotechnology*, 10(57), 12257-12261.
- Sinha, R., & Khare, S. K. (2012). Isolation of a halophilic *Virgibacillus* sp. EMB13: characterization of its protease for detergent application. 11, 416-426.
- Sodek, J., & Hofmann, T. (1970). Large-scale preparation and some properties of penicillopepsin, the acid proteinase of *Penicillium janthinellum*. *Can. J. Biochem.*, 48, 425-431.
- Souza, P. M. D., Bittencourt, M. L. D. A., Caprara, C. C., Freitas, M. D., Almeida, R. P. C. D., Silveira, D., ... & Magalhães, P. O. (2015). A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46, 337-346. doi:10.1590/s1517-838246220140359.
- Srilakshmi, J., Madhavi, J., & Ammani, K. (2014). Commercial potential of fungal protease: Past, present and future prospects. *Journal of Pharmaceutical Chemical and Biological Sciences*, 2, 218-234.
- Stackebrandt, E., & Ebers, J. (2006). Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol. Today*, 33, 152-155.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., Grimont, P. A., Kämpfer, P., Maiden, M.C.J., Nesme, X., Rossello-Mora, R., Swings, J., Trüper, H.G., Vauterin, L., Ward, A. C., Whitman, W. B. (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52(3), 1043-1047.
- Sumantha, A., Larroch, C., & Pandey, A. (2006). Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. *Food Technol Biotechnol.* 44, 211-220.
- Sundus, H., Mukhtar, H., & Nawaz, A. (2016). Industrial applications and production sources of serine alkaline proteases: a review. *Journal of Bacteriology & Mycology*, 3(1).
- Sztajer, H., Maliszewska, I., & Wieczorek, J. (1998). Production of exogenous lipase by bacteria, fungi and actinomycetes. *Enzyme Microbial Technology*, 10 (8), 492-497. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(88\)90027-0](https://doi.org/10.1016/0141-0229(88)90027-0).

- Szymczak, T., Cybulska, J., Podleśny, M., & Frąc, M. (2021). Various perspectives on microbial lipase production using agrifood waste and renewable products. *Agriculture*, 11, 540. <https://doi.org/10.3390/agriculture11060540>.
- Tan, J. S., Abbasiliasi, S., Ariff, A. B., Ng, H. S., Bakar, M. H. A., & Chow, Y. H. (2018). Extractive purification of recombinant thermostable lipase from fermentation broth of *Escherichia coli* using an aqueous polyethylene glycol impregnated resin system. *3 Biotech.*, 8(6), 1-7.
- Thakur, N., Goyal, M., Sharma, S., & Kumar, D. (2018). Proteases: Industrial Applications and Approaches used in Strain Improvement Biological Forum. *An International Journal*, 10(1), 158-167.
- Thapa, S., Li, H., OHair, J., Bhatti, S., Chen, F.C., Al Nasr, K., & Zhou, S. (2019). Biochemical Characteristics of Microbial Enzymes and Their Significance from Industrial Perspectives. *Molecul. Biotechnol.*, 1-23.
- Tian, J., Long, X., Tian, Y., & Shi, B. (2019). Eco-friendly enzymatic dehairing of goatskins utilizing a metalloprotease high-effectively expressed by *Bacillus subtilis* SCK6. *Journal of Cleaner Production*, 212, 647-654.
- Tripathi, R., Singh, J., kumar Bharti, R., & Thakur, I.S., (2014). Isolation, purification and characterization of lipase from *Microbacterium* sp. and its application in biodiesel production. *Energy Procedia.*, 54, 518-529.
- Tripathi, V. R., Kumar, S., & Garg, S. K. (2011). A study on trypsin, *Aspergillus flavus* and *Bacillus* sp. protease inhibitory activity in *Cassia tora* (L.) syn *Senna tora* (L.) Roxb. seed extract. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11(1), 1-8.
- Twining, S. S., Kirschner, S. E., Mahnke, L. A., & Frank, D. W. (1993). Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase, alkaline protease, and exotoxin A on corneal proteinases and proteins. *Investigative ophthalmology & visual science*, 34(9), 2699-2712.
- Ullah, N., Daud, M., Shabir, M., Özkan, T. & Qasim, M. (2015). Screening identification and characterization of lipase producing soil bacteria from upper dir and Mardan Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *Int. J. Biosci.*, 6, 49–55.
- Ullah, N., Rehman, M. U., Sarwar, A., Nadeem, M., Nelofer, R., Shakir, H. A., Irfan, M., Idrees, M., Naz, S., Nabi, G., Shah, S., Aziz, T., Alharbi, M., Alshammari, A., & Alqahtani, F. (2022). Purification, characterization, and application of alkaline protease enzyme from a locally isolated *Bacillus cereus* strain. *Fermentation*, 8(11), 628. <https://doi.org/10.3390/fermentation8110628>.
- URL-1. (2019, May 17). Joint Genome Institute. <https://genome.jgi.doe.gov/portal/>
- URL-2. (2019, May 17). National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

- Ülker, S., Özel, A., Çolak, A., & Karaoğlu, S. A. (2011). Isolation, production, and characterization of an extracellular lipase from *Trichoderma harzianum* isolated from soil. *Turk J. Biol.*, 35, 543–550.
- van Beilen, J. B., & Li, Z. (2002). Enzyme technology: an overview. *Current Opinion in biotechnology*, 13(4), 338–344.
- Vaquero, M. E., Barriuso, J., Martinez, M. J., & Prieto, A. (2016). Properties, structure, and applications of microbial sterol esterases. *Applied microbiology and biotechnology*, 100, (5), 2047–2061.
- Velooralappil, N. J., Robinson, B. S., Selvanesan, Sreedevi, S., Unni, K. N., Sajith S., Priji, P., & Josh, M. S., Benjamin, S. (2013). Versatility of microbial proteases. *Adv Enzyme Res.*, 1(3), 1–13.
- Verma, M. L., & Kanwar, S. S. (2008) Properties and application of poly(methacrylic acid-co-dodecyl-methacrylate-cl-N,N-methylene bisacrylamide) hydrogel immobilized *Bacillus cereus* MTCC 8372 lipase for the synthesis of geranyl acetate. *Journal of Applied Polymer Science*, 110 (2), 837–846. <https://doi.org/10.1002/app.28539>.
- Vranova V, Rejsek, K., & Formanek, P. (2013). Proteolytic activity in soil: A review. *Appl Soil Ecol.*, 70, 23–32.
- Wahab, W. A. A., & Ahmed, S. A. (2017). Response surface methodology for production, characterization and application of solvent, salt and alkali-tolerant alkaline protease from isolated fungal strain *Aspergillus niger* WA. *Int J Biol Macromol.* 115, 447–458.
- Wang, Y., Aziz, T., Hu, G., Liu, J., Min, Z., Zhennai, Y., Alharbi, M., Alshammari, A., & Alasmari, A. F. (2023). Production, purification, and characterization of a novel milk-clotting metalloproteinase produced by *Bacillus velezensis* YH-1 isolated from traditional Jiuqu. *Food Science and Technology*, 184, 115080.
- Wattam, A. R., Davis, J. J., Assaf, R., Boisvert, S., Brettin, T., Bun, C., Conrad, N., Dietrich, E.M., Disz, T., Gabbard, J.L., Gerdes, S., Henry, C.S., Kenyon, R.W., Machi, D., Mao, C., Nordberg, E.K., Olsen, G.J., Murphy-Olson, D.E., Olson, R., Overbeek, R., Parrello, B., Pusch, G.D., Shukla, M., Vonstein, V., Warren, A., Xia, F., Yoo, H., & Stevens, R. L. (2017). Improvements to PATRIC, the all-bacterial bioinformatics database and analysis resource center. *Nucleic acids research*, 45(D1), D535–D542.
- Yao, C., Yuan, A., Zhang, H., Li, B., Liu, J., Xi, F., & Dong, X. (2019). Facile surface modification of textiles with photocatalytic carbon nitride nanosheets and the excellent performance for self-cleaning and degradation of gaseous formaldehyde. *J. Colloid Interface Sci.*, 533, 144–153.
- Yasar, G., Gulhan, U. G., Guduk, E., & Aktas, F. (2020). Screening, partial purification and characterization of the hyper-thermophilic lipase produced by a new isolate of *Bacillus subtilis* LP2. *Biocatalysis and Biotransformation*, 38(5), 367–375. <https://doi.org/10.1080/10242422.2020.1751829>.

- Yongquan, L. (2001). Sheep-pelt bating with acid protease. *J. Am. Leather Chem. Assoc.*, 96, 398–400.
- Zambare, V., Nilegaonkar, S., & Kanekar, P. (2011). A novel extracellular protease from *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327: enzyme production and its partial characterization. *New biotechnology*, 28(2), 173-181.
- Zeren B. (2020). *Yeni İzolat Bacillus Subtilis E6-5 Suşundan Proteaz: Üretim Koşullarının Optimizasyonu, Kısmi Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Deri Endüstrisindeki Potansiyel Uygulamaları*, Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Bursa.
- Zhang, G., Wang, H., Zhang, X., & Ng, T. (2010). Helvellisin, a novel alkaline protease from the wild ascomycete mushroom *Helvella lacunosa*. *J. Biosci. Bioeng.*, 109, 20–24.
- Zhang, Y., Wang, J., He, J., Liu, X., Sun, J., Song, X., & Wu, Y. (2023). Characteristics and application in cheese making of newly isolated milk-clotting enzyme from *Bacillus megaterium* LY114. *Food Research International*, 172, 113202.
- Zhang, Z., Hao, H., Tang, Z., Zou, Z., Zhang, K., Xie, Z., Babe, L., Goedegebuur, F., & Gu, X. (2015). Identification and characterization of a new alkaline thermolysin-like protease, BtsTLP1, from *Bacillus thuringiensis* Serovar *Sichuansis* strain MC28. *Journal of microbiology and biotechnology*, 25(8), 1281-1290.
- Zhao, J., Liu, S., Gao, Y., Ma, M., Yan, X., Cheng, D., Wan, D., Zeng, Z., Yu, P., & Gong, D. (2021). Characterization of a novel lipase from *Bacillus licheniformis* NCU CS-5 for applications in detergent industry and biodegradation of 2,4-D butyl ester. *International Journal of Biological Macromolecules*, 176, 126–136. [https:// doi. org/ 10. 1016/j. ijbio mac. 2021. 01. 214](https://doi.org/10.1016/j.ijbio mac.2021.01.214).
- Zhou, C., Qin, H., Chen, X., Zhang, Y., Xue, Y., & Ma, Y. (2018). A novel alkaline protease from alkaliphilic *Idiomarina* sp. C9-1 with potential application for eco-friendly enzymatic dehairing in the leather industry. *Scientific reports*, 8(1), 16467. DOI:10.1038/s41598-018-34416-5.

8. EKLER

Ek-1. 2NP6 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

ATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTC
GAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTG
GGTAACCTGCCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATT
TTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCG
TCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAG
AGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAG
GGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTT
CGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTG
ACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT
GGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGAT
GTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAG
AGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGG
CGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG
ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGC
CCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGA
AACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCA
ACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCT
TCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT
TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTACAGTTGGGCACTCTAA
GGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTA
TGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGG
AGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGC
TGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACA
CACCGCCCGTCACACACGGTACCAT

Ek-2. *Bacillus pacificus* Proteaz Geninin Baz Dizisi

ATGGATCAGTTATTTAGATACCCGTTGCACCAAATTCCTTTGGTAGCAATGGCCATTATTA
 TCGCATTATCAGTGCATGAATTTGCGCATGCAATGGATGTAGCATATAAAATTTGGGGACGA
 TACAGCAAAGAGACAAGGGCGTTTAACGTTATCACCGATGGCTCATTTAGACCCTATAGGT
 TTAATTGCAGTATTAATTCTTGGATTTGGTTGGGCAAGACCGGTTTCCTGTAAACCCATATA
 ACTTTAAAAGACCGCGTCTTGCAGGTATATTAGTTTCAATTGCAGGGCCGATTAGTAACTT
 AATTTTAAGCGCAATCGGTTTAATTATTTGGTATAGCTTATTAACATTTGGTGTATTATAC
 TCAATTCCATCTGCAGTAGCAGATACGTTAGCTCAATTTTTCCAGATTTTTATTATGCTGA
 ATATCGTTTTACTTGTATTTAACTTATTACCGATCCCGCCACTTGATGGGTATCGCGTAGT
 GGAAGATTTAGCACCAGCAAATATTCGCGCGAAAATGACACAGTATGAAAAATACGGGGCA
 ATTGCGTTATTAATTCTCGTTATTACACCTCTTAGTAATTACACAATTCAACCTATTTTCC
 AGGTAGTTATTCCGCATGTATTTGTATTTTGTAGATAGCATCATTGCGCCTATTTTTGGCCT
 TGTATAA

***Bacillus pacificus* Proteazının Amino asit Dizisi**

MDQLFRYPLHQIPLVAMAI I I I A L S V H E F A H A Y V A Y K F G D D T A K R Q G R L T L S P M A H L D P I G L
 I A V L I L G F G W A R P V P V N P Y N F K R P R L A G I L V S I A G P I S N L I L S A I G L I I W Y S L L T F G V L Y S
 I P S A V A D T L A Q F F Q I F I M L N I V L L V F N L L P I P P L D G Y R V V E D L A P A N I R A K M T Q Y E K Y G A I
 A L L I L V I T P L S N Y T I Q P I F Q V V I P H V F V F L D S I I A P I F G L V

Ek-3. *Bacillus pacificus* Lipaz Geninin Baz Dizisi

ATGAAAAAAGTCATCTTAACAATTGTTTGTCTCCTCCTTCTAATCATTTCTTATTCTTATT
 TTGAAAAGAACGATGAGACAAAACAAAATGAACCCGAAGAAAAAACAGAAAAACATCTAC
 TCCAAGTTGGATTGATAAGCAAACAAACGATTCCTTCTATCATCTCGTACTAGGTGATTG
 CTCGCCAAAGGATATGGATCGACACAAGGTGGATTGCTGAATTAGCCTCTAAACAAATAG
 AAGCACAAATTCATAAACCAATTACTGTAGAAAACCTTGGGATAAACGGTCTTACAACCGA
 TCGTCTCGCTAAAAAGGTTGACTCAGAAGATGTAAAGCAAAAATTAGAGCAGCCAATATT
 ATTACAATTAACATTGGGGGAAATAATTTGTTTCGCTTAAATCGTGATGTCGGTGTTATAG
 ACGGTATTAAAATGTTAAATAAAGAAAAAGCTCATTTTGAAGCGGATGTAAAAATATTGT
 AAAGACAGTCCGAGATCAAAATCCGGATGCTTTACTCATTTCTTCTGAACCTTTATAACCCG
 TTACAACTCGATGACTCCATCGCAAGTTATGCAGATATGTTTTTAGATGGCTGGAATGAAT
 CCGTTTATTCCATTGCAAAGCGAATCAACCATCTATCGTTTTGCCAATTCGTAAATTAAT
 ATCGAATGATAAAAAAGAATTGCTCTTTGACCAAGTACACCCAAATGATAAAGGCTATACG
 ATTATTGCCGATTCCTTTACAAAAAAGTGTTGGCCTACAAATATTAA

***Bacillus pacificus* Lipazının Amino asit Dizisi**

MKKVILTIVCLLLLIISYSYFEKNDKQNEPEEKTEKTSTPSWIDKQTNDSFYHLVLGDS
 LAKGYGSTQGGFAELASKQIEAQIHKPITVENLGLINGLTDRDLAKKVDSEDKQKIRAANI
 ITINIGGNNLFRNLNRDVGVIDGIKMLNKEKAHFEADVKNIVKTVRDQNPDALLLISELYNP
 LQLDDSIASYADMFLDGWNEVYSIAKANQPSIVLPIRKLI SNDKKELLEDQVHPNDKGYT
 IIADSFTKKVLAYKY

ÖZGEÇMİŞ

Meral BELDÜZ KOLCU, ilköğrenimini Trabzon 100. Yıl İlköğretim Okulunda, Orta öğrenimini Trabzon Cumhuriyet İlköğretim Okulunda ve Lise öğrenimini Trabzon Lisesinde (YDA) tamamladıktan sonra 2004-2005 öğretim yılında Erzurum Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde Lisans öğrenimine başladı. 2008 yılında bu bölümden mezun oldu. Aynı yıl Trabzon K.T.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı. 2012 yılında “*Aneurinibacillus* sp. PDF24’ten termal kararlı yeni bir karboksilesterazın karakterizasyonu” başlıklı yüksek lisans tezini sunmasının ardından doktora eğitimine başladı. 2013 yılından itibaren Avrasya Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu’nda öğretim görevlisi olarak görev yapmaktadır. İyi derece İngilizce bilmektedir. Evli ve bir kız çocuğu vardır.

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

1. Gökmenoglu, C., Beldüz Kara, N., Beldüz M., Kamburoglu, A., Tosun, İ., Sadık, E., Kara, M. C., (2018). Evaluation of *Candida albicans* biofilm formation on various parts of implant material surfaces. *Nigerian journal of clinical practice*, 21(1), 33-37.
2. Beldüz Kara, N., Kamburoglu, A., Yılmaz, Y., Tosun, İ., Beldüz Kolcu M., Kara M. C., (2018). Evaluation of *Candida albicans* biofilm formation on various dental restorative material surfaces. *Nigerian Journal of Clinical Practice*, 20(3), 355.
3. Beldüz Kara, N., Selamet, H., Benkli Y. A., Beldüz Kolcu M., Gökmenoglu C., Kara M. C., (2020). Laser Therapy Induces Increased Viability and Proliferation in Isolated Fibroblast Cells. *Wounds-A Compendium of Clinical Research And Practice*, 32(3), 69-73.

Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

1. Beldüz Kolcu M., Ay Şal F., Çanakçı S., Beldüz A. O., (2022). Characterization of a New Thermostable Carboxylesterase from *Aneurinibacillus* sp. PDF24. *Sakarya University Journal of Science*, 26(5), 1956-1966., Doi: 10.16984/soaufenbilder.1074637.