

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

Nihan ARABACI

***Bacillus* sp. SUŞLARINDAN İZOLE EDİLEN ASİDİK, ALKALİ,
TERMOSTABİL AMİLAZ VE PULLULANAZ
ENZİMLERİNİN ÜRETİMİ, KARAKTERİZASYONU VE
BİYOTEKNOLOJİK KULLANIM OLANAKLARININ
ARAŞTIRILMASI**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2018

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Bacillus* sp. SUŞLARINDAN İZOLE EDİLEN ASİDİK, ALKALİ,
TERMOSTABİL AMİLAZ VE PULLULANAZ ENZİMLERİNİN ÜRETİMİ,
KARAKTERİZASYONU VE BİYOTEKNOLOJİK KULLANIM
OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI**

Nihan ARABACI

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez 18/01/2018 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu İle Kabul Edilmiştir.

.....
Prof. Dr. Burhan ARIKAN
DANIŞMAN

.....
Prof. Dr. Kadir AYDIN
ÜYE

.....
Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
ÜYE

.....
Prof. Dr. Cumhuri ÇÖKMÜŞ
ÜYE

.....
Doç. Dr. Ashabil AYGAN
ÜYE

Bu tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

**Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü**

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: FDK-2014-2393) ve TÜBİTAK BİDEB (2211-C) tarafından desteklenmiştir.

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

ÖZ

DOKTORA TEZİ

***Bacillus* sp. SUŞLARINDAN İZOLE EDİLEN ASİDİK, ALKALİ, TERMOSTABİL AMİLAZ VE PULLULANAZ ENZİMLERİNİN ÜRETİMİ, KARAKTERİZASYONU VE BİYOTEKNOLOJİK KULLANIM OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI**

Nihan ARABACI

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Danışman : Prof. Dr. Burhan ARIKAN
Yıl : 2018, Sayfa : 231
Jüri : Prof. Dr. Burhan ARIKAN
Prof. Dr. Kadir AYDIN
Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
Prof. Dr. Cumhuri ÇÖKMÜŞ
Doç. Dr. Ashabil AYGAN

Bu çalışmada, topraktan izole edilen nötral *Aeribacillus pallidus* NA1 suşundan alkali amilaz, asidik *Geobacillus lituanicus* NA2 suşundan asidik amilaz, nötral *Geobacillus thermoleovorans* NP1 suşundan asidik pullulanaz ve asidik *Anoxybacillus rupiensis* NP2 suşundan alkali pullulanaz elde edilmiş ve karakterize edilmiştir. Bu amaçla, enzimlerin optimum sıcaklık ve pH değerleri, sıcaklık ve pH stabiliteleri, çeşitli kimyasalların enzim aktiviteleri üzerine etkileri belirlenmiş, SDS-PAGE zimogram ve ince tabaka kromatografisi (TLC) analizleri gerçekleştirilmiştir.

NA1, NA2, NP1 ve NP2 enzimlerinin optimum aktivite gösterdikleri pH değerleri, sırasıyla, 9.0, 4.0, 6.0 ve 9.0'dur. Optimum aktivite sıcaklıkları, sırasıyla, 50, 60, 50 ve 60°C olan enzimler termofil özelliktedir. NA2 asidik amilaz ve NP2 alkali pullulanaz, nişasta ve pullulanı hidrolize ederek son ürün olarak glukoz, maltoz ve maltotrioz açığa çıkarmışlardır. Bütün enzimler, %30 konsantrasyona kadarki nişastayı ortalama %90 düzeyinde sıvılaştırmıştır. NA1 alkali amilaz ile BriX sisteminde %19 glikoz değeri elde edilmiştir. NA1 alkali amilaz 165 kDa, NA2 asidik amilaz 200 kDa ve NP2 alkali pullulanaz 113 kDa'dur. NP1 asidik pullulanaz, zimogram analizinde 112 ve 107 kDa'luk iki aktivite bandı göstermiştir. NA2 asidik amilaz ve %1 deterjan karışımı yemek sosu, bebek maması ve çikolata lekeleri üzerinde %100 performans göstermiştir.

İzole edilen enzimler nişastanın sıvılaştırılması, biyoetanol üretimi ve deterjan endüstrisi başta olmak üzere, çeşitli biyoteknolojik ve endüstriyel uygulamalarda kullanımları açısından yüksek potansiyele sahiptir.

Anahtar Kelimeler: Amilaz, Amilopullulanaz, Asidik, Alkali, Termofilik

ABSTRACT

PhD THESIS

**THE INVESTIGATION OF THE PRODUCTION, CHARACTERIZATION AND
BIOTECHNOLOGICAL USAGE POSSIBILITIES OF THE ACIDIC,
ALKALINE, THERMOSTABLE AMYLASE AND PULLULANASE ENZYMES
ISOLATED FROM *Bacillus* sp.**

Nihan ARABACI

**UNIVERSITY OF ÇUKUROVA
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOLOGY**

Supervisor : Prof. Dr. Burhan ARIKAN
Year : 2018, Pages : 231
Jury : Prof. Dr. Burhan ARIKAN
Prof. Dr. Kadir AYDIN
Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
Prof. Dr. Cumhur ÇÖKMÜŞ
Assoc. Prof. Dr. Ashabil AYGAN

In this study, the production and characterization of an alkaline amylase from neutral strain *Aeribacillus pallidus* NA1, an acidic amylase from acidic strain *Geobacillus lituanicus* NA2, an acidic pullulanase from neutral strain *Geobacillus thermoleovorans* NP1 and an alkaline pullulanase from acidic *Anoxybacillus rupiensis* NP2 isolated from soil were performed. For this purpose, the analyzes of optimum temperature and pH values, the temperature and pH stabilities, and the effects of various chemicals on enzyme activities were determined, the SDS-PAGE/zymogram and thin layer chromatography (TLC) analyzes were done.

The optimum pH values of NA1, NA2, NP1, and NP2 are 9.0, 4.0, 6.0 ve 9.0, respectively. The optimum temperature values of the enzymes are 50, 60, 50, and 60°C, respectively. And all the enzymes are thermophilic. NA2 acidic amylase and NP2 alkaline pullulanase hydrolyzed starch and pullulan to glucose, maltose and maltotriose, as final products. The enzymes are α -amylase and amylopullulanase. All the enzymes liquefied the starch at an average of 90% up to 30% concentration of starch. And 19% BriX value was obtained by the liquefaction of the starch by NA1 alkaline amylase. The molecular weight of NA1 is 165 kDa, NA2 is 200 kDa and the NP2 enzyme is 113 kDa in size. The NP1 enzyme showed two activity bands with molecular weights of 112 and 107 kDa in zymogram analysis. The mixture of NA2 enzyme and 1% detergent showed 100% performance on the removal of foodstuff, baby food and chocolate stains.

The isolated enzymes have a high potential for their usage in a variety of biotechnological and industrial applications, particularly in the liquefaction of starch, bioethanol production and the detergent industry.

Key Words: Amylase, Amylopullulanase, Acidic, Alkaline, Thermophilic

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Amilaz ve pullulanaz enzimlerinin üretimini gerçekleştirecek olan asidik ve nötral termofil *Bacillus* sp. suşlarının izolasyonu için çeşitli toprak örnekleri pH'sı 5.0 ve 7.0 olan sıvı besiyerlerinde, 55° C'de inkübe edilmiştir. 80° C'de 10 dakika süreyle ısı şoku uygulandıktan sonra inkübasyona bırakılan örnekler pH'sı 5.0 ve 7.0 olan N1 agar besiyerlerine aşılanmıştır. Katı besi yerinde üreyen karakteristik *Bacillus* koloni morfolojisi görünümüne sahip bakteriler seçilmiştir ve stoklanmıştır.

Bacillus sp. olduğu düşünülen bu suşlar, pH'sı 5.0 ve 7.0 olan M9 nişastalı ve pullulanlı katı besiyerlerine ayrı ayrı ekildikten sonra 55° C'lik etüvde 72 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. En yüksek amilaz ve pullulanaz aktivite zonunu oluşturan suşlar seçilmiştir. Bakterilerin tanımlanmaları için gram boyama, spor boyama, katalaz aktivitesi gibi bazı biyokimyasal testler ve 16S rRNA moleküler tanımlama analizi ile suşların identifikasyonu yapılmıştır. Tanımlama sonucuna göre, alkali amilaz üreticisi nötral suş *Aeribacillus pallidus* NA1, asidik amilaz üreticisi asidik suş *Geobacillus lituanicus* NA2, asidik pullulanaz üreticisi nötral suş *Geobacillus thermoleovorans* NP1 ve alkali pullulanaz üreticisi asidik suş *Anoxybacillus rupiensis* NP2 olarak tanımlanmış ve NCBI veritabanına suşların kayıtları yapılmıştır.

Bakterilerin en iyi üredikleri ve amilaz ile pullulanaz sentezledikleri pH ve sıcaklık aralıklarını belirlemek amacıyla, suşlar pH'ı 5.0-9.0 olan nişastalı ve pullulanlı katı ve sıvı besiyerlerine ekilerek, 30-72 saat süreyle inkübe edilmişlerdir. Bulgulara göre, *Aeribacillus pallidus* NA1 suşu pH 7.0'de ve 45° C'de, *Geobacillus lituanicus* NA2 suşu pH 5.0'te ve 55° C'de, *Geobacillus thermoleovorans* NP1 suşu pH 7.0'de ve 45° C'de, *Geobacillus thermoleovorans* NP1 suşu pH 5.0'te ve 55° C'de en iyi üreme ve enzim sentezleme davranışını göstermiştir.

Bakterilerin en iyi üreme ve enzim sentezini gerçekleştirdikleri sürelerinin belirlenmesi için, suşlar optimum aktivite gösterdikleri pH değerlerine sahip substratlı besiyerlerine aşılandıktan sonra optimum üreme sıcaklıklarında inkübasyona bırakılmışlardır. Inkübasyon sırasında 0., 12., 24., 36., 48., 60., 72., 84. ve 96. saatlerde alınan örneklerle yapılan aktivite analizleri sonucunda NA1, NA2, NP1 ve NP2 suşlarının optimum inkübasyon sürelerinin, sırasıyla 60., 48., 24. ve 48. inkübasyon saatleri olduğu tespit edilmiştir.

Belirlenen optimum koşullarda enzim üretimi gerçekleştirilmiş ve elde edilen süpernatant ham enzim kaynağı olarak karakterizasyon, yıkama performansı ve nişasta sıvılaştırma analizlerinde kullanılmıştır. NA1 alkali amilaz enzimi 12063 U/mL, NA2 asidik amilaz enzimi 4604 U/mL aktiviteye sahip iken, NP1 asidik pullulanaz enzimi 2105 U/mL ve NP2 alkali pullulanaz enzimi 1867 U/mL aktivite göstermiştir. NA1 alkali amilaz enziminin protein miktarı 6.2 µg/mL, NA2 asidik amilaz enzimininki 3 µg/mL, NP1 asidik pullulanaz enzimininki 5 µg/mL ve NP2 alkali pullulanaz enzimininki de 5.6 µg/mL bulunmuştur.

Enzimleri optimum pH ve sıcaklık değerleri, NA1 alkali amilaz enzimi için pH 9.0 ve 50° C, NA2 asidik amilaz enzimi için pH 4.0 ve 60° C, NP1 asidik pullulanaz enzimi için pH 6.0 ve 50° C ve NP2 alkali pullulanaz enzimi için pH 9.0 ve 60° C bulunmuştur. Bütün enzimlerin pH 3.0-12.0 ve 30-100° C aralıklarında oldukça yüksek oranlarda stabil kaldığı belirlenmiştir.

Enzimler, PMSF, EDTA, CaCl₂, MgCl₂, CuCl₂, ZnCl₂, BaCl₂, MnCl₂, CoCl₂ ve HgCl₂ (her biri 5 mM ve 10 mM), 4M ve 8M üre, SDS, TritonX-100, Tween 20, Tween 80, β-Merkaptoetanol ve H₂O₂ (her biri %1 ve %5) kimyasallarının iki farklı konsantrasyonuyla 1 saat süreyle ön inkübasyona bırakılmıştır ve standart aktivite analizleri gerçekleştirilmiştir. NA1 alkali amilaz, 5 mM CaCl₂ de %96, 10 mM'da %93.4 kalan aktiviteye sahipken, 5 mM PMSF ile muamele edildiğinde %99.1, 10 mM'da %94.4 stabil kalmıştır. Enzim aktivitesi 5 mM EDTA ile %105.2, 10 mM ile % 92.3 korunmuştur. NA1 alkali amilaz, orijinal aktivitesini

%1 SDS ile %93.3, %5'lik SDS'de %49 korumuştur. NA2 asidik amilaz, $MgCl_2$, $CuCl_2$, $ZnCl_2$, $BaCl_2$, $CoCl_2$ ve $HgCl_2$ 'nin 5 ve 10 mM konsantrasyonlarında yüksek oranda stabil kalmıştır. NA2 asidik amilaz, SDS, TritonX-100, Tween 20 ve Tween 80'in %1 ve %5'lik konsantrasyonlarında, sırasıyla, %82.4 ve %83.1, %80.2, %88, %89.3, %89.4, %94.2 ve %94.4 stabil kalmıştır.

NP1 asidik pullulanaz enzimi, 5 mM $CaCl_2$ ile aktivitesini %96.4, 10 mM $CaCl_2$ ile %100 korumuştur. Enzim 5 mM EDTA ile %92, 10 mM EDTA ile %101.3 aktivite göstermiştir. %1 SDS ile aktivitesinin %51'ini korurken, %5 SDS enzimin aktivitesini %86.3'e yükselmiştir. NP1 asidik pullulanazın aktivitesi %1 H_2O_2 ile %80.7 inhibe olurken, %5 H_2O_2 ile muamele sonucunda tamamen kaybolmuştur.

NP2 alkali pullulanazın aktivitesi, 5 mM PMSF ile %70 artarken, 10 mM PMSF ile enzimin başlangıç aktivitesinin %96.4'ünü koruduğu görülmüştür. Enzim, SDS, TritonX-100, Tween 20 ve Tween 80 kimyasallarının %1 ve %5'lik konsantrasyonlarında aktivitesini, sırasıyla, %83.1 ve %63, %185.2 ve %111.4, %182 ve %91, %172 ve %87.3 korumuştur.

NA1 alkali amilaz enzimi en yüksek aktiviteyi %5'lik NaCl'de %58 oranında, bütün tuz konsantrasyonlarında ise ortalama %51.5 düzeyinde göstermiştir. NA2 asidik amilaz, en yüksek aktiviteyi %10 NaCl konsantrasyonunda %58 ve tüm konsantrasyonlarda ortalama %48 oranında göstermiştir. NP1 asidik pullulanaz, %10'luk NaCl ile %50, bütün konsantrasyonlarda ortalama %48.5 aktivite göstermiştir. NP2 alkali pullulanaz ise %10 NaCl'de %50 aktiviteye sahipken, tüm tuz konsantrasyonlarında ortalama %48 aktivite gösterdiği bulunmuştur.

İnce tabaka kromatografisi (TLC) analizinde, 24 saatlik inkübasyondan sonra nişasta ve pullulan NA1 alkali amilaz enzimi ile glukoza kadar tamamen hidrolize edilirken, NA2 asidik amilazın nişastayı ve pullulanı maltoz, maltotrioz ve diğer oligosakkaritlere kadar hidrolize ettiği bulunmuştur. NP1 asidik ve NP2

alkali pullulanaz enzimlerinin, pullulanı ve nişastayı glukoz, maltoz, maltotrioz ve maltoz türevi diğer olisakkaritlere kadar hidrolize ettikleri tespit edilmiştir.

SDS-PAGE zimogram analizleri ile belirlenen moleküler ağırlıklar, NA1 alkali amilaz için 165 kDa, NA2 asidik amilaz için 200 kDa, NP1 asidik pullulanaz için 112 kDa ve 107 kDa, NP2 alkali pullulanaz için 113 kDa'dur.

Enzimlerin yıkama performansları, yemek sosu, bebek maması ve çikolata kirliliği ile analiz edilmiştir. %1 deterjan ile enzim karışımının bütün örneklerde %100'e yakın leke giderim başarısı gösterdiği saptanmıştır.

Nişasta sıvılaştırma denemeleri, 4 mL %5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ve 50 nişasta ve 1 mL enzim karışımlarının, enzimlerin optimum sıcaklıklarında 2 saat süreyle inkübasyonu ile gerçekleştirilmiştir. NA1 alkali amilaz %5-30 nişasta konsantrasyonlarında ortalama %87.5, NA2 asidik amilaz %5-25 nişasta konsantrasyonlarında %87, NP1 asidik pullulanaz %5-30 konsantrasyonlarında %90 ve NP2 alkali pullulanaz %5-30 konsantrasyonlarında yaklaşık %89.2 oranında nişastayı sıvılaştırmışlardır.

Nişasta sıvılaştırma ve TLC hidroliz analizlerinin bulguları, enzimlerin α -amilaz ve amilopullulanaz (Tip II pullulanaz) grubuna dahil olduklarını göstermektedir.

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim süresince bilgi ve tecrübeleriyle bana rehber olan, ilgi ve desteğini her zaman hissettiğim danışman hocam Sayın Prof. Dr. Burhan ARIKAN'a müteşekkir olduğumu bildirir, saygılarımı sunarım.

Doktora tez izleme komitemde yer alan Sayın Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ'e ve Sayın Prof. Dr. Kadir AYDIN'a katkılarından dolayı saygı ve şükranlarımı sunarım.

Doktora tez çalışmalarım süresince bana destek olan tüm mesai arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca yanımda olan, varlıklarını ve desteklerini her an kalbimde hissettiğim ve bu tezimi ithaf ettiğim sevgili annem Ayşegül ARABACI'ya, babam Muharrem ARABACI'ya ve kardeşim Vehbican ARABACI'ya sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

“2211-C Yurtiçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı” kapsamında tezimi destekleyen ve burs imkanı sağlayan TÜBİTAK Bilim İnsanı Desteleme Daire Başkanlığı'na (BİDEB) teşekkürlerimi sunarım.

Nihan ARABACI

Ocak, 2018

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	IV
TEŞEKKÜR.....	VII
İÇİNDEKİLER	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	XVI
ŞEKİLLER DİZİNİ	XVIII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XXIV
1. GİRİŞ	1
1.1. Enzimler.....	2
1.2. Mikrobiyal Enzimler.....	6
1.3. Termofilik Enzimler	7
1.4. Nişastanın Hidrolizinde Görev Alan Enzimler	8
1.4.1. Endoamilazlar (Endo-acting)	10
1.4.2. Ekzoamilazlar (Exo-acting)	11
1.4.3. Transferazlar	11
1.4.4. Dallanmış Yapıları Hidrolize Eden Enzimler (Debranching)	11
1.4.4.1. İndirekt Dallanmış Yapıları Hidrolize Eden Enzimler	11
1.4.4.2. Direkt Dallanmış Yapıları Hidrolize Eden Enzimler	12
1.5. Amilazlar	12
1.5.1. α -amilaz (EC 3.2.1.1).....	13
1.5.2. β -amilaz (EC 3.2.1.2).....	14
1.5.3. γ -amilaz (EC 3.2.1.3)	14
1.6. Nişasta.....	14
1.7. Amilazların Uygulama Alanları.....	17
1.7.1. Nişastanın Sıvılaştırılması.....	17

1.7.2. Fruktöz Şurubu ve Maltoz Üretimi	17
1.7.3. Oligosakkarit Karışımının Üretimi.....	18
1.7.4. Maltotetroz Şurubu Üretimi	18
1.7.5. Tekstilde Nişastanın Giderimi	18
1.7.6. Gıda Endüstrisi.....	19
1.7.7. Biyoetanol Endüstrisi	19
1.7.8. Kâğıt Hamuru ve Kâğıt Endüstrisi	20
1.7.9. Deterjan Endüstrisi.....	20
1.7.10. Nişasta İşleme Tesislerinin Atık Suyunun Arıtılması	21
1.8. Pullulanazlar	21
1.8.1. Tip I Pullulanaz (Pullulan α -1,6-glukanohidrolaz, α -dekstrin endo- 1,6-glukanohidrolaz, EC 3.2.1.41).....	21
1.8.2. Tip II Pullulanaz (Amilopullulanaz/ α -amilaz-pullulanaz, EC 3.2.1.1/EC 3.1.2.41).....	22
1.8.3. Tip I Pullulan Hidrolaz (Neopullulanaz, Pullulan-4-D- glukanohidrolaz, EC 3.2.1.135)	22
1.8.4. Tip II Pullulan Hidrolaz (İzopullulanaz, Pullulan-4-glukanohidrolaz, EC 3.2.1.57)	22
1.8.5. Tip III Pullulan Hidrolaz (EC 3.2.1.-)	23
1.9. Pullulan	24
1.10. Pullulanazların Uygulama Alanları.....	27
1.10.1. Nişastanın Sakkarifikasyonu	27
1.10.2. Maltoz ve Maltotrioz Şurubu Üretimi.....	28
1.10.3. Panoz ve İzopanoz İçeren Şurupların Hazırlanması.....	28
1.10.4. Fırıncılık.....	28
1.10.5. Deterjan Endüstrisi.....	29
1.11. Çalışmanın Amacı.....	30

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	31
3. MATERYAL ve METOT	59
3.1. Materyal	59
3.1.1. Bakteri İzolasyonu ve Enzim Üretiminde Kullanılan Besi Yerleri	59
3.1.1.1. N1 Besi Yeri	59
3.1.1.2. M9 Nişastalı Besi Yeri	59
3.1.1.3. Pullulanlı Besi Yeri	60
3.1.2. Kullanılan Çözeltiler	61
3.1.2.1. NaOH Çözeltisi	61
3.1.2.2. Hidroklorik Asit (HCl) Çözeltisi	61
3.1.2.3. Lügol Solüsyonu	61
3.1.2.4. Etilalkol (%96)	61
3.1.2.5. Sitrat-Fosfat Tamponu	61
3.1.2.6. Fosfat Tamponu	62
3.1.2.7. Glisin-NaOH Tamponu	62
3.1.2.8. Borax-NaOH Tamponu	63
3.1.2.9. Dinitro Salisilik Asit (DNS) Çözeltisi	63
3.1.2.10. Glukoz Stok Çözeltisi	63
3.1.2.11. Sığır Serum Albumin (BSA) Stok Çözeltisi	64
3.1.2.12. Renklendirme Çözeltisi	64
3.1.3. İnce Tabaka Kromatografisinde Kullanılan Solüsyonlar	64
3.1.3.1. <i>n</i> -Butanol-Asetik Asit-Distile Su Çözeltisi	64
3.1.3.2. %20'lik Sülfirik Asit (H ₂ SO ₄)/Etilalkol Çözeltisi	64
3.1.3.3. D-Glukoz Çözeltisi (%1, %2 ve %4, w/v)	65
3.1.3.4. Maltoz Çözeltisi (%1, %2 ve %4, w/v)	65
3.1.3.5. Maltotrioz Çözeltisi (%1, %2 ve %4, w/v)	65
3.1.3.6. Maltodekstrin Çözeltisi (%1, %2 ve %4, w/v)	65
3.1.4. SDS-PAGE İşleminde Kullanılan Solüsyonlar	65

3.1.4.1. Solüsyon A	65
3.1.4.2. Solüsyon B.....	65
3.1.4.3. Solüsyon C.....	66
3.1.4.4. Amonyum Persülfat (AMPS) (%10).....	66
3.1.4.5. N, N, N', N'-Tetrametiletildiamin (TEMED).....	66
3.1.4.6. Örnek Yükleme Tamponu (5X).....	66
3.1.4.7. Elektroforez Tamponu (pH 8.3)	66
3.1.4.8. Jel Boyama Solüsyonu.....	66
3.1.4.9. Renk Giderim Solüsyonu.....	67
3.1.4.10. Renatürasyon Solüsyonları.....	67
3.1.4.11. İyodin Solüsyonu.....	67
3.1.4.12. Kongo Kırmızısı Solüsyonu	67
3.2 .Metot.....	68
3.2.1. Bakteri İzolasyonu ve Teşhisi	68
3.2.1.1. Suşların İzolasyonu.....	68
3.2.1.2. Bakteri İdentifikasyonu.....	68
3.2.2. Bakterilerin Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	69
3.2.2.1. Bakterilerin Katı Besi Yerinde Amilaz ve Pullulanaz Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	69
3.2.2.2. Bakterilerin Katı Besi Yerinde Ürettiği, Amilaz ve Pullulanaz Enzim Sentezini Gerçekleştirdiği Optimum pH ve Sıcaklık Aralığının Belirlenmesi	69
3.2.2.3. Bakterilerin Sıvı Besi Yerinde Ürettiği, Amilaz ve Pullulanaz Enzim Sentezinin Gerçekleştiği İnkübasyon Sürelerinin Belirlenmesi	70
3.2.2.4. Bakterilerin Sıvı Besi Yerinde Ürettiği, Amilaz ve Pullulanaz Enzim Sentezlerinin Gerçekleştiği Optimum pH ve Sıcaklık Aralığının Belirlenmesi	70

3.2.3. Enzim Üretimi	71
3.2.3.1. Sıvı Besi Yerinde Amilaz ve Pullulanaz Enzimlerinin Üretimi	71
3.2.3.2. Amilaz ve Pullulanaz Enzimlerinin Katı Besi Yerindeki Aktiviteleri	72
3.2.3.3. Amilaz ve Pullulanaz Enzimlerinin Aktivite Tayin Yöntemi	72
3.2.3.4. Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması ve Enzimlere Ait Ünite Değerlerinin Hesaplanması	73
3.2.3.5. BSA Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması ve Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi	74
3.2.4. Enzim Karakterizasyonu	75
3.2.4.1. Amilaz ve Pullulanaz Enzimlerinin Aktivite Gösterdiği Optimum pH Değerlerinin Belirlenmesi	75
3.2.4.2. Amilaz ve Pullulanaz Enzimlerinin Aktivite Gösterdiği Optimum Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi	75
3.2.4.3. Amilaz ve Pullulanaz Enzimlerinin pH Stabilitelerinin Belirlenmesi	76
3.2.4.4. Amilaz ve Pullulanaz Enzimlerinin Sıcaklık Stabilitelerinin Belirlenmesi	76
3.2.4.5. İnhibitör, Şelatör, Metal İyonu, Deterjan ve Okside Edici Ajanların Amilaz ve Pullulanaz Enzim Aktivitesine Etkisinin Belirlenmesi	77
3.2.4.6. NaCl'ün Amilaz ve Pullulanaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	78
3.2.4.7. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) ile Hidroliz Ürünlerinin Belirlenmesi	78
3.2.4.8. SDS-PAGE Yöntemi ile Zimogram Analizi	79

3.2.5. Enzim Denemeleri.....	81
3.2.5.1. Enzimlerin Yıkama Performans Analizleri.....	81
3.2.5.2. Nişastanın Sıvılaştırılması	82
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	85
4.1. Bakteri İzolasyonu ve Teşhisine Ait Bulgular	85
4.1.1. Suşların İzolasyon Bulguları.....	85
4.1.2. Bakterilerin İdentifikasyon Bulguları	85
4.2. Bakterilerin Üreme ve Enzim Sentezleme Yeteneklerine Ait Bulgular.....	92
4.2.1. Bakterilerin Katı Besi Yerinde Optimum Ürettiği, Amilaz ve Pullulanaz Sentezlediği pH ve Sıcaklıklara Ait Bulgular	92
4.2.2. Bakterilerin Sıvı Besi Yerinde Ürettiği, Amilaz ve Pullulanaz Enzim Sentezini Gerçekleştirdiği Optimum İnkübasyon Sürelerinin Belirlenmesine Ait Bulgular	96
4.2.3. Bakterilerin Sıvı Besi Yerinde Enzim Sentezledikleri Optimum pH ve Sıcaklık Değerinin Belirlenmesine Ait Bulgular	102
4.3. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesine Ait Bulgular	111
4.3.1. Amilaz ve Pullulanaz Enzimlerinin Katı Besi Yerindeki Aktivitelerine Ait Bulgular	111
4.3.2. Amilaz ve Pullulanaz Enzimlerine Ait Aktivite Analizleri.....	114
4.3.2.1. Glukoz Kalibrasyon Eğrisi ve Enzimlerin Aktivite Analizleri	114
4.3.2.2. Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi.....	115
4.4. Enzimlerin Karakterizasyonuna Ait Bulgular.....	116
4.4.1. Amilaz ve Pullulanaz Enzimlerinin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değerlerinin Belirlenmesine Ait Bulgular	116
4.4.2. Amilaz ve Pullulanaz Enzimlerinin Optimum Aktivite Sıcaklıklarının Belirlenmesine Ait Bulgular	122
4.4.3. Amilaz ve Pullulanaz Enzimlerinin pH Stabilitelerinin	

Belirlenmesine Ait Bulgular	128
4.4.4. Amilaz ve Pullulanaz Enzimlerinin Sıcaklık Stabilitelerinin Belirlenmesine Ait Bulgular	135
4.4.5. İnhibitör, Şelatör, Metal İyonu, Deterjan ve Okside Edici Ajanların Amilaz ve Pullulanaz Enzim Aktiviteleri Üzerindeki Etkilerine Ait Bulgular.....	142
4.4.6. NaCl'nin Amilaz ve Pullulanaz Enzimlerinin Aktiviteleri Üzerine Etkisinin Belirlenmesine Ait Bulgular	161
4.4.7. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) ile Hidroliz Ürünlerin Belirlenmesine Ait Bulgular	167
4.4.8. SDS-PAGE Yöntemi ile Moleküler Ağırlığın Belirlenmesi ve Zimogram Analizi.....	173
4.5. Enzim Denemelerine Ait Bulgular.....	177
4.5.1. Enzimlerin Yıkama Performans Analizlerine Ait Bulgular	177
4.5.2. Nişastanın Sıvılaştırılmasına Ait Bulgular.....	186
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	191
KAYNAKLAR	211
ÖZGEÇMİŞ	231



ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 3.1. N1 Besi Yerinin İçeriği.....	59
Çizelge 3.2. M9 Besi Yerinin İçeriği	60
Çizelge 3.3. Pullulanlı Besi Yerinin İçeriği	60
Çizelge 3.4. Lügol Solüsyonunun İçeriği.....	61
Çizelge 3.5. Sitrat-Fosfat Tamponunun İçeriği.....	62
Çizelge 3.6. Fosfat Tamponunun İçeriği.....	62
Çizelge 3.7. Glisin-NaOH Tamponunun İçeriği	63
Çizelge 3.8. Glukoz Kalibrasyon Grafiğinin Hazırlanması	73
Çizelge 3.9. BSA Kalibrasyon Grafiğinin Hazırlanması	74
Çizelge 4.1. İzole Edilen Suşların Tür İsmi, NCBI Veritabanındaki Erişim Numaraları ve İnternet Erişim Adresleri	90
Çizelge 4.2. <i>Aeribacillus pallidus</i> NA1 suşunun Katı Besiyerinde Ürettiği ve Amilaz Sentezini Gerçekleştirdiği Optimum pH	92
Çizelge 4.3. <i>Aeribacillus pallidus</i> NA1 suşunun Katı Besiyerinde Ürettiği ve Amilaz Sentezini Gerçekleştirdiği Optimum Sıcaklık	93
Çizelge 4.4. <i>Geobacillus lituanicus</i> NA2 suşunun Katı Besiyerinde Ürettiği ve Amilaz Sentezini Gerçekleştirdiği Optimum pH	93
Çizelge 4.5. <i>Geobacillus lituanicus</i> NA2 suşunun Katı Besiyerinde Ürettiği ve Amilaz Sentezini Gerçekleştirdiği Optimum Sıcaklık	94
Çizelge 4.6. <i>Geobacillus thermoleovorans</i> NP1suşunun Katı Besiyerinde Ürettiği ve Pullulanaz Sentezini Gerçekleştirdiği Optimum pH	94
Çizelge 4.7. <i>Geobacillus thermoleovorans</i> NP1suşunun Katı Besiyerinde Ürettiği ve Pullulanaz Sentezini Gerçekleştirdiği Optimum Sıcaklık.....	95
Çizelge 4.8. <i>Anoxybacillus rupiensis</i> NP2 Suşunun Katı Besiyerinde Ürettiği ve Pullulanaz Sentezini Gerçekleştirdiği Optimum pH	95

Çizelge 4.9. <i>Anoxybacillus rupiensis</i> NP2 Suşunun Katı Besiyerinde Ürettiği ve Pullulanaz Sentezini Gerçekleştirdiği Optimum Sıcaklık.....	96
Çizelge 4.10. NA1 Alkali Amilaz Aktivitesine Metal İyonlarının Etkisi	142
Çizelge 4.11. NA1 Alkali Amilaz Aktivitesine İnhibitör, Şelatör, Deterjan ve Okside Edici Ajanların Etkisi	143
Çizelge 4.12. NA2 Asidik Amilazın Aktivitesi Üzerine Çeşitli Kimyasalların Etkisi.....	149
Çizelge 4.13. NP1 Asidik Pullulanazın Aktivitesi Üzerine Çeşitli Kimyasalların Etkisi.....	154
Çizelge 4.14. NP2 Alkali Pullulanazın Aktivitesi Üzerine Çeşitli Kimyasalların Etkisi.....	158

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 1.1. Nişastanın Hidrolizinde Görev Alan Enzimler	10
Şekil 1.2. Nişastanın Yapısında Bulunan (A) Amiloz ve (B) Amilopektin Polimerlerinin Yapısı	16
Şekil 1.3. Pullulanı Hidrolize Eden Enzimlerin Şematik Gösterimi	23
Şekil 1.4. Tekrarlayan Maltotrioz Birimlerinden Oluşan Pullulanın Kimyasal Yapısı	24
Şekil 1.5. Tekrarlayan Panoz Birimlerinden Oluşan Pullulanın Kimyasal Yapısı.....	25
Şekil 1.6. Tekrarlayan İzopanoz Birimlerinden Oluşan Pullulanın Kimyasal Yapısı.....	25
Şekil 4.1. <i>Aeribacillus pallidus</i> NA1 Suşunun Gram Boyamasına Ait Mikroskop Görüntüsü	86
Şekil 4.2. <i>Geobacillus lituanicus</i> NA2 Suşunun Gram Boyamasına Ait Mikroskop Görüntüsü.....	86
Şekil 4.3. <i>Geobacillus thermoleovorans</i> NP1 Suşunun Gram Boyamasına Ait Mikroskop Görüntüsü.....	87
Şekil 4.4. <i>Anoxybacillus rupiensis</i> NP2 Suşunun Gram Boyamasına Ait Mikroskop Görüntüsü.....	87
Şekil 4.5. <i>Aeribacillus pallidus</i> NA1 Suşunun Spor Boyamasına Ait Mikroskop Görüntüsü	88
Şekil 4.6. <i>Geobacillus lituanicus</i> NA2 Suşunun Spor Boyamasına Ait Mikroskop Görüntüsü.....	88
Şekil 4.7. <i>Geobacillus thermoleovorans</i> NP1 Suşunun Spor Boyamasına Ait Mikroskop Görüntüsü.....	89
Şekil 4.8. <i>Anoxybacillus rupiensis</i> NP2 Suşunun Spor Boyamasına Ait Mikroskop Görüntüsü.....	89

Şekil 4.9. <i>Aeribacillus pallidus</i> NA1 Suşuna Ait Filogenetik Ağaç	91
Şekil 4.10. <i>Geobacillus lituanicus</i> NA2 Suşuna Ait Filogenetik Ağaç	91
Şekil 4.11. <i>Geobacillus thermoleovorans</i> strain NP1 Suşuna Ait Filogenetik Ağaç	91
Şekil 4.12. <i>Anoxybacillus rupiensis</i> NP2 Suşuna Ait Filogenetik Ağaç	92
Şekil 4.13. <i>Aeribacillus pallidus</i> NA1 Suşunun Optimum İnkübasyon Süresi.....	97
Şekil 4.14. <i>Geobacillus lituanicus</i> NA2 Suşunun Optimum İnkübasyon Süresi ...	98
Şekil 4.15. <i>Geobacillus thermoleovorans</i> NP1 Suşunun Optimum İnkübasyon Süresi	100
Şekil 4.16. <i>Anoxybacillus rupiensis</i> NP2 Suşunun Optimum İnkübasyon Süresi	101
Şekil 4.17. <i>Aeribacillus pallidus</i> NA1 Suşunun Ürettiği ve Amilaz Sentezini Gerçekleştirdiği Optimum pH Grafiği	102
Şekil 4.18. <i>Geobacillus lituanicus</i> NA2 Suşunun Ürettiği ve Amilaz Sentezini Gerçekleştirdiği Optimum pH Grafiği.....	103
Şekil 4.19. <i>Geobacillus thermoleovorans</i> NP1 Suşunun Ürettiği ve Pullulanaz Sentezini Gerçekleştirdiği Optimum pH Grafiği	105
Şekil 4.20. <i>Anoxybacillus rupiensis</i> NP2 Suşunun Ürettiği ve Pullulanaz Sentezini Gerçekleştirdiği Optimum pH Grafiği	106
Şekil 4.21. <i>Aeribacillus pallidus</i> NA1 Suşunun Ürettiği ve Amilaz Sentezini Gerçekleştirdiği Optimum Sıcaklık Grafiği.....	107
Şekil 4.22. <i>Geobacillus lituanicus</i> NA2 Suşunun Ürettiği ve Amilaz Sentezini Gerçekleştirdiği Optimum Sıcaklık Grafiği.....	108
Şekil 4.23. <i>Geobacillus thermoleovorans</i> NP1 Suşunun Ürettiği ve Pullulanaz Sentezini Gerçekleştirdiği Optimum Sıcaklık Grafiği	109
Şekil 4.24. <i>Anoxybacillus rupiensis</i> NP2 Suşunun Ürettiği ve Pullulanaz Sentezini Gerçekleştirdiği Optimum Sıcaklık Grafiği	110

Şekil 4.25. <i>Aeribacillus pallidus</i> NA1 Suşuna Ait Alkali Amilaz Enziminin Nişastalı Katı Besi Yerindeki Hidroliz Zonu	112
Şekil 4.26. <i>Geobacillus lituanicus</i> NA2 Suşuna Ait Asidik Amilaz Enziminin Nişastalı Katı Besi Yerindeki Hidroliz Zonu	112
Şekil 4.27. <i>Geobacillus thermoleovorans</i> NP1 Suşuna Ait Asidik Pullulanaz Enziminin Pullulanlı Katı Besi Yerindeki Hidroliz Zonu	113
Şekil 4.28. <i>Anoxybacillus rupiensis</i> NP2 Suşuna Ait Alkali Pullulanaz Enziminin Pullulanlı Katı Besi Yerindeki Hidroliz Zonu	113
Şekil 4.29. Glukoz Kalibrasyon Grafiği	114
Şekil 4.30. BSA Kalibrasyon Grafiği	115
Şekil 4.31. <i>Aeribacillus pallidus</i> NA1 Suşundan Elde Edilen Amilazın Optimum pH Grafiği	116
Şekil 4.32. <i>Geobacillus lituanicus</i> NA2 Suşundan Elde Edilen Amilazın Optimum pH Grafiği	118
Şekil 4.33. <i>Geobacillus thermoleovorans</i> NP1 Suşundan Elde Edilen Pullulanazın Optimum pH Grafiği	119
Şekil 4.34. <i>Anoxybacillus rupiensis</i> NP2 Suşundan Elde Edilen Pullulanazın Optimum pH Grafiği	121
Şekil 4.35. <i>Aeribacillus pallidus</i> NA1 Suşundan Elde Edilen Alkali Amilazın Optimum Sıcaklık Grafiği	123
Şekil 4.36. <i>Geobacillus lituanicus</i> NA2 Suşundan Elde Edilen Asidik Amilazın Optimum Sıcaklık Grafiği	124
Şekil 4.37. <i>Geobacillus thermoleovorans</i> NP1 Suşundan Elde Edilen Asidik Pullulanazın Optimum Sıcaklık Grafiği	126
Şekil 4.38. <i>Anoxybacillus rupiensis</i> NP2 Suşundan Elde Edilen Alkali Pullulanazın Optimum Sıcaklık Grafiği	127
Şekil 4.39. <i>Aeribacillus pallidus</i> NA1 Suşundan Elde Edilen Alkali Amilazın pH Stabilitesine Ait Grafik	128

Şekil 4.40. <i>Geobacillus lituanicus</i> NA2 Suşundan Elde Edilen Asidik Amilazın pH Stabilitesine Ait Grafik.....	130
Şekil 4.41. <i>Geobacillus thermoleovorans</i> NP1 Suşundan Elde Edilen Asidik Pullulanazın pH Stabilitesine Ait Grafik	132
Şekil 4.42. <i>Anoxybacillus rupiensis</i> NP2 Suşundan Elde Edilen Alkali Pullulanazın pH Stabilitesine Ait Grafik	134
Şekil 4.43. <i>Aeribacillus pallidus</i> NA1 Suşundan Elde Edilen Alkali Amilazın Sıcaklık Stabilitesine Ait Grafik	136
Şekil 4.44. <i>Geobacillus lituanicus</i> NA2 Suşundan Elde Edilen Asidik Amilazın Sıcaklık Stabilitesine Ait Grafik.....	137
Şekil 4.45. <i>Geobacillus thermoleovorans</i> NP1 Suşundan Elde Edilen Asidik Pullulanazın Sıcaklık Stabilitesine Ait Grafik.....	138
Şekil 4.46. <i>Anoxybacillus rupiensis</i> NP2 Suşundan Elde Edilen Alkali Pullulanazın Sıcaklık Stabilitesine Ait Grafik.....	140
Şekil 4.47. <i>Aeribacillus pallidus</i> NA1 Suşundan Elde Edilen Alkali Amilazın Aktivitesi Üzerine NaCl'nin Etkisine Ait Grafik.....	162
Şekil 4.48. <i>Geobacillus lituanicus</i> NA2 Amilaz Enzim Aktivitesi Üzerine NaCl'nin Etkisine Ait Grafik	163
Şekil 4.49. <i>Geobacillus thermoleovorans</i> NP1 Suşundan Elde Edilen Asidik Pullulanazın Aktivitesi Üzerine NaCl'nin Etkisine Ait Grafik.....	165
Şekil 4.50. <i>Anoxybacillus rupiensis</i> NP2 Suşundan Elde Edilen Alkali Pullulanazın Aktivitesi Üzerine NaCl'nin Etkisine Ait Grafik.....	166
Şekil 4.51. NA1 Alkali Amilaz ve NA2 Asidik Amilaz Enzimlerinin TLC Analizi Sonucu Açığa Çıkan Son Ürünler	167
Şekil 4.52. NP1 Asidik Pullulanaz ve NP2 Alkali Pullulanaz Enzimlerinin TLC Analizi Sonucu Açığa Çıkan Son Ürünler.....	170

Şekil 4.53. Amilaz-Amilaz, Amilaz-Pullulanaz ve Pullulanaz-Pullulanaz Enzim Kombinasyonlarının TLC Analizi Sonucu Açığa Çıkan Son Ürünler.....	172
Şekil 4.54. NA1 Alkali Amilaz Enziminin Zimogram Analizi ve Moleküler Ağırlığı.....	173
Şekil 4.55. NA2 Asidik Amilaz Enziminin Zimogram Analizi ve Moleküler Ağırlığı.....	174
Şekil 4.56. NP1 Asidik Pullulanaz Enziminin Zimogram Analizi ve Moleküler Ağırlığı.....	176
Şekil 4.57. NP2 Alkali Pullulanaz Enziminin Zimogram Analizi ve Moleküler Ağırlığı.....	177
Şekil 4.58. NA1 Alkali Amilaz ve NP1 Asidik Pullulanaz Enzimlerinin Yemek Sosu Lekesi Üzerindeki Yıkama Performansı	178
Şekil 4.59. NA2 Asidik Amilaz ve NP2 Alkali Pullulanaz Enzimlerinin Yemek Sosu Lekesi Üzerindeki Yıkama Performansı	180
Şekil 4.60. NA1 Alkali Amilaz ve NP1 Asidik Pullulanaz Enzimlerinin Bebek Maması Lekesi Üzerindeki Yıkama Performansı	181
Şekil 4.61. NA2 Asidik Amilaz ve NP2 Alkali Pullulanaz Enzimlerinin Bebek Maması Lekesi Üzerindeki Yıkama Performansı	182
Şekil 4.62. NA1 Alkali Amilaz ve NP1 Asidik Pullulanaz Enzimlerinin Çikolata Lekesi Üzerindeki Yıkama Performansı.....	183
Şekil 4.63. NA2 Asidik Amilaz ve NP2 Alkali Pullulanaz Enzimlerinin Çikolata Lekesi Üzerindeki Yıkama Performansı.....	184
Şekil 4.64. NA1 Alkali Amilaz Enziminin Nişastayı Sıvılaştırma Davranışı.....	187
Şekil 4.65. NA2 Asidik Amilaz Enziminin Nişastayı Sıvılaştırma Davranışı	188
Şekil 4.66. NP1 Asidik Pullulanaz Enziminin Nişastayı Sıvılaştırma Davranışı	189
Şekil 4.67. NP2 Alkali Pullulanaz Enziminin Nişastayı Sıvılaştırma Davranışı	190



SİMGELER ve KISALTMALAR

AMPS	: Amonyum persülfat
atm	: Atmosfer
bis	: N,N'-metilen-bis-akrilamid
BaCl ₂	: Baryum Klorür
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
BSA	: Sığır serum albümini
CaCl ₂	: Kalsiyum Klorür
CoCl ₂	: Kobalt Klorür
CuCl ₂	: Bakır Klorür
dH ₂ O	: Distile su
DNS	: Dinitrosalisilik asit
EDTA	: Etilendiaminotetra-asetik asit
EC	: Enzim Komisyonu
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
H ₂ SO ₄	: Sülfirik Asit
HCl	: Hidroklorik asit
HgCl ₂	: Civa Klorür
I	: İyot
IU	: Uluslararası Birimler
kDa	: Kilo dalton
KI	: Potasyum iyodür
OD	: Optik Dansite
M	: Molar
mA	: Miliamper
mg	: Miligram
MgCl ₂	: Magnezyum Klorür

mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
MnCl ₂	: Mangan Klorür
NaCl	: Sodyum Klorür
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
nm	: Nanometre
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PSMF	: Fenilmetilsulfonilflorit
rpm	: Dakikada devir sayısı
sp.	: Species (tür, tekil)
spp.	: Species (tür, çoğul)
S	: Svedberg Birimi/ Sedimentasyon katsayısı
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TLC	: İnce Tabaka kromatografisi
Tris	: 2-Amino-2-Hidroksimetilpropan-1,3-diol
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin
U	: Ünite
U/mg	: Ünite/miligram
U/mL	: Ünite/mililitre
UV	: Ultraviyole
v:v	: Hacim : Hacim
w:v	: Ağırlık : Hacim
ZnCl ₂	: Çinko Klorür
µL	: Mikrolitre
µg	: Mikrogram

1. GİRİŞ

Mikroorganizmalar, doğadan endüstriye giden yolda hemen hemen her alanda kullanılabilir farklı özellikleriyle yer alan ve ekosistemde olağanüstü etkileri olan canlılardır. Doğal koşullarda gerçekleştirdikleri dönüşüm reaksiyonları sonucu, bir yandan varlıklarını ve çeşitliliklerini sürdürürken, diğer taraftan bu dönüşümden yararlanan diğer paydaşların yaşamlarını kolaylaştırmaktadırlar. Biyoçeşitlilik ile aktivitede görev alan bireylerin iş bölümü yapması sonucu biyotransformasyon şeklinde tanımlanan olaylar kısa sürede kusursuz bir şekilde gerçekleşmektedir. Doğadaki bu yolculukta, mikroorganizmaların metabolik faaliyetlerin kısa sürede gerçekleşmesini sağlayan hızlandırıcılar enzimlerdir.

Enzimler, hayvan, bitki ve mikroorganizmalarda bulunan ortak biyokatalizörlerdir. Aktivite spektrumları ve elde edilebilme özellikleri dikkate alındığında, her üç organizmada da aynı katalitik aktiviteyi gösteren enzimlerden özellikle mikroorganizma kaynaklı olanlar tercih edilmektedir. Mikrobiyal enzimler, aktivite gösterdikleri pH ve sıcaklık aralıklarının geniş olması ve yüksek stabiliteye sahip olmaları gibi özellikleri dikkate alındığında, özellikle bakteriyel kökenli enzimler, çeşitli biyoteknolojik ve endüstriyel uygulamalarda kullanılabilirlikleri açısından ön plana çıkmaktadırlar.

Birkaç yıl öncesine kadar, endüstriyel uygulamalarda ağırlıklı olarak kimyasal katalizörler kullanılmaktaydı. Bu işlemlere, tekstil endüstrisinde haşılların zayıf asitlerle giderimi ve tüylenmenin önlenmesi, kağıt endüstrisinde ağartma ve yumşak kağıt eldesinin hidrojen peroksitle sağlanması, sağlıkta kullanılan birçok ilacın sentetik üretimi, biyoetanol üretiminde asit ya da alkali gibi kimyasallarla ön işlem ve hidroliz yapılması, deri endüstrisinde alkali uygulamalar örnek olarak verilebilir. Kimyasal katalizörlerin ve üretimde kimyasal kullanımının önemli düzeyde çevre kirliliğine yol açması, yeterli verimin alınamaması, son

kullanıcılarda ürün kaynaklı alerjiler başta olmak üzere birçok rahatsızlığın görülmesi kimyasallar haricindeki diğer alternatifleri ön plana çıkarmıştır.

Bugün endüstrise ve birçok farklı uygulamada (deterjan başta olmak üzere) katalizör olarak enzimler kullanılmaktadır. Endüstriyel uygulamaların çeşitlenmesine bağlı olarak, enzim ihtiyacı ve yeni alanlara uygun enzimlere olan gereksinim artmaktadır. Bu durum enzim teknolojisinin hemen her alanda hızla etkinliğini artırmakta ve birçok araştırmacının konu üzerinde çalışmasına olanak sağlamaktadır. Bugüne kadar enüstriyel boyutta düşünölen ve uygulanan enzim kullanımı sağlık alanında etkisini göstermeye başlamıştır. Gelecek yıllarda, kanser dahil birçok hastalığın tedavisinde enzimlerin etkin bir şekilde kullanım yolunun açılması uzak bir ihtimal değildir.

1.1. Enzimler

Enzimler canlı hücrelerde bulunan ve amino asit zincirlerinin katlanmasıyla oluşan globöler proteinlerdir. Organizmadaki tüm biyokimyasal reaksiyonların gerçekleşmesinde biyolojik katalizör olarak rol almaktadırlar. Enzimlerin etki ettiğı moleküllere substrat denilmektedir. Her enzim, kendi substratına özgüldür (Koç, 2015).

Günümüz dünyasında, çeşitli kimyasalların üretiminde yenilenebilir, ucuz ve kolaylıkla temin edilebilen biyokütlenin kullanımına yönelik bir eğilim vardır. Endüstriyel proseslerde, biyokütleyi hedef ürönlere dönüştürmek için mikrobiyal hücreler ve onların enzimleri kullanılmaktadır. Bu proseslerde çoğunlukla, yüksek sıcaklıkta stabil kalan enzimlere ihtiyaç duyulmaktadır. Böylelikle iyi derecede substrat çözünürlüğü sağlanmakta, yüksek verim elde edilmekte ve kontaminasyon riski azalmaktadır. Bu sebeple, termofil organizmalar genellikle endüstriyel açıdan uygun termostabil enzim kaynakları olarak kabul edilmektedir (Turner ve ark, 2007).

Biyoteknolojik ve endüstriyel alandaki birçok proseste enzimler kullanılmaktadır. Enzimlerin varoluşu, fırıncılıkta, pişirmede, mayalamada, alkol üretiminde, peynir yapımında ve benzeri alanlarda mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin kullanıldığı antik Yunan tarihi ile ilişkilendirilmiştir. Enzimlerin özelliklerinin daha iyi bilinmesi ve saflaştırılması ile enzimatik uygulamaların sayısı gün geçtikçe artmıştır. Özellikle termostabil enzimlerin kullanımı ile yeni endüstriyel prosesler ortaya çıkmıştır (Haki ve Rakshit, 2003).

Enzimlerden, yüzyıllardan beri birçok alanda faydalanılmakla birlikte, günümüzde enzimlerin kullanımı neredeyse sınırsızdır. Diğer kimyasallara kıyasla, daha stabil katalizörler olmakla birlikte, düşük sıcaklık ve pH'lerden yüksek sıcaklık ve pH'lara kadar aktivite gösterebilmektedirler. Kimyasalların kullanımı, çevre için olumsuz etkiler ortaya çıkarmaktadır. Bundan dolayı, enzimlerin kullanımı endüstriyel sorunlar için çevre dostu bir çözümdür. Enzimlerin kullanıldığı proseslerde herhangi bir yan etki meydana gelmemektedir. Katalizledikleri biyokimyasal reaksiyon sonlandığında reaksiyon ürünü enzimi terkeder ve ortamda substrat bulunduğu müddetçe enzim aynı reaksiyonu tekrar tekrar gerçekleştirebilir. Bunun yanı sıra, enzimin üç boyutlu yapısıyla belirlenen aktif bölge, enzimin substratına olan özgüllüğünü sağlamakta ve onu diğer kimyasal bileşiklerden ayırarak benzersiz kılmaktadır. Aktif bölge, enzime özgü olan substratın şeklindedir. Bu bölgeye bağlanan ve sadece doğru şekle sahip olan maddeler enzim tarafından ürünlere dönüştürülebilmektedir (Kalpana ve Pandian, 2014).

Enzimlerin biyoteknolojik ve endüstriyel alanlardaki uygulamalarda kullanılabilmesi için amino asit dizilerinin, üç boyutlu yapılarının, optimum aktivite koşullarının, pH ve sıcaklık stabilitelerinin, denatüre edici ajanların enzim aktivitesi üzerindeki etkilerinin bilinmesi gerekmektedir. Her enzimin optimum aktivitesini gösterdiği bir sıcaklık ve pH değeri vardır. pH değişimi, enzimin aktif bölgesinin iyonizasyonunu ve reaksiyon hızını etkilemektedir. Enzimin aktivite

gösterdiği pH ve sıcaklık, genellikle, elde edildiği mikroorganizmanın yaşadığı ortamla ilişkilidir (Erarslan ve ark. 2005: Çöleri, 2007'den).

Enzimin aktivitesini azaltan veya tamamen yok eden inhibitör maddeler, ya substrata benzer yapıda olup enzime substratmış gibi bağlanırlar ya da enzimin aktif bölgesine veya dışındaki bir bölgeye bağlanarak enzimin üç boyutlu yapısını değiştirirler (Erarslan ve ark, 2005: Çöleri, 2007'den). Termotabil enzimlerin yapısal olarak daha stabil olmaları; pH, sıcaklık, sodyum dodesil sülfat (SDS) ve üre gibi denatüre edici ajanlara karşı daha dayanıklı olmalarını sağlamaktadır. SDS, anyonik bir deterjan olup proteine bağlandığında onu negatif yükle yükler, proteinin konformasyonunu ve aktivitesini etkileyerek onu denatüre eder. Üre, proteinlerin denatürasyonunda ve çözünürlüğünün artırılmasında kullanılır. Denatüre proteinlerin tekrar katlanmalar yaparak doğal ve aktif formlarına dönüşümünü sağlar. Divalent iyon şelatörü olan EDTA, metaloproteinler ve divalent katyonlara ihtiyaç duyan enzimler için bir inhibitördür. EDTA ile enzimin aktivitesindeki azalma, enzim aktivite ve stabilitesinde metal iyonlarının gerekli olduğunu göstermektedir. Enzimlerin aktivite göstermeleri için gerekli olan metal iyonlarına kofaktör denilmektedir. Çoğu enzim, kofaktör olarak bakır (Cu^{+2}), demir (Fe^{+2}), çinko (Zn^{+2}) ve magnezyum (Mg^{+2}) iyonlarına ihtiyaç duymaktadır. Bakır (Cu^{+2}), civa (Hg^{+2}) ve gümüş (Ag^{+2}) gibi ağır metal iyonları, aktif bölgesinde sistein kökleri içeren enzimlerin -SH gruplarıyla birleşerek enzimi inhibe etmektedir (Zubay, 1988: Çöleri, 2007'den).

Doğadaki mikroorganizma çeşitliliği oldukça fazladır. Enzim endüstrisi, yeryüzünün her tarafından, özellikle ekstrem fiziksel ve kimyasal koşullara sahip bölgelerden alınan toprak ve su örneklerinden, çeşitli mikroorganizmalar elde etmekte ve bu mikroorganizmalardan endüstriyel açıdan oldukça değerli enzimlerin üretimini gerçekleştirmektedir (Kalpana ve Pandian, 2014).

Mikroorganizmalar tarafından sentezlenen enzimler, hücrelerde çalıştıkları ortama göre hücre içi (intraselüler) ve hücre dışı (ekstraselüler) olmak üzere iki

guba ayrılırlar. Hücre dışı enzimler, üretildikleri organizma tarafından hücre dışına salgılanan enzimlerdir. Bu enzimler, besi yerinde ve hücre yapılarının dış kısmı ile bağlantılı hâlde ortamda bulunan yüksek molekül ağırlıklı besin maddelerini hidrolize ederek mikroorganizma tarafından hücre içine alınabilir forma dönüştürmektedirler. Bu tip enzimlere genel olarak hidrolazlar denilmektedir. Gram negatif bakterilerde proteinler, iç ve dış membran arasındaki periplazmik boşlukta kalırlar. Çünkü Gram negatif bakterilerin duvarı, Gram pozitif bakterilerde bulunmayan bir dış membrana sahiptir. Gram pozitif bakterilerde ise, enzimler doğrudan besi yerine salgılanırlar. Bu enzimlerin stabilitesi yüksektir ve ortam koşullarında aktivitelerini uzun süre koruyabilirler. Elde edilişleri kolaydır ve endüstrideki kullanım alanları daha yaygındır. Enzimler, hücrenin sitoplazmasına dağılmış olarak bulunan ribozomlarda sentezlenirler. Bu enzimlerin substratları, genellikle, şekerler, amino asitler, karboksilik asit gibi küçük molekül ağırlığa sahip olan ve hücre zarından geçebilme yeteneğindeki moleküllerdir. Hücre yapılarına sıkıca bağlı olan ve dışarıya salgılanmayan intraselüler enzimlerin elde edilmeleri ve saflaştırılmaları için öncelikle hücre zarının parçalanması gerekmektedir (Özdenefe, 2014; Çınar, 2007).

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından önerilen sistematik adlandırmada enzimler altı büyük sınıfa ayrılmaktadırlar ve her sınıfın katalizlenen reaksiyon tipine göre alt sınıfları bulunmaktadır:

EC 1. Oksidoredüktazlar: Oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarını katalizler.

EC 2. Transferazlar: İki molekül arasında bir atom veya atom grubunun transferi reaksiyonlarını katalizler.

EC 3. Hidrolazlar: Hidroliz reaksiyonlarını katalizler.

EC 4. Liyazlar: Substrattan, hidroliz ve yükseltgenme harici bir yolla, bir grubun ayrılması reaksiyonlarını katalizler.

EC 5. İzomerazlar: İzomerizasyon reaksiyonlarını katalizler.

EC 6. Ligazlar: Adenozin trifosfat (ATP) veya diğer nükleozit trifosfatın yıkımı ile birlikte yeni bir bağın sentezlenmesi reaksiyonlarını katalizler (Akan, 2011).

1.2. Mikrobiyal Enzimler

Enzimler, hayvanlar (kimosin, pepsin, tripsin vb.), bitkiler (fisin, papain, bromelain vb.) ve mikroorganizmalardan (α -amilaz, pektinazlar, selüloz, vb.) elde edilebilmektedirler. Karasal ve sucul tüm mikroorganizmalar, enzimlerin en dinamik üreticileri olup elli yıldan fazladır çeşitli endüstrilerde kullanılmaktadırlar. Prensip, hayvanlardakine ve bitkilerdekine benzer her türlü enzim mikroorganizmalardan elde edilebilir. Biyoteknolojik ve endüstriyel açıdan bakıldığında genel eğilim, mikrobiyal kökenli enzimlerin kullanımınıdır (Vaidya ve ark, 2015).

Mikroorganizmalar, elde edilebilirliklerinin kolay olması, hızlı üremeleri ve ucuz besinleri kullanarak istenilen koşullarda birçok enzimi üretebilmeleri, enzim üretme kapasitesinin artırılması için genetik değişiklik yapma kolaylığına sahip olmaları, kısa fermentasyon sürelerinde bol miktarda enzim üretebilmeleri gibi avantajlara sahip olduklarından, endüstriyel enzim üretimi için ideal organizmalardır (Vaidya ve ark, 2015; Niehaus ve ark, 1999; Kalpana ve Pandian, 2014'ten).

Mikrobiyal enzimler, bitkisel ve hayvansal enzimlere göre çevreye daha az zararlı olmaları, katalitik aktivitelerinin ve verimliliklerinin yüksek olması, daha stabil olmaları, düşük maliyetli olmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleri, düşük enerji tüketimine sebep olmaları gibi bazı önemli avantajlara sahiptirler (Vaidya ve ark, 2015; Kalpana ve Pandian, 2014). Bu enzimler, fermentörlerde sıvı ya da yarı katı besi yerlerinde üretilen prokaryotik (bakteri) ve ökaryotik (maya, mantar) hücrelerden elde edilebilirler. Bakterilerden elde edilen enzimlerin çoğu *Bacillus*

cinsine (Gram pozitif bakteri), mantarlardan elde edilenler ise *Aspergillus* cinsine (filamentöz mantar) aittirler (Vaidya ve ark, 2015).

Enzimlerin kullanıldığı temel uygulamalar; sağlık, tekstil, gıda ve deri endüstrisidir. Endüstriyel olarak üretilen enzimler, temel olarak ilaç (%41), deterjan (%17), gıda ve yem (%17), deri ve kâğıt (%17), tekstil (%8) endüstrisinde kullanılmaktadırlar (Kalpana ve Pandian, 2014).

1.3. Termofilik Enzimler

Son zamanlarda araştırmacılar, ekstremofillerin sıcak ortamlara adaptasyonu, termofillerden ve hipertermofillerden termostabil enzim üretimi, termozimlerin (termo-tolerant enzimler) yapısal ve fonksiyonel ilişkileri ve termostabil enzimlerin biyoteknolojik ve endüstriyel alanlardaki uygulamalarıyla ilgili çalışmalar yapmaktadırlar. Yapılan araştırmalarda, termofillerin, termostabil özellikte, denatürasyona ve proteolizize dayanıklı, denatürasyondan sonra proteinleri kendi doğal formuna ve işlevine geri döndürmeye yardımcı olan ve 'şaperoninler' olarak bilinen özelleşmiş proteinler ihtiva ettiği bildirilmiştir (Everly ve Alberto, 2000: Haki ve Rakshit, 2003'ten). Termofillerin hücre membranları, doymuş yağ asitlerinden oluşmaktadır. Yağ asitleri, hücreye hidrofobik bir ortam sağlamak ve hücrenin yüksek sıcaklıklarda yaşayabilecek formda kalmasına yardımcı olmaktadır. Termofillerin sahip olduğu ve DNA'da pozitif süpersarmalların oluşumunu sağlayan ters DNA giraz enzimi, DNA'nın erime noktasını (çift sarmalın ipliklerinin ayrılacağı sıcaklık) yükseltir (Haki ve Rakshit, 2003).

Termofillerden elde edilen çoğu protein termostabildir. Biyoteknolojik ve endüstriyel proseslerde termostabil enzimlerin tercih edilmesinin temel sebepleri: Oda sıcaklığında uzun süreli depolanabilmesi, organik çözücülere karşı yüksek tolerans göstermesi, kontamine olma risklerinin düşük olması, yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilen ham madde ön işlemlerinde aktivite kaybı yaşamamasıdır.

Termofil koşullarda gerçekleşen enzim-substrat reaksiyonlarında substrat viskozitesinin azalması ve difüzyonunun artması sayesinde, daha yüksek ürün verimi elde edilmektedir. Ayrıca yüksek çalışma sıcaklığı, organik bileşiklerin biyolojik olarak yararlanılabilirliklerini ve çözünürlüklerini arttırdığı için, biyoremediasyon işlemleri termofilik koşullarda daha etkili olmaktadır (Turner ve ark, 2007; Haki ve Rakshit, 2003).

Termofilik mikroorganizmalardan izole edilen enzimler, yapısal kararlılıklarının avantajları sayesinde mikroorganizmaların üremeleri için gerekli olan optimum sıcaklıklardan daha yüksek sıcaklıklarda ve geniş pH aralıklarında aktif ve stabil olmakla birlikte, organik çözücülere, proteazlara, deterjanlara ve denatüre edici bileşiklere daha dayanıklıdır. Bu özelliklerinden ötürü, termofilik enzimlerin biyoteknolojik ve endüstriyel kullanım alanları giderek artmaktadır (Çöleri, 2007).

1.4. Nişastanın Hidrolizinde Görev Alan Enzimler

Nişasta endüstrisi, yararlı bir ham madde olan nişastanın hidrolizini ve modifikasyonunu sağlayan enzimlerin en büyük kullanıcılarından. Nişasta polimerinin tamamen hidrolize olabilmesi için çeşitli enzim kombinasyonlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu kombinasyonlar; α -amilaz, glukoamilaz, β -amilaz, izoamilaz ve pullulanaz enzimlerini içermektedir (Poonam ve Dalel, 1995; Haki ve Rakshit, 2003'ten) (Şekil 1.1).

Nişastanın enzimatik hidrolizasyonu, nişasta granüllerinin çözünmesiyle viskoz süspansiyon oluştuğu ve yüksek sıcaklıklarda gerçekleşen jelatinizasyon, nişastanın kısmi hidrolizinin gerçekleştiği ve viskozitenin azaldığı sıvılaşma, nişastanın tam hidrolize olduğu ve glukoz ile maltoz üretimini içeren sakkarifikasyon basamaklarından oluşmaktadır. Termotabil amilazlar; *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* ve *Bacillus licheniformis* gibi çeşitli *Bacillus* türlerinden izole edilmektedirler (Haki ve Rakshit, 2003).

Endüstriyel açıdan büyük öneme sahip olan, nişasta ve benzer polisakkaritlerdeki α -1,4, α -1,6 ile α -1,4 ve α -1,6 bağlarını parçalayan mikrobiyal enzimler altı sınıfa ayrılabilir:

1. α -1,4 bağlarını hidrolize eden enzimler: Örneğin; α -amilaz (endo-acting amilazlar).

2. α -1,4 bağlarını hidrolize eden ve α -1,6 bağlarını atlamayan enzimler: Örneğin; β -amilaz (son ürün olarak maltoz üreten exo-acting amilazlar).

3. Hem α -1,4 hem de α -1,6 bağlarını hidrolize eden enzimler: Örneğin; amiloglukozidazlar (glukoamilaz) ve amilopullulanazlar.

4. Sadece α -1,6 bağlarını hidrolize eden enzimler: Örneğin; pullulanazlar ve diğer dallanmış yapıları hidrolize eden (debranching) enzimler.

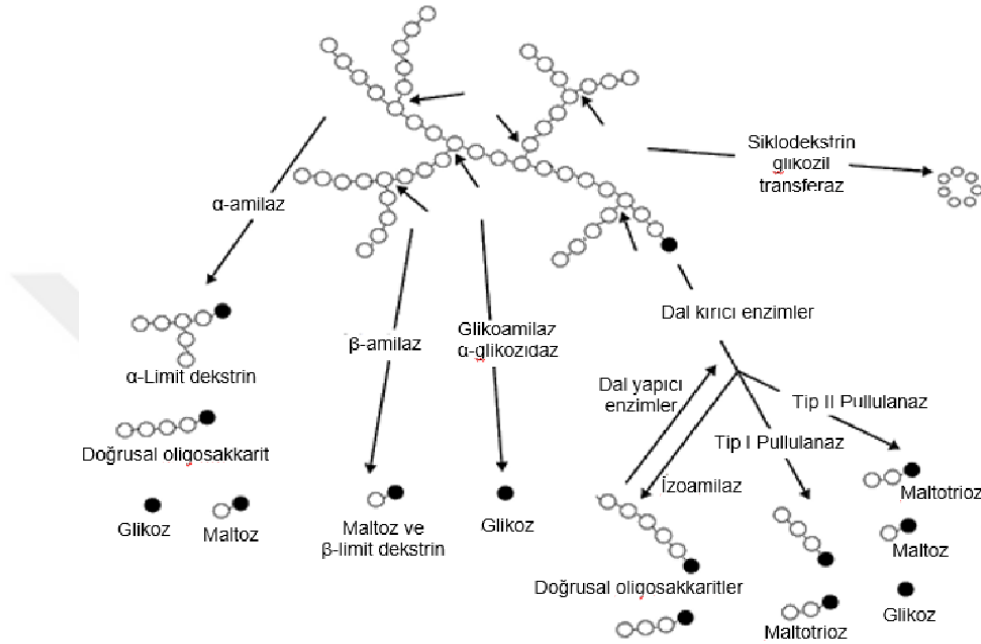
5. Diğer enzimlerin amiloz ve amilopektin üzerindeki aktivitesi sonucu meydana gelen kısa zincirli oligosakkaritlerdeki α -1,4 bağlarını hidrolize eden enzimler: Örneğin; α -glukozidaz.

6. Nişastayı, siklodekstrinler veya Sachardinger dekstrinler olarak adlandırılan bir dizi indirgenmeyen halkalı D-glukozil polimerlere hidrolize eden enzimler: Örneğin; *Bacillus macerans* amilazı (siklodekstrin üreten enzimler), (Şekil. 1.1) (Fogarty ve Kelly, 1979; Aiyer, 2005'ten).

Kompleks bir yapıya sahip olan nişasta polimerinin oligosakkaritler ve daha küçük şekerlere depolimerizasyonu için endoamilaz ve ekzoamilaz enzim kombinasyonlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Nişastanın enzimatik hidrolizi için temel olarak dört tip enzim bulunmaktadır: Endoamilazlar, ekzoamilazlar, dallanmış yapıları hidrolize eden enzimler ve transferazlar (Sivaramakrishnan ve ark, 2006; Pandey ve ark, 2000).

Endoamilazlar ve ekzoamilazlar nişastayı hidrolize eden enzim gruplarıdır. Bu enzimler, glukozidik bağları hidrolize ettikleri yere göre sınıflandırılmaktadırlar. Nişastayı hidrolize eden enzimler, çeşitli şekerleri hidrolize edebilen glukozit hidrolaz (GH) ailesinde yer almakla birlikte, çoğunlukla

GH-13 ailesinde bulunmaktadır (Vaidya ve ark, 2015; Sivaramakrishnan ve ark, 2006).



Şekil 1.1. Nişastanın Hidrolizinde Görev Alan Enzimler (Açık halka yapısı bir poliglukoz molekülünün indirgenen ucunu sembolize etmektedir) (Antranikan, 1992)

1.4.1. Endoamilazlar (Endo-acting)

Amiloz ve amilopektin zincirlerinin iç kısımlarındaki α -1,4 glukozidik bağları hidrolize eden enzimlerdir. α -amilaz (EC 3.2.1.1) enzimi, nişasta polimerinin içi kısımlarındaki α -1,4 bağlarını hidrolize ederek lineer ve dallanmış oligosakkaritleri ya da α -limit dekstrinlerin oluşumunu sağlayan ve en iyi bilinen endoamilaz enzimidir. Bu enzimler, *Bacteria* ve *Archaea* domainlerine ait birçok mikroorganizmada bulunmaktadır (Zhang ve ark, 2017; Hii ve ark, 2012).

1.4.2. Ekzoamilazlar (Exo-acting)

Glukoamilaz (EC 3.2.1.3) ve α -glukozidazlar (EC 3.2.1.20) gibi amiloz ve amilopektinin dış kısımlarda bulunan α -1,4 ve α -1,6 bağlarını hidrolize ederek glukoz birimlerinin oluşumunu sağlayan enzimlerdir. Diğer taraftan, özellikle α -1,4 bağlarını hidrolize ederek maltoz ve β -limit dekstrinleri üreten enzimler β -amilazlardır (EC 3.2.1.2) (Haki ve Rakshit, 2003).

1.4.3. Transferazlar

Donör molekülün α -1,4 glukozidik bağlarını hidrolize edip yeni glukozidik bir bağ oluşumu ile donör molekülden ayrılan parçayı glukozidik alıcıya aktararak nişastanın dönüşümünü sağlayan enzim grubu transferazlardır. Amilomaltaz (EC 2.4.1.25) ve siklodekstrin glukoziltransferaz (EC 2.4.1.19) gibi enzimler yeni bir α -1,4 glukozidik bağ oluştururlar (Çınar, 2007).

1.4.4. Dallanmış Yapıları Hidrolize Edenler (Debranching)

Amilopektin ve/veya glukojen ve benzer polimerlerdeki α -1,6 glukozidik bağların hidrolizini katalizlemektedirler. İki ana gruba ayrılırlar:

1.4.4.1. İndirekt Dallanmış Yapıları Hidrolize Eden Enzimler

Bu grupta yer alan amilo-1,6-glukozidaz enzimi, kendi aktivitesinden önce başka bir enzim veya enzimler tarafından substratın modifikasyonuna gereksinim duymaktadır. Özellikle hayvanlarda ve mayada bulunmaktadır. Amilo-1,6-glukozidaz, substrattaki yan zincir tek bir glukoz ünitesinden oluşuyorsa sadece α -1,6 dallanma noktasını hidrolize eder. Amilo-1,6-glukozidazın glukoz ve maltotetroza hidrolize edebildiği bilinen en küçük substrat, dallanmış pentasakkarit 63- α -glukozil maltotetrozdur (Hii ve ark, 2012).

1.4.4.2. Direkt Dallanmış Yapıları Hidrolize Eden Enzimler

Bitkilerde ve bakterilerde bulunan bu enzim grubu, substratın α -1,6 glukozidik bağlarını doğrudan hidrolize edebilen pullulanaz ve izoamilaz enzimlerini içermektedir (Hii ve ark, 2012).

α -dekstrin 6-glukanohidrolaz, pullulan 6-glukanohidrolaz, limit dekstrinaz ve amilopektin-6-glukanohidrolaz olarak da bilinen mikrobiyal pullulanaz enzimi (EC 3.2.1.41), α -1,6 glukozidik bağlarla bağlı maltotrioz birimlerinden oluşan pullulandaki α -1,6 glukozidik bağlara spesifik etki göstermesinden dolayı ilgi çekici bir enzimdir. Pullulanazlar, pullulan ve amilopektinin yapısındaki α -1,6 glukozidik bağları hidrolize etmektedir. Substrata olan özgülüklerine ve substrat ile reaksiyon sonucu açığa çıkardıkları son ürün tipine göre beş grup pullulan hidrolize edici enzim bulunmaktadır:

1. Tip I Pullulanaz (EC 3.2.1.41)
2. Tip II Pullulanaz (Amilopullulanaz) (EC 3.2.1.41/EC 3.2.1.1)
3. Tip I Pullulan Hidrolaz (Neopullulanaz) (EC 3.2.1.135)
4. Tip II Pullulan Hidrolaz (İzopullulanaz) (EC 3.2.1.57)
5. Tip III Pullulan Hidrolaz (EC 3.2.1.-) (Hii ve ark, 2012).

Glukojen 6-glukanohidrolaz olarak da bilinen izoamilaz (EC 3.2.1.68), glukojeni tamamen hidrolize edebilen tek enzimdir. Bu enzimin en aktif olduğu pH aralığı 3.0-4.0'tür. Enzim, 45-55°C aralığında maksimum stabiliteye sahiptir. İzoamilaz, amilopektin ve glukojendeki α -1,6 glukozidik bağları hidrolize eder (Hii ve ark, 2012; van der Maarel ve ark, 2002).

1.5. Amilazlar

α -amilaz, β -amilaz ve γ -amilazları kapsayan amilaz enzim grubu, hem endüstriyel hem de biyoteknolojik uygulanabilirliklerinden dolayı geniş bir uygulama alanına sahiptir (Saini ve ark, 2017). Enzim piyasasında proteazlardan sonra en büyük paya sahip olan amilazlar, dünyadaki enzim pazarının yaklaşık

%30'unu oluşturan en önemli endüstriyel enzimlerden biridir (Vaidya ve ark, 2015; Gupta ve ark, 2003; Aiyer, 2005'ten).

Amilazlar, polisakkaritlerdeki α -1,4 glukozidik bağların hidrolizini katalize ederek nişastanın ve benzer polimerlerin hidrolizini sağlayan hidrolitik enzimlerdir (Takata ve ark, 1992; Saini ve ark, 2017'den). Mikroorganizmalarda, bitkilerde ve hayvanlarda yaygın olarak bulunmaktadırlar. α -amilaz; çeşitli mantar, maya ve bakterilerden elde edilmekle birlikte, mantar ve bakteri kaynaklı olanlar endüstriyel uygulamalarda daha çok tercih edilmektedir. Bunun sebebi, bakteri ve mantarlardan elde edilen amilazların, ekstraselüler olarak üretim ortamına salgılanmaları sebebiyle büyük ölçekli üretimlerinin nispeten kolay ve düşük maliyetli olmasıdır (Saini ve ark, 2017).

Nişasta, endüstriyel uygulamalarda sıvılaştırma ve sakkarifikasyon olarak adlandırılan iki farklı işlem ile hidrolize edilir. Modern endüstriyel uygulamalarda pişirmeden önce ve sonra sıvılaştırıcı amilazlar eklenerek nişasta 110°C'de jelatinize edilir (sıvılaştırılır). Sakkarifikasyon aşamasında α -amilaz, glucoamilaz ve dallanmış yapıları hidrolize eden enzimlerin karışımı ilave edilmektedir. Yüksek sıcaklıklarda gerçekleşen bu işlemler için termofilik α -amilazlar tercih edilmektedir (Zhang ve ark, 2017).

Amilazları α -amilaz, β -amilaz ve γ -amilaz olmak üzere üç gruba ayırmak mümkündür:

1.5.1. α -amilaz (EC 3.2.1.1)

1,4- α -D-glukanglukanohidrolaz veya glukojenaz olarak da bilinen ekstraselüler enzimlerdir. GH-13 sınıfında yer alırlar (Cherry ve ark, 2004; Saini ve ark, 2017'den). Kalsiyum (Ca^{+2}) bağımlı metaloenzimlerdir. Bu amilolitik enzim, nişasta ve benzeri uzun zincirli karbonhidratların α -1,4 glukozidik bağlarını iç kısımlardan hidrolize ederek maltoz, maltotrioz ve bazı dekstrinler gibi

oligosakkaritleri üretirler (Vaidya ve ark, 2015). Mikrobiyal α -amilazlar, endüstriyel α -amilazlar arasında en çok tercih edilenlerdir (Zhang ve ark, 2017).

1.5.2. β -amilaz (EC 3.2.1.2)

1,4- α -glukanmaltohidrolaz, glukojenaz veya sakkarojen amilaz olarak bilinmektedirler. Nişastanın indirgeyici olmayan ucundaki ikinci α -1,4 glukozidik bağı hidrolize ederek maltoz oluşumunu sağlayan, GH-14 sınıfında yer alan bir tür amilaz enzimidir. (Saini ve ark, 2017; Vaidya ve ark, 2015). Maltozun indirgen glukozunun β formunda olmasından dolayı bu enzime β -amilaz denilmektedir (Kossmann ve Lloyd, 2000; Vaidya ve ark, 2015'ten). Bakteriler, mantarlar ve bitkiler tarafından üretilmektedirler (Saini ve ark, 2017).

1.5.3. γ -amilaz (EC 3.2.1.3)

Glukan-1,4- α -glukozidaz, amiloglukozidaz, ekzo-1,4- α -glukozidaz, glukamilaz, lizozomal α -glukozidaz ya da 1,4- α -D-glukanglukohidrolaz olarak bilinmektedir (Tateno ve ark, 2007; Vaidya ve ark, 2015'ten). GH-15 sınıfında yer almaktadır. Amiloz ve amilopektindeki indirgenmemiş uçlarda bulunan son α -1,4 glukozidik bağları hidrolize ederek glukoz birimlerinin oluşumunu sağlamaktadır. Aynı zamanda, α -1,6 glukozidik bağları da hidrolize ederler (Saini ve ark, 2017; Vaidya ve ark, 2015). Diğer amilaz formlarından farklı olarak γ -amilaz, asidik ortamlarda oldukça aktiftir ve stabildir. Optimum aktivite gösterdiği pH 3.0'tür (Saini ve ark, 2017).

1.6. Nişasta

Nişasta, glukoz birimlerinin glukozidik bağlarla biraraya gelmesiyle oluşmuş bir polimer olup, çoğu bitki tarafından üretilen temel bir karbonhidrattır (Aiyer, 2005). Ticari olarak mısır, buğday, sorgum ve pirinç gibi bitki tohumlarından,

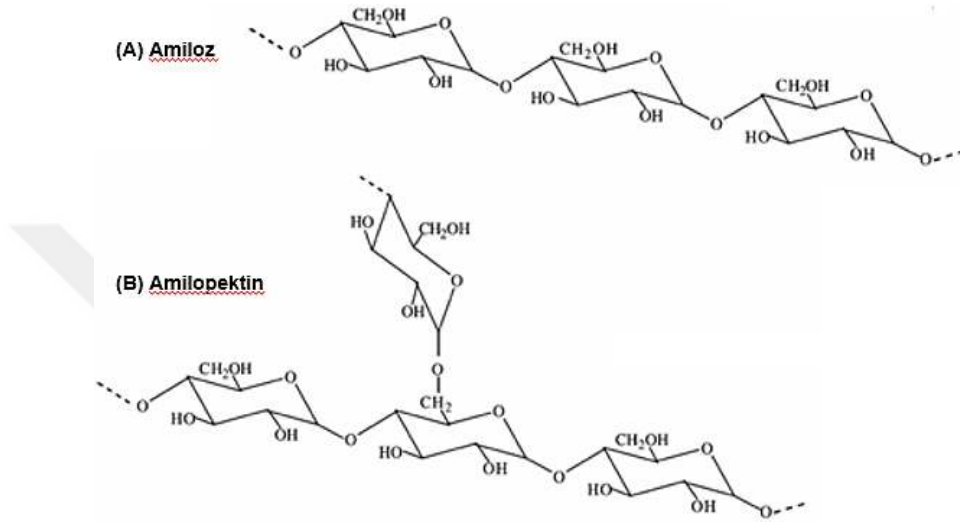
manyok, patates, kök ve sago palmyesi gibi bitkilerin kökleri ve yumrularından ve bitki saplarından elde edilmektedir. (Vaidya ve ark, 2015; Aiyer, 2005).

Nişasta, insan beslenmesinde metabolik enerjinin sağlanmasında önemli bir rol oynamaktadır. Gıda (özellikle yüksek fruktoz ve glukoz şurupları) ve deterjan gibi çeşitli endüstrilerde kimyasal ve/veya enzimatik olarak çeşitli ürünlere dönüştürülebilen önemli bir endüstriyel ham maddedir (Miao ve ark, 2011: Vaidya ve ark, 2015'den). Nişastanın hidrolizi için katalizör olarak asit veya enzim kullanılabilir. Ancak enzimatik hidrolizin daha az yan ürün oluşumu ve yüksek verim gibi birçok avantajı vardır. Nişastanın enzimatik hidrolizi uzun yıllardır endüstriyel ölçekte gerçekleştirilmekle beraber, her geçen gün artan şekilde geleneksel asit hidrolizi uygulamasının yerini almaktadır (Aiyer, 2005).

Nişasta, selülozdan sonra bitkiler tarafından en çok üretilen, karbon (C), hidrojen (H) ve oksijen (O) atomlarından oluşan, suda çözünmeyen granüllerden meydana gelen heterojen bir polisakkarittir. Nişasta molekülleri, yüzlerce veya binlerce glukoz biriminin glukozidik bağlarla bağlanması sonucu oluşmuştur. Glukozidik bağlar, alkali koşullarda stabil iken, asit veya bazı enzimler ile etkileşime girdiğinde hidrolize olmaktadır. Polimerik zincirin uç kısmında indirgeyici uç grubu olarak bilinen aldehit grubu bulunmaktadır (Hii ve ark, 2012). Nişasta ısıtıldığı zaman yapısını oluşturan glukoz birimlerini bir arada tutan hidrojen bağları zayıflamaya başlar. Bu durum, nişastanın şişmesini ve jelatinleşmesini sağlamaktadır (Aiyer, 2005). Nişastanın yüksek sıcaklıklarda jelatinleştirilmesi (100-110°C) ve sıvılaştırılması (80-90°C) için termofilik ve termostabil α -amilazlara ihtiyaç duyulmaktadır (Koç, 2015).

Nişasta, farklı yapılara ve özelliklere sahip olan amiloz ve amilopektin birimlerinden oluşan heterojen bir polisakkarittir (Şekil 1.2). Amiloz, α -1,4 glukozidik bağlarla bağlanmış 6000 kadar glukoz biriminden oluşan doğrusal bir glukoz polimeridir. Amilopektin, α -1,4 glukozidik bağlarla bağlanmış 10-60 kadar glukoz biriminden oluşan doğrusal kısa zincirin, α -1,6 glukozidik bağlarla

bağlanmış 15-45 glukoz biriminden oluşan yan zincirlere bağlanmasıyla meydana gelen bir glukoz polimeridir (Şekil 1.2) (de Souza ve de Oliveira e Magalhães, 2010).



Şekil 1.2. Nişastanın Yapısında Bulunan (A) Amiloz ve (B) Amilopektin Polimerlerinin Yapısı (de Souza ve de Oliveira e Magalhães, 2010)

Moleküler ağırlığı amilozunkinden 1000 kat daha fazla olan amilopektin, doğadaki en büyük moleküllerdendir. Amilopektinin sulu çözeltileri; yüksek viskozite, berraklık, kararlılık ve jelleşmeye direnç gösterme gibi özelliklere sahiptir. Amilopektin, iyot ile zayıf bağlanma gerçekleştirir ve kırmızı-kahverengi bir renk oluşur. Nişastanın ihtiva ettiği amilopektin seviyesi kaynağına göre değişmektedir. Örneğin; glukoz şurubu üretiminde kullanılan çoğu nişasta %75-85 oranında amilopektin içermektedir. Bu oran, birçok bitkide %60-90 arasında değişirken, pirinç, mısır, sorgum, arpa, bezelye ve patates çeşitlerinde yaklaşık %100'e ulaşmaktadır (Hii ve ark, 2012; Aiyer, 2005).

1.7. Amilazların Uygulama Alanları

Amilazlar; nişastanın sıvılaştırılması ve sakkarifikasyonunda, ilaç sanayisinde, tekstil endüstrisinde dokumada, nişastanın fermente edilebilir şekere dönüştürülmesinde, fermantasyonda, deterjan ve kâğıt endüstrisinde, tatlı şurupların hazırlanmasında, gıda endüstrisinde unun diyastaz içeriğinin artırılmasında, bebek mamalarının hazırlanmasında ve jöle üretiminde karışımdan nişastanın uzaklaştırılmasında, biyoetanol üretimi için nişasta içeriğine sahip ham maddenin hidrolizinde ve daha birçok endüstriyel alanda kullanılmaktadır (Saini ve ark, 2017; Vaidya ve ark, 2015). Amilazların kullanıldığı bazı endüstriyel alanlar şu şekildedir:

1.7.1. Nişastanın Sıvılaştırılması

Nişastanın sıvılaştırılması, çözünmeyen nişasta granüllerinin sulu solüsyonda dağılmasının sağlandığı ve termostabil amilazlar aracılığıyla kısmi hidrolizinin gerçeleştiği bir prosestir. Endüstriyel proseslerde sıvılaştırma işlemlerinde nişasta konsantrasyonu %30-40 düzeyinde tutulur (w/v) ve yüksek sıcaklıkta (90-110°C) jelatinleşme sağlanır. Jelatinleşmeden sonra viskozite yükselmektedir. Viskozitenin azaltılması ve nişastanın sıvılaştırılması için termostabil α -amilazlar kullanılmaktadır (Saini ve ark, 2017; Vaidya ve ark, 2015).

1.7.2. Fruktöz Şurubu ve Maltoz Üretimi

Yüksek fruktoz ihtiva eden şuruplar (HFCS), glukozun glukoz izomeraz ile hidrolize edilmesiyle hazırlanmaktadır. Bu şuruplar %42 oranında fruktoz içeriğine sahiptirler. Bu süreçte ilk olarak nişasta, enzimatik sıvılaştırma ve sakkarifikasyon yoluyla glukozla dönüştürülür (Aiyer, 2005).

Maltoz, şeker şurubunun ana bileşeni olan bir disakkarittir. Kristalleşme eğiliminin düşük olması ve higroskopik olmaması nedeniyle gıda endüstrisinde tatlandırıcı ve intravenöz şeker katkısı olarak kullanılmaktadır. Mısır, patates, tatlı

patates ve manyok nişastalarından üretilir. İmalatında termostabil α -amilazlar kullanılmaktadır (Saini ve ark, 2017).

1.7.3. Oligosakkarit Karışımının Üretimi

Oligosakkarit karışımı (maltooligomer karışımı), mısır nişastasının α -amilaz, β -amilaz ve pullulanaz ile hidrolize edilmesi sonucu elde edilmektedir. (Vaidya ve ark, 2015). Bileşiminde %2.2 glukoz, %37.4 maltoz, %46.4 maltotrioz ve %14 maltotetroz ve daha büyük maltooligosakkaritler yer almaktadır. Maltooligomer karışımı, higroskopik olması sebebiyle karıştırıldığı gıdanın nem düzenleyicisi olarak görev yapmaktadır. Düşük glukoz içeriğinden dolayı mısır şurubundan daha düşük viskoziteye sahip olup sükrozdan daha az tatlıdır. Sükroz ve diğer şekerlerin yerine kullanılmaktadır. Gıdalardaki sükrozun kristalleşmesini önlemek için de kullanılmaktadır (Saini ve ark, 2017).

1.7.4. Maltotetroz Şurubunun Üretimi

Maltotetroz şurubu (G4 şurubu), nişastanın maltotetroz oluşturan termostabil α -amilazlar ile hidrolizi sonucunda üretilmektedir. Sükrozdan %20 daha az tatlıdır ancak daha yüksek viskoziteye sahiptir. Maltotetroz şurubu, daha az glukoz ve maltoz içeriğine sahiptir. Suyun donma noktasını düşürdüğünden, dondurulmuş gıdaların donma noktalarını kontrol etmek için kullanılmaktadır. Parlaklık kazandırma özelliğinden dolayı kâğıt endüstrisinde de kullanımı yaygındır (Aiyer, 2005).

1.7.5. Tekstilde Nişastanın Giderimi

Tekstil dokumalarında, kumaş üretiminden önce ipliğe nişasta macunu uygulanır. Nişasta, dokuma esnasında kumaşa dayanıklılık sağlar. Kumaş dokunduktan sonra kumaşın üzerindeki nişasta α -amilazlar ile uzaklaştırılır. Bu aşamadan sonra kumaş boyanmaya hazır hâle gelir. Tekstil endüstrisinde α -

amilazlar, nişastayı hidrolize etmek ve çözünür hâle getirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. α -amilazlar, ağartma ve boyama işleminden önce nişastanın kumaştan uzaklaştırılması için haşıl sökme amacıyla kullanılmaktadır (Saini ve ark, 2017; de Souza ve de Oliveira e Magalhães, 2010).

1.7.6. Gıda Endüstrisi

Amilazlar; pişirmede, mayalamada, sindirime yardımcı olan ürünlerin hazırlanmasında, kek yapımında, meyve suları ve nişasta şurupları gibi çeşitli işlenmiş gıdaların üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Fırıncılıkta, un içindeki nişastayı maya tarafından fermente edilebilir daha küçük dekstrinlere indirgemek için α -amilaz ekmek hamuruna eklenir. Bu durum, fermantasyon oranını yükseltip hamurun viskozitesinin azalmasını sağlamakta, ürünün hacimini ve doku kalitesini artırmaktadır. Böylelikle ekmeğin tadı ve kabuğunun rengi iyileştirilmiş olur. α -amilaz, fermente edilebilir bileşiklerin üretiminde kullanılmasının yanı sıra, bayatlamayı önleyici etkiye sahip olduğundan pişmiş ürünlerin yumuşaklıklarını korumasına ve raf ömürlerinin uzamasına fayda sağlamaktadır (de Souza ve de Oliveira e Magalhães, 2010). Termotabil maltojenik amilazlar fırıncılık endüstrisinde ticari olarak kullanılmaktadırlar (Vaidya ve ark, 2015).

1.7.7. Biyoetanol Endüstrisi

Fosil yakıtların çok yüksek oranda çevre kirliliğine neden olması ve yüksek maliyeti sebebiyle biyoyakıtlara olan ilgi son yıllarda artmıştır (Saini ve ark, 2017). Etanol, en çok kullanılan sıvı biyoyakıt olup, tarımsal atıklar gibi yenilenebilir kaynaklardan ve ürünlerden üretilbilmektedir. Nişasta, düşük maliyetli ve dünyanın birçok bölgesinde kolaylıkla temin edilebilen bir ham madde olması sebebiyle, biyoetanol üretiminde en çok tercih edilen substrattır (de Souza ve de Oliveira e Magalhães, 2010).

Niştastanın etanol dönüşüm prosesi iki aşamalıdır: Niştastanın amilolitik mikroorganizma veya glukoamilaz ve α -amilaz gibi enzimler kullanılarak şekere dönüştürüldüğü sakkarifikasyon ve bu aşamayı izleyen *Saccharomyces cerevisiae* gibi fermantasyon yapan bir mikroorganizmanın şekeri etanole dönüştürdüğü fermantasyon aşaması (Öner ve ark, 2006: Vaidya ve ark, 2015'ten).

1.7.8. Kâğıt Hamuru ve Kâğıt Endüstrisi

Kâğıt hamuru ve kâğıt endüstrisinde maliyeti yüksek olan kimyasal uygulamalarının yerine α -amilazların kullanımı ile niştasta kaplanmış kâğıdın yapısındaki ham niştasta hidrolize edilmektedir (Saini ve ark, 2017). Kaplama işleminde kullanılan niştasta, kâğıdın yazım kalitesini iyileştirmek için kâğıdın yüzeyini yeterince yumuşak hale getirir ve kâğıdın dayanıklılığını artırır. Ancak bu uygulama için doğal niştastanın viskozitesi çok yüksektir. Bu nedenle mikrobiyal amilazlar kullanılmaktadır (de Souza ve de Oliveira e Magalhães, 2010).

1.7.9. Deterjan Endüstrisi

Deterjan enzimleri, dünya çapındaki enzim üretiminin yaklaşık %40'ını oluşturmaktadırlar. Bu nedenle deterjan endüstrisi modern endüstriyel biyoteknolojinin en büyük uygulama alanındandır. Enzimlerin deterjanlarda kullanılması deterjanların zorlu lekeleri giderebilme kabiliyetini arttırmakta ve deterjanı çevre açısından güvenli hâle getirmektedir (Hmidet ve ark, 2008).

Niştastalı gıda lekelerinin giderimi için çamaşır deterjanları, bulaşık deterjanları ve leke çıkarıcıların formülasyonlarında en çok tercih edilen enzimlerden biri α -amilazlardır. Özellikle alkalın amilaz, enzimatik deterjan karışımlarında en çok kullanılan ikinci enzim olup, bütün sıvı deterjanların %90'ının formülasyonunda yer almaktadır. Bu enzimler; meyve, çikolata, yemek sosu ve küçük oligosakkaritler gibi gıdalarda yaygın olarak bulunan niştasta

polimerlerinin yapısındaki glukozidik bağların hidrolizini katalizlemektedir (Vaidya ve ark, 2015).

1.7.10. Nişasta İşleme Tesislerinin Atık Suyunun Arıtılması

Gıda işleme tesislerinden çıkan atıklarda yüksek oranda nişasta kirliliği bulunmaktadır. Gıda işleme atık suyunun biyoteknolojik arıtımında mikrobiyal amilazlar kullanılmaktadır (Aiyer, 2005)

1.8. Pullulanazlar

Pullulanazlar (EC 3.2.1.41, α -dekstrin 6-glukanohidrolaz), pullulan, nişasta, β -limit dekstran, amilopektin ve benzer oligosakkaritlerin yapısındaki α -1,6-D-glukozidik bağları hidrolize ederek maltotrioz oluşumunu sağlayan endo etkili dallanmış yapıları hidrolize eden enzimlerdir (Asha ve ark, 2013). Bakteriler, mantarlar ve yüksek bitkiler gibi çeşitli organizmalardan elde edilmektedirler.

Mikrobiyal pullulanazlar, pullulanın yapısındaki α -1,6 glukozidik bağlara spesifik aktivite göstermeleri, büyük ölçekli endüstriyel proseslerde kolaylıkla üretilebilir oluşları ve nispeten düşük üretim maliyetleri nedeniyle ilgi çekici enzimlerdir. Pullulanaz üreticisi *Bacillus* türlerinden bazıları, *Bacillus acidopullulyticus*, *Bacillus deramificans* ve *Bacillus cereus* FDTA-13'tür (Liu ve ark, 2016; Asha ve ark, 2013).

Pullulanazlar, substrat spesifitelerine ve reaksiyon ürünlerine göre beş farklı kategoriye ayrılmaktadır:

1.8.1. Tip I Pullulanaz (Pullulan α -1,6-glukanohidrolaz, α -dekstrin endo-1,6-glukanohidrolaz, EC 3.2.1.41)

Pullulan, amilopektin, glukojen, α -limit dekstrin ve β -limit dekstrindeki α -1,6 glukozidik bağları hidrolize ederek maltotrioz ve doğrusal oligosakkaritleri

oluşturan enzimlerdir. Ancak α -glukanlardaki α -1,4 glikozidik bağları hidrolize etmezler (Nisha ve Satyanarayana, 2016).

1.8.2. Tip II Pullulanaz (Amilopullulanaz/ α -amilaz-pullulanaz, EC 3.2.1.1/EC 3.2.1.41)

Nişastanın, pullulanın ve limit dekstrinlerin yapısında bulunan α -1,4 ve α -1,6 glukozidik bağları hidrolize eden enzimlerdir. Pullulanın yapısındaki α -1,6 glukozidik bağları hidrolize ederek maltotrioz birimlerini, nişasta, amiloz ve amilopektinin yapısında bulunan α -1,4 glukozidik bağları hidrolize ederek glukoz birimlerini açığa çıkarmaktadır. α -amilaz veya β -amilaz gibi enzimlere ihtiyaç duymadan polisakkaritlerin tamamını basit şekerlere dönüştürebilme kabiliyetinden dolayı nişasta işleme endüstrisinde sıklıkla kullanılan önemli bir enzimdir. Her iki katalitik aktiviteye de sahip olma özelliğini nedeniyle amilopullulanaz veya α -amilaz-pullulanaz olarak tanımlanmaktadır (Nisha ve Satyanarayana, 2016; Hii ve ark, 2012; van der Maarel ve ark, 2002).

1.8.3. Tip I Pullulan Hidrolaz (Neopullulanaz, Pullulan-4-D-glukanohidrolaz, EC 3.2.1.135)

Pullulanın yapısındaki α -1,4 glukozidik bağları hidrolize ederek panoz (6-*O*- α -D-glukozil-maltoz) birimlerinin oluşumunu sağlamaktadır. Siklodekstrinler üzerinde oldukça aktiftir. Nişasta ve benzer polisakkaritlerin α -1,4 ve α -1,6 glukozidik bağlarını düşük bir verimlilikle hidrolize edebilmektedir (Hii ve ark, 2012).

1.8.4. Tip II Pullulan Hidrolaz (İzopullulanaz, Pullulan-4-glukanohidrolaz, EC 3.2.1.57)

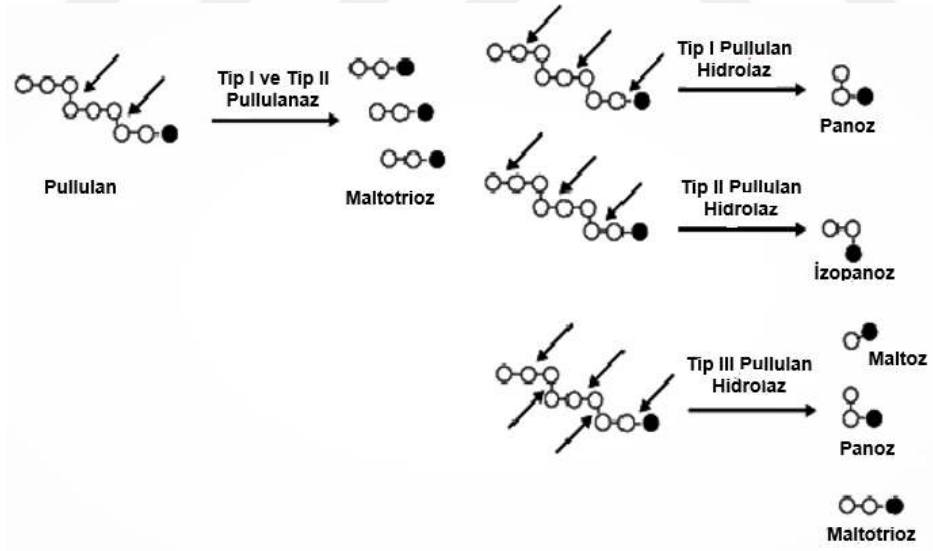
Pullulanın yapısında bulunan α -1,4 glukozidik bağları hidrolize ederek izopanoz (6-*O*- α -maltozil-glukoz) birimlerinin oluşumunu sağlamaktadır. Panozu

hidrolize ederek glukoz ve izomaltoz birimlerini meydana getirir. Neopullulanazların aksine bu enzim, nişastayı ve dekstranı hidrolize etmez (Hii ve ark, 2012; van der Maarel ve ark, 2002).

1.8.5. Tip III Pullulan Hidrolaz (EC 3.2.1.-)

Pullulanın yapısındaki α -1,4 ve α -1,6 glukozidik bağları hidrolize ederek maltotrioz, panoz, maltoz ve glukoz birimlerini meydana getirir (Liu ve ark, 2016; Li ve ark, 2015). Aynı zamanda nişastayı, amilozu, amilopektini, glukojeni ve siklodekstrini maltoz ve maltotrioz birimlerine dönüştürerek aktivite gösterir (Hii ve ark, 2012; van der Maarel ve ark, 2002).

Tip I pullulanaz, tip II pullulanaz ve tip I pullulan hidrolaz enzimleri, bakteriler ve arkealar tarafından üretilirken, tip II pullulan ve tip III pullulan hidrolaz, sırasıyla, mantarlar ve hipertermofilik arkealar tarafından üretilmektedir, (Şekil 1.3) (Nisha ve Satyanarayana, 2016).

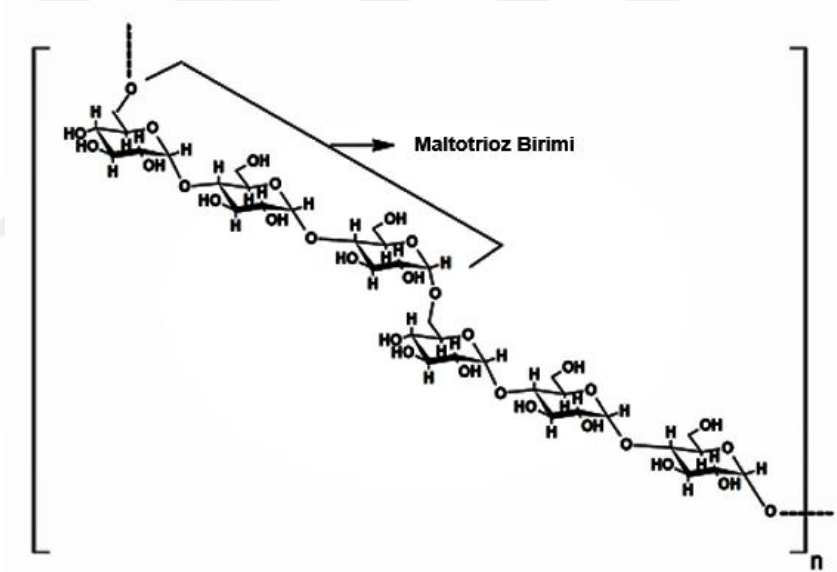


Şekil 1.3. Pullulanı Hidrolize Eden Enzimlerin Şematik Gösterimi (Bertoldo ve Antranikian, 2002)

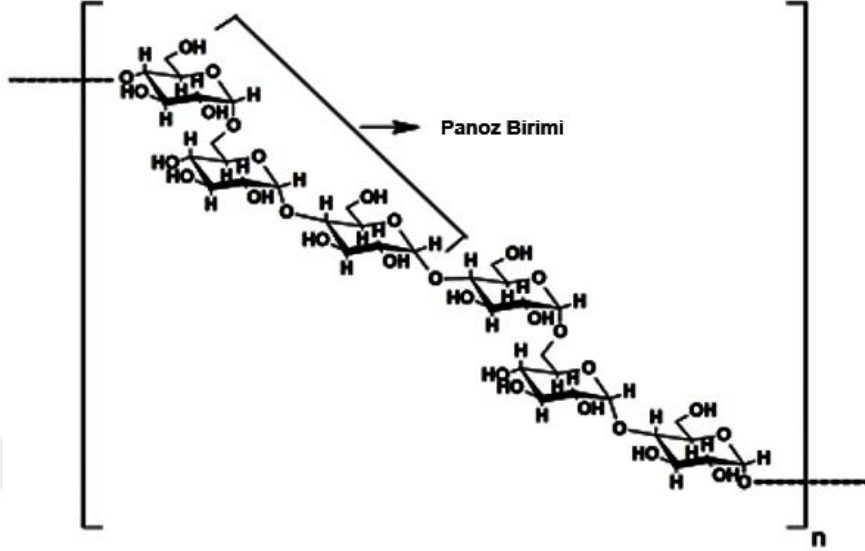
1.9. Pullulan

Pullulan, önceden *Pullularia pullulans* olarak bilinen *Aureobasidium pullulans* mantarı tarafından sentezlenen bir ekzopolisakkarittir. Pullulan, suda çözünerek renksiz ve viskoz bir çözelti oluşturur ancak etanol, metanol ve aseton gibi çözücülerde çözünmez (Nisha ve Satyanarayana, 2016).

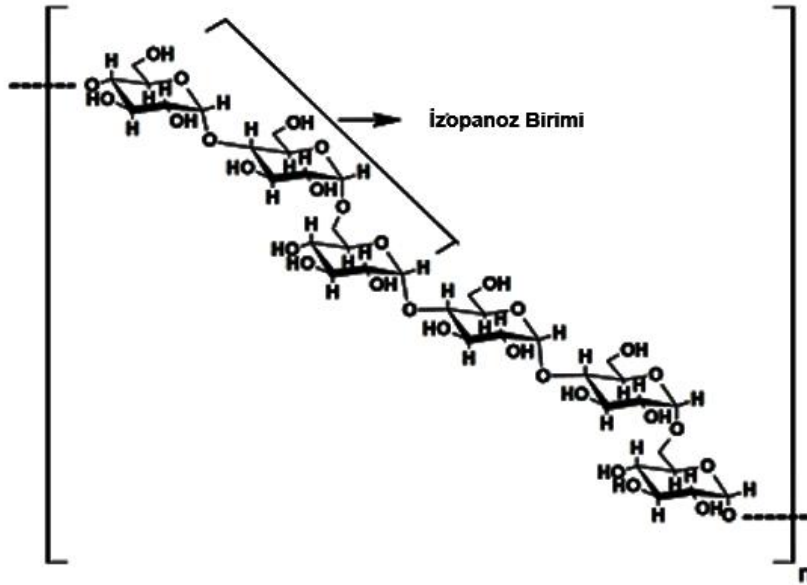
Pullulan, α -1,6 glukozidik bağlarla bağlanmış maltotrioz alt birimlerinden (Şekil 1.4), α -1,4 glukozidik bağlarla bağlanmış izopanoz (Şekil 1.5) veya panoz (Şekil 1.6) alt birimlerinden oluşan lineer bir glukoz homopolimeridir. Yapısında 2:1 oranında α -1,4-glukan ve α -1,6-glukan bağlarını içermektedir $\{-(1,4)\text{-}\alpha\text{-D-glukopranozil-(1,4)\text{-}\alpha\text{-D-glukopranozil-(1,6)\text{-}\alpha\text{-D-glukopiranozil}}\}$ (Singh ve ark, 2008).



Şekil 1.4. Tekrarlayan Maltotrioz Birimlerinden Oluşan Pullulanın Kimyasal Yapısı (Singh ve ark, 2008)



Şekil 1.5. Tekrarlayan Panoz Birimlerinden Oluşan Pullulanın Kimyasal Yapısı (Singh ve ark, 2008)



Şekil 1.6. Tekrarlayan İzopanoz Birimlerinden Oluşan Pullulanın Kimyasal Yapısı (Singh ve ark, 2008)

Pullulan, nişastanın dallanmış yapılarını hidrolize eden enzimlerin aktivitesinin belirlenmesinde model substrat olarak önemli bir rol oynamaktadır. Yapısındaki α -1,6 glukozidik bağlar, amilopektinin dallanma noktalarındakilere benzemektedir. Bu bağlanma şeklinin pullulanın yapısal esnekliğinden ve çözünürlüğünden sorumlu olduğu, bu ve diğer polisakkaritlerde görülmeyen film ve lif oluşumuna neden olduğu düşünülmektedir. Pullulan filmleri ve lifleri, petrolden üretilen sentetik polimere benzemektedir. Pullulan ürünleri yenilebilir ve biyolojik olarak parçalanabilir özelliktedir. Pullulan toksik, mutajen ve kanserojen olmamakla birlikte kokusuz ve tatsızdır. Kuru pullulan, beyaz renkli toz hâlinde olup higroskopik değildir. Sıcak veya soğuk suda kolaylıkla çözünür (Prajapati ve ark, 2013; Singh ve ark, 2008).

Araştırmalar, besin olarak alınan pullulanın prebiyotik olarak işlev gördüğünü ve bifidobakterilerin gelişimini desteklediğini öne sürmektedir. Pullulan; makarnalarda, pişmiş ürünlerde, içeceklerde ve soslarda düşük viskoziteli bir dolgu maddesi olarak kullanılabilir. Pullulan çözeltileri, arap zıncı benzeri nispeten düşük viskoziteye sahip olup, ısıya, pH değişimlerine ve çoğu metal iyonuna karşı karardır (Prajapati ve ark, 2013; Leathers, 2003).

Pullulan; gıda, ilaç, klinik ve sağlık hizmetleri endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Pullulan ve pullulan türevleri, yapışkan ve bağlayıcı özellikleri sayesinde yara iyileştiricilerinin bileşiminde, protez yapıştırıcılarında, ilaç kaplamalarında, ağız bakımı ürünlerinde, losyonlar ve şampuanlar gibi çeşitli kozmetik ürünlerinde, gıda yapıştırıcılarında bağlayıcı ve stabilizatör olarak, jöle yapımında, pastacılıkta yapıştırıcı olarak, fotografik, litografik (taş baskı) ve elektronik uygulamalarda kullanım alanı bulmuştur (Leathers, 2003). Pullulan; mekanik dayanıklılık, yapışkanlık, film oluşturabilme, enzimatik olarak parçalanabilme gibi birtakım özelliklere sahip olup, insan bağırsağındaki sindirim enzimlerine dayanıklı olduğundan ağız yolu ile alınan ilaçlarda taşıyıcı olarak kullanılabilir özelliktedir (Prajapati ve ark, 2013).

1.10. Pullulanazların Uygulama Alanları

Pullulanazlar, nişastanın endüstriyel sakkarifikasyonu uygulamalarında yaygın olarak kullanılan enzimlerdir. Maltoz, maltotrioz, panoz ve izopanoz şeker şuruplarının üretimi için genellikle glukoamilaz, α -amilaz ve β -amilaz ile birlikte kullanılmaktadır (Orhan, 2012). Bu enzim, endüstriyel nişasta dönüştürme işleminin toplam reaksiyon süresini ve maliyeti azaltır. Termostabil amilopullulanazlar, nişastanın sıvılaştırılması ve sakkarifikasyonu için oldukça kullanışlıdır. α -amilaz ve glukoamilaz gibi diğer amilolitik enzimlerin yerine kullanıldığında şeker üretim maliyetini düşürebilir (Duan ve Wu, 2015). Bu enzimler, aynı zamanda ekmek yapımında bayatlamayı önleyici olarak kullanılırlar. Panozun antikarogenik (diş çürüklerini önleyici) özelliği bulunmakta ve dental plaklarda kullanılmaktadır (Nisha ve Satyanarayana, 2016). Pullulanazların kullanıldığı bazı endüstriyel alanlar şu şekildedir:

1.10.1. Nişastanın Sakkarifikasyonu

Termofilik pullulanazların kullanıldığı temel uygulama alanı nişastanın sakkarifikasyon prosesidir. Amilopullulanazlar ve tip III pullulan hidrolazlar, hem α -1,4 glukozidik bağları hem de α -1,6 glukozidik bağları hidrolize ederek kompleks polisakkaritleri daha basit formlara dönüştürebilmektedir. Pullulanazın kullanımı, glukoz verimini %94 arttırır. Nişasta moleküllerinin amilaz ve pullulanaz enzimleri tarafından hidrolizi sonucu glukoz, maltoz ve maltotriozdan oluşan bir karışım meydana gelir. Sıvı hâldeki bu karışım, glukoz şurubudur. Glukoz şurubu, daha sonra glukoz izomeraz enzimi ile fruktoza dönüştürülerek fruktoz şurubu elde edilir. Gıdalarda tatlandırıcı olarak da bu fruktoz şurubu tercih edilir (Nisha ve Satyanarayana, 2016; Hii ve ark, 2012).

1.10.2. Maltoz ve Maltotrioz Şurubu Üretimi

Pullulanaz enziminin pullulanı hidrolize etmesi sonucu üretilirler. Yüksek maltozlu şuruplar hafif tatlılığa, düşük viskoziteye, düşük oranda higroskopikliğe ve termal stabiliteye sahiptir. Şekerleme ve dondurma gibi gıda alanındaki birçok uygulamada kullanım için oldukça uygundur. Son yıllarda, ilaç endüstrisinde intravenöz beslenme için D-glukoz yerine kan glukoz düzeyini yükseltmeyen maltoz kullanılmaktadır. Saf maltoz maltitol ve kristalin maltitol üretimi için de kullanılabilir (Nisha ve Satyanarayana, 2013).

Maltotrioz şurubu düşük donma noktasına ve hafif tatlılığa sahiptir, nem tutar ve yiyeceklerde nişastanın retrogradasyonunu (kristalleşmesini) önler. Maltoz şurupları, glukoz şurupları ve sükroza kıyasla, daha az renk oluşturma, yüksek ısı stabilitesine sahip olma, düşük viskoziteli çözelti oluşturma, yüksek oranda fermente edilebilirlik gibi birçok özelliğe sahiptir. Gıda endüstrisinde tatlı yapımında ve bira üretiminde, ilaç endüstrisinde ise intravenöz beslenmede kullanılmaktadır (Singh ve ark, 2010).

1.10.3. Panoz ve İzopanoz İçeren Şurupların Hazırlanması

Panoz ve izopanoz içeren şeker şurupları, intestinal *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* türlerinin proliferasyon ajanları olarak işlev görür. Bunlar diyet takviyesi gıdalar olarak kullanılırlar (Nisha ve Satyanarayana, 2016).

1.10.4. Fırıncılık

Bayatlama, çözünmüş nişastadaki amilopektinin retrogradasyonu sonucu meydana gelmekte olup, fırıncılık alanındaki en büyük sorundur. Kırıntı sertliğinin artışı, ekmeğin gevrekliğinin azalması, nem kaybı ve ekmek lezzetinin azalması gibi bayatlama etkileri, ürün kalitesinin bozulmasına neden olmaktadır (van der Maarel ve ark, 2002). Bu problem, kimyasal işlemlerle halledilebilir olmasına

rağmen, artık tüketicilerin doğal ürünlere olan talebi sebebiyle enzimatik işlemler daha çok tercih edilmektedir.

Amilopektin zincirinin kısaltılmasıyla bayatlama süreci geciktirilebilir. α -amilaz, ekmeek yapımında kullanıldığında dallanmış maltodekstrinler üretilmekte ve bu yapılar ekmeğin yapışkan bir yapı kazanmasına neden olmaktadır. Dallanmış yapıları hidrolize eden enzimlerden olan amilopullulanaz ve pullulanaz (α -amilaz ile birlikte), dallanmış maltodekstrinleri hidrolize ederek unlu mamullerde yapışkan yapının oluşumunu engeller. Amilopullulanazlar, bayatlamayı önleyici enzimatik muamelede önemli bir rol oynamakta ve pişmiş mamullerin raf ömrünü uzatmaktadır (Nisha ve Satyanarayana, 2016).

1.10.5. Deterjan Endüstrisi

Alkali pullulanazlar, alkali koşullar altında nişastalı lekelerin giderimi için bulaşık ve çamaşır deterjanlarının formülasyonlarında katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Bu enzimler, alkali α -amilazlar ile birlikte kullanıldığında deterjanın yıkama performansı artmaktadır (Asha ve ark, 2013). Nişastadaki hem α -1,4 glukozidik hem de α -1,6 glukozidik bağları hidrolize eden amilopullulanazlar, deterjan endüstrisi için oldukça önemli enzimlerdir (Hii ve ark, 2012).

1.11. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada, farklı bölgelerden alınan toprak örneklerinden, amilaz ve pullulanaz üreticisi nötral ve asidik *Bacillus* sp. suşlarının izolasyonu, suşların moleküler düzeyde tanımlanması, suşlardan amilaz ve pullulanaz enzimlerinin elde edilmesi, enzimlerin farklı parametreler açısından karakterize edilerek özelliklerinin belirlenmesi, biyoteknolojik ve endüstriyel uygulamalardaki kullanılabilirliklerinin araştırılması amaçlanmıştır.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Al-Johani ve ark (2017), Suudi Arabistan'ın Gazan İlinin bölgesel sıcak su kaynaklarından termofilik amilaz üreticisi bakteri izole etmişlerdir. Suşun 16S rRNA filogenetik analizi sonucunda, *Bacillus subtilis* ile aynı sekansa sahip olduğunu saptamışlardır. *B. subtilis*'in maksimum amilaz üretimini %0.5 nişasta ve 10 g/L pepton içeren pH'ı 8.5 olan besi yerinde, 45°C'de 48 saatlik inkübasyon sonunda gerçekleştirdiğini bildirmişlerdir.

Paul ve ark (2017), *Bacillus* sp. MB6 suşu ile yaptıkları çalışmada suşun amilaz enzimi üretimini gerçekleştirdiği inkübasyon koşullarını pH 6.0, 37°C ve 48 saat olarak belirlenmişlerdir. Suştan elde ettikleri amilaz enziminin optimum aktivite koşulları pH 6.0 ve 55°C'dir ve enzimin aktivitesi için en uygun reaksiyon süresi 30 dakika olarak belirlenmiştir.

Pereire ve ark (2017), araştırmalarında *Cryptococcus flavus*'tan elde ettikleri α -amilaz enzimini kromatografi (Q-Sepharose) ve jel filtrasyonu (Sephacryl S-100) saflaştırmışlardır. SDS-PAGE analizi ile enzimin moleküler ağırlığının 67 kDa olduğunu belirlemişlerdir. İmmobilize enzimin optimum aktivite gösterdiği pH 4.5, optimum sıcaklık ise 50°C bulunmuştur. İmmobilize enzimin optimum sıcaklığının serbest enzimin optimum sıcaklığı ile aynı olduğunu belirtmişlerdir. α -amilaz enziminin nişastayı hidrolize etmesiyle reaksiyon ürünü olarak maltoz, maltotrioz ve maltotetroz açığa çıkmıştır.

Simair ve ark (2017), termofilik *Bacillus* sp. BCC 01-50 suşunun α -amilaz enzimini üretmesi için fermentasyon koşullarının optimizasyonunu ve amilazın karakterizasyonunu çalışmışlardır. Besi yerinde bakteriyel gelişimin ve amilaz üretiminin 60 saatlik inkübasyon sonunda gerçekleştiğini saptamışlardır. Enzim üretimi sırasında besi yeri bileşenleri, sıcaklık, pH, çalkalama hızı ve inokulum miktarı optimize edilmiştir. En yüksek enzim sentezi suşun şeker kamışı besi yerinde, 60 saatlik inkübasyon sonunda, 150 rpm çalkalama hızında, 50°C'de ve

pH 8.0 koşullarında gerçekleşmiştir. Ham amilaz pH 9.0'da ve 65°C'de maksimal aktivite göstermiştir. Enzim, pH 9.0-10.0 ve 60-70°C aralığında stabilitesini korumuştur. Ham enzimin deterjan endüstrisi ve nişastalı materyallerin sakkarifikasyonu ile ilgili uygulamalarda yüksek kullanım potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir.

Zhang ve ark (2016), *Anoxybacillus* sp. YIM 342 suşundan ekstraselüler termofilik α -amilaz (1,4- α -D-glukanohidrolaz, EC 3.2.1.1) enzimini elde ederek önce ultrafiltrasyon, daha sonra amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz ile kısmi olarak saflaştırmışlardır. Saflaştırılmış α -amilazın moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile 68 kDa olarak belirlemişlerdir. Enzimin optimum aktivite sıcaklığını 80°C ve pH'ını 9.0 olarak bulmuşlardır. Enzimin amiloz ve amilopektini yüksek oranlarda hidrolize etmesinden dolayı nişastanın sıvılaştırılması uygulamalarında önemli bir potansiyele sahip olacağını bildirmişlerdir. Çözünür nişastayı glukoz, maltoz ve maltotrioza kadar hidrolize eden enzimin, biyoyakıt endüstrisi ile ilgili uygulamalar için kullanılabilir özellikte olduğunu bildirmişlerdir.

Parashar ve Satyanarayana (2016), *E. coli* ve *P. pastoris* klonlama kombinasyonunu kullanarak, *Bacillus acidicola* TSAS1 suşuna ait ekstraselüler asit-stabil α -amilaz (Ba-amy) enzimini rekombinant olarak üretmişlerdir. *P. pastoris*'te eksprese edilen saf Ba-amy enziminin, glukoprotein yapısında, optimum aktivitesini pH 4.0'te ve 60°C'de gösteren, 66 kDa büyüklükte bir molekül olduğu belirtmişlerdir. Enzim nişastayı maltoz (%30), maltotrioz (%20) ve diğer maltooligosakkaritleri meydana getirecek şekilde hidrolize etmiştir. Bu özellikleri nedeniyle, enzimin fırıncılıkta bayatlamayı önleyici olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğunu belirlemişlerdir.

Song ve ark (2016), derin deniz bakterisi olan *Luteimonas abyssi* XH031T suşundan elde ettikleri yüksek aktiviteli alkalifilik alfa-amilaz (LaaA) enzimi ile ilgili bölgeyi klonlayarak *Escherichia coli* BL21 suşunda eksprese etmişlerdir. Enzimin optimum aktivitesi pH 9.0'da 8881 U/mg olarak belirlenmiştir. Enzimin

pH 6.0-11.0 aralığında ve 45°C'den daha düşük sıcaklıklarda da aktivitesini koruduğu bildirilmiştir (10°C'de %38 kalan aktivite). Ayrıca, 1 mM Na⁺, K⁺ ve Mn²⁺ iyonlarının LaaA enziminin aktivitesini artırdığı bulunmuştur. Bu sonuçlar, LaaA enziminin, deterjan endüstrisinde kullanılabilecek potansiyele sahip, alkali-tolerant ve yüksek aktiviteli bir enzim olduğunu göstermektedir.

Wang ve ark (2016), izole ettikleri amilaz üreticisi WangLB suşunun 16S rDNA analizine göre *Bacillus* cinsine ait olduğunu bildirmişlerdir. Suşun amilaz enzimini ürettiği koşulları optimize ettiklerinde, en yüksek üretimin 35°C'de, pH 10.0'da, %1 (v/v) inokulum miktarında, 20 g/L nişasta ve %0.1 pepton içeren sıvı besi yerindeki 48 saatlik inkübasyon sonucunda elde edildiğini bulmuşlardır. Bu koşullarda üretilen enzimin spesifik aktivitesi 26.670 ± 1390 U/mL olarak hesaplanmıştır. Enzimin moleküler ağırlığını SDS-PAGE analizinde 55 kD, optimum aktivite sıcaklığını 55°C ve optimum pH değerini 9.0 olarak bulmuşlardır. Enzimin geniş sıcaklık (50-85°C) ve pH (3-10) aralıklarında oldukça yüksek aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Nithya ve ark (2016), palmye ağaçlarının ekili olduğu alanlardan aldıkları 5 toprak örneğinden toplamda 56 bakteri suşu izole etmiş ve bu suşların amilaz sentezleme yeteneklerini belirlemişlerdir. Toplamda 24 izolatin amilaz aktivitesine sahip olduğunu görmüşlerdir. Bu suşlardan, KSU-6 izolatu maksimum amilaz enzim üretimi (37.52 U/mL) gerçekleştirmiştir ve izolat *Bacillus licheniformis* KSU-6 olarak tanımlanmıştır. Araştırmacılar, gerçekleştirdikleri enzim üretim optimizasyonu çalışmalarında, %0.2 (v/v) nişasta, %5 (w/v) pepton ve %0.3 (v/v) malt ekstraktı içeren ve pH'ı 10.0 olan besi yerine %2 (v/v) organizma aşılması yaptıklarında, 50°C'deki 44 saatlik inkübasyon sonucunda en yüksek üretim değerine ulaştıklarını bildirmişlerdir. Kısmi saflaştırma ile elde edilen amilaz enziminin, pH 12.0 ve 80°C'de, 1-2 M tuz ve 10 mM konsantrasyondaki farklı deterjanlar kullanıldığında stabil kaldığını bulmuşlardır. *Bacillus licheniformis* KSU-6 suşundan üretilen amilazın alkali ve termostabil karakterde bir enzim olup,

nişastanın sıvılaştırılması ve deterjan endüstrilerinde kullanılabilecek özelliklere sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Zhou ve ark (2015), derin deniz sedimentlerinden izole ettikleri *Flammeovirga pacificai* suşundan termostabil özellikteki α -amilaz (Amy16) enzimini elde etmişlerdir. Enzim üretimi için *Escherichia coli*'ye klonlama yapılarak heterolog ekspresyon ile elde edilen rekombinant amilaz enzimi, nikel (Ni^{+}) afinite kolonu ile saflaştırılmıştır. Rekombinant Amy16 enziminin, 50°C 'de oldukça aktif olduğu, 60°C 'de 20 dakikalık inkübasyondan sonra başlangıç aktivitesinin %81'inden fazlasını koruduğu bulunmuştur. Amy16 amilaz enziminin optimal aktivitesini pH 6.5'de göstermekle birlikte alkali koşullara toleransının yüksek olduğu saptanmıştır. Mg^{+2} , Sr^{+2} , Na^{+} ve K^{+} 'nın düşük konsantrasyonları Amy16 enziminin aktivitesini bir miktar arttırmıştır. İnce tabaka kromatografisi analizi sonuçları, Amy16 enziminin nişastayı, zamana bağlı bir şekilde, maltoza kadar hidrolize ettiğini, enzimin sıvı tip hidrolizde etkili bir endoenzim olduğunu bildirmişlerdir. Bu sonuçlara göre, enzimin deterjan formülasyonunda kullanıma uygun olabileceği belirtilmiştir.

Liu ve ark (2015), soya sosundan amilaz enzimi üreticisi *Bacillus subtilis* ZJ-1 suşunu izole etmişlerdir. Bu suştan elde edilen α -amilazın spesifik aktivitesi 542.7 U/mg protein olarak belirlenmiştir. Enzimin moleküler ağırlığı 58 kD olarak bulunmuştur. Enzim maksimum aktivitesini pH 5.0'te ve 50°C 'de göstermiştir. Enzim 40°C 'de başlangıç aktivitesini 89.4 ± 3.0 düzeyinde korumuştur. Enzim aktivitesini, 5 mM CaCl_2 varlığında, 40°C 'deki 60 dakikalık inkübasyondan sonra pH 4.0 ve 5.0'te, sırasıyla, 87.7 ± 3.7 ve 63.4 ± 2.9 oranlarında korumuştur. Amilaz enzimine ait bu özellikler, enzimin tavuk sindirim sistemi koşullarında (pH 3.5-7.0, 40°C) aktivite gösterebileceğini ve bu alanda kullanılması durumunda nişastayı yüksek düzeyde hidrolize edebilme potansiyeline sahip olabileceğini desteklemektedir. Enzim 80°C 'de 5 dakika inkübe edildiğinde orijinal aktivitesini 78.4 ± 3.6 oranında koruduğu bulunmuştur. Bu özellikler enzimin hayvan yemi

(özellikle tavuk yemi) üretiminde kullanım potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

Dawood ve ark (2015), SUDK1, SUDK2, SUDK4 ve SUDO kodlu *Bacillus licheniformis* izolatlarından elde ettikleri ekstraselüler amilaz enzimlerinin üretimi, saflaştırılması ve kısmi karakterizasyonu ile ilgili çalışmalar gerçekleştirmişlerdir. Ekstrakte edilen enzimler, DEAD Sephadex A-25 jel filtrasyonu ile kısmi olarak saflaştırılmıştır. Bu enzimlerin aktivitesi (83.343-121.755 U/mg protein), ham enzimlerle kıyaslandığında (4.626-7.250 U/mg protein) yaklaşık olarak 16.8-18.3 kat daha yüksek bulunmuştur. Enzimatik reaksiyon ürünleri ince tabaka kromatografisi kullanılarak belirlenmiştir. Kromatografi sonucunda elde edilen verilere göre, amilaz enzimleri nişastayı hidrolize ederek, maltoz ve çeşitli maltooligosakkaritler meydana getirmişlerdir ve bu enzimler α -amilaz olarak tanımlanmışlardır. Enzimlerin optimum aktivitesi 60-70°C aralığında elde edilirken, 90°C'ye kadar %30-50 oranında kalan aktivite değeri ölçülmüştür. Tüm enzimler optimum aktivitelerini pH 7.0'de göstermekle birlikte, pH 6.0-9.0 aralığında stabilizeye sahiptirler. İzole edilen α -amilaz enzimlerinin geniş sıcaklık ve pH aralıklarında stabiliteyi korumaları, enzimlerin gıda, yem, tekstil ve birçok endüstriyel uygulama için potansiyel adaylar olduklarını göstermektedir.

Ementania ve ark (2015), *Bacillus subtilis* DR8806'ten elde ettikleri ekstraselüler α -amilaz genini pET28a (+) vektörüne klonlayarak *Escherichia coli* BL21 (DE3) suşunda eksprese etmişlerdir. Rekombinant enzimin moleküler ağırlığı 76 kDa olarak bulunmuştur. Enzim optimum aktivitesini pH 5.0'te ve 70°C'de göstermekle birlikte, pH 4.0-9.0 ve 45-75°C aralığında oldukça stabildir. İzole edilen α -amilazın aktivitesi Na^+ , K^+ ve Ca^{+2} iyonları varlığında artarken, Zn^{+2} , Pb^{+2} ve Hg^{+2} iyonlarıyla inhibe olmuştur. Rekombinant α -amilaz enzimi, SDS ve CTAB gibi deterjanların bulunduğu koşullarda yüksek düzeyde stabil kalmıştır. Reaksiyon ortamındaki organik çözücüler α -amilaz aktivitesini arttırmıştır. TLC analizinde nişastanın maltotrioz ve maltoza hidrolize olduğu saptanmıştır.

Rekombinant α -amilaz enziminin özellikleri enzimi endüstriyel kullanımlar için potansiyel aday yapmaktadır.

Singh ve ark (2014), *Streptomyces* sp. MSC702 suşundan elde ettikleri α -amilazı kısmi olarak saflaştırdıktan sonra enzimin biyokimyasal karakterizasyonunu yapmışlardır. Enzimin optimum pH, sıcaklık ve inkübasyon süresini, sırasıyla, 5.0, 55°C ve 30 dakika olarak belirlemişlerdir. Ekstraselüler ekstrakt amonyumsülfat presipitasyonu ile konsantre edilmiştir. Enzim, 5 mM K⁺, Co⁺² ve Mo⁺² iyonlarında stabilitesini korurken, Pb⁺², Mn⁺², Mg⁺², Cu⁺², Zn⁺², Ba⁺², Ca⁺², Hg⁺², Sn⁺², Cr⁺³ ve Al⁺³ iyonlarına maruz kaldığında aktivitesinin inhibe olduğu bulunmuştur. Enzim aktivitesinin %1 Triton X-100, %1 Tween 80, 5 mM sodyum lauril sülfate, %1 gliserol, 5 mM EDTA ve 5 mM üre içeren ortamlarda stabilitesini kaybetmiştir. Enzim 60°C'de ve pH 5.0'te, maksimum aktivite göstermiştir. Elde edilen α -amilaz enzimi, 60°C'de ve pH 7.0'de, 1 saat süreyle, sırasıyla, %100 ve %34.18 oranlarında stabil kalmıştır. Yapılan analizler sonunda elde edilen veriler enzimin endüstriyel kullanıma uygun olduğunu göstermiştir.

Chanda ve ark (2014), *Bacillus* sp. KR-8104 suşundan α -amilaz enzimi elde etmişler ve pamuklu kumaşın haşılama işleminde kullanılabilirliği açısından denemişlerdir. Optimum enzim üretimini, 45°C'de, pH'sı 5.0 olan ve azot kaynağı olarak soya tozu ile tavuk dışkısı içeren ve pH'ı 6.0 olan ve azot kaynağı olarak et tozu ile tavuk dışkısı içeren besiyerlerinde gerçekleştirmişlerdir. Optimum haşılama koşulları 40-45°C, pH 5.0-6.0 ve 10 saat olarak tespit edilmiştir.

Aygan ve ark (2014), meyve bahçesinden alınan topraklardan *Bacillus subtilis* A10 suşunu izole etmiş ve amilaz sentezinin pH 7.0-11.0 aralığında, optimum 37°C'de gerçekleştiğini belirlemişlerdir. SDS-PAGE analizi sonunda enzimin moleküler ağırlığının tek banttı olduğunu ve 46.9 kDa olduğu bulunmuştur. Enzim optimum aktivitesini pH 8.5'te ve 45°C'de göstermiştir. Amilaz enziminin termal stabilitesinin 20-50°C aralığında ve 30 dakikalık inkübasyon sonunda %89.5 olduğu bulunmuştur. Enzimin pH stabilitesi, pH 7.0-

10.0 aralığında ve 15 dakikalık inkübasyon sonunda ortalama %84.9'dur. Enzim SDS ve EDTA ile reaksiyona girdiğinde aktivitesini, sırasıyla, %48.4 ve %75.9 korumuştur. Na₂SO₃ ve β-Merkaptoetanol enzim aktivitesini etkilememiştir. Alkalifilik amilaz enziminin atık kağıt, nişasta ve biyoetanol endüstrilerinde kullanılabilirlik açısından uygun özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir.

Asoodeh ve ark (2014), *Bacillus* sp. DR90 suşundan α-amilaz genini izole ederek pET28a (+) vektörüne aktarmışlardır ve *Escherichia coli* BL21 (DE3) suşunda eksprese etmişlerdir. Rekombinant enzimin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile 76 kDa olarak bulunmuştur. Enzim, optimal aktivitesini pH 4.0'te ve 75°C'de göstermekle birlikte, geniş pH ve sıcaklık aralığında aktiviteye sahiptir. Amilaz aktivitesi kalsiyum iyonları varlığında artmamıştır. Enzim, SDS, üre ve EDTA'ya karşı iyi derecede stabiliteye sahip olmasının yanı sıra, çeşitli katı ve sıvı deterjanlarla da oldukça uyumluluk göstermiştir. Tüm bu özellikleriyle enzimin gıda ve deterjan endüstrileri için uygun bir aday olduğu görülmüştür.

Kalpna ve Pandian (2014), Palk Körfezi'nin sedimentlerinden izole ettikleri halotolerant *Bacillus subtilis* S8-18 suşundan elde ettikleri α-amilaz enziminin karakterizasyonu yapmışlardır. Elektroforetik analize göre, enzim 57 kDa moleküler ağırlığa sahip bir monomerdur. Enzim optimum aktivitesini 60°C'de ve pH 6.0'da göstermiştir. pH 4.0-12.0 aralığında 24 saat süreyle %84-94 aktiviteye sahiptir. Enzim 24 saatten sonunda aktivitesini %72 oranında koruyarak %28'lik NaCl konsantrasyonuna tolerans göstermiştir. α-amilaz enzimi, divalent metal iyonlarının 1 mM'lık konsantrasyonunda aktivitesini minimum %93 oranında korumuştur. S8-18 α-amilaz 1 mM EDTA'dan etkilenmemiştir ve 5 mM EDTA konsantrasyonunda aktivitesinin %96'sını korumuştur. Enzim %1 SDS konsantrasyonunda aktivitesinin %68'ini korumuştur. %1 TritonX-100 ve Tween 80 ile %85 kalan aktivite değerine sahiptir.

Kumari ve ark (2013), *Bacillus cereus* MTCC 10205 suşundan elde ettikleri amilaz enziminin SDS-PAGE analizinde moleküler ağırlığın 55 kDa olan bir bant

elde etmişlerdir. Saflaştırılan enzim optimum aktivitesini 55°C’de ve pH 5.5’te göstermiştir. Enzim, yüksek sıcaklıklardaki 90 dakikalık inkübasyondan sonra orjinal aktivitesini %72 korumuştur. Buna karşılık, 60°C’de 90 dakikalık inkübasyondan sonra tamamen inaktif olmuştur. Enzim 4°C’de 5 güne kadar oldukça stabil kalırken, aktivitesinin %10’unu kaybettiği görülmüştür. Buna karşılık, 35°C’de 3 gün sonunda aktivitesinin %28’ini kaybettiği belirlenmiştir. Yapılan inhibisyon çalışmaları, enzimin aktif bölgesinde SH gruplarını içerdiğini açığa çıkarmıştır.

Sharma ve Satyanarayana (2013a), asidofilik bakteri *Bacillus acidicola*’dan izole ettikleri ve nişastanın sakkarifikasyon proseslerine oldukça uygun olan asidik amilaz (BAamy) enzimi ile çalışmışlardır. Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık 60°C ve pH 4.0 olarak bulunmuştur.

Sharma ve Satyanarayana (2013b), *Bacillus acidicola* bakterisinden elde edip saflaştırdıkları asidik α -amilaz enziminin moleküler ağırlığını 66.0 kDa olarak hesaplamışlardır. Enzim optimum aktivitesini pH 4.0’te ve 60°C’de göstermektedir. Tween 20, 40 ve 80 enzim aktivitesini arttırırken, SDS ve Triton X-100’ün düşük konsantrasyonları bile enzimi inhibe etmiştir. EDTA, β -merkaptotanol enzim ektivitesi üzerinde düşük oranda inhibitörük etki göstermiştir. PMSF ve Hg⁺² enzim aktivitesini inhibe etmiştir. Farklı sıcaklıklarda yapılan termodinamik çalışmalarına göre enzim termostabil özelliktedir. Enzim ham nişastayı hidrolize etme yeteneğinde olup, nişastanın jelatinizasyonu için gerekli olan 105°C’lik alt jelatinizasyon sıcaklığı için uygun özelliktedir.

Ozturk ve ark (2013), Türkiye’deki kaplıcalardan elde ettikleri 597 adet bakteri izolatının ekstraselüler α -amilaz üretme kabiliyetlerine bakmışlardır. Bunların arasından, yüksek miktarda enzim üreten *Bacillus subtilis* A28 izolatını seçmişler ve bu suşun α -amilaz genini *Escherichia coli*’ye klonlamışlardır. Enzim optimum aktivitesini 70°C’de ve pH 6.0’da göstermiştir ve pH 4.5-7.0 aralığında oldukça yüksek aktiviteye sahiptir. Amy28 α -amilaz, 50°C’de 90 dakika inkübe

edildikten sonra aktivitesinin %100'ünü korumuştur. Co^{+2} , Cu^{+2} , Fe^{+2} , Fe^{+3} , Ni^{+2} ve Zn^{+2} enzim aktivisinde önemli oranda inhibisyona neden olurken, Na^{+} , Mg^{+2} , Li^{+} ve Ba^{+2} enzim aktivitesini etkilememiştir. 10 mM EDTA ile muamele edilen enzimin aktivitesi %70'in üzerinde inhibe olmuştur. Diğer amilazlar için yüksek sıcaklık stabilizatörü olarak bilinen Ca^{+2} iyonları, Amy28 enziminin aktivitesini stimule etmemiştir. pH ve sıcaklık stabilitesi verilerine göre, Amy28 α -amilaz, nişastanın işlenmesinde, mayalama ve gıda endüstrilerinde kullanıma uygun bir enzimdir.

Deb ve ark (2013), *Bacillus amyloliquefaciens* P-001 suşundan elde ettikleri ekstraselüler amilaz enziminin kısmi karakterizasyonunu yapmışlardır. Maksimum enzim üretimi, %1 (v/v) bakteri inokülasyonu sonucunda pH 9.0'da, 42°C'de, 150 rpm çalkalama yapılarak 48 saatlik inkübasyon koşullarında elde edilmiştir. Ham amilazın optimum aktivite verimi 40 dakikalık inkübasyon sonunda pH 6.5'te ve 60°C'de elde edilmiştir. Enzim 50°C'de 30 dakikalık ön inkübasyondan sonra orijinal aktivitesini %73 korumuştur. Enzimin aktivitesi Ca^{+2} ile artarken (%146.25), Mn^{+2} , Zn^{+2} ve Cu^{+2} enzim aktivitesini inhibe etmiştir. Mg^{+2} ve Fe^{+2} enzim aktivitesini çok az miktarda etkilemiştir.

Roy ve Mukherjee (2013), Kuzeydoğu Hindistan'ın Assam bölgesinden aldıkları toprak örneklerinden elde ettikleri alkalofilik bakteri suşu moleküler tanımlama sonucunda *Bacillus licheniformis* AS08E olarak adlandırılmıştır. Suş, α -amilaz enzimini pH 12.5'te sentezlemiştir. Elde edilen amilazın moleküler ağırlığı yaklaşık 55 kDa olarak belirlenmiştir. Saflaştırılan enzim optimum aktivitesini pH 10.0'da ve 80°C'de göstermiştir. Çeşitli surfaktanlardan, organik çözücülerden ve ticari çamaşır deterjanlarından etkilenmeyen α -amilazın, nişasta ile reaksiyonu sonucunda meydana gelen reaksiyon ürünleri TLC sisteminde analiz edilerek son ürünün maltoz olduğu belirlenmiştir. Bu enzimin özellikleri, enzimin gıda ve deterjan endüstrileri için uygun olduğunu göstermektedir.

Li ve ark (2013a), *Bacillus lentus* JNU3 suşundan elde ettikleri izoamilaz genini *Pichia pastoris*'e klonlayarak eksprese etmişlerdir. Saflaştırılan rekombinant enzimin moleküler ağırlığı 90 kDa, optimal aktivite sıcaklığı 70°C, optimum pH değeri 6.5 olarak bulunmuştur. Enzim 30-70°C aralığında yüksek düzeyde stabilite göstermiştir ve bu özellikleri açısından nişastanın hidroliz işlemleri için uygun bir enzim olduğu belirlenmiştir.

Abdel-Fattah ve ark (2013), termotolerant *B. licheniformis* AI20 izolatından α -amilaz enzimi üretmek için %1 nişasta, %0.75 maya özütü ve %0.02 CaCl₂ içeren besi yerini kullanmışlardır. Enzimin sipesifik aktivitesi 384 U/mL, moleküler ağırlığı ise 55 kDa bulunmuştur. α -amilazın aktivite gösterdiği optimal sıcaklık ve pH değerleri, sırasıyla, 60-80°C ve 6-7.5'tir. Enzim çeşitli çözücülere karşı oldukça iyi bir stabiliteye sahiptir. Enzim aktivitesi SDS, EDTA ve EGTA gibi deterjan ve şelatörlerden düşük düzeyde etkilenmiştir. Buna karşılık, 0.1 mM konsantrasyonda iki değerlikli metal iyonlarına karşı %100 stabilite göstermiş, 10 mM Cu⁺² ve Zn⁺² ise enzim aktivitesini, sırasıyla, %25 ve %55 oranında düşürmüştür.

Li ve ark (2013b), yeni izole ettikleri termofilik *Bacillus* sp. CICIM 304 suşundan yeni termostabil izoamilaz (IAM) enzimini saflaştırmışlardır. Saflaştırılan monomerik proteinin moleküler ağırlığı 100 kDa olarak hesaplanmıştır. Enzimin optimal aktivitesi 70°C'de ve pH 6.0'da gerçekleşmekle birlikte, enzim 30-70°C ve pH 5.5-9.0 aralıklarında oldukça iyi stabiliteye sahiptir. Bu özellikleri gösteren ve yeni tanımlanan izoamilaz enzimi, endüstriyel nişasta dönüşüm proseslerinde kullanılabilir.

Samie ve ark (2012), hiper asidofil ve termostabil *Micrococcus* sp. NS 211 (M.Amy NS 211) suşundan amilaz enzimi izole etmişlerdir. İzolasyon sırasında bakteriyi nişastalı agarda ve 85°C'de inkübe etmişlerdir. M.Amy NS 211 amilaz enziminin, 70-110°C ve pH 1.2-8.0 aralığında aktiviteye sahip olduğu, optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerinin 85°C ve pH değerinin 3.5 olduğu

belirlenmiştir. SDS-PAGE analizine göre enzim 84 kDa moleküler ağırlığında tek bir amilolitik aktivite bandına sahiptir. Enzim, 5 mM $MnCl_2$, $CaCl_2$, $FeCl_2$, $MgCl_2$, $ZnCl_2$, $NiCl$, $NaCl$ ve Na-sülfatta, sırasıyla, %298, 347, 211, 253, 146, 142, 141 ve 153 aktivite göstermiştir. Buna karşılık, 5 mM EDTA, 3 mM PMSF, 8 M üre ve %1 SDS ile muamele edildiğinde enzimin aktivitesi, sırasıyla, %143, %134, %43 ve %119 inhibe olmuştur. M.Amy NS 211 enziminin çamaşır deterjanlarında, tekstilde, ekstrem sıcaklık ve asidik koşullarda faaliyet gösteren endüstriyel proseslerde uygulanabilir özellikte olduğu belirlenmiştir.

Bai ve ark (2012), termoasidofilik *Alicyclobacillus* sp. A4 suşundan iyon değişim kromatografisiyle saflaştırdıkları asidik α -amilaz enziminin moleküler ağırlığını SDS-PAGE ile 64 kDa olarak belirlenmiştir. Enzimin optimum aktivite sıcaklık ve pH değeri 75°C ve pH 4.2'de elde edilmiştir. Bu özellikler dikkate alındığında izole edilen α -amilaz enzimin nişasta endüstrisinde ticari olarak kullanılabileceği değerlendirilmiştir.

Vijayalakshmi ve ark (2012), *Euphorbia hirta* (Sütleğen) bitkisinin rizosfer toprağından izole ettikleri α -amilaz üreticisi bakteri suşu ile çalışmışlardır. İzole edilen suş, gram pozitif, hareketli, çubuk şeklinde, terminal endosporludur. 16S rRNA gen sekansı temel alınarak çizilen filogenetik ağaca göre *Bacillus subtilis* üyelerine yakınlık gösterdiği belirlenen suş, *Bacillus subtilis* KC3 olarak tanımlanmıştır. Optimizasyon için inkübasyon süresi, sıcaklık, pH, besi yerindeki farklı karbon ve nitrojen kaynakları, metal tuzlarının etkisi ve farklı substrat konsantrasyonları gibi parametreler kullanılmıştır. Maksimum enzim verimi 40°C ve pH 7'de 48 saatlik inkübasyon sonunda elde edilmiştir (22.92 U/mL). Enzim optimum aktivitesini 50°C'de ve pH 6.5'da göstermiştir. Çeşitli metal iyonlarının (Ca^{+2} , Fe^{+2} , Mg^{+2} , Zn^{+2} ve Cu^{+2}) amilolitik aktivite üzerine etkisi araştırılmış ve %0.1 Ca^{+2} 'un enzim üretimini arttırdığı (28.83 U/mL), buna karşın diğer metal iyonlarının inhibitörük etki gösterdiği bulunmuştur. En yüksek enzim değeri %2 substrat (nişasta) konsantrasyonunda elde edilmiştir.

Bakri ve ark (2012), Suriye topraklarından aldıkları örneklerden amilaz üreten bakteriler izole etmiştir. Amilolitik *Bacillus* sp. örnekleri nişastalı agar besi yerinde izole edilmiştir. İzole edilen örnekler arasında *Bacillus* SY134D suşu en iyi amilolitik aktiviteyi göstermiştir. *Bacillus* SY134D izolatı 16S analizine göre *Bacillus subtilis* olarak tanımlanmıştır. Suşun amilaz üretimi için optimum sıcaklık 37°C olarak bulunmuştur. Amilaz üretimi pH 3.0-9.0 aralığında gerçekleşmekle birlikte optimum verimliliğe pH 5.0'te ulaşılmıştır. Enzim pH 6.0'da ve 70°C'de optimum aktivite göstermektedir.

Roy ve ark (2012), Hindistan, Assam'dan aldıkları toprak örneklerinden, yüksek titrelerde alkali α -amilaz enzimini üretebilen AS-S01a suşunu izole etmişler ve taksonomik olarak *Bacillus subtilis* AS-S01a şeklinde tanımlamışlardır. İzole edilen alkali α -amilaz enziminin moleküler ağırlığı 21 kDa olarak belirlenmiştir. Enzim optimum aktivitesini 55°C'de ve pH 9.0'da göstermiştir. Saflaştırılmış α -amilaz oksidanlar, surfaktanlar, EDTA ve çeşitli ticari deterjanlar ile muamele edildiğinde aktivitesini korumuştur. Bu özelliklerinden dolayı enzimin farklı endüstriyel uygulamalarda kullanılabilir özellikte olduğu bildirilmiştir.

Bano ve ark (2011), *Bacillus subtilis* KIBGE HAS suşundanelde ettikleri alfa-amilaz enzimini ultrafiltrasyon, amonyum sülfat presipitasyonu ve jel filtrasyon kromatografisiyle saflaştırmışlardır. Saflaştırılan enzimin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile 56 kDa olarak hesaplanmıştır. Enzim optimum aktivitesini pH 7.5'te ve 50°C'de göstermiştir.

Al-Quadan ve ark (2011), kaplıcadan izole ettikleri *Bacillus* HUTBS62 suşundan oldukça asidik ve termostabil özellikteki amilaz enzimini elde etmişlerdir. Enzim %60 amonyum sülfat ile presipite edilerek, Sephadex G-100 jel filtrasyonunda ve DEAE iyon değişim kromatografisinde saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzim, 54.2 kDa moleküler ağırlığa sahip bir monomerdur. Enzim optimum aktivitesini pH 4.4'te ve 90°C'de göstermiştir ve 100°C'de 90 dakika süreyle ön inkübasyona tabi tutulduktan sonra aktivitesinin yaklaşık %50'sini

korumuştur. 5 mM konsantrasyondaki kobalt, magnezyum, kadmiyum ve manganezin varlığında amilaz aktivitesi artmıştır. Kalsiyum, çinko ve bakır amilaz aktivitesini inhibe ederken, demir ve sodyum aktiviteyi farklı oranlarda azaltmıştır. Enzim pH 4.4'te ve 90°C'de, 1 ve 2 mM EDTA varlığında aktifliğini korumuştur. Asit ve termo-stabil özelliklerinden ötürü enzim gıda amaçlı endüstriyel uygulamalar için potansiyel bir adaydır.

Elayaraja ve ark (2011), Parangipettai sahilindeki denizel sedimentlerden termostabil alkali α -amilaz üreticisi *Bacillus firmus* CAS 7 suşunu izole etmişlerdir. Amilaz üretimi 35°C'de, pH 7.5'te ve %1 patates kabuğu substratı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *B. firmus* optimize edilmiş üretim koşullarında 676 U/mL α -amilaz üretmiştir. Üretilen α -amilaz enzimi optimum aktivitesini 50°C'de ve pH 9.0'da göstermiştir.

Anupama ve Jayaraman (2011), Hindistan'ın Kumta sahilinden izole ettikleri halotolerant *Bacillus aquimaris* VITP4 suşunu kullanarak ekstraselüler α -amilaz enzimini üretmişlerdir. Maksimum enzim üretimi pH 8.0 ve 40°C'de 24 saatlik inkübasyon sonunda gerçekleşmiştir. Saflaştırılan enzim optimal aktivitesini pH 7.5-9.5 aralığında ve 40°C'de göstermiştir. Enzimin 3.5 M NaCl konsantrasyonunda başlangıç aktivitesinin %60'ından fazlasını koruması halotolerant olduğunu göstermektedir. Kalsiyum iyonu (0.01 mM) ve CTAB (10 mM) enzim aktivitesini artırırken, EDTA aktiviteyi düşürmüştür. Bu sonuçlar, *Bacillus aquimaris* VITP4 suşundan elde edilen α -amilazın halotolerant, katyonik deterjanların varlığında stabilityesini koruyan, metal iyonu bağımlı bir enzim olduğunu göstermiştir.

Liu ve Xu (2008), *Bacillus* sp. YX-1 suşundan izole ettikleri α -amilaz enzimini saflaştırmış ve karakterize etmişlerdir. Maksimum α -amilaz aktivitesi (53 U/mL) 45°C'de 44 saatlik inkübasyon sonucunda elde edilmiştir. Enzimin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile 56 kDa olarak belirlenmiştir. Enzim maksimum aktivitesini pH 5.0'te göstermiştir ve pH 4.5-11.0 aralığında stabilitesini

korumuştur. Enzim, farklı ham nişastalarda güçlü hidroliz yeteneğine sahiptir. Nişasta endüstrisinde standart olarak kullanılan %20 konsantrasyondaki ham mısır nişastasını pH 5.0'te 12 saatlik inkübasyon sonunda hidrolize etmiştir. Çalışma sonucunda, kısmi amino asit sekansı analizine göre enzimin yeni bir α -amilaz olduğu belirtilmiştir.

Aygan ve ark (2008), Van Gölü'nden alkalifilik ve yüksek düzeyde termostabil α -amilaz üreten *Bacillus* sp. suşunu izole etmişlerdir. Enzim sentezi 25-40°C aralığında gerçekleşmiştir. SDS-PAGE analizine göre enzim 66 kDa moleküler ağırlığında tek bir banttandır oluşmaktadır. Enzim 20-90 °C aralığında aktiftir. Maksimum enzim aktivitesi 50°C'de ve pH 10.5'te gerçekleşmiştir. 30 dakikalık ön inkübasyon süresi sonunda enzim 80°C'ye kadar %90'ın üzerinde stabilite göstermiştir. Termostabilite Ca^{+2} varlığında artmamıştır. Enzim 1 saat süreyle pH 5.0-9.0 aralığında inkübasyona bırakıldığında %75 oranında kalan aktivite değerine sahiptir. Enzim aktivitesinin SDS ve EDTA varlığında, sırasıyla, %38 ve %34 oranlarında inhibe olduğu belirtilmiştir.

Asgher ve ark (2007), α -amilaz elde etmek için izole ettikleri *Bacillus subtilis* JS-2004 suşunu atık patates nişastası içeren sıvı besi yerinde üretmişlerdir. Maksimum enzim üretimi pH 7.0'de ve 50°C'de 48 saatlik inkübasyon sonucunda gerçekleşmiştir (72 U/mL). α -amilaz enzimi optimum aktivitesini pH 8.0 ve 70°C'de göstermiştir. Enzim 60 ve 70°C'lerde 1 saat inkübe edildiğinde oldukça stabil kalırken, 80 ve 90°C'lerde orijinal aktivitesinin, sırasıyla, %12 ve %48'ini kaybetmiştir. Enzim 24 saat süreyle pH 8.0 ve 70°C'de inkübe edildiğinde orijinal aktivitesinde %6 oranında bir düşüş gözlemlenmiştir. Enzim aktivitesi Ca^{+2} ile artarken (relatif aktivite %117), Co^{+2} , Cu^{+2} Hg^{+2} iyonlarıyla güçlü bir şekilde inhibe olmuştur. Enzim Mg^{+2} , Zn^{+2} , Ni^{+2} , Fe^{+2} ve Mn^{+2} iyonlarından çok az miktarda etkilenmiştir.

Saxena ve ark (2007), termofil ve alkali amilaz üreticisi *Bacillus* sp. PN5 suşunu topraktan izole etmişlerdir. Enzim üretimi pH'sı 7.0 olan, %0.6 nişasta,

%0.5 pepton ve %0.3 maya özütü içeren besi yeri kullanılarak, 60°C’de ve 60 saatlik inkübasyon sonucunda gerçekleştirilmiştir. Maksimum amilaz aktivitesi pH 10.0’da ve 90°C’de ölçülmüştür. Enzim pH 10.0’daki 1 saatlik inkübasyon sonucunda aktivitesinin %80’ini korumuştur. 105°C’de %65 aktivite gösteren enzim, 80-100°C aralığında 1 saatlik inkübasyon sonucunda stabilitesini %100 korumuştur. SDS ile 1 saat muamele edildiğinde enzimin aktivitesi %83.36’tür. Bu özelliklerden dolayı, enzimin nişasta sıvılaştırma proseslerinde ve deterjan formülasyonlarında kullanılabilir olduğu bildirilmiştir.

Anto ve ark (2006), *Bacillus cereus* MTCC 1305 suşundan elde ettikleri α -amilaz enzimini buğday kepeği ve pirinç kabuğunu substrat olarak kullanarak üretmişlerdir. Buğday kepeği ile yapılan çalışmada en yüksek enzim üretimi 94 ± 2 U/g olarak belirlenmiştir. Optimum α -amilaz aktivitesi 55°C’de ve pH 5.0’te elde edilirken, enzim 75°C’de %90 aktivite göstermiştir.

Najafi ve ark (2005), topraktan izole ettikleri *Bacillus subtilis* AX20 suşunun ekstraselüler α -amilaz enzimi üretme yeteneğinde olduğunu saptamışlardır. Mikroorganizmanın biyokimyasal testleri ve 16S rDNA sekansı ile karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bakteri 37°C’de üretildiğinde maksimum amilaz aktivitesi 38U/mL olarak hesaplanmıştır. Enzimin SDS-PAGE analizinde, 78 kDa’lık bir homodimer polimerini kapsayan 149 kDa’luk molekül ağırlığa sahip olduğu görülmüştür. Amilazın optimum aktivite gösterdiği pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla, 6.0 ve 55°C olarak bulunmuştur. Enzim Hg^{+2} , Ag^{+2} ve Cu^{+2} iyonları ile inhibe olurken, EDTA ve EGTA ile inhibisyon gerçekleşmemiştir. Mısır ve çözümlü nişastanın AX20 α -amilaz ile hidrolize edilmesi sonucunda açığa çıkan son ürünler %70-75 glukoz ve %20-25 maltozdu.

Hagihara ve ark (2001), KSM-K38 olarak tanımlanan alkalifilik *Bacillus* izolatından α -amilaz (AmyK38) enzimini izole etmişlerdir. Morfolojik ve fizyolojik özellikleri ile 16S rDNA gen sekansı ve DNA-DNA hibridizasyonu ile gerçekleştirilen filogenetik analiz sonucunda izolatın *Bacillus* cinsine ait yeni bir

tür olduğu belirlenmiştir. Enzim optimum katalitik aktivitesini pH 8.0-9.5 ve 55-60°C aralığında göstermiştir. SDS-PAGE ile yapılan analizde enzimin moleküler ağırlığı yaklaşık 55 kDa olarak bulunmuştur. Bu enzim, çeşitli karbonhidratları maltoz, maltotrioz, maltoheksoz ve maltoheptoz son ürünlerine hidrolize etme yeteneğindedir. Enzimin katalitik aktivitesi 100 mM konsantrasyona kadarki EDTA ve EGTA'dan etkilenmemiştir. AmyK38 enzimi, kimyasal oksidasyona oldukça dirençli olup, 1.8 M H₂O₂ ile 1 saat inkübe edildiğinde aktivitesinin %80'ini korumuştur.

Schwermann ve ark (1994), termofilik *Alicyclobacillus acidocaldarius* (ATCC 27009) suşundan elde ettikleri α -amilaz enziminin moleküler ağırlığını 160 kDa olarak hesaplamışlardır. Enzim nişastayı glukoz, maltoz ve maltotrioz hidrolize etme yeteneğinde olup, aynı zamanda pullulanaz aktivitesine de sahiptir. Amilaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla, pH 3.0 ve 75°C olup, enzimin termoasidofilik karakterde olduğunu görülmüştür.

Paquet ve ark (1991), *Clostridium acetobutylicum* (ATCC 824) suşundan elde ettikleri ekstraselüler α -amilaz (1,4- α -D-glukanglukanohidrolaz, EC 3.2.1.1) enzimi anyon değişim kromatografisi (Mono Q) ve jel filtrasyonu (Superose 12) saflaştırmışlardır. SDS-PAGE analizinde enzimin moleküler ağırlığının 84 kDa olduğu tespit edilmiştir. α -amilazın aktivitesi kalsiyum iyonlarıyla (veya diğer metal iyonlarıyla) artmadığı gibi, EDTA ile de inhibe olmamıştır. Enzimin optimal aktivitesi pH 5.6'da ve 45°C'de gerçekleşmiştir. İzole edilen α -amilaz enzimi asidik pH'larda stabil olmakla birlikte, enzimin termal stabilitesi oldukça düşüktür. Enzim maltoheksozu glukoz, maltoz, maltotrioz, maltotetroz ve maltopentoza hidrolize etmiştir.

Kanno (1986), *B. acidocaldarius* A-2 suşundan elde ettiği ekstraselüler amilaz enzimini saflaştırmış ve özelliklerini araştırmıştır. Analizler sonunda enzimin α -amilaz (1,4- α -D-glukanglukanohidrolaz, EC 2.3.1.1) aktivitesine sahip olduğunu belirlemiştir. Enzimin moleküler ağırlığı 66 kDa, optimum aktivite

sıcaklığı ve pH'ı sırasıyla, 70°C ve 3.5 olarak bulunmuştur. Enzim, substratsız ortamda 30 dakikalık inkübasyon sonunda pH 2.0'de başlangıç aktivitesinin %70'inden fazlasını ve pH 4.5'ta %90'ından fazlasını korumuştur.

Yang ve ark (2017), *Bacillus megaterium* WW1210 suşundan ettikleri pullulanaz enzimine ait geni (BmPul) *Escherichia coli*'ye klonlayarak eksprese etmişlerdir. Rekombinant pullulanaz (BmPul) enzimi elde edilerek saflaştırılmış ve biyokimyasal olarak karakterize edilmiştir. BmPul enziminin moleküler ağırlığı SDS-PAGE analiziyle ortalama 112 kDa olarak hesaplanmıştır. Enzim optimum aktivitesini 55°C ve pH 6.5'te göstermiştir. Enzimin 40°C'nin altındaki sıcaklıklarda ve pH 6.5-8.5 aralığında stabil olduğu görülmüştür. BmPul enzimi, pullulanı maltotriosa kadar hidrolize ettiği için tip I pullulanaz olarak adlandırılmıştır. Bu özellikler enzimin gıda endüstrisinde kullanım potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

Mishra ve ark (2016), mikrobiyal pullulandan elde edilen maltotrioz şurubunun üretim optimizasyonu ile ilgili parametreleri çalışmışlardır. Bu proseste, pullulanın hidrolizi için pullulanaz enzimi kullanılmıştır. Pullulan izopropanol çöktürmesiyle hazırlanmıştır. Proses için optimize edilen inkübasyon süresi 8 saat, sıcaklık 46°C, pH 5.5, etanol miktarı %6 (v/v) ve pullulanaz miktarı 10 ASPU/g olarak bulunmuştur. HPLC analizinde hidrolizattaki en önemli bileşenin maltotrioz olduğu belirlenmiştir. Çalışma sonuçları, bu prosesin maltotrioz üretiminde en etkili yöntem olduğunu göstermektedir.

Liu ve ark (2016), *Paenibacillus barengoltzii* bakterisinden elde ettikleri pullulanaz enzimine ait geni (PbPulA) *Escherichia coli*'ye klonlayarak ekspresyon gerçekleştirmişlerdir. Rekombinant pullulanazın SDS-PAGE analizinde 75 kDa moleküler büyüklükte olduğu bulunmuştur. PbPulA enziminin optimum aktivitesini pH 5.5'te ve 50°C'de gösterdiği saptanmıştır. Enzim nişasta endüstrisinde kullanılabilir özelliktedir.

Kahar ve ark (2016), *Anoxybacillus* sp. SK3-4 suşundan elde ettikleri tip I pullulanaz (PulASK) enzimine ait özellikleri araştırmışlardır. Saflaştırılan enzimin moleküler ağırlığı 80 kDa olarak bulunmuştur. Enzim pH 5.0-6.0 aralığında stabil olmakla birlikte, enzimin en aktif olduğu pH değerinin 6.0 olduğu belirlenmiştir. PulASK enzimi optimum aktivitesini 60°C’de göstermekte olup, bu sıcaklıkta stabildir. Diğer tip I pullulanazların aktivitesine benzer şekilde PulASK enzimi de pullulanı maltotrioza kadar hidrolize etmiştir. PulASK enziminin nişastanın α -1,6 glukozidik bağlarını hidrolize ederek, lineer ve dallanmamış oligosakkaritler ürettiği ancak kısa zincirlere karşı etkili olmadığı tespit edilmiştir. Bu durum, şimdiye kadar bilinen ve özellikle maltotrioz meydana getiren tip I pullulanazlara kıyasla şaşırtıcı bir sonuçtur.

Duan ve ark (2015), *Bacillus deramificans* bakterisinden elde ettikleri pullulanaz enziminin aktivitesi üzerine çeşitli sufaktanların etkisini araştırmışlardır. %0.5 Triton X-100 bulunan fermentasyon ortamında 40 saatlik inkübasyon sonunda maksimal pullulanaz üretiminin gerçekleştiği belirtilmiştir (812.4 U/mL).

Siddiqui ve ark (2014), hipertermofilik arke *Pyrobaculum calidifontis*’in tip II pullulanaz enzimi ile çalışmışlardır. Enzimin molekül ağırlığı 111 kDa olarak bulunmuştur. Bu enzimi kodlayan Pcal-1616 geni *Escherichia coli*’ye klonlanarak ekspresyon gerçekleştirilmiştir. Rekombinant enzim en yüksek aktiviteyi 95°C’de ve pH 5.5’te göstermekle birlikte, pH 4.0-8.0 aralığında %80’in üzerinde aktiviteye sahiptir. Ca^{+2} iyonları enzim aktivitesi üzerinde önemli bir etki göstermemiştir.

Xu ve ark (2014), *Anoxybacillus* sp. LM18-11 suşundan elde ettikleri termostabil pullulanaz enziminin (PulA) yapısal ve fonksiyonel özelliklerini araştırmışlardır. Hidroliz ürünleri temel alındığında, PulA tip I pullulanaz olarak sınıflandırılmıştır. Enzim maksimum aktivitesini 60°C’de ve pH 6.0’da göstermiştir. Enzim yüksek düzeyde termostabil olup, endüstriyel uygulamalar için büyük öneme sahiptir.

Ahmad ve ark (2014), hipertermofilik bir arke olan *Thermococcus kodakarensis* (TK-PUL) suşundan, nişastayı ve pullulanı metal iyonuna gerek duymadan hidrolize eden, termo-asidofilik özelliğe sahip, PUL enzim genini klonlayarak rekombinant enzimin karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. TK-PUL enzimi hem pullulanaz hem de α -amilaz aktivitesine sahip olması nedeniyle amilopullulanaz (tip II pullulanaz) özelliğindedir. En yüksek enzim aktivitesi 95-100°C aralığında gözlemlenmiştir. Enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değeri 3.0-8.5 aralığında bulunmuştur. TK-PUL enzimi 90°C’de birkaç saat stabil kalarak aktivitesini korumuştur. Rekombinant TK-PUL enzimi aktivitesi ve stabilitesi için metal iyonlarına gereksinim duymamaktadır. Enzim, pullulandaki α -1,6 ve α -1,4 glukozidik bağları hidrolize etmektedir. Enzim pullulanın yanı sıra nişasta, glukojen, dekstrin, amiloz, amilopektin ve siklodekstrinin dahil olduğu çeşitli polisakkaritleri maltotrioza hidrolize etmiştir. TK-PUL, maltotrioza maltoz ve glukozu hidrolize edebilen ender bir enzimdir.

Wei ve ark (2014), pullulan hidrolize edebilen bir bakteri izole etmiştir. Suş 16S rRNA sekans analiziyle *Bacillus cereus* Nws-bc5 olarak tanımlanmıştır. *Bacillus cereus*’tan elde edilen pullulan degradasyonundan sorumlu pullulanaz geni (pulBC), *Escherichia coli* ve *Bacillus subtilis* WB800 konak organizmalarına klonlanarak gen ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. Moleküler ağırlığı yaklaşık 81.4 kDa olan saf rekombinant enzim pullulanın yapısındaki α -1,6 bağlarına etki ederek, maltotriozları oluşturmaktadır. Enzimin optimum aktivite gösterdiği pH ve sıcaklık değerleri, sırasıyla, 6.0 ve 40°C’dir. pulBC enzimi, alkali koşullarda çok daha yüksek stabilite göstermekte olup, pH 6.0–9.0 aralığında tamamen stabildir. Enzimin aktivitesi Ca^{+2} varlığında artmaktadır. Saflaştırılmış pulBC enziminin spesifik aktivitesi pullulan ile 44.7 U/mg ve nişasta ile 29.3 U/mg olarak hesaplanmıştır.

Qiao ve ark (2014), alkalifilik *Exiguobacterium acetylicum* YH5 suşundan elde ettikleri pullulanaz genini (Pul3YH5) *Escherichia coli* BL21 (DE3) konak

organizmasına klonlamışlardır ve ekspresyon gerçekleştirmişlerdir. Rekombinant pullulanaz enziminin moleküler ağırlığı yaklaşık 100 kDa bulunmuştur. Enzim optimum aktivitesini 50°C’de ve pH 6.0’da göstermekle birlikte, alkali-tolerant davranış sergilemiştir. Enzim pH 4.0-10.0 aralığında 30 dakika ön inkübasyona bırakıldığında %93’ün üzerinde stabil kalmıştır. Pul3YH5 enziminin aktivitesi Co^{+2} , Fe^{+2} ve Mn^{+2} ile önemli derecede artarken, Cu^{+2} , SDS, β -merkaptöetanol ve EDTA ile inhibe olmuştur. *Exiguobacterium acetylicum* pullulanaz enzimi, pullulanı maltotrioza hidrolize etmiştir. Bu enzimatik özellikler, Pul3YH5 enziminin deterjan endüstrisinde kullanılabilir özelliklere sahip bir alkalitolerant pullulanaz olduğunu göstermektedir.

Wu ve ark (2014), *Thermus thermophilus* HB27 suşundan elde ettikleri, pullulanaz (TTHpu) enzimini kodlayan geni klonlamışlardır. Enzim 52 kDa moleküler ağırlığa sahiptir. Gen, pHsh ve pET28a vektörleri kullanılarak *Escherichia coli*’ye klonlanıp eksprese edilmiştir. Safılaştırılan TTHpu pullulanaz enzimi en yüksek aktivitesini pH 6.5’te ve 70°C’de göstermiştir. Enzim 60-70°C’de 2 saatlik inkübasyondan sonra aktivitesinin %90’ından fazlasını korumuştur. pH 6.0-8.0 aralığında stabil olan enzimin aktivitesi 5 mM manganiz varlığında %298’e yükseltmiştir. Bu enzim, pullulanın α -1,6 ve α -1,4 glukozidik bağlarını hidrolize ederek maltotrioz, maltoz ve glukoz karışımını açığa çıkarmıştır. TTHpu enzimi, nişastanın endüstriyel sıvılaştırmasında kullanılabilir özellikte bir enzimdir.

Asha ve ark (2013), topraktan izole ettikleri pullulanaz üreticisi suşu, mikroskopik incelemeleri ve biyokimyasal testleri temel alarak, *Bacillus halodurans* olarak tanımlamışlardır. Maksimum pullulanaz üretimi pH’ı 10.0 olan, %1.5 çözünür pullulan ve %0.5 pepton içeren besi yerinde ve 37°C’de gerçekleşmiştir. Safılaştırılmış alkali pullulanazın moleküler ağırlığı 37 ± 1 kDa, optimum pH ve sıcaklık değerleri ise, sırasıyla, 10.0 ve 50°C olarak bulunmuştur. Pullulanaz aktivitesi, Zn^{+2} ve Cu^{+2} iyonlarının varlığında inhibe olmuştur. Mg^{+2} ,

Mn⁺² ve Fe⁺² enzim aktivitesini bir miktar inhibe ederken, Ca⁺² aktiviteyi artırıcı yönde etki göstermiştir. EDTA, DTT, PMSF, TLCK ve NaI, enzimi inhibe etmezken, NEM ve IAA enzim aktivitesinde bir miktar inhibisyon etkisi göstermiştir. NBS'nin, enzim aktivitesini tamamen inhibe etmesi, triptofanın aktivite için çok önemli olduğunu göstermiştir. İzole edilen enzimin termotolerant ve alkalifilik özelliklerde olmasından dolayı nişastanın işlenmesinde, deterjan endüstrisinde ve diğer biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilir özellikte olduğu belirlenmiştir.

Chai ve ark (2012a), Malezya'daki kaplıcalarından iki termofilik bakteri (SK3-4 ve DT3-1) izole etmişlerdir. Suşlar çubuk şeklinde, gram pozitif ve endospor içeren hücrelerdir. Her iki suşun da optimum üremeleri 55°C'de ve pH 7.0'de gerçekleşmiştir. DT3-1 suşu %2'lik NaCl konsantrasyonuna, SK3-4 suşuna kıyasla, daha düşük tolerans göstermiştir. 16S rRNA gen sekansına dayanan filogenetik analize göre her iki suş da *Anoxybacillus* cinsine aittir ve pullulanı maltotrioz ve glukozu hidrolize etmişlerdir.

Li ve ark (2012), *Bacillus* sp. CICIM 263 suşunun termostabil tip I pullulanaz enzimini kodlayan pulA1 genini, *Escherichia coli* ve *Bacillus subtilis* bakterilerine aktararak eksprese etmişlerdir. Moleküler ağırlığı 100.887 Da olan rekombinant PuLA1 enzimi optimum aktivitesini pH 6.5'te ve 70°C'de göstermiştir. 70°C'de 1 saat süreyle inkübe edildiğinde aktivitesinin %88'inden fazlasını koruyan enzim termostabil karakterdedir. Pullulanı tamamen hidrolize ederek maltotriozu dönüştüren PulA1 enzimi, biyoetanol üretiminde fermente edilebilir şekerlerin verimini arttırmak için yapılan endüstriyel uygulamalarda kullanıma uygundur.

Kang ve ark (2011), hipertermofilik anaerobik *Thermotoga neapolitana* bakterisinden elde ettikleri tip I pullulanaz enzimini kodlayan geni (pula) *Escherichia coli*'ye klonlamışlardır. Rekombinant pullulanaz enziminin (rPulA) moleküler ağırlığı 93 kDa olarak hesaplanmıştır. Enzimin optimal aktivite

gösterdiği pH aralığı 5.0-7.0 ve sıcaklık 80°C'dir. rPulA enzimi pullulanı maltotrioza kadar hidrolize etmiştir.

Zhang ve Jin (2011), izole ettikleri pullulanaz enziminin (12 ASPU/g) optimum hidroliz koşulları pH 5.0'te ve 46°C'de 32 saatlik inkübasyondur.

Zareian ve ark (2010), İran kaplıcalarından ekstraselüler pullulanaz üreten termofilik L14 suşunu izole etmişlerdir. Bakteri 16S rDNA analizi ve biyokimyasal testlere göre, *Geobacillus stearothermophilus* olarak tanımlanmıştır. Enzim amonyum sülfat presipitasyonu, anyon değişim ve jel filtrasyon kromatografisiyle saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimden SDS-PAGE analizinde 100 kDa moleküler ağırlığına sahip tek bant elde edilmiştir. Pullulanaz enziminin optimum aktivite koşulları pH 5.5 ve 65°C olarak bulunmuştur. 60-70°C aralığında stabil olan enzim, pullulanı, nişastayı ve maltooligosakkaritleri hidrolize etme yeteneğinde iken, siklodekstrin ve panoz üzerinde etki göstermemiştir. L14 enzimi pullulanı glukoz, maltoz ve maltotrioza, nişastayı ise glukoz ve maltoza hidrolize etmiştir. Yapılan analizlerde enzimin maltotrioz, maltotetroz, maltopentoz, maltoheksoz ve maltoheptoz gibi maltooligosakkaritlerin farklı türlerini hidrolize etme yeteneğinde olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak, enzim pullulanın ve nişasta gibi dallanmış polisakkaritlerin hem α -1,4 hem de α -1,6 glukozidik bağlarına etki ederek, pullulanı ve nişastayı glukoz ve maltoza hidrolize edebilmektedir. *Geobacillus stearothermophilus* L14 suşundan elde edilen enzim pullulandan glukoz üreten amilopullulanaz enzimine ait ilk örnektir.

Singh ve ark (2010), pullulanaz enzimi ile saflaştırılmış pullulandan maltotrioz şurubu üretmişlerdir. Pullulanaz enzimi optimum pH 5.0'te aktivite göstermekle birlikte, pH 5.0-6.0 aralığında önemli oranda aktiftir. Optimum olarak 50°C'de aktivite gösteren enzim, bu sıcaklıkta 6 saat inkübe edildiğinde tamamen stabil kalmıştır (%100). Pullulanaz enziminin aktivitesi Mn^{+2} ve Ca^{+2} ile, sırasıyla, 1.8 ve 1.2 kat artmıştır. Enzim pullulanı, çözünür nişastayı ve dekstrini oldukça etkili bir şekilde hidrolize etmiştir.

Ling ve ark (2009), ekstraselüler pullulanaz üreticisi *Bacillus cereus* H1.5 suşundan elde ettikleri enzimi, DEA Sepharose ve Superdex jel filtrasyon teknikleri ile saflaştırmışlardır. Enzim optimum aktivitesini 55°C’de ve pH 6.0’da göstermiştir. Enzimin termostabilitesi ve termoaktivitesi Ca^{+2} varlığında önemli derecede artmıştır (%170). Enzimin aktivitesi, Ca^{+2} ve Mn^{+2} hariç, hemen hemen tüm metal iyonların güçlü bir şekilde inhibe olmuştur. 2-merkaptoetanol ve ditiyotritol ile aktivitesi artan enzimin aktivitesi N-bromosüksinimid ve Schardinger dekstrinlerin inhibe olmuştur. Enzim pullulanın yapısındaki α -1,6 bağlarına etki ederek pullulanı maltotrioz birimlerine hidrolize etmiştir. Bunun yanı sıra, enzim amilopektin ve çözünür nişastadaki α -1,4 bağlarına da etki ederek nişastayı maltoz ve glukoz birimlerine indirgemıştır. Bu sonuçlar, enzimin tip II pullulanaz (amilopullulanaz) olduğunu göstermektedir.

Kunamneni ve Singh, (2006), Hindistan’dan aldıkları toprak örneklerinden pullulanaz enzimi üreticisi termofilik *Bacillus* sp. AN-7 suşunu izole etmişlerdir. Enzim amonyumsülfat çöktürmesi, anyon değişim ve jel filtrasyon kromatografisi yöntemleriyle saflaştırılmıştır. Optimum aktivitesini 90°C’de ve pH 6.0’da gösteren enzim, 80°C’de ve pH 4.5-7.0 aralığında 24 saatten daha uzun süre inkübe edildiği zaman başlangıç aktivitesinin yarısını korumuştur. Bu sonuç enzimin termostabil karakterde olduğunu göstermektedir. Enzim 105°C’den yüksek sıcaklıklarda ve 4.5’ten düşük pH değerlerinde inkübe edildiğinde orijinal aktivitesini hızla kaybetmiştir. Pullulanaz enzimi, Hg^{+2} iyonlarıyla tamamen inhibe olmuştur. Ca^{+2} , ditiyotritol ve Mn^{+2} pullulanaz aktivitesini stimüle etmiştir. Enzim pullulanı maltotrioz ve maltoz birimlerine hidrolize etmiştir. *Bacillus* sp. AN-7 suşundan elde edilen pullulanaz enzimi (pullulan-6-glukanohidrolaz, EC 3.2.1.41) aktivite özellikleri nedeni ile tip I pullulanaz şeklinde değerlendirilmiştir.

Samah ve ark (2005), kaplıcalardan izole ederek *Bacillus flavothermus* KWF-1 olarak tanımladıkları bakteri suşundan termofilik pullulanaz enzimini üretmişlerdir. Enzim pH 7.0-10.0 ve 60-90°C aralığındaki koşullarda inkübe

edildiğinde aktivitesini korumuştur. Ham enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık ve pH değerleri, sırasıyla, 80°C ve 10.0 olarak bulunmuştur.

Bertoldo ve ark (2004), anaerobik termoalkalifilik *Anaerobranca gottschalkii* bakterisinin genom sekansındaki tip I pullulanaz enzimini kodlayan geni *Escherichia coli* BL21(DE3) suşuna klonlayarak eksprese etmişlerdir. Saflaştırılan rekombinant pullulanaz enziminin (rPulAg) moleküler ağırlığı 96 kDa olarak belirlenmiştir. Enzim optimum katalitik aktivitesini pH 8.0 ve 70°C’de göstermiştir. Enzim pullulanı maltotrioz birimlerine hidrolize etme özelliğindedir. Mono ve divalent katyonlar, enzim aktivitesini artırma yönünde etki göstermemiştir. rPulAg enzimi %0.5 SDS, %20 Tween ve %50 Triton X-100 bulunan koşullarda stabil kalmıştır. *A. gottschalkii*’den elde edilen pullulanaz enzimi, ilk termo-alkali-stabil tip I pullulanaz olma özelliğindedir.

Roy ve ark (2003), Tunus’ta bulunan kaplıcaların civarındaki topraklardan yüksek miktarda pullulanaz aktivitesi olan US149 suşunu izole etmişlerdir. İzole edilen suş çubuk şeklinde ve hareketsiz olup, sadece pH 4.5-5.0 aralığındaki asidik koşullarda ve 37-55°C aralığındaki sıcaklıklarda üreyebilmektedir. İzole edilen suş, 16S rRNA analizine göre *Bacillus naganoensis* (accession no. AB021193) olarak tanımlanmıştır. Moleküler ağırlığı 200 kDa olarak hesaplanan enzimin, her biri 95 kDa olan iki alt üniteden meydana geldiği bulunmuştur. Saflaştırılan enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değeri 5.0 olup, enzimin pH 5.0’ten düşük değerlerde de aktivitesini koruduğu bulunmuştur. Enzim pullulanı hidrolize ederken, amiloz ve maltoheptozu hidrolize edememektedir. Pullulanın hidroliz ürününün izopanoz olduğu belirlenmiştir. Bu durum, PulUS149 enziminin tip II pullulanazlar içinde yer alan izopullulanaz (pullulan-4-glukanohidrolaz, EC 3.2.1.57) türünde bir enzim olduğunu kanıtlamaktadır.

Duffner ve ark (2000), hipertermofilik anaerobik bir arkea olan *Desulfurococcus mucosus*’tan, termoaktif pullulanaz enzimini kodlayan geni (*apuA*), *Bacillus subtilis*’te klonlayarak eksprese etmişlerdir. Saflaştırılan

rekombinant enzim (rapuDm), her birinin moleküler ağırlığı 66 kDa olan iki alt üniteden oluşmaktadır. Enzim optimum aktivitesini 85°C’de ve pH 5.0’te göstermiştir. Divalent katyonlar enzim aktivitesi ve stabilitesi üzerine etki etmemiştir. RapuDm enzimi 80°C’de 4 saat süreyle inkübasyona bırakıldığında stabilitesini korumuştur. Enzim pullulanı hidrolize ederek maltotrioz, nişasta, amiloz, amilopektin ve siklodekstrinleri hidrolize ederek maltotrioz ve maltoz birimlerinin oluşumunu sağlamıştır. Arkea kökenli pullulanaz enzimi, substrat spesifitesinin geniş olması nedeniyle tip II pullulanaz şeklinde sınıflandırılmıştır.

Bertoldo ve ark (1999), ekstrem termofil anaerobik *Fervidobacterium pennavorans* Ven5 suşunun tip I pullulanaz enzimini kodlayan genini *Escherichia coli*’ye klonlayarak eksprese etmişlerdir. Rekombinant pullulanaz enzimi pH 6.0’da ve 80°C’de optimum aktivite göstermiştir. Enzim pullulan, nişasta, amilopektin, glukojen ve α - β -dekstrindeki α -1,6-glukozidik bağları hidrolize etme yeteneğindedir. Bununla birlikte, enzim amilozdaki α -1,4-glukozidik bağları hidrolize edememiştir. Bu sonuçlara göre, enzim tip I pullulanaz olarak sınıflandırılmıştır. Enzim yüksek substrat spesifitesi ve termal stabilitesi sayesinde biyoteknolojik uygulamalar ve nişasta işleme endüstrilerinde kullanılabilir özelliktedir.

Rüdiger ve ark (1995), hipertermofilik arke *Pyrococcus woesei*’den ekstrem sıcaklık stabilitesine sahip pullulanaz enzimini kodlayan geni *Escherichia coli*’de klonlayıp eksprese etmişlerdir. Saflaştırılan rekombinant enzimin moleküler ağırlığı 90 kDa olarak bulunmuştur. Enzim optimal aktivitesini 100°C’de ve pH 6.0’da gösterirken, 120°C’de aktivitesinin %40’ını korumuştur. Enzimin aktivitesi kalsiyum iyonlarının varlığında %370’e çıkmıştır. β -merkaptoetanol ve ditiotreitol gibi indirgeyici ajanlar enzim aktivitesini arttırırken, *N*-bromosuksinimid ve α -siklodekstrin aktivite üzerine inhibitörük etki göstermiştir.

Castro ve ark (1992), izole ettikleri amilolitik aktiviteye sahip endospor oluşturan MIR-23 kodlu bakteriyi morfolojik ve biyokimyasal testlerden geçirerek

Bacillus polymyxa olarak tanımlamışlardır. Organizma asidik koşullardaki (pH 5.0) nişastaslı besi yerinde üreyerek, α -amilaz, pullulanaz ve α -glukosidaz enzimlerini sentezlemiştir. Pullulanaz enzimi optimum aktivitesini 52-57°C ve pH 4.5-5.5 aralığında göstermiştir. Enzim bu özellikleri sayesinde nişastanın sıvılaştırılması ile ilgili endüstriyel uygulamalar için uygundur.

Ara ve ark (1992), alkalifilik *Bacillus* sp. KSM-1876 suşundan elde ettikleri alkali pullulanaz (pullulan 6-glikanohidrolaz, EC 3.2.1.41) enzimini saflaştırmışlardır. Enzimin optimum aktiviteye sahip olduğu koşullar pH 10.0 ve 50°C olarak belirlenmiştir. Moleküler ağırlığı 120 kDa olan enzim pullulanı maltotrioz birimlerine hidrolize etmiştir.

Lee ve ark (2016), *Hermetia illucens* (Siyah Asker Böceği) larvasının bağırsak mikroflorasından pullulanaz genini (PulSS4) elde etmişlerdir. Bu genin aminoasit sekansı *Amphibacillus xylanus*'tan elde edilen amilopullulanaza ait gen sekansı ile %51 oranında benzerlik göstermiştir. PulSS4 enzimi 10–50°C aralığında aktif olmakla beraber, optimum aktivitesini 40°C'de göstermiştir. pH 6.5-10.5 aralığında aktivite gösteren amilopullulanaz enziminin optimum aktiviteye sahip olduğu pH değeri 9.0 olarak bulunmuştur. 30°C'de ve pH 5.0-11.0 aralığında 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldığında orijinal aktivitesinin %80'inden fazlasını korumuştur. PulSS4, %10'luk polar organik çözücülere ve %1'lik iyonik olmayan deterjanlar gibi çeşitli kimyasallara karşı stabilitesini yüksek düzeyde korumuştur. Enzimin ılımlı sıcaklıklar ve alkali koşullarda yüksek aktivite gerektiren biyoteknolojik uygulamalar için güçlü bir potansiyel olacağı düşünülmektedir.

Kahar ve ark (2013), termofilik *Anoxybacillus* sp. SK3-4 (ApuASK) suşundan elde ettikleri amilopullulanaz enzimini saflaştırıp karakterize etmişlerdir. Saflaştırılan ApuASK enziminin moleküler ağırlığı hem SDS-PAGE hem de native-PAGE analizinde 225 kDa olarak belirlenmiştir. ApuASK suşundan izole edilen amilopullulanaz pH 6.0-8.0 aralığında stabil olmakla birlikte, optimum

aktivitesini pH 7.5'te göstermiştir. Optimum aktivitesini 60°C'de gösteren enzim, 65°C'de 240 dakika inkübasyona bırakıldığında orijinal aktivitesini %54 oranında korumuştur. Enzim pullulan, nişasta, glukojen ve dextrini glukoz, maltoz ve maltotrioz birimlerine hidrolize etmiştir.

Asodeh ve Lagzian (2012), doğal kaynak suyundan izole ettikleri termostabil alkalifilik *Bacillus subtilis* DR8806 suşundan glucoamilopullulanaz enzimini elde etmişlerdir. Enzim iyon değişim kromatografisi ve amonyum sülfat çöktürmesi ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin moleküler ağırlığı 65.5 kDa olarak bulunmuştur. Enzim pH 5.0-11.0 aralığında yüksek aktiviteye sahip olmakla birlikte, optimum aktivitesini pH 9.5'te göstermiştir. Enzimin optimum aktivite sıcaklığı 70°C olarak belirlenmiştir. Aktivitesi için kalsiyuma ihtiyaç duyan enzim, SDS ve Triton X-100 gibi surfaktantlar ile H₂O₂ gibi okside edici ajanlara karşı ekstrem stabilite göstermiştir. Bu özellikler, enzimin çamaşır deterjanı endüstrisinde uygulanabilme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

Mrudula ve ark (2011), *Clostridium thermosulfurogenes* SVM17 suşundan termostabil amilopullulanaz enzimini izole etmişlerdir. Enzim sentezi 50-70°C ve pH 4.0-9.0 aralığında gerçekleşmekle birlikte, optimum verim 60°C'de ve pH 7.5'te elde edilmiştir. Maksimum bakteri üremesi 12 saatte, enzim sentezi ise 24 saatte gerçekleşmiştir.

Brunswick ve ark (1999), *Bacillus* sp. DSM 405 suşundan elde ettikleri amilopullulanaz enzimini saflaştırmışlardır. Enzim, hem nişastadaki α -1,4-glukozidik bağları hidrolize ederek maltooligasakkaritleri açığa çıkarmakta, hem de pullulandaki α -1,6-glukozidik bağları hidrolize ederek maltotrioz birimlerini oluşturmaktadır. Enzim 126 kDa moleküler ağırlığa sahip bir glukoproteindir. Substrat olarak nişasta kullanıldığında pH 6.5'te, pullulan kullanıldığında ise pH 6.0'da optimum aktivite gösteren enzim, her iki substratla da optimum aktivitesini 70°C'de göstermiştir.

Ara ve ark (1995), alkalifilik *Bacillus* sp. KSM-1378 suşundan alkali amilopullulanaz enzimini elde edip saflaştırmışlardır. Enzim 210 kDa moleküler ağırlığa sahip bir glukoproteindir. Pullulanın α -1,6-glukozidik bağlarını hidrolize ederek temel son ürün olarak maltotrioz birimlerini açığa çıkarmıştır. Ayrıca amiloz, amilopektin ve glukojendeki α -1,4-glukozidik bağları hidrolize ederek çeşitli oligosakkaritleri oluşturmuştur. Enzim pullulanaz aktivitesini pH 9.5'te ve 50°C'de gösterirken, enzimin α -amilaz aktivitesi için optimum değerler pH 8.5 ve 50°C'dir. Her iki enzim aktivitesi dietil pirokarbonat ve *N*-bromosuksinimid gibi inhibitörler ile güçlü bir şekilde inhibe edilmiştir. Pullulanaz aktivitesi özellikle Hg^{+2} iyonlarıyla inaktive olurken, amilaz aktivitesi EDTA ve EGTA ile güçlü bir şekilde inhibe edilmiş ancak Ca^{+2} iyonlarıyla tekrar aktivite kazanmıştır.

Lee ve ark (1994), topraktan termofil ve alkalifilik *Bacillus* sp. XAL601 suşunu izole etmişlerdir. XAL601 suşundan α -amilaz ve pullulanaz aktivitesi olan termostabil ve alkali-stabil bir enzim elde etmişlerdir. Elde edilen α -amilazpullulanaz enzimini sentezleyen gen (aapT) klonlanarak nükleotid sekansı belirlenmiştir (GenBank accession number D28467). Enzim optimum aktivitesini 70°C'de ve pH 9.0'da göstermiştir. Enzim çözünür nişastayı maltoz (G2) ve maltotetroza (G4) kadar hidrolize etmiştir. Pullulanın hidrolizinden üretilen ürün sadece maltotriozdur (G3). Enzim ham nişastayı 60-70°C ve pH 8.0-9.0 aralığında hidrolize etmiştir.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Bakteri İzolasyonu ve Enzim Üretiminde Kullanılan Besi Yerleri

3.1.1.1. N1 Besi Yeri

Toprak örneklerinden bakteri izolasyonu yapmak ve izole edilen suşların stok kültürlerinin saklanması amacıyla kullanılmıştır (Arabacı, 2011). Besi yerinin pH'ı bakterilerin izolasyon koşullarına uygun olarak 5.0 ve 7.0'ye ayarlanmıştır. Hazırlanan besiyeri otoklavda 121°C'de ve 1.2 atmosfer basıncında 15 dakika süreyle steril edilmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. N1 Besi Yerinin İçeriği

Besi Yeri Bileşimi	g/L
Pepton	10
Et özütü	10
Maya	5
Glukoz	1
Agar	15

3.1.1.2. M9 Nişastalı Besi Yeri

İzole edilen *Bacillus* sp. suşlarının ürettiği amilaz enziminin aktivitesinin saptanması ve üretilmesi amacıyla kullanılmıştır (Ozturk ve ark, 2013; Aygan, 2008). Besi yerinin pH'ı amilaz pozitif suşların seçilmesi ve enzim üretimleri için 5.0 ve 7.0'ye ayarlanmıştır (izolasyon koşullarındaki pH değerlerine uygun olarak). Hazırlanan besiyeri otoklavda 121°C'de ve 1.2 atmosfer basıncında 15 dakika süreyle steril edilmiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. M9 Besi Yerinin İçeriği

Besi Yeri Bileşimi	g/L
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	6
KH ₂ PO ₄	3
NaCl	0.5
NH ₄ Cl	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.24
CaCl ₂ .2 H ₂ O	0.24
Pepton	3
Nişasta	10
Agar	15

3.1.1.3. Pullulanlı Besi Yeri

İzole edilen *Bacillus* sp. suşlarının ürettiği pullulanaz enziminin aktivitesinin saptanması ve üretilmesi amacıyla kullanılmıştır (Wei ve ark, 2014). Besi yerinin pH'ı pullulanaz aktivitesi gösteren suşların seçilmesi ve enzim üretimleri için 5.0 ve 7.0'ye ayarlanmıştır (izolasyon koşullarındaki pH değerlerine uygun olarak). Hazırlanan besi yeri otoklavda 121°C'de ve 1.2 atmosfer basıncında 15 dakika süreyle steril edilmiştir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Pullulanlı Besi Yerinin İçeriği

Besi yeri Bileşimi	g/L
Maya	3
Trypton	5
NaCl	5
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0.5
MgSO ₄	0.1
Pullulan	5
Agar	15

3.1.2. Kullanılan Çözeltiler**3.1.2.1. NaOH Çözeltisi**

Besi yerlerinin pH'ını ayarlamak için ve tampon çözeltilerin hazırlanmasında kullanılmak üzere 0.1 M, 1 M ve 2 M konsantrasyonlarda hazırlanmıştır.

3.1.2.2. Hidroklorik Asit (HCl) Çözeltisi

Besi yerlerinin pH'ını ayarlamak amacıyla 0.1 M ve 1 M konsantrasyonlarda hazırlanmıştır.

3.1.2.3. Lügol Solüsyonu

Nişastalı katı besi yerinde amilaz aktivitesinin saptanması amacıyla kullanılmıştır. Çizelge 3.4'te belirtilen oranlarda hazırlanan solüsyon kullanılmadan önce 20 kat sulandırılmıştır (Aygan ve ark, 2014).

Çizelge 3.4. Lügol Solüsyonunun İçeriği

Bileşimi	g /100mL
İyot (I)	7 g
Potasyum iyodür (KI)	3 g
Distile Su	100 mL

3.1.2.4. Etilalkol (%96)

Pullulanlı katı besi yerinde üreyen bakterilerin pullulanaz aktivite zonlarının belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır (Wei ve ark, 2014).

3.1.2.5. Sitrat-Fosfat Tamponu

Enzimlerin pH 3.0, 4.0 ve 5.0'teki aktivite ve stabilitelerinin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır. İstenilen pH değerindeki sodyum fosfat tamponunun

hazırlanması için Çizelge 3.5'te belirtilen hacimlerde 0.2 M sitrik asit (38.424 g/L) ve 0.2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (53.614 g/L) stok solüsyonları kullanılarak son hacim 100 mL olacak şekilde distile su eklenmiştir (Temizkan ve Arda, 2008) .

Çizelge 3.5. Sitrat-Fosfat Tamponunun İçeriği

pH	0.2 M sitrik asit	0.2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Son Hacim
3.0	39.8 mL	10.2 mL	100 mL
4.0	30.7 mL	19.3 mL	100 mL
5.0	24.3 mL	25.7 mL	100 mL

3.1.2.6. Fosfat Tamponu

Enzimlerin pH 6.0, 7.0 ve 8.0'deki aktivitelerinin ve stabilitelerinin saptanması amacıyla kullanılmıştır. İstenilen pH değerindeki sodyum fosfat tamponunu elde etmek için Çizelge 3.6'da belirtilen hacimlerde 0.2 M NaH_2PO_4 (23.996 g/L) ve 0.2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (53.614 g/L) stok solüsyonları kullanılarak son hacim 200 mL olacak şekilde distile su eklenmiştir (Temizkan ve Arda, 2008).

Çizelge 3.6. Fosfat Tamponunun İçeriği

pH	0.2 M sitrik asit	0.2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Son Hacim
6.0	87.7 mL	12.3 mL	200 mL
7.0	39.0 mL	61.0 mL	200 mL
8.0	5.3 mL	94.7 mL	200 mL

3.1.2.7. Glisin-NaOH Tamponu

Enzimlerin pH 9.0 ve 10.0 değerlerindeki aktivitelerini ve stabilitelerini belirlemek için kullanılmıştır. Çizelge 3.7'de belirtilen 0.2 M Glisin (15.014 g/L) ile 0.2 M NaOH (8 g/L) çözeltilerinden uygun miktarlarda alınıp son hacim 200 mL olacak şekilde distile su eklenmiştir. (Temizkan ve Arda, 2008).

Çizelge 3.7. Glisin-NaOH Tamponunun İçeriği

pH	0.2 M Glisin	0.2 M NaOH	Son Hacim
9.0	50 mL	8.8 mL	200 mL
10.0	50 mL	32 mL	200 mL

3.1.2.8. Borax-NaOH Tamponu

Enzimlerin pH 11.0 ve 12.0'deki aktivitelerini ve stabilitelerini saptamak için kullanılmıştır. Tamponu hazırlamak için 0.05 M Boraks (10.061 g/L) çözeltisinden 50 mL alınarak üzerine, istenilen pH değeri elde edilinceye kadar, uygun NaOH çözeltisinden (0.2 M NaOH ve yüksek pH değerleri için 2 N NaOH) yeterli hacimde eklenmiş ve son hacim 200 mL olacak şekilde distile su ilave edilmiştir (Temizkan ve Arda, 2008).

3.1.2.9. Dinitro Salisilik Asit (DNS) Çözeltisi

Amilaz ve pullulanaz enzim reaksiyonları sonunda açığa çıkan indirgen şeker miktarını belirlemek ve reaksiyonu durdurmak amacıyla kullanılmıştır. 1 g DNS 50 mL distile suda çözüldükten sonra üzerine 30 g Na-K-Tartarat eklenip ısıtılarak iyice karıştırılır. Elde edilen karışıma 20 mL 2 N NaOH ilave edilerek son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanır (Miller, 1959).

3.1.2.10. Glukoz Stok Çözeltisi

0.09 g glukoz 100 mL distile suda çözülerek hazırlanmıştır. Glukoz kalibrasyon grafiği için gerekli olan çeşitli glukoz konsantrasyonlarının hazırlanması amacıyla kullanılmıştır.

3.1.2.11. Sığır Serum Albumini (BSA) Stok Çözeltisi

10 mg BSA 100 mL distile suda çözülerek stok çözelti hazırlanmıştır. Bu stok çözelti, BSA kalibrasyon eğrisi için gerekli olan farklı BSA konsantrasyonlarının hazırlanması amacıyla kullanılmıştır (Bradford, 1976).

3.1.2.12. Renklendirme Çözeltisi

Renklendirme çözeltisi, karışımdaki protein konsantrasyonunun belirlenmesinde kullanılmıştır. Bu çözeltiyi hazırlamak amacıyla 0.6 g Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası 1 litre %2'lik perklorik asitte çözülmüştür. Çözelti kaba filtre kağıdından süzülüp koyu renkli şişeye aktarılmıştır. Hazırlanan filtrattan bir miktar alınarak 469 nm'de ölçüm yapılmıştır. Okunan absorbans değeri 1.3-1.5 arasında olmalıdır (Spector, 1978; Bradford, 1976).

3.1.3. İnce Tabaka Kromatografisinde Kullanılan Solüsyonlar**3.1.3.1. *n*-Butanol-Asetik Asit-Distile Su Çözeltisi**

Amilaz ve pullulanaz enzimlerinin hidroliz ürünlerinin saptanması amacıyla yapılan ince tabaka kromatografisi analizinde yürütme solüsyonu (hareketli faz) olarak kullanılmıştır. *n*-Butanol-asetik asit-distile su, 3:1:1 (v/v/v) oranında karıştırılarak hazırlanmıştır (Aygan ve ark, 2014; Arabacı, 2011; Shim ve ark, 2009; Kim ve ark, 1995).

3.1.3.2. %20'lik Sülfirik Asit (H₂SO₄)/Etil alkol Çözeltisi

Karışım, 80 mL etil alkol (%96) içerisine 20 mL H₂SO₄ çözeltisi (v/v) eklenerek hazırlanmıştır (Aygan ve ark, 2014; Arabacı, 2011; Shim ve ark, 2009; Kim ve ark, 1995). TLC'de oluşan reaksiyon ürünlerinin görünür hâle getirilmesi amacıyla kullanılmıştır.

3.1.3.3. D-Glukoz Çözeltisi (%1, w/v)

İnce tabaka kromatografisinde son ürünlerin tanımlanması amacıyla standart olarak kullanılmıştır.

3.1.3.4. Maltoz Çözeltisi (%1, w/v)

İnce tabaka kromatografisinde son ürünlerin tanımlanması amacıyla standart olarak kullanılmıştır.

3.1.3.5. Maltotrioz Çözeltisi (%1, w/v)

İnce tabaka kromatografisinde son ürünlerin tanımlanması amacıyla standart olarak kullanılmıştır.

3.1.3.6. Maltodekstrin Çözeltisi (%1, w/v)

İnce tabaka kromatografisinde son ürünlerin tanımlanması amacıyla standart olarak kullanılmıştır.

3.1.4. SDS-PAGE İşleminde Kullanılan Solüsyonlar**3.1.4.1. Solüsyon A**

Ayırıcı ve yığma jel hazırlanırken kullanılan bir çözeltidir. 29.2 g Akrilamid ve 0.8 g Bisakrilamid bir miktar distile suda çözüldükten sonra son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanır. Monomer çözeltisi koyu renkli şişede ve buzdolabında saklanır (Bollag ve ark, 1996).

3.1.4.2. Solüsyon B

Karışım, 75 mL 2 M Tris-HCl (pH 8.8), 4 mL %10'luk SDS ve 21 mL distile su ile hazırlanır (Bollag ve ark, 1996). Ayırıcı jel hazırlanırken kullanılmıştır.

3.1.4.3. Solüsyon C

Karışım, 50 mL 1 M Tris-HCl (pH 6.8), 4 mL %10'luk SDS ve 46 mL distile su ile hazırlanır (Bollag ve ark, 1996). Yığıma jel hazırlamada kullanılmıştır.

3.1.4.4. Amonyum Persülfat (AMPS) (%10)

Poliakrilamid jellerde polimerizasyonu başlatıcı ajan olarak kullanılır. 0.5 g AMPS 5 mL distile suda çözülerek hazırlanır. Her kullanımdan önce taze hazırlanmalıdır (Bollag ve ark, 1996).

3.1.4.5. N, N, N', N'-Tetrametiletilendiamin (TEMED)

Poliakrilamid jelin polimerizasyon reaksiyonunda katalizör olarak rol oynamaktadır.

3.1.4.6. Örnek Yükleme Tamponu (5X)

Analiz edilecek örneklerin hazırlanmasında kullanılmaktadır. 62.5 mM Tris (pH 6.8), %2 SDS, %5 β -merkaptotanol, %10 Gliserol ve %0.002 Bromfenol mavisi karışımından oluşan bir tampondur (Zhang ve ark, 2009).

3.1.4.7. Elektroforez Tamponu (pH 8.3)

3 g Tris, 14.4 g Glisin ve 1 g SDS 1 L distile su içinde çözülerek hazırlanmıştır (Bollag ve ark, 1996).

3.1.4.8. Jel Boyama Solüsyonu

Jeldeki protein bantlarının boyanması amacıyla kullanılır. 1 g Coomassie Brilliant Blue R-250, 450 mL metanol içerisinde çözülüp filtre kağıdından süzildikten sonra karışımın üzerine 100 mL asetik asit ve 450 mL distile su eklenerek hazırlanır (Bollag ve ark, 1996).

3.1.4.9. Renk Giderim Solüsyonu

Jele yapışan fazla boyanın jelden uzaklaştırılması için kullanılır. 100 mL metanol, 100 mL asetik asit ve 800 mL distile su ile hazırlanır (Bollag ve ark, 1996).

3.1.4.10. Renatürasyon Solüsyonları

Solüsyon I: 50 mM Na_2HPO_4 , 50 mM NaH_2PO_4 (pH 7.2) ve %40 oranında izopropanol eklenerek hazırlanmıştır (Burhan ve ark, 2003).

Solüsyon II: 50 mM Na_2HPO_4 ile 50 mM NaH_2PO_4 (pH 7.2) kullanılarak hazırlanmıştır (Burhan ve ark, 2003).

Solüsyon III: 50 mM Na_2HPO_4 , 50 mM NaH_2PO_4 (pH 7.2), 5 mM β -merkaptotanol ve 1 mM EDTA'nın bileşiminden oluşmaktadır (Burhan ve ark, 2003).

3.1.4.11. İyodin Solüsyonu

Amilaz enzimlerinin zimogram analizinde aktivite bantlarının tespit edilmesi için kullanılan iyodin solüsyonu, 5 g iyot (I) ve 50 g potasyum iyodürün (KI) 1 L distile suda çözülmesiyle hazırlanmıştır (Aygan ve ark, 2014; Burhan ve ark, 2003).

3.1.4.12. Kongo Kırmızısı Solüsyonu

Pullulanaz enzimlerinin zimogram analizinde elde edilen aktivite bantlarının görünür hâle getirilmesi amacıyla kullanılmıştır. 1 g Kongo kırmızısının 1 L distile suda çözülmesiyle hazırlanmıştır (Moubasher ve ark, 2010).

3.2. Metot

3.2.1. Bakteri İzolasyonu ve Teşhisi

3.2.1.1. Suşların İzolasyonu

Asidik ve nötral *Bacillus* sp. suşlarının izolasyonu için farklı ortamlardan alınan toprak örnekleri 1'er gram tartılarak pH'ı 5.0 ve 7.0 olan 50 mL'lik N1 sıvı besi yerlerine inoküle edilip, 55°C ve 200 rpm'de 6 saat inkübe edilmiştir. Bakteri üremesi gerçekleşen örneklerle, sporlu bakterilerin izole edilmesi amacıyla, 80°C'de 10 dakika süreyle ısı şoku uygulanmıştır (Arabacı, 2011; Lennette ve ark, 1985).

Örnekler ısı şoku uygulamasından sonra, 55°C ve 200 rpm'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra tek koloni elde etmek amacıyla örneklerden seri sulandırmalar yapılmıştır. Örneklerin seri sulandırmalarından pH'ı 5.0 ve 7.0 olan N1 agar besi yerlerine yayma ekim yapılmıştır ve 55°C'de 1 gece inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra *Bacillus* cinsine ait karakteristik morfolojik görünümüne sahip olan koloniler çizgi ekim yöntemiyle N1 agar besi yerlerine ekilip, 55°C'de inkübasyona bırakılmıştır. N1 agar ortamında üreyen örnekler stok kültür şeklinde saklanmışlardır (Arabacı, 2011).

3.2.1.2. Bakteri İdentifikasyonu

Bacillus sp. koloni morfolojisine sahip olan suşlar seçilerek amilaz ve pullulanaz enzim aktivitelerine sahip olup olmadıkları belirlenmiştir. Enzim üretme yeteneğinde olan bakterilerin teşhisi için gram boyama, spor boyama, katalaz aktivitesi gibi biyokimyasal testler yapılmıştır (Ratanakhanokchai ve ark, 1999).

Gram pozitif, endospor ihtiva eden ve katalaz aktivitesine sahip olan amilaz ve pullulanaz üreticisi suşların 16S ribozomal RNA analizi ile moleküler tanımlamaları ve Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) programı aracılığıyla NCBI genbankası veritabanına (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) kayıtları yapılmıştır. NCBI veritabanından onay numaraları alınan suşların filogenetik ağaçları çizilmiştir.

3.2.2. Bakterilerin Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi**3.2.2.1. Bakterilerin Katı Besi Yerindeki Amilaz ve Pullulanaz Aktivitelerinin Belirlenmesi**

İzole edilen *Bacillus* sp. suşları pH'ı 5.0 ve 7.0 olan M9 nişastalı ve pullulanlı katı besi yerlerine çizgi ekim tekniğiyle ayrı ayrı ekildikten sonra 55°C'lik etüvde 72 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Üreyen koloniler amilaz aktivitelerinin belirlenmesi için iyot solüsyonu ile boyanmıştır. Amilaz enzimi sentezleyerek nişastayı hidrolize eden kolonilerin etrafında şeffaf hidroliz zonunun oluşumu gözlemlenmiştir. Hidroliz zonu oluşturan koloniler amilaz pozitif olarak değerlendirilmiştir (Burhan ve ark, 2003; Hols ve ark, 1994).

Pullulanaz aktivitesinin saptanması amacıyla, üretilen kolonilerin üzerine etil alkol dökülmüştür. Etil alkolle muamele edilen petriler 1 saat süreyle derin dondurucuda (-20°C) bekletilmiştir. Etrafında şeffaf hidroliz zonu oluşan koloniler pullulanaz pozitif olarak değerlendirilmiştir (Wei ve ark, 2014).

3.2.2.2. Bakterilerin Katı Besi Yerinde Ürettiği, Amilaz ve Pullulanaz Enzim Sentezini Gerçekleştirdiği Optimum pH ve Sıcaklık Aralığının Belirlenmesi

Organizmaların üredikleri sıcaklık aralığı ile amilaz ve pullulanaz enzim sentezini gerçekleştirdikleri pH aralığını saptamak amacıyla, amilaz ve pullulanaz aktivitesi olan suşlardan 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0 pH değerlerine sahip M9 nişastalı ve pullulanlı katı besi yerlerine çizgi ekimler yapılmıştır. Örnekler 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 ve 70°C'lerde 72 saat inkübe edilerek üreyebildikleri pH ve sıcaklık aralıkları ile enzim sentezleme yetenekleri belirlenmiştir.

Nişasta içeren katı besi yerinde üreyen koloni çapları ölçüldükten sonra iyot buharına tutulup oluşan aktivite zon çapları ölçülerek enzim üretiminin gerçekleştiği pH ve sıcaklık aralıkları belirlenmiştir (Simair ve ark, 2017; Voget ve ark, 2006; Burhan ve ark, 2003).

Pullulanlı katı besi yerinde üreyen koloni çapları ölçüldükten sonra, etil alkol muamelesiyle oluşan hidroliz zon çapları ölçülerek enzim üretiminin gerçekleştiği pH ve sıcaklık aralıkları belirlenmiştir (Wei ve ark, 2014; Ara ve ark, 1995).

3.2.2.3. Bakterilerin Sıvı Besi Yerinde Ürettiği, Amilaz ve Pullulanaz Enzim Sentezinin Gerçekleştiği İnkübasyon Sürelerinin Belirlenmesi

Amilaz ve pullulanaz sentezleme yeteneğindeki suşların üredikleri ve enzim sentezini gerçekleştirdikleri optimum inkübasyon sürelerini belirlemek amacıyla amilaz ve pullulanaz üreticisi suşlar sıvı besi yerinde analiz edilmiştir.

Amilaz ve pullulanaz üreticisi suşlar pH'ları 5.0 ve 7.0 olan M9 nişastalı ve pullulanlı sıvı besi yerlerinde 24 saat süreyle ön inkübasyona bırakılmıştır. Bir gecelik taze kültürler OD₆₀₀'de okunarak bakteri yoğunluğu saptanmıştır. Kültürler, pH'ları 5.0 ve 7.0 olan M9 nişastalı ve pullulanlı sıvı besi yerlerine %1 oranında inoküle edilmişlerdir. Hazırlanan karışımlar bakterilerin izolasyon sıcaklığında (55°C) ve 150 rpm'de 4 gün inkübe edilmiştir.

İnokülasyon işleminden itibaren 0., 12., 24., 36., 48., 60., 72., 84. ve 96. saatlerde sıvı kültürlerden örnek alınmıştır. Alınan örnekler 7500 rpm'de 20 dakika süreyle santrifüj edilerek bakteriler uzaklaştırılmıştır (Nithya ve ark, 2016; Wang ve ark, 2016; Ozturk ve ark, 2013; Vijayalakshmi ve ark, 2012). Elde edilen süpernatantlar ile standart amilaz ve pullulanaz aktivite tayinleri yapılmıştır. Analiz sonunda suşların üredikleri ve enzim üretiminin gerçekleştirdikleri optimum inkübasyon süreleri belirlenmiştir.

3.2.2.4. Bakterilerin Sıvı Besi Yerinde Ürettiği, Amilaz ve Pullulanaz Enzim Sentezinin Gerçekleştiği Optimum pH ve Sıcaklık Aralığının Belirlenmesi

Bakterilerin sıvı besi yerinde ürettiği, amilaz ve pullulanaz enzim sentezini gerçekleştirdiği optimum pH ve sıcaklık aralıklarının saptanması amacıyla amilaz ve pullulanaz üreticisi suşlar sıvı besi yerinde analiz edilmiştir.

Amilaz ve pullulanaz üreten suşlar pH'ları 5.0 ve 7.0 olan M9 nişastalı ve pullulanlı sıvı besi yerlerinde 24 saat süreyle ön inkübasyona bırakılmıştır. Bir gecelik taze kültürler OD₆₀₀'de okunarak bakteri yoğunluğu saptanmıştır.

Enzim sentezlerinin gerçekleştiği pH aralığının belirlenmesi için, amilaz ve pullulanaz üreticisi suşlar pH'ı 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0 olan M9 nişastalı ve pullulanlı sıvı besi yerlerine %5 oranında inoküle edilmiştir. Suşlar, izolasyon sıcaklıklarında (55°C), 150 rpm'de ve her suşa ait optimum inkübasyon sürelerinde üremeye bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda her pH değerindeki örnek 7500 rpm'de 20 dakika süreyle santrifüj edilerek bakteriler uzaklaştırılmıştır. Elde edilen süpernatantlar ile standart amilaz ve pullulanaz aktivite tayinleri yapılmıştır ve enzim sentezinin gerçekleştiği optimum pH değerleri tespit edilmiştir.

Enzim sentezini gerçekleştirdiği pH değeri belirlenen amilaz ve pullulanaz üreticisi suşlar, enzimlerin sentezlendiği sıcaklık aralıklarının belirlenmesi amacıyla tespit edilen optimum pH'larda ayrı ayrı hazırlanan M9 nişastalı ve pullulanlı sıvı besi yerlerine %5 oranında inoküle edilmiştir. İnokülasyonu yapılan örnekler 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 ve 70°C'lerde ve 150 rpm'de, her suşa ait optimum üreme sürelerinde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda her sıcaklıktaki kültürlerden örnek alınıp 7500 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonucu elde edilen süpernatantlar ile standart amilaz ve pullulanaz aktivite tayinleri yapıp enzim sentezinin gerçekleştiği optimum sıcaklık değerleri belirlenmiştir (Wang ve ark, 2016; Hauli ve ark, 2013).

3.2.3. Enzim Üretimi

3.2.3.1. Sıvı Besi Yerinde Amilaz ve Pullulanaz Enzimlerinin Üretimi

Amilaz ve pullulanaz enzimlerinin elde edilmesi için, seçilen amilaz ve pullulanaz üreticisi suşlar içerisinde uygun substratlar bulunan sıvı besi yerlerinde, belirlenen optimum sıcaklık, pH ve inkübasyon sürelerinde üretilmişlerdir. Kültürler 7500 rpm'de 20 dakika süreyle 4°C'de santrifüj edilmiştir ve

süpernatantlar steril şişelere aktarılmıştır. Elde edilen süpernatantlar sonraki çalışmalarda ham enzim kaynağı olarak kullanılmıştır (Simair ve ark, 2017; Vijayaraghavan ve ark, 2015; Li ve ark, 2013; Samah ve ark, 2005).

3.2.3.2. Amilaz ve Pullulanaz Enzimlerinin Katı Besi Yerindeki Aktiviteleri

Elde edilen süpernatant enzimlerden 100'er µL alınarak, optimum pH değerlerinde hazırlanmış nişastalı ve pullulanlı agar besi yerlerine damlatılmıştır. Enzimlerin damlatıldığı petriler enzimlerin üretildiği optimum sıcaklık ve inkübasyon sürelerinde inkübe edilmiştir. Besi yerlerinde oluşan hidroliz zonlarına göre, elde edilen enzimlerin aktivite doğrulama testleri gerçekleştirilmiştir (Aygan ve ark, 2014; Arikan, 2008).

3.2.3.3. Amilaz ve Pullulanaz Enzimlerinin Aktivite Tayin Yöntemi

Amilaz ve pullulanaz enzim aktivitesinin saptanması için enzimlerin optimum aktivite gösterdikleri pH değerinde ayrı ayrı hazırlanmış ve içerisinde %1 nişasta ile %1 pullulan bulunan tamponlar kullanılmıştır.

Enzimlerin aktivite tayini için, 0.5 mL süpernatant (enzim kaynağı) ve 0.5 mL substratlı tampon karıştırılıp enzimin optimum aktivite sıcaklığında 60 dakika süreyle su banyosunda inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda ortama eşit miktarda (1 mL) 3,5-Dinitrosalisilik asit (DNS) ayırıcı eklendikten sonra reaksiyon karışımları 5 dakika süreyle kaynatılmıştır (Deljou ve Arezi, 2016; Dawood ve ark, 2015; Anto ve ark, 2006; Miller, 1959). Çeşme suyunda soğutma işlemi yapıldıktan sonra amilaz için 550 nm (Aygan ve ark, 2014; Burhan ve ark, 2003; Gessesse ve Gashe, 1997), pullulanaz için 540 nm dalga boyunda (Liu ve ark, 2016; Wei ve ark, 2014; Shankar ve ark, 2014) köre karşı spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır. Kör, enzimlerin üretildiği besiyeri ve substratlı tampon ile DNS karışımından oluşmaktadır.

3.2.3.4. Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması ve Enzimlere Ait Ünite Değerlerinin Hesaplanması

Enzim ünite miktarının bulunması için gerekli olan glukoz kalibrasyon eğrisini oluşturmak amacıyla 0.09 g/100mL konsantrasyonda glukoz stok çözeltisi hazırlanmıştır. Analiz için Çizelge 3.8'deki gibi hazırlanan örneklerin her birinden 1 mL alınarak tüplere aktarılmıştır ve üzerlerine 3'er mL DNS çözeltisi ilave edildikten sonra tüpler 10 dakika kaynar su banyosunda bekletilmiştir. Su banyosundan çıkarılan tüpler çeşme suyunda soğutulduktan sonra her bir tüpe 8 mL distile su eklenmiştir. Her glukoz değerine karşı oluşan absorbans değerinin bulunması için 540 nm dalga boyunda köre karşı spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır. Glukoz konsantrasyonlarına (mg/mL) karşı elde edilen absorbans değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.

Çizelge 3.8. Glukoz Kalibrasyon Grafiğinin Hazırlanması

	Kör	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3	Örnek 4	Örnek 5
Glukoz stok çözeltisi (mL)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
dH ₂ O (mL)	2	1.8	1.6	1.4	1.2	1
Hazırlanan çözeltinin konsantrasyonu (mg/mL)	0	0.09	0.18	0.27	0.36	0.45

Standart glukoz grafiği oluşturulduktan sonra enzim aktivitesi aşağıda verilen formül ile hesaplanmıştır:

$$\text{Enzim Aktivitesi} = \frac{W \times V \times 1000}{VE \times t}$$

W : Açığa çıkan glukoz miktarı (OD₅₄₀/Standart grafikten elde edilen eğim)

VE : Enzim hacmi (mL)

V : Reaksiyon çözeltisi hacmi (mL)

t : Reaksiyon süresi (dakika)

Bir ünite (U) amilaz veya pullulanaz aktivitesi, enzimin optimum sıcaklık ve pH değerinde, nişasta veya pullulandan 1 dakika sonunda 1 μ mol glukoz oluşturan enzim miktarı olarak ifade edilir (Miller, 1959).

3.2.3.5. BSA Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması ve Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Enzim çözeltilerinin içerdiği protein miktarı, sığır serum albumini (BSA) kullanılarak Bradford metoduna göre belirlenmiştir (Bradford, 1976). 10 mg BSA 100 mL distile suda çözülerek BSA grafiği hazırlamada kullanılacak olan stok çözelti elde edilmiştir.

Protein miktarlarının belirlenmesi için, Çizelge 3.9'da belirtildiği gibi hazırlanan örneklerin her birinden 1 mL alınarak tüplere aktarılmıştır ve üzerlerine 1 mL renklendirme çözeltisi ilave edilmiştir. Elde edilen karışımların 595 nm dalga boyunda köre karşı absorbans değerleri elde edilmiştir. Her BSA konsantrasyonuna (μ g/mL) karşı okunan absorbans değerleri ile eğri çizilerek kalibrasyon grafiği elde edilmiştir.

Çizelge 3.9. BSA Kalibrasyon Grafiğinin Hazırlanması

	Kör	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3	Örnek 4	Örnek 5
BSA stok çözeltisi (mL)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
dH ₂ O (mL)	2	1.9	1.8	1.7	1.6	1.5
Hazırlanan çözeltinin konsantrasyonu (μ g/mL)	0	5	10	15	20	25

3.2.4. Enzim Karakterizasyonu**3.2.4.1. Amilaz ve Pullulanaz Enzimlerinin Aktivite Gösterdiği Optimum pH Değerlerinin Belirlenmesi**

Optimum pH değerlerinin saptanması için 0.1 M Sitrat-Fosfat (pH 3.0, 4.0, 5.0), 0.1M Fosfat (pH 6.0, 7.0, 8.0), 0.1 M Glisin-NaOH (pH 9.0, 10.) ve 0.1 M Borax-NaOH (pH 11.0, 12.0) tamponları kullanılmıştır (Wang ve ark, 2016; Zhang ve ark, 2016; Dawood ve ark, 2015; Hauli ve ark, 2013; Vishnu ve ark, 2006).

Enzimlerin optimum pH değerlerinin saptanması için çeşitli pH değerlerinde hazırlanan, içerisinde %1 nişasta ve %1 pullulan bulunan tampon çözeltiler kullanılarak aktivite analizi yapılmıştır.

Enzim reaksiyonu için 0.5 mL süpernatant (enzim kaynağı) ve 0.5 mL substratlı pH tamponu karıştırılıp enzimin üretildiği sıcaklıkta 60 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda reaksiyon karışımına eşit miktarda DNS ayırıcı eklenerek karışım 5 dakika süreyle kaynatılmıştır. Soğutma işleminden sonra amilaz enzimi için 550 nm, pullulanaz enzimi için 540 nm dalga boyunda UV visible spektrofotometre kullanılarak köre karşı ölçüm yapılmıştır ve absorbans değerleri elde edilmiştir (Vishnu ve ark, 2006; Roy ve ark, 2003). En yüksek absorbans değerinin elde edildiği pH'nın absorbans değeri 100 kabul edilmiştir. Diğer pH'lardan elde edilen absorbanslar optimum değere göre oranlanıp, rölatif enzim aktivitesi belirlenmiştir (Mrudula ve ark, 2011; Burhan ve ark, 2003; Gessesse ve Gashe, 1997).

3.2.4.2. Amilaz ve Pullulanaz Enzimlerinin Aktivite Gösterdiği Optimum Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi

Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerinin belirlenmesi amacıyla optimum aktivitenin elde edildiği pH değerine sahip 0.5 mL substratlı tampon ve 0.5 mL enzim içeren reaksiyon karışımı 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100°C sıcaklıklarda 60 dakika inkübe edilmiştir (Kunamneni ve ark, 2006).

İnkübasyon sonunda reaksiyon karışımına eşit hacimde DNS çözeltisi eklenerek 5 dakika kaynatma işlemi uygulanmıştır. Amilazlar için 550 nm, pullulanazlar için 540 nm dalga boyunda UV visible spektrofotometrede köre karşı ölçüm yapılmıştır (Wei ve ark, 2014; Aygan, 2008).

En yüksek absorbans değerinin elde edildiği sıcaklık 100 kabul edilerek diğer sıcaklıklardan elde edilen veriler optimum değere göre oranlanmış ve rölatif enzim aktivitesi hesaplanmıştır (Arabacı, 2011; Burhan ve ark, 2003).

3.2.4.3. Amilaz ve Pullulanaz Enzimlerinin pH Stabilitelerinin Belirlenmesi

pH stabilitelerinin belirlenmesi amacıyla, amilaz ve pullulanaz enzimleri pH 3.0-11.0 aralığındaki değerlerde hazırlanmış substratsız pH tamponlarıyla 24 saat süreyle oda sıcaklığında ön inkübasyona bırakılmıştır (Wei ve ark, 2014; Kalpana ve Pandian, 2014; Aygan, 2008; Behal ve ark, 2006).

Stabilite analizi için ön işlem görmüş amilaz ve pullulanaz enzimlerinden 0.5 mL ve substratlı optimum pH tamponu çözeltisinden 0.5 mL karıştırılmıştır. Reaksiyon karışımı optimum aktivitenin gerçekleştiği sıcaklıkta 60 dakika süreyle inkübe edildikten sonra standart aktivite analizi yapılmıştır. Başlangıç enzim aktivitesinin saptanması için ön işleminden geçmemiş enzimler ile aktivite analizleri yapıp, elde edilen sonuç 100 olarak değerlendirilmiştir. Farklı pH değerlerinde 24 saatlik ön işleminden geçirilen enzimlerden elde edilen aktivite sonuçları ile enzimlerin orjinal aktivite sonuçları karşılaştırılarak her bir pH için kalan enzim aktiviteleri bulunmuştur (Ozturk ve ark, 2013; Arabacı, 2011; Burhan ve ark, 2003).

3.2.4.4. Amilaz ve Pullulanaz Enzimlerinin Sıcaklık Stabilitelerinin Belirlenmesi

Termal stabilitenin belirlenmesi amacıyla, amilaz ve pullulanaz enzimleri 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 ve 110°C sıcaklıklarda 60 dakika süreyle ön

inkübasyona bırakılmıştır (Emtenani ve ark, 2015; Kalpana ve Pandian, 2014). Ön işlemden geçmiş enzimlerden 0.5 mL alınarak 0.5 mL substratlı optimum pH tamponuyla karıştırılmıştır. Reaksiyon karışımı enzimlerin optimum aktivite sıcaklığında 60 dakika inkübe edildikten sonra standart aktivite analizleri yapılmıştır (Emtenani ve ark, 2015; Wei ve ark, 2014; Aygan, 2008).

Orijinal enzim aktivitesinin saptanması için kontrol olarak ön işlem görmemiş enzim kullanılmıştır. Bu analizden elde edilen sonuç 100 kabul edilmiştir. Ön inkübasyon işleminin gerçekleştirildiği her sıcaklık değerinden elde edilen sonuçlar, enzimlerin başlangıç aktivite değerlerinden elde edilen sonuçlarla oranlanarak % kalan enzim aktivitesi hesaplanmıştır (Arabacı, 2011; Burhan ve ark, 2003; Mehrotra ve ark, 1999; Gessesse ve Gashe, 1997).

3.2.4.5. İnhibitör, Şelatör, Metal İyonu, Deterjan ve Okside Edici Ajanların Amilaz ve Pullulanaz Enzim Aktivitesine Etkisinin Belirlenmesi

Çeşitli kimyasalların amilaz ve pullulanaz enzimleriyle etkileşimlerinin belirlenmesi amacıyla iki farklı konsantrasyonda hazırlanan kimyasallar (1 mL) ile amilaz ve pullulanaz enzimleri (1 mL) ayrı ayrı karıştırılarak süspansiyonlar hazırlanmıştır. NA1 alkali amilaz ve NP1 asidik pullulanaz için 50°C, NA2 asidik amilaz ve NP2 alkali pullulanaz için 60°C’de 60 dakika süreyle ön inkübasyon gerçekleştirilmiştir (Arabacı, 2011; Aygan, 2008).

İnhibitör, şelatör, metal iyonu, deterjan ve okside edici ajan olarak PMSF, EDTA, CaCl₂, MgCl₂, CuCl₂, ZnCl₂, BaCl₂, MnCl₂, CoCl₂ ve HgCl₂ (5 mM ve 10 mM), üre (4M ve 8M), SDS, TritonX-100, Tween20, Tween80, β-Merkaptoetanol ve H₂O₂ (%1 ve %5 konsantrasyonda) kullanılmıştır (Zhang ve ark, 2016; Behal ve ark, 2006).

Ön işlem görmüş amilaz ve pullulanaz enzimlerinden 0.5 mL alınarak 0.5 mL substratlı optimum pH tamponuyla karıştırılmış ve optimum aktivite sıcaklığında 60 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında standart

aktivite analizleri yapılmıştır. Başlangıç enzim aktivitesinin saptanması için ön işlemde geçmemiş enzimler 100 olarak kabul edilmiştir. Ön işlem uygulaması yapılan örneklerden elde edilen değerler orijinal aktivite ile karşılaştırılarak kalan enzim aktivitesi hesaplanmıştır (Zhang ve ark, 2016; Arabacı, 2011; Arıkan, 2008).

3.2.4.6. NaCl'ün Amilaz ve Pullulanaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

NaCl'ün enzim aktivitesine etkisini araştırmak için %1, 5, 10 ve 15'lik NaCl çözeltileri kullanılmıştır. Enzimler ve çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanmış NaCl çözeltileri (1:1 mL) karıştırılarak NA1 alkali amilaz ve NP1 asidik pullulanaz için 50°C, NA2 asidik amilaz ve NP2 alkali pullulanaz için 60°C'de 60 dakika ön inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Ön işlem uygulanan enzimler ile optimum pH değerine sahip susbitratlı tampon eşit hacimde (0.5 ml enzim+0.5 ml substrat) karıştırılmıştır. Reaksiyon karışımları enzimlerin optimum aktivite sıcaklıklarında 60 dakika inkübe edildikten sonra standart enzim aktivitesi analizleri gerçekleştirilmiştir. Ön işlem görmemiş amilaz ve pullulanaz enzimleri ile standart aktivite analizleri yapılarak başlangıç enzim aktiviteleri belirlenmiştir (kontrol) ve bu değer 100 olarak kabul edilmiştir (Aygan, 2008). Ön işlem uygulaması yapılan örneklerden elde edilen değerler orijinal aktivite ile karşılaştırılarak kalan enzim aktivitesi hesaplanmıştır (Kahar ve ark, 2016; Arabacı, 2011; Arıkan, 2008; Pomares ve ark, 2003).

3.2.4.7. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) ile Hidroliz Ürünlerinin Belirlenmesi

Amilaz ve pullulanaz enzimlerinin hidroliz ürünleri ince tabaka kromatografisi (TLC) ile analiz edilmiştir. TLC analizi için TLC Silica Gel 60 F₂₅₄ (Merck) kromatografi plakaları kullanılmıştır.

Amilaz ve pullulanaz enzimleri, her enzimin optimum aktivitesinin elde edildiği pH tamponlarında hazırlanan ve %1, 2, 4 nişasta ve pullulan içeren substrat çözeltileriyle optimum aktivite sıcaklıklarında 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra reaksiyon karışımlarından örnekler alınarak (15-20 µL) TLC plakaları üzerine aktarılmıştır. Açığa çıkan son ürünleri saptamak amacıyla glukoz (G1), maltoz (G2), maltotrioz (G3) ve maltodekstrin (G4) standart çözeltileri (%1) reaksiyon ürünleriyle birlikte plakalara yüklenmiştir (5 µL) (Zareian ve ark, 2010; Roy ve ark, 2003).

Oluşan reaksiyon ürünlerinin birbirinden ayrılabilmesi için, hazırlanan plakalar örneklerin yüklendiği kenardan itibaren dik bir şekilde n-butanol: asetik asit: su (3:1:1) yürütme çözeltilisine batırılmıştır. Bu sayede moleküllerin silika jelde göç etmeleri sağlanmıştır (Emtenani ve ark, 2015). Bu işlem kapalı hazne ortamında yaklaşık 6 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra plakalar oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Plakalar kuruduktan sonra hidroliz ürünlerinin görünür hâle gelmesi için plakalara %20'lik sülfürik asit (H₂SO₄)-etilalkol (v/v) çözeltisi püskürtülerek boyama işlemi gerçekleştirilmiştir (Zareian ve ark, 2010). Bu uygulamanın hemen ardından TLC plakaları 120°C'lik fırına konulup, yaklaşık 20-30 dakika süreyle kurutulmuştur (Aygan, 2008).

3.2.4.8. SDS-PAGE Yöntemi ile Zimogram Analizi

Amilaz ve pullulanaz enzimlerinin moleküler ağırlıklarını belirlemek ve zimogram analizlerini gerçekleştirmek için Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrophores (SDS-PAGE) yöntemi kullanılmıştır.

NA1 alkali ve NA2 asidik amilaz enzimlerinin zimogram analizini yapmak ve moleküler ağırlıklarını saptamak amacıyla, içerisinde %1 nişasta (w/v) bulunan %10'luk ayırıcı jel kullanılmıştır (Arabacı, 2011). NP1 asidik ve NP2 alkali pullulanaz enzimlerinin zimogram analizini yapmak ve moleküler ağırlıklarının

belirlemek amacıyla, %1 pullulan (w/v) içeren %8'lik ayırıcı jel kullanılmıştır (Yang ve ark, 2004).

Amilaz enzimleri için %10'luk ayırıcı jelin hazırlanmasında, 6.5 mL SolA, 5 mL SolB, 8.5 mL distile su, %1 nişasta kullanılmıştır. Pullulanaz enzimleri için 5.4 mL SolA, 5 mL SolB, 9.6 mL distile su, %1 pullulan içeren %8'lik ayırıcı jel karışımı hazırlanmıştır.

Amilaz enziminin analiz edildiği %10'luk jel karışımına degaz işleminden sonra 66 µL AMPS ve 20 µL TEMED eklenerek jel cam plakalar arasına dökülmüştür. Daha sonra jelin üst yüzeyi distile su ile kapatılarak polimerizasyona bırakılmıştır.

Pullulanaz enziminin analiz edildiği %8'lik jel karışımına degaz işleminden sonra 100 µL AMPS ve 10 µL TEMED ilave edilmiştir. Karışım cam plakalar arasına dökülerek üst yüzeyi distile su ile kapatılmıştır ve polimerizasyon gerçekleştirilmiştir (Aygan, 2008).

Ayırıcı jel polimerize olduktan sonra %5 konsantrasyonda yığma jel karışımı (1.75 mL SolA, 2.25 mL SolC, 5 mL distile su, 20 µL AMPS, 7.5 µL TEMED) hazırlanarak polimerize olmuş olan ayırıcı jel üzerine dökülmüştür. Jelde, örneklerin yükleneceği kuyucukların oluşması amacıyla yığma jel polimerize olmadan evvel cam plakalar arasına elektroforez tırağı yerleştirilmiş ve oda sıcaklığında yaklaşık 60 dakika süreyle polimerizasyon gerçekleştirilmiştir (Burhan ve ark, 2003; Coral ve ark, 2002; Bollag ve ark, 1996;).

Polimerizasyondan sonra jelde oluşan kuyucuklara, örnek yükleme tamponuyla karıştırılmış enzim örneklerinden 75 µL yüklenmiştir. Enzimlerin molekül ağırlıklarının belirlenmesi amacıyla kuyucuklardan birine 10 µL marker protein (Thermo Scientific Prestained Protein Moleküler Weight Marker (Lot: 00427944) 120, 90, 50, 34, 26, 20 kDa) konulmuştur. Elektroforez işlemi süresince jele 10 mA akım uygulanmıştır. İzleme boyası ayırıcı jelin bitiş noktasına ulaşmadan elektroforez işlemi sonlandırılmıştır (Gözükara, 2009; Aygan, 2008).

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jeller cam plakalar arasından çıkarılmıştır. Daha sonra marker proteininin bulunduğu ilk kısım jelden kesilerek çıkartılmış ve boyama çözeltisine konularak proteinlerin boyanması için 2 saat boyama işlemi yapılmıştır. Bu süre sonunda jel birkaç kez distile suyla yıkandıktan sonra jel renk giderim solüsyonuna konulmuştur. 1 gece süreyle protein dışındaki yapıları bağlanmış boyanın giderim işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu süre sonunda jel, bantların daha net görünmesi için %1'lik gliserol çözeltisinde bekletilmiştir (Aygan, 2008).

Jeldeki aktivite bantlarının saptanması amacıyla örneklerin bulunduğu diğer jel parçaları renatürasyon işlemlerinden geçirilmiştir. Renatürasyon uygulaması üç farklı çözelti kullanılarak, farklı sıcaklık ve sürelerde jeldeki SDS'nin uzaklaştırılması için gerçekleştirilen bir işlemdir. Bu amaçla, jel oda sıcaklığında 1 saat solüsyon-I, 1 saat solüsyon-II ve +4°C'de bir gece solüsyon-III'te inkübe edilmiştir. Renatürasyon işleminden sonra jel cam plaka üzerine alınarak hava almayacak şekilde streç film ile kaplanıp, enzimlerin optimum aktivite gösterdikleri sıcaklıkta 24 saat inkübasyona bırakılmıştır (Burhan ve ark, 2003).

İnkübasyondan sonra nişastalı jeller iyodin solüsyonuyla boyanarak amilaz enzimlerinin aktivite bölgeleri ve moleküler ağırlıkları belirlenmiştir (Arabacı, 2011; Aygan, 2008). Pullulanlı jeller ise, öncelikle 30 dakika süreyle Kongo kırmızısı (1 g/L) ile boyanmıştır. Daha sonra 15 dakika iyodin solüsyonunda (5 g/L iyot ve 0.5 g/L potasyum iyodür) bekletilerek aktivite bantları ve enzimlerin moleküler ağırlıkları belirlenmiştir (Aygan ve ark, 2014; Moubasher ve ark, 2010).

3.2.5. Enzim Denemeleri

3.2.5.1. Enzimlerin Yıkama Performans Analizleri

Amilaz ve pullulanaz enzimlerinin biyo-deterjan formülasyonunda kullanılabilirliklerini saptamak amacıyla enzimlerin yıkama performans analizleri yapılmıştır. Bu amaçla, öncelikle 4x4 cm büyüklüğünde kesilmiş beyaz renkli

pamuklu kumaş parçaları yemek sosu (Heinz, American Steak Souce), bebek maması (Herobaby, Karışık Meyveli ve Yulaflı) ve çikolata (Ülker, Sütü Çikolata) ile lekelenmiştir. Lekelerin kuruması ve kumaşlara nüfuz etmesi için lekeli kumaş parçaları 1 gece oda sıcaklığında bekletilmiştir. Yıkama performanslarını test etmek için 3 farklı lekenin uygulanmış olduğu kumaş parçaları, sırasıyla ve ayrı ayrı, aşağıda anlatıldığı şekilde hazırlanmış karışımların bulunduğu beherlere konulmuştur:

1. Yalnızca 25 mL çeşme suyu içeren beherler
2. %1 (v/v) oranında ticari deterjan (Ariel marka sıvı çamaşır deterjanı) içeren çeşme suyu bulunan ve toplam hacmi 25 mL olan karışımın bulunduğu beherler,
3. 500 U/mL enzim ve çeşme suyundan oluşan 25 mL'lik karışımların bulunduğu beherler,
4. %1 (v/v) ticari deterjan, 500U/mL enzim ve çeşme suyu içeren toplam 25 mL karışımın bulunduğu beherler.

Yukardaki şekilde hazırlanan ve içerisinde lekeli kumaşların bulunduğu beherler her enzimin kendi optimum sıcaklığında 1 saat süreyle 100 rpm/dk hızdaki çalkalayıcı sistem kullanılarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra kumaş parçaları beherlerden alınarak çeşme suyuyla durulanmış ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Enzimlerin leke çıkarma kapasiteleri sadece çeşme suyunda bekletilen lekeli kumaşlar, herhangi bir işlem görmemiş lekeli kumaşlar ve lekesiz kumaşlarla kıyaslanarak görsel olarak belirlenmiştir (Roohi ve ark, 2013; Roy ve ark, 2012).

3.2.5.2. Nişastanın Sıvılaştırılması

Nişasta sıvılaştırma denemeleri için her enzimin optimum aktivite gösterdiği pH tamponunda hazırlanmış %5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ve 50 oranında nişasta içeren karışımlardan 4 mL alınarak üzerine 1 mL süpernatant (amilaz ve

pullulanaz enzim kaynağı) eklenip, 2 saat süreyle enzimlerin optimum aktivite gösterdikleri sıcaklıklarda inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonunda reaksiyon tüplerinde gerçekleşen sıvılaşma davranışı ve orijinale göre oluşan sıvılaşma sonucu meydana gelen renk değişimi dikkate alınarak enzimin sıvılaştırma yeteneği belirlenmiştir. Reaksiyon sonunda tüpler alt üst edilerek orijinale göre oluşan akıcılık, sıvılaştırma oranı için kriter olarak alınmıştır. Ayrıca endüstriyel uygulamada hızlı karar vermek için standart uygulama olan ve açığa çıkan % glukoz değerini gösterme prensibine göre çalışan, BriX sistemi ile sıvılaştırma ve ortaya çıkan glukoz değeri saptanmıştır.



4. BULGULAR ve TARTIŞMA**4.1. Bakteri İzolasyonu ve Teşhisine Ait Bulgular****4.1.1. Suşların İzolasyon Bulguları**

Farklı toprak örneklerinden ısı şoku uygulaması ile izole edilen ve koloni morfolojisi görünümüne göre *Bacillus* cinsine ait olduğu değerlendirilen toplam 324 bakteri amilaz ve pullulanaz enzim taraması için kullanılmıştır.

İzole edilen toplam 324 suşun 196'sı nötral, 128'i asidik koşullarda üreme özelliği göstermiştir. İzole edilen 196 nötral suşun 97'si amilaz pozitif, 36'sı pullulanaz pozitif özellik gösterirken, 128 asidik suşun 28'i amilaz pozitif, 13'ü pullulanaz pozitif olarak belirlenmiştir. Seçilen sporlu bakterilerden nötral koşullarda üreyenlerin oranı ortalama %60.5 olarak hesaplanmıştır. Buna karşılık asidik koşullarda üreme yeteneğine sahip olan örneklerin oranı ortalama %39.5'tur.

Nötral suşlar içerisinde amilaz pozitif özellikteki örneklerin oranı yaklaşık %49.5 iken, pullulanaz aktivitesi gösteren suşlarınki yaklaşık %18.4'tür. Amilaz ve pullulanaz üretme yeteneğinde olmayan suşların oranı ise yaklaşık %32.1 olarak hesaplanmıştır.

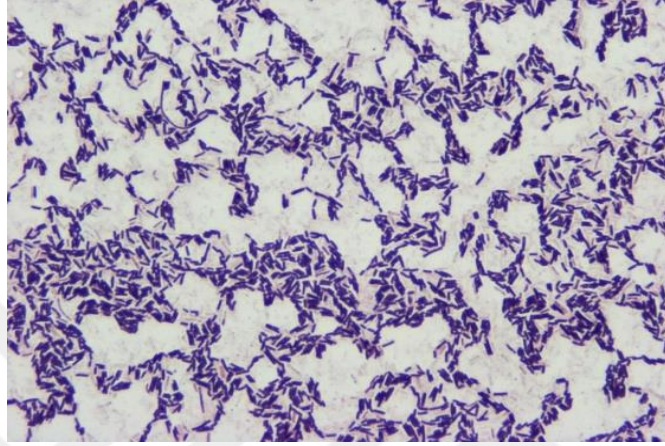
Asidik koşullarda üreyen toplam 128 suştan amilaz üretme yeteneğine sahip olanların oranı yaklaşık %21.8, pullulanaz sentezleme özelliği bulunanlarınki ise yaklaşık %10.2 olarak hesaplanmıştır. Amilaz ve pullulanaz sentezleme yeteneği olmayanların oranı ortalama %68'dir.

Asidik ve nötral koşullarda üreyen ve aktivite zon çapına göre en iyi amilaz ve pullulanaz üreticisi oldukları belirlenen 4 adet suşun, enzimlerin üretiminde kullanılmak üzere, stok kültürleri yapılmıştır.

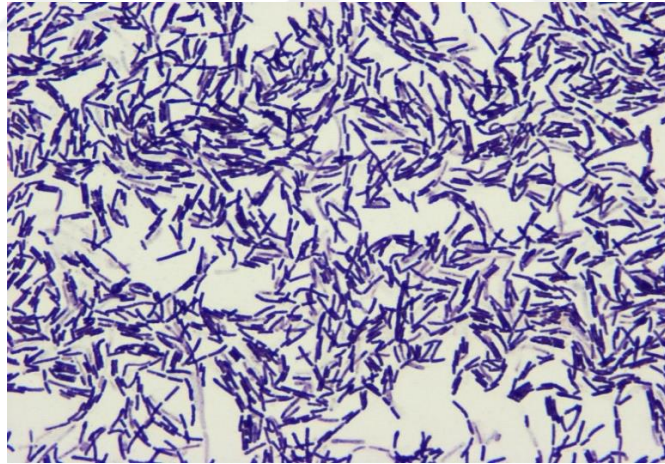
4.1.2. Bakterilerin İdentifikasyon Bulguları

Seçilen suşlar, beyaz renkli ve dalgalı kenarlı koloni morfolojisine sahip, gram pozitif, çubuk şekilli, katalaz pozitif, aerob ve endospor oluşturan tipik *Bacillus*

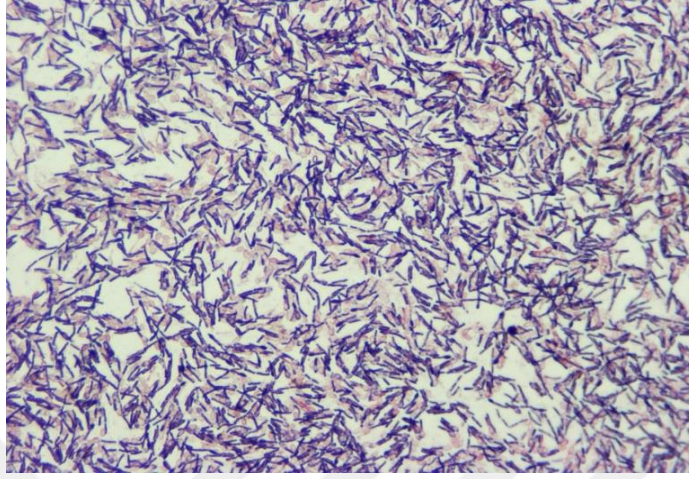
görünümlü bakteriler olarak belirlenmişlerdir (Şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7 ve 4.8).



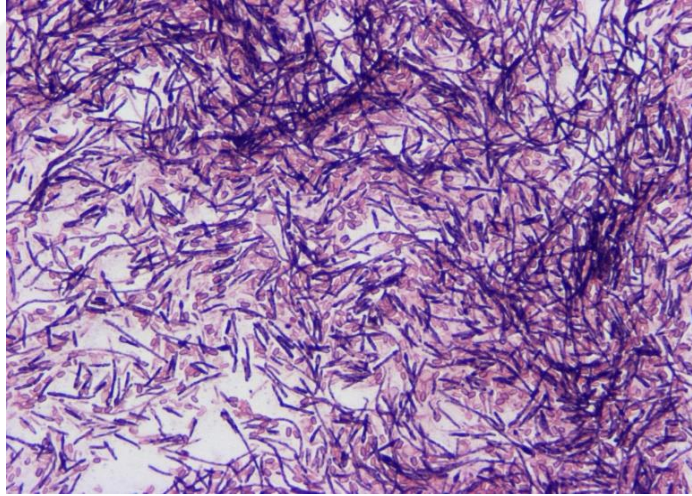
Şekil 4.1. *Aeribacillus pallidus* NA1 Suşunun Gram Boyamasına Ait Mikroskop Görüntüsü



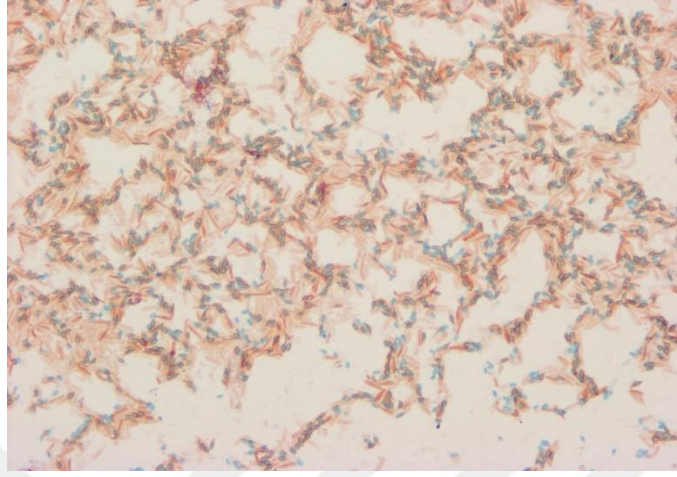
Şekil 4.2. *Geobacillus lituanicus* NA2 Suşunun Gram Boyamasına Ait Mikroskop Görüntüsü



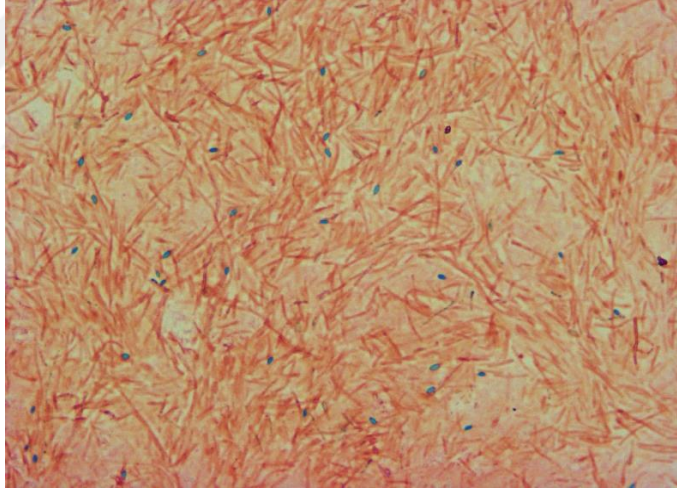
şekil 4.3. *Geobacillus thermoleovorans* NP1 Suşunun Gram Boyamasına Ait Mikroskop Görüntüsü



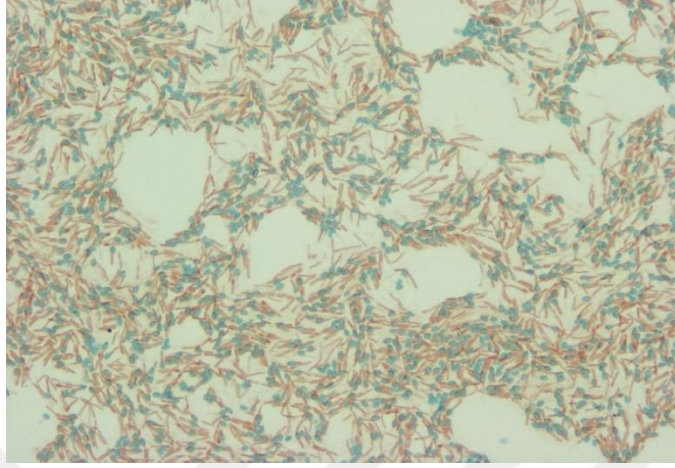
şekil 4.4. *Anoxybacillus rupiensis* NP2 Suşunun Gram Boyamasına Ait Mikroskop Görüntüsü



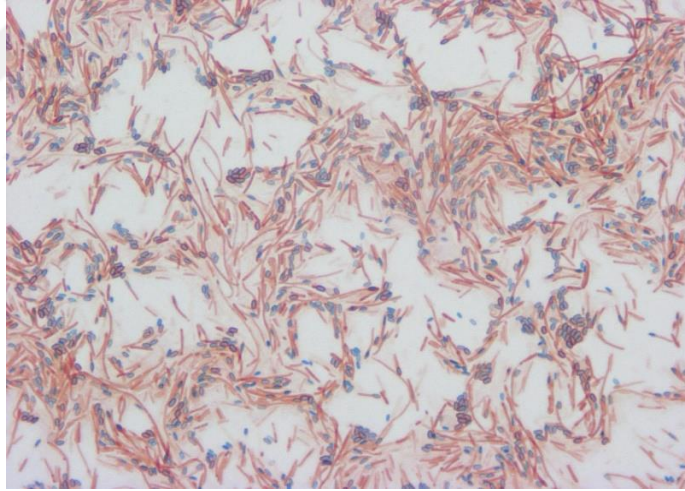
şekil 4.5. *Aeribacillus pallidus* NA1 Suşunun Spor Boyamasına Ait Mikroskop Görüntüsü



şekil 4.6. *Geobacillus lituanicus* NA2 Suşunun Spor Boyamasına Ait Mikroskop Görüntüsü



şekil 4.7. *Geobacillus thermoleovorans* NP1 Suşunun Spor Boyamasına Ait Mikroskop Görüntüsü



şekil 4.8. *Anoxybacillus rupiensis* NP2 Suşunun Spor Boyamasına Ait Mikroskop Görüntüsü

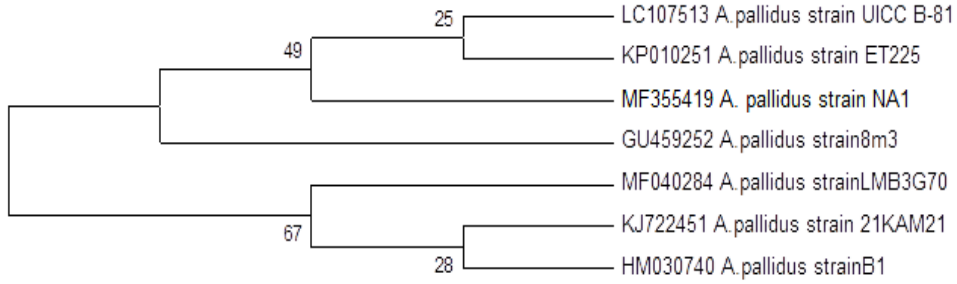
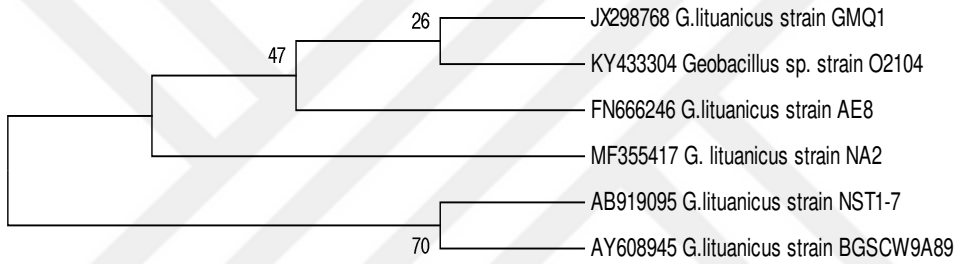
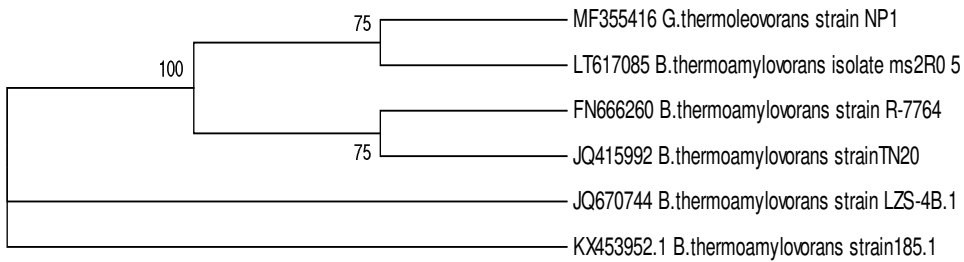
Enzim üretiminde kullanılmak üzere seçilen suşların 16S rRNA analizine göre gerçekleştirilen moleküler tanımlama deneyleri BM Laboratuvar Sistemleri firması tarafından Sanger Dideoksi Sekanslama tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sekanslama sonucu tür düzeyinde tanımlanan suşlar, National Center for Biotechnology Information (NCBI) gen bankası veritabanına kaydedilerek her suş için ayrı ayrı erişim numaraları alınmıştır (Çizelge 4.1).

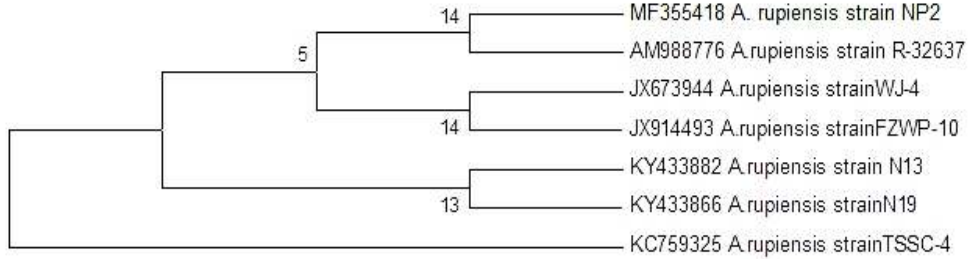
Çizelge 4.1. İzole Edilen Suşların Tür İsmi, NCBI Veritabanındaki Erişim Numaraları ve İnternet Erişim Adresleri

Suş Adı	NCBI Erişim Numarası ve İnternet Erişim Adresi
<i>Aeribacillus pallidus</i> NA1	MF355419 www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MF355419.1
<i>Geobacillus lituanicus</i> NA2	MF355417 www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MF355417.1
<i>Geobacillus thermoleovorans</i> NP1	MF355416 www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MF355416.1
<i>Anoxybacillus rupiensis</i> NP2	MF355418 www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MF355418.1

Suşların evrimsel tarihleri, UPGMA metodu kullanılarak çıkarılmış (Sneath ve Sokal, 1973), evrimsel analizleri ise MEGA6'da yapılmıştır (Tamura ve ark, 2013).

Aeribacillus pallidus NA1, *Geobacillus lituanicus* NA2, *Geobacillus thermoleovorans* strain NP1 ve *Anoxybacillus rupiensis* NP2 suşlarına ait filogenetik ağaçlar Şekil 4.9, 4.10, 4.11 ve 4.12'de gösterilmiştir.

Şekil 4.9. *Aeribacillus pallidus* NA1 Suşuna Ait Filogenetik AğaçŞekil 4.10. *Geobacillus lituanicus* NA2 Suşuna Ait Filogenetik AğaçŞekil 4.11. *Geobacillus thermoleovorans* NP1 Suşuna Ait Filogenetik Ağaç

Şekil 4.12. *Anoxybacillus rupiensis* NP2 Suşuna Ait Filogenetik Ağaç

4.2. Bakterilerin Üreme ve Enzim Sentezleme Yeteneklerine Ait Bulgular

4.2.1. Bakterilerin Katı Besi Yerinde Ürediği, Amilaz ve Pullulanaz Sentezlediği Optimum pH ve Sıcaklıklara Ait Bulgular

Enzim üretimi ve karakterizasyonu için seçilen *Aeribacillus pallidus* NA1, *Geobacillus lituanicus* NA2, *Geobacillus thermoleovorans* NP1 ve *Anoxybacillus rupiensis* NP2 şeklinde tanımlanan nötral ve asidik enzim üreticilerinin (amilaz ve pullulanaz) katı besiyerinde analizleri gerçekleştirilmiştir. Amilaz enzimi çalışmalarından elde edilen bulgular Çizelge 4.2 ve 4.3'te, pullulanaz enzimi çalışmalarından elde edilen bulgular Çizelge 4.4 ve 4.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. *Aeribacillus pallidus* NA1 Suşunun Katı Besiyerinde Ürediği ve Amilaz Sentezini Gerçekleştirdiği Optimum pH

pH (NA1)	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0
Koloni çapı (mm)	2	2	4	3	3
Aktivite zon çapı (mm)	16	17	23	19	18

Aeribacillus pallidus NA1 suşu ile gerçekleştirilen analizlerde elde edilen bulgular, suşun en iyi üreme ve enzim sentezleme davranışını pH 7.0'de gerçekleştirdiğini göstermektedir. (Çizelge 4.2). Seçilen suş, pH 5.0 ve 6.0 da 2 mm,

8.0 ve 9.0 da 3 mm koloni çapı oluşturarak ürerken, pH 7.0'de 4 mm koloni çapı oluşturarak iyi bir üreme davranışı göstermiştir. Suşun aktivite zon çapı pH 5.0'te 16 mm, pH 6.0'da 17 mm, pH 7.0'de 23 mm, pH 8.0'de 19 mm ve pH 9.0'da 18 mm olarak ölçülmüştür.

Çizelge 4.3. *Aeribacillus pallidus* NA1 Suşunun Katı Besiyerinde Ürettiği ve Amilaz Sentezini Gerçekleştirdiği Optimum Sıcaklık

Sıcaklık (°C) (NA1)	35	40	45	50	55	60	65	70
Koloni çapı (mm)	2	2	2	3	2	2	-	-
Aktivite zon çapı (mm)	6	8	21	11	10	10	-	-

Aeribacillus pallidus NA1 suşu ile gerçekleştirilen analizler, bakterinin en iyi üreme ve enzim sentezleme davranışını 45°C'de gerçekleştirdiğini göstermektedir (Çizelge 4.3). Seçilen suş 35, 40, 55 ve 60°C'de 2 mm koloni çapı oluşturarak üreme gösterirken, 50°C'de 3 mm koloni çapı elde edilmiştir. *Aeribacillus pallidus* NA1 suşunun aktivite zon çapları 35°C'de 6 mm, 40°C'de 8 mm, 50°C'de 11 mm, 55 ve 60°C'de 10 mm aktivite zonu oluşturmuştur. Seçilen suş 45°C'de 2 mm koloni 21 mm aktivite zon çapı meydana getirmiştir.

Çizelge 4.4. *Geobacillus lituanicus* NA2 Suşunun Katı Besiyerinde Ürettiği ve Amilaz Sentezini Gerçekleştirdiği Optimum pH

pH (NA2)	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0
Koloni çapı (mm)	7	5	3	2	2
Aktivite zon çapı (mm)	26	23	20	14	14

Geobacillus lituanicus NA2 suşu ile gerçekleştirilen analizlerde bakterinin en iyi ürediği ve enzim sentezlediği pH değeri 5.0 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.4). Seçilen suş, pH 5.0'te 7 mm, 6.0'da 5 mm, 7.0'de 3 mm 8.0 ve 9.0'da 2 mm koloni çapı oluşturarak üremiştir. Suşun aktivite zon çapı pH 5.0'te 26 mm, pH 6.0'da 23 mm, pH 7.0'de 20 mm, pH 8.0 ve 9.0'da 14 mm olarak ölçülmüştür.

Çizelge 4.5. *Geobacillus lituanicus* NA2 Suşunun Katı Besiyerinde Ürediği ve Amilaz Sentezini Gerçekleştirdiği Optimum Sıcaklık

Sıcaklık (°C) (NA2)	35	40	45	50	55	60	65	70
Koloni çapı (mm)	2	2	2	3	2	2	-	-
Aktivite zon çapı (mm)	6	8	10	11	21	10	-	-

Aeribacillus lituanicus NA2 suşu ile gerçekleştirilen analizlerde bakterinin en iyi ürediği ve enzim sentezlediği sıcaklık değeri 55°C olarak bulunmuştur (Çizelge 4.5). Analiz edilen suş 65 ve 70°C'de ürememiştir. Buna karşılık 35, 40, 45 ve 60°C'de 2 mm koloni çapı ve sırasıyla, 6, 8, 10 ve 10 mm aktivite zonu oluşturmuştur. 50°C'de 3 mm koloni 11 mm aktivite zonu, 55°C'de ise 2 mm koloni 21 mm aktivite zonu oluşturmuştur.

Çizelge 4.6. *Geobacillus thermoleovorans* NP1 Suşunun Katı Besiyerinde Ürediği ve Pullulanaz Sentezini Gerçekleştirdiği Optimum pH

pH (NP1)	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0
Koloni çapı (mm)	2	4	4	6	6
Aktivite zon çapı (mm)	-	17	20	19	18

Geobacillus thermoleovorans NP1 suşu ile gerçekleştirilen analizlerde bakterinin en iyi ürediği ve enzim sentezlediği pH değeri 7.0 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.6). Seçilen suş pH 5.0'te 2 mm çaplı koloni gelişimi gözlemlenmiş ancak enzim sentezi gerçekleşmemiştir. Suş pH 6.0'da 4 mm koloni ve 17 mm zon çapı, pH 7.0'de 4 mm koloni ve 20 mm aktivite zonu, pH 8.0'de 6 mm koloni ve 19 mm zon çapı ve pH 9.0'da 6 mm koloni ve 18 mm aktivite zon çapı oluşturarak üremiştir.

Çizelge 4.7. *Geobacillus thermoleovorans* NP1 Suşunun Katı Besiyerinde Ürediği ve Pullulanaz Sentezini Gerçekleştirdiği Optimum Sıcaklık

Sıcaklık (°C) (NP1)	35	40	45	50	55	60	65	70
Koloni çapı (mm)	2	3	3	3	4	3	-	-
Aktivite zon çapı (mm)	2	7	10	9	9	8	-	-

Geobacillus thermoleovorans NP1 suşu ile gerçekleştirilen analizlerde bakterinin en iyi ürediği ve enzim sentezlediği sıcaklık değeri 45°C olarak bulunmuştur (Çizelge 4.7). Analiz edilen suş 40, 45, 50 ve 60°C'de 3 mm koloni çapı oluştururken, 40°C'de 7 mm, 45°C'de 10 mm, 50°C'de 9 mm ve 60°C'de 8 mm aktivite zonu meydana getirmiştir. Seçilen suş 65 ve 70°C'de ürememiştir. Buna karşılık, 35°C'de 2 mm koloni ve 2 mm aktivite zonu elde edilmiştir.

Çizelge 4.8. *Anoxybacillus rupiensis* NP2 Suşunun Katı Besiyerinde Ürediği ve Pullulanaz Sentezini Gerçekleştirdiği Optimum pH

pH (NP2)	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0
Koloni çapı (mm)	7	7	7	7	6
Aktivite zon çapı (mm)	15	15	14	14	11

Anoxybacillus rupiensis NP2 suşu ile gerçekleştirilen analizlerde bakterinin en iyi ürediği ve enzim sentezini gerçekleştirdiği pH değeri 5.0 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.8). Suş pH 5.0'te ve 6.0'da 7 mm koloni 15 mm aktivite zon çapı oluşturmuştur. pH 7.0 ve 8.0'de 7 mm koloni ve 14 mm aktivite zon çapı meydana getiren suş, pH 9.0'da 6 mm koloni ve 11 mm aktivite zon çapına sahiptir.

Çizelge 4.9. *Anoxybacillus rupiensis* NP2 Suşunun Katı Besiyerinde Ürediği ve Pullulanaz Sentezini Gerçekleştirdiği Optimum Sıcaklık

Sıcaklık (°C) (NP2)	35	40	45	50	55	60	65	70
Koloni çapı (mm)	-	-	5	6	12	10	-	-
Aktivite zon çapı (mm)	-	-	11	15	28	14	-	-

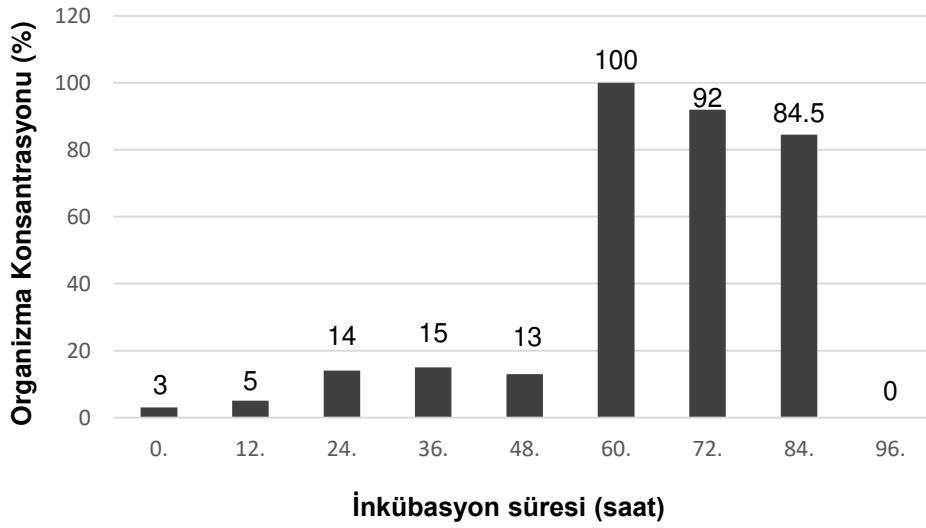
Anoxybacillus rupiensis NP2 suşu 55°C'de 12 mm koloni ve 28 mm pullulanaz aktivite zon çapı ile en iyi üreme ve enzim sentezleme davranışını göstermiştir (Çizelge 4.9). Organizma 35, 40, 65 ve 70°C'de ürememiştir. Buna karşılık, 45°C'de 5 mm koloni ve 11 mm aktivite zonu, 50°C'de 6 mm koloni ve 15 mm aktivite zonu, 60°C'de 10 mm koloni ve 14 mm aktivite zonu oluşturmuştur.

4.2.2. Bakterilerin Sıvı Besi Yerinde Ürediği, Amilaz ve Pullulanaz Enzim Sentezini Gerçekleştirdiği Optimum İnkübasyon Sürelerinin Belirlenmesine Ait Bulgular

Ön inkübasyon sonucu aktif duruma getirilen NA1 ve NA2 suşları pH'ları 5.0 ve 7.0 olan M9 nişastalı sıvı besiyerlerine, NP1 ve NP2 suşları pullulanlı sıvı besiyerlerine %1 oranında inoküle edilmiştir. Suşların inkübasyonları 55°C'de 150 rpm'de 4 gün süreyle gerçekleştirilmiştir. İnokülasyonları takiben 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 ve 96. inkübasyon saatlerinde sıvı kültürlerden örnekler alınıp OD₆₀₀'de üreme değerleri saptanmıştır. Aynı zaman dilimlerinde alınan örnekler 7500 rpm'de

20 dakika süreyle santrifüj edilmiş, bakteriler ortamdaki uzaklaştırılmış ve enzim kaynağı olarak kullanılacak süpernatantlar elde edilmiştir.

Amilaz ve pullulanaz enzimlerini içeren süpernatant kullanılarak standart aktivite tayinleri yapılmış, optimum üremenin ve enzim üretiminin gerçekleştiği süreler saptanmıştır. Yapılan değerlendirmeler sonucunda elde edilen veriler Şekil 4.13, 4.14, 4.15 ve 4.16’da gösterilmiştir.



Şekil 4.13. *Aeribacillus pallidus* NA1 Suşunun Optimum İnkübasyon Süresi

Aeribacillus pallidus NA1 suşu 12, 24, 36, 48, 60, 72 ve 84’üncü saatlerde sırasıyla, yaklaşık %5, 14, 15, 13, 100, 92 ve 84.5 düzeyinde üreme göstermiştir. NA1 suşunun en yüksek üreme değeri ve amilaz enzim üretimi inkübasyonun 60. saatinde elde edilmiştir (Şekil 4.13). İnkübasyonun 96. saatinde herhangi bir üreme gerçekleşmemiştir.

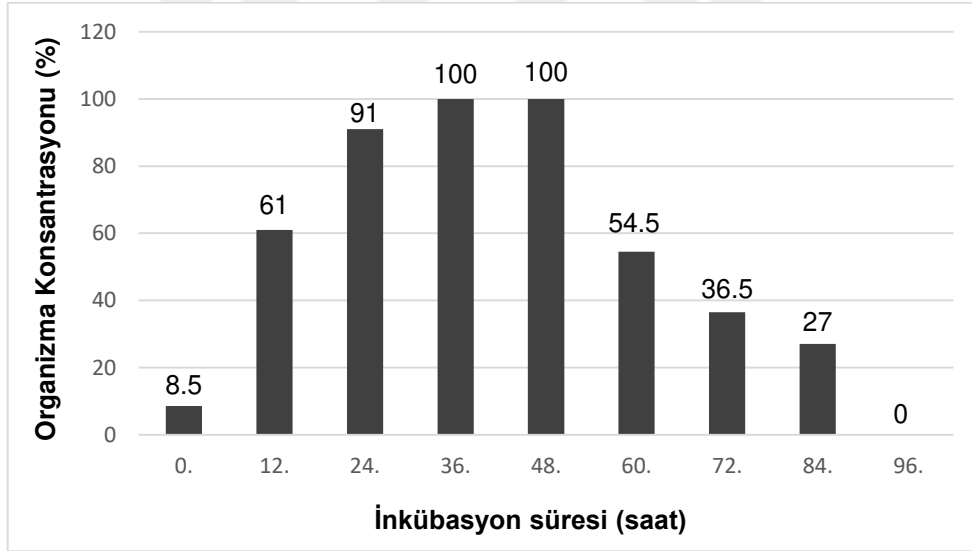
Simair ve ark (2017), NA1 suşu ile benzer optimum koşullara sahip olan *Bacillus* sp. BCC 01-50 suşunu 50°C ve 150 rpm’de üreterek suşun ürettiği ve optimum α -amilaz enzimini sentezlediği inkübasyon süresini 60 saat olarak belirlemişlerdir.

Roy ve ark (2012), 45-50°C ve 150 rpm’de inkübe ettikleri alkali amilaz üreticisi *Bacillus subtilis* AS-S01a suşunun en iyi ürettiği ve amilaz sentezlediği inkübasyon süresini 60 saat olarak belirlemişlerdir.

Elayaraja ve ark (2011), 50°C ve 150 rpm’de ürettikleri termo-alkalifilik *Bacillus firmus* CAS 7 suşunun maksimum üreme değerine inkübasyonun 42. saatinde ulaştığını, amilaz sentezini ise 48. saatte gerçekleştirdiğini saptamışlardır.

Aeribacillus pallidus NA1 suşunun amilaz üretim zamanı literatür verileri ile uygunluk göstermektedir.

Geobacillus lituanicus NA2 suşunun optimum ürettiği ve amilaz sentezini gerçekleştirdiği sürenin saptanması amacıyla yapılan analizler sonunda elde edilen bulgular Şekil 4.14’te gösterilmiştir.



Şekil 4.14. *Geobacillus lituanicus* NA2 Suşunun Optimum İnkübasyon Süresi

Geobacillus lituanicus NA2 suşunun 12, 24, 36, 48, 60, 72 ve 84. saatlerde, sırasıyla, yaklaşık %61, 91, 100, 100, 54.5, 36.5 ve 27 düzeyinde ürettiği bulunmuştur. Analiz edilen NA2 suşu, 24. saatten başlayıp 48. saate kadar yaklaşık

%100'e yakın düzeyde üreme göstermiştir. Suşun optimum üreme zamanı 36-48. saatler arası olup, en yüksek enzim sentezi 48. saatte elde edilmiştir. İnkübasyonun 96. saatinde herhangi bir üreme gerçekleşmemiştir.

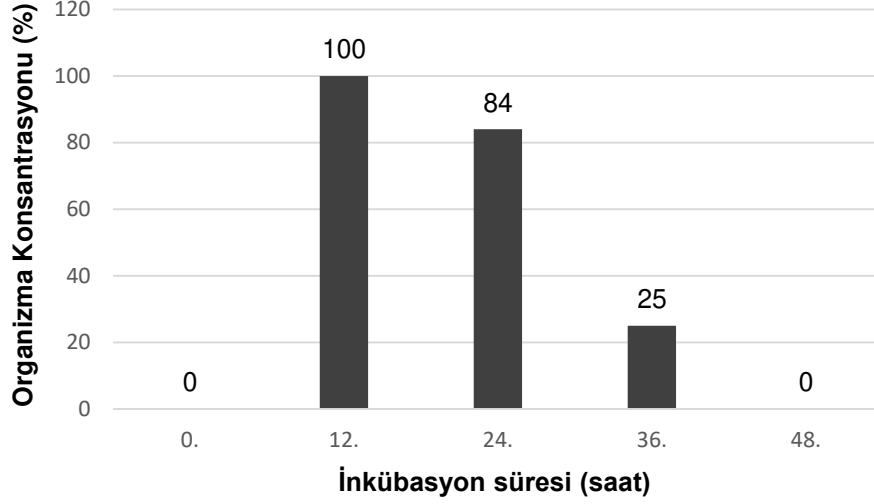
Paul ve ark (2017), asidik ve termofil amilaz üreticisi *Bacillus* sp. MB6 suşunun optimum üremesini ve enzim üretimini 48. saatte gerçekleştirdiğini saptamışlardır.

Wang ve ark (2016), *Bacillus* sp. WangLB suşunun optimal üreme gösterdiği ve amilaz üretimini gerçekleştirdiği inkübasyon süresini 48 saat bulmuşlardır.

Bai ve ark (2012), kaplıcalardan izole ettikleri termoasidofilik *Alicyclobacillus* sp. A4 suşunun 48 saatlik inkübasyon sonunda oldukça iyi ürediğini ve amilaz enzimini sentezlediğini bildirmişlerdir.

Geobacillus lituanicus NA2 suşuna ait veriler literatür bilgileri ile büyük ölçüde örtüşmektedir. Bununla birlikte, Asad ve ark (2011), *Bacillus* sp. WA21 suşunun optimum üreme ve amilaz enzim sentezini 144 saat sonucunda gerçekleştirdiğini belirtmişlerdir. Bu sonuç *Geobacillus lituanicus* NA2 suşuna ait verilerden oldukça farklılık göstermektedir.

Geobacillus thermoleovorans NP1 suşunun optimum ürediği ve pullulanaz enzimini sentezlediği sürenin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalardan elde edilen veriler Şekil 4.15'te gösterilmiştir.



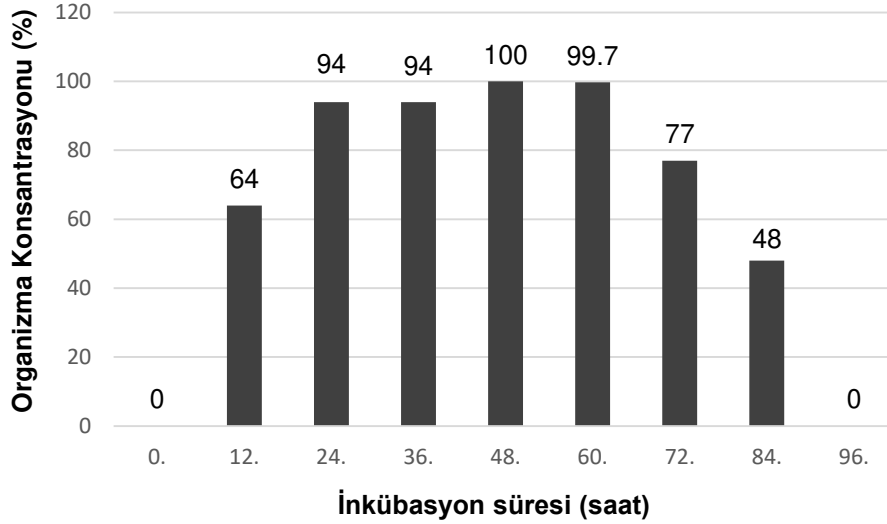
Şekil 4.15. *Geobacillus thermoleovorans* NP1 Suşunun Optimum İnkübasyon Süresi

Geobacillus thermoleovorans NP1 suşunun optimum üremesini ve pullulanaz enzim üretimini 12 saatlik (%100) inkübasyon süresinde gerçekleştirmiştir. Bunu %84 ile 24. saat ve %25 ile 48. saat izlemektedir.

Kunamneni ve Singh (2006), asidik pullulanaz üreticisi *Bacillus* sp. AN-7 suşunun optimum ürettiği ve enzim sentezlediği inkübasyon süresini 48 saat olarak belirlemişlerdir.

Gomes ve ark (2003), izole ettikleri termofilik *Rhodothermus marinus* suşunun maksimum ürettiği, asidik ve termofilik özellikteki pullulanaz enzimini ürettiği inkübasyon süresini 12 saat olarak belirlemişlerdir. *Geobacillus thermoleovorans* NP1 suşundan elde edilen değerler, Gomes ve ark (2003) ile benzerdir.

Anoxybacillus rupiensis NP2 suşunun optimum ürettiği ve pullulanaz enzim üretiminin gerçekleştirdiği süreyi belirlemek amacıyla yapılan çalışmalardan elde edilen veriler Şekil 4.16'da gösterilmiştir.



Şekil 4.16. *Anoxybacillus rupiensis* NP2 Suşunun Optimum İnkübasyon Süresi

Anoxybacillus rupiensis NP2 suşunun, inkübasyonunun 48. saatinde optimum ürettiği ve pullulanaz enzim üretimini gerçekleştirdiği tespit edilmiştir. Organizma 12, 24, 36, 48, 60, 72 ve 84 saat süreyle üretildiğinde üreme ve enzim sentezi, sırasıyla, %64, 94, 94, 100, 99.7, 77 ve 48 olarak bulunmuştur. İnkübasyonun 96. saatinde bakteri üremesi gerçekleşmemiştir.

Asha ve ark (2013), *Bacillus halodurans* bakterisinin en iyi ürettiği ve pullulanaz enzim sentezini gerçekleştirdiği inkübasyon süresini 120 saat bulmuşlardır.

Zareian ve ark (2010), asidik pullulanaz enzim üreticisi *Geobacillus stearothermophilus* suşunun maksimum seviyede ürettiği ve enzim sentezini gerçekleştirdiği inkübasyon süresini 36 saat olarak belirlemişlerdir.

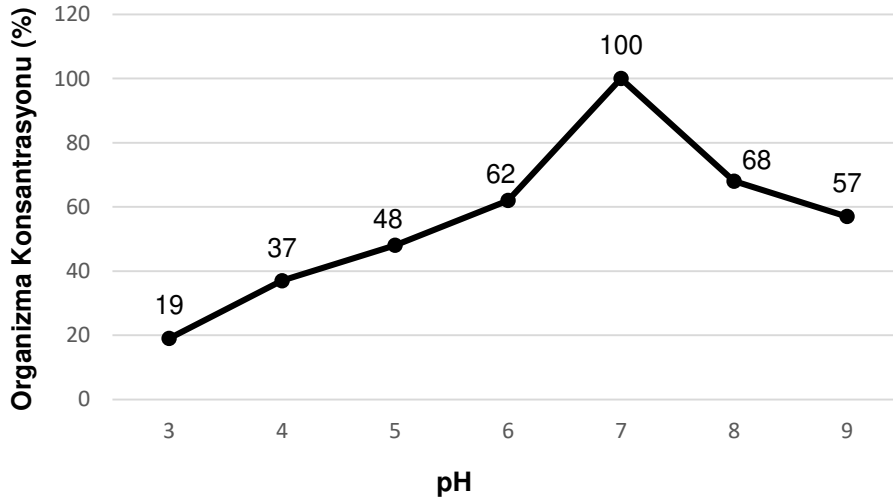
Samah ve ark (2005), *Bacillus flavothermus* KWF-1 suşunun en iyi üreme gösterdiği ve alkali pullulanaz enzimini ürettiği süreyi 24 saat olarak belirlemişlerdir.

Kim ve ark (1993), topraktan izole ettikleri pullulanaz üreticisi *Bacillus* sp. S-1 suşunun 48 saatlik inkübasyon süresinde optimum üreme gösterdiğini ve alkali

pullulanaz enzimini sentezlediğini tespit etmişlerdir. NP2 suşunun inkübasyonu sonucunda elde edilen optimum üreme ve enzim sentezleme davranışı Kim ve ark'nın (1993) bulguları ile uyum göstermektedir.

4.2.3. Bakterilerin Sıvı Besi Yerinde Enzim Sentezledikleri Optimum pH ve Sıcaklık Değerinin Belirlenmesine Ait Bulgular

Amilaz enzimi üreticisi NA1 ve NA2 suşları pH'sı 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0 olan M9 nişastalı sıvı besiyerlerinde, pullulanaz enzimini sentezleyen NP1 ve NP2 suşları pH'sı 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0 olan pullulanlı sıvı besiyerlerinde 55°C ve 150 rpm'de inkübe edilmişlerdir. Her suş kendisine ait olan inkübasyon süresinde inkübe edilmiştir. Organizmalar ayrı ayrı üretildikten sonra çöktürme işlemi yapılarak süpernatant elde edilmiştir ve süpernatantlar enzim kaynakları olarak kullanılmıştır. Süpernatantlar kullanılarak standart amilaz ve pullulanaz enzim aktivitesi tayinleri yapıp enzim sentezinin gerçekleştiği optimum pH değerleri tespit edilmiştir (Şekil 4.17, 4.18, 4.19, 4.20).



Şekil 4.17. *Aeribacillus pallidus* NA1 Suşunun Ürettiği ve Amilaz Sentezini Gerçekleştirdiği Optimum pH Grafiği

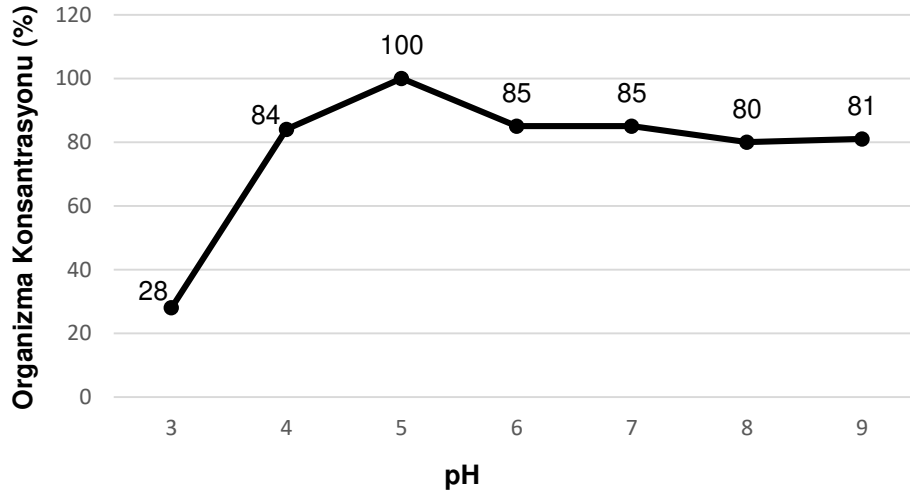
Aeribacillus pallidus NA1 suşunun optimum ürettiği ve amilaz enziminin sentezini gerçekleştirdiği pH değeri 7.0 olarak bulunmuştur (Şekil 4.17). NA1 suşu pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0'da, sırasıyla, %19, 37, 48, 62, 100, 68 ve 57 oranında aktivite göstermiştir.

Vijayaraghavan ve ark (2015), amilaz üreticisi *Bacillus cereus* suşu ile yaptıkları çalışmada bakterinin optimum gelişimini ve enzim üretimini pH 7.0'de gerçekleştirdiğini tespit edilmişlerdir.

Oziengbe ve ark (2012), α -amilaz üreticisi *Bacillus licheniformis* suşunun optimum gelişim gösterdiği ve amilaz enzim sentezini gerçekleştirdiği pH değerinin 7.0 olduğunu saptamışlardır.

Behal ve ark (2006), *Bacillus* sp. AB 04 suşunun en iyi ürettiği ve alkali α -amilaz enzimini ürettiği pH değerini 7.0 olarak belirlemişlerdir.

Literatür bulguları ile *Aeribacillus pallidus* NA1 suşundan elde edilen sonuçlar tam bir uyumluluk içerisindedir.



Şekil 4.18. *Geobacillus lituanicus* NA2 Suşunun Ürettiği ve Amilaz Sentezini Gerçekleştirdiği Optimum pH Grafiği

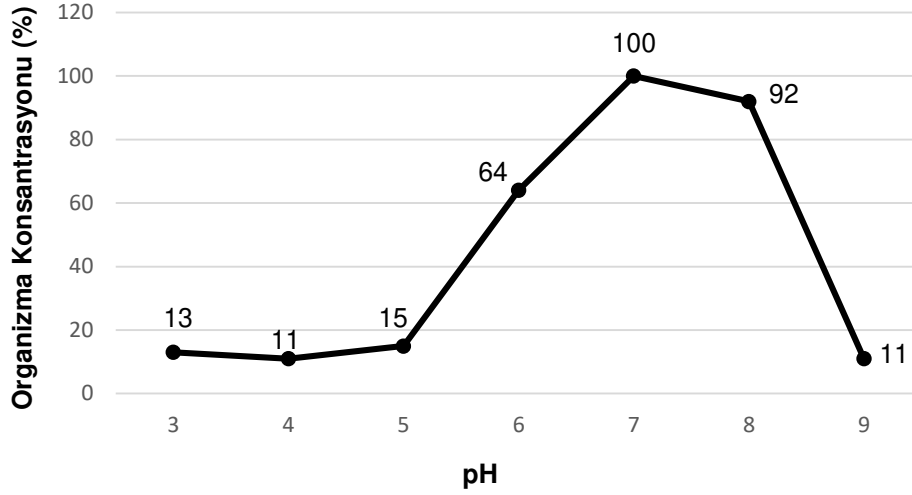
Geobacillus lituanicus NA2 suşunun optimum ürettiği ve amilaz enzimini sentezlediği pH değeri 5.0 olarak bulunmuştur (Şekil 4.18). Yapılan çalışmada en yüksek aktivite değerine pH 5.0'te ulaşılmakla beraber, pH 3.0'te %28, pH 4.0'te %84, pH 6.0'da %85, pH 7.0'de %85, pH 8.0'de %80 ve pH 9.0'da %81 düzeyinde enzim üretimi gerçekleşmiştir. pH 4.0-9.0 aralığında ortalama %86 enzim verimliliği elde edilmiştir. Enzim üretim pH aralığının bu denli geniş olması organizmanın oldukça stabil olduğunu göstermektedir.

Chand ve ark (2014), α -amilaz üreticisi *Bacillus* sp. KR-8104 suşunun pH 5.0-9.0 aralığında oldukça iyi üreme göstermesine rağmen, suşun en iyi ürettiği ve enzim sentezi gerçekleştirdiği pH değerinin 5.0-6.0 aralığında olduğunu saptamışlardır.

Asad ve ark (2011), *Bacillus* sp. WA21 olarak tanımladıkları suşun hem üremesini hem de α -amilaz sentezini pH 3.0-11.0 aralığında gerçekleştirmekle beraber, optimum pH'ın 6.0 olduğunu belirlemişlerdir.

Liu ve Xu (2008), asidik α -amilaz üreticisi *Bacillus* sp. YX-1 suşunun en iyi ürettiği ve enzim sentezini gerçekleştirdiği pH değerini 5.0 olarak belirlemişlerdir. *Geobacillus lituanicus* NA2 suşundan elde edilen değerler Liu ve Xu'nun (2008) bulguları ile tam bir uyum içindedir.

Geobacillus thermoleovorans NP1 suşu, pH 7.0'de optimum üreme ve pullulanaz enzimini sentezleme yeteneğindedir (Şekil 4.19). NP1 suşu ile farklı pH değerlerinde yapılan çalışmalarda pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0 ve 9.0'da, sırasıyla, %13, 11, 15, 64, 92 ve 11 değerleri elde edilmiştir. Suş, pH 6.0-8.0 aralığında diğer pH değerlerine göre daha yüksek değerde enzim üretmiştir. pH 8.0'de %92 enzim üretimi gerçekleşirken, pH 9.0'daki üretim değeri %11'e düşmüştür. Benzer durum pH 3.0-5.0 aralığı için de geçerli olup ortalama değer %13'tür.

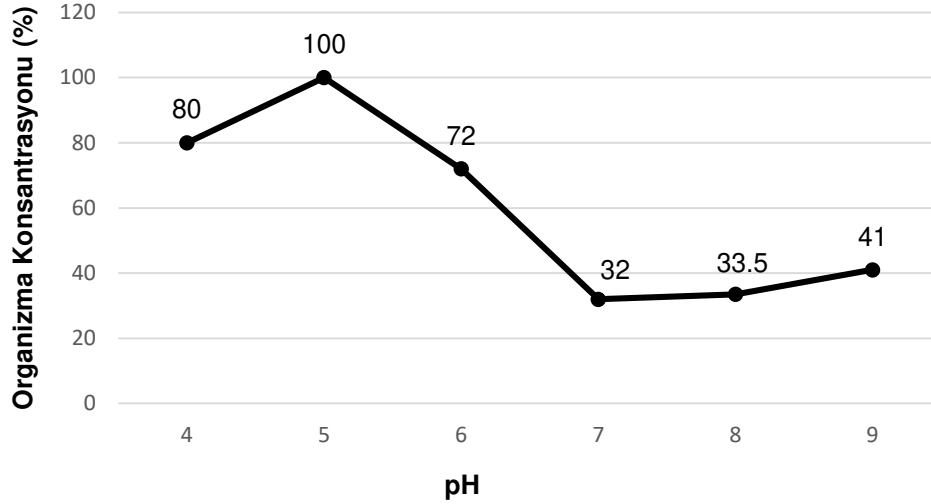


Şekil 4.19. *Geobacillus thermoleovorans* NP1 Suşunun Ürettiği ve Pullulanaz Sentezini Gerçekleştirdiği Optimum pH Grafiği

Siroosi ve ark (2014), *Halorubrum* sp. Ha25 suşunun en iyi ürettiği ve amilopullulanaz enzim sentezini gerçekleştirdiği pH değerinin 7.0 olduğunu tespit etmişlerdir.

Zareian ve ark (2010), asidik pullulanaz üreticisi *Geobacillus stearothermophilus* suşunun en iyi ürettiği ve enzim sentezini gerçekleştirdiği pH değerini 7.3 olarak belirlemişlerdir.

Çalışmamızda kullanılan asidik pullulanaz enzim üreticisi suşa ait değerler literatürdeki benzerleri ile uyum göstermektedir.



Şekil 4.20. *Anoxybacillus rupiensis* NP2 Suşunun Ürettiği ve Pullulanaz Sentezini Gerçekleştirdiği Optimum pH Grafiği

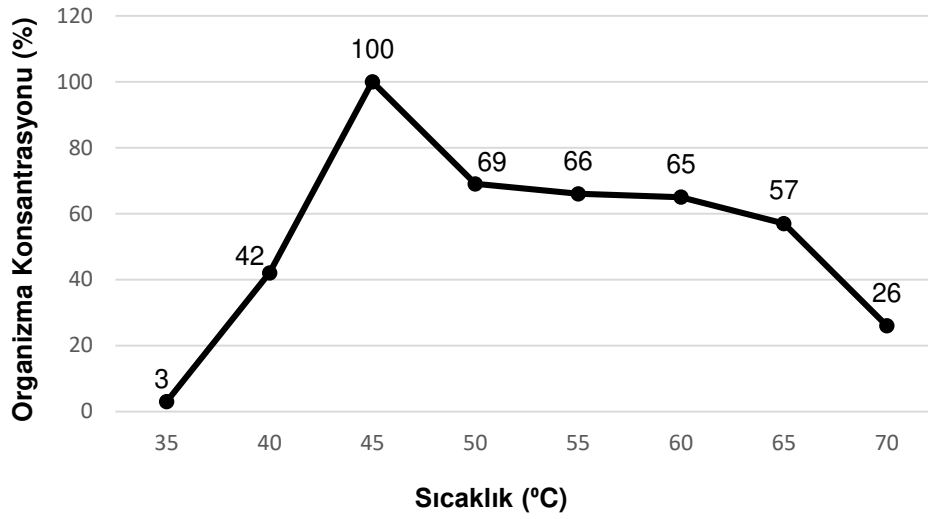
Standart aktivite analizi sonuçlarına göre, *Anoxybacillus rupiensis* NP2 suşunun optimum ürettiği ve pullulanaz enziminin sentezini gerçekleştirdiği pH değeri 5.0 olarak saptanmıştır (Şekil 4.20). NP2 suşu pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0'da, sırasıyla, %80, 100, 72, 32, 33.5 ve 41 oranlarında enzim üretimi gerçekleştirmiştir. Organizmadan pH 5.0'te optimum verim elde edilirken, pH 4.0-6.0 aralığındaki verimlilik ortalama %84 düzeyinde gerçekleşmiştir. Buna karşılık pH 7.0-9.0 aralığında ortalama %35.5 verim elde edilmiştir. Bu sonuç, organizmanın asidik pH değerlerinde yüksek verimlilikte enzim sentezlediğini göstermektedir.

Kim ve ark (1993), topraktan izole ettikleri alkali pullulanaz üreticisi termofilik *Bacillus* sp. S-1 suşunun optimum ürettiği ve pullulanaz enzimini ürettiği pH değerinin 5.0 olduğunu belirtmişlerdir. Elde ettiğimiz sonuç literatür ile tam uyum içindedir.

Enzim üreticisi olarak seçilen suşların en iyi enzim ürettiği sıcaklık değerinin saptanması için 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 ve 70°C'lerde üretim çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Üretim için M9 nişastalı ve pullulanlı sıvı üreme ortamları

kullanılarak, organizmaların en iyi ürediği sürelerde, 150 rpm çalkalamalı inkübatörlerde kültürler elde edilmiştir.

Farklı sıcaklıklardaki üretim işlemi sonunda kültürlerin üreme değeri spektrofotometrede yapılan ölçümlerle saptanırken, kültürün kalan kısımları 7500 rpm’de çöktürülerek süpernatant elde edilmiş ve enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Elde edilen bulgular Şekil 4.21, 4.22, 4.23 ve 4.24’de gösterilmiştir.



Şekil 4.21. *Aeribacillus pallidus* NA1 Suşunun Ürettiği ve Amilaz Sentezini Gerçekleştirdiği Optimum Sıcaklık Grafiği

Aeribacillus pallidus NA1 suşu optimum üremesini ve enziminin sentezini 45°C’de gerçekleştirmiştir. Üretim sıcaklığı olarak seçilen 35, 40, 50, 55, 60, 65 ve 70°C’de, sırasıyla, %3, 42, 69, 66, 65, 57 ve 26 enzim değerlerine ulaşılmıştır. Organizmadan optimum verimlilik 45°C’de elde edilmekle birlikte, 50-65°C aralığında ortalama %66’lık, 35 ve 40°C’lerde %22.5’lik verim söz konusudur. Bu sonuçlar enzim üreticisi suşun termofil aralıkta daha yüksek verimliliğe sahip olduğunu göstermektedir (Şekil 4.21).

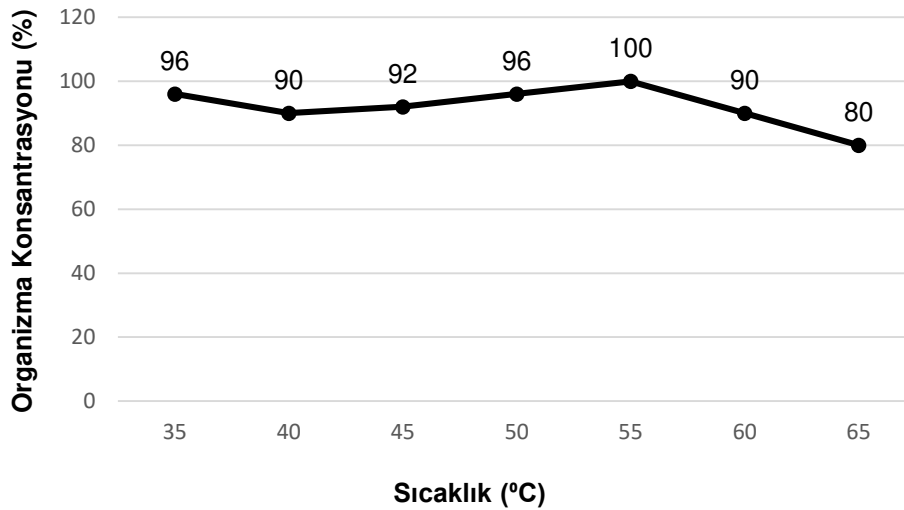
Simair ve ark (2017), *Bacillus* sp. BCC 01-50 suşunun optimum üremesinin ve amilaz enzimi üretiminin 50°C’de gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Dawood ve ark (2015), termostabil amilaz üreticisi *Bacillus licheniformis* suşunun en iyi üreme ve enzim üretme sıcaklığını 50°C olarak belirlemişlerdir.

Oziengbe ve ark (2012), α -amilaz üreticisi *Bacillus licheniformis* suşunda optimum üremenin 55°C, enzim sentezinin 60°C’de gerçekleştiğini bulmuşlardır.

Asad ve ark (2011), *Bacillus* sp. WA21 suşunun maksimum α -amilaz üretimini 45°C’de gerçekleştirdiğini bulmuşlardır.

Aeribacillus pallidus NA1 suşunun optimum üreme ve amilaz enzimini sentezlediği sıcaklık değeri literatürdekilerle benzerlik göstermektedir.



Şekil 4.22. *Geobacillus lituanicus* NA2 Suşunun Ürettiği ve Amilaz Sentezini Gerçekleştirdiği Optimum Sıcaklık Grafiği

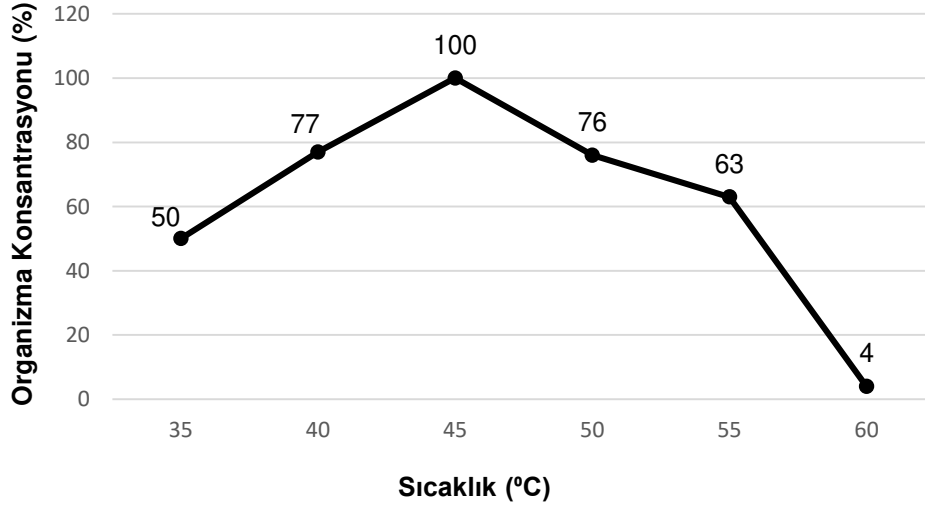
Geobacillus lituanicus NA2 suşunun optimum ürettiği ve amilaz enziminin sentezini gerçekleştirdiği sıcaklık değeri 55°C olarak bulunmuştur. Suş, 35, 40, 45, 50, 60 ve 65°C’de, sırasıyla, %96, 90, 92, 96, 90 ve 80 oranlarında enzim sentezi gerçekleştirmiştir. Bütün sıcaklık değerleri dikkate alındığında toplamda ortalama

%92 verimlilik elde edilmiştir. Bu sonuçlar organizmanın mezo-termofil aralıkta dikkate değer düzeyde enzim üretme yeteneğinde olduğunu göstermektedir (Şekil 4.22).

Chand ve ark (2014), α -amilaz sentezleme özelliği olan *Bacillus* sp. KR-8104 suşunun optimum üremesini ve enzim sentezini 45°C'de gerçekleştirdiğini belirtmişlerdir.

Bai ve ark (2012), α -amilaz üreticisi *Alicyclobacillus* sp. A4 suşunun optimum üreme ve enzim üretme sıcaklığını 60°C olarak bulmuşlardır.

Geobacillus lituanicus NA2 suşunun optimum enzim üretme verimliliğinin 55°C'de gerçekleşmesi literatürlerden (yeni literatürler sınırlı olmakla birlikte) farklılık göstermektedir.



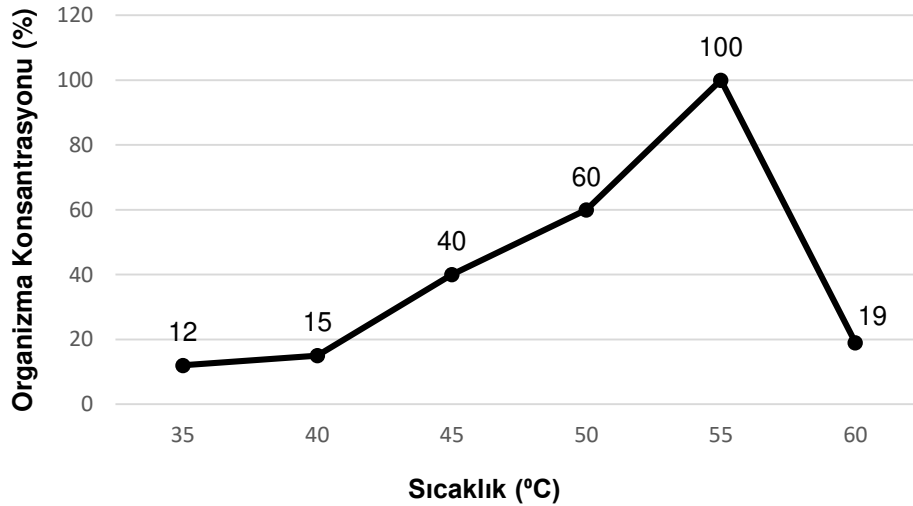
Şekil 4.23. *Geobacillus thermoleovorans* NP1 Suşunun Ürettiği ve Pullulanaz Sentezini Gerçekleştirdiği Optimum Sıcaklık Grafiği

Geobacillus thermoleovorans NP1 suşunun optimum ürettiği ve pullulanaz enziminin sentezini gerçekleştirdiği sıcaklık değerinin 45°C olduğu bulunmuştur. Organizma 35, 40, 50, 55 ve 60°C'de, sırasıyla, %50, 77, 76, 63 ve 4 enzim üretmiştir. Üretim amaçlı seçilen suş 40-50 °C aralığında ortalama %84 enzim

üretmektedir. Bu sonuç, suşun termotolerant koşullarda yüksek düzeyde üretici olduğunu göstermektedir (Şekil 4.23).

Kunamneni ve Singh (2006), *Bacillus* sp. AN-7 suşunun maksimum pullulanaz enzim sentezini 50°C’de gerçekleştirdiğini bildirmişlerdir.

Roy ve ark (2003), topraktan izole ettikleri asidik pullulanaz üreticisi *Bacillus* sp. US149 suşunun optimum ürettiği ve enzim sentezini gerçekleştirdiği sıcaklık değerini belirlemek için bakteriyi 30-55°C aralığındaki sıcaklıklarda inkübasyona bırakmışlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre, en iyi üreme ve enzim sentezi 45°C’de gerçekleşmiştir. *Geobacillus thermoleovorans* NP1 suşuna ait bulgular Roy ve ark’nın (2003) çalışmalarındaki değerler ile tam bir uyum göstermektedir.



Şekil 4.24. *Anoxybacillus rupiensis* NP2 Suşunun Ürettiği ve Pullulanaz Sentezini Gerçekleştirdiği Optimum Sıcaklık Grafiği

Anoxybacillus rupiensis NP2 suşunun optimum ürettiği ve pullulanaz enzimini ürettiği sıcaklık değeri 55°C olarak bulunmuştur. *Anoxybacillus rupiensis* NP2 suşu 35, 40, 45, 50 ve 60°C sıcaklıklarda, sırasıyla, %12, 15, 40, 60 ve 19 oranlarında enzim üretmiştir. Enzim üretimi 40°C’den itibaren hızlı bir artış

gösterirken, inkübasyon sıcaklığı 50°C'den 55°C'ye yükseltildiğinde enzim üretiminde yaklaşık %40 oranında keskin bir artış meydana gelmiştir. Buna karşılık, sıcaklık, optimum üretimin elde edildiği 55°C'den 60°C'ye yükseltildiğinde enzim üretiminde %81 oranında düşüş meydana gelmiştir. Bu sonuç, suşun dar bir sıcaklık aralığında ve termofil koşullarda yüksek düzeyde pullulanaz aktivitesine sahip olduğunu göstermektedir (Şekil 4.24).

Asoodeh ve Lagzian (2012), *Bacillus subtilis* DR8806 suşunun optimum ürettiği ve alkali glukoamilopullulanaz enzimini ürettiği sıcaklığı 70°C olarak belirlemişlerdir.

Samah ve ark (2005), *Bacillus flavothermus* KWF-1 suşunun en iyi ürettiği ve pullulanaz enziminin sentezini gerçekleştirdiği sıcaklığı 50°C olarak bulmuşlardır.

Kim ve ark (1993), topraktan izole ettikleri pullulanaz üreticisi *Bacillus* sp. S-1 suşunun optimum üreme gösterdiği ve alkali pullulanaz enzimini ürettiği sıcaklık değerinin 50°C olduğunu saptamışlardır.

Anoxybacillus rupiensis NP2 suşuna ait veriler literatürler ile benzerlik göstermiş ve suşun termofil özellikte bir enzim üreticisi olduğu değerlendirilmiştir.

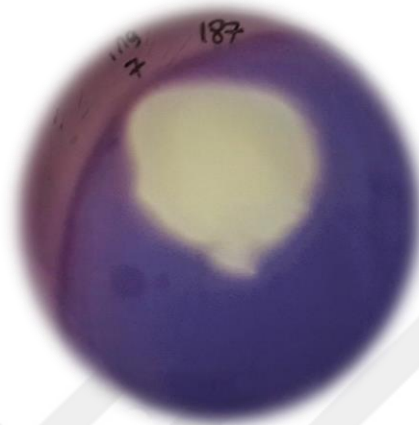
4.3. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesine Ait Bulgular

4.3.1. Amilaz ve Pullulanaz Enzimlerinin Katı Besi Yerindeki Aktivitelerine Ait Bulgular

Aeribacillus pallidus NA1, *Geobacillus lituanicus* NA2, *Geobacillus thermoleovorans* NP1 ve *Anoxybacillus rupiensis* NP2 suşlarından elde edilen ve enzim içeren süpernatantlar kullanılarak, nişasta ve pullulan içeren katı besiyerinde hidroliz testleri yapılmıştır. Bu amaçla, uygun substrat içeren katı besiyerlerine süpernatantlardan 100'er µL damlatılarak enzimlerin optimum sıcaklık değerlerinde inkübasyon yapılmıştır.

İnkübasyon sonunda nişastalı besiyeri iyot buharına tutulup enzimlerin meydana getirdikleri hidroliz zonları saptanmıştır (Voget ve ark, 2006; Burhan ve

ark, 2003) (Şekil 4.25 ve 4.26).



Şekil 4.25. *Aeribacillus pallidus* NA1 Suşuna Ait Alkali Amilaz Enziminin Nişastalı Katı Besiyerindeki Hidroliz Zonu

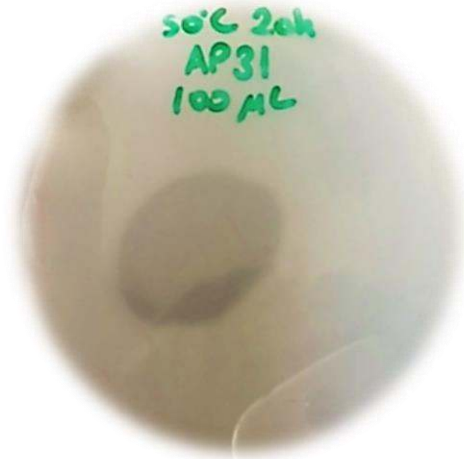


Şekil 4.26. *Geobacillus lituanicus* NA2 Suşuna Ait Asidik Amilaz Enziminin Nişastalı Katı Besiyerindeki Hidroliz Zonu

Pullulanlı besiyerinde hidroliz zonunun saptanması için besiyerlerinin üzerine etil alkol döküldükten sonra petriler -20°C’de 1 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda enzimlerin oluşturdukları şeffaf hidroliz zonları belirlenmiştir (Ara ve ark, 1995) (Şekil 4.27 ve 4.28).



Şekil 4.27. *Geobacillus thermoleovorans* NP1 Suşuna Ait Asidik Pullulanaz Enziminin Pullulanlı Katı Besiyerindeki Hidroliz Zonu

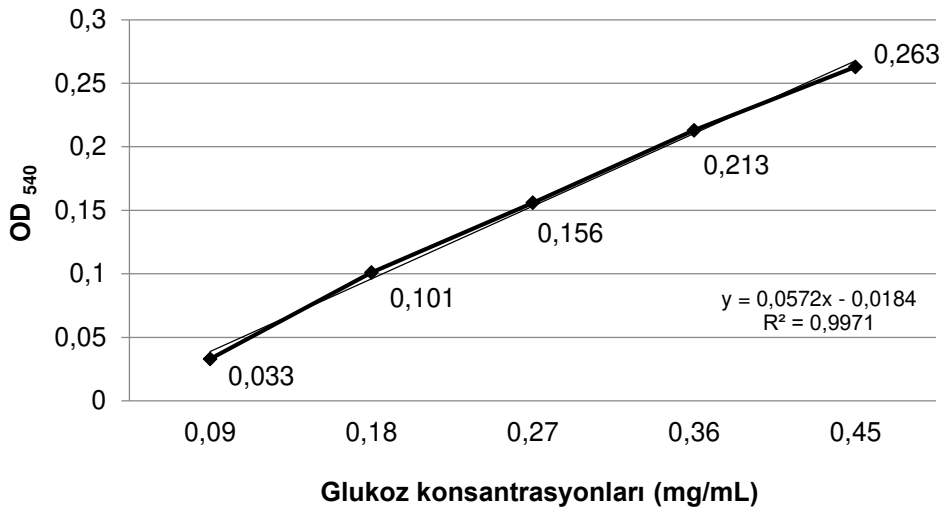


Şekil 4.28. *Anoxybacillus rupiensis* NP2 Suşuna Ait Alkali Pullulanaz Enziminin Pullulanlı Katı Besiyerindeki Hidroliz Zonu

4.3.2. Amilaz ve Pullulanaz Enzimlerinin Aktivite Analizleri

4.3.2.1. Glukoz Kalibrasyon Eğrisi ve Enzimlerin Aktivite Analizleri

Enzimlerin spesifik aktivitelerinin yorumlanması için 0.09, 0.18, 0.27, 0.36, 0.45 mg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan glukoz çözeltilerinin 540 nm'deki absorbans değerleri belirlenmiştir. Şekil 4.29'da glukoz konsantrasyonları ve absorbans değerleri arasındaki doğrusal ilişki verilmiştir.



Şekil 4.29. Glukoz Kalibrasyon Grafiği

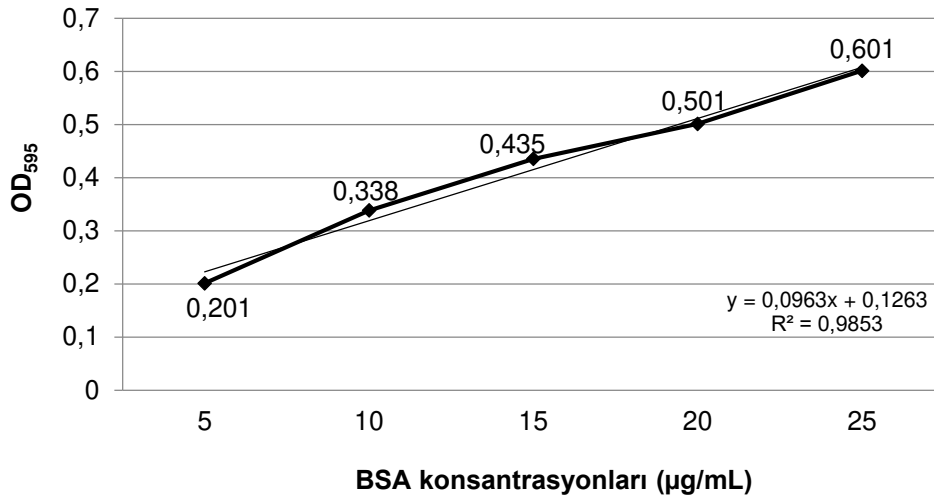
Kalibrasyon grafiğinde görülen $R^2=0,9971$ değerine bağlı olarak eğim 0,0572 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.29).

Aeribacillus pallidus NA1 suşuna ait amilaz enziminin spesifik aktivitesi 12.063 U/mL, *Geobacillus lituanicus* NA2 suşundan elde edilen amilaz enziminin spesifik aktivitesi 4.604 U/mL bulunmuştur.

Geobacillus thermoleovorans NP1 suşundan izole edilen pullulanaz enziminin spesifik aktivitesi 2.105 U/mL, *Anoxybacillus rupiensis* NP2 suşunun ürettiği pullulanaz enziminin spesifik aktivitesi 1.867 U/mL olarak hesaplanmıştır.

4.3.2.2. Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Protein miktarının saptanması amacıyla, 5, 10, 15, 20, 25 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan BSA çözeltilerinin 595 nm'deki absorbans değerleri ölçülmüştür. Şekil 4.30'da BSA konsantrasyonları ve absorbans değerleri arasındaki doğrusal ilişki verilmiştir.



Şekil 4.30. BSA Kalibrasyon Grafiği

Kalibrasyon grafiğinde görülen $R^2=0,9853$ değerine bağlı olarak eğim 0,0963 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.30).

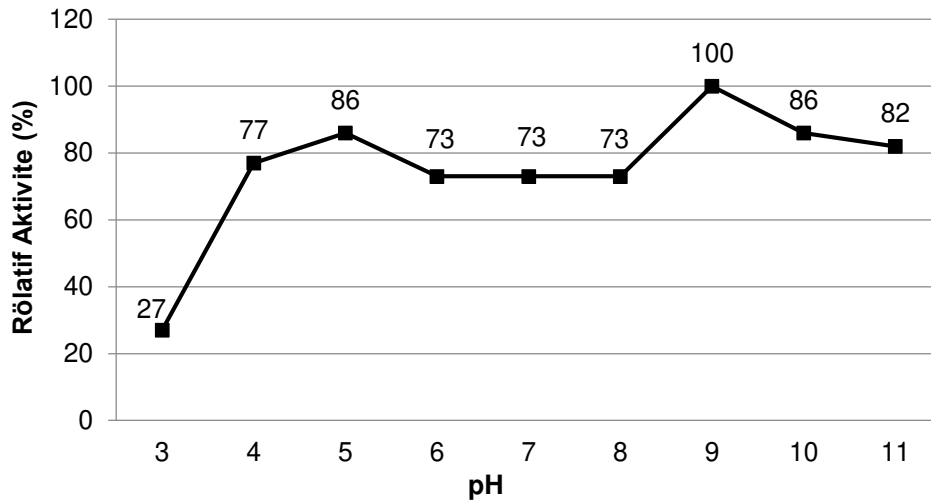
Aeribacillus pallidus NA1 suşuna ait amilaz enziminin protein miktarı 6.2 µg/mL, *Geobacillus lituanicus* NA2 suşundan elde edilen amilaz enziminin ise 3 µg/mL olarak hesaplanmıştır.

Geobacillus thermoleovorans NP1 suşundan izole edilen pullulanaz enziminin protein miktarı 5 µg/mL, *Anoxybacillus rupiensis* NP2 suşuna ait pullulanaz enzimininki de 5.6 µg/mL olarak bulunmuştur.

4.4. Enzimlerin Karakterizasyonuna Ait Bulgular

4.4.1. Amilaz ve Pullulanaz Enzimlerinin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değerlerinin Belirlenmesine Ait Bulgular

Amilaz ve pullulanaz enzimlerinin optimum aktivite gösterdiği pH değerlerinin belirlenmesi amacıyla 0.1M Sitrata-Fosfat (pH 3.0, 4.0, 5.0), 0.1M Fosfat (pH 6.0, 7.0, 8.0), 0.1 M Glisin-NaOH (pH 9.0, 10.0) ve 0.1 M Borax-NaOH (pH 11.0, 12.0) tampon sistemleri kullanılmıştır. Reaksiyon karışımları enzimlerin üretildikleri sıcaklıklarda 60 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra standart aktivite tayini yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.31, 4.32, 4.33 ve 4.34'te gösterilmiştir.



Şekil 4.31. *Aeribacillus pallidus* NA1 Suşundan Elde Edilen Amilazın Optimum pH Grafiği

Aeribacillus pallidus NA1 suşundan izole edilen amilaz enziminin pH 4.0-11.0 aralığındaki tüm pH'larda ortalama %81 düzeyinde rölatif aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Enzim optimum aktivitesini pH 9.0'da göstermekle birlikte, pH 3.0'te %27, pH 4.0'te %77, pH 5.0'te %86, pH 6.0, 7.0 ve 8.0'de %73, pH 10.0'da

%86 ve pH 11.0'de %82 aktivite göstermiştir. Özellikle alkali pH'larda ortalama %85 düzeyinde yüksek aktivite gösteren NA1 alkali amilaz enzimi, geniş pH aralığında aktiviteye sahip alkali enzim özelliğindedir (Şekil 4.31).

Simair ve ark (2017), *Bacillus* sp. BCC 01-50 suşundan elde ettikleri amilaz enzimi ile yaptıkları çalışmada, enzimin pH 8.0-10.0 aralığında aktivite gösterdiğini ve optimum aktivitenin pH 9.0'da gerçekleştiğini bulmuştur.

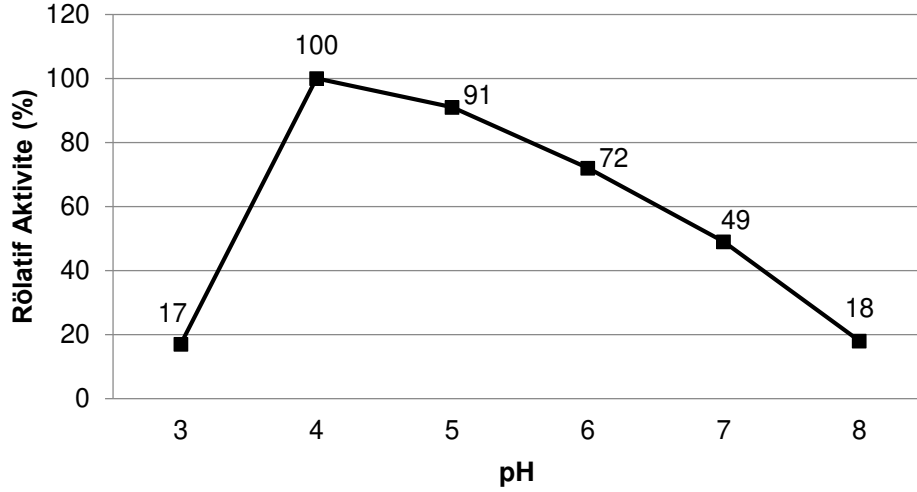
Wang ve ark (2016), *Bacillus* sp. WangLB suşundan saflaştırdıkları amilaz enziminin optimum aktivitesini pH 9.0'da gösterdiğini belirlemişlerdir. Bunun yanı sıra, enzimin pH 3.0-10.0 aralığında %85'ten fazla aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Zhang ve ark (2016), termofilik *Anoxybacillus* sp. YIM 342 suşundan izole ettikleri amilaz enziminin aktivite gösterdiği optimum pH değerini 9.0 olarak bulmuşlardır.

Hauli ve ark (2013) *Anoxybacillus* sp. IB-A suşundan saflaştırdıkları amilaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değerini 9.0 olarak belirlemişlerdir.

Elayaraja ve ark (2011), termofilik *Bacillus firmus* CAS 7 suşundan saflaştırdıkları α -amilaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değerini belirlemek için pH 3.0-11.0 aralığında analiz yapmışlar ve optimum pH değerinin 9.0 olduğunu bulmuşlardır.

Aeribacillus pallidus NA1 suşundan izole edilen amilaz enziminin optimum pH 9.0'da aktif olması enzimin alkali özellikte olduğunu göstermektedir. Enzimde pH 5.0 ve 9.0'da olmak üzere iki yüksek değer elde edilirken, enzim pH 4.0-6.0 aralığında ortalama %79, pH 8.0-11.0 aralığında ortalama %85 rölatif aktiviteye sahiptir. Alkali pH değerlerindeki ortalama aktivite değerinin daha yüksek olması enzimin için alkali karakteride olduğunu desteklemektedir. Literatür bulguları ile *Aeribacillus pallidus* NA1 suşundan elde edilen değerler uyumluluk göstermektedir.



Şekil 4.32. *Geobacillus lituanicus* NA2 Suşundan Elde Edilen Amilazın Optimum pH Grafiği

Geobacillus lituanicus NA2 suşundan izole edilen amilaz enzimi optimum aktivitesini pH 4.0'te göstermiştir. Enzim pH 3.0'te %17, pH 5.0'te %91, pH 6.0'da %72, pH 7.0'de %49 aktivite göstermiş pH 8.0'de enzim aktivitesi hızla %18'e düşmüştür. Alkali pH'larda düşük düzeyde enzim aktivitesi elde edilmiştir. Özellikle pH 4.0, 5.0 ve 6.0 gibi asidik pH değerlerinde ortalama %81.5 oranında oldukça yüksek aktiviteye sahip olan NA2 amilaz enziminin oldukça asidik özellik gösteren bir enzim olduğu bulunmuştur (Şekil 4.32).

Kalpana ve Pandian (2014), *Bacillus subtilis* S8-18 suşundan elde ettikleri termofilik α -amilaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin 6.0 olduğunu bulmuşlardır.

Kumari ve ark (2013), *Bacillus cereus* MTCC 10205 suşundan saflaştırdıkları amilaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değerini saptamak için pH 3.5-8.5 aralığında analiz yapmışlar ve optimum aktivitenin gerçekleştiği pH değerini 5.5 olarak belirlemişlerdir.

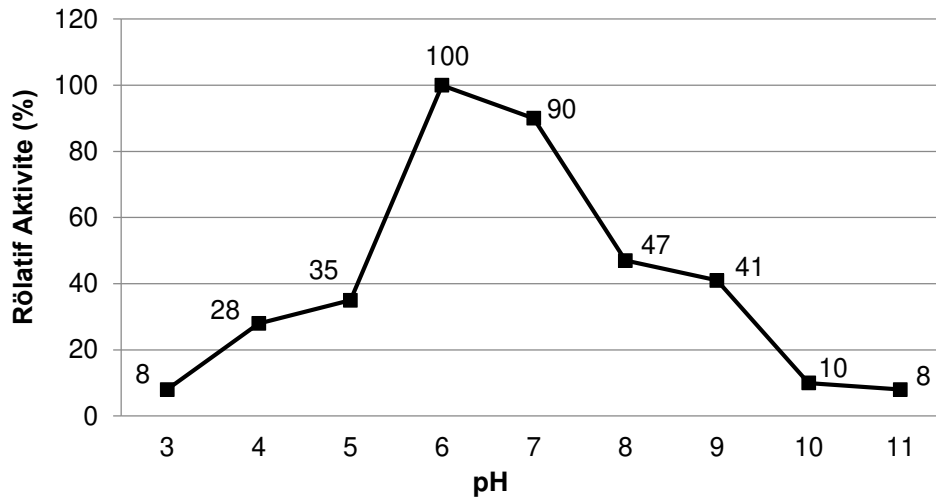
Sharma ve Satyanarayana (2013), asidofilik *Bacillus acidicola* suşundan elde ettikleri α -amilaz enziminin optimum aktivitesini pH 4.0'te gösterdiğini saptamışlardır.

Bai ve ark (2012), *Alicyclobacillus* sp. A4 suşunun ürettiği α -amilaz enziminin pH 4.2'de optimum aktivite gösterdiğini bulmuşlardır.

Asad ve ark (2011), termofilik *Bacillus* sp. WA21 suşundan saflaştırdıkları amilaz enziminin optimum aktivitesini pH 6.0'da gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Anto ve ark (2006), *Bacillus cereus* MTCC 1305 suşundan izole ettikleri alfa amilaz enziminin optimum pH 5.0'te aktif olduğunu bildirmişlerdir.

Geobacillus lituanicus NA2 suşundan izole edilen amilaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değeri, Sharma ve Satyanarayana'nın (2013) bulgularıyla benzerlik göstermektedir. İzole eden enzim, optimum aktivite gösterdiği pH değeri nedeni ile asidik amilaz olarak tanımlanmıştır.

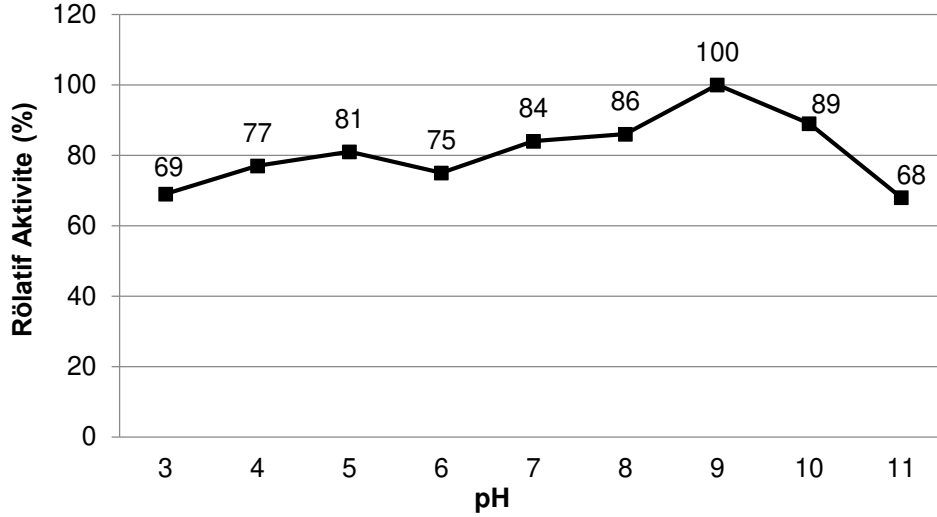


Şekil 4.33. *Geobacillus thermoleovorans* NP1 Suşundan Elde Edilen Pullulanazın Optimum pH Grafiği

Geobacillus thermoleovorans NP1 suşundan elde edilen pullulanaz optimum aktivitesini pH 6.0'da göstermiştir. Enzim pH 5.0'te %35, pH 7.0'de %90 ve pH 8.0'de %47 oranında rölatif aktiviteye sahiptir. Reaksiyonun gerçekleştirildiği pH değeri alkali yönde arttıkça, enzimin aktivitesinde önemli oranda azalma meydana gelmiştir. Örneğin, pH 10.0'da %10, pH 11.0'de %8 rölatif aktivite elde edilmiştir. Benzer durum asidik koşullar için de geçerli olup, pH 4.0'te %28, pH 3.0'te %8 aktivite gerçekleşmiştir. Enzim asido-nötral özelliktedir (Şekil 4.33).

Kang ve ark (2011), hipertermofilik *Thermotoga neapolitana* (pula) bakterisinden izole ettikleri termostabil tip I pullulanaz enzimi ile pH 4.5-10.0 aralığında aktivite analizleri yapmışlardır. Enzimin pH 4.5-7.0 aralığında oldukça yüksek aktiviteye sahip olduğunu, optimum aktivitesini pH 6.5'te gösterdiğini bulmuşlardır. Enzim aktivitesinin pH 7.0'nin üzerindeki keskin bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Bu bulgular, *Geobacillus thermoleovorans* NP1 suşundan elde edilen pullulanazın özellikleri ile benzerlik göstermektedir.

Kunamneni ve Singh (2006), *Bacillus* sp. AN-7 suşundan elde ettikleri pullulanaz enziminin optimum aktivitesini belirlemek amacıyla, pH 3.0-9.0 aralığında aktivite analizi yapmışlardır. Bu reaksiyonlar sonucunda, enzimin optimum aktiviteye sahip olduğu pH değerini 6.0 olarak belirlemişlerdir. *Geobacillus thermoleovorans* NP1 suşundan elde edilen pullulanaz, optimum aktivite değeri açısından Kunamneni ve Singh'in (2006) sonuçları ile uyumludur.



Şekil 4.34. *Anoxybacillus rupiensis* NP2 Suşundan Elde Edilen Pullulanazın Optimum pH Grafiği

Anoxybacillus rupiensis NP2 suşundan izole edilen pullulanaz en yüksek aktiviteyi pH 9.0'da göstermiştir. Enzim pH 3.0-11.0 aralığında ortalama %81 rölatif aktiviteye sahiptir. Optimum aktivite değeri dışındaki pH değerlerinde elde edilen rölatif aktivite sonuçları birbirine oldukça yakın olup, pH 3.0-11.0 aralığında (pH 9.0 hariç) ortalama %79 aktivite elde edilmiştir. Bu sonuçlar NP2 alkali pullulanaz enziminin asidik, nötral ve alkali özellik gösteren, geniş pH spektrumunda yüksek düzeyde aktif enzim özelliği taşıdığını göstermektedir (Şekil 4.34).

Lee ve ark (2016), *Hermetia illucens* (Siyah Asker Böceği) larvasının bağırsak mikroflorasından elde ettikleri pullulanaz enzimini (PulSS4) pH 5.0-11.0 aralığında analiz etmişlerdir ve enzimin pH 9.0'da optimum aktivite gösterdiğini bulmuşlardır.

Asha ve ark (2013), topraktan izole ettikleri *Bacillus halodurans* bakterisinden elde ettikleri pullulanaz enziminin pH 3.0-11.0 aralığındaki aktivite analizlerine göre, enzimin optimum aktivitesini pH 10.0'da gösterdiğini bulmuşlardır.

Bertoldo ve ark (2004), termoalkalifilik *Anaerobranca gottschalkii* suşundan

elde ettikleri tipI pullulanaz enziminin pH 5.0-11.0 aralığındaki aktivite testlerinde optimum olarak pH 8.0'de aktif olduğunu saptamışlardır.

Kim ve ark (1993), alkalifilik *Bacillus* sp. S-1 suşundan saflaştırdıkları termofilik pullulanaz enziminin optimum pH 9.0'da aktif olduğunu belirlemişlerdir.

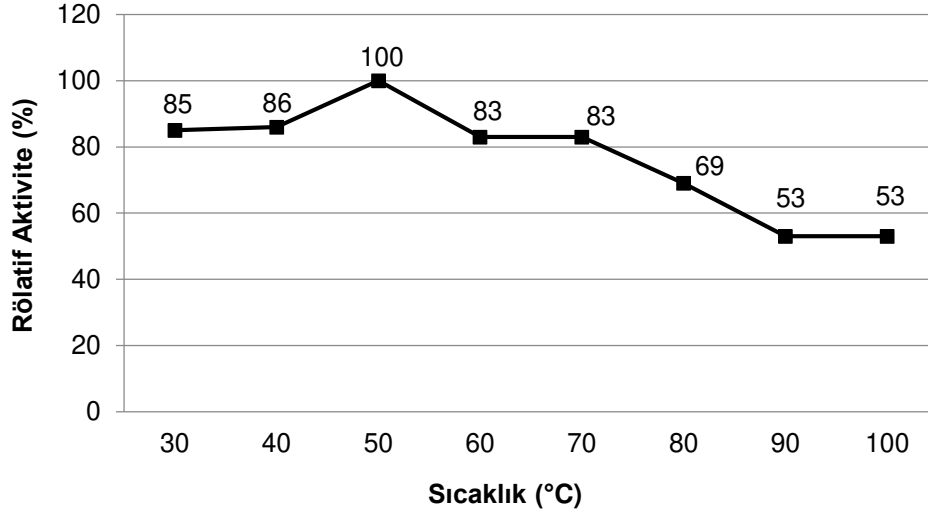
Ara ve ark (1992), alkalifilik *Bacillus* sp. KSM-1876 suşundan izole ettikleri alkali pullulanaz enziminin optimum aktivitesini pH 10.0'da gösterdiğini, pH 11.0'de ise %85 aktiviteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir.

Anoxybacillus rupiensis NP2 suşundan elde edilen enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değeri, literatürlerdeki verilerle benzerlik ve tutarlılık göstermektedir.

4.4.2. Amilaz ve Pullulanaz Enzimlerinin Optimum Aktivite Sıcaklıklarının Belirlenmesine Ait Bulgular

Amilaz ve pullulanaz enzimleri aktivite gösterdikleri sıcaklık değerlerinin belirlenmesi amacıyla 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100°C'de, enzimlerin optimum aktivite pH'ında hazırlanmış substratlı tampon ile 60 dakika süreyle reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulgular Şekil 4.35, 4.36, 4.37 ve 4.38'de gösterilmiştir.

Aeribacillus pallidus NA1 suşuna ait olan alkali amilazın optimum aktivite gösterdiği sıcaklık 50°C olarak bulunmuştur (Şekil 4.35). Enzim 30-100°C aralığında ortalama %65 oranında aktivite göstermiştir. 30-70°C aralığında ortalama %87.4 aktivite elde edilirken, 70°C'den yüksek sıcaklıklarda rölatif aktivitede azalma görülmüştür. 70°C'de %83, 80°C'de %70 ve 100°C'de %53 aktivite gösteren enzim bu özellikleri nedeniyle termofil uygulamalar için uygundur.

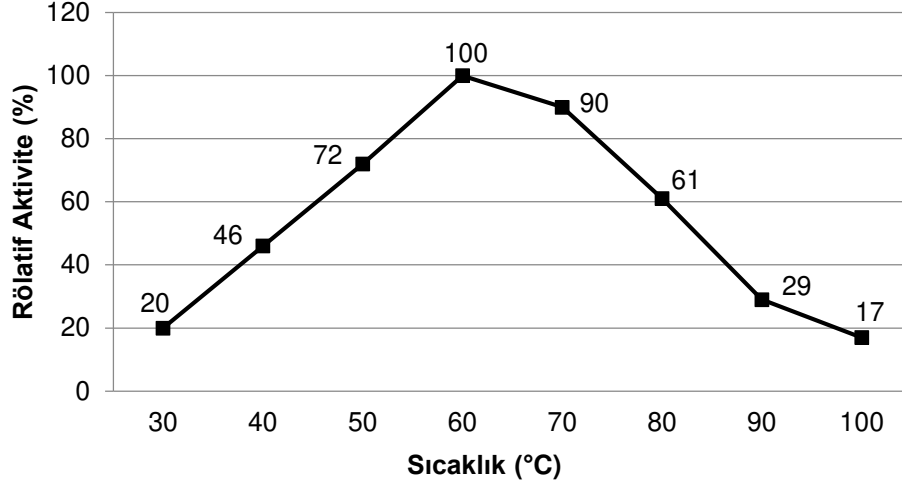


Şekil 4.35. *Aeribacillus pallidus* NA1 Suşundan Elde Edilen Alkali Amilazın Optimum Sıcaklık Grafiği

Wang ve ark (2016), *Bacillus* sp. WangLB suşundan izole ettikleri alkali amilaz enziminin optimum aktivite sıcaklığını 55°C olarak bulmuşlardır. WangLB amilaz enzimi aynı zamanda 50-85°C sıcaklık değerlerinde %90'dan daha yüksek rölatif aktivite göstermişlerdir.

Vijayaraghavan ve ark (2015), *Bacillus cereus* IND4 suşundan elde edilen amilaz enziminin 50°C'de optimum aktivite gösterdiğini saptamışlardır.

Elayaraja ve ark (2011), termofilik *Bacillus firmus* CAS 7 suşundan saflaştırdıkları α -amilaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerini 50°C olarak bulmuşlardır. NA1 alkali amilazın optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri literatür değerleri ile uyumludur.



Şekil 4.36. *Geobacillus lituanicus* NA2 Suşundan Elde Edilen Asidik Amilazın Optimum Sıcaklık Grafiği

Yapılan analizler sonucunda, *Geobacillus lituanicus* NA2 suşunun sentezlediği asidik amilazın 60°C’de optimum aktivite gösterdiği bulunmuştur (Şekil 4.36). Enzimin aktivitesi 30°C’den 60°C’ye kadar hızla yükselmiş ve %80 aktivite artışı gerçekleşmiştir. NA2 asidik amilaz enziminin aktivitesi sıcaklığın 60°C’den 100°C’ye doğru artırılması sonucunda optimum değere göre yaklaşık %83 azalma göstermiştir. Enzimin 30°C’de %20, 40°C’de %46, 50°C’de %72, 70°C’de %90, 80°C’de %61, 90°C’de %29 ve 100°C’de %17 rölatif aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, NA2 asidik amilaz enzimi termofilik bir enzimdir.

Emtenani ve ark’nın (2015), *Bacillus subtilis* DR8806 suşundan saflaştırdıkları amilaz enzimi en yüksek aktiviteyi 70°C’de göstermiştir. Enzim 35-75°C aralığında aktivitesini korumakla beraber daha yüksek sıcaklıklarda enzimin aktivitesi azalmıştır. Enzimin 65°C’deki rölatif aktivitesi %92 iken, 75°C’de %74 aktivite elde edilmiştir.

Kalpana ve Pandian (2014), *Bacillus subtilis* S8–18 suşundan elde ettikleri asidik α -amilaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerinin 60°C olduğunu bulmuşlardır.

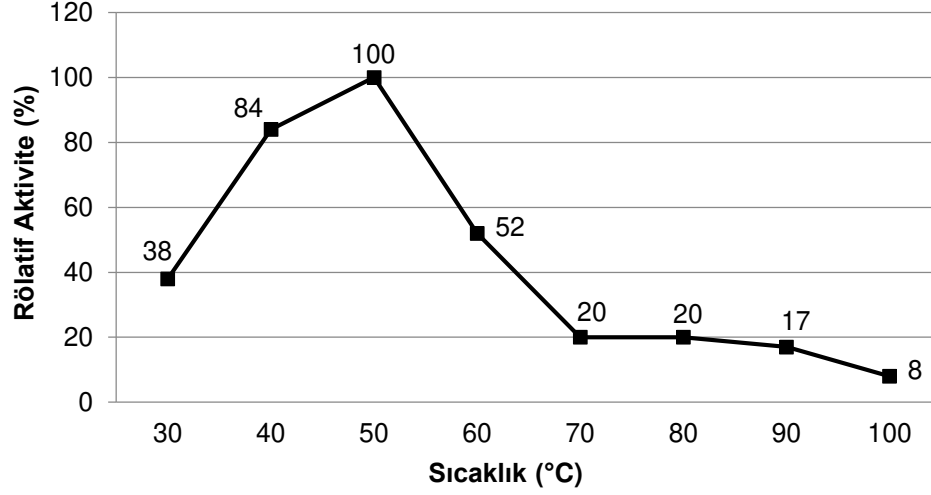
Kumari ve ark (2013), *Bacillus cereus* MTCC 10205 suşundan saflaştırdıkları amilaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerini saptamak için 30-70°C aralığında aktivite analizleri yapmışlar ve enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerini 55°C bulmuşlardır.

Ozturk ve ark (2013), *Bacillus subtilis* A28 suşundan izole ettikleri asidik amilaz enziminin 65-75°C aralığında oldukça yüksek aktiviteye sahip olduğunu, 70°C’de optimum aktivite gösterdiğini bulmuşlardır Bununla birlikte, enzim aktivitesi 80°C’den sonra hızla düşmüştür.

Asad ve ark (2011) *Bacillus* sp. WA21 suşundan saflaştırdıkları asidik α -amilaz enziminin 35-95°C aralığında aktivite göstermekle birlikte, optimal aktivitesinin 55°C’de gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Anto ve ark (2006), izole ettikleri *Bacillus cereus* MTCC 1305 suşundan saflaştırdıkları alfa amilaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerini 55°C olarak bulmuşlardır. *Geobacillus lituanicus* NA2 suşundan izole edilen asidik amilaz enziminin optimum sıcaklık aktivitesi dikkate alındığında enzim termofil olmakla birlikte literatür verilerinden farklılık göstermektedir.

Geobacillus thermoleovorans NP1 suşundan izole edilen asidik pullulanazın optimum aktivite gösterdiği sıcaklık 50°C olarak bulunmuştur (Şekil 4.37). Enzim 30°C’de %38, 40°C’de %84 aktivite gösterirken, sıcaklık 60°C’ye yükseltildiğinde aktivite %52’ye düşmüştür. Enzimin aktivitesinde 50-60°C aralığında yaklaşık %50, 50-70°C aralığında yaklaşık %80 azalma meydana gelmiştir. Enzimin 70-100°C aralığındaki aktivitesi ortalama %16.25 bulunmuştur. Bu bulgulara göre, NP1 asidik pullulanaz enzimi termotolerant özelliktedir.



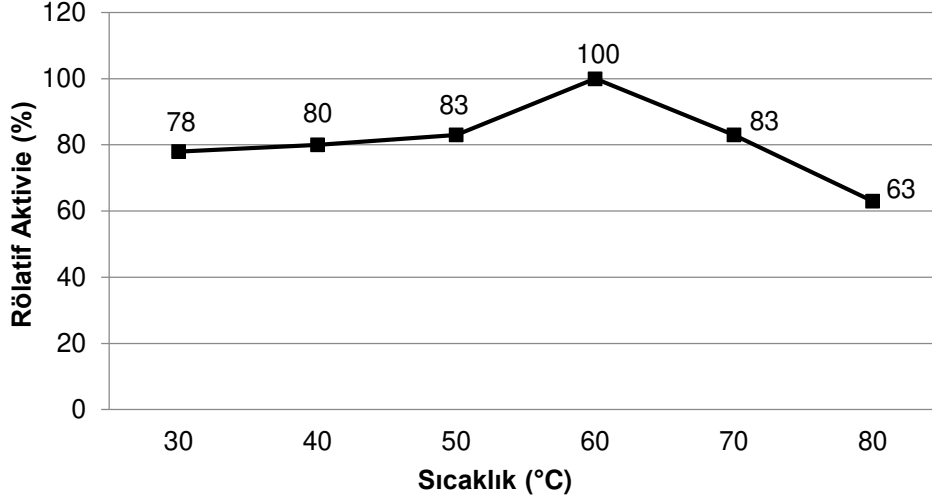
Şekil 4.37. *Geobacillus thermoleovorans* NP1 Suşundan Elde Edilen Asidik Pullulanazın Optimum Sıcaklık Grafiği

Kahar ve ark (2016), *Anoxybacillus* sp. SK3-4 suşundan saflaştırdıkları asidik tip I pullulanaz (PulsASK) enzimini 30-100°C aralığında aktivite analizine tabi tutarak enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerinin 60°C olduğunu saptamışlardır.

Kunamneni ve Singh (2006), *Bacillus* sp. AN-7 suşundan saflaştırdıkları pullulanaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerini belirlemek amacıyla 40-110°C aralığındaki sıcaklıklarda aktivite analizleri gerçekleştirmişler ve enzimin 90°C’de maksimum aktiviteye sahip olduğunu bulmuşlardır.

Duffner ve ark (2000), *Desulfurococcus mucosus*’tan elde ettikleri termoaktif pullulanaz enziminin 40-100°C aralığındaki sıcaklık değerlerinde standart aktivite analizlerini yapmışlar ve enzimin optimum aktivite göstermiş olduğu sıcaklığı 85°C olarak belirlemişlerdir.

NP1 asidik pullulanaz enzimi optimum sıcaklık aktivitesi açısından literatürle karşılaştırıldığında, Kahar ve ark’nın (2016) bulgularına yakın olduğunu bulmuşlardır.



Şekil 4.38. *Anoxybacillus rupiensis* NP2 Suşundan Elde Edilen Alkali Pullulanazın Optimum Sıcaklık Grafiği

Anoxybacillus rupiensis NP2 suşundan elde edilen alkali pullulanazın optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri 60°C olarak belirlenmiştir (Şekil 4.38). 30-80°C aralığında ortalama %81.2 oranında oldukça yüksek aktiviteye sahip olan enzim, 80°C’de %63 aktivite göstermiştir. Bu değerler dikkate alındığında, NP2 alkali pullulanaz enziminin geniş sıcaklık aralığında aktivite gösteren termofil özellikte bir enzim olduğu görülmektedir.

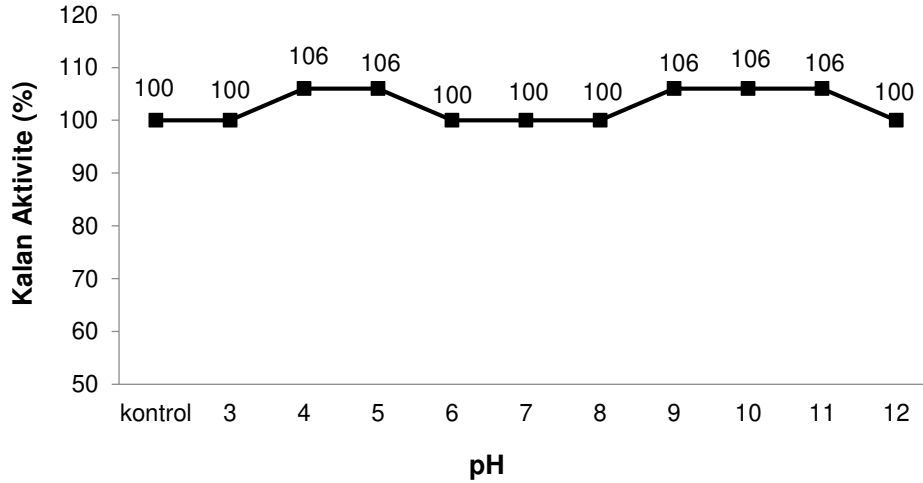
Asha ve ark (2013), *Bacillus halodurans* bakterisinden elde ettikleri alkali pullulanaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerini belirlemek için 0-100°C aralığında analizler gerçekleştirmişlerdir ve enzimin optimum aktivite değerini 50°C’de elde etmişlerdir.

Bertoldo ve ark (2004), termoalkalifilik *Anaerobranca gottschalkii* suşundan elde ettikleri tip I alkali pullulanaz enziminin optimum sıcaklık değerini belirlemek amacıyla enzimi 40-80°C aralığında standart aktivite analizlerine tabi tutmuşlardır. Analizler sonucunda, enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri 70°C olarak bulunmuştur.

Samah ve ark (2005), *Bacillus flavothermus* KWF-1 suşundan izole ettikleri termostabil pullulanaz enzimini 40-100°C aralığındaki sıcaklıklarda analiz etmişler ve enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerini 80°C olarak belirlemişlerdir.

4.4.3. Amilaz ve Pullulanaz Enzimlerinin pH Stabilitelerinin Belirlenmesine Ait Bulgular

Amilaz ve pullulanaz enzimleri pH stabilitelerinin belirlenmesi amacıyla pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0 ve 12.0’de hazırlanmış olan substratsız pH tamponlarıyla 24 saat süreyle oda sıcaklığında ön inkübasyona bırakılmışlardır. Ön işlem görmüş enzimler kalan aktivite değerlerinin saptanması için optimum pH’larında hazırlanmış substrat kullanılarak optimum sıcaklıkta 60 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Elde edilen stabilite değerleri Şekil 4.39, 4.40, 4.41 ve 4.42’de gösterilmiştir.



Şekil 4.39. *Aeribacillus pallidus* NA1 Suşundan Elde Edilen Alkali Amilazın pH Stabilitelerine Ait Grafik

Aeribacillus pallidus NA1 suşundan izole edilen amilaz enzimi tüm pH değerleri dikkate alındığında ortalama %103 oranında oldukça yüksek stabiliteye sahiptir (Şekil 4.39). pH 9.0'da optimum aktiviteye sahip olan NA1 alkali amilaz enzimin yüksek alkali pH'larda da (ortalama %103.6) aktivitesinin tamamını koruması enzimin alkali özelliği ile uyum sağlamaktadır.

Simair ve ark (2017), amilaz enzimi ile yaptıkları çalışmada, enzimi pH 8.0-10.0 aralığındaki alkali pH değerlerinde 1 saat süreyle inkübasyona bıraktıklarında enzimin %90 civarında stabil kaldığını bildirmişlerdir. Aynı enzimin stabilitesi asidik ve nötral pH'larda (pH 5.0-7.0) ortalama %60 oranına düşmüştür.

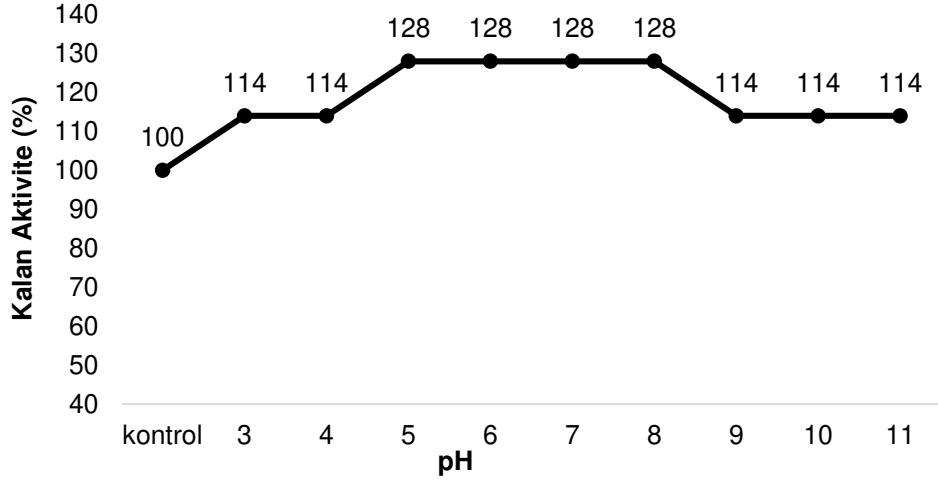
Nithya ve ark (2016), *Bacillus licheniformis* KSU-6 suşundan izole ettikleri alkali amilaz enzimini pH 4.0-12.0 aralığındaki pH tamponlarında 1 saat süreyle ön inkübasyona bırakmışlardır. Enzim pH 8.0, 9.0 ve 10.0'da aktivitesinin %100'ünü korurken, pH 11.0'de %91 ve pH 12.0'de %85 kalan aktiviteye sahiptir.

Zhang ve ark (2016), *Anoxybacillus* sp. YIM 342 suşundan saflaştırdıkları alkali amilaz enzimi pH 8.0 ve 9.0'da 210 dakika ön inkübasyona bırakıldığında aktivitesinin %80'ini korumuştur. pH 10.0'daki ön inkübasyon sonucunda, enzimin aktivitesinde düşüş olmuş ve enzim %45 stabil kalmıştır.

Aygan ve ark (2014), topraktan izole ettikleri *Bacillus subtilis* A10 suşundan saflaştırdıkları alkali α -amilaz enziminin pH stabilitesini belirlemek amacıyla, enzimi 45°C'de, 15 ve 30 dakikalık sürelerde, pH 4.0-11.0 aralığındaki çeşitli pH tamponlarında ön inkübasyona bırakmışlardır. En yüksek stabilite değeri, 15 dakikalık ön inkübasyon sonucunda pH 7.0-10.0 aralığında %84.9 olarak ölçülmüştür. Enzim 30 dakikalık ön inkübasyondan sonra orijinal aktivitesinin %50'sinden fazlasını korumuştur. Her iki ön inkübasyon süresinde de maksimum kalan aktivite değerleri pH 8.0 ve 9.0'da ölçülmüştür.

Aeribacillus pallidus NA1 suşundan izole edilen alkali amilaz enzimi çeşitli literatürlerdeki verilere kıyasla farklı pH tamponlarında daha uzun süre ön inkübasyona bırakılmış (literatürlerde 15-210 dakika, NA1 alkali amilaz enzimi 24

saat) ve inhibe olmamıştır. Enzimin aktivitesi bütün pH'larda ortalama %103'tür. Bu sonuçlar, literatüre göre oldukça çarpıcı ve enzim kararlılığı açısından farklı olup, enzim ekstrem pH'larda stabildir veya pH ile indüklenebilme özelliğine sahiptir.



Şekil 4.40. *Geobacillus lituanicus* NA2 Suşundan Elde Edilen Asidik Amilazın pH Stabilitésine Ait Grafik

Geobacillus lituanicus NA2 suşundan elde edilen asidik amilaz pH 3.0-11.0 aralığında ortalama %120.2 oranında stabil kalmıştır ve pH'nın alkali yönde yükselmesiyle aktivitesinin indüklendiği görülmüştür. Optimum aktivitesini pH 4.0'e gösteren NA2 asidik amilaz enzimi, pH 3.0, 4.0, 5.0 ve 6.0'da ortalama %121, pH 5.0, 6.0, 7.0 ve 8.0'de %128, pH 9.0, 10 ve 11.0'de %114 stabil kalmıştır (Şekil 4.40). Bu sonuçlar, enzimin asido-alkali özellikte olduğunu göstermektedir.

Emtenani ve ark (2015), *Bacillus subtilis* DR8806 suşundan izole ettikleri Amy8803 amilaz enzimini pH 2.0-10.0 aralığındaki pH değerlerinde ve 70°C'de 60 dakika süreyle ön inkübasyona bırakmışlardır. Aktivite analizi sonucunda DR8806 α -amilaz enziminin pH4.0-9.0 aralığında ortalama %80'den fazla kalan aktiviteye sahip olduğu ve stabilitesini oldukça yüksek oranda koruduğu tespit edilmiştir. Enzim, pH 4.0-7.0 aralığında amilolitik aktivitesinin %100'ünü korurken, pH 3.0'te

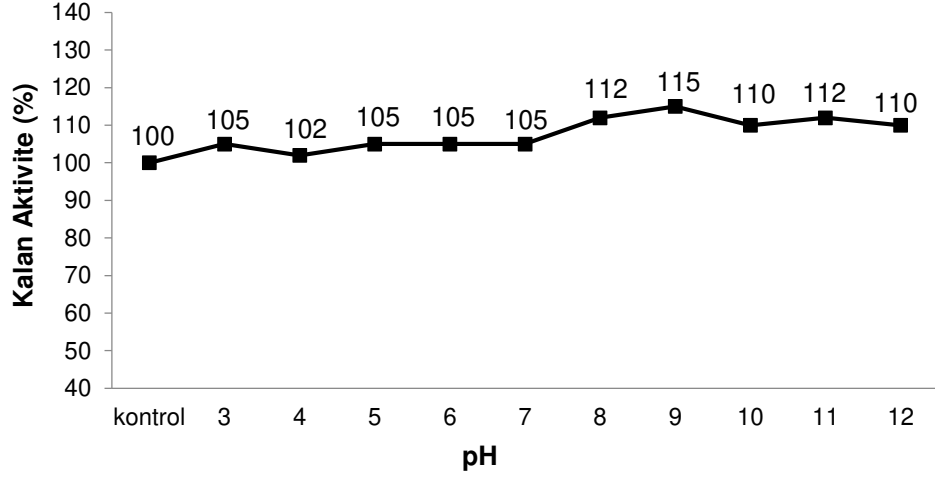
%77'sini ve pH 9.0'da %81'ini korumuştur.

Kalpana ve Pandian'ın (2014) *Bacillus* sp. S8-18 suşundan elde ettikleri amilaz enziminin 24 saat süreyle 4.0-12.0 aralığındaki pH'larda ön inkübasyona bırakıldığında %84-94 oranlarında oldukça yüksek stabilite değerlerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda pH 5.0-12.0 aralığında ortalama %90 kalan aktivite değeri ölçülmüştür.

Bacillus sp. WA21 suşuna ait amilaz enzimi ile çalışan Asad ve ark (2011), enzimi pH 3.0-11.0 aralığındaki değerlerde 55°C'de 1 saat süreyle inkübasyona bırakarak amilazın stabilite koşullarını belirlemişlerdir. Asidik özellikteki bu enzimin hidrolitik aktivitesi, pH 3.0-5.0 ve 7.0-11.0 aralıklarındaki değerlerde oldukça etkilenmekle birlikte, enzim pH 6.0'da orijinal aktivitesinin %100'ünü korumuştur.

Kalpana ve Pandia'nın (2014) çalışmaları dışındaki literatürlerde ön inkübasyon süresi genellikle 60 dakikadır. *Geobacillus lituanicus* NA2 suşundan elde edilen asidik amilaz enziminin pH stabilitesi çalışmalarında 24 saatlik ön inkübasyon sonunda enzimin aktivitesi korunmuş ve aktivitede artış olmuştur. Bu durum, enzimin stabilitesinin pH artışı ile indüklenebilir olduğunu ve enzimin asidik, nötral ve alkali koşullarda yüksek düzeyde stabil kalabilme yeteneğine sahip olduğunu göstermektedir. Enzim bu özelliği sayesinde işlem süresi 60 dakikadan daha uzun olan alanlardaki uygulamalar için kullanım potansiyeli oldukça yüksek bir adaydır.

Geobacillus thermoleovorans NP1 suşuna ait asidik pullulanazın pH 3.0-12.0 aralığındaki ortalama stabilite değerinin %108.1 olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.41). Enzim tüm pH'larda oldukça yüksek stabiliteye sahiptir. Optimum aktivitesini pH 6.0'da gösteren NP1 asidik pullulanaz enzimi, pH 6.0 tamponundaki ön inkübasyonundan sonra başlangıç aktivitesini %105 oranında korumuştur. Bu sonuçlar, NP1 asidik pullulanazın geniş pH aralığında stabil bir enzim olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.41. *Geobacillus thermoleovorans* NP1 Suşundan Elde Edilen Asidik Pullulanazın pH Stabilitesine Ait Grafik

Kahar ve ark (2016), *Anoxybacillus* sp. SK3-4 suşundan elde ettikleri tip I pullulanaz (PulsASK) enzimini 30 dakika süreyle ön inkübasyona bırakmışlardır. Süre sonunda enzimin optimum aktivite sıcaklığında (60°C) standart aktivite analizleri gerçekleştirmişler ve her pH değerinde enzimin kalan aktivite oranlarını hesaplamışlardır. Sonuçlara göre, PulsASK enzimi pH 5.0-7.0 aralığında oldukça stabil kalmıştır.

Wei ve ark (2014), *Bacillus cereus* Nws-bc5 suşundan elde ettikleri rekombinant tip I asidik pullulanaz enziminin (*Pul_{BC}*) pH stabilitesini belirlemek amacıyla, enzimi 24 saat süreyle ön inkübasyona bırakmışlardır. Standart aktivite analizi sonunda *Pul_{BC}* enzimi, pH 6.0-9.0 aralığında başlangıç aktivitesinin %75'inden fazlasını korumuş ve en yüksek stabilite değerini pH 7.0'de göstermiştir.

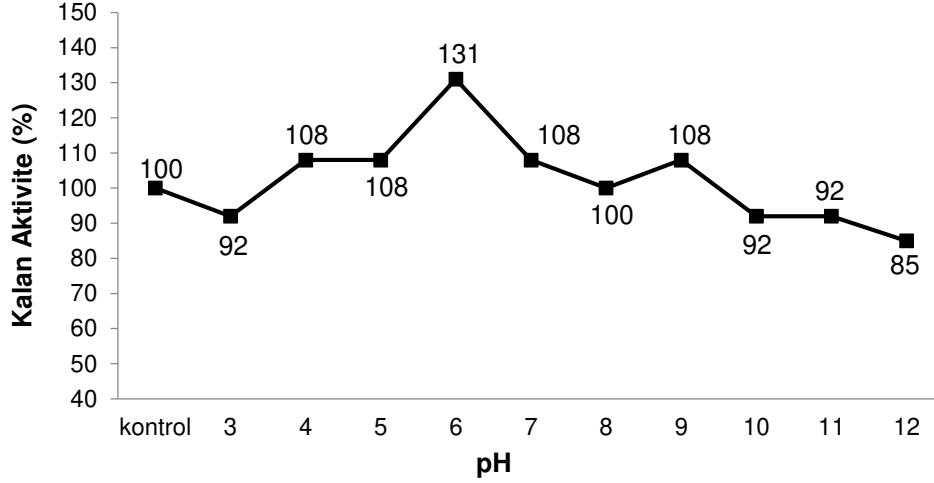
Singh ve ark (2010), *Aureobasidium pullulans* FB-1 suşundan elde ettikleri asidik pullulanaz enziminin pH stabilitesini analiz etmek amacıyla, enzimi pH 3.5-7.0 aralığındaki pH tamponlarında 0-360 dakika aralığındaki farklı sürelerde ön inkübasyona bırakmışlardır. 6 saatlik ön inkübasyonda, pH 4.5-6.5 aralığında oldukça stabil olan FB-1 pullulanaz enziminin, pH 5.0'te başlangıç aktivitesinin %100'ünü

koruduğu tespit edilmiştir. Aynı sürede, pH 5.5'te başlangıç aktivitesinin tamamına yakını, pH 6.0'da aktivitesinin %90'ından fazlasını ve pH 6.5'te de %80'den fazlasını koruduğu belirlenmiştir. pH 4.5'te 6 saatlik ön inkübasyon sonucunda enzim başlangıç aktivitesinin %75'inden fazlasını ve pH 4.0'te %60'a yakını korumuştur. pH 3.5'te 306 dakikalık ön inkübasyonda enzim %80 inaktif olmuştur. pH 7.0'de 2 saatlik ön inkübasyon sonucunda başlangıç aktivitesinin %60'ı kalan FB-1 pullulanaz enzimi, 280 dakika sonunda aktivitesinin tamamını kaybetmiştir.

Gomes ve ark (2003), termofilik *Rhodothermus marinus*'tan elde ettikleri pullulanaz enzimini pH 4.0-10.0 aralığında 24 saatlik ön inkübasyona bırakıp, standart enzim aktivitesi tayini yapmışlar ve enzimin pH stabilitesini belirlemişlerdir. pH 5.0-9.0 aralığında oldukça iyi sabilite değerlerine sahip olan enzim, pH 6.0'da başlangıç aktivitesinin %100'ünü korumuştur. NP1 asidik pullulanaz enziminin pH stabilite değerleri Gomes ve ark'ninkilerle (2003) benzerlik göstermektedir.

NP1 asidik pullulanaz enzimi pH 8.0-12.0 aralığında yaklaşık %112, pH 3.0-7.0 aralığında ortalama %104 aktivite göstermiştir. Asidik ve alkali koşullarda aktivitesinde artış görülen NP1 asidik pullulanaz, asidik ve alkali enzimlerin kullanıldığı alanlar için güçlü bir adaydır.

Anoxybacillus rupiensis NP2 suşunun sentezlediği pullulanaz enzimi pH 3.0-12.0 aralığında ortalama %102.4 oranında stabil kalmıştır (Şekil 4.42). Optimum aktivitesini pH 9.0'da gösteren enzim, 8.0-12.0 aralığındaki alkali pH aralığında stabilitesini ortalama %95.4 oranında koruyarak alkali özellikte bir enzim olduğunu göstermiştir. Geniş pH stabilitesi spektrumuna sahip olan NP2 alkali pullulanaz enzimi, pH 6.0'da %131 aktivite değerine ulaşmıştır.



Şekil 4.42. *Anoxybacillus rupiensis* NP2 Suşundan Elde Edilen Alkali Pullulanazın pH Stabilitesine Ait Grafik

Lee ve ark (2016), *Hermetia illucens* (Siyah Asker Böceği) larvasının bağırsak mikroflorasından elde ettikleri alkalifilik pullulanaz enziminin (PulSS4) pH stabilitesini belirlemek amacıyla, enzimi pH 5.0-11.0 aralığındaki değerlerde 24 saat süreyle ön inkübasyona bırakmışlardır. Ön inkübasyon süresi sonunda gerçekleştirilen standart aktivite analizlerine göre PulSS4 pullulanaz enziminin asidik ve alkali koşullarda başlangıç aktivitesinin %80'inden fazlasını koruduğu tespit edilmiştir. *Anoxybacillus rupiensis* NP2 suşunun alkali pullulanaz enzimine ait bulgular literatürle benzerlik göstermektedir.

Asodeh ve Lagzian'ın (2012), *Bacillus subtilis* DR8806 suşundan saflaştırdıkları alkali glukoamilopullulanaz enziminin pH stabilitesinin belirlenmesi amacıyla enzim pH 3.0-11.0 aralığındaki pH'larda 3 saat süreyle ön inkübasyona bırakılmış ve 70°C'de standart aktivite analizi gerçekleştirilmiştir. DR8806 glukoamilopullulanaz enzimi, pH 4.0-9.0 aralığındaki pH değerlerinde öninkübasyona bırakıldığında 1 saatlik süre sonunda başlangıç aktivitesinin %90'ından fazlasını korumuştur. Ancak pH 10.0'un üzerindeki pH değerlerinde enzimin kalan aktivite değerleri düşmüştür. pH 10.5'te %64 ve pH 11.0'de %50

oranlarında kalan aktivite değerleri ölçülmüştür. Enzimin alkali pH değerlerinde yüksek oranda stabiliteye sahip olduğu görülmüştür.

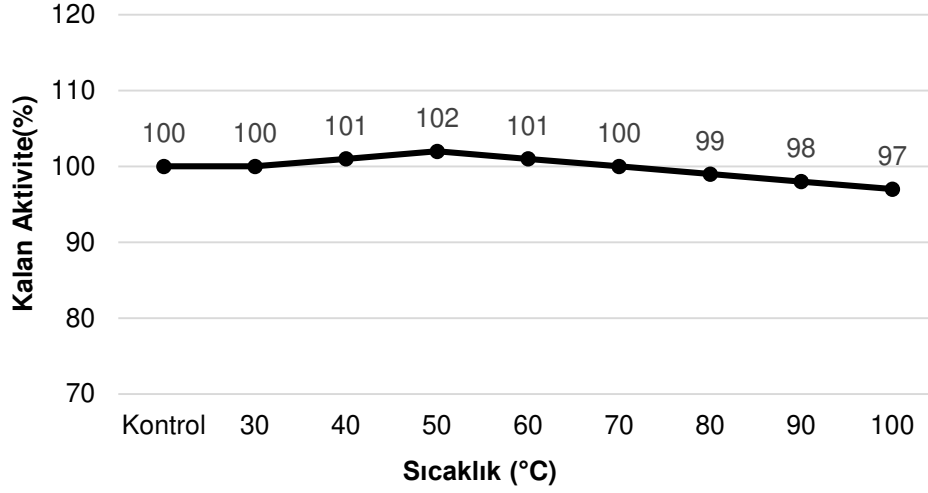
Samah ve ark (2005), *Bacillus flavothermus* KWF-1 suşundan izole ettikleri termofilik pullulanaz enziminin pH stabilitesini belirlemek amacıyla, enzimi pH 7.0-10.0 aralığında 30 dakika süreyle ön inkübasyona bırakmışlardır. KWF-1 pullulanaz enzimi pH 4.0-5.0 aralığında inaktive olurken, en iyi stabilite değeri pH 10.0'da ölçülmüştür.

Kim ve ark (1993), termofilik ve alkalifilik *Bacillus* sp. S-1 suşundan elde ettikleri alkali pullulanaz enziminin pH 4.0-11.0 aralığındaki 24 saatlik inkübasyon süresince başlangıç aktivitesinin tamamını koruyarak stabil kaldığını bulmuşlardır. Çalışmamızda analiz edilen enzime ait pH stabilite değerlerinin literatürdekilerden daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

4.4.4. Amilaz ve Pullulanaz Enzimlerinin Sıcaklık Stabilitelerinin Belirlenmesine Ait Bulgular

Amilaz ve pullulanaz enzimleri termal stabilitelerinin belirlenmesi amacıyla, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100°C sıcaklıklarda 60 dakika süreyle ön inkübasyona bırakılmıştır. Ön inkübasyondan sonra enzimlerin optimum sıcaklıklarında ve substratlı optimum pH tamponlarında yapılan standart aktivite analizlerine ait bulguları Şekil 4.43, 4.44, 4.45 ve 4.46'da gösterilmiştir.

Aeribacillus pallidus NA1 suşundan elde edilen alkali amilaz enziminin 30-100°C aralığında başlangıç aktivitesinin ortalama %100'ünü koruduğu belirlenmiştir (Şekil 4.43). Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık 50°C'dir. Bunun yanı sıra, enzim analizi yapılan tüm sıcaklık değerlerinde aktivitesini oldukça yüksek oranlarda korumuştur. Enzimin aktivitesi 40-60°C aralığında indüklenerek ortalama %101 oranında aktivite elde edilmiştir. Bu bulgular, enzimin termostabil karakterde olduğunu göstermektedir. NA1 alkali amilaz enzimine ait bu termal stabilite bulguları çeşitli literatürlerdeki sonuçlarla uyum göstermiştir.



Şekil 4.43. *Aeribacillus pallidus* NA1 Suşundan Elde Edilen Alkali Amilazın Sıcaklık Stabilitesine Ait Grafik

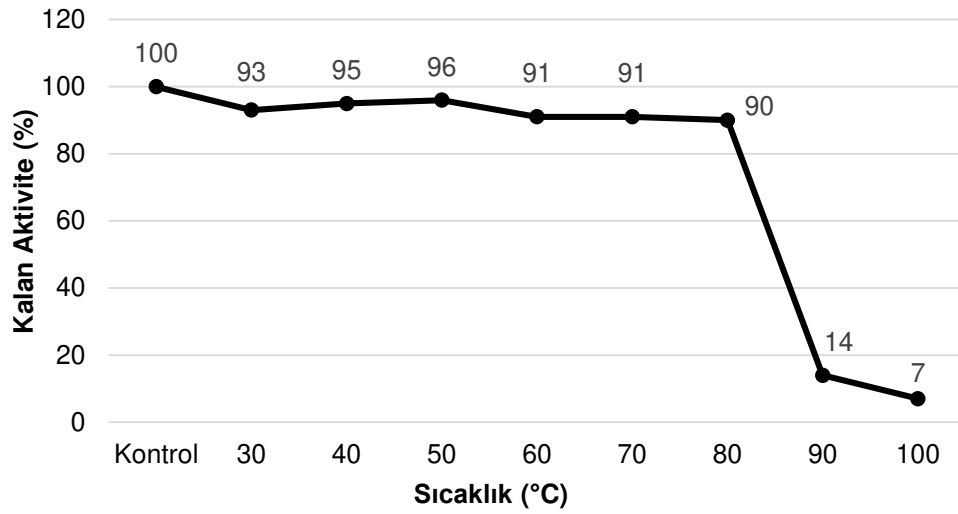
Nithya ve ark (2016), *Bacillus licheniformis* KSU-6 suşundan izole ettikleri alkali amilaz enziminin termal stabilitesini belirlemek amacıyla, enzimi 40-100°C aralığındaki sıcaklıklarda 60 dakika süreyle ön inkübasyona bırakmışlardır. Daha sonra standart aktivite analizi yapıldığında en yüksek aktivite (%100) 50 ve 60°C'lerde gözlemlenmiştir. 100°C'de enzim aktivitesinin %58 oranında korunduğu tespit edilmiştir. NA1 alkali amilaz enzimi 100°C'de orijinal aktivitesini %97 oranında korumuştur.

Zhang ve ark (2016), *Anoxybacillus* sp. YIM 342 suşundan izole ettikleri alkali amilaz enziminin sıcaklık stabilitesini belirlemek amacıyla enzimi 10-180 dakika süreyle 70, 80 ve 90°C'lerde ön inkübasyona bırakmışlardır. Enzim 1 saat sonunda 70°C'de aktivitesinin % 45'ini korurken, 30 dakikalık süre sonunda 80°C'de %49'dan fazla stabil kalmıştır. Enzim 90°C'de 20 dakikalık ön işlem sonunda %90 inaktive olmuştur.

Aygan ve ark (2014), *Bacillus subtilis* A10 suşuna ait alkali ve termofilik α -amilaz enziminin sıcaklık stabilitesini saptamak amacıyla, enzimi 4-90°C aralığında 30 dakika ön inkübasyona bırakmışlardır. Enzim 4-50°C aralığında aktivitesini

ortalama %91.5 korumuştur.

Hauli ve ark (2013) *Anoxybacillus* sp. IB-A suşundan saflaştırdıkları alkali amilaz enzimi 70°C’de 10 saat süreyle ön inkübasyona bırakıldığında %100 stabil kalmıştır.



Şekil 4.44. *Geobacillus lituanicus* NA2 Suşundan Elde Edilen Asidik Amilazın Sıcaklık Stabilitesine Ait Grafik

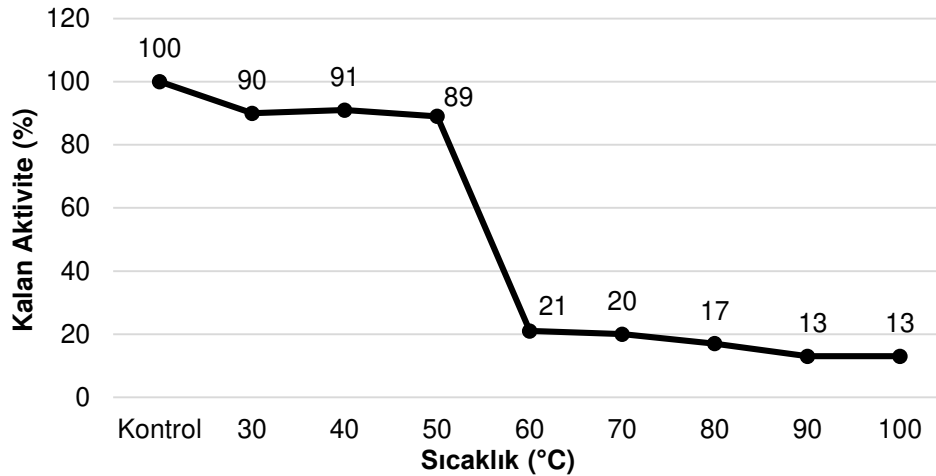
Geobacillus lituanicus NA2 suşundan elde edilen asidik amilaz enzimi 30-100°C sıcaklıklarda ortalama %72.1 oranında stabilite değerine sahiptir. Enzim 30-80°C aralığındaki sıcaklıklarda ön inkübasyondan sonra orijinal aktivitesini ortalama %93 korumuştur. Enzim 90°C’de %86, 100°C’de ise %93 inhibe olmuştur. Optimum aktivite sıcaklığı 60°C olan NA2 asidik amilaz enziminin sıcaklık stabilitesi 90°C’den sonra hızla düşmüştür (Şekil 4.44). Bu bulgulara göre, enzim termostabil karakterde olmakla birlikte, 80°C’den daha yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilecek uygulamalar için uygun değildir. Bir başka ifadeyle, enzim 30-80°C aralığında faaliyet gösteren alanlarda kullanılabilirliğe sahiptir.

Emtenani ve ark (2015), *Bacillus subtilis* DR8806 suşundan saflaştırdıkları

amilaz enziminin termal stabilitesini belirlemek amacıyla enzimi 60 dakika süreyle 30-85°C aralığındaki sıcaklıklarda ön inkübasyona bırakmışlardır. Enzimin 30-85°C aralığında oldukça stabil kaldığını belirlemişlerdir. DR8806 amilaz enzimi optimum aktivite gösterdiği 70°C'de %100 stabil kalırken, 75-80°C aralığında başlangıç aktivitesinin %50'sinden fazlasını korumuştur.

Kalpna ve Pandian (2014), *Bacillus subtilis* S8-18 suşundan elde ettikleri asit-alkali özellikteki termofilik α -amilaz enziminin termal stabilitesini belirlemek amacıyla enzimi 40-100°C aralığındaki sıcaklıklarda 10 ve 60 dakika inkübasyona bırakmışlardır. S8-18 amilaz enzimi 10 dakikalık inkübasyon sonunda 70°C'ye kadar ortalama %61, 1 saatlik inkübasyon sonucunda 50°C'ye kadar ortalama %71 oranında stabilitesini korumuştur.

Asad ve ark (2011), *Bacillus* sp. WA21 suşundan kısmi olarak saflaştırdıkları termo-asidik α -amilaz enzimi 35-85°C gibi geniş bir sıcaklık aralığında 10 dakika süreyle inkübe edildiğinde, ortalama %60'tan daha fazla oranda stabil kalırken, 65°C'de orijinal aktivitesinin %100'ünü korumuştur. WA1 amilaz enzimi 85°C'de %50 inhibe olmuştur.



Şekil 4.45. *Geobacillus thermoleovorans* NP1 Suşundan Elde Edilen Asidik Pullulanazın Sıcaklık Stabilitesine Ait Grafik

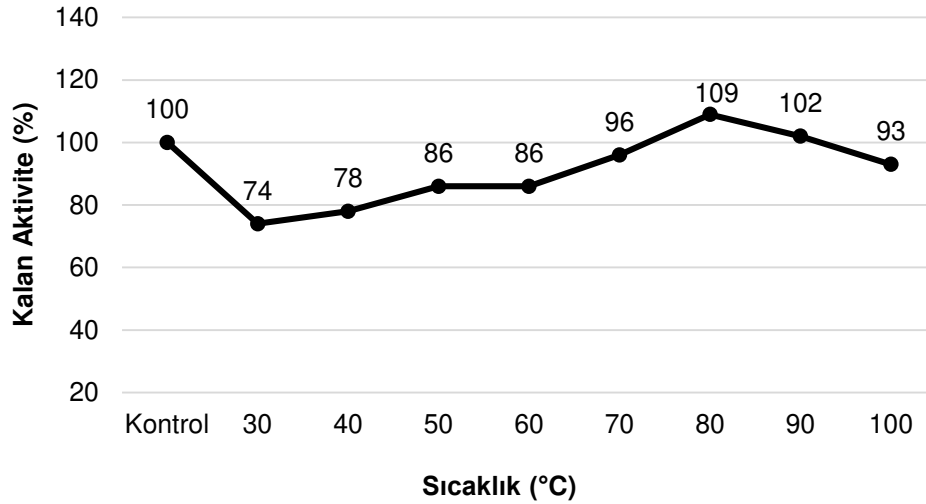
Geobacillus thermoleovorans NP1 suşundan elde edilen asidik pullulanaz enzimi 30, 40 ve 50°C’de %90 oranında stabil kalmıştır. Buna karşılık, 60-100°C aralığında enzim aktivitesi hızla azalmıştır ve enzim başlangıç aktivitesinin yalnızca %17’sini koruyabilmiştir. Optimum aktivitesini 50°C’de gösteren NP1 asidik pullulanaz enzimi, 50°C’de aktivitesinin %89’unu korumakla birlikte, 50°C’nin üzerindeki sıcaklıklarda aktivitesini kaybetmiştir. Bu durumdan dolayı, enzimin aynı zamanda mezofilik özellik gösterdiği de söylenebilmektedir (Şekil 4.45). 60°C ye kadar ortalama %90 stabil kalan NP1 asidik pullulanaz mezo-termotolerant özelliğindedir.

Kahar ve ark (2016), *Anoxybacillus* sp. SK3-4 suşundan izole ettikleri tip I pullulanaz (PulsASK) enziminin termal stabilitesini belirlemek amacıyla, enzimi 20 dakika süreyle 30-100°C aralığındaki sıcaklıklarda ön inkübasyona bırakmışlar ve standart aktivite analizi ile kalan aktivite değerlerini belirlemişlerdir. Enzim 30-60°C aralığında başlangıç aktivitesinin neredeyse tamamını korumuştur, ancak 60°C’den sonra stabilitenin düşüşe geçtiği görülmüştür. Enzim 100°C’de aktivitesinin tamamını kaybetmiştir. PulsASK enzimi, 12 saat süreyle 60, 65 ve 70°C sıcaklıklarda ön inkübasyona bırakılmış ve yapılan aktivite analizlerine göre enzimin 60°C’de 9 saat ön inkübasyona bırakıldıktan sonra başlangıç aktivitesinin %50’sini, 12 saat sonunda ise %40 kadarını koruduğu tespit edilmiştir. Enzim 65°C’deki ön inkübasyon sonucunda 1 saat, 70°C’de ise yaklaşık 30 dakika sonunda başlangıç aktivitesinin tamamını kaybetmiştir.

Singh ve ark (2010), *Aureobasidium pullulans* FB-1 suşundan elde ettikleri asidik pullulanaz enziminin termal stabilitesini belirlemek amacıyla, enzimi 40, 45, 50, 55, 60, 65 ve 70°C sıcaklıklarda 0-6 saat sürelerde ön inkübasyona bırakmışlardır. Enzim, optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri olan 50°C’de, 6 saatlik ön inkübasyon süresi sonunda başlangıç aktivitesinin tamamını korumuştur. FB-1 pullulanaz enzimi, 70°C’de 4 saatlik ön inkübasyon süresi sonunda başlangıç aktivitesinin tamamını kaybederken, 6 saatlik inkübasyon süresi sonunda, sırasıyla,

40°C’de başlangıç aktivitesinin %70’e yakını, 45°C’de yaklaşık %80’ini, 55°C’de %90’a yakını, 60°C’de %80’inden fazlasını ve 65°C’de %60’tan fazlasını koruduğu belirlenmiştir.

Duffner ve ark (2000), *Desulfurococcus mucosus*’tan elde ettikleri termoaktif pullulanaz enziminin sıcaklık stabilitesini belirlemek için enzimi 40-100°C aralığında, 30 dakikadan 4 saate kadar farklı sürelerde ön inkübasyona bırakmışlardır. Ön inkübasyon süreleri sonunda standart aktivite analizleri gerçekleştirilmiştir. Enzim, 75°C’de 4 saat süre sonunda başlangıç aktivitesinin %80’ine yakını, 80°C’de ise %60’ından fazlasını koruyup stabil kalırken, 85°C’de 50 dakikalık ön inkübasyon süresi sonunda başlangıç aktivitesinin %50’sini korumuştur. Enzim 90°C’de 1 saat ve 100°C’de yaklaşık 15 dakika sonunda başlangıç aktivitesinin tamamını kaybetmiştir.



Şekil 4.46. *Anoxybacillus rupiensis* NP2 Suşundan Elde Edilen Alkali Pullulanazın Sıcaklık Stabilitesine Ait Grafik

Anoxybacillus rupiensis NP2 alkali pullulanaz enziminin 30-100°C aralığındaki sıcaklıklardaki stabilitesi ortalama %90.5’tir (Şekil 4.46). Enzim

optimum aktivitesini 60°C’de göstermekle birlikte, 70, 80, 90 ve 100°C’de ortalama %100 stabil kalmıştır. Özellikle 80°C’deki aktivitesi %109’dur. Bu değerler, NP2 alkali pullulanaz enziminin yüksek oranda termal stabiliteye sahip bir enzim olduğunu göstermektedir.

Roodi ve ark (2017), *Cohnella* sp.’den izole ettikleri rekombinant termo-alkalifilik *Coh01133* amilopullulanaz enziminin termal stabilite profilini belirlemek amacıyla enzimi 0-100°C aralığındaki sıcaklıklarda 90 dakika süreyle ön inkübasyona bırakmışlardır. Yapılan standart aktivite analizi sonucunda elde edilen veriler, enzimin 20-60°C aralığında başlangıç aktivitesinin %90’ını koruduğunu, ancak 60°C’nin üzerinde aktivitesinin düşüşe geçtiğini göstermiştir.

Lee ve ark (2016), *Hermetia illucens* (Siyah Asker Böceği) larvasının bağırsak mikroflorasından elde ettikleri alkalifilik pullulanaz enziminin sıcaklık stabilitesini belirlemek için, PulSS4 pullulanaz enzimini 10-60°C aralığındaki sıcaklıklarda 8 saat süreyle öninkübasyona bırakmışlar ve daha sonra standart enzim aktivitesi analizini gerçekleştirmişlerdir. Enzim 40°C’de 8 saat süreyle başlangıç aktivitesinin %60’ını korurken, 60°C’de 2 saatlik öninkübasyon süresi sonunda başlangıç aktivitesinin tamamını kaybetmiştir.

Asodeh ve Lagzian (2012), *Bacillus subtilis* DR8806 suşundan izole ettikleri alkali glukoamilopullulanaz enziminin sıcaklık stabilitesini belirlemek için enzimi 30-90°C aralığındaki sıcaklıklarda 60 dakika süreyle öninkübasyona bırakmışlardır. Sonuçlara göre, DR8806 glukoamilopullulanaz enziminin aktivitesi 30-70°C aralığındaki sıcaklıklarda, başlangıç aktivitesine kıyasla, yaklaşık %20 oranında düşmüştür. Enzim 80°C’de yalnızca %24 oranında kalan aktivite değerine sahip iken, 85 ve 90°C sıcaklıklarda 5 dakikalık ön inkübasyon sonrasında başlangıç aktivitesinin tamamını kaybettiği belirlenmiştir.

Samah ve ark (2005), *Bacillus flavothermus* KWF-1 suşundan izole ettikleri alkali pullulanaz enziminin termal stabilitesini belirlemek amacıyla, enzimi 40-90°C aralığındaki sıcaklıklarda 30 dakika süreyle ön inkübasyona bırakmışlardır.

KWF-1 pullulanaz enzimi 90°C'ye kadar başlangıç aktivitesinin büyük bir kısmını korurken, 90°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda aktivitesini kaybettiği görülmüştür.

4.4.5. İnhibitör, Şelatör, Metal İyonu, Deterjan ve Okside Edici Ajanların Amilaz ve Pullulanaz Enzim Aktiviteleri Üzerindeki Etkilerine Ait Bulgular

Amilaz ve pullulanaz enzimleri iki farklı konsantrasyonda hazırlanan inhibitör, şelatör, metal iyonu, deterjan ve okside edici ajanlar (PMSF, EDTA, CaCl₂, MgCl₂, CuCl₂, ZnCl₂, BaCl₂, MnCl₂, CoCl₂ ve HgCl₂ (her 5 mM ve 10 mM), 4M ve 8M üre, SDS, TritonX-100, Tween 20, Tween 80, β-Merkaptoetanol ve H₂O₂ (%1 ve %5)) ile 60 dakika ön inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kalan aktivitenin saptanması için standart enzim aktivitesi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulgular Çizelge 4.10, 4.11, 4.12, 4.13 ve 4.15'te gösterilmiştir.

Aeribacillus pallidus NA1 suşundan izole edilen termo-alkalin özellikteki amilaz enzimi, metal iyonlarının iki farklı konsantrasyonunda ön inkübasyona tabi tutulmuştur (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. NA1 Alkali Amilaz Aktivitesine Metal İyonlarının Etkisi

Kimyasallar	I. konsantrasyonlar	Kalan Aktivite (%)	II. konsantrasyonlar	Kalan Aktivite (%)
Kontrol	-	100	-	100
CaCl ₂	5 mM	96	10 mM	93.4
MgCl ₂	5 mM	96.3	10 mM	84
CuCl ₂	5 mM	128	10 mM	106
ZnCl ₂	5 mM	98	10 mM	88
BaCl ₂	5 mM	99	10 mM	94.1
MnCl ₂	5 mM	164.1	10 mM	156
CoCl ₂	5 mM	120.1	10 mM	112.1
HgCl ₂	5 mM	99	10 mM	92

Enzim aktivitesi CaCl_2 'nin her iki konsantrasyonunda da korunmuş önemli derecede inhibisyon gerçekleşmemiştir. Enzim 5 mM CaCl_2 konsantrasyonunda aktivitesini %96 korurken, 10 mM'lık konsantrasyonda %93.4 stabil kalmıştır. Bu sonuç, NA1 alkali amilaz enziminin Ca^{+2} bağımlı bir enzim olmadığını göstermekte olup, nişasta endüstrisinde enzimin kullanılabilirliği açısından önemli bir etkidir. Nişasta endüstrisinde Ca^{+2} bağımlı olmayan enzimler daha çok tercih edilmektedir (Wang ve ark, 2016).

MgCl_2 , BaCl_2 ve HgCl_2 'ün 5 mM'lık konsantrasyonları enzim aktivitesini etkilememekle birlikte, 10 mM'lık konsantrasyonlarda, sırasıyla, %84, 94.1 ve 92 oranlarında stabilite elde edilmiştir. Enzim 5 mM ZnCl_2 konsantrasyonunda %98, 10 mM konsantrasyonda %88 oranında stabilitesini korumuştur. Enzimin ZnCl_2 ile aktive olmaması enzimin termofilik olduğunu göstermektedir (Ozturk ve ark, 2013; Aygan, 2008). CuCl_2 , MnCl_2 ve CoCl_2 'nin her iki konsantrasyonu da enzim aktivitesini önemli düzeyde artırmıştır.

Çizelge 4.11. NA1 Alkali Amilaz Aktivitesine İnhibitör, Şelatör, Deterjan ve Okside Edici Ajanların Etkisi

Kimyasallar	I. konsantrasyonlar	Kalan Aktivite (%)	II. konsantrasyonlar	Kalan Aktivite (%)
PMSF	5 mM	99.1	10 mM	94.4
EDTA	5 mM	105.2	10 mM	92.3
Üre	4 M	64	8 M	22.3
SDS	% 1	93.3	% 5	49
TritonX100	% 1	103	% 5	94.1
Tween 20	% 1	109	% 5	88
Tween 80	% 1	105	% 5	90
β -merkapt- etanol	% 1	106.1	% 5	5
H_2O_2	% 1	40	% 5	0

Aeribacillus pallidus NA1 suşundan izole edilen termo-alkalin özellikteki amilaz enzimi çeşitli inhibitör, şelatör, deterjan ve okside edici ajanların iki farklı konsantrasyonunda ön inkübasyona tabi tutulmuştur (Çizelge 4.11).

Enzim 5 mM PMSF ile aktivitesini %99.1, 10 mM konsantrasyonda % 94.4 korumuştur. Bu durum, enzimin aktif bölgesindeki serin aminoasit içeriğinin düşük olduğunu göstermektedir (Aygan, 2008). Enzim aktivitesi 5 mM EDTA ile indüklenerek %105.2 aktivite elde edilirken, 10 mM EDTA ile bir miktar inhibisyon meydana gelmiş ve % 92.3 kalan aktivite elde edilmiştir. NA1 alkali amilaz enzimin aktivitesinde EDTA ile önemli derecede bir inhibisyonun gerçekleşmemesi enzimin metaloenzim karakterinde olmadığını göstermektedir.

NA1 alkali amilaz enzimi, 4 M'lık üre ile %36, 8 M'lık üre ile %87.7 oranında inhibe olmuştur. Ürenin enzimi inhibe etmesi, enzimin hidrofobik aminoasitlerden oluştuğunun bir göstergesidir (Samie ve ark, 2012).

NA1 alkali amilaz enzimi, %1 SDS ile muamele edildiğinde aktivitesinin %93.3'ünü korurken, %5'lik SDS enzim aktivitesinin %51'ini inhibe etmiştir. Enzimin SDS'ye önemli derecede dirençli olması deterjan formülasyonlarında kullanıma potansiyelinde olduğunu göstergesidir.

TritonX-100'ün %1 ve %5'lik konsantrasyonları enzim aktivitesini, sırasıyla, %103 ve %94.1 oranlarında indüklemiştir. %1 Tween 20 ve %1 Tween 80, sırasıyla, aktiviteyi %109 ve %105 oranında indüklemiştir. Her iki ajanın %5'lik konsantrasyonunda ortalama %90 kalan aktivite elde edilmiştir. Enzim aktivitesinin %1 Tween20 ve Tween80 ile indüklenmesi, enzimin deterjanlara karşı oldukça dayanıklı olduğunu ve özellikle deterjan endüstrisinde kullanılabilir özellikte olduğunu göstermektedir.

β -merkaptetanol'ün %1 konsantrasyonu, enzimin aktivitesini %106.1'ya yükseltirken, %5'lik konsantrasyonu aktiviteyi %95 inhibe etmiştir. NA1 alkali amilaz enzimi H_2O_2 'nin %1 konsantrasyonunda %60 oranında inhibe olurken, %5'lik konsantrasyonda tamamen inhibisyon gerçekleşmiştir.

Nithya ve ark (2016), *Bacillus licheniformis* KSU-6 suşundan izole ettikleri alkali amilaz enzimine çeşitli deterjanların etkilerini belirlemek amacıyla, 10 mM SDS, TritonX-100, Tween 20 ve Tween 80 ile 30 dakika inkübe etmişlerdir. Enzim SDS ile %91, TritonX-100 ile %88, Tween 20 ile %79 ve Tween 80 ile %85 oranlarında stabil kalmıştır.

Zhang ve ark (2016), termofilik *Anoxybacillus* sp. YIM 342 suşundan izole ettikleri termo-alkalin özellikteki amilaz enziminin aktivitesi üzerine çeşitli kationların (10 mM ZnCl₂, LiCl, CdCl₃, KCl, CaCl₂, FeCl₃, BaCl₂, NaCl, CuCl₂, AlCl₃, MnCl₂, MgCl₂, AgNO₃, Co(NO₃)₂, Pb(CH₃COO)₂, NiSO₄) ve bazı kimyasalların (5mM PMSF, EDTA, DTT, SDS) etkisini çalışmışlardır. Enzimi çeşitli kimyasallarla 80°C’de 30 dakika inkübasyona bıraktıktan sonra standart amilaz aktivitesi tayini yapmışlardır. Enzim, Cd⁺³, Pb⁺², Fe⁺³, Cu⁺², Al⁺³, Mn⁺², Co⁺³, Ag⁺, Mg⁺², Ni⁺² ve Ba⁺² ile, sırasıyla, %93, 84, 97, 97, 81, 72, 70, 73, 28, 16 ve 52 oranlarında inhibe olurken, Na⁺, K⁺ ve Li⁺ aktiviteyi etkilememiştir. YIM 342 amilaz enzimi, Na⁺ ile % 98, K⁺ ile %97 ve Li⁺ ile %101 oranlarında stabil kalmıştır. Enzim Ca⁺² ile indüklenmiş ve %112 aktivite değeri elde edilmiştir. Çoğu amilaz enzimi, yapısal bütünlük ve stabilite için Ca⁺² iyonuna bağımlıdır (Hiteshi ve ark, 2014). Enzim aktivitesi 5 mM EDTA ile %90 oranında inhibe olmuştur. EDTA inhibisyonu, amilaz aktivitesinin metal bağımlı olduğunu göstermektedir (Ramírez-Zavala ve ark, 2004). SDS’nin 5 mM konsantrasyonunda enzim aktivitesinde %78 oranında azalma gerçekleşmiş ve enzim denatüre olmuştur. Enzimin SDS’ye karşı hassas olması, proteinin kompakt bir yapıya sahip olmadığını ve bazı esnek bileşenlere sahip olduğunu göstermektedir (Amid ve ark, 2014). PMSF’nin %79 oranında enzim aktivitesini inhibe etmesi, Ser ve Cys rezidülerinin YIM 342 amilaz eniminin aktivitesi için gerekli olduğunu ve enzimin aktif bölgesinde yer aldığını göstermiştir (Ürek ve Pazarlıoğlu, 2004).

Song ve ark (2016), derin deniz bakterisi *Luteimonas abyssi* XH031T suşundan elde ettikleri alkalifilik α -amilaz enziminin (LaaA) aktivitesi üzerine metal

iyonlarının ve diğer kimyasalların etkisini araştırmak için Na^+ , K^+ , Fe^{+3} , Mn^{+2} , Ca^{+2} , Zn^{+2} , Ag^+ , Al^{+3} , Mg^{+2} , üre ve SDS'nin çeşitli konsantrasyonlarını kullanarak, pH 9.0 ve 50°C'de aktivite tayini yapmışlardır. Enzim aktivitesi 1 mM Na^+ , K^+ ve Mn^{+2} eklenmesiyle, sırasıyla, %121.5, 108.1 ve 117.2'ye yükselmiştir. Enzim aktivitesi 10 mM K^+ , 1 mM Fe^{+3} , 1 mM Al^{+3} ve üre ile belirgin bir şekilde inhibe olmamıştır. Enzim, 10 mM'dan yüksek Na^+ , 100 mM'dan yüksek K^+ , 10 mM'dan yüksek Mn^{+2} , 10 mM'dan yüksek Fe^{+3} , 10 mM'dan yüksek Al^{+3} , Zn^{+2} , Mg^{+2} , Ca^{+2} ve SDS ile önemli ölçüde inhibe olmuştur. Yapılan çalışmalara göre, metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerindeki etkisi enzimin yapısal özelliği ile ilgilidir. Bu nedenle, muhtemelen LaaA α -amilazda Na^+ , K^+ ve Mn^{+2} için benzer metal bağlama alanları vardır ve bu aktivite artışlarının ekstrem çevreye adaptasyonun bir sonucu olabileceği düşünülmektedir.

Wang ve ark (2016), *Bacillus* sp. WangLB suşundan izole ettikleri termo-alkali amilaz enziminin aktivitesi üzerine çeşitli metal iyonlarının (2 ve 5 mmol/L konsantrasyonlarda) ve kimyasalların etkisini belirlemişlerdir. Ca^{+2} eklendiğinde amilaz aktivitesinin etkilenmemesi, enziminin Ca^{+2} bağımlı olmadığını göstermiştir. Literatürlere göre, *Bacillus* sp.'den üretilen amilaz enzimlerinin çoğu Ca^{+2} bağımlı olup, Ca^{+2} eklenmesinin amilaz aktivitesini artırıcı yönde önemli etkileri olmaktadır (Abdel-Fattah ve ark, 2013; Burhan ve ark, 2003). Nişasta endüstrisinin en büyük sorunlarından biri, üretim işlemini engelleyebilecek kalsiyum oksalatın oluşumudur. Bu nedenle, son yıllarda kalsiyum-bağımsız amilaz talebindeki artış dikkat çekmektedir (Xie ve ark, 2014; Kikani ve Singh, 2011). Bu da, WangLB suşundan elde edilen amilazın nişasta endüstrisinde kullanım için büyük bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

Aygan ve ark (2014), *Bacillus subtilis* A10 suşundan saflaştırdıkları alfa amilaz enziminin aktivitesi üzerine metal iyonlarının, şelatörlerin, deterjanların ve inhibitörlerin etkisini test etmek amacıyla enzimi 30 dakika süreyle ön inkübasyona bırakmışlardır. Enzim, ZnCl_2 , üre, KCl, EDTA, CaCl_2 ve SDS varlığında inhibe

olmuş ve, sırasıyla, % 35.2, % 24.3, % 35, % 51.6, % 46.35 ve % 24.1 kalan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. β -merkaptotanol enzim aktivitesini etkilememiştir. EDTA inhibisyonu, enzimin metal iyonuna ihtiyaç duyduğunu göstermektedir.

Hauli ve ark (2013), *Anoxybacillus sp.* IB-A suşundan izole etikleri termo-alkalin amilaz enziminin aktivitesi üzerine çeşitli metal iyonlarının ve kimyasal maddelerin etkisine bakmışlardır. Bunun için enzimi, Mg^{+2} , Fe^{+2} , Pb^{+2} , Co^{+2} , Cr^{+2} , Ca^{+2} , Ni^{+2} , K^+ , Na^+ , Zn^{+2} , Cu^{+2} , Li^{+2} , Ag^{+2} , Hg^{+2} , Mo^{+2} , Cd^{+2} , Mn^{+2} gibi metal iyonlarının 10 mM'lık solüsyonlarıyla ve EDTA, β -merkaptotanol, SDS, TritonX-100 ve Tween 20 gibi kimyasallarla 1 saat süreyle 60°C'de ön inkübasyona bırakmışlardır. Mo^{+2} , K^+ , Mn^{+2} , Cu^{+2} , Hg^{+2} , Pb^{+2} ve Co^{+2} , enzim aktivitesini, sırasıyla, %113.4, 115.2, 108.9, 110.2, 109.9, 104.39 ve 106 oranlarında arttırmıştır. Enzim aktivitesinde, EDTA (%112.81), SDS (%110.39), TritonX100 (%121.68) ile β -merkaptotanol (%135.30) ile önemli oranda artış meydana gelmiştir. Tween 20, enzim aktivitesini çok az miktarda inhibe etmiştir (%98.74). Bu sonuçlar, enzimin şelatör ve SDS'ye dirençli bir amilaz olduğunu göstermekle birlikte, bir metaloenzim olmadığını da kanıtlamaktadır (Gupta ve ark, 2003). Enzim Ni^{+2} ve Zn^{+2} ile, sırasıyla, %89 ve %99 stabil kalmıştır. Mg^{+2} , Fe^{+2} , Cr^{+2} , Ag^{+2} , Ca^+ , Li^{+2} , Cd^{+2} , Na^+ ve K^+ ise enzim aktivitesinde, sırasıyla, % 101.07, 105.28, 101.18, 109, 101.61, 106.47, 108.87, 105.37 ve 115.23 oranlarında kısmi artışlara neden olmuştur.

Chakraborty ve ark (2011), çeşitli metal iyonları (5 mM ve 10 mM), çeşitli kimyasal ve şelatlayıcı maddelerin *Saccharopolyspora sp.* A9 suşundan elde ettikleri α -amilaz enziminin aktivitesi üzerine etkisini araştırmışlardır. Enzim kimyasallar ile 30 dakika 55°C'de ön inkübasyona bırakılmıştır ve 60 dakika optimum sıcaklıkta standart amilaz aktivitesi tayini yapılmıştır. Amilaz aktivitesi, 5 mM Ca^{+2} ile %125'e, 10 mM Ca^{+2} varlığında ise %142'ye yükselmiştir. Ca^{+2} iyonunun, amilaz üretiminde ve aktivitesinde önemli bir role sahip olduğu görülmüştür. Mg^{+2} (5 mM

%109.87, 10 mM %117.61), Mn^{+2} (5 mM %110, 10 mM %126), Co^{+2} (5 mM %104.5, 10 mM %110.21), Cu^{+2} (5 mM %108.79, 10 mM %117.47) gibi divalent katyonların da enzim aktivitesini güçlendirdiği tespit edilmiştir. Ancak amilaz aktivitesi Hg^{+2} (5 mM %64.23, 10 mM %46.78), Zn^{+2} ve Fe^{+3} (5 mM %56.67, 10 mM %42.12) iyonlarıyla inhibe olmuştur. K^{+} iyonunun amilaz aktivitesi üzerinde hiçbir etkisi olmamıştır (5 mM K^{+} %100, 10 mM K^{+} %99.96). 8 mM üre, enzim aktivitesini %9.45'e, 5 mM EDTA ise %2.13'e düşürmüştür.

Geobacillus lituanicus NA2 suşundan izole edilen termo-asidik özellikteki amilaz enzimi, çeşitli inhibitör, şelatör, metal iyonu, deterjan ve okside edici ajanların iki farklı konsantrasyonunda ön inkübasyona tabi tutulmuştur (Çizelge 4.11).

$CaCl_2$ 'nin her iki konsantrasyonu da NA2 amilaz enziminin aktivitesini çok etkilememekle birlikte, 5 mM ve 10 mM $CaCl_2$ konsantrasyonlarında, sırasıyla, % 84 ve 88.1 kalan aktivite değerleri elde edilmiştir. $CaCl_2$ konsantrasyonu 2 kat artırıldığında enzimin kalan aktivitesinde bir miktar artış görülmesi enzimin kısmen kalsiyum bağımlı olduğunu düşündürmektedir.

$MgCl_2$, $CuCl_2$, $ZnCl_2$, $BaCl_2$, $CoCl_2$ ve $HgCl_2$ 'ün hem 5 mM hem de 10 mM konsantrasyonunda enzimin aktivitesi oldukça yüksek oranlarda korunmuştur. NA2 asidik amilaz enzimi, $ZnCl_2$ ile reaksiyona girdiğinde 5 mM $ZnCl_2$ ile aktivitesinin %90'ını ve 10 mM ile aktivitesinin % 86.3'ünü korumuştur. $MnCl_2$ enzim aktivitesini artırıcı yönde etki göstermiştir ve 5 mM $MnCl_2$ ile muamele sonucunda %147 ve 10 mM ile %124 aktivite değeri elde edilmiştir.

Enzim, 5 mM ve 10 mM PMSF ile muamele edildiğinde, aktivitenin %82 ve %84.4 korunduğu saptanmıştır. Enzimin PMSF'den etkilenmemesi aktif bölgesinde serin aminoasit içeriğinin düşük olduğunu göstermektedir. Enzim 5 ve 10 mM EDTA ile aktivitesini, sırasıyla, %75 ve 85 oranında aktivitesini korumuştur. NA2 asido-termofilik amilaz enziminin EDTA ile inhibe olmaması enzimin aktif merkezinde metal iyonu bulunmadığını göstermektedir.

Çizelge 4.12. NA2 Asidik Amilazın Aktivitesi Üzerine Çeşitli Kimyasalların Etkisi

Kimyasallar	I. konsantrasyonlar	Kalan Aktivite (%)	II. konsantrasyonlar	Kalan Aktivite (%)
Kontrol	-	100	-	100
CaCl ₂	5 mM	84	10 mM	88.1
MgCl ₂	5 mM	92	10 mM	91.3
CuCl ₂	5 mM	119	10 mM	88.1
ZnCl ₂	5 mM	90	10 mM	86.3
BaCl ₂	5 mM	91.1	10 mM	83
MnCl ₂	5 mM	147	10 mM	124
CoCl ₂	5 mM	106.2	10 mM	98.1
HgCl ₂	5 mM	120	10 mM	109
PMSF	5 mM	82	10 mM	84.4
EDTA	5 mM	75	10 mM	85
Üre	4 M	52	8 M	22
SDS	% 1	82.4	% 5	83.1
TritonX-100	% 1	80.2	% 5	88
Tween 20	% 1	89.3	% 5	89.4
Tween 80	% 1	94.2	% 5	94.4
β-merkapt- etanol	% 1	121.2	% 5	3
H ₂ O ₂	% 1	18	% 5	0

Deterjan türevli SDS, TritonX-100, Tween 20 ve Tween 80'in %1 ve %5 konsantrasyonlarıyla muamele sonucunda enzim aktivitesi, sırasıyla, %82.4 ve 83.1, %80.2 ve 88, %89.3 ve 89.4, %94.2 ve 94.4 oranlarında korunmuştur. Bu sonuçlar, NA2 asidik amilaz enziminin deterjanlara oldukça dayanıklı olduğu göstermektedir.

Enzim %1'lik β-merkaptetanol ile aktive olmuş ve aktivitede %21.2 oranında artış meydana gelmiştir. Bu durum, enzimin aktif bölgesinde dimerik formda sistin aminoasiti bulunduğunu göstermektedir (Singh ve ark, 2012). Bununla

birlikte, %5 β -merkaptoetanol aktivite üzerinde yüksek düzeyde inhibisyon etkisi göstermiştir. H_2O_2 'nin hem %1 (%18) hem de %5'lik (%0) konsantrasyonu NA2 amilaz önemli düzeyde inhibe etmiştir. Bu sonuç, enzimin okside edici ve ağartıcı bileşiklere karşı dirençsiz olduğunu göstermektedir.

Emtanani ve ark (2015), *Bacillus subtilis* DR8806 suşundan izole ettikleri asidik ve termofilik özellikteki (pH 5.0 ve 70°C) α -amilaz enziminin aktivitesi üzerine metal iyonları, enzim inhibitörleri ve denatüre edici ajanların etkisini belirlemişlerdir. Enzim her kimyasal ile 30 dakika süreyle ön inkübasyona bırakılmış ve standart enzim aktivitesi tayini yapılmıştır. Metal iyonlarıyla test edildiğinde, 5 mM Na^+ , K^+ ve Ca^{+2} iyonları varlığında α -amilaz aktivitesi, sırasıyla, %120, 113 ve 116'ya yükselmiştir. 1 mM Ba^{+2} iyonu ile enzim %81 kalan aktivite gösterirken, 5 mM konsantrasyonda enzim aktivitesi %112 olarak ölçülmüştür. Ancak, enzim aktivitesi Zn^{+2} , Cu^{+2} , Pb^{+2} , Hg^{+2} ve Mn^{+2} varlığında güçlü bir şekilde inhibe olmuştur. Enzim, Co^{+2} ve Mg^{+2} iyonlarıyla bir miktar inhibe olarak, 1 mM ve 5 mM konsantrasyonlarda, sırasıyla, %73 ve 38, %44 ve 22 aktivite göstermiştir. Amilaz enzimi, Fe^{+2} 'nin 1 mM ve 5 mM konsantrasyonlarında %29 ve 26 stabil kalmıştır. β -merkaptoetanolün 1 mM konsantrasyonunda %61 ve 5 mM konsantrasyonunda %59 oranında kalan aktiviteye sahip olan amilaz enzimi, 5 mM üre ile aktivitesinin %98'ini korumuştur. Amy8806 amilaz enzimi, anyonik surfaktan olan SDS'nin %10 ve %20 konsantrasyonunda aktivitesini %85 ve 70 oranında korumuştur. Enzimin SDS'den yüksek oranda etkilenmemesi özellikle deterjan formülasyonunda kullanılabilirliği açısından çok önemlidir. Enzim %20 TritonX-100 varlığında büyük miktarda inhibe olmuştur (%88). 5 mM EDTA varlığında başlangıç aktivitesinin %80'ini koruması, enzimin aktivitesi için metal iyonlarının gerekli olduğunu göstermektedir.

Ozturk ve ark (2013), *Bacillus subtilis* A28 suşunun ürettiği asidik ve termofilik amilaz enzimini izole etmişler ve çeşitli metal iyonlarının, deterjanların, şelatörlerin ve sürfaktanların enzim aktivitesi ve stabilitesi üzerine etkisini

belirlemişlerdir. Bunun için 10 mM konsantrasyondaki metal iyonlarından FeCl_2 , FeCl_3 , LiCl_2 , ZnCl_2 , NiCl_2 , CoCl_2 , ZnSO_4 , BaCl_2 , CuCl_2 , FeSO_4 , NaCl , KCl , MnCl_2 , MgCl_2 , CaCl_2 , farklı konsantrasyonlarda EDTA, 10 mM PMSF ve 2-merkaptotanol ile %1 ya da %0.1 TritonX-100, Tween 20, Tween 80 ve SDS kullanmışlardır. Amilaz aktivitesi, Fe^{+2} , Fe^{+3} , Cu^{+2} ve Zn^{+2} iyonlarıyla tamamen inhibe olmuştur. Co^{+2} , Ni^{+2} ve Mn^{+2} iyonları enzimi, sırasıyla, %64, 55 ve 23 oranlarında inhibe etmiştir. Enzim Ca^{+2} ile %97, Na^+ ile %102, Mg^{+2} ile %102, Li^+ ile %108 ve Ba^{+2} ile %95 stabil kalmıştır. Enzim aktivitesi KCl eklenmesiyle %15 oranında artış göstermiştir. amy28 α -amilaz aktivitesi, %1 ve %0.1 SDS ile tamamen inhibe olmuştur. PMSF ve EDTA (10 mM), enzim aktivitesini %35 ve %26 oranlarında inhibe etmiştir. TritonX-100 (%0.1 ve %1) enzim aktivitesini, sırasıyla, %10 ve %12 oranlarında inhibe etmiştir. %0.1 ve %1 konsantrasyonlardaki Tween 20 ve Tween 80 enzim aktivitesini, sırasıyla, %16 ve %18, %5 ve %13 inhibe etmiştir.

Sharma ve Satyanarayana (2013), *Bacillus acidicola*'dan izole ettikleri, asit-stabil ve termofilik α -amilaz enziminin aktivitesi üzerine 1 ve 5 mM konsantrasyonlarda hazırlanmış, Ca^{+2} , Co^{+2} , Ba^{+2} , Hg^{+2} , Mn^{+2} , Mg^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} iyonlarının, β -merkaptotanol ve (PMSF) gibi inhibitörlerin ve EDTA'nın etkilerini araştırmışlardır. Co^{+2} enzim aktivitesini güçlü bir şekilde arttırırken, Ca^{+2} iyonu herhangi bir etki göstermemiştir. Co^{+2} 'nin 1 mM'lık konsantrasyonu enzim aktivitesini %250 oranında arttırırken. 5 mM konsantrasyonda %230 aktivite artışı elde edilmiştir. Ca^{+2} 'un aktivitede değişikliğe yol açmaması enzimin bağımsız olduğunu göstermektedir. Nişasta endüstrisinde Ca^{+2} bağımlı olmayan α -amilazlar tercih edilmektedir. Ca^{+2} , glukoz izomerazı inhibe etmekte ve böylece ileriki aşamalarda üründen Ca^{+2} giderimi gerekli hale gelmektedir (Antranikian, 1992). Mg^{+2} 'un 1 mM konsantrasyonu aktivitede değişikliğe yol açmazken, 5 mM konsantrasyonu aktiviteyi %126'ya yükseltmiştir. Ba^{+2} ve Zn^{+2} 1 mM konsantrasyonda aktiviteyi %10 oranında inhibe ederken, 5 mM konsantrasyonda, sırasıyla, %86 ve 76 kalan aktivite saptanmıştır. Mn^{+2} ve Hg^{+2} enzimi güçlü bir

şekilde inhibe etmiştir. 1 mM Mn^{+2} aktiviteyi %25'e düşürürken, 5 mM Mn^{+2} enzimi tamamen inhibe etmiştir. Enzimin Hg^{+2} ile %100 inhibisyonu, enzim molekülünde karboksil gruplarının bulunduğunu göstermektedir (Dey ve ark, 2002). Ayrıca, Hg^{+2} 'nin indol halkasını oksitlediği ve triptofanda bulunan aromatik halka ile etkileşime girdiği bilinmektedir (Kumar ve Satyanarayana, 2011; Liu ve ark, 2010). Tween 20 ve Tween 80 deterjanlarının konsantrasyonu arttıkça enzim aktivitesi artarken, SDS ve TritonX-100 hafif inhibitörük etki göstermişlerdir. %0.1 Tween 20 ile %100 aktiviteye sahip olan enzimin aktivitesi %0.2'lik Tween 20 ile %116'ya yükselmiştir. Aynı şekilde, enzimin aktivitesi %0.2 Tween 80'de %102'ye yükselmiştir. SDS ve TritonX-100'ün %0.1'lik konsantrasyonlarında aktivitesinin tamamını koruyan amilaz enziminin, %0.2'lik konsantrasyonlardaki aktivitesi, sırasıyla, %90 ve 95.5 oranında düşmüştür. 1 mM EDTA ile aktivitenin %85'i korunmuştur ve enzim aktivitesinde 5 mM EDTA ile %40 inhibisyon gerçekleşmiştir. 1 mM PMSF ile enzim aktivitesinin %75 korunduğu, 5 mM PMSF ile tamamen inhibe olduğu bulunmuştur. β -merkaptetanolün 1 mM konsantrasyonda enzimi %7 inhibe ederken, 5 mM'da %15 inhibisyon gerçekleşmiştir.

Birçok çalışmada Zn^{+2} 'nin amilazlar üzerindeki çeşitli etkileri rapor edilmiştir. Zn^{+2} , termostabil amilazlar için iyi bilinen bir inhibitör olup, Zn^{+2} ile inhibisyon enzimin termostabil karakterde olduğunu göstermektedir (Dheeran ve ark, 2010; Arıkan, 2008). Enzimin Co^{+2} , Cu^{+2} , Fe^{+2} , Fe^{+3} ve Ni^{+2} iyonlarıyla inhibisyonu iki farklı mekanizmayla açıklanabilmektedir. Bunlardan ilki, ekzojen katyonlar ve proteinlerle ilişkili katyonlar arasındaki rekabetin metaloenzim aktivitesini azalttığını öne sürmektedir. Diğer ise, bazı metal iyonlarının direkt inhibitörük etkisini vurgulamaktadır. Ancak ikinci durumda inhibitörük etki, enzimatik aktiviteye ya da konformasyonel değişimlerden kaynaklanan substrat bağlanmasına katkı sağlayan metal iyonlarıyla amino asitler arasındaki etkileşime bağlıdır (Chai ve ark, 2012b; Lin ve ark, 1998).

EDTA ile enzimin inhibe olması, enzimin aktivite göstermek için divalent katyonlara gereksinim duyduğunun göstergesidir. PMSF, serin amino asidi ile reaksiyona giren ve bu özelliği ile enzimi inhibe eden iyi bilinen bir proteaz inhibitörüdür. β -merkaptotanol ile enzimin inhibe olmaması, enzimde yeterince disülfid bağı bulunmadığının göstergesidir.

Geobacillus lituanicus NA2 suşundan elde edilen asidik amilaz, Ca^{+2} bağımsız, termostabil ve asidik, serin amino asitlerince zengin olmayan içeriğe sahip, metaloenzim özelliği zayıf, hidrofobik aminoasitlerden oluşan, yapısında disülfid bağı taşımayan, tiyol grupları bulunduran, deterjanlara dirençli, aktivitesi için kısmen metal iyonlarına gerek duyan, deterjan ve nişasta endüstrisi için uygun bir enzimdir.

Geobacillus thermoleovorans NP1 suşundan izole edilen termo-asidik özellikteki pullulanaz enzimi, çeşitli inhibitör, şelatör, metal iyonu, deterjan ve okside edici ajanların iki farklı konsantrasyonunda ön inkübasyona bırakılmıştır (Çizelge 4.12).

CaCl_2 'ün 5 mM konsantrasyonunda enzim aktivitesinin %96.4'ünün korunduğu, 10 mM konsantrasyondaki ise enzimin %100 stabil olduğu bulunmuştur. Bu sonuca göre, NP1 amilaz enzimi Ca^{+2} bağımlı bir enzim olmayıp, nişasta endüstrisi için α -1,6 glukozit bağlarını hidrolize etme yeteneği nedeniyle glukaoamilaz enzimine alternatif olma özelliğindedir.

5 mM MgCl_2 ve BaCl_2 ile enzim aktivitesinin %94 korunduğu, 10 mM'lık konsantrasyondaki her iki iyonla da aktivitenin indüklenerek %104'e yükseldiği bulunmuştur. ZnCl_2 'ün 5 mM ve 10 mM konsantrasyonlarında enzim aktivitesi %104 ve 106 olarak ölçülmüştür. MnCl_2 ve CoCl_2 'ün her iki konsantrasyonu da enzim aktivitesini arttırmıştır. Bu iki metal iyonunun 5 mM konsantrasyonlarında, aktivite değeri, sırasıyla, %142.2 ve 146, 10 mM'lık konsantrasyonlarında, sırasıyla, %124.1 ve 130'dur. CuCl_2 ün her iki konsantrasyonu da enzim aktivitesini bir miktar arttırmıştır. NP1 asidik pullulanaz aktivitesi 5 mM Cu^{+2} ile %110, 10 mM Cu^{+2} ile

%115'tir. 5 mM HgCl₂ ile pullulanaz aktivitesinde farklılık olmazken (102.4), 10 mM'lık konsantrasyonda enzim %22 oranında inhibe olmuştur.

Çizelge 4.13. NP1 Asidik Pullulanazın Aktivitesi Üzerine Çeşitli Kimyasalların Etkisi

Kimyasallar	I. konsantrasyonlar	Kalan Aktivite (%)	II. konsantrasyonlar	Kalan Aktivite (%)
Kontrol	-	100	-	100
CaCl ₂	5 mM	96.4	10 mM	100
MgCl ₂	5 mM	94	10 mM	104
CuCl ₂	5 mM	110	10 mM	115
ZnCl ₂	5 mM	104	10 mM	106
BaCl ₂	5 mM	94	10 mM	104
MnCl ₂	5 mM	142.2	10 mM	146
CoCl ₂	5 mM	124.1	10 mM	130
HgCl ₂	5 mM	102.4	10 mM	78
PMSF	5 mM	100	10 mM	103
EDTA	5 mM	92	10 mM	101.3
Üre	4 M	53	8 M	25.3
SDS	% 1	51	% 5	86.3
TritonX-100	% 1	89.2	% 5	109
Tween 20	% 1	102.4	% 5	109
Tween 80	% 1	102.4	% 5	104
β-merkapt- etanol	% 1	145	% 5	6.3
H ₂ O ₂	% 1	19.3	% 5	1

PMSF'nin her iki konsantrasyonunda da NP1 asidik pullulanazın başlangıç aktivitesi korunmuştur. Bu durum, enzimin aktif bölgesindeki serin aminoasit içeriğinin düşük olduğunu göstermektedir (Aygan, 2008). 5 mM EDTA ile enzim aktivitesi %92, 10 mM EDTA ile % 101.3'dir. Pullulanaz enziminin aktivitesinde, EDTA ile önemli derecede bir inhibisyonun gerçekleşmediğinden, enzimin bir metaloenzim olmadığı düşünülmektedir. NP1 asidik pullulanaz 4 M'lık üre ile %53 oranında aktivite gösterirken, 8 M konsantrasyondaki üre ile başlangıç aktivitesinin %25.3'ünü korumuştur. Ürenin her iki konsantrasyonuyla muamele sonucunda enzim inhibisyonunun gerçekleşmesi, enzimin hidrofobik aminoasitlerce zengin bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir (Samie ve ark, 2012).

NP1 asidik pullulanaz %1 SDS ile muamele edildiğinde aktivitesinin %51'ini korurken, %5 SDS ile muamele sonucu kalan aktivite %86.3'tür. TritonX-100'ün %1 ve %5'lik konsantrasyonları ile gerçekleşen reaksiyon sonucundaki enzim aktivitesi, sırasıyla, %89.2 ve 109'dur. Tween 20 ve Tween 80'in %1 ve %5'lik konsantrasyonları enzim aktivitesini etkilememiş ve aktivite düşük düzeyde de olsa indüklenmiştir. Enzimin deterjan türevli bu ajanlarla denatüre olmaması, deterjanlara karşı oldukça dayanıklı olduğunu ve özellikle deterjan endüstrisinde kullanılabilir özellikte olduğunu göstermektedir.

Enzimin aktivitesi %1 β -merkaptöetanol ile %145 iken, %5 β -merkaptöetanol konsantrasyonu enzimi %93.7 oranında inhibe etmiştir. H_2O_2 'nin %1'lik konsantrasyonu enzimi %80.7 oranında inhibe ederken, %5'lik konsantrasyonu enzimin tamamını güçlü bir şekilde inhibe etmiştir. Bu sonuç enzimin okside edici ajanlara karşı dayanıksız olduğunu göstermektedir.

Kahar ve ark (2016), *Anoxybacillus* sp. SK3-4 suşundan izole ettikleri asidik ve termofilik özellikteki (pH 6.0 ve 60°C) tip I pullulanaz enziminin aktivitesi üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki metal iyonlarının, enzim inhibitörlerinin ve denatüre edici kimyasalların etkisini belirlemişlerdir. SK3-4 pullulanaz enzimi, $MgCl_2$ 'ün 2 mM'lık konsantrasyonunda %122.53 ve 5 mM'lık konsantrasyonunda

%121.16 oranında aktivite göstermiştir. 2 mM BaCl₂ ile %54.33, 5 mM BaCl₂ ile %24.24 kalan aktivite değerine sahip olan enzim, 2 mM MnCl₂ ile yaklaşık %60 oranında inhibe olurken, 5 mM MnCl₂ ile enzimin başlangıç aktivitesinin %24.95'i korunmuştur. Hem 2 mM hem de 5 mM ZnCl₂ ile oldukça yüksek oranda (yaklaşık inhibisyon oranları %78 ve %86) inhibe olan SK3-4 pullulanaz enziminin, CoCl₂ ve CuCl₂ ile muamele edildiğinde orijinal aktivitesinin neredeyse tamamını kaybettiği gözlemlenmiştir. Enzimin 2 mM EDTA ile %68.36, 2 mM SDS ile %53.08 ve 2 mM üre ile %57.1 oranında kalan aktivite değerleri ölçülmüştür. 2 mM β-merkaptotanol ile inkübasyona bırakılan enzimin başlangıç aktivitesinde artış görülmüştür (%142.9). %1'lik konsantrasyonlarda hazırlanmış deterjan türevli Tween 20, Tween 80 ve TritonX-100 ile reaksiyona bırakılan enzim aktivitesini, sırasıyla, %142.9, 113.67 ve 71.58 oranlarında korumuştur.

Singh ve ark (2010), *Aureobasidium pullulans* FB-1 suşundan elde ettikleri termofilik ve asidik pullulanaz enziminin aktivitesi üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki (2-10 mM) metal iyonları (Zn⁺², Ca⁺², Cu⁺², Ba⁺², Mg⁺², Mn⁺², Co⁺², Hg⁺², K⁺) ve EDTA'nın, %0.025-0.10 aralığındaki farklı konsantrasyonlardaki SDS, Tween 80 ve TritonX-100 gibi çeşitli surfaktanların etkisini araştırmışlardır. Pullulanaz aktivitesindeki maksimum artışın, Ca⁺² (2.1 kat) ve Mn⁺² (1.84 kat) ile olduğunu saptamışlardır. Bu sonuçlara göre, enzimin daha iyi katalitik aktivite göstermek için bu iyonlara ihtiyaç duyduğunu belirtmişlerdir. Cu⁺² ve Hg⁺²'nin 4 mM'lık konsantrasyonu FB-1 pullulanaz enziminin inaktivasyonuna sebep olurken, Ni⁺²'nin 1 mM konsantrasyonu enzim aktivitesini tamamen inhibe etmiştir. Diğer metal iyonlarının düşük konsantrasyonlarıyla muamele edilen enzimin aktivitesinde önemli bir azalma gözlemlenmemiştir. EDTA'nın, FB-1 pullulanaz enzimini inhibe etmemiş olmasının, EDTA'nın pullulanaz aktivitesi için gerekli olan divalent katyonları şelatlamadığının göstergesi olarak belirtilmiştir. SDS, Tween 80, TritonX-100 surfaktanlarının hiçbir konsantrasyonu (%0.025–0.10) enzim

aktivitesini arttırmamıştır. NP1 asidik pullulanazın aktivite sonuçları literatürdekilerle benzerlik göstermektedir.

Rüdiger ve ark (1995), hipertermofilik *Pyrococcus woesei* suşundan elde ettikleri termostabil pullulanaz enziminin aktivitesi üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki metal iyonlarının, enzim inhibitörlerinin ve denatüre edici kimyasalların etkisini araştırmışlardır. Enzim 1, 3 ve 5 mM konsantrasyonlardaki CaCl_2 ile muamele edildiğindeki aktivitesi, sırasıyla, %363, 370 ve 360 oranlarına yükselmiştir. ZnCl_2 ve CuCl_2 enzim aktivitesi üzerinde güçlü bir inhibisyona sebep olmuştur. Enzim 1, 3 ve 5 mM MgCl_2 ile reaksiyona bırakıldığında, sırasıyla, %128, 103 ve 99 oranlarında aktivite göstermiştir. Aynı konsantrasyonlardaki MnCl_2 ile muamele edilen enzimin, sırasıyla, %126, 106 ve 99 oranlarında aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Pullulanaz enzimi 1, 3 ve 5 mM CoCl_2 ile muamele edildiği zaman, sırasıyla, %135, 105 ve 94 oranlarında aktivite göstermiştir. Saflaştırılan pullulanaz enzimi 1 mM SDS'de aktivitesinin tamamını korumuş, 5 mM SDS ile %87 inhibe olmuştur. Enzim 3 ve 6 M üre ile etkileşime bırakıldığında aktivitesi, sırasıyla, %100 ve 50 olarak hesaplanmıştır. Pullulanaz enzimi 10 mM β -merkaptotanol ile %170, 30 mM β -merkaptotanol ile %145 oranında aktivite göstermiştir ve %1 TritonX-100 ile muamele edildiğinde aktivitesinin orijinal değere göre iki kat arttığı görülmüştür.

NP1 asidik pullulanaz enzimi termostabilitesi zayıf, serin aminoasit içeriği düşük, metaloenzim özelliği göstermeyen, okside edici ajanlardan etkilenen, hidrofobik amino asit içeriği zengin, deterjanlara önemli ölçüde dirençlilik gösteren özellikte bir enzimdir.

Anoxybacillus rupiensis NP2 suşundan izole edilen termo-alkali özellikteki pullulanaz enzimi çeşitli inhibitör, şelatör, metal iyonu, deterjan ve okside edici ajanların iki farklı konsantrasyonunu ile muameşe edilmiştir (Çizelge 4.13).

Çizelge 4.14. NP2 Alkali Pullulanazın Aktivitesi Üzerine Çeşitli Kimyasalların Etkisi

Kimyasallar	I. konsantrasyonlar	Kalan Aktivite (%)	II. konsantrasyonlar	Kalan Aktivite (%)
Kontrol	-	100	-	100
CaCl ₂	5 mM	176	10 mM	100.7
MgCl ₂	5 mM	172	10 mM	91
CuCl ₂	5 mM	141.2	10 mM	75
ZnCl ₂	5 mM	148	10 mM	78
BaCl ₂	5 mM	153.2	10 mM	86.4
MnCl ₂	5 mM	220	10 mM	93.2
CoCl ₂	5 mM	162	10 mM	61.4
HgCl ₂	5 mM	170	10 mM	27.3
PMSF	5 mM	170	10 mM	96.4
EDTA	5 mM	193	10 mM	84.1
Üre	4 M	80	8 M	18.2
SDS	% 1	83.1	% 5	63
TritonX-100	% 1	185.2	% 5	111.4
Tween 20	% 1	182	% 5	91
Tween 80	% 1	172	% 5	87.3
β-merkapt- etanol	% 1	240	% 5	30
H ₂ O ₂	% 1	104	% 5	41

NP2 alkali pullulanaz enzimi, 5 mM CaCl₂ konsantrasyonu ile muamele edildiğinde %176 oranında aktivite göstermiştir. Bu sonuca göre, enzim Ca⁺² bağımlı bir enzimdir. Buna karşılık 10 mM CaCl₂ konsantrasyonda başlangıç aktivitesinin tamamını korunmuştur. NP2 alkali pullulanaz, 5 mM ZnCl₂ ile %148 aktivite gösterirken, 10 mM konsantrasyonda aktivite %78 düzeyine düşmüştür. Bu değerler dikkate alındığında NP2 alkali pullulanazın termofilik karakterde bir enzim olduğu

görülmektedir (Ozturk ve ark, 2013; Aygan, 2008). Enzim aktivitesi 5 mM konsantrasyondaki Mn^{+2} ile %220, Mg^{+2} ile %172, Co^{+2} ile %162, Hg^{+2} ile %170, Ba^{+2} ile %153 ve Cu^{+2} ile %141'dir. Buna karşılık 10 mM Mg^{+2} , Cu^{+2} , Ba^{+2} , Mn^{+2} ve Co^{+2} konsantrasyonlarındaki aktivite, sırasıyla, %91, 75, 86.4, 93.2 ve 61.4 oranında korunmuştur. Enzim 10 mM $HgCl_2$ ile muamele edildiğinde başlangıç aktivitesinin sadece %27.3'ü oranında stabil kalmıştır.

Enzim, 5 mM PMSF ile %170 oranında aktivite gösterirken, 10 mM PMSF ile muamele edildiğinde başlangıç aktivitesinin %96.4'ünü koruduğu tespit edilmiştir. Enzimin PMSF ile inhibe olmaması, aktif bölgesindeki serin aminoasit içeriğinin düşük olduğunu göstermektedir.

NP2 alkali pullulanaz, 5 mM EDTA ile %193 oranında yüksek bir aktivite sergilerken, 10 mM EDTA ile başlangıç aktivitesini %84.1 oranında korumuştur. NP2 alkali pullulanazın EDTA ile inhibe olmaması, enzimin bir metaloenzim olmadığını göstermektedir.

Enzim aktivitesi, deterjan özelliğindeki SDS, TritonX-100, Tween 20 ve Tween 80 kimyasallarının %1'lik ve %5'lik konsantrasyonlarında, sırasıyla, %83.1 ve 63, %185.2 ve 111.4, %182 ve 91, %172 ve 87.3 oranlarındadır. Bu sonuçlar, NP2 alkali pullulanaz enziminin deterjan ve yüzey aktif ajanlara karşı oldukça dayanıklı olduğunu göstermektedir.

Enzim, β -merkaptöetanolün %1'lik konsantrasyonu ile %240 oranında oldukça yüksek bir aktivite değeri göstermiştir. Bu durum, enzimin aktif bölgesinde fazla miktarda sistin dimerik aminoasitlerinin bulunduğunu göstermektedir (Singh ve ark, 2012). Bununla birlikte, %5 β -merkaptöetanol enzimin başlangıç aktivitesini %70 inhibe etmiştir. Enzim aktivitesi %1 H_2O_2 ile %104 değerine ulaşırken, %5'lik konsantrasyonda orijinal aktivitenin %59'u inhibe olmuştur. Enzimin H_2O_2 'e karşı çok yüksek düzeyde dirençliliği bulunmaktadır.

Lee ve ark (2016), *Hermetia illucens* (Siyah Asker Böceği) larvasının bağırsak mikroflorasından elde ettikleri alkali pullulanaz enzimini (PulSS4), çeşitli metal

iyonları, deterjanlar ve diğer kimyasalların varlığında 60 dakika süreyle ön inkübasyona bırakılmışlardır. Tween 20, Tween 80 ve TritonX-100 gibi iyonik olmayan deterjanların %1'lik konsantrasyonunda enzim aktivitesinde çok az miktarda azalma görülürken, %10'luk konsantrasyonlarda enzimin %70 oranında stabil kaldığı belirlenmiştir. Enzim %1 SDS'de orijinal aktivitesini %15 koruduğu, buna karşılık %3 ve üzeri konsantrasyonlarda aktivitenin tamamen kaybolduğu bildirilmiştir. Enzim, Mg^{+2} , Cu^{+2} ve Ca^{+2} gibi divalent katyonlarla, sırasıyla, %99.1, 86.3 ve 103 oranlarında aktivite gösterirken, Mn^{+2} , Zn^{+2} , Co^{+2} , Hg^{+2} , Ni^{+2} ve Cd^{+2} ile aktivitesini kaybetmiştir. Enzim aktivitesi 1 mM EDTA ile tamamen yok olmuştur. Enzimin, 1 M üre ile başlangıç aktivitesinin %64.4'ünü, 3 M üre ile aktivitesinin %15'ini koruduğu görülmüştür. PulSS4 enziminin 10 mM β -merkaptoetanol ile aktivitesinde %116.4 artış gerçekleştiği bulunmuştur.

Asha ve ark (2013), toprak örneğinden elde ettikleri *Bacillus halodurans* bakterisine ait alkali pullulanaz enziminin aktivitesi üzerine çeşitli metal iyonlarının (10 mM Cu^{+2} , Ca^{+2} , Mg^{+2} , Zn^{+2} ve Mn^{+2}) ve bazı kimyasalların (EDTA, PMSF) etkilerini saptamışlardır (ön inkübasyon 10 dakika). Pullulanaz aktivitesi Zn^{+2} ve Cu^{+2} iyonlarıyla inhibe olmuştur. Mg^{+2} ve Mn^{+2} ile enzimin başlangıç aktivitesinin neredeyse tamamına yakını korunmuş, Ca^{+2} 'un enzimin aktivitesini artırdığı bulunmuştur. Pullulanaz enziminin güçlü bir metal şelatlayıcı olan EDTA ile inhibe olmaması enzimin metaloenzim karakterinde olmadığını göstermektedir. Aynı zamanda, pullulanaz enziminin PMSF ile aktivitesinin %80'inden fazlasını koruması, enzimin aktif bölgesinde histidin ve serin rezidülerinin bulunmadığı şeklinde değerlendirilmiştir.

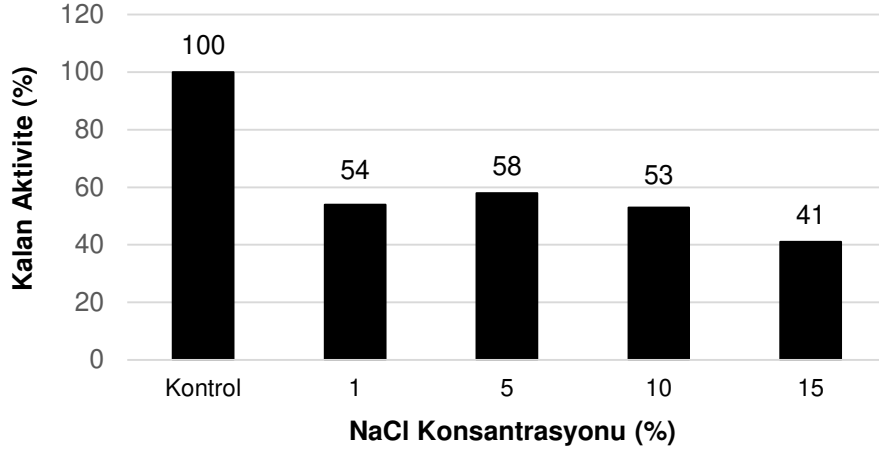
Lee ve ark (2000), *Bacillus circulans* S-1 suşundan elde ettikleri pullulan 6-glukanohidrolaz enziminin aktivitesi üzerine 1 mM konsantrasyondaki metal iyonları ($CaCl_2$, $CoCl_2$, $MgCl_2$, $ZnCl_2$, $CuCl_2$ ve $MnCl_2$) ve EDTA'nın 24 saatlik etkisini belirlemek amacıyla araştırmalar yapmışlardır. S-1 enzimi, Ca^{+2} , Co^{+2} ve Mg^{+2} iyonlarıyla, sırasıyla, %107, 112 ve 107 oranlarında aktivite göstermiştir. Mn^{+2}

iyonu, enzimin başlangıç aktivitesini %44 oranında arttırmıştır. Enzim, Zn^{+2} ve Cu^{+2} ile reaksiyonu sonucunda bir miktar inhibe olmuş ve başlangıç aktivitesinin, sırasıyla, %71 ve 46 oranlarında korunduğu bulunmuştur. Enzim EDTA ile %107 oranında aktivite göstermiştir.

Anoxybacillus rupiensis NP2 suşundan izole edilen termo-alkali özellikteki pullulanaz enzimi kullanılan kimyasal ajanların 5 mM ve %1 konsantrasyonları enzim aktivitesinde önemli seviyede artışa neden olmuştur. Buna karşılık 10 mM ve %5 konsantrasyonlardaki aktivite değerlerinde, orijinal aktiviteye ve 5 mM ile %1 konsantrasyondaki aktivite değerlerine göre azalma görülmüştür. TritonX-100'ün her iki konsantrasyonu da aktivitede artış elde edilmiştir. Bütün değerler dikkate alındığında, en yüksek inhibisyon %73 ile 10 mM Hg^{+2} 'da gerçekleşirken, bunu yaklaşık %72 ile 8M üre, %70 ile %5 β -merkaptoetanol, %59 ile %5 H_2O_2 ve %57 ile %5 SDS izlemiştir. Literatürlerden farklı olarak %100 inhibisyon gerçekleşmemiştir. NP2 alkali pullulanaz, serin ve histidin amino asitleri içermeyen, Ca^{+2} bağımlı, deterjan, okside edici ajanlar, yüzey aktif bileşikler ve birçok metal iyonuna dirençli ve aktivitesi indüklenen, metaloenzim özelliğinde olmayan ve hidrofobik aminoasitlerce zengin bir enzimdir.

4.4.6. NaCl'nin Amilaz ve Pullulanaz Enzimlerinin Aktiviteleri Üzerine Etkisinin Belirlenmesine Ait Bulgular

Amilaz ve pullulanaz enzimlerinin aktiviteleri üzerine tuzun etkisini saptamak amacıyla, enzimler %1, %5, %10 ve %15'lik konsantrasyonlara sahip NaCl çözeltileri ile 60 dakika süreyle ön inkübasyona tabi tutulmuş ve aktivite analizi yapılmıştır. Enzim aktivitelerine ait bulgular Şekil 4.47, 4.48, 4.49 ve 4.50'deki grafiklerde gösterilmiştir.



Şekil 4.47. *Aeribacillus pallidus* NA1 Suşundan Elde Edilen Alkali Amilazın Aktivitesi Üzerine NaCl'nin Etkisine Ait Grafik

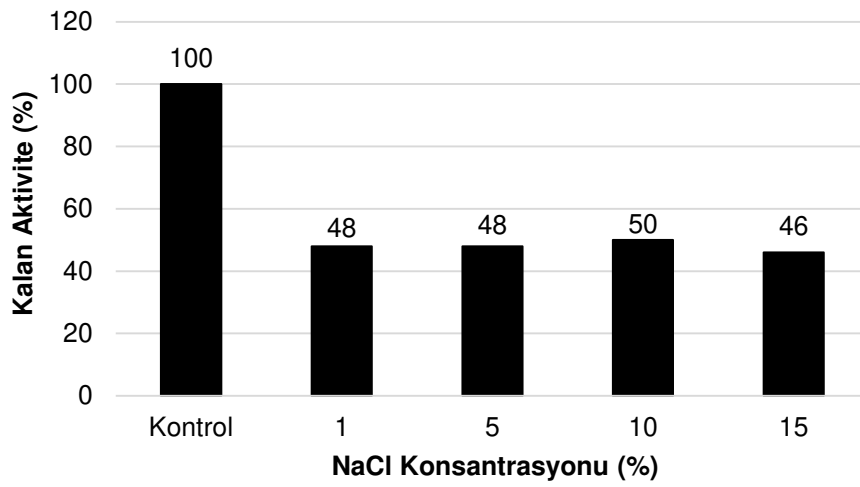
Aeribacillus pallidus NA1 suşundan elde edilen alkali amilaz %1, 5, 10 ve 15 NaCl konsantrasyonlarında, sırasıyla, %54, 58, 53 ve 41 aktivite göstermiştir (Şekil 4.47). En yüksek aktivite %5'lik NaCl konsantrasyonunda %58 iken, tüm NaCl konsantrasyonlarındaki ortalama aktivite değeri %51.5 olarak bulunmuştur. Bu sonuç, enzimin orta düzeyde halofilik özellikte olduğunu göstermektedir.

Nithya ve ark (2016), *Bacillus licheniformis* KSU-6 suşundan elde ettikleri alkali amilaz enzimi 0-4 M NaCl konsantrasyonlarında 1 saat süreyle ön inkübasyona bırakılmıştır. Enzim 0-2 M NaCl varlığında %100 stabilite göstermiştir. Amilaz enzimi, 4 M NaCl'de %73, 3M NaCl'de %88 oranında aktivite göstermiştir.

Aygan ve ark (2014), *Bacillus subtilis* A10 suşundan izole ettikleri alkalifilik α -amilaz enziminin 0.1-4.0 M NaCl ile 30 dakika ön inkübasyona bırakmışlardır. Maksimum enzim aktivitesi 1 M (%5.85) NaCl varlığında elde edilmiştir.

Chakraborty ve ark (2011), haloalkalifilik *Saccharopolyspora* sp. A9 suşundan izole ettikleri amilaz enzimini %3.5, 7, 11, 14 ve 17 NaCl'de 48 saat inkübasyona bırakmışlardır. Enzim, %11 NaCl'de %72, %17 NaCl'de %33 aktivite göstermiştir.

Anupama ve Jayaraman (2011), *Bacillus aquimaris* VITP4 suşundan izole ettikleri alkali α -amilaz enzimini 0-5 M NaCl çözeltileri ile 15 dakika ön inkübasyona bırakmışlardır. 3.5 M NaCl konsantrasyonda enzimin aktivitesi %60 oranında koruduğu saptamıştır. Enzim aktivitesinin, 0-1 M NaCl’de değişmediği, 3 M NaCl’de aktivitenin %75’inin korunduğu tespit edilmiştir. NaCl konsantrasyonu 5 M’a çıkarıldığında aktivitenin büyük ölçüde düştüğü bildirilmiştir.



Şekil 4.48. *Geobacillus lituanicus* NA2 Suşundan Elde Edilen Asidik Amilazın Aktivitesi Üzerine NaCl’nin Etkisine Ait Grafik

Geobacillus lituanicus NA2 suşundan elde edilen asidik amilaz enzimi %1, 5, 10 ve 15’lik NaCl konsantrasyonlarıyla muamele edildiğinde, sırasıyla, %47, 54, 58 ve 57 oranlarında stabil kalmıştır (Şekil 4.48). Tüm tuz konsantrasyonlarında ortalama %48 oranında stabilitesini koruyan NA2 asidik amilaz enziminin en yüksek aktivitesi %10 NaCl konsantrasyonunda %58 olarak ölçülmüştür. Enzim %15 NaCl konsantrasyonunda %57 oranında kalan aktiviteye değerine sahiptir. Bu özellikleri ile enzim orta düzeyde halofiliktir.

Bajpai ve ark (2015), *Haloferax* sp. HA10 suşundan izole ettikleri asidik α -amilaz enziminin, 0.5-3.0 M NaCl’de stabilitesini önemli oranda koruduğunu

bildirmişlerdir. Enzim 4 M NaCl’de %48 aktivite gösterirken, maksimum aktivite değeri 1M NaCl’de elde edilmiştir.

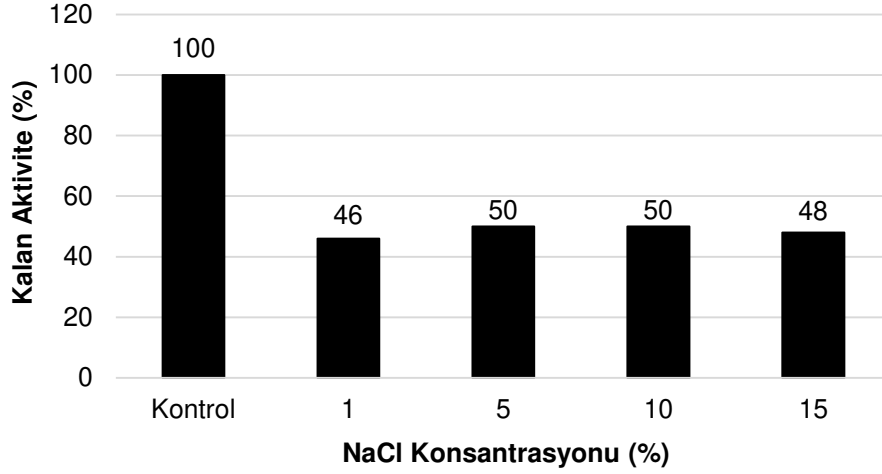
Kalpna ve Pandian (2014), asidik S8-18 α -amilaz enzimini %0-28 NaCl konsantrasyonlarında 24 saat ön inkübasyona bırakmışlardır. Enzim aktivitesi, %4 NaCl konsantrasyonuna kadar etkilenmemiş, %15’lik konsantrasyonda aktivitesinin %80’ini korunmuştur. Enzim, %28 NaCl konsantrasyonunda %72 oranında stabil kalmıştır.

Shafiei ve ark (2011), halofilik *Nesterenkonia* sp. F bakteri suşundan elde ettikleri asidik α -amilaz enzim aktivitesine NaCl etkisini belirlemek amacıyla, 0-4 M konsantrasyonlardaki NaCl çözeltileriyle analizler gerçekleştirmişlerdir. Geniş NaCl konsantrasyonu aralığında aktivite gösteren amilaz enzimi maksimum aktivitesini 0.75–1 M NaCl konsantrasyonu aralığında göstermiştir. Enzim 4 M NaCl’de %50.2 aktivite göstermiştir. NA2 asidik amilaz enziminin NaCl’e karşı aktivite davranışı literatürle uyumludur.

Geobacillus thermoleovorans NP1 asidik pullulanaz enzimi %1, 5, 10 ve 15’lik NaCl konsantrasyonlarında, sırasıyla, %46, 50, 50 ve 48 aktivite göstermiştir (Şekil 4.49). Enzim en yüksek aktiviteyi %5-10 konsantrasyonlarda %50 düzeyinde göstermiştir. Bütün tuz konsantrasyonları değerlendirildiğinde ortalama aktivite %48.5 olarak hesaplanmıştır.

Kahar ve ark (2016), *Anoxybacillus* sp. SK3-4 suşundan saflaştırdıkları tip I pullulanaz (PulsASK) enzimini 2 ve 5 mM NaCl ile ön inkübasyona bırakarak aktivite analizi yapmışlardır. SK3-4 pullulanaz enzimi, 2 mM NaCl ile %128.54, 5mM NaCl ile %122.30 oranlarında aktivite göstermiştir.

Qiao ve ark (2014), *Exiguobacterium acetylicum* YH5 suşundan elde ettikleri asidik tip I pullulanaz enzimini (Pul3YH5) 5 mM NaCl ile muamele etmişler ve enzimin abaslangıç aktivitesinin tamamını koruduğunu tespit etmişlerdir (%101.91).

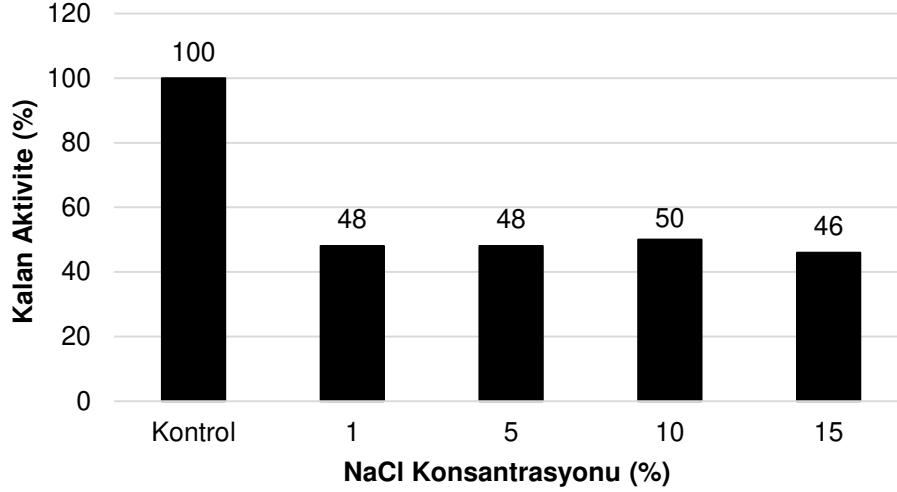


Şekil 4.49. *Geobacillus thermoleovorans* NP1 Suşundan Elde Edilen Asidik Pullulanazın Aktivitesi Üzerine NaCl'nin Etkisine Ait Grafik

Ling ve ark (2009), *Bacillus cereus* H1.5 suşundan izole ettikleri asidik tip II pullulanaz enzimini 0.2 ve 2 mM NaCl ile inkübasyona bırakmışlar ve standart aktivite analizleri gerçekleştirmişlerdir. H1.5 pullulanaz enzimi 0.2 ve 2 mM NaCl ile güçlü bir şekilde inhibe olmuş ve sırasıyla, %12.3 ve 5.8 oranlarında kalan aktivite değerleri elde edilmiştir.

Kunamneni ve Singh (2006), *Bacillus* sp. AN-7 suşundan saflaştırdıkları asidik pullulanaz enzimini 10 mM NaCl ile inkübasyona bıraktıklarında, enzimin başlangıç aktivitesinin tamamını (%100) koruduğunu gözlemlemişlerdir.

Anoxybacillus rupiensis NP2 suşundan elde edilen alkali pullulanaz enziminin %1, 5, 10 ve 15'lik NaCl ile elde edilen kalan aktivite değerleri, sırasıyla, %48, 48, 50 ve 46'dır (Şekil 4.50). Tüm tuz konsantrasyonlarında ortalama %48 oranında stabil kalan NP2 alkali pullulanaz enziminin en yüksek stabilite değeri %10 NaCl'de bulunmuştur (%50).



Şekil 4.50. *Anoxybacillus rupiensis* NP2 Suşundan Elde Edilen Alkali Pullulanazın Aktivitesi Üzerine NaCl'nin Etkisine Ait Grafik

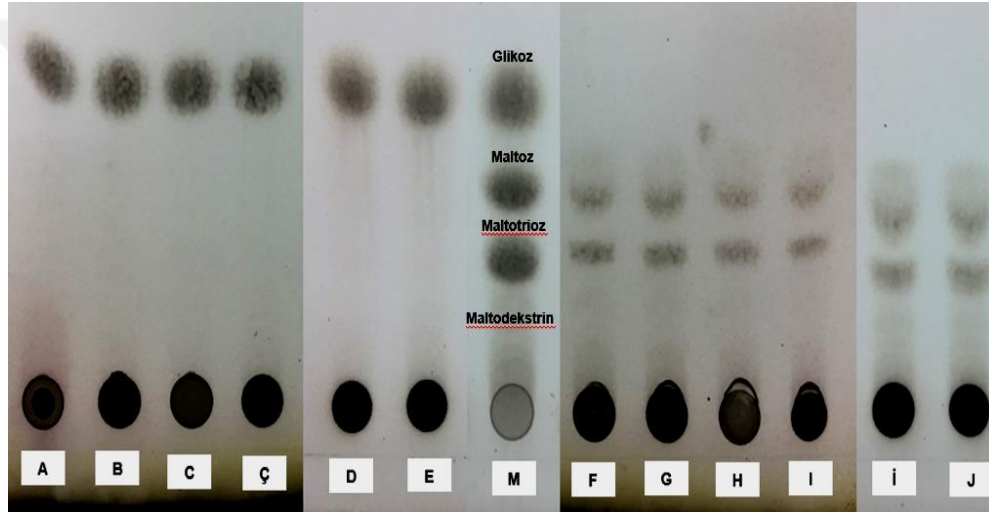
Roodi ve ark (2017), *Cohnella* sp.'den izole ettikleri rekombinant termo-alkalifilik *Coh01133* amilopullulanaz enziminin 5 mM NaCl ile inkübasyonu sonucunda enzimin aktivitesinde, başlangıca göre azalma gerçekleştiğini gözlemlemişler ve kalan aktivite değerinin %32 olduğunu belirlemişlerdir.

Siroosi ve ark (2014), *Halorubrum* sp. Ha25 suşundan elde ettikleri halofilik amilopullulanaz enziminin 0-4.5 M'lık aralığındaki NaCl ile muamele etmişler ve stabilite analizleri gerçekleştirmişlerdir. Enzimin en yüksek aktiviteyi 3.5 M NaCl'de gösterdiği bildirilmişlerdir. NP2 alkali pullulanaz enzimi %10 NaCl konsantrasyonunda %50 aktivite değeri ile literatür verilerine yakın aktivite göstermiştir.

Lee ve ark (2000), alkalifilik *Bacillus circulans* S-1 suşundan elde ettikleri alkali pullulan 6-glukanohidrolaz (pullulanaz) enziminin 1 mM NaCl'de %110 aktivite gösterdiğini bildirmişleridir.

4.4.7. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) ile Hidroliz Ürünlerin Belirlenmesine Ait Bulgular

Aeribacillus pallidus NA1, *Geobacillus lituanicus* NA2, *Geobacillus thermoleovorans* NP1 ve *Anoxybacillus rupiensis* NP2 suşlarından izole edilen amilaz ve pullulanaz enzimlerinin reaksiyon ürünlerinin saptanması için ince tabaka kromatografisinde (TLC) analizleri gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.51, 4.52, 4.53 ve 4.54'te gösterilmiştir.



Şekil 4.51. NA1 Alkali Amilaz ve NA2 Asidik Amilaz Enzimlerinin TLC Analizi Sonucu Açığa Çıkan Son Ürünler (A: NA1+%1 nişasta, B: NA1+%2 nişasta, C: NA1+%1 pullulan, Ç: NA1+%2 pullulan, D: NA1+%4 nişasta, E: NA1+%4 pullulan, M: marker (%1'lik glukoz, maltoz, maltotrioz, maltodekstrin karışımı), F: NA2+%1 nişasta, G: NA2+%2 nişasta, H: NA2+%1 pullulan, I: NA2+%2 pullulan, İ: NA2+%4 nişasta, J: NA2+%4 pullulan).

TLC analizi sonucunda, NA1 alkali amilaz enziminin %1, 2 ve 4 nişasta (A, B, D) ve %1, 2 ve 4 pullulanı (C, Ç, E) 24 saatlik inkübasyon sonunda glukozu kadar tamamen hidrolize ettiği bulunmuştur (Şekil 4.51). Reaksiyon ürünleri dikkate

alındığında, *Aeribacillus pallidus* NA1 suşundan izole edilen NA1 alkali amilaz enziminin α -amilaz ve amilopullulanaz özelliğinde olduğu belirlenmiştir.

Song ve ark (2016), *Luteimonas abyssi* XH031 suşundan izole ettikleri alkalifilik α -amilaz enziminin (LaaA), nişastayı glukoz, maltoz ve maltotrioza hidrolize ettiğini saptamışlardır.

Aygan ve ark (2014), *Bacillus subtilis* A10 suşundan elde ettikleri alkalifilik α -amilaz enziminin nişastayı 45°C’de 60 dakika sonunda glukoz, maltoz ve diğer oligosakkaritlere hidrolize ettiğini belirlemişlerdir.

Asoodeh ve Lagzian (2012), *Bacillus subtilis* DR8806 suşundan saflaştırdıkları glukoamilopullulanaz enziminin %1 nişastayı 30 dakika, 1, 2, 4, 6 ve 24 saat sonunda maltoz ve glukozu hidrolize ettiğini, 24 saatlik inkübasyonda son ürün olarak sadece glukoz elde edildiğini bildirmişlerdir. Enzim bu özellikleri sayesinde glukoamilaz şeklinde değerlendirilmiştir. Enzim aynı zamanda pullulanı maltotrioza hidrolize ettiği için amilopullulanaz olarak da adlandırılmıştır.

Behal ve ark (2006), *Bacillus sp.* AB 04 suşundan elde ettikleri alkali α -amilaz enziminin, 100°C’de 30 dakikalık inkübasyon sonunda nişastayı glukoz, maltoz ve diğer oligosakkaritlere hidrolize ettiği saptamıştır.

NA2 asidik amilaz %1, 2 ve 4 konsantrasyondaki nişasta ve pullulanı 24 saatlik inkübasyon sonunda maltoz, maltotrioz ve diğer oligosakkaritlere kadar parçalamıştır (Şekil 4.51). Nişasta ve pullulanın her üç konsantrasyonu ile gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonu sonucu açığa çıkan son ürünlerin kromatografik analizi benzerlik göstermiştir (F, G, H, I, J). NA2 asidik amilazın maltojenik amilaz ve amilopullulanaz özelliği gösterdiği tespit edilmiştir.

Parashar ve Satyanarayana (2016), asidofilik *Bacillus acidicola* TSAS1 suşundan izole ettikleri asit-stabil α -amilaz enziminin (Ba-amyl), nişastayı maltoz, maltotrioz ve maltodekstrinlere hidrolize ettiğini bildirmişlerdir. Reaksiyon süresi uzatıldığında nişastanın maltoz ve maltotrioza kadar parçalandığını gözlemlemişlerdir. Enzim, nişastayı %30 maltoz, %20 maltotrioz ve %50 diğer

maltooligosakkaritlere hidrolize etmiştir. Bu özellikleri nedeniyle, enzimin fırıncılık sektöründe bayatlama önleyici olarak kullanılabileceği ifade edilmiştir. NA2 asidik amilaz enzimine ait sonuçlar bu literatürdeki verilerle uyumlu olup, enzim fırıncılık endüstrisi için uygun özellikler taşımaktadır.

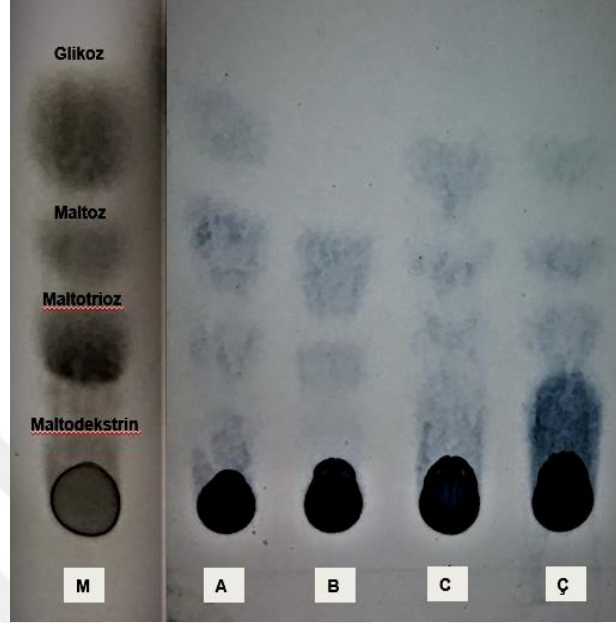
Emtenani ve ark (2015), *Bacillus subtilis* DR8806 suşundan izole ettikleri α -amilaz enziminin nişastayı maltoz ve maltotrioza dönüştürdüğünü saptamışlardır. Enzimin nişastadan yüksek maltoz içeren maltodekstrinlerin üretiminde kullanılabilir özellikte olduğu belirtilmiştir.

Demirkan ve ark (2005), *Bacillus amyloliquefaciens* suşundan elde ettikleri α -amilaz enziminin nişastayı maltoz, malto-oligosakkaritler ve bir miktar glukoza hidrolize ettiğini saptamışlardır.

NP1 asidik ve NP2 alkali pullulanaz enzimlerinin pullulan ve nişasta ile yapılan hidroliz işlemi sonucu oluşan reaksiyon ürünleri Şekil 4.52’de gösterilmiştir.

NP1 asidik pullulanaz ve NP2 alkali pullulanaz enzimlerinin, yapılan TLC analizlerinde %4 konsantrasyonda hazırlanmış pullulan ve nişastayı glukoz, maltoz, maltotrioz ve maltodekstrinin dahil olduğu diğer olisakkaritlere kadar hidrolize ettikleri bulunmuştur. Her iki enzim de nişasta ve pullulanı glukoza kadar hidrolize etmiştir (A, B, C, Ç). Bu özelliklerinden dolayı NP1 asidik pullulanaz ve NP2 alkali pullulanaz enzimlerinin tip II Pullulanaz (amilopullulanaz) oldukları tespit edilmiştir.

Lee ve ark (2016), *Hermetia illucens* (Siyah Asker Böceği) larvasının bağırsak mikroflorasından elde ettikleri alkalifilik pullulanaz enzimi, pullulanı maltotrioz birimlerine kadar hidrolize ederken, nişastayı glukoz, maltoz, maltotrioz ve maltotetroz birimlerine kadar indirgemıştır ve bu enzimin tip II pullulanazlar (amilopullulanazlar) sınıfına girdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.52. NP1 Asidik Pullulanaz ve NP2 Alkali Pullulanaz Enzimlerinin TLC Analizi Sonucu Açığa Çıkan Son Ürünler (**M**: marker (%1’lik glukoz, maltoz, maltotrioz, maltodekstrin karışımı), **A**: NP1+%4 pullulan, **B**: NP1+%4 nişasta, **C**: NP2+% pullulan, **Ç**: NP2+%4 nişasta).

Siddiqui ve ark (2014), hipertermofilik arkea *Pyrobaculum calidifontis* suşundan elde ettikleri asidik pullulanaz enziminin 90°C’de ve pH 5.5’te, pullulanı maltoza ve maltotrioza, nişastayı maltoheksoz, maltopentoz, maltotetroz, maltotrioz, maltoz ve glukozu kadar hidrolize ettiğini bildirmişlerdir. Her iki substratı hidrolize etme kabiliyetine sahip olan enzim tip II pullulanaz (amilopullulanaz) olarak tanımlanmıştır.

Wei ve ark (2014), *Bacillus cereus* Nws-bc5 suşundan elde ettikleri tip I asidik pullulanaz enziminin (*Pul_{BC}*) pullulanı maltotrioza, nişastayı maltotrioza ve maltoza kadar hidrolize ettiğini saptamışlardır.

Kang ve ark (2011), *Thermotoga neapolitana* bakterisinden izole ettikleri termostabil tip I asidik pullulanaz enziminin (*pulA*), pullulanın tamamını maltotrioz

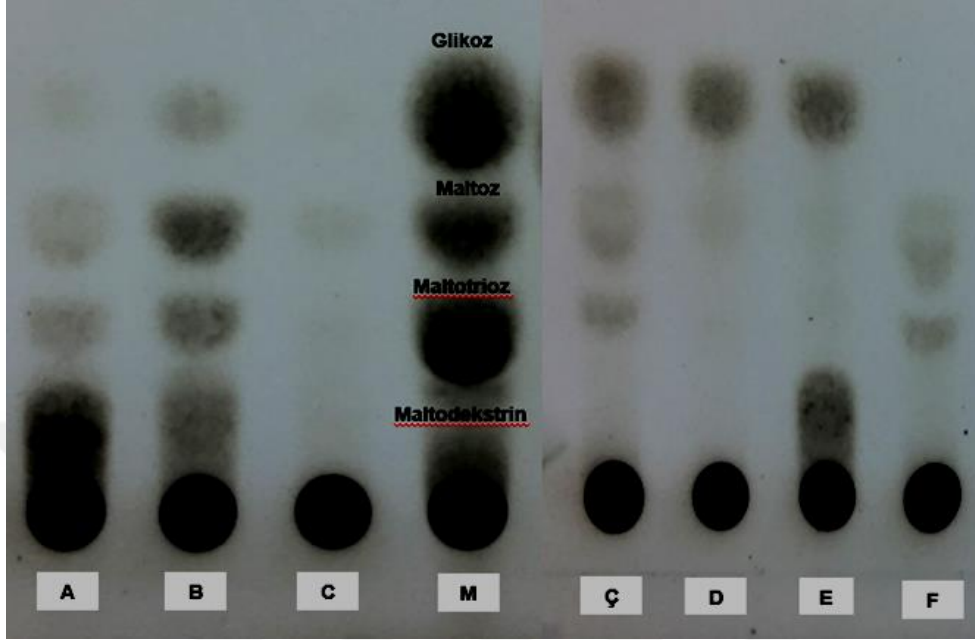
birimlerine, nişastayı maltoz, maltotrioz ve maltooligosakkarit birimlerine hidrolize ettiğini belirlemişlerdir. Enzim, tip I pullulanaz olarak tanımlanmıştır.

Bertoldo ve ark (2004), izole ettikleri termoalkalifilik *Anaerobranca gottschalkii* suşundan saflaştırılan pullulanaz enziminin, pullulanı maltotrioz birimlerine hidrolize ettiğini bulmuşlar ve enzimi tip I pullulanaz olarak adlandırmışlardır.

Devi ve Yogeewaran (1999), *Micrococcus halobius* OR-1 suşuna ait alkali pullulanaz enziminin, nişasta ve pullulanı maltotrioz birimlerine kadar hidrolize ettiğini belirlemişlerdir.

İzolasyonu yapılan NA1 alkali ve NA2 asidik amilaz enzimleri, NP1 asidik ve NP2 alkali pullulanaz enzimleri ile reaksiyona giren farklı konsantrasyonlardaki nişasta ve pullulan içeren karışımlardan 24 saatlik süre sonunda elde edilen hidroliz ürünleri Şekil 4.53'te gösterilmiştir.

NA2 asidik amilaz ve NP2 alkali pullulanaz karışımı, %4'lük nişastayı glukoz, maltoz, maltotrioz ve diğer oligosakkaritlere kadar hidrolize etmiştir (A). NP1 asidik pullulanaz ve NP2 alkali pullulanaz karışımı, %4'lük nişastayı glukoz, maltoz, maltotrioz ve maltodekstrinin bulunduğu diğer oligosakkaritlere hidrolize etmiştir (B). NP1 asidik pullulanaz ve NP2 alkali pullulanaz karışımı, %4'lük pullulanı glukoz, maltoz ve maltotriozla kadar hidrolize etmiştir (C). NA1 alkali amilaz ve NA2 asidik amilaz karışımı, %4'lük nişastayı maltotrioz, maltoz ve yüksek oranda glukozla hidrolize etmiştir (Ç). NA1 alkali amilaz ve NP1 asidik pullulanaz karışımı %4'lük nişastayı maltoza ve yüksek miktarda glukozla hidrolize etmiştir (D). NA1 alkali amilaz ve NP2 alkali pullulanaz karışımı, %4'lük nişastayı yüksek düzeyde glukoz, daha az oranda maltoz ve fazla miktarda diğer oligosakkaritlere hidrolize etmiştir (E). NA2 asidik amilaz ve NP2 alkali pullulanaz karışımı nişastayı maltotrioz ve maltoza hidrolize etmiştir (F).



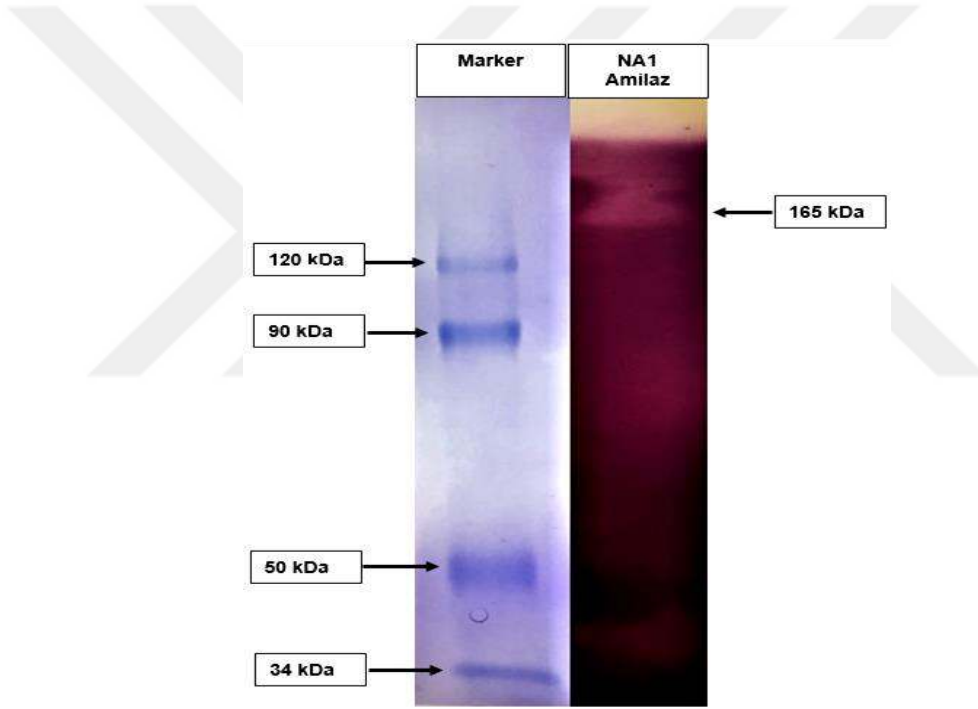
Şekil 4.53. Amilaz-Amilaz, Amilaz-Pullulanaz ve Pullulanaz-Pullulanaz Enzim Kombinasyonlarının TLC Analizi Sonucu Açığa Çıkan Son Ürünler (**A:** NA2+NP2+%4 nişasta, **B:** NP1+NP2+%4 nişasta, **C:** NP1+NP2+%4 pullulan, **M:** marker (%1'lik glukoz, maltoz, maltotrioz, maltodekstrin karışımı), **Ç:** NA1+NA2+%4 nişasta, **D:** NA1+NP1+%4 nişasta, **E:** NA1+NP2+%4 nişasta, **F:** NA2+NP1+%4 nişasta).

Bu sonuçlara göre, amilaz ve pullulanaz enzimleri birlikte kullanıldıklarında 24 saat sonunda nişasta ve pullulanı tamamen hidrolize ederek glukoz, maltoz, maltotrioz ve diğer maltoz türevi oligosakkaritlere dönüştürmüştür. Enzimlerin nişastanın sıvılaştırılması işlemlerinde birlikte kullanılmaları durumunda, glukoamilaz enzimine gerek kalmaksızın yüksek düzeyde verim alınması mümkündür.

4.4.8. SDS-PAGE Yöntemi ile Moleküler Ağırlığın Belirlenmesi ve Zimogram Analizi

NA1 ve NA2 amilaz enzimlerinin moleküler ağırlıkları %1 oranında nişasta içeren %10'luk SDS-PAGE jellerindeki zimogram analizi sonucu belirlenmiştir. Enzimlerin moleküler ağırlıkları ve zimogram analizlerine ait bulgular Şekil 4.54 ve 4.55'te gösterilmiştir.

NA1 alkali amilaz enziminin moleküler ağırlığı yaklaşık 165 kDa olarak hesaplanmıştır.



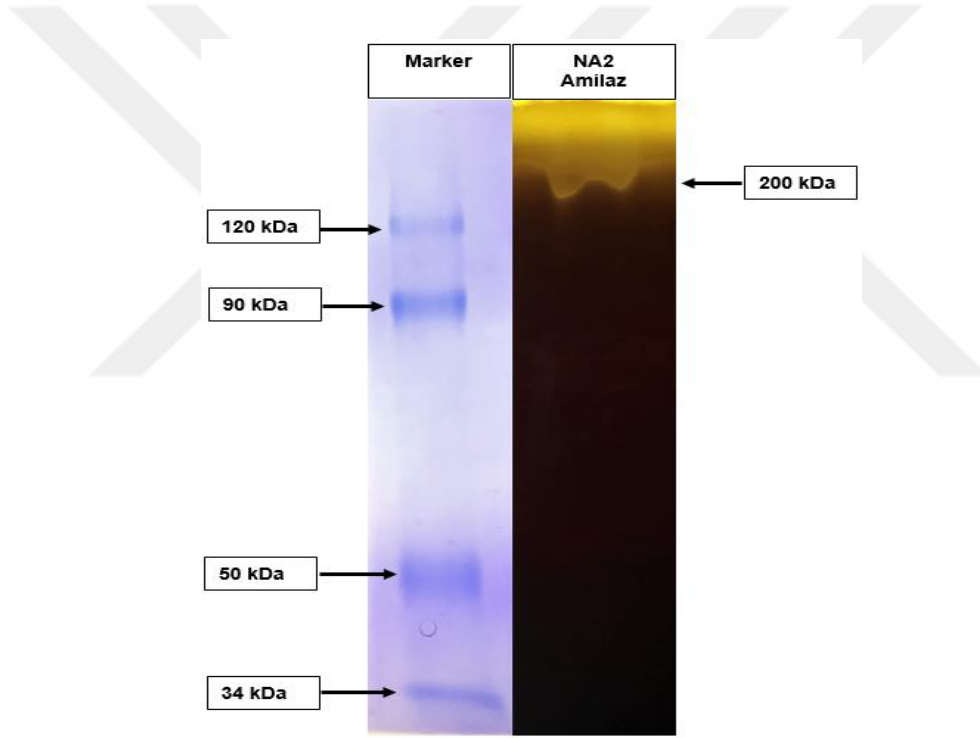
Şekil 4.54. NA1 Alkali Amilaz Enziminin Zimogram Analizi ve Moleküler Ağırlığı

Zhang ve ark (2016), termofilik *Anoxybacillus* sp. YIM 342 suşundan izole ettikleri alkali amilaz enzimini %12'lik SDS-PAGE ile analiz etmişler ve enzimin moleküler ağırlığını 68 kDa olarak bulmuşlardır. NA1 alkali amilaz enziminin moleküler ağırlığı literatür verilerine göre oldukça büyüktür.

Tiwari ve ark (2014), *Bacillus tequilensis* RG-01 suşundan izole ettikleri amilaz enziminin %12.5'lik SDS-PAGE ayırıcı jelindeki moleküler ağırlığını 67 kDa olarak hesaplamışlardır.

Chakraborty ve ark (2011), haloakalifilik *Saccharopolyspora* sp. A9 suşundan elde ettikleri alkali α -amilaz enziminin moleküler ağırlığını %10'luk poliakrilamid jel kullanarak 66 kDa olarak belirlemişlerdir.

NA2 amilaz enziminin moleküler ağırlığı yaklaşık 200 kDa olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.55. NA2 Asidik Amilaz Enziminin Zimogram Analizi ve Moleküler Ağırlığı

Ozturk ve ark (2013), *Bacillus subtilis*'ten elde ettikleri amilaz enziminin moleküler ağırlığını tespit etmek amacıyla %12'lik SDS-PAGE jeli kullanarak enzimin moleküler ağırlığını yaklaşık 73 kDa olarak bulmuşlardır.

Sharma ve Satyanarayana (2013), *Bacillus acidicola* suşundan izole ettikleri asidik amilaz enziminin moleküler ağırlığını %12'lik SDS-PAGE jelinde 66 kDa olarak belirlemişlerdir.

Bai ve ark (2012), *Alicyclobacillus* sp. A4 suşundan izole ettikleri α -amilaz enziminin moleküler ağırlığını 64 kDa bulmuşlardır. A4 enziminin moleküler ağırlığının belirlenmesinde %10'luk SDS-PAGE jeli kullanılmıştır.

Ara ve ark (1995), alkalifilik *Bacillus* sp. KSM-1378 suşundan izole ettikleri amilopullulanaz enzimini %7.5'lik SDS-PAGE sistemi kullanarak analiz etmişler ve moleküler ağırlığını 210 kDa olarak bulmuşlardır. Bu sonuca göre, NA2 amilaz enziminin moleküler ağırlığı literatürde bulunan benzer enzimlerle uyumludur.

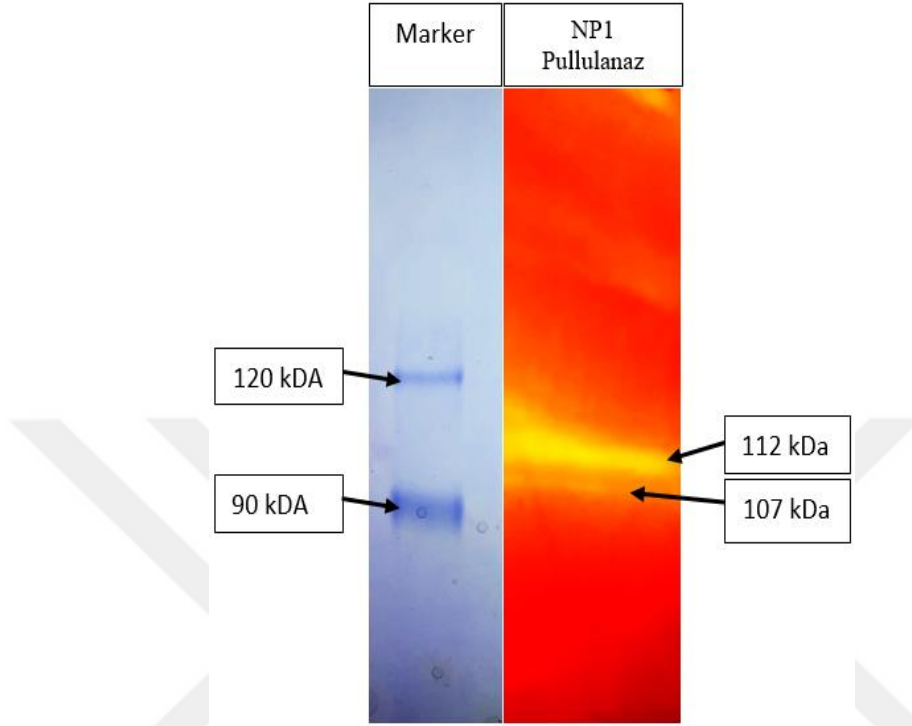
NP1 asidik ve NP2 alkali pullulanaz enzimlerinin moleküler ağırlıkları %1 pullulan içeren %8'lik SDS-PAGE jellerinde gerçekleştirilen zimogram analizi sonucunda belirlenmiştir.

NP1 asidik pullulanaz enziminin SDS-PAGE zimogram analizinde, moleküler ağırlıkları yaklaşık 112 ve 107 kDa olan iki ayrı aktivite bandı elde edilmiştir. Enzime ait zimogram ve moleküler ağırlık sonucu Şekil 4.56'da gösterilmiştir.

Yang ve ark (2017), *Bacillus megaterium* WW1210 suşundan elde ettikleri asidik pullulanaz enzimini %7.5'lik SDS-PAGE jelinde analiz etmişler ve enzimin moleküler ağırlığını 112 kDa bulmuşlardır. NP1 asidik pullulanaz enziminin verileri literatür verileri ile uyum içindedir.

Liu ve ark (2016), *Paenibacillus barengoltzii* suşundan elde ettikleri pullulanaz enzimini %12.5'lik SDS-PAGE jelinde analiz etmişler ve PbPulA enziminin moleküler ağırlığını 75 kDa bulmuşlardır.

Siddiqui ve ark (2014), hipertermofilik *Pyrobaculum calidifontis* suşundan elde ettikleri asidik pullulanaz enzimini %12'lik SDS-PAGE jelinde analiz etmişler ve enzimin 111 kDa moleküler ağırlığa sahip olduğunu saptamışlardır.



Şekil 4.56. NP1 Asidik Pullulanaz Enziminin Zimogram Analizi ve Moleküler Ağırlığı

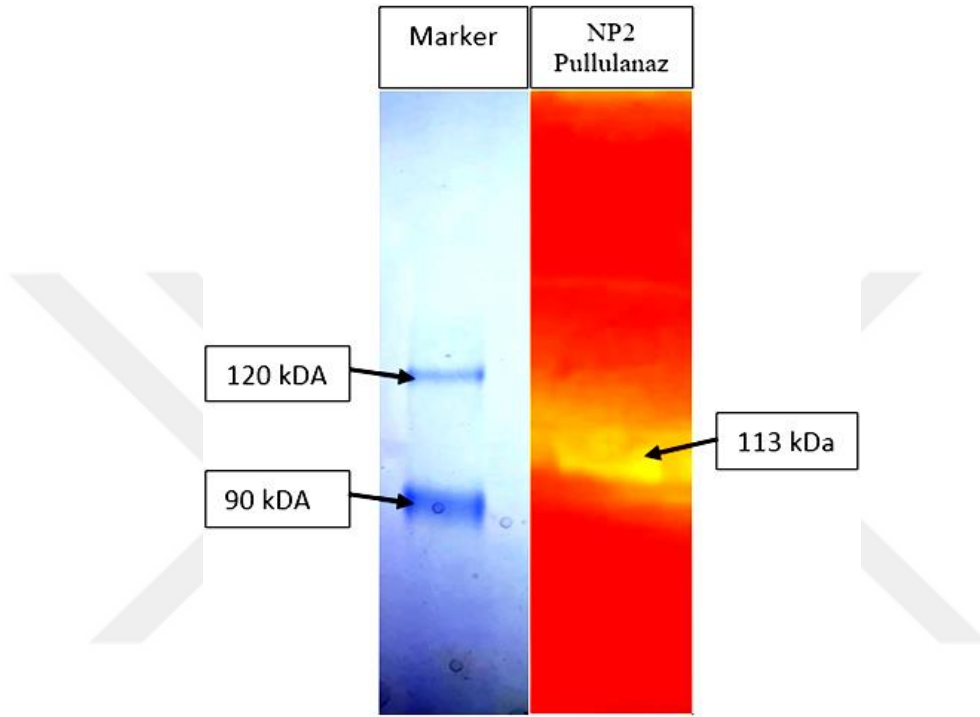
NP2 alkali pullulanaz enziminin SDS-PAGE zimogram analizinde moleküler ağırlığı yaklaşık 113 kDa olarak hesaplanmıştır. Enzime ait zimogram ve moleküler ağırlık sonucu Şekil 4.57’de gösterilmiştir.

Qiao ve ark (2014), *Exiguobacterium acetylicum* YH5 suşundan elde ettikleri asidik tip I pullulanaz enzimini (Pul3YH5) %10’luk SDS-PAGE ile analiz etmişler ve enzimin moleküler ağırlığını 100 kDa bulmuşlardır.

Anoxybacillus rupiensis NP2 alkali pullulanaz enziminin moleküler ağırlığı yaklaşık 113 kDa olarak hesaplanmıştır. Enzime ait moleküler ağırlık ve zimogram analiz sonucu Şekil 4.57’de gösterilmiştir.

Lee ve ark (2016), *Hermetia illucens* (Siyah Asker Böceği) larvasının bağırsak mikroflorasından elde ettikleri alkalifilik pullulanaz enziminin SDS-PAGE analizine

göre, 164 kDa moleküler ağırlığında tek bir aktivite bandına sahip olduğunu bulmuşlardır.



Şekil 4.57. NP2 Alkali Pullulanaz Enziminin Zimogram Analizi ve Moleküler Ağırlığı

4.5. Enzim Denemelerine Ait Bulgular

4.5.1. Enzimlerin Yıkama Performans Analizlerine Ait Bulgular

NA1 alkali amilaz, NA2 asidik amilaz, NP1 asidik pullulanaz ve NP2 alkali pullulanaz enzimleri ile yapılan yıkama performans analizlerine ait bulgular Şekil 4.58, 4.59, 4.60, 4.61 ve 4.62’de gösterilmiştir.

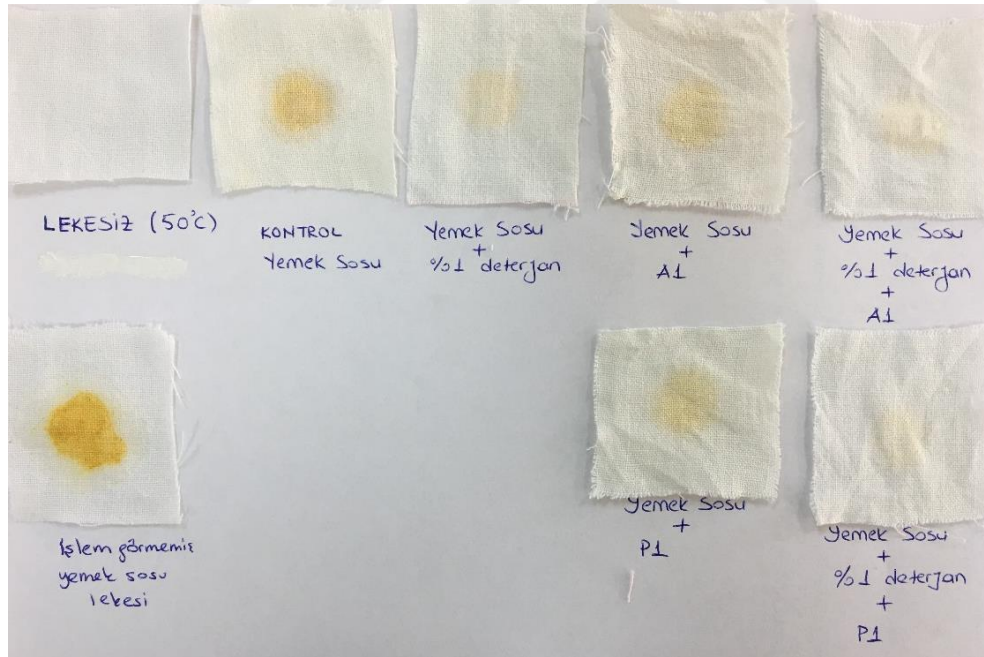
NA1 alkali amilaz ve NP1 asidik pullulanaz enzimlerinin yıkama performans analizleri enzimlerin optimum aktivite sıcaklıkları olan 50°C’de, NA2 asidik amilaz

ve NP2 alkali pullulanaz enzimlerinin yıkama performans analizleri de 60°C’de gerçekleştirilmiştir.

Yemek sosu, bebek maması ve çikolata gibi farklı oranlarda nişasta içeren gıda lekeleriyle lekelenmiş kumaş parçalarındaki kirliliğin giderimi esasına dayanan yıkama performans testleri, enzimlerin optimum aktivite gösterdikleri sıcaklıklarda 1 saat süreyle 100 rpm’lik çalkalayıcıda gerçekleştirilmiştir.

Sadece enzimin ve enzimle deterjan karışımının uygulandığı kumaş parçaları, lekesiz kumaş, işlem görmemiş lekeli kumaş, sadece çeşme suyuyla yıkanmış lekeli kumaş, %1 deterjan içeren çeşme suyuyla yıkanmış lekeli kumaş parçaları ile görsel olarak kıyaslanmıştır.

NA1 alkali amilaz ve NP1 asidik pullulanaz enzimlerinin yemek sosu lekesi üzerindeki yıkama performansı şekil 4.58’de gösterilmiştir.



Şekil 4.58. NA1 Alkali Amilaz ve NP1 Asidik Pullulanaz Enzimlerinin Yemek Sosu Lekesi Üzerindeki Yıkama Performansı (**A1**: NA1 Alkali Amilaz, **P1**: NP1 Asidik Pullulanaz)

NA1 alkali amilaz enzimiyle 50°C’de yıkanan yemek sosu ile lekelenmiş kumaşlar, hiç lekelenmemiş, yemek sosuyla lekelenmiş ancak işlem görmemiş ve sadece çeşme suyuyla yıkanmış yemek sosuyla lekelenmiş kumaşlarla kıyaslandığında oldukça iyi seviyede leke giderimi sağlandığı görülmüştür.

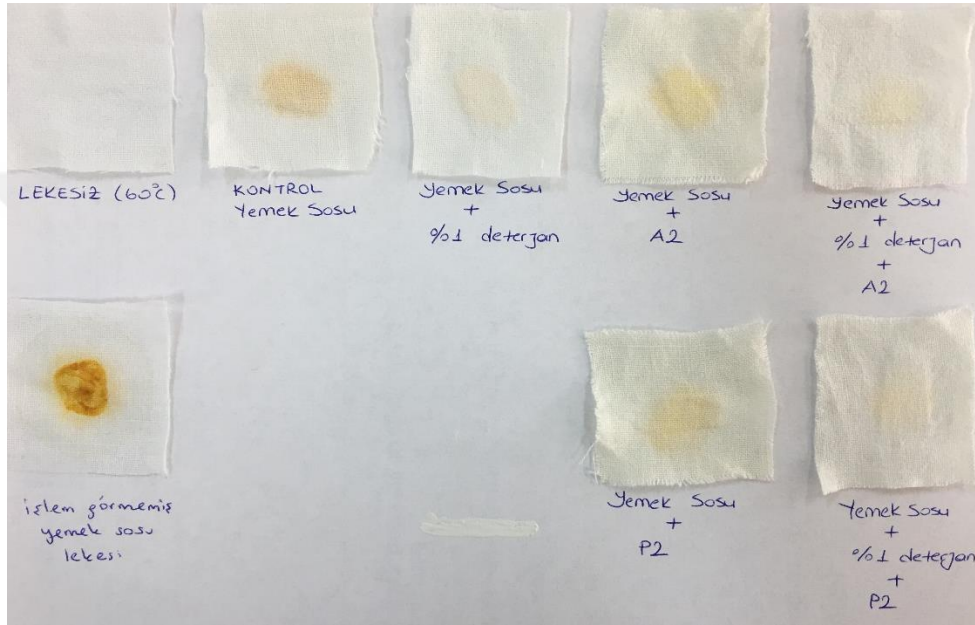
Yemek sosu ile lekelenmiş kumaşın, sadece P1 asidik pullulanaz enzimi ile yıkandığında işlem görmemiş yemek sosu örneğine göre %90 daha iyi temizlenmiş olduğu görülmektedir. Yemek sosu ile lekelenmiş kumaş %1 deterjan ve P1 asidik pullulanaz enzim karışımı ile yıkandığında, kumaşın işlem görmemiş örneğe göre tamamen temizlenmiş olduğu görülmektedir ve lekesiz olan kontrol kumaşına yakın görünümüne sahiptir.

Yemek sosu ile lekelenmiş kumaş parçasının, A1 alkali amilaz enzimi ile yıkandığında işlem görmemiş örneğe göre %80 daha iyi oranda temizlenmiş olduğu görülmektedir. Yemek sosu ile lekelenmiş kumaş %1 deterjan ve A1 alkali amilaz enzim karışımı ile yıkandığında, işlem görmemiş örneğe kıyasla, lekenin yok denilecek düzeyde giderilmiş olduğu görülmektedir. Yemek sosu ile lekelenmiş kumaş örneğinde P1 asidik pullulanaz ve %1 deterjan karışımının yıkama performansı, A1 alkali amilaz %1 deterjan karışımında yıkanan örneğe göre daha başarılı olmuştur.

NA2 asidik amilaz ve NP2 alkali pullulanaz enzimlerinin yemek sosu ile lekelenmiş kumaşlarla gerçekleştirilen yıkama performansı analizlerine ait bulgular şekil 4.59’da gösterilmiştir.

Yemek sosu ile lekelenmiş kumaş örneğinin A2 asidik amilaz ve P2 alkali pullulanaz ile gerçekleştirilen yıkama işleminde, her iki enzimle de işlem görmemiş yemek sosu örneğine göre yaklaşık %90 oranında leke giderimi gerçekleşmiştir. Yemek sosuyla lekelenmiş kumaşların %1 deterjan ve A2 asidik amilaz enzimi karışımı ile %1 deterjan ve P2 alkali pullulanaz enzim karışımlarında yapılan yıkamada, işlem görmemiş yemek soslu kumaş örneğine göre daha yüksek düzeyde yıkama performansının gerçekleştiği görülmektedir.

Yemek sosu örneklerinde, A1 alkali amilaz+deterjan karışımı ile P1 asidik pullulanaz+deterjan karışımı uygulaması yıkama performansı açısından A2 asidik amilaz+deterjan ve P2 alkali pullulanaz+deterjan karışımına göre daha başarılı olduğu görülmektedir.

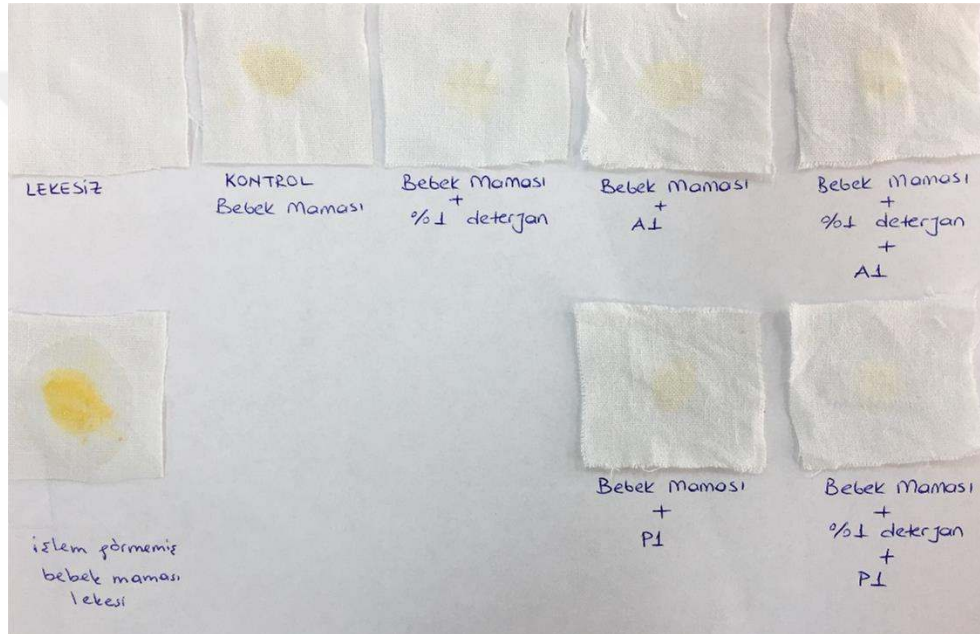


Şekil 4.59. NA2 Asidik Amilaz ve NP2 Alkali Pullulanaz Enzimlerinin Yemek Sosu Lekesi Üzerindeki Yıkama Performansı (**A2**: NA2 Asidik Amilaz, **P2**: NP2 Alkali Pullulanaz).

A1 alkali amilaz ve P1 asidik pullulanaz enzimlerinin bebek maması ile lekelenmiş kumaş parçaları üzerindeki yıkama performansları ile ilgili bulgular Şekil 4.60'ta gösterilmiştir.

Bebek maması ile lekelenmiş kumaşlar, sadece NA1 alkali amilaz ve NP1 asidik pullulanaz enzimlerini içeren suda yıkanmıştır. İşlem görmemiş bebek maması lekesi bulunan kumaş örneğiyle kıyaslandığında, sadece P1 asidik pullulanaz enzimini içeren su ile yıkanan kumaşta gözle fark edilmeyecek düzeyde leke kalmıştır. NA1 alkali amilaz enzimi ile yıkanan kumaşta %90'dan fazla leke

giderimi olmuştur. NA1 alkali amilaz enzimiyle %1 deterjan karışımı ve NP1 asidik pullulanaz enzimiyle %1 deterjan karışımında yıkanan bebek maması ile lekelenmiş kumaşların, işlem görmemiş bebek maması ile lekelenmiş kumaşa kıyasla, %100'e yakın oranda temizlendiği görülmektedir. Elde edilen görünüm lekесiz örneklerle benzer olup, NP1 asidik pullulanaz enzimi ve %1 deterjan karışımı, NA1 alkali amilaz ve %1 deterjan karışımına göre daha başarılıdır.



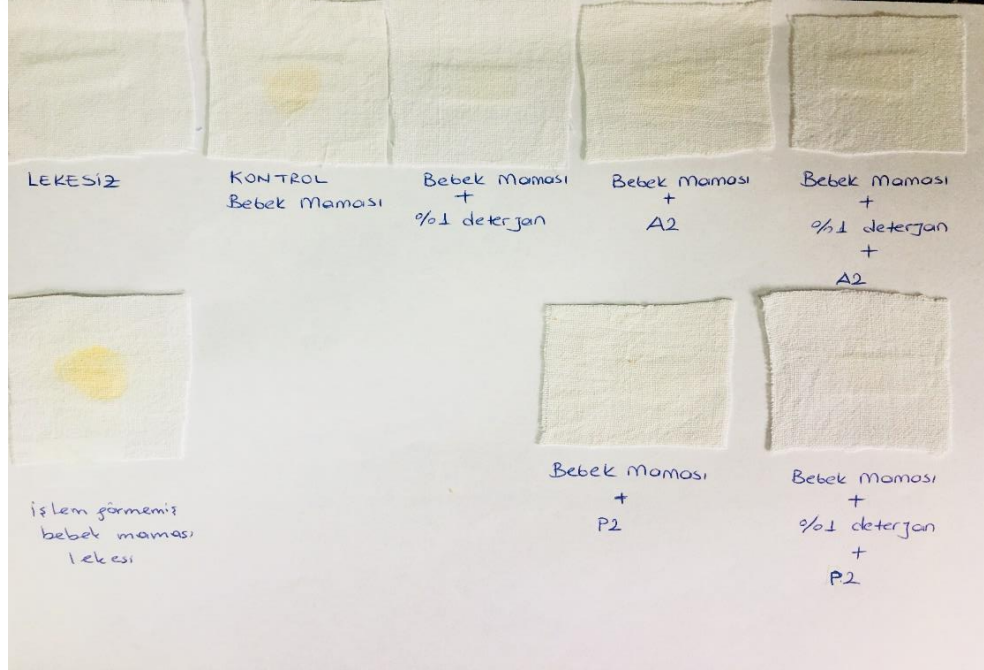
Şekil 4.60. NA1 Alkali Amilaz ve NP1 Asidik Pullulanaz Enzimlerinin Bebek Maması Lekesi Üzerindeki Yıkama Performansı (**A1**: NA1 Alkali Amilaz, **P1**: NP1 Asidik Pullulanaz).

NA2 asidik amilaz ve NP2 alkali pullulanaz enzimlerinin bebek maması ile lekelenmiş bezdeki yıkama performansına ait bulgular Şekil 4.61'de gösterilmiştir.

NA2 asidik amilaz enzimiyle yıkanan bebek maması ile lekelenmiş kumaşa, işlem görmemiş bebek maması lekeli kumaş örneğine göre %90'dan fazla leke giderimi gerçekleşmiştir. NP2 alkali pullulanaz enzimiyle yıkanan bebek maması ile

lekelenmiş kumaş parçasında, işlem görmemiş bebek maması örneğine kıyasla, %100'e yakın oranda leke giderimi sağlanmıştır.

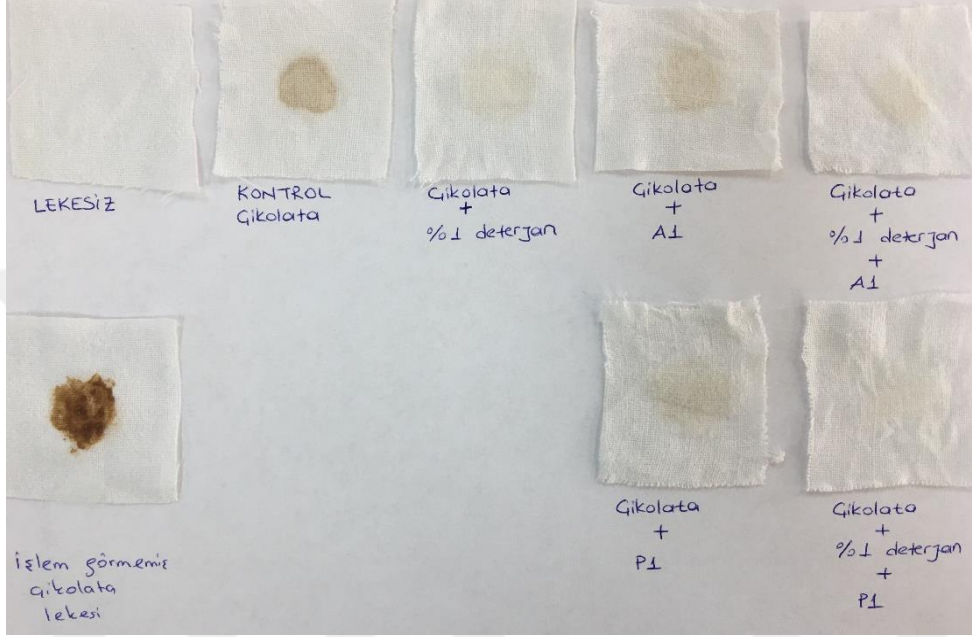
Bebek mamasıyla lekelenmiş kumaş NA2 asidik amilaz ve %1 deterjan karışımında yıkanması işleminden sonra işlem görmemiş bebek maması örneğiyle kıyaslandığında, kumaştaki leke gideriminin %100'e yakın olduğu görülmektedir. Bebek maması ile lekelenmiş kumaş parçasının NP2 alkali pullulanaz ve %1 deterjan karışımıyla yıkanması sonucunda işlem görmemiş bebek maması örneğine göre %100 leke giderimi gerçekleşmiştir.



Şekil 4.61. NA2 Asidik Amilaz ve NP2 Alkali Pullulanaz Enzimlerinin Bebek Maması Lekesi Üzerindeki Yıkama Performansı (**A2**: NA2 Asidik Amilaz, **P2**: NP2 Alkali Pullulanaz).

Kumaştaki bebek maması lekesinin gideriminde NP2 alkali pullulanaz ve %1 deterjan karışımının, NA2 asidik amilaz ve %1 deterjandan oluşan karışıma göre daha başarılı olduğu belirlenmiştir.

NA1 alkali amilaz ve NP1 asidik pullulanaz enzimlerinin çikolata lekesi üzerindeki yıkama performans analizine ait bulgular Şekil 4.62’de gösterilmiştir.

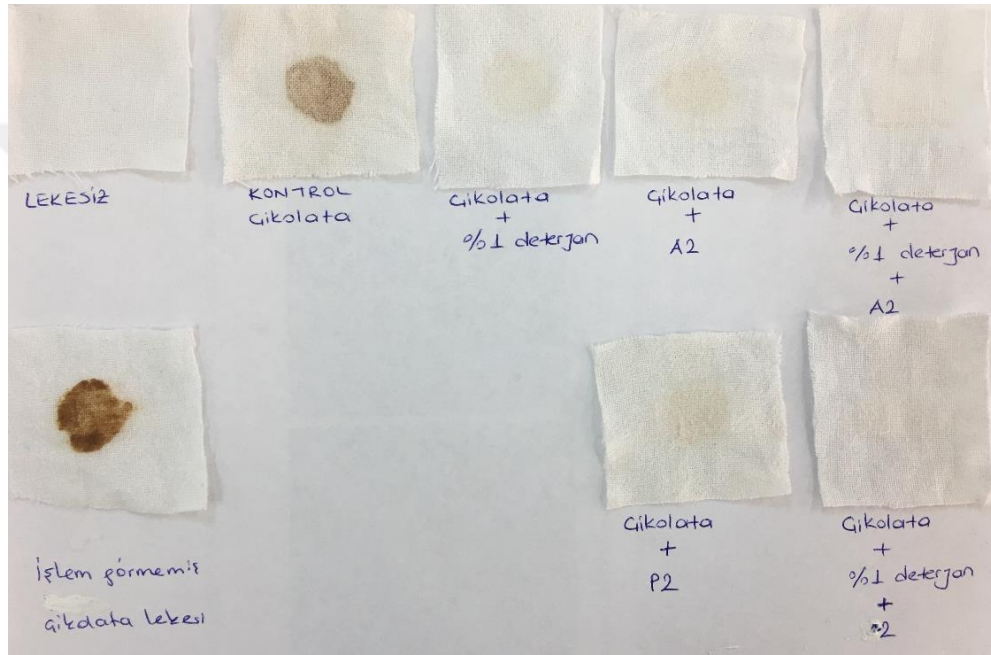


Şekil 4.62. NA1 Alkali Amilaz ve NP1 Asidik Pullulanaz Enzimlerinin Çikolata Lekesi Üzerindeki Yıkama Performansı (A1: NA1 Alkali Amilaz, P1: NP1 asidik pullulanaz).

NA1 alkali amilaz enzimi ile yıkanmış çikolata lekeli kumaşta, hiçbir işlem görmemiş örneğe kıyasla, yaklaşık %90’ın üzerinde leke giderimi olmuştur. NP1 asidik pullulanaz enzimi ile yıkanmış çikolata lekeli kumaşta, işlem görmemiş kumaş örneğine göre yaklaşık %95 düzeyinde leke giderimi gerçekleşmiştir. Çikolata ile lekelenmiş kumaş parçasının NA1 alkali amilaz ve %1 deterjan karışımıyla yıkanması sonucunda işlem görmemiş örneğe göre %100’e yakın leke giderimi olmuştur. Çikolata ile kirlenmiş kumaş parçasının %1 deterjan ve NP1 asidik pullulanaz karışımı ile yıkanması sonucunda işlem görmemiş çikolata lekeli kumaşa kıyasla, kirliliğin tamamen giderildiği görülmektedir. Elde edilen sonuç hiç

lekelenmemiş kumaşla benzerdir. NP1 asidik pullulanaz ve %1 deterjan karışımı, NA1 alkali amilaz ve %1 deterjan karışımına göre çikolata lekesinin temizlenmesinde daha yüksek oranda performans göstermiştir.

NA2 asidik amilaz ve NP2 alkali pullulanaz enzimlerinin çikolata lekesini giderme performanslarına ait bulgular Şekil 4.63'te gösterilmiştir.



Şekil 4.63. NA2 Asidik Amilaz ve NP2 Alkali Pullulanaz Enzimlerinin Çikolata Lekesi Üzerindeki Yıkama Performansı (A2: NA2 Asidik Amilaz, P2: NP2 Alkali Pullulanaz).

Çikolata ile lekelenmiş kumaşın sadece NA2 asidik amilaz enziminin bulunduğu suda yıkandığı zamanki kirlilik giderimi, işlem görmemiş örneğe göre yaklaşık %95 daha iyi düzeydedir. Çikolata ile lekelenmiş kumaşın sadece NP2 alkali pullulanaz enziminin bulunduğu suyla yıkanmasından sonraki leke giderim performansı, işlem görmemiş çikolata lekeli kumaşla kıyaslandığında, NA2 asidik amilazınki ile yakın seviyede leke gideriminin gerçekleştiği görülmektedir. Çikolata

kirliliği bulunan kumaş, NA2 asidik amilaz ve %1 deterjan karışımı ile yıkandığı zaman kirliliğin neredeyse tamamen giderildiği gözlemlenmiştir. Çikolata lekeli kumaşın NP2 alkali pullulanaz ve %1 deterjandan oluşan karışım ile yıkanması sonucu, işlem görmemiş çikolata lekeli kumaşa göre kirliliğin tamamen giderildiği görülmektedir. Özellikle NP2 alkali pullulanaz ve %1 deterjandan oluşan karışım çikolata lekesinin gideriminde %100 performans göstermiştir.

Bu sonuçlara göre, NP2 alkali pullulanaz enziminin kirlilik gideriminde çok daha başarılı olduğu görülmüştür. Enzimin, pH 9.0’da optimum aktiviteye sahip olması deterjan formülasyonu için ideal bir enzim olduğunu göstermektedir. NP2 alkali pullulanaz, özellikle çikolata ve bebek maması ile oluşturulan kirliliğin giderilmesinde yemek sosuna göre çok daha yüksek performans göstermiştir.

Endüstriyel deterjan üretiminde deterjan içerisine %0.1-1 oranında enzim karıştırılmaktadır. Gerçekleştirdiğimiz çalışmada %1 deterjan ve 500 U/mL enzimin yanı sıra, karışımın kalan kısmının sadece çeşme suyundan oluşması enzimlerin ne denli başarılı olduğunu göstermektedir.

Simair ve ark (2017), termofilik *Bacillus* sp. BCC 01-50 suşundan izole ettikleri alkali α -amilaz enziminin yıkama performans analizini yapmışlardır. Deterjan ve enzimin birlikte bulunduğu ortamda yıkanan kumaş parçalarındaki leke gideriminin diğerlerine göre oldukça iyi düzeyde olduğu gözlemlenmiştir. Yıkama performans analizi sonuçlarına göre, BCC 01-50 α -amilaz enziminin yıkama proseslerinde kullanılabilir olduğu tespit edilmiştir.

Roy ve Mukherjee (2013), *Bacillus licheniformis* AS08E suşundan saflaştırdıkları termostabil alkali α -amilaz enziminin biyo-deterjan katkısı olarak kullanılabilirliğini araştırmak amacıyla enzim ile yıkama performans testi yapmışlardır. Amilaz enzimi eklenen deterjan solüsyonunda bulunan kumaş parçalarındaki leke gideriminin, yalnız deterjen solüsyonunda bulunanlara kıyasla daha iyi olduğu gözlemlenmiştir.

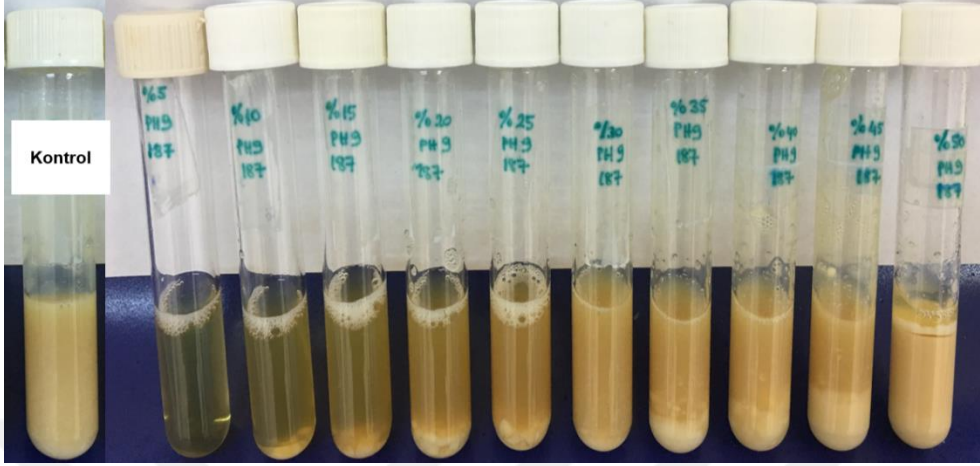
Roohi ve ark (2013), *Bacillus cereus* GA6 suşundan izole ettikleri α -amilaz enziminin yıkama performans analizini gerçekleştirmişlerdir. Sonuçlara göre, alkali α -amilaz enzimi deterjanla birlikte kullanıldığında leke gideriminde oldukça yüksek etkinlik göstermiştir. Yalnızca deterjan kullanımına kıyasla, deterjan ve enzim kombinasyonu ile yıkanan yemek sosu, bebek maması ve çikolata ile lekelenmiş kumaşlardaki leke giderimi daha iyi düzeyde bulunmuştur.

Roy ve ark (2012), *Bacillus subtilis* AS-S01a suşundan saflaştırdıkları alkali α -amilaz enziminin pamuklu kumaşlardaki çikolata lekesini giderme kapasitesini belirlemek ve biyo-deterjan katkısı olarak kullanılabilirliğini saptamak amacıyla, enzimin yıkama performans analizini gerçekleştirmişlerdir. Yalnızca enzim ve yalnızca deterjan ile yıkanan kumaş parçalarındaki leke giderimleriyle kıyaslandığında, en iyi leke gideriminin deterjan ve AS-S01a α -amilaz enzim karışımı ile yıkanmış kumaş parçalarında olduğu tespit edilmiştir.

4.5.2. Nişastanın Sıvılaştırılmasına Ait Bulgular

Her enzimden 1'er mL alınıp, içerisinde 4'er mL %5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ve 50 nişasta bulunan tampon karışımlarının olduğu tüplere eklenmiştir. Reaksiyon tüpleri enzimlerin optimum aktivite gösterdikleri sıcaklıklarda 2 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda enzimlerin gösterdikleri sıvılaştırma aktiviteleri, kontrole göre tüplerdeki akıcılık oranı ve renk değişimine göre değerlendirilmiştir. Ayrıca sıvılaşma sonucu açığa çıkan % glukoz değeri nişasta endüstrisinde standart olarak gerçekleştirilen BriX testiyle saptanmıştır.

NA1 alkali amilaz enzimi ile yapılan sıvılaştırma testi sonucu Şekil 4.64'te gösterilmiştir.

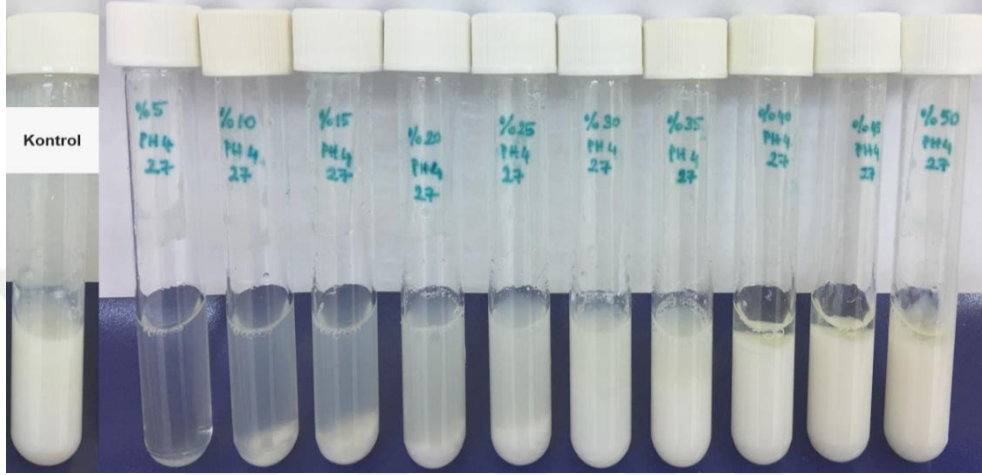


Şekil 4.64. NA1 Alkali Amilaz Enziminin Nişastayı Sıvılaştırma Davranışı

NA1 alkali amilaz enzimi %5, 10, 15, 20, 25 ve 30 konsantrasyondaki nişasta karışımlarını 50°C'deki inkübasyon sonucunda, sırasıyla, yaklaşık olarak %100, 95, 90, 80, 80 ve 80 sıvılaştırmıştır. Nişasta konsantrasyonunun %35, 40, 45 ve 50 olduğu karışımlardaki akışkanlık fazla olmamakla birlikte, tüplerin dip kısmında sıvılaşmayan yapıların varlığı dikkate alındığında tüplerde, sırasıyla, yaklaşık %70, 60, 50 ve 20 düzeyinde sıvılaşma olduğu gözlemlenmiştir.

NA1 alkali amilaz enziminin %5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ve 50 nişastayı sıvılaştırması sonucu açığa çıkan % glukoz değeri BriX sistemiyle ölçüldüğünde sırasıyla, %4, 8, 10, 12.2, 15, 17.5, 18, 19, 19 ve 6 glukoz açığa çıktığı bulunmuştur. Konsantrasyon yoğunluğu nedeniyle akıcılığın daha az olduğu gözlenen %35, 40 ve 45 nişastalı ortamlarda, çok akışkan olan %5 nişasta bulunan tüpe göre daha yüksek düzeyde glukoz açığa çıktığı görülmüştür.

NA2 amilaz enzimi ile yapılan sıvılaştırma testi sonucu Şekil 4.65'te gösterilmiştir.

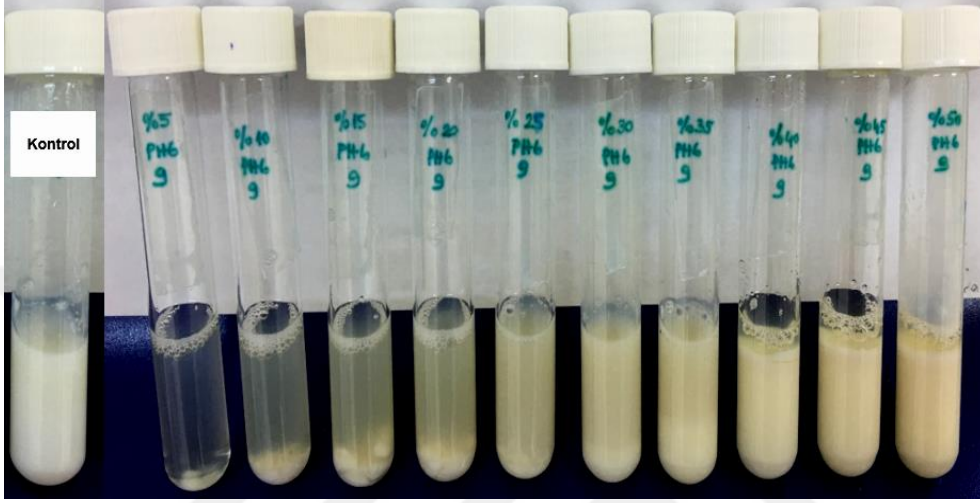


Şekil 4.65. NA2 Asidik Amilaz Enziminin Nişastayı Sıvılaştırma Davranışı

NA2 asidik amilaz enzimi %5, 10, 15, 20 ve 25 nişasta karışımlarını 60°C'deki inkübasyon sonucunda, sırasıyla, yaklaşık olarak %100, 95, 90, 80 ve 70 düzeyinde sıvılaştırmıştır. Nişasta konsantrasyonunun %30 ve 35 olduğu tüplerdeki akışkanlık çok az olmakla birlikte, yaklaşık %50 ve 40 oranında sıvılaşma gözlemlenmiştir. Nişasta miktarının %40, 45 ve 50 tüplerde yaklaşık %10'dan daha az miktarda sıvılaşma olduğu değerlendirilmiştir.

NA2 asidik amilaz enziminin %5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ve 50 nişastayı sıvılaştırması sonucu açığa çıkan % glukoz değeri sırasıyla, %5, 8, 10, 14, 14, 16, 13, 5, 5 ve 5 olarak bulunmuştur.

NP1 asidik pullulanaz enzimi ile yapılan sıvılaştırma testi sonucu Şekil 4.66'da gösterilmiştir.

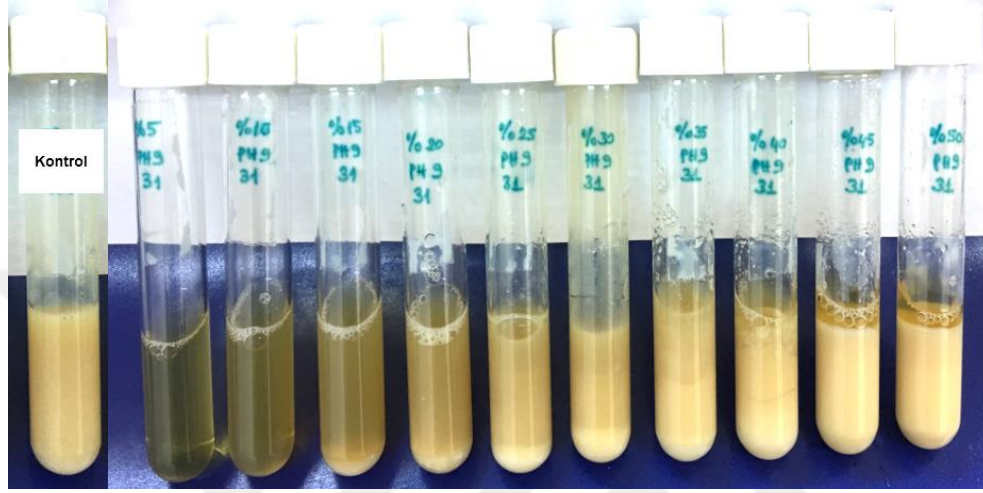


Şekil 4.66. NP1 Asidik Pullulanaz Enziminin Nişastayı Sıvılaştırma Davranışı

NP1 asidik pullulanaz enzimi %5, 10, 15, 20, 25, 30 ve 35 nişasta karışımlarını 50°C'deki inkübasyon sonucunda, sırasıyla, yaklaşık olarak %100, 95, 90, 90, 85, 80 ve 60 sıvılaştırmıştır. Nişasta konsantrasyonu %40, 45 ve 50 olan tüplerde sıvılaştırma oranının yaklaşık %10 olduğu görülmüştür.

NP1 asidik pullulanaz enziminin %5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ve 50 nişastayı sıvılaştırması sonucu açığa çıkan % glukoz değeri sırasıyla, %5, 8, 10, 12, 16.1, 16, 16.5, 4.5, 4 ve 4 olarak bulunmuştur.

NP2 alkali pullulanaz enzimi ile yapılan sıvılaştırma testi sonucu Şekil 4.67’de gösterilmiştir.



Şekil 4.67. NP2 Alkali Pullulanaz Enziminin Nişastayı Sıvılaştırma Davranışı

NP2 alkali pullulanaz enzimi %5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 ve 40 nişasta içeren tüplerdeki nişastalı karışımı, sırasıyla, yaklaşık olarak %100, 100, 95, 90, 80, 70, 60 ve 40 oranında sıvılaştırmıştır. İçerisinde %30-40 arasında nişasta bulunan tüplerde, konsantrasyona bağlı olarak, %5’e göre daha kıvamlı sıvılaşma meydana gelmiştir. Nişasta miktarının %45 ve 50 olduğu tüplerde yaklaşık %10 sıvılaşma gerçekleştiği görülmüştür.

NP2 alkali pullulanaz enziminin %5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ve 50 nişastayı sıvılaştırması sonucu açığa çıkan % glukoz değerleri, sırasıyla, %4, 8, 10, 13, 14, 16, 11, 8.5, 6 ve 5.5 olarak bulunmuştur.

Bütün sıvılaştırma denemelerinde %5 nişasta içeren tüpte %100 sıvılaştırma ve yüksek düzeyde akıcılık elde edildiği halde, BriX değerleri (açığa çıkan % glukoz miktarı) ortalama %4.5’tur. Buna karşılık, sıvılaşmanın (akıcılık anlamında) en düşük olduğu %50 nişasta içeren tüplerde ortalama elde edilen glukoz değeri %5 olarak bulunmuştur.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Farklı bölgelerden alınan toprak örnekleri sıvı besi yerlerinde inkübasyona bırakıldıktan sonra sporlu bakterilerin izolasyonu amacıyla ısısal ön işleminden geçirilmiştir. Tek kolonilerin elde edilmesi için katı besi yerlerine yayma ekimler yapılmış ve üreyen örneklerden koloni morfolojileri tipik *Bacillus* sp. görünümünde olan birbirinden farklı 324 suş seçilmiştir. 196'sı nötral, 128'i asidik özellikte olan bu suşlar, nişastalı ve pullulanlı besi yerlerinde üretilerek amilaz ve pullulanaz enzim aktivitesine sahip olup olmadıkları belirlenmiştir. 196 adet nötral suşun 97'si amilaz pozitif, 36'sı pullulanaz pozitif özellik gösterirken, 128 adet asidik suşun 28'inin amilaz pozitif, 13'ünün de pullulanaz pozitif olduğu tespit edilmiştir. Bu suşlar arasından gram pozitif, basil görünümlü, katalaz pozitif, aerob ve spor oluşturduğu belirlenen, en iyi amilaz ve pullulanaz enzim aktivitesine sahip asidik ve nötral suşlar seçilmiştir.

Seçilen sporlu bakterilerden nötral koşullarda üreyenlerin oranı ortalama %60.5 olarak hesaplanmıştır. Buna karşılık asidik koşullarda üreme yeteneğine sahip olan örneklerin oranı ortalama %39.5 bulunmuştur. Nötral suşlar içerisinde amilaz pozitif özellikteki örneklerin oranı yaklaşık %49.5 iken, pullulanaz aktivitesi gösteren suşlarınki yaklaşık %18.4 bulunmuştur.

Asidik koşullarda üreyen toplam 128 suştan amilaz enzimi üretme yeteneğine sahip olanların oranı yaklaşık %21.8, pullulanaz sentezleme özelliği bulunan suşlarınki ise yaklaşık %10.2 olarak hesaplanmıştır. Seçilen suşlar, sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere N1 katı besi yerlerine ekilerek stok kültürler halinde saklanmışlardır.

En iyi amilaz ve pullulanaz enzim aktivitelerine sahip olan suşların 16S rRNA dizi analiziyle moleküler tanımlamaları yapılmıştır. Moleküler karakterizasyonu yapılan suşlar, *Aeribacillus pallidus* NA1 (MF355419), *Geobacillus lituanicus* NA2 (MF355417), *Geobacillus thermoleovorans* NP1

(MF355416) ve *Anoxybacillus rupiensis* NP2 (MF355418) olarak adlandırılmışlardır (Çizelge 4.1).

Seçilen suşlar, katı besi yerinde üreme ve enzim sentezleme davranışlarının saptanması için nişastalı ve pullulanlı besi yerlerinde analiz edilmişlerdir. Tanımlanarak enzim üretimi için kullanılmak üzere seçilen *Aeribacillus pallidus* NA1 ve *Geobacillus lituanicus* NA2 suşları nişasta, *Geobacillus thermoleovorans* NP1 ve *Anoxybacillus rupiensis* NP2 suşları pullulan içeren pH'ları 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0 olan besi yerlerine ekildikten sonra, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 ve 70°C'lerde 72 saat inkübasyona bırakılmışlardır.

Aeribacillus pallidus NA1 suşunun (amilaz üreticisi) nişastalı katı besi yerinde en iyi ürediği ve enzim sentezini gerçekleştirdiği koşullar pH 7.0 (Çizelge 4.2) ve 45°C (Çizelge 4.3) olarak belirlenmiştir. Nişastalı besi yerinde üreyen ve iyot buharına tutularak amilaz enzim aktivitesi belirlenen *Geobacillus lituanicus* NA2 suşunun (amilaz üreticisi) katı besi yerinde en iyi ürediği ve enzim sentezini gerçekleştirdiği pH değeri 5.0 (Çizelge 4.4), sıcaklık ise 55°C olarak saptanmıştır (Çizelge 4.5).

Geobacillus thermoleovorans NP1 suşunun katı besi yerinde (pullulanaz üreticisi) en iyi ürediği ve enzim sentezini gerçekleştirdiği pH değeri 7.0 (Çizelge 4.6.), sıcaklık 45°C (Çizelge 4.7) iken, *Anoxybacillus rupiensis* NP2 suşunun (pullulanaz üreticisi) optimum ürediği ve enzim sentezini gerçekleştirdiği pH değeri 5.0 (Çizelge 4.8), sıcaklık 55°C (Çizelge 4.9) olarak belirlenmiştir.

Bakterilerin sıvı besi yerinde ürediği ve amilaz ve pullulanaz enzimlerinin sentezini gerçekleştirdiği optimum inkübasyon sürelerinin saptanması amacıyla, seçilen suşlar substratlı besi yerlerinde 55°C'de, 150 rpm hızdaki çalkalamalı inkübatörde 4 gün süreyle inkübasyona bırakılmışlardır. Inkübasyonun 0., 12., 24., 36., 48., 60., 72., 84. ve 96. saatlerinde kültürlerden örnekler alınarak, amilaz ve pullulanaz enzimlerine ait standart aktivite analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, *Aeribacillus pallidus* NA1 suşunun 60. (Şekil 4.13),

Geobacillus lituanicus NA2 suşunun 48. (Şekil 4.14), *Geobacillus thermoleovorans* NP1 suşunun 24. (Şekil 4.15) ve *Anoxybacillus rupiensis* NP2 suşunun 48. saatte optimum ürediği ve enzim üretimini gerçekleştirdiği bulunmuştur (Şekil 4.16).

Bakterilerin sıvı besi yerinde ürediği, amilaz ve pullulanaz enzim sentezlerini gerçekleştirdikleri optimum pH'nın saptanması amacıyla, amilaz üreticisi NA1 ve NA2 suşları, pH'ları 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0 olan M9 nişastalı sıvı besi yerlerinde 55°C'de ve 150 rpm'de inkübasyona bırakılmışlardır. Pullulanaz üreticisi NP1 ve NP2 suşları da, pH'ları 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0 olan pullulanlı sıvı besi yerlerinde 55°C ve 150 rpm'de, her suşa ait optimum inkübasyon sürelerinde üretilmişlerdir.

Gerçekleştirilen standart aktivite analizleri sonuçlarına göre, *Aeribacillus pallidus* NA1 suşunun nişastalı sıvı besi yerinde ürediği ve amilaz sentezlediği optimum pH değeri 7.0 (Şekil 4.17), *Geobacillus lituanicus* NA2 suşunun ise pH 5.0 olarak bulunmuştur (Şekil 4.18). Pullulanaz üreticisi *Geobacillus thermoleovorans* NP1 suşu, optimum üreme ve enzim sentezini pH 7.0'de gerçekleştirmiştir (Şekil 4.19). *Anoxybacillus rupiensis* NP2 suşunun enzim sentezini en iyi pH 5.0'te gerçekleştirdiği saptanmıştır (Şekil 4.20).

Suşlar sıvı besi yerinde üredikleri ve enzimlerini sentezlendikleri optimum sıcaklıklarının belirlenmesi amacıyla, M9 nişastalı ve pullulanlı sıvı besi yerlerinde 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 ve 70°C'de, 150 rpm hızdaki çalkalamalı inkübatörlerde üretilmişlerdir. Gerçekleştirilen enzim aktivite analizleri sonucunda *Aeribacillus pallidus* NA1 suşu 45°C (Şekil 4.21) ve *Geobacillus lituanicus* NA2 suşu 55°C'de (Şekil 4.22) amilaz enzimi en yüksek miktarda sentezlemişlerdir. *Geobacillus thermoleovorans* NP1 ve *Anoxybacillus rupiensis* NP2 suşlarından, sırasıyla, 45°C (Şekil 4.23) ve 55°C'de (Şekil 4.24) optimum enzim verimi elde edilmiştir.

Üreme ve enzim sentezleme optimizasyonu yapılan suşlar uygun substratları içeren sıvı besi yerlerine aşılanmıştır ve suşlara ait enzimlerin üretimleri

gerçekleştirilmiştir. Kültürler 7500 rpm’de, 4°C’de ve 20 dakika süreyle santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatantlar sonraki çalışmalarda ham enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

Aeribacillus pallidus NA1, *Geobacillus lituanicus* NA2, *Geobacillus thermoleovorans* NP1 ve *Anoxybacillus rupiensis* NP2 suşlarından elde edilen ve enzimleri içeren süpernatantlar substratlı katı besi yerlerine damlatılarak enzimlere ait hidroliz zonları tespit edilmiştir.

Spesifik aktivite analizlerine göre, *Aeribacillus pallidus* NA1 suşunun 12.063 U/mL, *Geobacillus lituanicus* NA2 suşunun 4.604 U/mL, *Geobacillus thermoleovorans* NP1 suşunun 2.105 U/mL ve *Anoxybacillus rupiensis* NP2 suşunun 1.867 U/mL enzim ürettikleri bulunmuştur. Protein miktar tayini neticesinde, *Aeribacillus pallidus* NA1 amilaz enziminin protein miktarı 6.2 µg/mL, *Geobacillus lituanicus* NA2 amilaz enziminin 3 µg/mL, *Geobacillus thermoleovorans* NP1 pullulanaz enziminin 5 µg/mL ve *Anoxybacillus rupiensis* NP2 pullulanaz enziminin 5.6 µg/mL’dir.

Aeribacillus pallidus NA1 suşundan izole edilen amilaz enziminin pH 4.0-11.0 aralığındaki tüm pH’larda ortalama %81 düzeyinde rölatif aktivite gösterdiği bulunmuştur. Enzim optimum aktivitesini pH 9.0’da göstermekle birlikte, pH 3.0’te %27, pH 4.0’te %77, pH 5.0’te %86, pH 6.0, 7.0 ve 8.0’de %73, pH 10.0’da %86 ve pH 11.0’de %82 aktivite göstermiştir. Özellikle alkali pH’larda ortalama %85 düzeyinde yüksek aktivite gösteren NA1 amilaz enzimi, geniş pH aralığında aktiviteye sahip alkali enzim özelliğindedir (Şekil 4.33).

Wang ve ark (2016), *Bacillus* sp. WangLB suşundan saflaştırdıkları amilaz enziminin optimum aktivitesini pH 9.0’da gösterdiğini ve enzimin pH 3.0-10.0 aralığında %85’ten fazla aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Geobacillus lituanicus NA2 suşundan izole edilen amilaz enzimi optimum aktivitesini pH 4.0’te göstermiştir. Enzim pH 3.0’te %17, pH 5.0’te %91, pH 6.0’da %72, pH 7.0’de %49 aktivite göstermiş pH 8.0’de enzim aktivitesi hızla

%18'e düşmüştür. Alkali pH'larda enzim aktivitesi düşük düzeyde elde edilmiştir. Özellikle pH 4.0, 5.0 ve 6.0 gibi asidik pH değerlerinde ortalama %81.5 oranında oldukça yüksek aktiviteye sahip olan NA2 amilaz enziminin oldukça asidik özellik gösteren bir enzim olduğu bulunmuştur (Şekil 4.34).

Sharma ve Satyanarayana (2013), asidofilik *Bacillus acidicola* suşundan elde ettikleri α -amilaz enziminin optimum aktivitesini pH 4.0'te gösterdiğini saptamışlardır.

Geobacillus thermoleovorans NP1 suşundan elde edilen pullulanaz enzimi optimum aktivitesini pH 6.0'da göstermiştir. Enzim pH 5.0'te %35, pH 7.0'de %90 ve pH 8.0'de %47 rölatif aktiviteye sahiptir. Enzimin aktivitesi alkali pH değerlerinde önemli oranda azalmıştır. Örneğin, pH 10.0'da %10, pH 11.0'de %8 rölatif aktivite elde edilmiştir. Benzer durum asidik koşullar için de geçerli olup, pH 4.0'te %28, pH 3.0'te ise %8 aktivite gerçekleşmiştir. Enzim asido-nötral özelliktedir.

Kunamneni ve Singh (2006), *Bacillus* sp. AN-7 suşundan elde ettikleri pullulanaz enziminin optimum aktivitesini belirlemek amacıyla, pH 3.0-9.0 aralığındaki aktivite analizi yapmışlardır. Bu reaksiyonlar sonucunda, enzimin optimum aktiviteye gösterdiği pH değerini 6.0 olarak bulmuşlardır. *Geobacillus thermoleovorans* suşundan elde edilen pullulanaz enzimi optimum aktivite değeri bakımından Kunamneni ve Singh'in (2006) sonuçları ile uyumludur.

Anoxybacillus rupiensis NP2 suşundan izole edilen pullulanaz enzimi en yüksek aktiviteyi pH 9.0'da göstermiştir (Şekil 4.34). Enzim pH 3.0-11.0 aralığında ortalama %81 rölatif aktiviteye sahiptir. NP2 pullulanaz enzimi asidik, nötral ve alkali özellikte bir enzimdir.

Kim ve ark (1993), alkalifilik *Bacillus* sp. S-1 suşundan saflaştırdıkları termofilik pullulanaz enziminin optimum pH 9.0'da aktif olduğunu belirtmişlerdir. *Anoxybacillus rupiensis* NP2 suşundan elde edilen enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değeri literatür ile benzerlik ve tutarlılık göstermektedir.

NA1 alkali amilaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık 50°C olarak bulunmuştur (Şekil 4.35). Enzim 30-100°C aralığında ortalama %65 oranında aktivite göstermiştir. Enzim 30-70°C aralığında ortalama %87.4 aktivite elde edilirken, 70°C'den yüksek sıcaklıklarda rölatif aktivitede azalma görülmüştür. Enzim 70°C'de %83, 80°C'de %70 ve 100°C'de %53 aktivite göstermiştir. Enzim bu özellikleri nedeniyle termofilik uygulamalar için uygundur. Vijayaraghavan ve ark (2015), *Bacillus cereus* IND4 suşundan elde edilen amilaz enziminin 50°C de optimum aktivite gösterdiğini saptamışlardır.

Yapılan analizlerde, NA2 asidik amilaz enziminin 60°C'de optimum aktivite gösterdiği bulunmuştur. Enzimin aktivitesi 30°C'den 60°C'ye kadar hızla yükselmiş ve %80 aktivite artışı gerçekleşmiştir. Enzim, sıcaklığın 60°C'den 100°C'ye artırılmasıyla aktivitesinde yaklaşık %83 oranında azalma göstermiştir (Şekil 4.36). Bu sonuçlara göre, NA2 asidik amilaz enzimi termofilik bir enzimdir.

Kalpana ve Pandian (2014), *Bacillus subtilis* S8-18 suşundan elde ettikleri asidik α -amilaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerinin 60°C olduğunu bulmuşlardır.

NP1 asidik pullulanaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık 50°C bulunmuştur (Şekil 4.37). Enzim 30°C'de %38, 40°C'de %84 aktivite gösterirken sıcaklık 60°C'ye yükseltildiğinde aktivite %52'ye düşmüştür. Enzimin 70-100°C aralığındaki aktivitesi ortalama %16.25 olarak bulunmuştur. Bu bulgulara göre, NP1 pullulanaz enzimi termo-tolerant özelliktedir.

Kahar ve ark (2016), *Anoxybacillus* sp. SK3-4 suşundan saflaştırdıkları asidik tip I pullulanaz (PulsASK) enzimini 30-100°C aralığında aktivite analizine tabi tutmuşlar ve enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerinin 60°C olduğunu saptamışlardır.

NP2 alkali pullulanaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri 60°C bulunmuştur (Şekil 4.38). Enzim 30-80°C aralığında ortalama %81.2 oranında oldukça yüksek aktiviteye sahiptir ve 80°C'de %63 aktivite göstermiştir.

Bu değerler dikkate alındığında, NP2 pullulanaz enziminin geniş sıcaklık aralığında aktivite gösteren termofil özellikte bir enzim olduğu görülmektedir.

NA1 alkali amilaz enziminin, tüm pH değerleri dikkate alındığında, ortalama %103 oranında oldukça yüksek stabiliteye sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.29.). Enzim pH 4.0, 5.0, 9.0, 10 ve 11.0 de %106 ile en yüksek düzeyde stabilite göstermiştir.

Nithya ve ark (2016), *Bacillus licheniformis* KSU-6 suşundan izole ettikleri alkali amilaz enzimini pH 4.0-12.0 aralığındaki pH tamponlarında 1 saat süreyle ön-inkübasyona bırakmışlardır. Enzim, pH 8.0, 9.0 ve 10.0'da aktivitesinin %100'ünü korurken, pH 11.0'de %91 ve pH 12.0'de %85 kalan aktiviteye sahiptir.

Aeribacillus pallidus NA1 suşundan izole edilen amilaz enziminin farklı pH tamponlarındaki ön inkübasyon süresinin literatürlerdekilere göre daha uzun olmasına rağmen (literatürlerde 15-210 dakika, NA1 amilaz 24 saat) enzimin inhibe olmadığı görülmüştür. Bütün pH'lardaki ortalama aktivite %103 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar literatüre göre oldukça çarpıcı ve enzim kararlılığı açısından farklı olup, enzim ekstrem pH'larda stabil veya pH ile indüklenebilen özelliktedir.

NA2 asidik amilaz enzimi pH 3.0-11.0 aralığında ortalama %120.2 oranında stabil kalmıştır. Enzim stabilitesini geniş bir pH aralığında yüksek oranda koruduğu, aktivitesinin inhibe olmadığı ve indüklendiği bulunmuştur.

Kalpana ve Pandia'nın (2014) *Bacillus* sp. S8-18 suşundan elde ettikleri amilaz enziminin, 24 saat süreyle 4.0-12.0 aralığındaki pH'larda ön inkübasyona bırakıldığında, %84-94 oranlarında oldukça yüksek stabilite değerlerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda pH 5.0-12.0 aralığında ortalama %90 kalan aktivite değeri ölçülmüştür. NA2 asidik amilaz enziminin pH stabilite çalışmaları 24 saat ön inkübasyon yapılarak gerçekleştirilmiştir. Kalpana ve Pandia'nın (2014) çalışmaları dışındaki literatürlerde ön inkübasyon süresi genellikle 60 dakikadır.

NA2 asidik amilazın pH stabilite çalışmalarında 24 saat ön inkübasyon

sonunda aktivitesini korumanın ötesinde aktivitede artış olması, enzimin pH ile indüklenebilir, asidik-nötral-alkali koşullarda yüksek düzeyde stabil karaktere sahip olduğunu göstermektedir. Enzim bu özelliği nedeni ile işlem süresi 60 dakikadan daha uzun olan alanlardaki uygulamalar için kullanım potansiyeli oldukça yüksek bir adaydır.

NP1 asidik pullulanaz enziminin pH 3.0-12.0 aralığındaki ortalama stabilite değerinin %108.1 olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.41). Enzim tüm pH'larda oldukça yüksek stabiliteye sahiptir. Optimum aktivitesini pH 6.0'da gösteren NP1 pullulanaz enzimi, pH 6.0 tamponundaki ön inkübasyonundan sonra başlangıç aktivitesini %105 oranında korumuştur. Enzim pH 8.0-12.0 aralığında yaklaşık %112, pH 3.0-7.0 aralığında ortalama %104 aktivite göstermiştir. Asidik ve alkali koşullarda enzimin indüklenmesi enzimin, çok geniş aralıkta ve özellikle alkali koşullarda aktivite gösteren alanlar için güçlü bir aday olduğunu göstermektedir.

Gomes ve ark (2003), termofilik *Rhodothermus marinus*'tan elde ettikleri pullulanaz enzimini pH 4.0-10.0 aralığındaki 24 saatlik ön inkübasyona bırakıp, standart enzim aktivitesi tayini yapmışlar ve enzimin pH stabilitesini belirlemişlerdir. pH 5.0-9.0 aralığında oldukça iyi sabilite değerlerine sahip olan enzim, pH 6.0'da başlangıç aktivitesinin %100'ünü korumuştur. NP1 asidik pullulanaz enziminin pH stabilite değerleri Gomes ve ark'nın (2003) değerleri ile yakınlık göstermektedir.

NP2 alkali pullulanaz enzimi pH 3.0-12.0 aralığında ortalama %102.4 oranında stabil kalmıştır (Şekil 4.42). Geniş pH stabilitesi spektrumuna sahip olan NP2 enzimi, pH 6.0'da %131 stabilite göstermiştir. NP2 enzimi, pH 3.0-6.0 aralığındaki ortalama %110 oranında stabil kalmıştır.

Lee ve ark (2016), *Hermetia illucens* (Siyah Asker Böceği) larvasının bağırsak mikroflorasından elde ettikleri alkalifilik pullulanaz enziminin (PulSS4) pH stabilitesini belirlemek amacıyla, enzimi pH 5.0-11.0 aralığındaki değerlerde 24 saat süreyle ön inkübasyona bırakmışlardır. Ön inkübasyon süresi sonunda

gerçekleştirilen standart aktivite analizlerine göre, PulSS4 pullulanaz enziminin, asidik ve alkali koşullarda, başlangıç aktivitesinin %80'inden fazlasını koruduğu tespit edilmiştir. NP2 alkali pullulanaz enzimine ait bulgular literatürle benzerlik göstermektedir.

NA1 alkali amilaz enziminin 30-100°C aralığında başlangıç aktivitesinin ortalama %100'ünü koruduğu belirlenmiştir (Şekil 4.43). Optimum aktivite gösterdiği sıcaklık 50°C olmasının yanı sıra, enzim, analizi yapılan tüm sıcaklık değerlerinde aktivitesini oldukça yüksek oranlarda korumuştur. Enzim aktivitesi 40-60°C'ler arasında indüklenerek ortalama %101 aktivite değeri elde edilmiştir. Bu bulgular, enzimin termostabil karakterde olduğunu göstermektedir.

Nithya ve ark (2016), *Bacillus licheniformis* KSU-6 suşundan izole ettiği alkali amilaz enzimini 40-100°C aralığındaki sıcaklıklarda 60 dakika süreyle ön-inkübasyona bırakmışlardır. Daha sonra standart aktivite analizi yapıldığında en yüksek aktivite (%100) 50 ve 60°C'lerde gözlemlenmiştir. 100°C'de ise enzimin %58 oranında aktivitesinin korunduğu tespit edilmiştir. NA1 alkali amilaz enzimi 100°C'de orijinal aktivitesini %97 oranında korumuştur.

NA2 asidik amilaz enzimi 30-100°C sıcaklıklarda ortalama %72.13 oranında stabilite değerine sahiptir. Enzim 30-80°C aralığındaki sıcaklıklarda ön inkübasyondan sonra orijinal aktivitesini ortalama %93 korumuştur. Enzim 90°C'de %86, 100°C'de ise %93 inhibe olmuştur. Optimum aktivite sıcaklığı 60°C olan NA2 asidik amilaz enziminin sıcaklık stabilitesi 90°C'den sonra hızla düşmüştür. Bu bulgulara göre, enzim termostabil olmakla birlikte 80°C'den daha yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilecek uygulamalar için yeterli stabiliteye sahip değildir.

Asad ve ark (2011), *Bacillus* sp. WA21 suşundan kısmi olarak saflaştırdıkları termo-asidik α -amilaz enzimi, 35-85°C gibi geniş bir sıcaklık aralığında 10 dakika süreyle inkübe edildiğinde ortalama %60'tan daha fazla oranda stabil kalırken, 65°C'de orijinal aktivitesinin %100'ünü koruduğu

belirlenmiştir. WA1 amilaz enzimi 85°C’de %50 inhibe olmuştur.

NP1 asidik pullulanaz enziminin 30, 40 ve 50°C sıcaklık değerlerinde %90 oranında stabil kalmıştır. Optimum aktivitesini 50°C’de gösteren NP1 pullulanaz enziminin 50°C’de aktivitesinin %90’ını korumuştur (Şekil 4.45).

Kahar ve ark (2016), *Anoxybacillus* sp. SK3-4 suşundan izole ettikleri tip I pullulanaz (PulsASK) enziminin 30-60°C aralığındaki başlangıç aktivitesinin neredeyse tamamını korumuş, ancak 60°C’den sonra stabilitenin düşüşe geçtiği görülmüştür. Enzim 100°C’de aktivitesinin tamamını kaybetmiştir.

NP2 alkali pullulanaz enziminin 30-100°C aralığındaki sıcaklıklardaki stabilite ortalaması %90.5’tir (Şekil 4.46). Enzim 70, 80, 90 ve 100°C’lerde ortalama %100 stabil kalmıştır. Bu değerler, NP2 pullulanaz enziminin yüksek oranda termal stabiliteye sahip bir enzim olduğunu göstermektedir. NP2 enzimi, termostabil enzimlerin yoğun olarak kullanıldığı nişasta sıvılaştırma uygulamaları ve yüksek sıcaklık kullanılan yıkama işlemleri için uygun özellikler taşımaktadır.

Samah ve ark (2005), *Bacillus flavothermus* KWF-1 suşundan izole ettikleri alkali pullulanaz enziminin 90°C’ye kadar başlangıç aktivitesinin büyük bir kısmını korurken, 90°C’nin üzerindeki sıcaklıklarda aktivitesini kaybettiği görülmüştür.

NA1 alkali amilaz 5 mM CaCl₂ konsantrasyonda aktivitesini %96 korurken, bu oran 10 mM’lık konsantrasyonda %93.4 olarak elde edilmiştir. Enzim 5 mM ZnCl₂ konsantrasyonunda %98, 10 mM konsantrasyonda %88 oranında stabilitesini korumuştur. CuCl₂, MnCl₂ ve CoCl₂’nin her iki konsantrasyonu da enzim aktivitesini önemli düzeyde artırmıştır. Enzim 5 mM PMSF ile aktivitesini %99.1, 10 mM konsantrasyonda % 94.4 korumuştur. Bu durum, enzimin aktif bölgesindeki serin aminoasit içeriğinin düşük olduğunu göstermektedir (Aygan, 2008). Enzim aktivitesi 5 mM EDTA ile indüklenerek %105.2 aktivite elde edilirken, 10 mM konsantrasyonda % 92.3 kalan aktivite elde edilmiştir. Enzim, 4 M üre ile %36, 8 M üre ile %87.7 oranında inhibe olmuştur. Ürenin enzimi inhibe

etmesi enzimin hidrofobik aminoasitlerden oluştuğunun bir göstergesidir (Samie ve ark, 2012). %1 SDS ile muamele edildiğinde aktivitesinin %93.3'ünü koruyan, %5 SDS ile aktivitesi %51 oranında inhibe olan NA1 alkali amilaz enziminin SDS'ye önemli derecede dirençli olması, onu deterjan formülasyonlarında kullanılma potansiyeli yüksek bir aday yapmaktadır. TritonX-100'ün %1 ve %5'lik konsantrasyonları enzim aktivitesini, sırasıyla, %103 ve %94.1 oranlarında indüklemiştir. %1 Tween 20 ve Tween 80 aktiviteyi, sırasıyla, %109 ve 105 oranında indüklemiştir. β -merkaptotanol'ün %1 konsantrasyonu, enzim aktivitesini %106.1 artırırken, %5'lik konsantrasyonu %95 inhibe etmiştir. Enzim, H_2O_2 'nin %1 konsantrasyonunda %60, %5'lik konsantrasyonda tamamen inhibe olmuştur.

$CaCl_2$ 'nin her iki konsantrasyonu da NA2 asidik amilaz enziminin aktivitesini çok etkilememekle birlikte, 5 mM ve 10 mM $CaCl_2$ konsantrasyonlarında, sırasıyla, % 84 ve % 88.1 kalan aktivite değerleri elde edilmiştir. NA2 amilaz enziminin, 5 mM $ZnCl_2$ ile aktivitesinin %90'ını ve 10 mM ile aktivitesinin % 86.3'ünü koruduğu tespit edilmiştir. Enzimin $ZnCl_2$ ile inhibe olması, enzimin termostabil ve termofilik bir enzim olduğunu göstermektedir (Ozturk ve ark, 2013; Aygan, 2008). 5 mM $MnCl_2$ 'de %147, 10 mM'da ise %124 aktivite değeri elde edilmiştir. Enzim, 5 mM ve 10 mM PMSF ile muamele edildiğinde aktivitenin, sırasıyla, %82 ve 84.4 korunduğu saptanmıştır. Enzimin PMSF'den etkilenmemesi, aktif bölgesinde serin aminoasit içeriğinin düşük olduğunu göstermektedir. Enzim, 5 ve 10 mM EDTA ile aktivitesini, sırasıyla, %75 ve 85 oranında korumuştur. NA2 asido-termofilik amilaz enziminin EDTA ile inhibe olmaması enzimin aktif merkezinde metal iyonu bulunmadığını göstermektedir. SDS, TritonX-100, Tween 20 ve Tween 80'in %1 ve %5 konsantrasyonlarında, enzim aktivitesi, sırasıyla, %82.4 ve %83.1, %80.2 ve %88, %89.3 ve %89.4, %94.2 ve %94.4 oranlarında stabil kalmıştır. Bu sonuçlar, NA2 amilaz enziminin deterjanlara oldukça dayanıklı olduğu göstermektedir. Enzim

aktivitesinin %1'lik β -merkaptotanol ile indüklenmesi, enzimin aktif bölgesinde dimerik formda sistin aminoasiti bulunduğunu göstermektedir. H_2O_2 'nin %1 ve %5'lik konsantrasyonları NA2 asidik amilaz enzimini önemli düzeyde inhibe etmesi, enzimin okside edici ve ağartıcı bileşiklere karşı dirençsiz olduğunu göstermektedir.

NA2 amilaz, Ca^{+2} bağımsız, termostabil ve asidik, serin amino asitlerince zengin olmayan içeriğe sahip, metaloenzim özelliği zayıf, hidrofobik aminoasitlerden oluşan, yapısında disülfid bağı taşımayan, tiol grupları bulunduran, deterjanlara dirençli, aktivitesi için kısmen metal iyonlarına gerek duyan, deterjan ve nişasta endüstrisi için uygun özellikler taşıyan bir enzimdir.

NP1 asidik pullulanaz 5 ve 10 mM $CaCl_2$ konsantrasyonlarında aktivitesini %100'e yakın korumuştur. NP1 asidik pullulanazın aktivitesi 5 mM Cu^{+2} ile %110 iken, 10 mM Cu^{+2} ile %115'tir. PMSF'nin her iki konsantrasyonunda da enzimin başlangıç aktivitesi korunmuştur. Bu durum, enzimin aktif bölgesindeki serin aminoasit içeriğinin düşük olduğunu göstermektedir. 5 mM EDTA ile %92, 10 mM EDTA ile % 101.3 aktivite gösteren enzimin aktivitesinde, EDTA ile inhibisyon gerçekleşmediğinden, enzimin metaloenzim olmadığı düşünülmektedir. Enzim aktivitesi %1 β -merkaptotanol ile %145 oranında artarken, %5 β -merkaptotanol enzim aktivitesini %93.7 inhibe etmiştir. %1 H_2O_2 enzimi %80.7 oranında inhibe ederken, %5 H_2O_2 enzimin tamamını inhibe etmiştir. Bu sonuç enzimin okside edici ajanlara karşı dayanıksız olduğunu göstermektedir.

NP1 asidik pullulanaz, termostabilitesi zayıf, serin aminoasit içeriği zayıf, metaloenzim özelliği göstermeyen, okside edici ajanlardan etkilenen, hidrofobik amino asit içeriği zengin, deterjanlara önemli ölçüde dirençlilik gösteren bir enzimdir.

NP2 alkali pullulanaz enzimi, 5 mM $CaCl_2$ ile muamele edildiğinde %176 oranında aktivite göstermiştir. Bu sonuca göre, enzim Ca^{+2} -bağımlı bir enzimdir. NP2 alkali pullulanaz enzimi, 5 mM $ZnCl_2$ ile %148 aktivite gösterirken, 10 mM

ZnCl₂ ile aktivite %78'e düşmüştür. Enzimin aktivitesi 5 mM Mn⁺² ile %220, Mg⁺² ile %172, Co⁺² ile %162, Hg⁺² ile %170, Ba⁺² ile %153 ve Cu⁺² ile %141'dir. Enzim, 5 mM PMSF ile %170 oranında aktivite gösterirken, 10 mM PMSF ile muamele edildiğinde aktivitenin %96.4'e düştüğü tespit edilmiştir. 5 mM EDTA ile %193 oranında yüksek bir aktivite sergilerken ve 10 mM EDTA ile de başlangıç aktivitesini %84.1 oranında korumuş olan NP2 alkali pullulanaz enziminin EDTA ile inhibe olmaması, enzimin bir metaloenzim olmadığını göstermektedir. SDS, TritonX-100, Tween 20 ve Tween 80 ajanlarının %1 ve %5'lik konsantrasyonlarındaki enzim aktivitesini sırasıyla, %83.1 ve 63, %185.2 ve 111.4, %182 ve 91, %172 ve 87.3'tür. Bu sonuçlar, NP2 alkali pullulanaz enziminin deterjanlara ve yüzey aktif ajanlara karşı oldukça dayanıklı olduğunu göstermektedir. Enzim, β-merkaptetanolün %1'lik konsantrasyonu ile %240 oranında oldukça yüksek bir aktivite değeri göstermiştir. Bu durum, enzimin aktif bölgesinde fazla miktarda sistin dimerik aminoasitlerinin bulunduğunu göstermektedir. Enzim aktivitesi %1 H₂O₂ ile %104 değerine ulaşırken, %5'lik H₂O₂ konsantrasyonunda orijinal aktivitenin %59'u inhibe olmuştur.

İzole edilen NP2 alkali pullulanaz enzimi, serin ve histidin amino asitleri içermeyen, Ca⁺²-bağımlı, deterjan, okside edici ajanlar, yüzey aktif bileşikler ve birçok metal iyonuna dirençli olma gibi özelliklere sahiptir.

NA1 alkali amilaz enzimi %1, 5, 10 ve 15 NaCl konsantrasyonlarında, sırasıyla, %54, 58, 53 ve 41 aktivite göstermiştir (Şekil 4.47). En yüksek aktivite %5'lik NaCl konsantrasyonunda %58 olarak gerçekleşirken, tüm NaCl konsantrasyonlarındaki ortalama aktivite değeri %51.5 olarak bulunmuştur. Bu sonuç enzimin orta düzeyde halofilik özellikte olduğunu göstermektedir.

NA2 asidik amilaz enzimi %1, 5, 10 ve 15'lik NaCl konsantrasyonlarıyla muamele edildiğinde, sırasıyla, %47, 54, 58 ve 57 oranlarında stabil kalmıştır (Şekil 4.48). Tüm tuz konsantrasyonlarında ortalama %54 oranında stabilitesini

koruyan NA2 asidik amilaz enziminin, en yüksek aktivitesi %10 NaCl konsantrasyonunda %58 olarak ölçülmüştür.

NP1 asidik pullulanaz enzimi %1, 5, 10 ve 15'lik NaCl konsantrasyonlarında, sırasıyla, %46, 50, 50 ve 48 aktivite göstermiştir (Şekil 4.49). Enzim en yüksek aktiviteyi %5-10 konsantrasyonlarda %50 düzeyinde göstermiştir. Bütün tuz konsantrasyonları değerlendirildiğinde ortalama aktivite %48.5 olarak gerçekleşmiştir.

NP2 alkali pullulanaz enziminin %1, 5, 10 ve 15'lik NaCl ile elde edilen kalan aktivite değerleri, sırasıyla, %48, 48, 50 ve 46'dır (Şekil 4.50). Tüm tuz konsantrasyonlarında ortalama %48 oranında stabil kalan NP2 alkali pullulanaz enziminin en yüksek stabilite değeri %10 NaCl'de bulunmuştur (%50).

TLC analizi sonucunda, NA1 amilaz enziminin %1, %2 ve %4 nişasta ve pullulanı 24 saatlik inkübasyon sonunda glukozu kadar tamamen hidrolize ettiği bulunmuştur. NA1 alkali amilaz enzimi %4 pullulanı glukozu hidrolize etmiştir. Hidroliz ürünlerine göre NA1 alkali amilaz enziminin α -amilaz ve amilopullulanaz olduğu bulunmuştur. Aygan ve arkadaşları (2014), *Bacillus subtilis* A10 suşundan elde ettikleri alkalifilik alfa-amilaz enziminin nişastayı 45°C'de 60 dakika sonunda glukoz, maltoz ve diğer oligosakkaritlere hidrolize ettiğini belirtmişlerdir.

NA2 asidik amilaz enzimi, %1, %2 ve %4 konsantrasyonda 24 saat inkübe edildiği zaman nişasta ve pullulanı maltoz, maltotrioz ve diğer oligosakkaritlere kadar parçaladığı bulunmuştur. Enzim, maltojenik amilaz ve amilopullulanaz özelliğindedir. NA2 asidik amilaz enzimine ait sonuçlar literatürdekiler ile uyumlu olup, enzim fırıncılık endüstrisi için uygun özellikler taşımaktadır.

NP1 asidik ve NP2 alkali pullulanaz enzimlerinin TLC analizlerinde %4 konsantrasyondaki pullulan ve nişastayı glukoz, maltoz, maltotrioz ve maltodekstrinin dahil olduğu diğer oligosakkaritlere kadar hidrolize ettikleri bulunmuştur (Şekil 4.52). Her iki enzim de nişasta ve pullulanı glukozu kadar hidrolize etmiştir. Bu özelliklerinden dolayı NP1 asidik pullulanaz ve NP2 alkali

pullulanaz enzimleri tip II pullulanazlardır (amilopullulanaz). Song ve arkadaşları (2016), derin deniz bakterisi olan *Luteimonas abyssi* XH031 suşundan izole ettikleri alkalifilik α -amilaz enziminin (LaaA) nişastayı hidroliz glukoz, maltoz ve maltotrioza hidrolize ettiğini saptamışlardır.

Lee ve ark (2016), *Hermetia illucens* (Siyah Asker Böceği) larvasının bağırsak mikroflorasından elde ettikleri alkalifilik pullulanaz enziminin, pullulanı maltotrioz birimlerine kadar hidrolize ederken, nişastayı glukoz, maltoz, maltotrioz ve maltotetroz birimlerine kadar indirgediği ve bu enzimin tip II pullulanazlar (amilopullulanazlar) sınıfına girdiği belirlenmişlerdir.

NP2 alkali pullulanaz ve NA2 asidik amilaz karışımı nişastayı glukoz, maltoz, maltotrioz ve diğer oligosakkaritlere kadar hidrolize etmiştir. NP1 asidik pullulanaz ve NP2 alkali pullulanaz karışımı pullulanı glukoz, maltoz, maltotrioz kadar hidrolize etmiştir. NA2 asidik amilaz ve NA1 alkali amilaz, nişastayı maltotrioz, maltoz ve yüksek oranda glukozu hidrolize etmiştir. NA2 asidik amilaz ve NP2 alkali pullulanaz karışımı nişastayı maltotrioz ve maltoza hidrolize etmiştir. Amilaz ve pullulanaz enzimleri birlikte kullanıldıkları zaman nişasta ve pullulanı 24 saat sonunda tamamen glukoz, maltoz, maltotrioz ve diğer maltoz türevi oligosakkaritlere hidrolize ettikleri görülmektedir. Enzimler birlikte kullanıldıkları zaman nişastanın sıvılaştırılması işlemlerinde glukoamilaz enzimine gerek kalmaksızın yüksek düzeyde verim alınması mümkündür.

NA1 alkali amilaz enziminin %10'luk SDS-PAGE jel analizinde moleküler ağırlığı yaklaşık 165 kDa olarak hesaplanmıştır. NA2 amilaz enziminin moleküle ağırlığı SDS-PAGE jel analizinde yaklaşık 200 kDa olarak hesaplanmıştır.

NP1 pullulanaz enziminin %8 SDS-PAGE jeline yapılan zimogram analizinde moleküler ağırlıkları yaklaşık 112 ve 107 kDa olan iki ayrı aktivite bandı elde edilmiştir.

NP2 alkali pullulanaz enziminin SDS-PAGE jeline yapılan analiz sonunda moleküler ağırlığı 113 kDa bulunmuştur.

Enzimlerin yıkama performansları ile ilgili yapılan testlerde oldukça başarılı leke giderim sonuçları alınmıştır. Yemek sosu ile lekelenmiş kumaş sadece P1 enzimi ile yıkandığında işlem görmemiş yemek sosu örneğine göre %90 temizlenmiş görünmektedir. Yemek sosu ile lekelenmiş örnek %1 deterjan ve P1 enzim karışımı ile yıkandığında işlem görmemiş örneğe göre tamamen temizlenmiş görünmektedir. Lekesiz kontrol bezi ile yakın temizlikte görünüme sahiptir.

Yemek sosu ile lekelenmiş örnek %1 deterjan ve A1 alkali amilaz enzim karışımı ile yıkandığında işlem görmemiş örneğe kıyasla leke yok denecek düzeyde giderilmiştir. Yemek sosu ile lekelenmiş kumaş örneğinde P1 asidik pullulanaz enzimi ve %1 deterjan karışımının yıkama performansı A1 alkali amilaz ve %1 deterjan karışımında yıkanan örneğe göre daha başarılı olmuştur. Yemek sosu ile lekelenmiş bezlerin %1 deterjan ve A2 asidik amilaz karışımı ile %1 deterjan ve P2 alkali pullulanaz karışımları ile yapılan yıkama işleminde işlem görmemiş yemek soslu kumaş örneğine kıyasla yüksek bir performans gerçekleştiği görülmektedir. Yemek sosu örneklerinde A1 alkali amilaz+deterjan karışımı ile P1 asidik pullulanaz+deterjan karışımı uygulamasında, A2 asidik amilaz+deterjan ve P2 alkali pullulanaz+deterjan karışımına göre yıkama performansı açısından daha başarılı görülmektedir.

Bebek maması ile lekelenmiş kumaşların NA1 alkali amilaz ve %1 deterjan karışımı ile NP1 asidik pullulanaz ve %1 deterjan karışımı örneklerinde işlem görmemiş bebek maması ile lekelenmiş örneğe göre %100'e yakın temizlendiği görülmektedir. Elde edilen görünüm lekesiz örneklerle benzer olup, NP1 asidik pullulanaz ve %1 deterjan karışımı, NA1 alkali amilaz ve %1 deterjan karışımına göre daha başarılıdır. Bebek maması ile lekelenmiş kumaşın NA2 asidik amilaz ve %1 deterjan karışımında yıkanması işleminden sonra işlem görmemiş bebek maması örneğine kıyasla, %100'e yakın temizlik gerçekleşmiştir. Bebek maması ile lekelenmiş kumaşın NP2 alkali pullulanaz ve %1 deterjan karışımı ile yıkanması sonucunda işlem görmemiş bebek maması örneğine göre %100 leke

giderimi gözlemlenmiştir. Bebek maması örneğinde NP2 alkali pullulanaz ve %1 deterjan karışımı çok daha başarılı performans göstermiştir. Yıkanan kumaştaki görünüm, işlem görmemiş kumaştaki ile benzerdir. Bebek maması örneğinde NP2 alkali pullulanaz ve %1 deterjandan oluşan karışımın kirlilik gideriminde NA2 asidik amilaz ve %1 deterjandan oluşan karışıma göre daha başarılı olduğu belirlenmiştir.

Çikolata ile lekelenmiş kumaşın NA1 alkali amilaz ve %1 deterjan karışımı ile yıkanması işleminde işlem görmemiş örneğe göre %100'e yakın renk giderimi söz konusudur. Çikolata ile kirlenmiş kumaşın %1 deterjan ve NP1 asidik pullulanaz karışımı ile yıkanması sonucunda işlem görmemiş örneğe göre kirliliğin tamamen giderildiği görülmektedir. Elde edilen sonuç, hiç lekelenmemiş kumaştaki ile benzerdir. Çikolata kirliliğinin temizlenmesinde NP1 asidik pullulanaz ve %1 deterjan karışımı, NA1 alkali amilaz ve %1 deterjan karışımına göre daha yüksek yıkama performansı göstermiştir.

Çikolata kirliliği bulunan kumaş NA2 asidik amilaz ve %1 deterjan karışımı ile yıkandığında kirliliğin tamamen giderildiği görülmektedir. Çikolata lekeli kumaşın NP2 alkali pullulanaz ve %1 deterjandan oluşan karışım ile yıkandığında işlem görmemiş çikolata lekeli kumaşa göre kirliliğin tamamen giderildiği gözlenmiştir. Özellikle NP2 alkali pullulanaz ve %1 deterjandan oluşan karışım çikolata kirliliğinin gideriminde %100 yıkama performansı göstermiştir.

Bu sonuçlara göre, özellikle NP2 alkali pullulanazın leke gideriminde çok daha başarılı olduğu görülmüştür. Enzimin optimum aktivitesini pH 9.0'da göstermesi deterjan formülasyonu için ideal bir enzim olduğunu göstermektedir. Enzim özellikle çikolata ve bebek maması ile oluşturulan kirlilikte yemek sosuna göre çok daha yüksek performans göstermiştir. Endüstriyel deterjan üretiminde deterjan içerisine %0.1-1 oranında enzim eklenmektedir. Gerçekleştirdiğimiz çalışmada %1 deterjan ve 500 U/mL enzimin yanı sıra, kalan kısmın çeşme suyundan oluşması enzimlerin ne denli başarılı olduğunu göstermektedir.

Roohi ve Saima (2013), *Bacillus cereus* GA6 suşundan izole ettikleri α -amilaz enziminin yıkama performans analizini gerçekleştirmişlerdir. Sonuçlara göre, alkali α -amilaz enzimi deterjanla birlikte kullanıldığında leke gideriminde oldukça yüksek etkinlik göstermiştir. Yalnızca deterjan kullanımına kıyasla, deterjan ve enzim kombinasyonu ile yıkanan yemek sosu, bebek maması ve çikolata ile lekelenmiş kumaşlardaki leke giderimi daha iyi bulunmuştur.

NA1 alkali amilaz enzimi %5, 10, 15, 20, 25 ve 30 konsantrasyondaki nişasta karışımlarını 50°C'deki inkübasyon sonucunda, sırasıyla, yaklaşık olarak %100, 95, 90, 80, 80 ve 80 sıvılaştırmıştır. NA1 alkali amilaz enziminin %5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ve 50 nişastayı sıvılaştırması sonucu açığa çıkan % glukoz değeri BriX sistemiyle ölçüldüğünde sırasıyla, %4, 8, 10, 12.2, 15, 17.5, 18, 19, 19 ve 6 glukoz açığa çıktığı bulunmuştur.

NA2 asidik amilaz enzimi %5, 10, 15, 20 ve 25 nişasta karışımlarını 60°C'deki inkübasyon sonucunda, sırasıyla, yaklaşık olarak %100, 95, 90, 80 ve 70 düzeyinde sıvılaştırmıştır. Nişasta konsantrasyonunun %30 ve 35 olduğu tüplerde akıcılık zayıf olmakla birlikte yaklaşık %50 ve 40 sıvılaşma belirlenmiştir. NA2 asidik amilaz enziminin %5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ve 50 nişastayı sıvılaştırması sonucu açığa çıkan % glukoz değeri sırasıyla, %5, 8, 10, 14, 14, 16, 13, 5, 5 ve 5 bulunmuştur.

NP1 asidik pullulanaz enzimi %5, 10, 15, 20, 25, 30 ve 35 nişasta karışımlarını 50°C'deki inkübasyon sonucunda, sırasıyla, yaklaşık olarak %100, 95, 90, 90, 85, 80 ve 60 sıvılaştırmıştır. NP1 asidik pullulanaz enziminin %5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ve 50 nişastayı sıvılaştırması sonucu açığa çıkan % glukoz değeri sırasıyla, %5, 8, 10, 12, 16.1, 16, 16.5, 4.5, 4 ve 4 olarak bulunmuştur.

NP2 alkali pullulanaz enzimi %5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 ve 40 nişasta içeren tüplerde sırasıyla, yaklaşık olarak %100, 100, 95, 90, 80, 70, 60 ve 40 sıvılaştırmıştır. NP2 alkali pullulanaz enziminin %5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45

ve 50 nişastayı sıvılaştırması sonucu açığa çıkan % glukoz sırasıyla, %4, 8, 10, 13, 14, 16, 11, 8.5, 6 ve 5.5 bulunmuştur.

Bütün sıvılaştırma denemelerinde %5 nişasta içeren tüpte %100 sıvılaştırma ve su gibi akıcılık elde edildiği halde BriX değerleri ortalama (açığa çıkan % glukoz miktarı) 4.5 bulunmuştur. Buna karşılık sıvılaştırmanın (akıcılık anlamında) en düşük olduğu %50 nişastalı tüplerde ortalama elde edilen glukoz değeri 5 bulunmuştur.

Sonuç olarak;

1. Amilaz ve pullulanaz enzimleri nişasta endüstrisi başta olmak üzere, deterjanların da dahil olduğu çok farklı alanlarda kullanılmaktadır. Nişastanın endüstriyel düzeyde sıvılaştırılmasında α -1,4 glukozit bağlarını parçalayan asidik özellikteki termofil ve termostabil α -amilaz enzimleri ile α -1,4 ve α -1,6 glukozit bağlarını parçalayan mantar kökenli glukoamilaz enzimleri kullanılmaktadır.

2. Çalışmamızda izole edilen amilaz ve pullulanaz enzimleri termofil, termostabil, geniş pH aralığında aktivite gösteren, α -1,4 ve α -1,6 glukozit bağlarını parçalayan amilaz ve amilopullulanazlar olduklarından, nişastayı glukoz, maltoz, maltotiroz ve maltoz kökenli diğer oligosakkaritlere hidrolize etme yeteneğindedirler. Bu niteliklerinden dolayı, izole edilen amilaz ve pullulanaz enzimlerinden oluşan enzim kombinasyonu amilaz ve glukoamilaz enzim kombinasyonuna güçlü bir alternatif olma özelliğindedir.

3. Nişasta endüstrisinde sıvılaştırma işlemleri için %20 nişasta kullanılmaktadır (Liu ve Xu, 2008). Nişasta konsantrasyonu %20 olduğunda sıvılaştırma düzeyi NA1 alkali amilaz ile %80, NA2 asidik amilaz ile %80, NP1 asidik pullulanaz ile %90 ve NP2 alkali pullulanaz ile %90'dır. İzole edilen amilaz ve pullulanaz enzimleri %30 nişastayı 2 saatlik inkübasyon sonunda %87-90 düzeyinde tamamen sıvılaştırmıştır. Bu sonuçlar dikkate alındığında, NA1 alkali amilaz, NA2 asidik amilaz, NP1 asidik pullulanaz ve NP2 alkali pullulanaz enzimleri, nişastanın hidrolize edilerek glukoz, maltoz, maltotrioz gibi ürünlerin

üretildiği prosesler için α -amilaz ve glucoamilaz kombinasyonuna göre çok daha güçlü birer alternatif üründür.

4. Deterjan endüstrisi, enzimlerin en çok kullanıldığı alanların başında gelmektedir. Bu alanda proteaz enzimlerinden sonra en çok tercih edilenler nişastayı hidrolize eden enzimlerdir. Çalışmamızda, izole edilen enzimlerin yemek sosu, bebek maması ve çikolata gibi farklı ürünlerle yapılan yıkama performans analizlerinde %1 deterjan ve 500 U/mL enzim içeren karışımda yıkanan lekeli kumaşlarda, işlem görmemiş lekeli kumaşlara göre, 60 dakikalık uygulama sonunda %100'e yakın başarı elde edilmiştir. Özellikle NP2 alkali pullulanaz (amilopullulanaz) enzimi en yüksek performansa sahiptir. Bu enzimler deterjan endüstrisi için güçlü bir alternatif olma özelliğindedirler.

5. Tekstil endüstrisinde haşılların giderilmesi işlemleri yüksek pH ve yüksek sıcaklıkta gerçekleştirilen yaklaşık 2 saatlik bir uygulama gerektirmektedir. NP2 alkali pullulanaz enzimi amilopullulanaz/TipII pullulanaz özellikte bir enzim olup, asido-alkali koşullarda çok geniş bir pH aralığında aktivite gösteren (optimum pH 9.0), pH stabil ve pH ile indüklenen, termofil ve yüksek düzeyde termostabil bir enzim olması ve yıkama performansının %100 düzeyde gerçekleşmesi nedeniyle tekstil endüstrisinde kullanımı için ideal bir enzimdir.

6. Özellikle NA1 alkali amilaz, NA2 asidik amilaz, NP1 asidik pullulanaz ve NP2 alkali pullulanaz enzimleri nişasta ve tekstil işletmelerinden çıkan atık suların arıtılmasında, enzim kökenli arıtma işlemleri alanında kullanılabilir özelliktedir.

7. Dişlerde taş ve tartarların oluşumunda pullulan benzeri polisakkaritlerin önemli bir etkisi olduğu bilinmektedir. Özellikle NP1 asidik pullulanaz enziminin optimum aktivitesinin pH 6.0 olduğu düşünüldüğünde, bu enzimin diş macunu üretiminde kullanılma potansiyeli oldukça yüksektir.

KAYNAKLAR

- Abdel-Fattah, Y.R., Soliman, N.A., El-Toukhy, N.M., El-Gendi, H. and Ahmed, R.S. 2013. Production, purification, and characterization of thermostable α -amylase produced by *Bacillus licheniformis* Isolate AI20. J Chem., 1-11.
- Ahmad, N., Rashid, N., Saleem Haider, M., Akram, M., Akhtar, M., 2014. Novel Maltotriose-Hydrolyzing Thermoacidophilic Type III Pullulan Hydrolase from *Thermococcus kodakarensis*. Applied and Environmental Microbiology, 80(3):1108-1115.
- Aiyer, P.V., 2005. Amylases and their applications. African Journal of Biotechnology, 4(13): 1525-1529.
- Akan, A., 2011. *Aspergillus niger*'de Pullulanaz İndüksiyonu ve Çeşitli Taşıyıcılara İmmobilizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Al-Johani, N.B., Al-seeni, M.N. and Ahmed, Y.M, 2017. Optimization of alkaline α -amilaz production by thermophilic *Bacillus subtilis*. African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicines, 14(1):288-301.
- Al-Quadani, F., Akel, H. and Natshi, R., 2011. Characteristics of a novel, highly acid- and thermo-stable amylase from thermophilic *Bacillus* strain HUTBS62 under different environmental conditions. Ann Microbiol, 61:887–892.
- Amid, M. and Manap, M.Y.A., 2014. Purification and characterisation of a novel amylase enzyme from red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) peel. Food Chem., 165:412-418.
- Anto, H., Trivedi, U. and Patel, K., 2006. Alpha Amylase Production by *Bacillus cereus* MTCC 1305 Using Solid-State Fermentation. Food Technol. Biotechnol., 44(2):241–245.

- Antranikian, G., 1992. Microbial degradation of natural products In: Winkelmann (Ed.), Weinheim, Germany: VCH, pp. 27-56.
- Anupama, A. and Jayaraman, G., 2011. Detergent Stable, Halotolerant α -Amylase From *Bacillus aquimaris* VITP4 Exhibits Reversible Unfolding. International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology, 2(2):366-376.
- Ara, K., Igarashi, K., Saeki, K., Kawai, S. and Ito, S., 1992. Purification and Some Properties of an Alkaline Pullulanase from Alkalophilic *Bacillus* sp. KSM-1876. Biosci. Biotech. Biochem., 56(1):62-65.
- Ara, K., Saeki, K., Igarashi, K., Takaiwa, M., Uemura, T., Hagihara, H., Kawai, S. and Ito, S., 1995. Purification and characterization of an alkaline amylopullulanase with both α -1,4 and α -1,6 hydrolytic activity from alkalophilic *Bacillus* sp. KSM-1378. Biochimica et Biophysica Acta, 1243:315-324.
- Arabacı, N., 2011. Cold Aktif Alkalın Amilaz Enzimi Üreten *Bacillus* sp. Suşlarının İzolasyonu, Enzim Üretimi, Karakterizasyonu ve Endüstriyel Kullanım Olanaklarının Araştırılması. Ç.Ü.F.B.E. Yüksek Lisans Tezi.
- Arıkan, B., 2008. Highly Thermostable, Thermophilic, Alkaline, SDS and Chelator Resistant Amylase from a Thermophilic *Bacillus* sp. Isolate A3-15. Bioresource Technology, 99:3071-3076.
- Asad, W., Asif, M. and Rasool, S.A. 2011. Extracellular Enzyme Production By Indigenous Thermophilic Bacteria: Partial Purification and Characterization Of α -Amylase by *Bacillus* sp. WA21. Pak. J. Bot., 43(2).
- Asgher, M., Javaid Asad, M., Rahman, S.U. and Legge, R.L., 2007. A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. Journal of Food Engineering, 79:950-955.

- Asha R., Niyonzima F.N. and Sunil S.M., 2013. Purification and Properties of Pullulanase from *Bacillus halodurans*. International Research Journal of Biological Sciences, 2(3):35-43.
- Asoodeh, A and Lagzian, M., 2012. Purification and characterization of a new glucoamylpullulanase from thermotolerant alkaliphilic *Bacillus subtilis* DR8806 of a hot mineral spring. Process Biochemistry, 47:806-815.
- Asoodeh, A., Emtenani, S., Emtenani, S., Jalal, R. and Housaindokht, M.R., 2014. Molecular cloning and biochemical characterization of a thermoacidophilic, organic-solvent tolerant α -amylase from a *Bacillus* strain in *Escherichia coli* Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 99:114-120.
- Aygan, A., 2008. Haloalkalofil *Bacillus* sp. İzolasyonu, Amilaz, Selülaz ve Ksilanaz Enzimlerinin Üretimi, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulamalarda Kullanılabilirliği. Ç.Ü. F.B.E. Doktora Tezi.
- Aygan, A., Sarıtürk, S., Sedat Köstekçi and Tanis, H., 2014. Production and characterization of alkaliphilic alpha-amylase from *Bacillus subtilis* A10 isolated from soils of Kahramanmaraş, Turkey. African Journal Microbiology Research, 8(21):2168-2173.
- Bai, Y., Huang, H., Meng, K., Shi, P., Yang, P., Luo, H., Chunliang, L, Yukun, F., Wei, Z. and Bin, Y., 2012. Identification of an acidic α -amylase from *Alicyclobacillus* sp. A4 and assessment of its application in the starch industry. Food Chemistry, 131:1473–1478.
- Bajpai, B., Chaudhary, M. and Saxena, J., 2015. Production and Characterization of α -Amylase from an Extremely Halophilic Archaeon, *Haloferax* sp. HA10 Food Technol. Biotechnol., 53(1):11-17.
- Bakri, Y., Ammouneh, H., El-Khoury, S., Harba, M. and Thonart, P., 2012. Isolation and identification of a new *Bacillus* strain for amylase production. Research in Biotechnology, 3(6): 51-58.

- Bano, S., Qader, S.A.U., Aman, A., Syed, M.N. and Azhar, A., 2011. Purification and Characterization of Novel α -Amylase from *Bacillus subtilis* KIBGE Has. Aaps Pharmscitech., 12(1):255-261.
- Behal, A., Singh, J., Sharma, M.K., Puri, P. and Batra, N., 2006. Characterization of Alkaline α -Amylase from *Bacillus* sp. AB 04. International Journal Of Agriculture and Biology, 08(1):80-83.
- Bertoldo, C., Duffner, F., Jorgensen, P.L. and Antranikian, G., 1999. Pullulanase Type I from *Fervidobacterium pennavorans* Ven5: Cloning, Sequencing, and Expression of the Gene and Biochemical Characterization of the Recombinant Enzyme. Applied And Environmental Microbiology, 65(5):2084-2091.
- Bertoldo, C. and Antranikian, G., 2002. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. Current Opinion in Chemical Biology, 6:151-160.
- Bertoldo, C., Armbricht, M., Becker, F., Schafer, T., Antranikian, G. and Liebl, W., 2004. Cloning, Sequencing, and Characterization of a Heat- and Alkali-Stable Type I Pullulanase from *Anaerobranca gottschalkii*. Applied and Environmental Microbiology, 70(6):3407-3416
- Bollag, D.M., Rozycki, M.D. and Edelstein, S.J., 1996. Protein Methods, 2nd Edition, Wiley-Liss Press, New York, USA, p. 414.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal.Biochem. 72:248-254.
- Brunswick, J. M., Kelly, C. T. and Fogarty, W.M., 1999. The amylopullulanase of *Bacillus* sp. DSM 405. Appl Microbiol Biotechnol, 51:170-175.
- Burhan, A., Nisa, U., Gökhan, C., Ömer, C., Ashabil, A. and Osman, G., 2003. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. Isolate ANT-6.

- Process Biochemistry, 38:1397-1403.
- Castro, G.R., Santopietro, L.M.D. and Sineriz, F., 1992. Acid Pullulanase from *Bacillus polymyxa* MIR-23. Applied Biochemistry and Biotechnology, 3(7):227-233.
- Chai, Y.Y., Kahar, U.M., Salleh, M.M., Illias R.M. and Goh, K.M., 2012a. Isolation and characterization of pullulan-degrading *Anoxybacillus* species isolated from Malaysian hot springs. Environmental Technology, 33(11):1231-1238.
- Chai, Y.Y., Rahman, R. N. Z. R. A., Illias, R. M. and Goh, K. M., 2012b. Cloning and characterization of two new thermostable and alkalitolerant α -amylases from the *Anoxybacillus* species that produce high levels of maltose Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 39:731-741.
- Chakraborty, S., Khopade, S., Biao, R., Jian, W., Liu, X.Y., Mahadika, K., Chopadec, B., Zhang, L. and Kokare, C., 2011. Characterization and stability studies on surfactant, detergent and oxidant stable α -amylase from marine haloalkaliphilic *Saccharopolyspora* sp. A9. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 68:52-58.
- Chand, N., Sajedib, R.H., Nateria, A.S., Khajeh, K. and Rassa, M., 2014. Fermentative desizing of cotton fabric using an α -amylase-producing *Bacillus* strain: Optimization of simultaneous enzyme production and desizing Process Biochemistry, 49:1884-1888.
- Coral, G., Arıkan, B., Ünaldı, M.N. and Güvenmez Korkmaz, H., 2002. Some properties of thermostable xylanase from an *Aspergillus niger* strain. Ann. Microbiol., 52:299-306.
- Çınar, E., 2007. İnek Sütünden İzole Edilen *Bacillus* sp.'den Pullulanaz ve α -Amilaz Enzimlerin Üretimi, Bu Enzimlerin Bazı Optimizasyon Koşullarının Belirlenmesi. Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek lisans tezi.

- Çöleri, A., 2007. Bazı Termofilik *Bacillus* Türlerinin Termostabil α -Glukozidaz Üretim Kapasiteleri ve Enzimlerin Kısmi Karakterizasyonu. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi.
- Dawood, E.S., Ibrahim, S.A. and El-Nagerabi, S.A.F., 2015. Some Properties Of Thermostable α -Amylase of Four Isolates of *Bacillus licheniformis*. Nusantara Bioscience, 7(2):90-95.
- de Souza, P.M. and de Oliveira Magalhães, P., 2010. Application of microbial α -amylase in industry-a review. Brazilian Journal of Microbiology, 41:850-861.
- Deb, P., Talukdar, S.A., Mohsina, K., Sarker, P.K. and Sayem, S.M.A., 2013. Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* P-001. Springer Plus, 2(154):1-12.
- Deljou, A. and Arezi, I., 2016. Production of thermostable extracellular α -amylase by a moderate thermophilic *Bacillus licheniformis*-AZ2 isolated from Qinarje Hot spring (Ardebil prov. of Iran). Periodicum Biologorum, 118(4):405-416.
- Demirkan Sarıkaya, E., Mikami, B., Adachi, M., Higasa, T. and Utsumi, S., 2005. α -Amylase from *B. amyloliquefaciens*: purification, characterization, raw starch degradation and expression in *E. coli*. Process Biochemistry, 40:2629-2636.
- Devi, K.P.R. and Yogeewaran, G., 1999. Co-expression of saccharifying alkaline amylase and pullulanase in *Micrococcus halobius* OR-1 isolated from tapioca cultivar soil. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 15:223-229.
- Dey, G., Palit, S., Banerjee, R. and Maiti, B.R.J., 2002. Purification and characterization of maltooligosaccharide-forming amylase from *Bacillus circulans* GRS313. Industrial Microbiology and Biotechnology, 28:193-200.

- Dheeran, P., Kumar, S., Jaiswal, Y.K. and Adhikari, D.K., 2010. Characterization of hyperthermostable α -amylase from *Geobacillus* sp. IPTN. Applied Microbiology and Biotechnology, 86(6):1857-1866.
- Duan, X., Zou, C. and Wu, J., 2015. Triton X-100 enhances the solubility and secretion ratio of aggregation-prone pullulanase produced in *Escherichia coli* Bioresource Technology, 194:137-143.
- Duffner, F., Bertoldo, C., Andersen, J.T., Wagner, K. and Antranikian, G., 2000. A New Thermoactive Pullulanase from *Desulfurococcus mucosus*: Cloning, Sequencing, Purification, and Characterization of the Recombinant Enzyme after Expression in *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology, 182(22):6331-6338.
- Elayaraja, S., Velvizhi, T., Maharani, V., Mayavu, P., Vijayalakshmi S. and Balasubramanian, T., 2011. Thermostable α -amylase production by *Bacillus firmus* CAS 7 using potato peel as a substrate. African Journal of Biotechnology, 10(54):11235-11238.
- Emtenani, S., Asoodeh, A. and Emtanani, S., 2015. Gene cloning and characterization of a thermostable organic-tolerant α -amylase from *Bacillus subtilis* DR8806. International Journal of Biological Macromolecules, 72:290-298.
- Gessesse, A. and Gashe, B.A., 1997. Production of Alkaline Xylanase by an *Bacillus* sp. Isolated from an Alkaline Soda Lake. Journal of Applied Microbiology, 83:402-406.
- Gomes, I., Gomes, J. and Steiner, W., 2003. Highly thermostable amylase and pullulanase of the extreme thermophilic eubacterium *Rhodothermus marinus*: production and partial characterization. Bioresource Technology, 90:207-214.

- Gözükara, F., 2009. Termofil *Bacillus* sp. Bakterisinden Likenaz (B-1,3 ve 1,4 Glukanaz) Enzimi Üretimi, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Kullanılabilirliği. Ç.Ü. F.B.E. Yüksek Lisans Tezi.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K. and Chauhan, B., 2003. Microbial α -Amylases: A Biotechnological Prospective. *Process Biochemistry*, 38(11):1599-1616.
- Hagihara, H., Igarashi, K., Hayashi, Y., Endo, K., Ikawa-Kitayama, K., Ozaki, K., Kawai, S. and Ito, S., 2001. Novel α -Amylase That Is Highly Resistant to Chelating Reagents and Chemical Oxidants from the Alkaliphilic *Bacillus* Isolate KSM-K38. *Applied And Environmental Microbiology*, 67(4):1744-1750.
- Haki, G.D. and Rakshit. S.K., 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes:a review. *Bioresource Technology*, 89:17–34.
- Hauli, I., Sarkar, B., Mukherjee, T. and Mukhopadhyay, S.K., 2013. Isolation and identification of a novel thermo-alkaline, thermostable, SDS and chelator resistant amylase producing *Anoxybacillus* sp. IB-A from hot spring of Bakreswar, West Bengal (India): First report. *Advances in Applied Science Research*, 4(5):202-212.
- Hii, S.L., Tan, J.S., Ling, T.C. and Bin Ariff, A., 2012. Pullulanase:Role In Starch Hydrolysis And Potential Industrial Applications. *Enzyme Research*, 2012:14.
- Hiteshi, K. and Gupta, R., 2014. Thermal adaptation of α -amylases: A review. *Extremophiles*, 18:937-944.
- Hmidet, N., Bayoudh, A., Berrin, J.G., Kanoun, S., Juge, N. and Moncef Nasri, 2008. Purification and biochemical characterization of a novel α -amylase from *Bacillus licheniformis* NH1 Cloning, nucleotide sequence and expression of amyN gene in *Escherichia coli*. *Process Biochemistry*, 43:499-510.

- Hols, P., Ferain, T., Garmyn, D., Bernard, N. and Delcour, J., 1994. Use of Expression Secretion Signals and Vector Free Stable Chromosomal Integration In Engineering of *Lactobacillus plantarium* for Alfa Amylase and Levanase Expression. App. And Environ. Microbial., 60(5):1401-1413.
- Kahar, U.M., Chan, K.G., Salleh, M.M., Hii, S.M., and Goh, K.M., 2013. A High Molecular-Mass *Anoxybacillus* sp. SK3-4 Amylopullulanase: Characterization and Its Relationship in Carbohydrate Utilization. Int. J. Mol. Sci., 14:11302-11318.
- Kahar, U.M., Ng, C.L., Chan, K.G. and Goh, K.M., 2016. Characterization of a type I pullulanase from *Anoxybacillus* sp. SK3-4 reveals an unusual substrate hydrolysis. Appl Microbiol Biotechnol, 100:6291-6307.
- Kalpana, B.J. and Pandian, S.K., 2014. Halotolerant, acid-alkali stable, chelator resistant and raw starch digesting α -amylase from a marine bacterium *Bacillus subtilis* S8-18. J. Basic Microbiol., 54:802-811.
- Kang, J., Park, K.M., Choi, K.H., Park, C.S., Kim, G.H., Kim, D. and Cha, J., 2011. Molecular cloning and biochemical characterization of a heat-stable type I pullulanase from *Thermotoga neapolitana*. Enzyme and Microbial Technology, 48:260-266.
- Kanno, M., 1986. A *Bacillus acidocaldarius* α -Amylase That is Highly Stable to Heat under Acidic Conditions. Agric. Bioi. Chem., 50(1):23-31.
- Kikani, B. A. and Singh, S. P., 2011. Single step purification and characterization of a thermostable and calcium independent alpha-amylase from *Bacillus amyloliquifaciens* TSWK1-1 isolated from Tulsi Shyam hot spring reservoir, Gujarat (India). International Journal of Biological Macromolecules, 48:676-681.
- Kim, C.H., Choi, H.I. and Lee, D.S., 1993. Purification and Biochemical Properties of an Alkaline Pullulanase from Alkalophilic *Bacillus* sp. S-1. Biosci. Biotech. Biochem., 57(10):1632-1637.

- Kim, T.U., Gu, B.G., Jeong, J.Y., Byun, S.M. and Shin, Y.C., 1995. Purification and Characterization of a Maltotetraose-Forming Alkaline α -Amylase from an Alkalophilic *Bacillus* Strain, GM8901. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(8):3105-3112.
- Koç, Ö., 2015. *Aspergillus fumigatus* HBF125 Ekstraselüler α -Amilazının Üretimi, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.
- Kumar, V. and Satyanarayana, T., 2011. Applicability of thermo-alkali-stable and cellulase-free xylanase from a novel thermo-halo-alkaliphilic *Bacillus halodurans* in producing xylooligosaccharides. *Biotechnology Letters*, 33, 2279-2285.
- Kumari, N., Jain, V. and Malhotra, S., 2013. Purification and characterization of extracellular acidophilic α -amylase from *Bacillus cereus* MTCC 10205 isolated from soil. *African Journal of Microbiology Research*, 7(48):5440-5448.
- Kunamneni, A. and Singh, S., 2006. Improved high thermal stability of pullulanase from a newly isolated thermophilic *Bacillus* sp. AN-7. *Enzyme and Microbial Technology*, 39:1399-1404.
- Leathers, T.D., 2003. Biotechnological production and applications of pullulan. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 62:468-473.
- Lee, S.P., Morikawa, M., Takagi, M. and Imanaka, T., 1994. Cloning of the aapT Gene and Characterization of Its Product, α -Amylase-Pullulanase (AapT), from Thermophilic and Alkaliphilic *Bacillus* sp. Strain XAL601. *Applied And Environmental Microbiology*, 60(10):3764-3773.
- Lee, M.J., Park, C. Park, J.H., Chung, K.H., Nam, K.S., Park, J.W. and Kim, C.H., 2000. Biochemical characterization of a novel extracellular pullulan 6-glucanohydrolase from *Bacillus circulans* S-1. *Korean Journal of Life Science*, 10(3):307-316.

- Lee, Y.S., Seo, S.H., Yoon, S.H., Kim, S.Y. Hahn, B.S., Sim, J.S., Koo, B.S. and Lee, C.M., 2016. Identification of a novel alkaline amylopullulanase from a gutmetagenome of *Hermetia illucens*. International Journal of Biological Macromolecules, 82:514-521.
- Lennete, E.H., Ballows, A., Hausler, J.W.J. and Shadomy, J.H., 1985. Manual of Clinical Microbiology, 4:1149.
- Li, Y., Zhang, L., Niu, D., Wang, Z. and Shi, G., 2012. Cloning, Expression, Characterization, and Biocatalytic Investigation of a Novel Bacilli Thermostable Type I Pullulanase from *Bacillus* sp. CICIM 263. J. Agric. Food Chem., 60:11164-11172.
- Li, Y., Zhang, L., Ding, Z. and Shi, G., 2013a. Constitutive expression of a novel isoamylase from *Bacillus lentus* in *Pichia pastoris* for starch processing. Process Biochemistry 48:1303-1310.
- Li, Y., Niu, D., Zhang, L., Wang, Z. and Shi, G., 2013b. Purification, characterization and cloning of a thermotolerant isoamylase produced from *Bacillus* sp. CICIM 304. J Ind Microbiol Biotechnol, 40:437–446.
- Li, S.F., Xu, J.Y., Bao, Y.J., Zheng, H.C. and Song, H., 2015. Structure and sequence analysis-based engineering of pullulanase from *Anoxybacillus* sp. LM18-11 for improved thermostability. Journal of Biotechnology, 210:8–14.
- Lin, L.L., Chyau, C.C. and Hsu, W.H., 1998. Production and properties of a raw-starch-degrading amylase from the thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. TS-23. Biotechnology and Applied Biochemistry, 28:61-68.
- Ling, H.S, Ling, T.C., Mohamad, R. and Ariff, A.B., 2009. Characterization of Pullulanase Type II from *Bacillus cereus* H1.5. American Journal of Biochemistry and Biotechnology, 5(4):170-179.
- Liu, X.D. and Xu, Y., 2008. A novel raw starch digesting α -amylase from a newly isolated *Bacillus* sp. YX-1: Purification and characterization. Bioresource Technology, 99:4315-4320.

- Liu, W., Shi, P. and Chen, Q., 2010. Gene cloning, overexpression, and characterization of a xylanase from *Penicillium* sp. CGMCC 1669. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(1):1-12.
- Liu, J., Xia, W., Abdullahi, A.Y., Wu, F., Ai, Q., Feng, D. and Zuo, J., 2015. Purification and Partial Characterization of an Acidic α -Amylase from a Newly Isolated *Bacillus subtilis* ZJ-1 that may be Applied to Feed Enzyme. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 45:259–267.
- Liu, J., Liu, Y., Yan, F., Jiang, Z., Yang, S. and Yan, Q., 2016. Gene cloning, functional expression and characterisation of a novel type I pullulanase from *Paenibacillus barengoltzii* and its application in resistant starch production. *Protein Expression and Purification*, 121:22-30.
- Mehrotra, S., Pandey, P.K., Gaur, R. and Darmwal, N.S., 1999. The purification of alkaline protease by a *Bacillus* species isolated. *Bioresource Technology*, 67:201-203.
- Miller, G. L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31:426–428.
- Mishra, B., Manikanta, A. and Zamare, D., 2016. Preparation of Maltotriose Syrup from Microbial Pullulan by using Pullulanase Enzyme. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 13(1):481-485.
- Moubasher, H., Wahsh, S.S. and El-Kassem, N.A., 2010. Purification of Pullulanase from *Aureobasidium pullulans*. *Microbiology*, 79(6):759-766.
- Mrudula, S., Reddy, G. and Seenayya, G., 2011. Screening of Various Raw Starches on Production of Thermostable Amylopullulanase by *Clostridium thermosulfurogenes* SVM17. *World Applied Sciences Journal*, 15(7):996-1001.
- Najafi, M.F., Deobagkar, D. and Deobagkar, D., 2005. Purification and characterization of an extracellular α -amylase from *Bacillus subtilis* AX20. *Protein Expression and Purification*, 41:349-354.

- Nisha, M. and Satyanarayana, T., 2013. Characterization of recombinant amylopullulanase (gt-apu) and truncated amylopullulanase (gt-apuT) of the extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans* NP33 and their action in starch saccharification. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97:6279-6292.
- Nisha, M. and Satyanarayana, T., 2016. Characteristics, protein engineering and applications of microbial thermostable pullulanases and pullulan hydrolases. *Appl Microbiol Biotechnol*, 100:5661-5679.
- Nithya, K., Muthukumar, C., Dhanasekaran, D., Kadaikunnan, S., Alharbi, N.S., Khaled, J.M. and Thajuddin, N., 2016. Production, Optimization and Partial Characterization of Thermostable and Alkaline Amylase from *Bacillus licheniformis* KSU-6. *Int. J. Agric. Biol.*, 18(6):1188-1194.
- Orhan, N., 2012. *Hypocrea Jecorina* Qm9414'den Pullulanazın Saflaştırılması. Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi.
- Oziengbe, E.O. and Onilude, A.A., 2012. Production Of A Thermostable α -Amylase and Its Assay Using *Bacillus licheniformis* Isolated From Excavated Land Sites In Ibadan, Nigeria. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, 5(1):132-138.
- Ozturk, M. T., Akbulut, N., Issever Ozturk, S. and Gumusel, F., 2013. Ligase-Independent Cloning of Amylase Gene from a Local *Bacillus subtilis* Isolate and Biochemical Characterization of the Purified Enzyme. *Appl Biochem Biotechnol*, 171:263-278.
- Özdenefe, M.S., 2014. *Bacillus subtilis* Kullanılarak Atık Ekmeklerden Alkali Proteaz Ve Biyosüpfektan Üretimi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C.R., Soccol, V.Y., Singh, D. and Mohan, R., 2000. Advances in microbial amylases. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 31:135-152.
- Parashar, D. and Satyanarayana, T., 2016. Production of Ca^{2+} -Independent and Acidstable Recombinant α -Amylase of *Bacillus acidicola* Extracellularly

- and its Applicability in Generating Maltooligosaccharides. *Mol Biotechnol*, 58:707-717.
- Paquet, V., Croux, C., Goma, G. and Soucaille, P., 1991. Purification and Characterization of the Extracellular α -Amylase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(1):212-218.
- Paul, J.S., Lalib, B.M., Jadhava, S.K. and Tiwari, K.L., 2017. Parameter's optimization and kinetics study of α -amylase enzyme of *Bacillus* sp. MB6 isolated from vegetable waste. *Process Biochemistry*, 52:123-129.
- Pereira, S.E., Fernandes, K.F. and Ulhoa, C.J., 2017. Immobilization of *Cryptococcus flavus* α -amylase on glass tubes and its application in starch hydrolysis. *Starch/Stärke*, 69:1-8.
- Pomares, F.P., Bautista, V., Ferrer, J., Pire, C., Marhuenda-Egae, F.C. and Bonete, M.J., 2003. α -Amylase activity from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*. *Extremophiles*, 7:299-306.
- Prajapati, V.D., Jani, G.K. and Khanda, S.M., 2013. Pullulan: An exopolysaccharide and its various applications. *Carbohydrate Polymers*, 95:540-549.
- Qiao, Y., Peng, Q., Yan, J., H. Wang, H., Ding, H. and Shi, B., 2014. Gene cloning and enzymatic characterization of alkalitolerant type I pullulanase from *Exiguobacterium acetylicum*. *Letters in Applied Microbiology*, 60:52-59.
- Ramírez-Zavala, B., Mercado-Flores, Y., Hernandez-Rodríguez, C. and Villa-Tanaca, L., 2004. Purification and characterization of a lysine aminopeptidase from *Kluyveromyces marxianus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 235:369-375.
- Ratanakhanokchai, K., Kyu, K.L. and Tanticharoen, M., 1999. Purification and Properties of a Xylan-Binding Endoxylanase from Alkaliphilic *Bacillus* sp. Strain K-1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65:694-697.

- Roodi, F.Z., Aminzadeh, S., Farrokhi, N., Karkhane, A.A. and Haghbeen, K., 2017. *Cohnella* amylopullulanases: Biochemical characterization of two recombinant thermophilic enzymes. PLoS one, 12(4).
- Roohi, R., Kuddus, M. and Saima, S., 2013. Cold-active detergent-stable extracellular α -amylase from *Bacillus cereus* GA6: Biochemical characteristics and its perspectives in laundry detergent formulation. J Biochem Tech, 4(4):636-644.
- Roy, A., Messaoud, E.B. and Bejar, S., 2003. Isolation and purification of an acidic pullulanase type II from newly isolated *Bacillus* sp. US149. Enzyme and Microbial Technology, 33:720-724.
- Roy, J.K., Rai, S. K. and Mukherjee, A. K., 2012. Characterization and application of a detergent-stable alkaline α -amylase from *Bacillus subtilis* strain AS-S01a. International Journal of Biological Macromolecules, 50:219-229.
- Roy, J.K. and Mukherjee, A.K., 2013. Applications of a high maltose forming, thermo-stable α -amylase from an extremely alkalophilic *Bacillus licheniformis* strain AS08E in food and laundry detergent industries. Biochemical Engineering Journal., 77:220-230.
- Rüdiger, A., Jorgensen, P.L. and Antranikian, G., 1995. Isolation and Characterization of a Heat-Stable Pullulanase from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus woesei* after Cloning and Expression of Its Gene in *Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology, 61(2):567-575.
- Saini, R., Saini, H.S. and Dahiya, A., 2017. Amylases: Characteristics and industrial applications. Journal Of Pharmacognosy and Phytochemistry, 6(4):1865-1871.
- Samah, R.A., Illias, R.M., Hassan, O. and Salleh, M.M., 2005. Partial Characterization of Thermostable Pullulanase From *Bacillus flavothermus* KWF-1. Proc. Kustem 4th Annual Seminar, Kuala Terengganu, Terengganu.

- Samie, N., Reddy, P.R.M., and Ashouri, M., 2012. Novel extracellular hyper acidophil and thermostable α -amylase from *Micrococcus* sp. NS 211. *Starch/Starke*, 64:136-144.
- Saxena Kumar, R., Dutt, K., Agarwal, L. and Nayyar, P., 2007. A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5. *Bioresource Technology*, 98:260-265.
- Schwermann, B., Pfau K., Liliensiek, B., Schleyer, M., Fischer, T. and Baker, E.P., 1994. Purification, properties and structural aspects of a thermoacidophilic α -amylase from *Alicyclobacillus acidocaldarius* ATCC 27009 Insight into acidostability of proteins. *Eur. J. Biochem.*, 226:981-991.
- Shafiei, M., Ziaee, A.A. and Amoozegar, M.A., 2011. Purification and characterization of an organic-solvent-tolerant halophilic α -amylase from the moderately halophilic *Nesterenkonia* sp. strain F. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 38:275-281.
- Shankar, R., Madihah, M.S., Shaza, E.M., Nur Aswati, K.O., Suraini, A.A. and Kamarulzaman, K., 2014. Application of different feeding strategies in fed batch culture for pullulanase production using sago starch. *Carbohydrate Polymers*, 102:962-969.
- Sharma, A. and Satyanarayana, T., 2013a. Structural and biochemical features of acidic α -amylase of *Bacillus acidicola*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 61:416-423.
- Sharma, A. and Satyanarayana, T., 2013b. Characteristics of a High Maltose-Forming, Acid-Stable, and Ca^{2+} -Independent α -amylase of the Acidophilic *Bacillus acidicola*. *Appl Biochem Biotechnol.*, 171:2053-2064.
- Shim, J.H., Park, J.T., Hong, J.S., Kim, K.W., Kim, M.J., Auh, J.H., Kim, Y.W., Park, C.S., Boos, W., Kim, J.W. and Park, K.H., 2009. Role of Maltogenic Amylase and Pullulanase in Maltodextrin and Glycogen Metabolism of *Bacillus subtilis* 168. *Journal Of Bacteriology*, 191(15):4835-4844.

- Siddiqui, M. A., Rehman, H. and Rashid, N., 2014. Gene Cloning and Characterization of a Type II Pullulanase Hydrolase from a Hyperthermophilic Archaeon, *Pyrobaculum calidifontis*. Pakistan J. Zool., 46(4):1077-1084.
- Simair, A.A., Qureshi, A.S., Khushk, I., Chaudhry, H.A., Lashari, S., Bhutto, M.A., Mangrio, G.S. and Lu, C., 2017. Production and Partial Characterization of α -Amylase Enzyme from *Bacillus* sp. BCC 01-50 and Potential Applications. Hindawi BioMed Research International, 2017:9.
- Singh, R.S., Saini, G.K., Kennedy, J.F, 2008. Pullulan: Microbial sources, production and applications. Carbohydrate Polymers, 73:515–531.
- Singh, R.S., Saini, G.K., and Kennedy, J.F., 2010. Maltotriose syrup preparation from pullulan using pullulanase. Carbohydrate Polymers, 80:401-407.
- Singh, S.K., Singh, S.K., Tripathi, V.R. and Garg, S.K., 2012. Purification, characterization and secondary structure elucidation of a detergent stable, halotolerant, thermoalkaline protease from *Bacillus cereus* SIU1. Process Biochemistry, 47:1479-1487.
- Singh, R., Kumar, V. and Kapoor, V., 2014. Partial Purification and Characterization of a Heat Stable α -Amylase from a Thermophilic Actinobacteria, *Streptomyces* sp. MSC702. Enzyme Research, 2014:8.
- Siroosi, M., Amoozegar, M.A., Khajeh, K., Fazeli, M. and Rezaei, M.H., 2014. Purification and characterization of a novel extracellular halophilic and organic solvent-tolerant amylopullulanase from the haloarchaeon, *Halorubrum* sp. strain Ha25. Extremophiles, 18:25-33.
- Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K.M., Soccol, C.R. and Pandey, A., 2006. α -Amylases from Microbial Sources—An Overview on Recent Developments. *Food Technol. Biotechnol.*, 44(2):173-184.
- Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R., 1973. *Numerical Taxonomy*. Freeman, San Francisco.

- Song, Q., Wang, Y., Yin, C. and Zhang, X-H., 2016. LaaA, a novel high-active alkalophilic alpha-amylase from deep-seabacterium *Luteimonas abyssi* XH031. *Enzyme and Microbial Technology*, 90:83-92.
- Spector, T., 1978. Refinement of the Coomassie blue method of protein quantification: A simple and linear spectrophotometric assay for ≤ 0.5 to 50 μg of protein, *Anal Biochem*, 86(1):142-146.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A. and Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30:2725-2729.
- Temizkan, G. ve Arda, N., 2008. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Nobel Tıp Kitabevi, 3. Baskı, İstanbul, s.345.
- Tiwari, S., Shukla, N., Mishra, P. and Gaur, R., 2014. Enhanced Production and Characterization of a Solvent Stable Amylase from Solvent Tolerant *Bacillus tequilensis* RG-01: Thermostable and Surfactant Resistant. *The Scientific World Journal*, 2014:11.
- Turner, P., Mamo, G. and Eva Nordberg Karlsson, E.N., 2007. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microbial Cell Factories*, 6(9):1-23.
- Ürek, R.Ö. and Pazarlıoğlu, N.K., 2004. Purification and partial characterization of manganese peroxidase from immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. *Process. Biochem*, 39:2061-2068.
- Vaidya, S., Srivastava, P.K., Rathore, P. and Pandey, A.K., 2015. Amylases: a prospective enzyme in the field of biotechnology. *A J. Appl. Biosci.*, 41(1):1-18.
- van der Maarel, M.J.E.C., Veen, B., Uitdehaag, J.C.M., Leemhuis, H. and Dijkhuizen, L., 2002. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *J. Biotechnol.*, 94:137-155.

- Vijayalakshmi, K. Sushma, S. Abha and P. Chander, 2012. Isolation and Characterization of *Bacillus subtilis* KC3 for Amylolytic Activity. International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics, 2:5.
- Vijayaraghavan, P., Kalaiyarasi, M. and Vincent, S.G.P. 2015. Cow dung is an ideal fermentation medium for amylase production in solid-state fermentation by *Bacillus cereus*. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 13:111-117.
- Vishnu, C., Naveena, B.J., Altaf, Md., Venkateshwar, M. and Reddy, G., 2006. Amylopullulanase a novel enzyme of *L. amylophilus* GV6 in direct fermentation of starch to L(+) lactic acid. Enzyme and Microbial Technology, 38:545-550.
- Voget, S., Steele, H.L. and Streit, W.R., 2006. Characterization of metagenome-derived halotolerant cellulase. J. Biotechnol., 126:26-36.
- Xie, F., Quan, S., Liu, D., Ma, H., Li, F., Zhou, F. and Chen, G., 2014. Purification and characterization of a novel α -amylase from a newly isolated *Bacillus methylotrophicus* strain p 11-2. Process Biochemistry, 49:47-53.
- Xu, J., Ren, F., Huang, C.H., Zheng, Y., Zhen, J., Sun, H., Ko, T.P., He, M., Chen, C.C., Chan, H.C., Guo, R.T., Song, H. and Ma, Y., 2014. Functional and structural studies of pullulanase from *Anoxybacillus* sp. LM18-11. Proteins, 82:1685-1693.
- Wang, S., Jeyaseelan, J., Liu, Y. and Qin, W., 2016. Characterization and Optimization of Amylase Production in WangLB, a High Amylase-Producing Strain of *Bacillus*. Appl Biochem Biotechnol., 180:136-151.
- Wei, W., Ma, J., Guo, S. and Wei, D., 2014. A type I pullulanase of *Bacillus cereus* Nws-bc5 screening from stinky tofu brine: Functional expression in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* and enzyme characterization. Process Biochemistry, 49:1893-1902.

- Wu, H., Yu, X., Chen, L. and Wu, G., 2014. Cloning, overexpression and characterization of a thermostable pullulanase from *Thermus thermophilus* HB27. *Protein Expression and Purification*, 95:22-27.
- Yang, S-J., Lee, H-S., Park, C-S., Kim, Y-R., Moon, T-W. and Park, K-H., 2004. Enzymatic Analysis of an Amylolytic Enzyme from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* Reveals Its Novel Catalytic Properties as both an α -Amylase and a Cyclodextrin-Hydrolyzing Enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(10):5988-5995.
- Yang, S., Yan, Q., Bao, Q., Liu, J. and Jiang, Z., 2017. Expression and biochemical characterization of a novel type I pullulanase from *Bacillus megaterium*. *Biotechnol Lett*, 39:397-405.
- Zareian, S., Khajeh, K., Ranjbar, B., Dabirmanesh, B., Ghollasi, M. and Mollania, N., 2010. Purification and characterization of a novel amylopullulanase that converts pullulan to glucose, maltose, and maltotriose and starch to glucose and maltose. *Enzyme and Microbial Technology*, 46:57-63.
- Zhang, B., Sun, Z.W., Jiang, D.D. and Niu, T.G., 2009. Isolation and purification of alkaline keratinase from *Bacillus* sp. 50-3. *African Journal of Biotechnology*, 8(11):2598-2603.
- Zhang, H. and Jin, Z., 2011. Preparation of resistant starch by hydrolysis of maize starch with pullulanase. *Carbohydrate Polymers*, 83:865-867.
- Zhang, F., Yang, X., Geng, L., Zhang, Z., Yin, Y. and Li, W., 2016. Purification and characterization of a novel and versatile α -amylase from thermophilic *Anoxybacillus* sp. YIM 342. *Starch/Stärke*, 68:446–453.
- Zhang, Q., Han, Y. and Xiao, H., 2017. Microbial α -amylase: A biomolecular overview. *Process Biochemistry*, 53:88-101.
- Zhou, G., Jina, M., Cai, Y. and Zeng, R., 2015. Characterization of a thermostable and alkali-stable α -amylase from deep-sea bacterium *Flammeovirga pacifica*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 80:676–682.

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Sinop'ta doğdu. İlköğretim ve lise öğrenimini farklı illerde tamamladı. 2008 yılında Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezun oldu. 2011 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansını bitirdi. 2011 yılında aynı anabilim dalında doktora eğitimine başladı. 2009 yılından beri Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.