

T.C
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LAKTİK ASİT BAKTERİSİNDEN α -AMİLAZ İZOLASYONU VE
KARAKTERİZASYONU

İhsan REZZUKOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR

Haziran 2011

T.C.

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

DİYARBAKIR

İhsan REZZUKOĞLU tarafından yapılan “Laktik Asit Bakterisinden α -Amilaz İzolasyonu ve Karakterizasyonu” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyesinin

Ünvanı Adı Soyadı

Başkan : Prof. Dr. Abdunnasır YILDIZ

Üye : Doç. Dr. Osman AKBA

Üye : Yrd. Doç. Dr. Sema AGÜLOĞLU FİNCAN (Danışman)

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 23 / 06 / 2011

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

/ 06 / 2011

Prof. Dr. Hamdi TEMEL

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez konusunun seçimi, deneylerin yapılması ve tezin hazırlanmasında bilgi ve tecrübesiyle her türlü ilgiyi, yardımı ve fedakarlığı gösteren danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Sema AGÜLOĞLU FİNCAN'a özverili tutumu, içtenliği, yönlendirmeleri ve değerli önerileri için en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bilgilerinden ve desteğinden yararlandığım, deneylerimin tamamlanması için laboratuvarlarındaki cihazları kullanmamı sağlayan sayın hocam Prof. Dr. Birol OTLUDİL'e değerli katkılarından ötürü teşekkür ederim.

Ayrıca bu zor çalışmamda yardımlarını esirgemeyen, bana her zaman destek olan sayın hocam Prof. Dr. Hüda DİKEN'e şükranlarımı sunarım.

Deneyisel çalışmalarımın ve tez yazımının her aşamasında katkısı olan, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Arş. Gör. Fatma Matpan BEKLER'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamda bakterilerin morfolojik özelliklerinin belirlenmesinde yardımcı olan D.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım. Deneyisel çalışmalarımın tamamlanmasında yardım ve emekleri için arkadaşım, D.Ü. Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans öğrencisi Barış ENEZ'e teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman her koşulda bana her türlü destek olan, güvenen ve bu günlere gelmemi sağlayan muhteşem aileme en içten teşekkürlerimi ve sonsuz şükranlarımı sunarım.

Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Komisyonunun 09-FF-53 numaralı projemize vermiş olduğu destekten dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ÖZET.....	VI
ABSTRACT.....	VII
ÇİZELGE LİSTESİ.....	VIII
ŞEKİL LİSTESİ.....	IX
KISALTMA VE SİMGELER.....	X
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	5
2.1. Biyoteknoloji.....	5
2.2. Enzimler.....	5
2.3.Enzimlerin Endüstriyel Uygulamaları.....	6
2.4. Amilazlar.....	8
2.4.1. α -Amilazlar.....	10
2.4.2. α -Amilazın Etki Mekanizması.....	10
2.4.3. Nişasta.....	11
2.5. Peynir Altı Suyu.....	13
2.6. Laktik Asit Bakterileri.....	14
2.6.1. Laktokokkus.....	16
2.7. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, Tanımlanması ve α -Amilaz Üretimi ile İlgili Çalışmalar.....	17
3. MATERYAL VE METOT.....	21
3.1. Materyal	21
3.1.1. Biyolojik Materyal.....	21

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	21
3.1.3. Kullanılan Aletler.....	21
3.1.4. Bakteri İzolasyonu ve İdentifikasyonunda Kullanılan Besi Yerleri.....	22
3.1.4.1. Nutrient Broth Agar (NBA).....	22
3.1.4.2. de Man, Rogosa ve Sharpe (MRS) Agar.....	22
3.1.4.3. Mueller Broth.....	22
3.1.4.4. Basal Medium.....	23
3.1.4.5. Luria Bertani Broth.....	23
3.1.4.6. Jelatin Besi Yeri.....	23
3.1.4.7. Nişasta Agarı.....	23
3.1.4.8. Kazein Besi Yeri.....	23
3.1.4.9. Katalaz Testi.....	23
3.1.4.10. Ürea Agar Besi Yeri.....	24
3.1.4.11. Yağlı Besi Yeri.....	24
3.1.4.12. SİM Besi Yeri (Sülfıt-İndol-Mobility).....	24
3.1.4.13. Kanlı Agar.....	24
3.1.4.14. Fosfataz Testi.....	25
3.1.4.15. Şeker Testi (Triple Sugar Iron Agar).....	25
3.1.4.16. EMB (Eozin Metilen Blue).....	26
3.1.4.17. Caso Agar.....	26
3.1.5. Kullanılan Çözeltiler.....	26
3.1.5.1. NaOH ve HCl Çözeltisi.....	26
3.1.5.2. Sitrat Tamponu (pH 4.0-6.0).....	26
3.1.5.3. Tris-HCl Tamponu (pH 6.0-9.0).....	27
3.1.5.4. NaHCO ₃ Tamponu (pH 9.0-10.0).....	27

3.1.5.5. 3,5 DNS (3,5 Dinitro Salisilik Asit).....	27
3.1.5.6. Alkalın Çözeltisi.....	28
3.1.5.7. İyot Solüsyonu.....	28
3.1.5.8. Kristal Viyole Çalışma Solüsyonu.....	28
3.1.5.9. Lugol Çalışma Solüsyonu.....	28
3.1.5.10. Sulu Fuksin Solüsyonu.....	29
3.1.5.11. Kovacs Ayırıcı.....	29
3.1.5.12. Yarı Katı Agarlı Besi Yeri.....	29
3.1.5.12. Yarı Katı Agarlı Besi Yeri.....	29
3.2. METOT.....	29
3.2.1. Laktik asit bakterilerinin izolasyonu.....	29
3.2.2. Bakterilerin İdentifikasyonu.....	30
3.2.2.1. Biyokimyasal Testler.....	30
3.2.2.2. Gram Boyama.....	32
2.3. Laktik Asit Bakterilerinin Üretim Ortamının Optimizasyonu.....	33
3.2.3.1. İnkübasyon Süresinin Mikroorganizma Gelişimi Üzerine Etkisi	33
3.2.3.2. Sıcaklığın Mikroorganizma Gelişimi Üzerine Etkisi.....	33
3.2.3.3. pH'nın Mikroorganizma Gelişimi Üzerine Etkisi.....	33
3.2.4. <i>Lactococcus</i> sp. PS-2A Bakterisinden Elde Edilen α -Amilaz Enziminin Optimizasyonu	33
3.2.4.1. Farklı Besi Yerlerinin α -Amilaz Üzerine Etkisi.....	34
3.2.4.2. α -Amilaz Enzimi Aktivite Tayini.....	34
3.2.4.3. Protein Miktar Tayini (Lowry Yöntemi, 1951).....	35
3.2.4.4. İnkübasyon Süresinin α -Amilaz Üretimine Etkisi.....	35
3.2.4.5. α -Amilaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	35

3.2.4.6. α -Amilaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi.....	35
3.2.4.7. α -Amilaz Üretimi Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisi.....	36
3.2.4.8. α -Amilaz Üretimi Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi.....	36
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	37
4.1. Bakteri İzolasyonu ve İdentifikasyonu.....	37
4.1.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu.....	37
4.1.2. Bakterilerin İdentifikasyonu.....	38
4.1.2.1. Gram Boyama.....	38
4.1.2.2. Biyokimyasal Testler.....	39
4.2. <i>Lactococcus</i> sp. PS-2A Bakterisinin Üretim Ortamının Optimizasyonu.....	45
4.2.1. İnkübasyon Süresinin Mikroorganizma Gelişimi Üzerine Etkisi.....	45
4.2.2. Sıcaklığın Mikroorganizma Gelişimi Üzerine Etkisi.....	45
4.2.3. pH'nın Mikroorganizma Gelişimi Üzerine Etkisi.....	46
4.3. <i>Lactococcus</i> sp. PS-2A Bakterisinden Elde Edilen α -Amilaz Enziminin Optimizasyonu	47
4.3.1. Farklı Besi Yerlerinin α -Amilaz Üretimine Etkisi.....	47
4.3.2. İnkübasyon Süresinin α -Amilaz Üretimine Etkisi.....	48
4.3.3. α -Amilaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	49
4.3.4. α -Amilaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi.....	49
4.3.5. α -Amilaz Üretimi Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisi.....	50
4.3.6. α -Amilaz Üretimi Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi.....	51
5. TARTIŞMA-SONUÇ.....	53
6. KAYNAKLAR.....	59
ÖZGEÇMİŞ.....	65

ÖZET

LAKTİK ASİT BAKTERİSİNDEN α -AMİLAZ İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İhsan REZZUKOĞLU

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLJİ ANABİLİM DALI

2011

Bu çalışmada, Diyarbakır'daki peynirciler çarşısından peynir altı suyu örnekleri alınarak laktik asit bakterileri izole edildi. İzole edilen bu bakteriler morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler yardımıyla tanımlandı ve PS-2A, PS-3B, PS-3C ve PS-4B olarak adlandırıldı. Daha sonra bu bakterilerin ekstraselüler α -amilaz üretme yeteneği araştırılarak en iyi aktivite gösteren PS-2A bakterisi seçildi. PS-2A bakterisinin kok (yuvarlak) şekilli, Gram pozitif, katalaz negatif, hareketli olduğu belirlendi. Bu bakterinin üremesi için; optimum inkübasyon süresinin 16. saat, optimum pH'nın 7.0 ve optimum üreme sıcaklığının 35°C olduğu belirlendi.

PS-2A'nın α -amilaz aktivitesini; optimum 20. saatte (1847 U/mg), LB besiyeriinde gerçekleştirdiği ve α -amilaz aktivitesinin optimum pH ve sıcaklık değerlerinin sırasıyla 7.0 ve 35°C olduğu belirlendi.

PS-2A'nın üretim ortamına değişik karbon (glukoz, galaktoz, fruktoz, çözünebilir nişasta, maltoz ve sükroz) ve azot kaynakları (pepton, tripton, üre, amonyum sülfat, amonyum klorür ve kazein) eklenerek α -amilaz üretimi üzerine etkisi araştırıldı.

Karbon kaynaklarında; %1'lik çözünebilir nişastanın α -amilaz üretimini iki kat (4743 U/mg) arttırdığı, glukoz (1392 U/mg), fruktoz (468 U/mg) ve maltoz (1158 U/mg) ilavesiyle de enzim üretiminin azaldığı saptandı.

Azot kaynaklarında; %1'lik pepton (2550 U/mg), tripton (3527 U/mg), amonyum sülfat (3463 U/mg) ve amonyum klorür (4166 U/mg) ile α -amilaz üretiminin arttığı, üre (1241U/mg) ve kazein (1960 U/mg) ilavesi ile de enzim üretiminin azaldığı tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Laktik asit bakterileri, α -amilaz, peynir altı suyu, izolasyon.

ABSTRACT

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF α -AMYLASE FROM LACTIC ACID BACTERIUM

MSc THESIS

İhsan REZZUKOĞLU

UNIVERSITY OF DICLE
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT of BIOLOGY

2011

In this study, whey samples from Diyarbakır cheese market place were collected and lactic acid bacteria were isolated. These bacteria which were isolated were described with the aid of morphological, physiological, and biochemical tests and named as PS-2A, PS-3B, PS-3C and PS-4B. And then, by investigating extracellular α -amylase production capabilities of these bacteria, PS-2A bacterium which showed the best activity was selected. It was found that bacterium PS-2A was round-like, Gram positive, catalase negative, active. For produce the PS-2A; the optimum incubation time as 16th hours, optimum pH as 7.0 and optimum incubation temperature was determined as 35°C.

After that extracellular α -amylase enzyme production capabilities of the PS-2A were studied and the optimum conditions of the enzyme were determined. It was found that PS-2A conducted its optimum α -amylase activity at the 20th hour (1847 U/mg) in LB medium performed, and optimum pH and temperature values of α -amylase activity were 7.0 and 35°C, respectively.

By adding diverse carbon (glucose, galactose, fructose, soluble starch, maltose and sucrose) and nitrogen (peptone, tryptone, urea, ammonium sulphate, ammonium chlorid ve casein) sources to PS-2A's medium the effects of these on α -amylase production were investigated.

In carbon sources; The %1 soluble starch was increased the α -amylase production 2 fold (4743 U/mg), and it was determined that the enzyme production was decreased by adding glucose (1392 U/mg), fructose (468 U/mg) ve maltose (1158 U/mg).

In nitrogen sources; it was determined that with %1 peptone (2550 U/mg), tryptone (3527 U/mg), ammonium sulphate (3463 U/mg) and ammonium chlorid (4166 U/mg) the α -amylase production was increased and by adding urea (1241U/mg) and casein (1960 U/mg) the enzyme production was decreased.

Key Words:Lactic acid bacteria, α -amylase, whey, isolation.

ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge No</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Endüstride kullanılan bazı enzimler ve kullanım alanları	7
Çizelge 4.1. Laktik asit bakterilerinin, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri	40

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Sekil No</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. α -Amilazın 3 boyutlu görünümü	10
Şekil 2.2. α -Amilazın ve etki mekanizması	11
Şekil 2.3. Amilozun kimyasal yapısı	12
Şekil 2.4. Amilopektinin kimyasal yapısı	12
Şekil 2.5. Laktik asit bakterilerin ayrımı	15
Şekil 4.1. PS-2A'nın koloni görünümü	37
Şekil 4.2. PS-2A'nın nişastalı agarda amilaz varlığının tespiti	38
Şekil 4.3. <i>Lactococcus</i> sp. PS-2A bakterisinin Gram boyama görüntüsü	39
Şekil 4.4. PS-2A'nın kazein hidrolizi testi	41
Şekil 4.5. PS-2A'nın üreaz testi	42
Şekil 4.6. PS-2A'nın lipaz testi	42
Şekil 4.7. PS-2A'nın hareket testi	43
Şekil 4.8. PS-2A'nın fosfataz testi	44
Şekil 4.9. İnkübasyon Süresinin Mikroorganizma Gelişimi Üzerine Etkisi	45
Şekil 4.10. Sıcaklığın Mikroorganizma Gelişimi Üzerine Etkisi	46
Şekil 4.11. pH'nın Mikroorganizma Gelişimi Üzerine Etkisi	47
Şekil 4.12. Farklı Besi Yerlerinin α -Amilaz Üretimine Etkisi	48
Şekil 4.13. İnkübasyon Süresinin α -Amilaz Üretimine Etkisi	48
Şekil 4.14. α -Amilaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	49
Şekil 4.15. α -Amilaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi	50
Şekil 4.16. α -Amilaz Üretimi Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisi	51
Şekil 4.17. α -Amilaz Üretimi Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi	52

KISALTMALAR ve SİMGELER

NB	: Nutrient Broth
NBA	: Nutrient Broth Agar
MB	: Mueller Broth
MRS Agar	: de Man, Rogosa ve Sharpe Agar
LB	: Luria Bertani Broth
BM	: Basal Medium
FCR	: Folin reaktifi
3,5 DNS	: 3,5 Dinitro salisilik asit
EMB	: Eozin Metilen Blue
nm	: Nanometre
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
ml	: Mililitre
μ l	: Mikrolitre
OD	: Optik yoğunluk
BSA	: Bovin Serum Albumin
°C	: Santigrat derece
M	: Molar/Molarite
mM	: Milimolar
EC	: Enzim Sınıflandırması
PAS	: Peynir altı suyu
LAB	: Laktik asit bakterileri
ALAB	: Amilolitik laktik asit bakterileri
g	: Gram
dk.	: Dakika

α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gama
G1	: Maltoz
G2	: Maltodioz
G3	: Maltotrioz
G6	: Maltoheksos
SBM	: Slanetz ve Bartley Medium
NaCl	: Sodyum klorür
KPS	: Koagülaz pozitif stafilokok
CE	: Sefradin
CXM	: Sefuroksim
ZOX	: Seftizoksime
IPM	: İmipenem
SIM	: Sülfite-İndol-Mobility
sn.	: Saniye
μmol	: Mikromol
U	: Ünite
mg	: Miligram

1.GİRİŞ

Biyoteknoloji, insan, hayvan ve bitki hücrelerinin fonksiyonlarını anlamak ve değiştirmek amacıyla uygulanan çeşitli teknikleri ve işlemleri tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Biyoteknoloji uygulamaları; mikrobiyoloji, biyokimya, moleküler biyoloji, hücre biyolojisi, immünoloji, protein mühendisliği, enzimoloji ve biyoproses teknolojileri gibi farklı alanları bünyesinde toplar.

Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle, biyoteknolojinin endüstriyel enzimlerle ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar, daha da önem kazanmaktadır. Özellikle birkaç ülke dışında diğer ülkelerin bu konuda tamamen dışa bağımlı olmaları dikkate alındığında, bu konu daha da önemli duruma gelmektedir (Kıran ve ark. 2006).

Enzimler; canlı hücreler tarafından oluşturulan, biyolojik kimyasal tepkimeleri katalize eden çok küçük miktarlarda etkinlik gösteren ve tepkimeler sonunda aynı yapı ve hemen aynı miktarlarda ortamda kalan organik maddelerdir (Bilgehan 1999).

Enzimlerin birçok işlemdeki rolleri uzun zamandır bilinmektedir. Mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin ekmek yapımı, bira yapımı, alkol üretimi, peynir yapımı, vb. yerlerde kullanımı eski Yunan tarihine kadar uzanmaktadır (Haki ve Rakshit 2003).

Enzimler; spesifik, seçici olmaları ve ılımlı koşullar altında (düşük basınç ve sıcaklık, sulu ortam vb.) çok yüksek aktivite gösterebilme yeteneklerine sahip olduklarından endüstriyel katalizör olarak kullanılmaktadırlar (Lafuente 2009). Enzimler ileri derecede substrat spesifikliğine sahip olmaları nedeniyle istenmeyen yan ürünlerin oluşumunu engellerler ve katalizledikleri reaksiyonlarda %100 verim sağlarlar (Deveci 2006, Küfrevioğlu 2007).

Uygun koşullar sağlandığı zaman etkilerini doğal ortamları dışında da gösterebildiklerinden dolayı, enzimlerden pek çok alanda yararlanabilme imkanı vardır. Ayrıca enzimler; önemli oranda maliyet fiyatlarını düşürdüklerinden gıda, yem, tarım, kağıt, deri ve tekstil endüstrileri gibi sayısız yeni uygulamalarda kullanılmaktadırlar (Beilen ve Li 2002).

Enzimler; ekonomik, endüstriyel, kimya, tıp vb. alanlarda uygulama bulmuşlardır (Deveci 2006). Ekonomik alanlarda; ekmek, bira ve peynir üretimi gibi, tıpta teşhis ve tedavide önemli rol oynamaktadırlar. Kimya endüstrisinde, deterjan, endüstrisinde gıda işlemlerinde, ziraatte ve hatta biyolojik savaşta da pek çok kullanım alanları bulunmaktadır (Kuzu 2008).

Enzim kullanımı bir kaç açıdan yararlıdır. Gıda endüstrisinde kullanılmaları genellikle ılımlı koşullar altında işlemlerin başlatılmasını teşvik etme şeklindedir. Endüstriyel enzimler, birkaç istisna hariç pH 3.0-10.0 ve 25-90°C (çoğu 45-55°C)' de normal atmosfer basıncında çalışır (Baran 2001).

Gıda, yem, tarım, kağıt, deri ve tekstil endüstrileri enzim teknolojisi için uygundur. Çünkü ürünler hammaddeler kadar, enzimatik süreçlerle değiştirilebilen, parçalanabilen, üretilebilen biyomolekülleri kapsar.

Günümüzde endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmekle birlikte çok az bir kısmı da bitkisel ve hayvansal kaynaklardan sağlanmaktadır (Kuzu 2008, Coşkun 2010). Süt ve peynir endüstrilerinin bir yan ürünü olan ve atık olarak kabul edilen peynir altı suyu, enzim kaynağı olarak kullanılan bu mikroorganizmaların çok fazla çoğalıp gelişebildiği, organik madde yönünden çok zengin bir ortamdır.

Ticari öneme sahip olan enzimlerin çoğu, hidrolazlar şeklinde tanımlanmakta olup, mikrobiyal kökenlidir. Bu enzimlerin çoğu ekstrasellüler olarak bulunur ve yüksek moleküler ağırlığa sahip substratlarla görev yaparlar. Ekstrasellüler enzimler, besi yeri ve hücre duvarının dışı ile bağlantı halinde olan enzimler olarak tanımlanır (Kıran ve ark. 2006).

Enzim kaynağı olarak mikroorganizmaların tercih edilmesinin nedeni; bu mikrobiyal enzimlerin bitkisel ve hayvansal ayrıca kimyasal olarak üretilen enzimlere göre katalitik aktivitelerinin daha yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve daha ekonomik olmaları, yüksek saflıkta ve fazla miktarda elde edilebilmeleridir (Matpan 2007, Kıran 2006, Coşkun 2010, Kuzu 2008).

Mikrobiyal enzimlerin dünya genelinde yıllık kullanım oranlarına bakıldığında bu enzimlerin; %25 alkalın proteaz, %21 diğer proteazlar, %10 renin, %3 tripsin, %3

lipaz ve %10 diğer karbonhidrat parçalayan enzimler (selüloz ve ksilanaz gibi), %10 kadar ise analitik ve ilaç sanayisinde kullanılan enzimler ve %18 amilazların oluşturduğu görülür (Coşkun 2010).

Amilazlar bilinen en önemli ve eski endüstriyel enzimler olup ekmek ve bira yapımında, glukoz ve/veya fruktoz şurup üretiminde, nişasta, deterjan, tekstil, kağıt endüstrisi, eczacılık ve klinik alanlar gibi alanlarda geniş çapta kullanılmaktadırlar (Fukara 2007, Balkan 2008).

Günümüzde endüstriyel atık su olarak kabul edilen ve yeterince değerlendirilmeyen peynir altı suyu; yüksek kimyasal oksijen ihtiyacı nedeniyle kanalizasyonlara verildiğinde büyük bir çevre problemi oluşturmaktadır. Yalnızca enzim kaynağı olarak kullanılan mikroorganizmalar için değil aynı zamanda hastalık yapan mikroorganizmalar için de uygun üreme ortamı olması sebebiyle sağlık sorunlarına sebep olmaktadır.

Bu çalışmada peynir altı suyundan alınan örneklerden laktik asit bakterileri izolasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirilerek bu suşların endüstriyel açıdan büyük öneme sahip olan α -amilaz enzimi üretme yeteneğini saptamak ve en yüksek α -amilaz üretme yeteneğine sahip suştan elde edilecek α -amilaz enziminin karakterizasyonu (optimum besi yeri, optimum enzim üretim zamanı, optimum sıcaklık, optimum pH ve enzim üretimi üzerine değişik karbon, azot kaynaklarının etkisi) yapılarak peynir altı suyunun değerlendirilmesi için imkan sağlanması amaçlanmaktadır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Biyoteknoloji

Biyoteknoloji; hücre, doku ve organ kültürü, moleküler biyoloji, fizyoloji, biyokimya, mikrobiyoloji, moleküler genetik gibi doğa bilimleri ile temel mühendislik ve bilgisayar bilimlerinden yararlanarak, genetik ve moleküler DNA teknikleriyle bitki, canlıların genetik haritalarını çıkartmak, çoğaltmak, ıslah etmek, değiştirmek, geliştirmek, yeni ve az bulunan ürünleri yine canlılara (organizma, hücre ve dokulara) ürettirmek veya bunların daha fazla elde etmek için kullanılan teknolojilerin tümüdür.

Biyoteknoloji geleneksel ve modern olmak üzere 2 grupta değerlendirilir. Mikroorganizmalarca sütün yoğurt ve peynire dönüştürülmesi, sirke yapımı geleneksel gıda biyoteknolojisi konusu, yine genetik mühendisliği işlemleriyle, özellikleri geliştirilmiş mikroorganizmalarca daha nitelikli (örnek: enzimler, proteinler vb.) çeşitli etken maddeler (ilaç hammaddesi, aşılar vb.) veya ürünler (biyoetanol vb.) geliştirmek modern gıda, tıbbi veya mikrobiyal biyoteknoloji konularıdır. Bu nedenle biyoteknolojinin bitki, hayvan, gıda, tıbbi, mikrobiyal, endüstriyel (beyaz biyoteknoloji) ve çevre biyoteknolojileri olarak uygulama dalları gelişmiştir (Babaoğlu 2011).

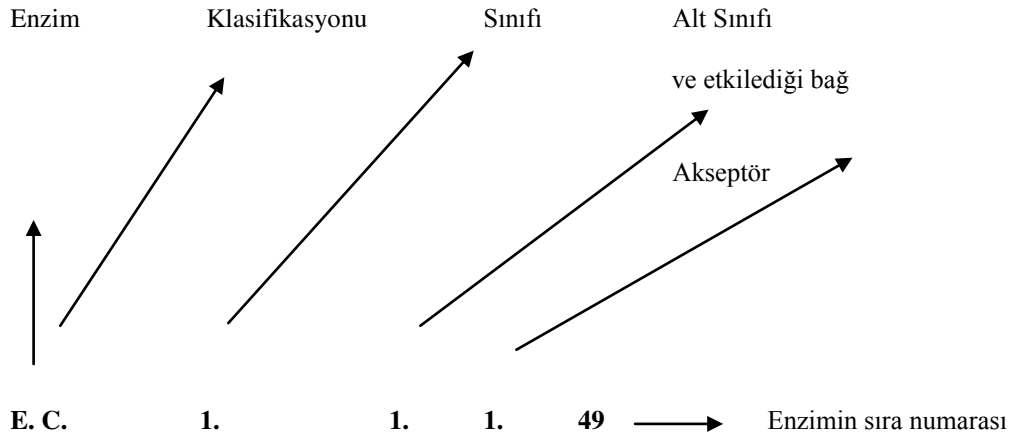
2.2. Enzimler

Enzimlerin çoğu proteinlerden yapılmışlardır ve doğal olarak yalnız canlılar tarafından sentezlenirler. Hücre içerisinde meydana gelen binlerce tepkimenin hızını ve özgülüğünü düzenlerler. Çoğu kez hücre dışında da etkinliklerini korurlar.

Solunumun, büyümenin, kas kasılmasının, sinirdeki iletimin, fotosentezin, azot bağlanmasının, deaminasyonun, sindirim vs.'nin temelini oluştururlar. Başlangıçta "Enzim" terimi, sindirim kanalında olduğu gibi bir çözelti ya da sıvı içerisinde etki ettiği durumlarda; buna karşın "Ferment = Maya" terimi çoğunluk hamur mayasında olduğu gibi, hücreye bağlı olduğu durumlarda kullanılmıştır. Buchner 1897'de fermentlerin de hücre dışında etki ettiğini bulunca iki terim arasındaki farklılık ortadan kalkmış oldu. Her iki terim arasında bugün herhangi bir fark olmamakla beraber; bakteri, mantar ve diğer tek hücrelilerdeki enzimatik işlevler, mayalanma ve etki maddeleri de ferment olarak kullanılmaktadır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Uluslararası Biyokimya Birliği, EC numaraları denen, enzimler için bir adlandırma sistemi geliştirmiştir; her enzim başında da "EC" olan ve dört sayıdan oluşan bir dizi ile betimlenir. İlk sayı enzimleri mekanizmalarına göre genel olarak sınıflandırır. Üst düzey sınıflandırma şu şekilde gösterilmektedir;



Bu sınıflandırmaya göre enzimler altı sınıfa ayrılmıştır.

1. Oksidoredüktazlar
2. Transferazlar
3. Hidrolazlar
4. Liyazlar
5. İzomerazlar
6. Sentetazlar (Ligazlar) (Gözükara 1997)

2.3. Enzimlerin Endüstriyel Uygulamaları

Enzimler, spesifik katalizörlere gerek duyulan endüstriyel uygulamalarda kullanılır. Ancak, enzimler genelde katalizleyebildikleri tepkime sayısı, organik çözücü ve yüksek sıcaklıklarda stabiliteleri açısından sınırlıdır. Bu yüzden protein mühendisliği aktif bir araştırma sahası olmuştur. Çizelge 2.1.'de endüstride kullanılan bazı enzimler ve kullanım alanları gösterilmektedir.

Çizelge 2.1. Endüstride kullanılan bazı enzimler ve kullanım alanları (Filer 2001).

Uygulama	Kullanılan enzim	Örnekler
<u>Ekmek endüstrisi</u>	α -Amilaz	Undaki <u>nişastanın</u> şekere parçalanmasını katalizler. Ekmek ve ekmek ürünleri yapımında kullanılır.
<u>Alkol endüstrisi</u>	<u>Bira</u> üretiminde arpanın ezilmesi ile enzimler salınır.	Bu enzimler nişasta ve proteinleri parçalayarak basit şekerler, amino asitler ve peptitler üretir, bunlar da <u>fermantasyonda</u> kullanılır.
	Amilaz, glukanaz, proteazlar	Malttaki polisakkarit ve proteinleri parçalarlar.
	Proteazlar	Biranın saklanması sırasında oluşan bulanıklığın giderilmesi.
<u>Meyve suları</u>	Selülozlar, pektinazlar	Meyve sularının berraklaştırılması
<u>Süt endüstrisi</u>	Genç geviş getirici hayvanların midesinden elde edilen rennin	Peynir üretimi, proteinin <u>hidrolizi</u> için
	<u>Lipazlar</u>	Mavi küflü <u>Rokfor peynirinin</u> üretimi sırasında peynirin olgunlaşmasında kullanılır.
<u>Nişasta endüstrisi</u>	Amilazlar, amiloglukozidazlar ve glukoamilazlar	Niştayı glukoza ve çeşitli <u>şuruplara</u> dönüştürür.
<u>Kağıt endüstrisi</u>	<u>Amilaz</u> , <u>Ksilanaz</u> , <u>Selüloz</u> , Lipazlar ve <u>Ligninazlar</u>	Amilaz, niştayı daha düşük <u>viskoziteye</u> indirerek; kağıdın şekillenmesi ve kaplanmasını kolaylaştırır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Çizelge 2.1. Endüstride kullanılan bazı enzimler ve kullanım alanları (Filer 2001)
(Tablonun devamı.)

Deterjan endüstrisi	Amilazlar	Bulaşık makinası deterjanlarında, dayanıklı nişasta lekelerinin çıkarılmasında kullanılır.
	<u>Lipazlar</u>	Yağ lekelerinin çıkartılmasını kolaylaştırmak için.
	<u>Selülozlar</u>	Çamaşır yumuşatıcılarında kullanılır.

2.4. Amilazlar

Uluslararası Biyokimya Birliği' nin yaptığı sınıflandırmaya göre α -amilaz, eter hidrolaz grubunda yer almaktadır ve α -1,4 glukanglukanohidrolaz (E.C.3.2.1.1) olarak adlandırılmaktadır. Uluslararası Biyokimya Birliği'ne göre hidrolazlar, C-O, C-N, C-C ve fosforik anhidrit bağlarını da içeren bazı bağların hidrolitik koparılmasını katalize eden enzimlerdir. Sistemik isimde daima hidrolaz kullanılmaktadır. Pratik isimlendirmede ise substratın önüne -az eki getirilmektedir (Baran 2001). Amilazlar ise hidrolazlar grubuna giren, nişasta ve glikojen moleküllerini hidrolize eden enzimlerdir.

Hidrolazlar sınıfında yer alan enzimler aşağıdaki gibi numaralandırılır:

1. Ester bağına etki edenler
2. Glikozil bileşiklerine etki edenler
3. Eter bağına etki edenler
4. Peptit bağına etki edenler
5. Peptit bağından başka diğer C-N bağlarına etki edenler
6. Asit anhidritlerine etki edenler
7. C-C bağına etki edenler
8. Klor ile meydana gelmiş tuzlardaki bağa etki edenler
9. Fosfor azot bağına etki edenler
10. Kükürt azot bağına etki edenler

11. Karbon fosfor bağına etki edenler

Ohlsson'un 1930 yılında malttan elde ettiği parçalayıcı enzimler, anomerik tiplerine göre alfa (α) ya da beta (β) amilazlar olarak adlandırılmışlardır. Mybrach ve Neamuler ise amilazlar için endoamilazlar ve ekzoamilazlar olmak üzere başka bir adlandırma sistemi önermişlerdir.

Endoamilazlar nişasta molekülünün içten, rastgele bir hareketle hidrolizini katalizlerler. Bu hareket; düz ve farklı zincir uzunluklarına sahip dallanmış oligosakkaritlerin oluşmasına açar. Ekzoamilazlar ise indirgen olmayan uçtan başarılı bir şekilde kısa uçlu ürünlere sonlandırarak hidroliz ederler (Gupta ve ark. 2003).

Amilazlar; dünyadaki enzim üretiminin yaklaşık olarak %30'unu oluştururlar ve gıda, fermentasyon, tekstil, kağıt, deterjan, eczacılık, damıtma ve şeker endüstrileri gibi geniş endüstri çeşitlerinde farklı uygulamalara sahiptirler (Hmidet ve ark. 2008). Amilazlar, nişasta endüstrisinde dekstrin, glukoz ve maltoz şurubu üretiminde kullanılır. Ekmekçilikte ise mayalarda, maltaz aktivitesi düşük olduğundan yardımcı enzim görevi üstlenirler (Yarkın 2007). Tatlandırıcı özelliklerinden dolayı alkolsüz içecek endüstrisinde çok büyük oranlarda kullanılırlar. Aynı zamanda, alkol fermentasyonu için nişastanın sıvılaştırılması ve şekerleştirilmesi için kullanılmaktadırlar (Aygan 2006). Amilazlar; bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmaları içine alan birçok kaynaktan elde edilebilmesine rağmen genel olarak endüstriyel talepleri mikrobiyal enzimler karşılar (Hmidet ve ark. 2008).

Nişastayı hidrolizleme şekillerine göre amilazlar 3'e ayrılır:

a) α -Amilazlar (Endoamilaz): Çok yavaş olarak hidroliz olayına katılırlar. Hasta olarak adlandırılan bir seri üç veya daha fazla α -1,4 bağlı glukoz birimlerini taşıyan ürünler açığa çıkarırlar. Buna, özellikle klorür ve bazı iyonlar da aktivatör olarak etki eder. α -amilaz, glikojenin dokularda yıkılmasında rol oynamaz, zira glikojen 1,4 glikozid bağının yıkılışı dokularda fosforilize olur. Glikojendeki 1,6 bağlarını da yine amilaz değil, ancak amilo 1,6 glikozidaz yıkar.

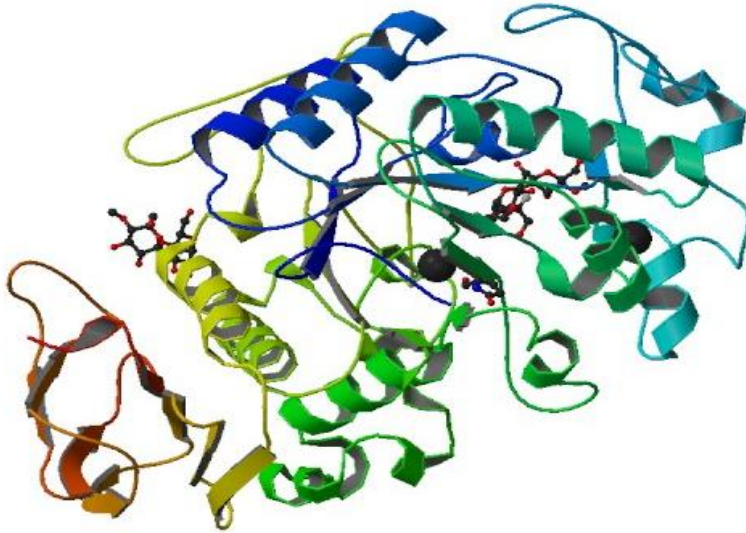
b) β -Amilazlar (Egzoamilaz): Bunlar nişastanın amiloz kısmını maltoza kadar hızlı bir şekilde hidroliz ederler. Polisakkaritte α -1,4 glikozid bağlarını hidroliz ederek zincirlerin redükte olmayan uçlarında maltoz birimlerini ayırırlar.

c) **γ -Amilazlar:** Kısa bir süre önce bağırsak ve karaciğerde ortaya çıkan, nişastayı maltoz birimlerine değil glukoz birimlerine kadar parçalamaktadır. Enzim 1,4 ve 1,6 bağlarını hidrolizleyip nişasta ve glikojeni tamamen parçalayabilir (Matpan 2007).

2.4.1. α -Amilazlar

α -Amilaz (1,4- α -D-glucanohydrolase; EC 3.2.1.1) nişastadaki α -1,4 bağlarını hidrolizler. Nişastayı hidroliz etme derecesine göre değişen iki kategori içinde sınıflandırılır. Sıvılaştırıcı α -amilazlar nişastanın % 30 ile % 40'ını; şekerleştirici α -amilazlar nişastanın % 50 ile 60'ını hidroliz eder (Balkan 2008).

α -Amilaz nişasta molekülündeki amiloz zincirinin α -1,4-glukozidik bağlarına rastgele etki ederek son ürün olarak %10'u glukoz ve %90'nı maltoz olan bir karışım meydana getirir. Nişastanın enzimatik hidrolizi sonunda oluşan ürünler α -optik konformasyonu gösterdiğinden bu enzimlere α -amilazlar denilmektedir (Fukara 2007, Balkan 2008). Ayrıca bu enzimler nişastanın iç kısımlarındaki α -1,4-glukozidik bağlarına etki ettikleri için endoamilazdır (Fukara 2007).



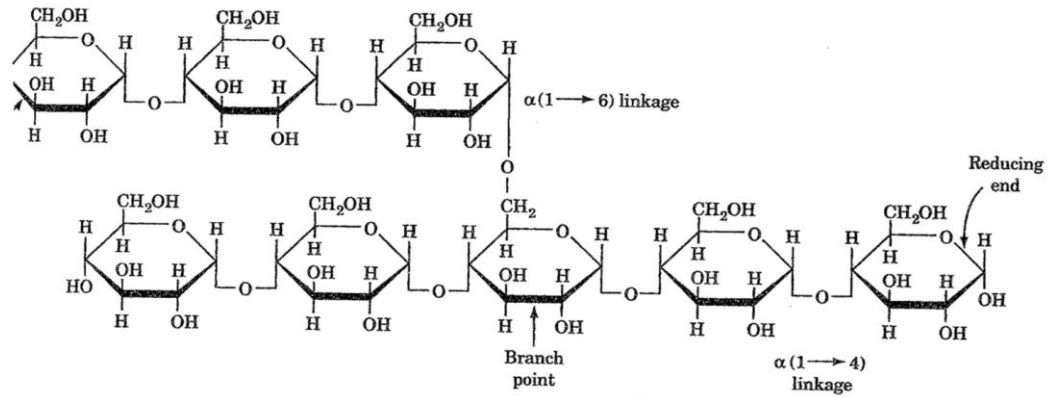
Şekil 2. 1. α -Amilazın 3 boyutlu görünümü (Li ve ark. 2009).

2.4.2. α -Amilazın Etki Mekanizması

α -Amilaz; çeşitli bakteriler, mantarlar, bitkiler ve hayvanlarda geniş bir dağılım gösterir ve polisakkaritlerin kullanımında büyük bir role sahiptir (Najafi ve ark. 2005,

Nazmi ve ark. 2006). Oligosakkaritlerin farklı büyüklüklerini elde etmek için içteki α -1,4-glukozidik bağlarını rastgele kesmek suretiyle nişasta, glikojen ve akraba olan polisakkaritleri hidroliz eder (Najafi ve ark. 2005, Habibi ve ark. 2006).

α - Amilaz üzerinde 9 glukoz kalıntısının bağlanabileceği bağlanma merkezleri bulunur. α - (1,4) bağını hidrolizleyen aktif merkezin, 3-4 no'lu glukoz kalıntılarının bağlandığı bağlanma merkezleri arasında kaldığı üzerinde durulmaktadır. Şekil 2.2. α -amilazın etki mekanizmasını göstermektedir.



Şekil 2.2. α -Amilazın etki mekanizması (Coşkun 2010).

Hidroliz işleminden sonra, soldaki grup enzim üzerinden ayrılırsa, boşalan bağlanma merkezlerini doldurmak üzere, nişasta zinciri sola doğru kendiliğinden hareket eder ve ürün olarak G6 (maltoheksos) oluşur. Eğer hidrolizden sonra sağ tarafta ayrılma söz konusu olursa boşalan bağlanma merkezlerini doldurmak üzere sağa doğru kayma meydana gelerek ve ürün olarak G3 (maltotrioz) oluşur. Amilopektinden ise; benzer mekanizma ile maltoz (G1), maltodioz (G2), maltotrioz (G3), maltoheksos (G6) meydana gelir (Agüloğlu 1996).

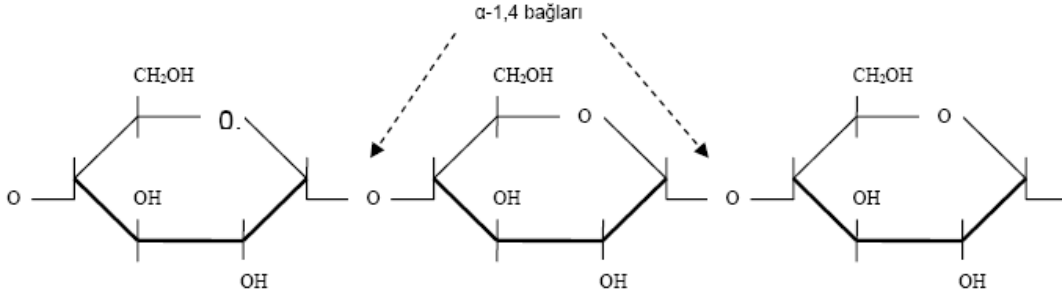
2.4.3. Nişasta

Nişasta, patates gibi yumrulu bitkilerde, mısır, buğday, pirinç gibi tahıllarda bulunan, suda çözünmeyen kompleks bir depo polisakkarit olup glukoz monomerlerinden oluşan bir homopolisakkarittir (Matpan 2007, Yarkın 2007).

Nişasta, iki tip glikoz polimerinden oluşur. Bunlardan birincisi amiloz olup, α -D-(1,4)-glikopiranosil bağlarıyla birbirine bağlanmış, moleküler ağırlığı yaklaşık 300

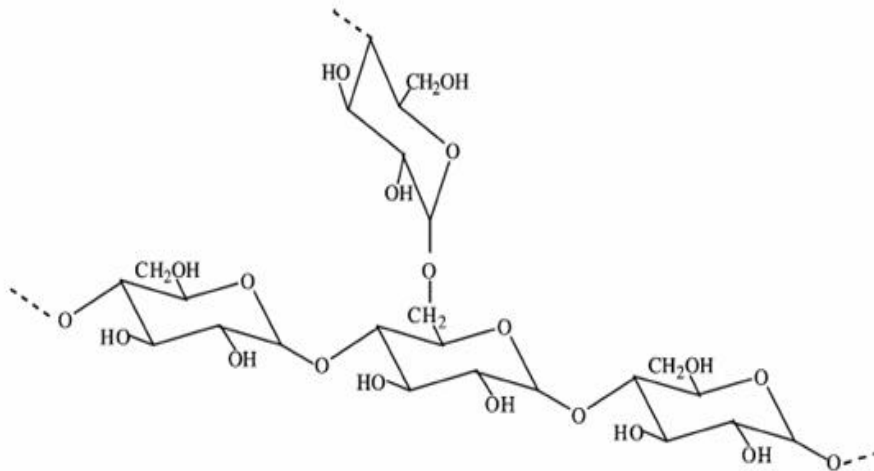
2. KAYNAK ÖZETLERİ

000 dalton olan lineer bir polimerdir. Ancak birbirini izleyen glikoz birimlerinin açılı olma eğiliminden dolayı bir sarmal oluşturur.



Şekil 2.3. Amilozun kimyasal yapısı (Gönenç 2006).

Diğeri ise amilopektin olup, dallanmış bir polimer özelliği gösterir. Amilopektin yan zincirleri, ana zincire α -1,6 ve α -1,4 bağlarıyla bağlı olan glikoz moleküllerinden meydana gelmiştir. Amilopektin adı verilen ikinci molekül şekli ise dallanmış bir yapı gösterir (Tatar 2007). Nişasta molekülün yaklaşık % 70'ini oluşturur. Yapısında en az 1800 glukoz birimi bulunur. Amilopektin molekülünde glukoz birimleri α -1,4 ve α -1,6 glikozidik bağları ile birbiriyle bağlanmışlardır. Glukoz birimleri α -1,4 glikozidik bağı ile bağlanarak düz bir zincir oluştuktan sonra her 24 ile 30'uncu glukoz birimlerinde α -1,6 glikozidik bağı ile yan zincir oluştururlar ve bu şekilde de dallanmış bir yapı ortaya çıkmış olur (Kos 2011).



Şekil 2.4. Amilopektinin kimyasal yapısı (Öztolan 2007).

α -Amilaz gibi amilolitik enzimler endüstriyel olarak, nişastanın sıvı hale getirilmesi ve sakkarifikasyon işlemlerinde önemlidir (Kim ve ark. 2008). α -Amilazlar; içten işleyen, glikozid hidrolaz enzimlerdir ve glikoliz hidrolaz 13. aileye (GH13) mensupturlar (Najafi ve ark. 2005, Habibi ve ark. 2006). α -Amilaz enzimi endüstriyel boyutlarda ilk kez 1939 yılında *Bacillus subtilis* suşu kullanılarak Japonya'da üretilmiştir. 1970 yılında *B. subtilis* ve *B. licheniformis* α -amilaz enzimi üretimi için geniş çapta kullanılmıştır (Tatar 2007).

α -Amilaz, bira yapımı, ekmekçilik, tekstil, kağıt, gıda ve deterjanı içine alan çok sayıda endüstriyel işlemde kullanılabilen, biyoprotein üretiminde ve nişastanın fermentasyonunda önemli bir yer tutan en önemli endüstriyel enzimlerden biridir (Agüloğlu ve ark. 2000, Liu ve Xu 2008). Deterjanda bir katkı olarak kullanıldığı gibi dokumada nişasta haşılının uzaklaştırılması, nişastanın sıvı hale gelmesi ve ekmekçilikte dekstrinin şeklinin daha fazla korunması gibi şeyler için kullanılabilir. α -Amilaz; termostabilite, metal iyon serbestliği, pH aralığı ve diğerleri gibi arzu edilen özellikleriyle akraba endüstrilerde çok yararlı olabilir (Najafi ve ark. 2005, Liu ve Xu 2008). Örneğin; pH değeri 8.0'dan yüksek olan amilazların nişasta ve tekstil endüstrilerinde nişasta sakkarifikasyonu için potansiyel uygulamaları vardır ve ayrıca otomatik bulaşık ve makineleri için kullanılan deterjanların bir parçasıdır (Saxena ve ark. 2007).

2.5. Peynir Altı Suyu

Peynir altı suyu; su ve sütte bulunan (yaklaşık olarak % 5 laktoz, % 0.9 azotlu bileşikler, % 0.8 mineraller ve küçük miktarlarda vitaminler), suda çözülebilen bileşiklerin çoğunu içeren peynir yapım işleminin yan ürünü olan bir sıvıdır (Ghaly ve Kamal 2003). Peynir altı suyu (PAS), peynir veya kazein üretiminde kazeinin çöktürülmesi sonucu elde edilen çözünabilir, proteince zengin bir üründür (Özen ve Kılıç 2007). Peynir altı suyu; süt ürünlerinin sıvı atığı olduğundan dolayı dünya çapında geniş kapasitelerde üretilir ve yüksek oranda ciddi çevresel kirlilik ve sağlık problemleri yaratır (Koutinas ve ark. 2007, Pescuma ve ark. 2008). Biyolojik olarak arıtılması yüksek maliyet gerektiren bir işlem olduğu için daha önceleri işlem görmeden hayvan gıdası olarak kullanılan peynir altı suyundan gelişen teknoloji ile birçok ürün elde edilmektedir. Peynir altı suyundan; konsantre PAS, PAS tozu, mineralleri azaltılmış

PAS tozu, laktozu ve mineralleri azaltılmış PAS tozu, PAS protein konsantresi, PAS protein izolatu ve laktoz üretilmektedir (Özen ve Kılıç 2007). Peynir altı suyu; yalnızca insan ve hayvan kullanımı için bir besin kaynağı değil aynı zamanda mikroorganizmaların üremesini destekleyen iyi bir ortamdır. Bunun tarımsal gübre ve hayvan yemi olarak kullanımının yanı sıra, peynir altı suyu veya bileşenleri; çeşitli gıda, kozmetik ve eczacılık ürünlerini içinde birleştirmiştir (Marek ve ark. 2004).

2.6. Laktik Asit Bakterileri

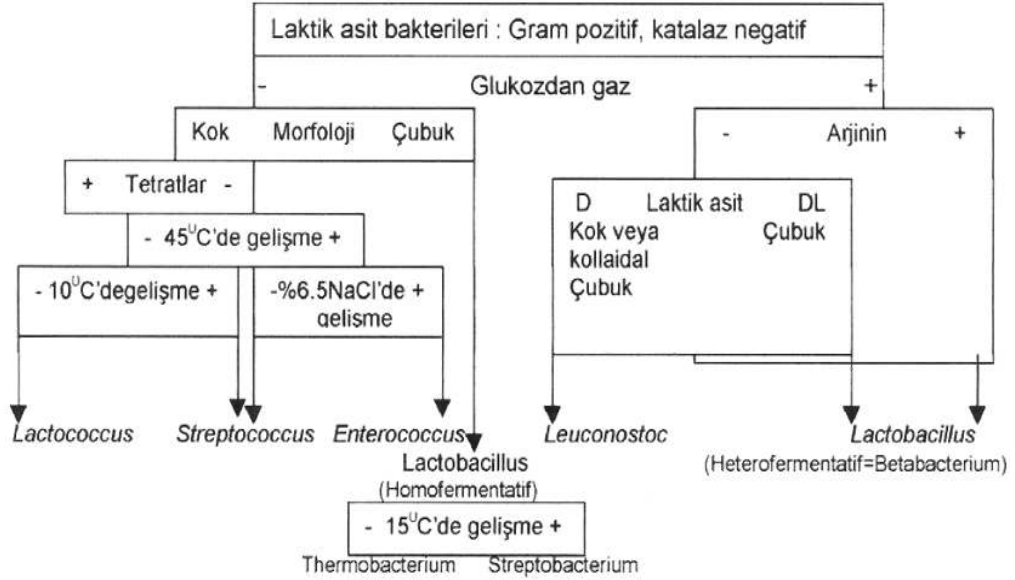
Günümüzde en tipik LAB mensupları; *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* ve *Pediococcus* cinslerine bağlı, düşük C + G branşının organizmalarıdır (Ammor ve ark. 2007). Genel olarak laktik asit bakterileri grubunda *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* ve *Leuconostoc* cinsleri incelenmekte iken son yıllarda yapılan genetik çalışmalar sonucu *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Weissella* ve *Vagococcus* cinsleri de bu grupta incelenmeye başlanmıştır. Yine son yıllara ait literatürde bu grupta *Aerococcus*, *Oenococcus*, *Atopobium*, *Dolosigranum*, *Tetragenococcus*, *Alloiococcus* ve *Gemella* gibi yeni cins isimlerine rastlanmakta ise de bu cinslerle ilgili taksonomik çalışmaların henüz tamamlanmadığı bildirilmektedir (Yılmaz ve Temiz 2003).

- **Domain:** Bacteria
 - **Kingdom:** Bacteria
 - **Phylum:** Firmicutes
 - **Class:** Bacilli
 - **Order:** Lactobacillales
 - **Family:** Streptococcaceae
 - **Genus:** Lactococcus

Laktik asit bakterileri; fermentasyon modellerine dayanarak üç gruba ayrılmıştır:

- a) Homofermentatif: Glukozdan % 85'ten fazla laktik asit üretenler,
- b) Heterofermentatif: Yalnızca % 50 laktik asit üretenler,
- c) DL-laktik asit, asetik asit ve karbondioksit üreten daha az bilinen heterofermentatif türler (Reddy ve ark. 2008).

Laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında yararlanılan morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik testleri içeren klasik yöntemlere günümüzde de başvurulmaktadır.



Şekil 2.5. Laktik asit bakterilerin ayrımı (Yılmaz ve Temiz 2003).

Morfolojik ve fizyolojik özellikler, bakterilerin sınıflandırılmasında kullanılan temel kriterdir. LAB'lerinin genus ve türlere göre değişmekle birlikte genel olarak kok, düzgün çubuk ve düzensiz çubuk olmak üzere üç farklı morfolojik görünimleri vardır. LAB'ini tanımlamada ilk olarak kullanılan karakterler; sütte ve diğer besi ortamlarına alındıklarında oluşturdukları laktik asit miktarı, minimum, optimum ve maksimum gelişme sıcaklığı, oksijene tolerans, farklı NaCl konsantrasyonuna gösterdikleri tolerans, gaz ve uçucu aroma bileşikleri üretmeye yetenekleri ile pH'ya toleranstır (Palalı 2007).

Laktik asit bakterileri (LAB); karbonhidrat fermentasyonunun temel metaboliti olarak laktik asit üreten, spor oluşturmeyen, Gram pozitif, katalaz ve oksidaz negatif çomak ve kok şekilli bakterilerin geniş bir grubunu teşkil ederler. LAB, anaerobik, aerotolerant ve özellikle besin olarak vitaminlerle aminoasitlere gereksinimleri vardır (Reddy ve ark. 2008, Françoise 2010).

LAB'nin insan tarafından kullanılmalarının uzun bir tarihi vardır, gıda üretimi ve muhafazası için maya kadar uzun süredir kullanılabilmektedir. Bu bakteriler; bitkilerin sindirim sistemi, gıda ürünleri gibi zengin organik ürünler içeren ortamlarda doğal

olarak bulunurlar. Solunum sistemleri yoktur ve enerji sağlamada çoğunlukla fermentatif metabolizmalarına güvenirlir (Renault 2002). Bunlardan amilolitik laktik asit bakterileri (ALAB) tek aşamalı fermentasyonda nişastalı biyokütleyi kullanırlar ve laktik asite dönüştürürler (Reddy ve ark. 2008).

LAB komunitésinin mensupları havaya toleranslı anaerobik doğaları sayesinde doğal çevrelerinin geniş bir alanını teşkil ederler (Ammor ve ark. 2007).

LAB; probiyotik özelliklere sahip olabilirler ve starter kültür bakterileri olarak, güvenli kullanımlarının uzun bir tarihi vardır (Katla ve ark. 2001). LAB; geçen 4000 yıldır kültür gıdalarını mayalamak için kullanılmışlardır (Reddy ve ark. 2008). LAB günümüzde de genellikle fermente gıda üretiminde kullanılmaktadır. Örneğin; yoğurt yapımında *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., peynir yapımında *Lactococcus* spp. ve sosis yapımında *Leuconostoc* spp. gibi farklı LAB yaygın olarak kullanılmaktadır (Palalı 2007). Amilazlarının ham nişastayı kısmi olarak hidroliz etme yeteneklerinden dolayı, ALAB; mısır, patates gibi farklı tipteki nişastalı ham maddeleri ya da maniok gibi farklı nişastalı substratları mayalayabilirler (Reddy ve ark. 2008).

LAB; mayalanmış süt ürünleri (peynir, yoğurt ve kefir), ekmek ve tahıllar (ekşi hamur vb.) ve sebzeleri (turşu ve silaj gibi) içeren değerli gıdaların üretimiyle ilişkili olarak; insanoğlu için en önemli mikroorganizma gruplarından biridir (Kim ve ark. 2008). Ayrıca çoğu LAB; bağırsak florasının her zaman her yerinde bulunan elemanlardır. İnsan bağırsağındaki bu bakterilerin çoğu, konak için yararlı ya da zararsız olup insan fizyolojisinde önemli bir rol oynarlar (Liu ve ark. 2009).

2.6.1. Laktokokkus

Lactococcus cinsi; Schleifer ve meslektaşları tarafından *Streptococcus* (Lancefield grup N laktik streptokoklar) ve *Lactobacillus* cinslerinin bazı türlerini yeniden sınıflandırmak için 1985'te önerilmiştir. Bu, 16S rRNA sekanslama ile pekiştirilmiş kemotaksonomik çalışmalar esas alınarak tayin edilmiştir.

Lactococcus cinsi; Streptokokgiller familyasında yer alır ve laktik asit üretme yeteneği olan kısa zincirler ve çiftler halinde dizilmiş; fakültatif, anaerobik Gram (+) bakteriler olarak karakterize edilmiştir (Vinh ve ark. 2006, Casalta ve Montel 2008).

Laktokoklar; Yalnızca L (+) laktik asit üretirler ve homofermentatiftirler. Laktokoklar genellikle hayvanların derileri ve bitkilerin üzerinden; *L. plantarum* çoğunlukla bitkilerden, *L. garvieae* süt ve hayvanlardan ve *L. piscum* som balığından izole edilmiştir. *L. lactis subsp lactis* ve *L. lactis subsp cremoris*; çok yaygın olarak ham süt, peynir ve diğer süt ürünlerinde bulunmuştur (Casalta ve Montel, 2008).

Laktokoklar; fermente edilmiş yiyeceklerin (peynir gibi) imalatında kullanılmalarından dolayı laktik asit bakterilerinin, pratik uygulamalardaki en önemli grubudur. Çoğunlukla üremeleri sırasında asidik koşullar sayesinde oluşmuş proteince zengin ürünlerin hızlı bozulmasını engellemeye yardımcı olurlar. Bakteriyofaj dirençliliği ve bakteriyosin üretme yeteneği gibi başka özelliklere de sahip olabilirler (Ayad ve ark. 2002).

2.7. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, Tanımlanması ve α -Amilaz Üretimi ile İlgili Çalışmalar

Sengun ve ark. (2009), yoğurt ve buğday unundan yapılan “Tarhana” dan MRS, M17 ve SBM besi yerlerini kullanarak 226 Gram pozitif ve katalaz negatif bakteri izole etmişlerdir. İzolatları fenotipik ve genotipik birçok yöntem kullanarak identifiye etmişler ve gruplandırmışlardır.

Adnan ve Tan (2007), keçi sütü kullanılarak elde edilen tapai ve tempoyak besinlerinden laktik asit bakterisi izole etmişlerdir. Toplam 126 suş izole ederek bu izolatların Gram boyama ve katalaz aktivitelerini belirlemişlerdir. Elde ettikleri izolatlardan yedi tanesini tanımlayarak bunlardan ikisinin laktobasil, birinin de laktokok olduğunu belirlemişlerdir.

Felis ve ark. (2007), Sardinarya inekleri ve koyunlarının ham sütünden ve koyunların sütünden yapılan Gioddu adlı yoğurtlarından; MRS Agar kullanarak %5 CO₂ içeren ortamda, 37°C’de, 24-48 saat inkübe ettikten sonra bakteriyal suşlar izole etmişlerdir. Bu suşların genotipik ve fenotipik metotlarla karakterizasyonunu yapmışlar ve büyük bir kısmının *Lactobacillus* suşları olduğunu belirlemişler ve probiyotik uygulamalarda yararlı işlevsel özelliklerini araştırmışlardır.

Rajagopalan ve Krishnan (2007), *Bacillus subtilis* KCC103 suşunu kullanarak farklı karbon kaynaklarının ve şeker kamışı posası hidrolizatının α -amilaz üretimi üzerine etkisini çalışmışlardır.

Zamfir ve ark. (2006), ham ve fermente edilmiş süt, peynir gibi kaynaklardan topladıkları 110 örnekten laktik asit bakterisi izolasyonu ve bu bakterilerin biyoçeşitliliği üzerine çalışmalar yapmışlardır. Elde ettikleri 599 izolatın Gram reaksiyonunu, katalaz aktivitesini ve morfolojisini test etmişlerdir. İzolatlar arasında genellikle *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc spp.*, *E. saccharominimus* ve *Enterococcus spp.* türlerini bulmuşlardır.

Najafi ve ark. (2005), topraktan izole ettikleri *Bacillus subtilis* AX20'den ürettikleri ekstraselüler α -amilaz enziminin homojenizasyonunu ve saflaştırılmasını yaparak optimum sıcaklığını 55°C, optimum pH'sını 6.0 olarak saptamışlardır. Enzim aktivitesi üzerine ağır metallerin ve bazı kimyasalların etkisini araştırmışlardır.

Badis ve ark. (2004), 4 farklı Cezayir ırkı keçinin sütünden izole ettikleri 725 laktik asit bakterisinin karakteristiğini çalışmışlardır. 30 ve 45°C inkübasyon sonrası mikrobiyolojik analizleri Gram boyama- katalaz üretimi- spor oluşturmayı içeren birinci adım ve makroskopik- mikroskopik morfolojik analizler ve fermentasyon tipine dayalı analizleri 2. adımda gerçekleştirmişlerdir.

Optimum olarak, Streptokokları; M17 besi yerinde, 45°C'de, 72 saat, aerobik ortamda; Laktokokları; Elliker besi yerinde, 30°C'de, 72 saat, aerobik ortamda üretmişlerdir. Lökonostokları; hipersakkarozlu besi yerinde, 25°C'de, 72-144 saat, aerobik ortamda; Pediokokları; M17 besi yerinde, 30°C'de, 72 saat, aerobik ortamda; mezofilik Laktobasilleri; MRS besi yerinde, 30°C'de, 24-36 saat, anaerobik ortamda; termofilik Laktobasilleri; MRS besi yerinde, 45°C'de, 24-36 saat, anaerobik ortamda üretmişlerdir.

Konsula ve Kyriakides (2004), taze koyun sütünden izole ettikleri ılımlı termofilik *Bacillus subtilis* suşundan elde ettikleri ekstraselüler termostabil α -amilazın nişasta hidrolizine etkisini araştırmışlardır. Maksimum amilaz üretiminin düşük konsantrasyonlarda nişasta içeren ortamda 40°C'de olduğunu; maksimum aktivitenin 135°C'de pH 6.0'da saptamışlardır.

Muyanja ve ark. (2003), Uganda yöresel fermente ev yapımı ve laboratuvar yapımı gıdası “ bushera” ‘dan 351 izolattan 113 laktik asit bakterisi izole etmişlerdir, çeşitli testler ve Gram boyama yaparak identifikasyonlarını yapmışlardır.

Sanni ve ark. (2002), Nijerya’nın yöresel fermente edilmiş yiyeceklerinden, amilaz üreten amilolitik laktik asit bakteri suşları izole etmişlerdir. Suşların; Gram pozitif, hareketsiz, katalaz negatif olduğunu ve spor oluşturmayan hücrelerden oluştuğunu saptamışlardır. Çalıştıkları 3 adet suşun amilaz aktivitesi için optimal koşulları, 12 saat ve pH 4.0-7.0 ve 30-80°C olarak denemişlerdir. *L. plantarum* suşları için pH’yı 6.0 ve sıcaklığı 65°C; *L. fermentum* K9 suşu için ise pH’yı 4.0 ve sıcaklığı 45°C olarak saptamışlardır.

Cengiz ve Uraz (2001), Atatürk Orman Çiftliği süt fabrikasından değişik zaman dilimlerinde alınan çiğ süt örneklerinden bakteriyolojik çalışma ile stafilokok izolasyonu yapmışlardır.

Besi yerinde üreyen bakterilerin kültür, hareket, beta hemoliz, morfolojik ve biyokimyasal özellikleri, katalaz, koagülaz, gram boyanma ve novobiyosin duyarlılığı gibi verilerine bakılarak koagülaz pozitif stafilokok (KPS) ve ayırımına gitmişlerdir. Bu stafilokokların sefalosporinlere (Sefradin: CE, Sefuroksim: CXM, Seftizoksime: ZOX) ve karbapenem grubundan imipeneme (IPM) duyarlılık-dirençlilik oranlarını araştırmışlardır.

Aguilar ve ark. (2000), yeni bir laktik asit bakterisi olan *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010’tan ürettikleri ekstraselüler α -amilaz enziminin karakterizasyonunu ve saflaştırmasını yapmışlardır. Enzimin optimum pH’sını 5.5 ve optimum sıcaklığını 55°C olduğunu saptamışlardır. Bazı karbon kaynaklarının enzim aktivitesi üzerine etkisini incelemişlerdir.

Toksoy ve ark. (1999), izole ettikleri bakterilerin identifikasyonlarında, bakterilerin morfolojik özellikleri saptamış ve biyokimyasal testlerden yararlanmışlardır. *Lactobacillus* bakterilerini diğer bakteri gruplarından ayırmak için, morfolojik şekilleri, spor oluşturma durumları, hareketlilik, gram boyama ve katalaz reaksiyonları ile katı besi yerindeki kolonilerin şekil ve yapılarını incelemişler ve bazı suşların antimikrobiyal etkilerini araştırmışlardır.

Sidhu ve ark. (1997), sıcak su kaynaklarından topladıkları toprak ve su örneklerinden izole ettikleri *Bacillus* sp. MK716 suşunun optimum büyüme sıcaklığını 55°C ve pH'sını 7.0 olarak saptamışlardır. Nişastanın α -amilaz üretimini indüklediğini bunun yanı sıra glukoz, nutrient broth veya Luria broth gibi zengin ortamda α -amilaz üretimini baskıladığını tespit etmişlerdir.

3. MATERİYAL METOT

3.1. Materyal

Aşağıdaki besi yerleri ve çözeltiler materyal olarak seçilmiş ve kullanılmıştır.

3.1.1. Biyolojik Materyal

Bu çalışmada Diyarbakır'daki peynirciler çarşısından alınan peynir altı suyu örneklerinden izole edilen bakteriler kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Nutrient Broth ve Nutrient Agar, Caso Agar, glukoz, sukroz, galaktoz, CaCl_2 , CaCO_3 , HCl , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaOH , $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, kristal viyole, lugol, fuksin, de Man, Rogosa ve Sharpe (MRS) Agar Merck'ten; tripton, FCR (Folin reaktifi), DNS (Dinitro salisilik asit), Na_2CO_3 çözülebilir nişasta, maltoz, laktoz, kazein, tris, fruktoz, fenolftalein difosfat, üre, $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_4$, Mueller Broth (MB), Sigma'dan; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, NaCl , etanol Riedel-De Haen'den; jelatin Difco'dan; pepton, maya özütü, Oxoid'den; et özütü Acumedia'dan; Na-K- Tartarat, glisin, süt tozu Fluka'dan temin edilmiştir.

3.1.3. Kullanılan Aletler

İnkübatör	(Sanyo)
Çalkalamalı Su Banyosu	(Julabo)
pH Metre	(Mettler Toledo MP220)
Spektrofotometre	(Varian 50 UV)
Otoklav	(HIRAYAMA HICLAVE HV)
Soğutmalı Santrifüj	(Sigma 2K-15)
Vorteks	(VWR International)
Etüv	(Heraus)
Steril Kabin	(Telstar AV-100)
Magnetik Karıştırıcı	(Stuart)
Su Banyosu	(Grant 6G)
Sterilizatör	(Heraus)
Dijital Göstergeli Hassas Terazî	(GEC, AVERY)

3.1.4. Bakteri İzolasyonu ve İdentifikasyonunda Kullanılan Besi Yerleri

3.1.4.1. Nutrient Broth Agar (NBA): Bakteri izolasyonu ve identifikasyonunda kullanıldı.

Pepton.....	10 g/l
Maya Özüdü	5 g/l
NaCl.....	10 g/l
Agar-agar.....	15 g/l
Distile su.....	1000 ml

3.1.4.2. de Man, Rogosa ve Sharpe (MRS) Agar: Bakteri izolasyonu ve identifikasyonunda kullanıldı.

Pepton.....	% 1.0
Et özüdü.....	% 0.8
Maya Özüdü.....	% 0.4
Glukoz.....	% 2.0
CH ₃ COONa.3H ₂ O.....	% 0.5
Tween 80.....	% 0.1
K ₂ HPO ₄	% 0.2
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	% 0.2
MgSO ₄ ·7H ₂ O.....	% 1.0
MnSO ₄ ·4H ₂ O	% 0.005
Agar.....	% 1.0

3.1.4.3. Mueller Broth: Bakteri ve amilaz üretimi için kullanıldı.

Maya özüdü.....	% 0.6
Kazein hidrolizat.....	% 1.75
Nişasta.....	% 0.15

3.1.4.4. Basal Medium: Bakteri ve amilaz üretimi için kullanıldı.

Nişasta.....	% 2
Et özütü.....	% 1
Maya Özütü.....	% 0.2
CaCl ₂	% 0.02
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	% 0.01

3.1.4.5. Luria Bertani Broth: Bakteri ve amilaz üretimi için kullanıldı.

Trypton.....	10 g/l
Maya Özütü	5 g/l
NaCl.....	10 g/l

3.1.4.6. Jelatin Besi Yeri: Bakterilerin jelatini parçalayıp parçalamadığını saptamak için kullanılmıştır. NB besi yerine (100 ml) 12 gr jelatinin eklenmesiyle hazırlanır.

3.1.4.7. Nişasta Agarı: Amilaz aktivitesinin saptanması amacıyla kullanılmıştır. Bunun için NBA besi yerine %3'lük nişasta eklenmesiyle hazırlanır.

3.1.4.8. Kazein Besi Yeri: Bakterilerin süt proteinini oluşturan kazeini kazeinaz enzimi vasıtasıyla hidrolizleyip hidrolizleyemediklerini tespit etmek amacıyla kullanılır.

Pepton.....	10 g/l
Maya Özütü	5 g/l
Agar-agar.....	15 g/l
Süt Tozu.....	% 10

3.1.4.9. Katalaz Testi: Bakterilerin katalaz reaksiyonlarını saptamak amacıyla kullanılmıştır. Saf bakteri kültürü üzerine %3'lük H₂O₂ çözeltisinden 1 ml ilave edilir ve gaz çıkışı gözlenir.

3.1.4.10. Ürea Agar Besi Yeri: Bu test, mikroorganizmaların üreyi hidroliz eden üreaz enzimini sentezleyip sentezleyemediklerini tespit etmek için kullanılır.

Pepton.....	1 g
KH ₂ PO ₄	2 g
NaCl.....	5 g
D-Glukoz.....	1 g
Üre.....	20 g
Fenol kırmızısı.....	12 mg
Agar-agar.....	1.5 g
Distile su.....	100 ml (son pH 6.8)

3.1.4.11. Yağlı Besi Yeri: Bu test, mikroorganizmaların yağları parçalayan lipaz enzimini sentezleyip sentezleyemediklerini tespit etmek için kullanılır.

Pepton.....	1.25 g/250 ml
Et özütü.....	0.75 g/250 ml
Agar-agar.....	3.79 g/250 ml
Tereyağı.....	2.5 g/250 ml

3.1.4.12. SİM Besi Yeri (Sülfid-İndol-Mobility): Hidrojensülfür, indol oluşumu ve hareketin varlığını ölçmek için kullanılan bir besi yeridir.

Kazein Peptonu.....	2 g/l
Et Peptonu.....	6 g/l
NH ₄ Fe(SO ₄) ₂ · 12 H ₂ O	0.2 g/l
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₃	0.2 g/l
Agar.....	3 g/l
Distile su.....	1000 ml

3.1.4.13. Kanlı Agar: Hemoliz testinde; zor üreyen mikroorganizmaların hemolitik reaksiyonlarını, dış faktörlerden etkilenmeden, maksimum performansta tespit etmek için kullanılan temel içeriği kan ilavesi ile zenginleştirilmiş olan bir katı besi yeridir.

Pankreatik kazein	15 g
-------------------------	------

Papaik hazmedilmiş soya unu5 g

NaCl.....5 g

Agar.....15 g

Defibrine koyun kanı% 5-7

Distile su.....1000 ml

3.1.4.14. Fosfataz Testi: Bu test, özellikle, koagulaz pozitif suşların fosfataz enzimi sentezleyip sentezlemediğini belirlemek için yapılır.

Fenolftalein disfofat..... % 0.5

Nutrient broth.....0.48 g

Distile su.....60 ml

3.1.4.15. Şeker Testi (Triple Sugar Iron Agar): İncelenecek olan bakterilerin fermentasyon yeteneği olup olmadığını anlamak için kullanılır.

Kazein Peptonu15 g/l

Et Peptonu5 g/l

Et özütü.....3 g/l

Agar-agar.....12 g/l

Maya Özütü3 g/l

NaCl.....5 g

Laktoz.....10 g

Sukroz.....10 g

D-Glukoz.....1 g

Fenol kırmızısı0.024 g

$\text{NH}_3\text{Fe}_3(\text{SO}_4)_2$ 0.5 g/l

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.5 g/l

Distile su1000 ml

3.1.4.16. EMB (Eozin Metilen Blue): İçindeki ayıraçlar aracılığı ile benzer bakterilerin farklı koloniler oluşturmalarını sağlamak ve karışık bakterileri birbirinden ayırt etmeye yarayan bir besi yeridir.

Pepton.....	10 g
Laktoz.....	5 g
Sukroz.....	5 g
K ₂ HPO ₄	2 g
Agar.....	13.5 g
Eozin Y.....	0.4 g
Metilen mavisi.....	0.065 g

3.1.4.17. Caso Agar: Bakteri izolasyonu ve identifikasyonunda kullanıldı.

Kazein Pepton.....	15 g
Soymeal Pepton.....	5 g
NaCl.....	5 g
Agar.....	15 g

3.1.5. Kullanılan Çözeltiler

3.1.5.1. NaOH ve HCl Çözeltisi

Besi yerlerinin pH'sını ayarlamak amacı ile 1 N NaOH ve HCl çözeltileri kullanılmıştır.

3.1.5.2. Sitrat Tamponu (pH 4.0-6.0): Enzimin pH 4.0-6.0 arasındaki aktivitesini saptamak amacı ile kullanıldı. 0.1 M solusyon A (21.014 g/1000 ml sitrik asit) ve 0.1M solusyon B Na₂HPO₄·7H₂O (35.716 g/1000 ml) stok çözeltileri hazırlanır ve istenilen pH değerleri için uygun karışımların elde edilmesi amacıyla kullanılır.

<u>pH</u>	<u>Solusyon A (ml)</u>	<u>Solusyon B (ml)</u>	<u>Distile su (ml)</u>
4.0	33	17	50
5.0	20.5	29.5	50
6.0	9.5	40.5	50

3.1.5.3. Tris-HCl Tamponu (pH 6.0-9.0): Enzimlerin pH 6.0-9.0 arasındaki aktivitelerini saptamak amacı ile kullanıldı. 0.1 M Solusyon A (27.8 g Tris /1000 ml) ve 0.1 M solusyon B (8.28 ml HCl /1000 ml) stok çözeltileri hazırlanır ve istenilen pH değerleri için uygun karışımların elde edilmesi amacıyla kullanılır.

<u>pH</u>	<u>Solusyon A (ml)</u>	<u>Solusyon B (ml)</u>	<u>Distile su (ml)</u>
6.0	30.7	19.3	50
7.0	24.3	25.7	50
8.0	17.9	32.1	50
9.0	17.9	32.1	50

3.1.5.4. NaHCO₃ Tamponu (pH 9.0-10.0): Enzimlerin pH 9.0-10.0 arasındaki aktivitelerini saptamak amacı ile kullanıldı. 0.1 M solusyon A (8.4 g NaHCO₃/1000 ml) ve 0.1 M solusyon B (4 g NaOH/1000 ml) stok çözeltileri hazırlanır ve istenilen pH değerleri için uygun karışımların elde edilmesi amacıyla kullanılır.

<u>pH</u>	<u>Solusyon A (ml)</u>	<u>Solusyon B (ml)</u>	<u>Distile su (ml)</u>
9.0	44.3	5.7	50
10.0	39.3	10.7	50

3.1.5.5. 3,5 DNS (3,5 Dinitro Salisilik Asit): Enzim aktivitesini durdurmak amacı ve indirgen şeker miktarının saptanması amacı ile kullanılmıştır. 20 g 3,5 dinitro salisilik asit 400 ml distile su içinde çözündü. Başka bir beherde 32 g / 300 ml NaOH çözündü ve daha sonra yavaş yavaş 3,5 dinitro salisilik asit üzerine damla damla eklendi. Bir süre sıcak su banyosunda bekletildikten sonra 600 g Na-K Tartarat azar azar eklendi. Hacim saf su ile 2000 ml'ye tamamlandı (Bernfeld 1955).

3.1.5.6. Alkalın Çözeltisi: Protein miktar tayininde kullanıldı.

A; 0,1 N NaOH içinde %2 (w/v) Na₂CO₃ çözüldü.

B; %1 (w/v) Na-K Tartarat içinde %5 (w/v) CuSO₄. 5H₂O çözüldü.

C; 50 ml A belirteci ile 1 ml B belirteci karıştırılarak oluşturuldu.

3.1.5.7. İyot Solüsyonu: Nişastalı katı besi yerinde amilaz aktivitesinin saptanması amacı ile kullanılmıştır. 14 mM KI ve 10m M I₂ saf su ile 50 ml'ye tamamlandı.

3.1.5.8. Kristal Viyole Çalışma Solüsyonu: Gram boyama yaparken kullanıldı. Kristal viyole stok solüsyonundan 40 ml ve amonyum oksalat stok solüsyonundan 160ml karıştırılarak günlük çalışma solüsyonu hazırlandı. Önce kristal viyole stok solüsyonu bir şişeye filtre edilerek süzüldü, üzerine amonyum oksalat stok solüsyonu ilave edildi.

Kristal Viyole Stok Solüsyonu:

Kristal viyole..... 40 g

% 95'lik Etanol 400 ml

Kristal viyole cam havanda ezildi ve üzerine alkol ilave edildi (oda sıcaklığında 1 yıl saklanır).

3.1.5.9. Lugol Çalışma Solüsyonu: Gram boyama yaparken kullanıldı.

Stok lugol solüsyonu..... 60 ml

Distile su..... 220 ml

%5'lik NaHCO₃ 60 ml

Koyu renkli bir şişede karıştırılır, günlük çalışma solüsyonu hazırlanır.

Stok Lugol Solüsyonu:

İyot kristalleri..... 25 g

Potasyum iyodür..... 50 g

Distile su..... 500 ml

Koyu renkli bir şişede karıştırılır, oda derecesinde 6 ay saklanır.

3.1.5.10. Sulu Fuksin Solüsyonu: Gram boyama yaparken kullanıldı.

Bazik fuksin (stok) 10 ml

Distile su..... 100 ml

Fuksin, distile suda iyice karıştırılır ve filtre kâğıdında süzülür.

Bazik Fuksin (Stok Solüsyon):

Bazik Fuksin..... 10 g

% 95'lik Etil alkol..... 100ml

Bazik fuksin havanda ezilir ve alkolle eritilir, 37°C'de bir gece bekletildikten sonra filtre kâğıdında süzülür ve cam kapaklı şişelerde saklanır.

3.1.5.11. Kovacs Ayıracı: İndol testinin ayırıcı olarak kullanıldı.

Amil veya isoamil alkol (saf)..... 150 ml

Paradimetil aminobenzaldehid 10 g

HCl50 ml

3.1.5.12. Yarı Katı Agarlı Besi Yeri: Hareket testinin içeriğinde bulunur. % 3-5 agar içeren besi yeridir.

3.1.5.13. Triptofan Besi Yeri: İndol testinde bakterilerin triptofanı hidrolizleyerek indol oluşturup oluşturmadıklarını belirlemek amacıyla kullanıldı.

%1'lik triptofan besiyeri:

Pepton veya sindirilmiş pankreatik kazein..... 2 g

NaCl..... 0,5 g

Distile su..... 100 ml

3.2. METOT**3.2.1. Laktik asit bakterilerinin izolasyonu**

Laktik asit bakterisi elde etmek amacıyla 10 ml peynir altı suyu 90 ml steril su içeren erlenlere aktararak 10^{-1} lik süspansiyon hale getirildi ve benzer şekilde ardışık transferler yapılarak 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} 'lik dilüsyonlar sağlandı. Tek koloni

elde etmek amacıyla seri sulandırma yapılan örneklerden MRS agar besisi yerine yayma ekim yapıldı ve 37°C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra besisi yerinde tek tek düşmüş farklı morfolojik görünüme sahip koloniler seçildi ve bu koloniler NB agar besisi yerine çizgi şeklinde ekim yapılarak identifikasyon ve amilaz aktivitelerinin saptanması amacı ile stok kültür şeklinde saklandı.

3.2.2. Bakterilerin İdentifikasyonu

3.2.2.1. Biyokimyasal Testler: Seçilen farklı morfolojik görünüme sahip bakteri örneğini teşhis edebilmek amacı ile nişasta, jelatin, katalaz, kazein, üreaz ve lipaz hidrolizi ile hareket, indol, fosfataz, hemoliz gibi biyokimyasal testler yapıldı.

Nişasta Hidrolizi Testi:

Bu test, mikroorganizmaların nişastanın mikroorganizmalar tarafından sentezlenen amilaz enzimi tarafından parçalanıp parçalanmadığını ortaya koymak amacıyla yapılır. Bunun için %3'lük nişastalı agar (pH 7.0) hazırlandı ve katı besisi yerlerinde üretilen izolatlardan ayrı ayrı tek koloni seçilerek çizgi ekimi yapıldı ve her izolat için optimum sıcaklıkta 2-5 gün süreyle inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda nişastalı agarların üzeri iyot solüsyonu ile kaplandı ve reaksiyon değerlendirildi.

Jelatin Hidrolizasyon Testi:

Bu test mikroorganizmaların, jelatinaz enzimi sentezleyip sentezleyemediklerini ölçmek için yapılır. Bunun için % 10 jelatin içeren besisi yeri hazırlandı, taze kültürden seçilen farklı mikroorganizmaların ayrı ayrı ekimi yapıldı. Besi yerleri her izolat için optimum sıcaklıkta 10 gün kadar inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kontrollerle birlikte buzdolabında 1-2 saat bırakıldı. Besi yerinde erimenin olup olmadığı gözlemlendi.

Katalaz Testi:

Bu test ile, mikroorganizmaların katalaz enzimi sentezleyip sentezleyemediklerini saptanır. Bunun için gecelik (18-24 saatlik) mikroorganizma kültürleri üredikleri katı besisi yerine çizgi ekim ile aktarıldı ve 1 gece inkübe edildi. Taze kültürlerin üzerine yavaş yavaş %3'lük taze hazırlanmış hidrojen peroksit ilave edildi ve incelendi. Hidrojen peroksit ilavesinden sonra kolonilerin bulunduğu yerlerde

kabarcıklar görülürse katalaz enziminin sentezlendiği, eğer hava kabarcıkları görülmezse katalaz enziminin sentezlenmediği sonucuna varılır.

Kazein Hidrolizi:

Bu test, mikroorganizmaların süt proteinini kazeinaz ile hidrolizleyip hidrolizleyemediklerini tespit etmek amacıyla kullanılır. Bunun için; %10 süt tozu bulunan besi yeri hazırlandı ve taze kültür ekilerek bir gün süreyle inkübe edildi. 1 gün sonra kültür üzerine %1'lik HCl damlatılarak kolonilerin etrafında şeffaf zonların oluşup oluşmadığına bakıldı.

Üreaz Testi:

Bu test ile mikroorganizmaların üreyi hidroliz eden üreaz enzimini sentezlediklerini tespit edilir. Bu test bakterilerin cins ve tür tayininde önemlidir. Bunun için; üre agarlı besi yeri 15 ml'lik tüplerde hazırlandı. Taze mikroorganizma kültürlerinden üre agarlı besi yerine ekim yapıldı ve 2-5 süreyle inkübasyona bırakıldı ve renk değişimi olup olmadığı gözlemlendi.

Lipaz Testi:

Bu test mikroorganizmaların yağları parçalayan lipaz enzimini sentezleyip sentezleyemediklerini tespit etmek için kullanıldı. Bunun için; yağlı besi yeri hazırlanıp otoklavlandıktan sonra her bir izolatın taze kültüründen ayrı ayrı ekim yapılarak 1 gün inkübasyona bırakıldı ve ertesi gün oluşan kolonilerin bulunduğu kültür ortamına aşırı doygun CuSO_4 çözeltisi damlatıldı. Mat yeşilimsi saha lipaz üretiminin olduğunu göstermektedir.

Hareket Testi:

Bu test mikroorganizmaların hareket yeteneklerinin olup olmadığını belirlemede kullanılır. Bunun için; %0.4-0.5 yarı katı agarlı besiyeri 15 ml'lik tüplerdeki içinde kapiler tüplerin bulunduğu besi ortamına döküldü. Elde edilen izolatların gecelik taze kültürlerinden tek koloni iğne öze yardımıyla alınarak kapiler tüp içerisine daldırmak suretiyle ekim yapıldı ve her izolat ayrı ayrı 24 veya 48 saat inkübasyona bırakıldı. Eğer besiyerinin inokülasyon hattı boyunca üreme var ancak sağa-sola doğru dallanma yoksa mikroorganizma hareketsiz kabul edilir, fakat inokülasyon hattından sağa-sola doğru agarın içine doğru bir yayılma gözlenirse hareketli kabul edilir.

İndol Testi:

Triptofan bulunan bir besi yerinde üretilen bakterilerin, triptofanı enzimatik hidrolize uğratarak indol oluşturup oluşturmadıklarını belirlemek amacı ile yapılan bir testtir. 5 ml %1'lik triptofan besi yeri içeren tüplere ekim yapılarak optimum sıcaklıkta 72 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 0.2-0.3 ml Kovacs ayırıcı ilave edildi. Üst kısımda kırmızı halka oluşumu pozitif reaksiyon, sarı-kahverengi ise negatif reaksiyon olduğunu gösterir.

Fosfataz Testi:

Bu test, özellikle, koagulaz pozitif stafilokokların sentezledikleri fosfataz enzimi sentezleyip sentezlemediğini belirlemek için yapılır. Bunun için; içinde, %0.5 fenolftalein difosfat bulunan NB sıvı besi yeri 10 ml'lik tüplerde hazırlandı. Taze mikroorganizma kültürlerinden besi yerine ekim yapıldı ve 2 gün süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda tüplere 1 damla %40 NaOH solusyonu damlatıldı. Tüpte kırmızı rengin oluşup oluşmadığı gözlemlendi.

Hemoliz Testi:

Bakterilerin hemoliz yeteneği olup olmadığını tespit etmek için kullanılır. Bu test, % 5 koyun kanı içeren kanlı agarda üreyen bakteri kolonilerinin sahip oldukları hemolizin enzimleri ile eritrositleri parçalayarak, bir zon oluşması esasına dayanır. Gecelik üretilmiş kültürden kanlı agar besi yerine tek koloni düşürülecek şekilde öze ile çizgi ekim yapılır ve optimum sıcaklıkta 1 – 7 gün inkübe edildi. Oluşturdukları kolonilerin etrafında, kenarları keskin hatlı olmayan, bulanık ve yeşilimsi bir zon oluşursa α -hemolitik; kolonilerin etrafında düzgün bir hatla çevrilmiş temiz ve berrak bir hemoliz zonu oluşursa β - hemolitik ve zon oluşmuyorsa γ -hemolitik reaksiyon verdiği belirlenir.

3.2.2.2. Gram Boyama:

NBA'da gecelik üretilen bakteri örneklerinden platin öze yardımıyla koloni alınarak temiz lamin bir kenarına serum fizyolojik damlatılıp kolonilerin yayma işlemi gerçekleştirildi ve preparat kurutulup, alevden geçirilerek tespit edildi. Kurutulan preparatlar üzerine ilk önce kristal viyole solüsyonu dökülerek 2 dakika bekletildi, boyanması sağlandı ve su ile yıkandı. Yıkanan preparat üzerine lugol solüsyonu

dökülerek 1 dakika bekletildi ve yıkandı. Deklorizasyonu sağlamak amacıyla % 96'lık alkol döküldü 15- 20 sn. bekletildi ve yıkandı. En son olarak sulu fuksin ile 2 dakika bekletildi ve boyanması sağlandı, su ile yıkanarak boya giderildi. Preparatlar kurutulduktan sonra immersiyon yağı damlatılarak mikroskop altında hem morfolojik hem de Gram özelliklerine göre inceleme yapıldı.

3.2.3. Laktik Asit Bakterilerinin Üretim Ortamının Optimizasyonu

3.2.3.1. İnkübasyon Süresinin Mikroorganizma Gelişimi Üzerine Etkisi

25 ml LB sıvı besi yeri hazırlanarak 100 ml'lik erlenmayerde otoklavlandı. Gecelik taze kültürden 1 ml ekim yapılarak 37°C'de, 120 rpm'de çalkalamalı su banyosunda üretildi. 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36 ve 48. saatlerde üretilen bakterinin 600 nm'de spektrofotometrede absorbanı ölçüldü.

3.2.3.2. Sıcaklığın Mikroorganizma Gelişimi Üzerine Etkisi

25 ml LB sıvı besi yerine ön inkübasyondan 1 ml bakteri ekimi yapıldı; 20°C'den başlayarak 5°C arttırılarak 60°C'ye kadar optimum üreme zamanında, 120 rpm'de çalkalamalı su banyosunda inkübe edildi. Her bir sıcaklık için spektrofotometrede 600 nm'de absorbanı ölçüldü.

3.2.3.3. pH'nın Mikroorganizma Gelişimi Üzerine Etkisi

25 ml LB sıvı besi yerleri pH'ları 2.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 olacak şekilde ayarlanarak otoklavlandı ve gecelik taze kültürden 1 ml ekim yapıldı. Bakterinin optimum üreme zamanı ve sıcaklığında 120 rpm'de çalkalamalı su banyosunda inkübe edildi ve 600 nm'de spektrofotometrede absorbanları ölçüldü.

3.2.4. *Lactococcus* sp. PS-2A Bakterisinden Elde Edilen α -Amilaz Enziminin Optimizasyonu

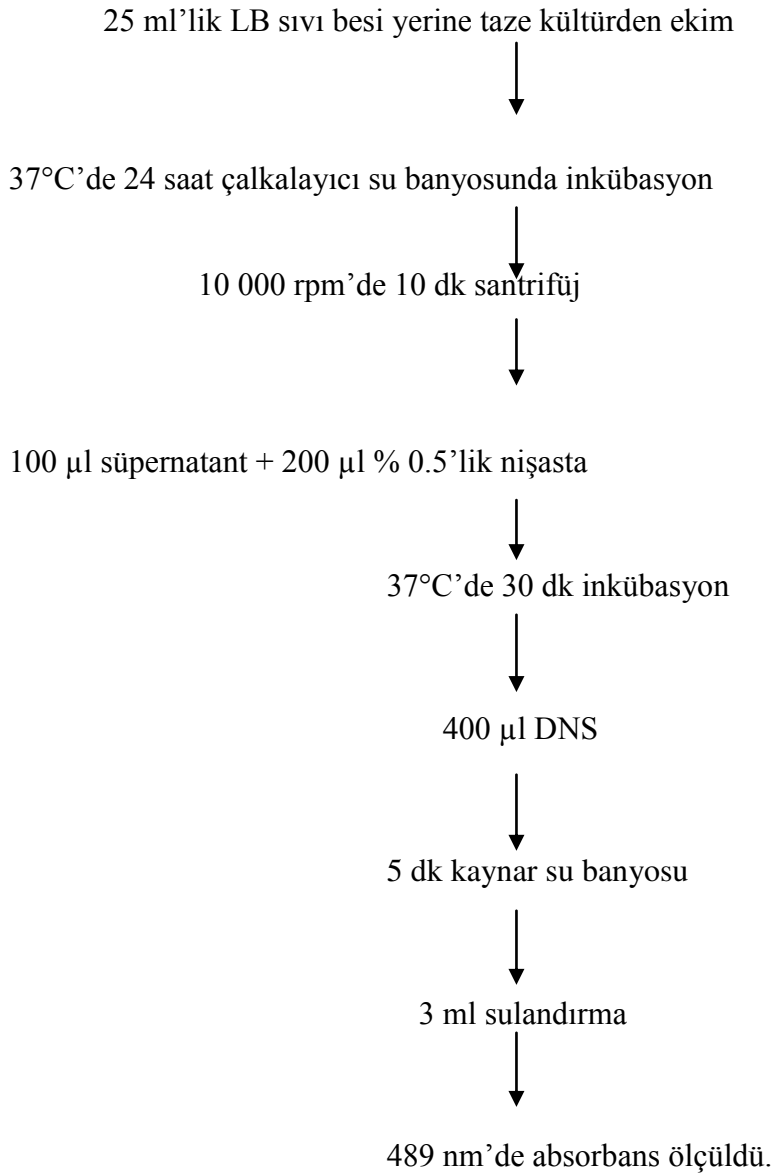
Çalışmanın bu bölümünde optimum kültür koşullarının belirlenmesi amaçlandı. α -Amilaz sentezine etkili olabileceği düşünülen; üretim süresi, üretim ortamının sıcaklık ve pH'sı, üretim ortamına eklenen değişik karbon ve azot kaynaklarının etkileri çalışıldı.

3.2.4.1. Farklı Besi Yerlerinin α -Amilaz Üzerine Etkisi

Farklı besiyerlerinin α -amilaz üretimine etkisini belirlemek amacıyla katı besiyerinde üretilen bakteri suyu farklı besiyerlerine (MRS, NB, LB ve BM) aktarıldı ve 1 gece üretilti. Bakterinin absorbansı 600 nm’de spektrofotometrede ölçülerek α -amilaz aktivitesi ve protein miktarı belirlendi.

3.2.4.2. α -Amilaz Enzimi Aktivite Tayini

α -Amilaz enziminin aktivitesi Bernfeld yöntemine göre tespit edildi (Bernfeld, 1955).



α -amilaz için 1 Ünite Enzim: 1 μ mol nişastayı 1 dakikada maltoz birimlerine parçalayan α -amilaz miktarıdır (U/mg).

3.2.4.3. Protein Miktar Tayini (Lowry Yöntemi, 1951)

Öncelikle konsantrasyonunu bildiğimiz standart protein çözeltisi (1mg/ml BSA) hazırlandı. Bu standart çözeltiden faydalanarak konsantrasyonunu bilmediğimiz çözeltideki protein miktarı Lowry yöntemine göre hesaplandı. Bunun için artan konsantrasyonlarda hazırlanan standart ve 50 μ l enzim çözeltisi alınarak tüplerin hepsine 5 ml alkalın çözeltisi eklendi ve 15 dk. 40°C’de bekletildikten sonra tüplerin hepsine 1:1 oranında seyreltilmiş 500 μ l FCR (Folin reaktifi) eklendi ve 30 dk karanlıkta bekletildikten sonra 660 nm’de spektrofotometrede absorbans değerleri ölçüldü.

3.2.4.4. İnkübasyon Süresinin α -Amilaz Üretimine Etkisi

Üretim süresinin α -amilaz üretimine etkisini görmek için üreme ortamının değişik zaman periyotlarında (4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36 ve 48. saat) bakteri kültüründen 1 ml örnek alındı. 10 000 rpm’de 10 dakika soğutmalı santrifüjde santrifüjlendi. Elde edilen süpernatant enzim kaynağı olarak kullanılıp Bernfeld yöntemine göre aktivitesi ölçüldü.

3.2.4.5. α -Amilaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Enzim olarak; LB besi ortamında optimum koşullarda üretilen bakteri kültürünün santrifüj edilmesiyle elde edilen üst sıvı kullanıldı. Daha sonra 20°C’den 5°C’lik artan sıcaklık aralıklarıyla 60°C’ye kadar Bernfeld yöntemine göre α -amilaz aktivitesi belirlendi.

3.2.4.6. α -Amilaz Aktivitesi Üzerine pH’nın Etkisi

Enzim olarak LB besi yerinden elde edilen üst sıvı kullanıldı. Substrat olarak kullandığımız nişasta %0.5’lik olacak şekilde sırasıyla sitrik asit (0.1 M pH 4.0, 5.0 ve 6.0), Tris-HCl (0.1 M pH 7.0, 8.0 ve 9.0) ve glisin/NaOH (0.1 M pH 9.0, 10.0) tamponları içerisinde ayrı ayrı hazırlandı. Daha sonra bakteri için optimum sıcaklıkta Bernfeld yöntemine göre α -amilaz aktivitesi ölçüldü.

3.2.4.7. α -Amilaz Üretimi Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisi

100 ml'lik erlenlerde 25 ml LB besi yerleri hazırlanıp otoklavlandı. LB besi yerlerinde %1 konsantrasyonda olacak şekilde karbon kaynaklarından glukoz, galaktoz, fruktoz, laktoz, çözünebilir nişasta, maltoz ve süktroz tek tek ilave edildi, gecelik kültürden 1 ml bakteri ekimi yapıldı. α -Amilaz üretimi için optimum üretim zamanı, sıcaklık ve pH'da inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda 1 ml örnek alınarak 600 nm'de spektrofotometrede absorbans ölçümleri yapıldı. Daha sonra 10 000 rpm'de soğutmalı santrifüjde santrifüj edildi ve elde edilen süpernatantlardan α -amilaz aktivitesi ölçüldü ve Lowry (1951)'e göre protein miktar tayini yapıldı.

3.2.4.8. α -Amilaz Üretimi Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi

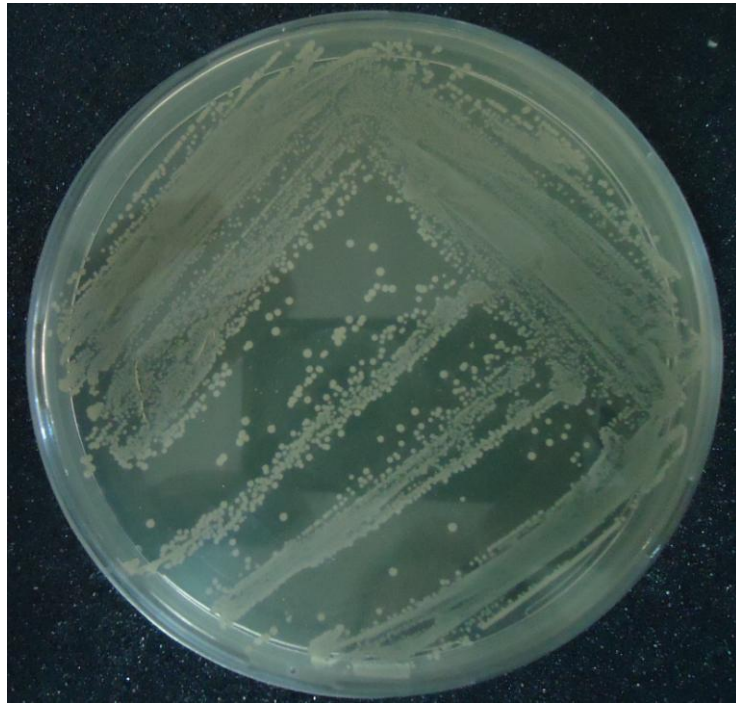
100 ml'lik erlenlerde hazırlanan 25 ml'lik LB besi yerlerine %1'lik azot kaynaklarından pepton, tripton, üre, amonyum sülfat, amonyum klorür, amonyum sülfat, amonyum nitrat, sodyum nitrat, et özütü, maya özütü ve mısır özütü eklendikten sonra otoklavlandı. Daha sonra gecelik bakteri kültüründen 1'er ml her erlene ayrı ayrı ekildi. Optimum koşullarda inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda 1 ml örnek alınarak 600 nm'de spektrofotometrede absorbans ölçümleri yapıldı. Bu örneklerin üst sıvısında α -amilaz aktivitesi ve protein miktar tayini yapıldı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Bakteri İzolasyonu ve İdentifikasyonu

4.1.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

Peynir altı suyu kullanılarak laktik asit bakterisi elde etmek amacıyla seri sulandırma yapılan örneklerden laktik asit bakterileri için selektif besi yeri olan MRS agara yayma ekim yapıldı ve 37°C’de 1 gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra MRS besi yerinde tek tek düşmüş farklı morfolojik görünüme sahip 4 çeşit koloni seçilerek bu koloniler PS-2A, PS-3B, PS-3C ve PS-4B olarak isimlendirildi. Seçilen koloniler NB agar besi yerine çizgi şeklinde ekim yapıldı. Üretilen bakteri kültürlerinin hepsinin; <1 mm, kok şeklinde, düzgün görümlü, pigment oluşturmeyan kolonilerden oluştuğu tespit edildi. Şekil 4.1.’de PS-2A’nın NB agardaki koloni görünümü verilmektedir.



Şekil 4.1. PS-2A’nın koloni görünümü

Şekil 4.2.'de PS-2A'nın nişastalı agarda amilaz ürettiği belirlendi. Amilaz varlığı tespit edildikten sonra PS-2A'yı tanımlamaya yönelik biyokimyasal testler yapıldı.

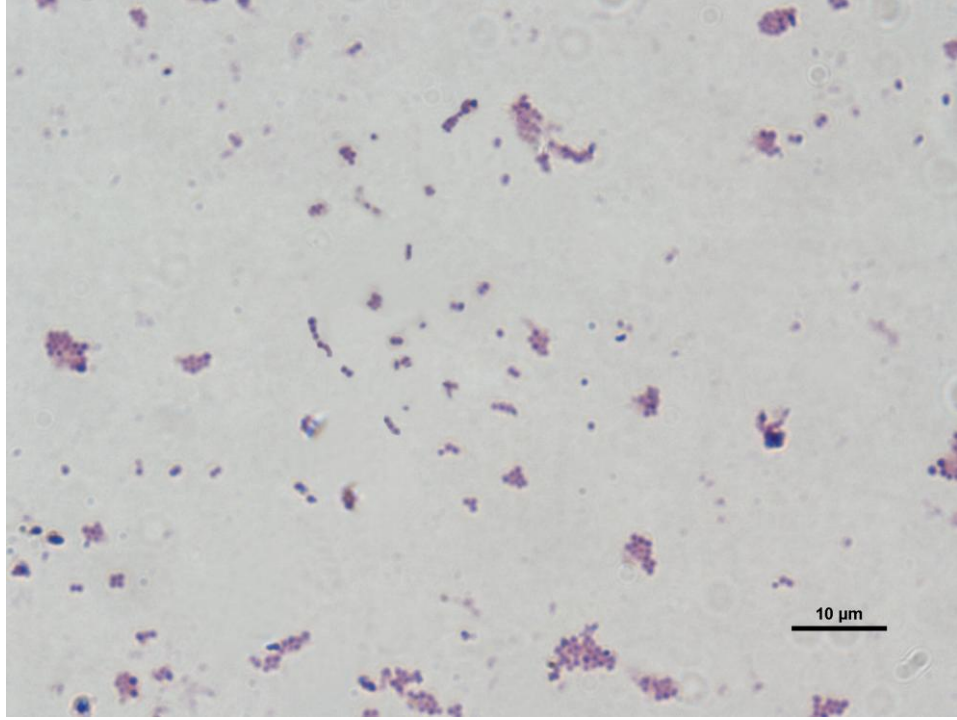


Şekil 4.2. PS-2A'nın nişastalı agarda amilaz varlığının tespiti

4.1.2. Bakterilerin İdentifikasyonu

4.1.2.1. Gram Boyama:

NBA'da gecelik üretilen bakteri örneklerinden hazırlanan preparatlardan mikroskop altında Gram boyama özellikleri ve morfolojik özellikleri incelendi. Buna göre; elde edilen 4 farklı izolatın (PS-2A, PS-3B, PS-3C ve PS-4B) Gram pozitif ve kok şeklinde olduğu belirlendi. Belirtilen izolatların laktik asit bakterileri için selektif olan MRS agarda üremelerinden ve Gram boyanma özellikleriyle koloni şekillerinden dolayı Laktokokus oldukları belirlendi Şekil 4.3.'de PS-2A'ya ait Gram boyama sonucu görülmektedir.



Şekil 4.3. *Lactococcus* sp. PS-2A bakterisinin Gram boyama görüntüsü

4.1.2.2. Biyokimyasal Testler: Seçilen PS-2A, PS-3B, PS-3C ve PS-4B bakteri örneklerini teşhis edebilmek amacı ile nişasta, jelatin, katalaz, kazein, üreaz ve lipaz hidrolizi ile hareket, indol, fosfataz, hemoliz gibi biyokimyasal testler yapıldı ve bu bakterilerin birbirleriyle ve laktik asit bakterilerinden Laktokokus ile olan benzerlikleri ve farklılıkları Çizelge 4.1.'de verilmektedir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Çizelge 4.1. Laktik Asit Bakterilerinin, Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri (Kav ve ark. 2008, Çağırın 2004, Evans ve ark. 2006, Ravelo ve ark. 2001, Sharifiyazdi 2010, Vendrel ve ark. 2006, Kubilay ve ark. 2005, Soltani ve ark. 2008).

Özellikleri	PS-2A	PS-3B	PS-3C	PS-4B	<i>Lactococcus</i>
Gram	+	+	+	+	+
Koloni büyüklüğü	< 1 mm	< 1 mm	< 1 mm	< 1 mm	< 1 mm
Koloni morfolojisi	kok	kok	kok	kok	kok
Hareketlilik	+	-	-	-	-
Pigment üretimi	-	-	-	-	-
Katalaz	-	-	-	-	-
Hemoliz	-	+	-	-	+
İndol	+	+	-	+	(d)
Nutrient Agar	+	+	+	+	ND
Fosfataz	+	+	+	+	+
Şeker(Glukoz, laktoz, sukroz)	-	-	-	-	(d)
EMB	+	+	-	+	ND
Caso Agar	+	+	+	+	ND
Nişasta+NB	+	+	+	+	ND
Büyüme					
Sıcaklık aralığı	20-60 °C	20-60 °C	20-60 °C	20-60 °C	10-45°C
pH aralığı	4-10	4-10	4-10	4-10	4.5-9.6
Hidroliz					
Nişasta	+	+	-	+	ND
Kazein	+	+	+	+	ND
Jelatin	-	-	-	-	ND
Aktivite					
Lipaz	+	+	-	+	ND
Üreaz	+	-	-	+	-
α -amilaz	+	+	+	+	ND

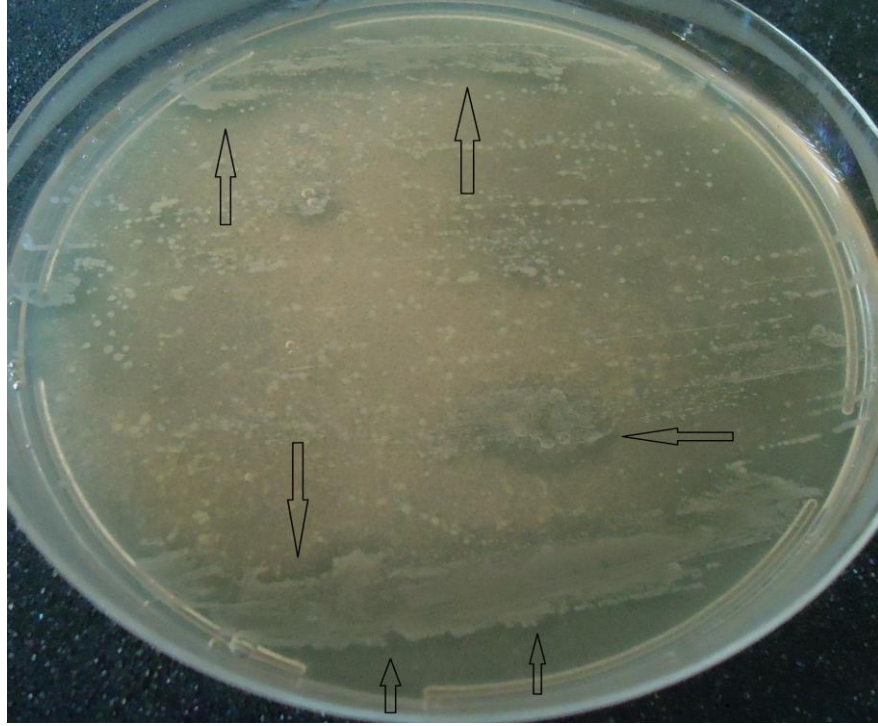
+ pozitif sonuç

- negatif sonuç

ND belirsiz

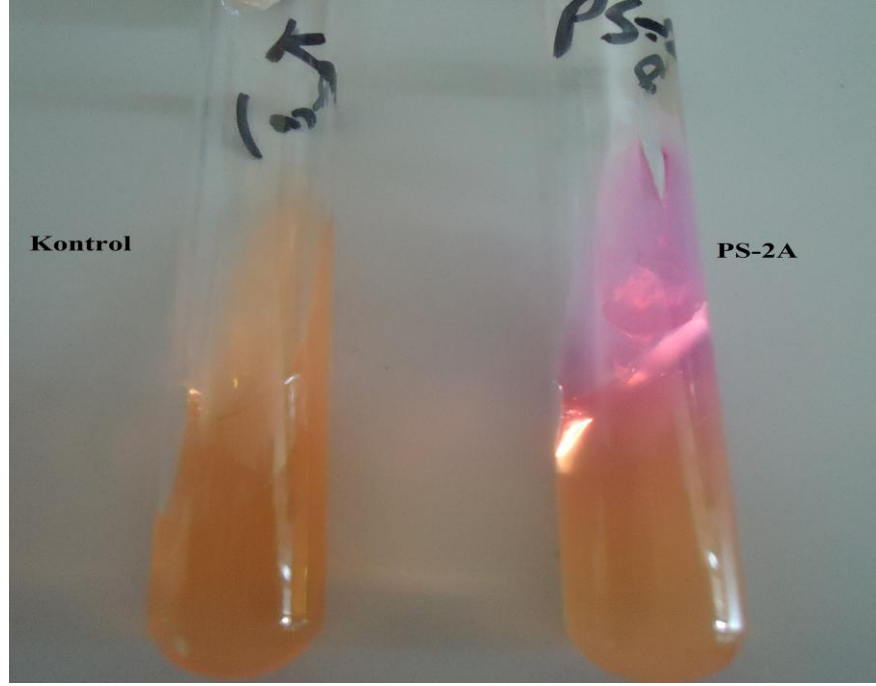
(d) değişken

Bu izolatlardan yapılan biyokimyasal testlerde nişastalı agarda en iyi amilaz aktivitesine sahip olan izolatın PS-2A olduğu belirlendi.



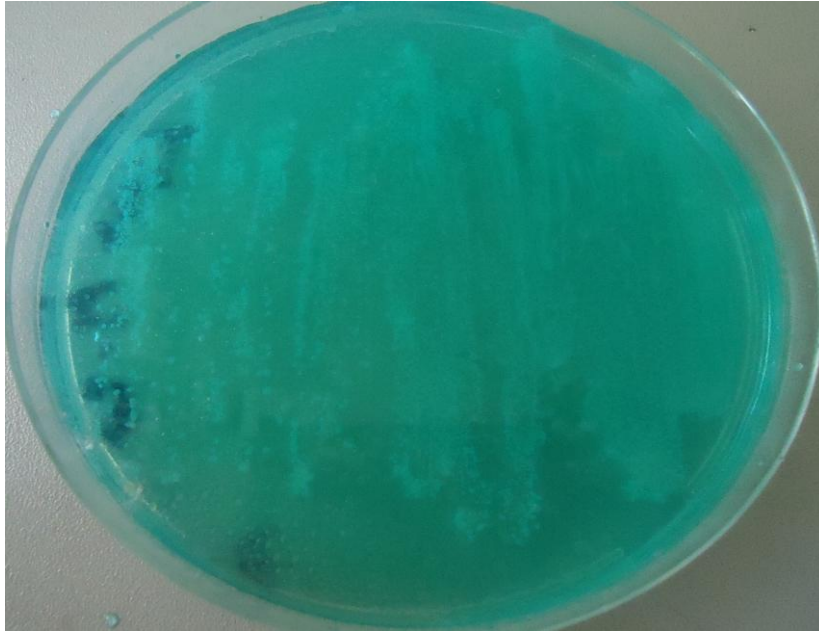
Şekil 4.4. PS-2A'nın kazein hidrolizi testi

Şekil 4.4.'te kolonilerin etrafında az miktarda şeffaf zonlar görülmektedir, bu zonlar PS-2A'nın kazeinli agarda süt proteinini kazeinaz enzimi ile az miktarda hidrolizlediğini göstermektedir.



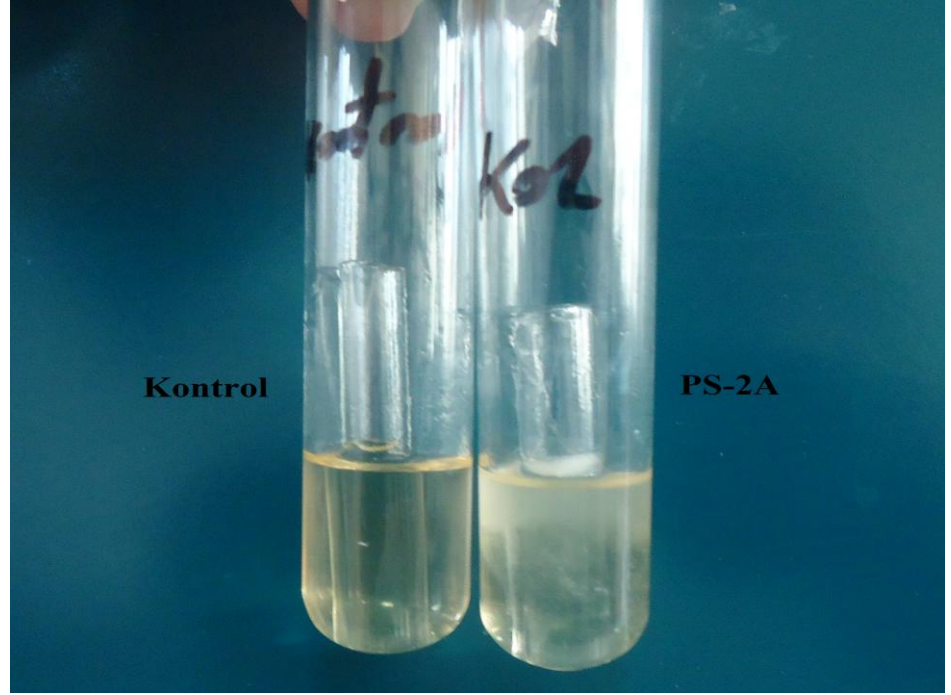
şekil 4.5. PS-2A'nın üreaz testi

şekil 4.5.'te üre agarlı besi yerine PS-2A'nın taze kültüründen ekim yapıp inkübasyona bırakıldıktan sonra besi yerindeki renk değişimi görölmektedir, bu da PS-2A'nın üreyi hidroliz eden üreaz enzimini sentezlediğini göstermektedir.



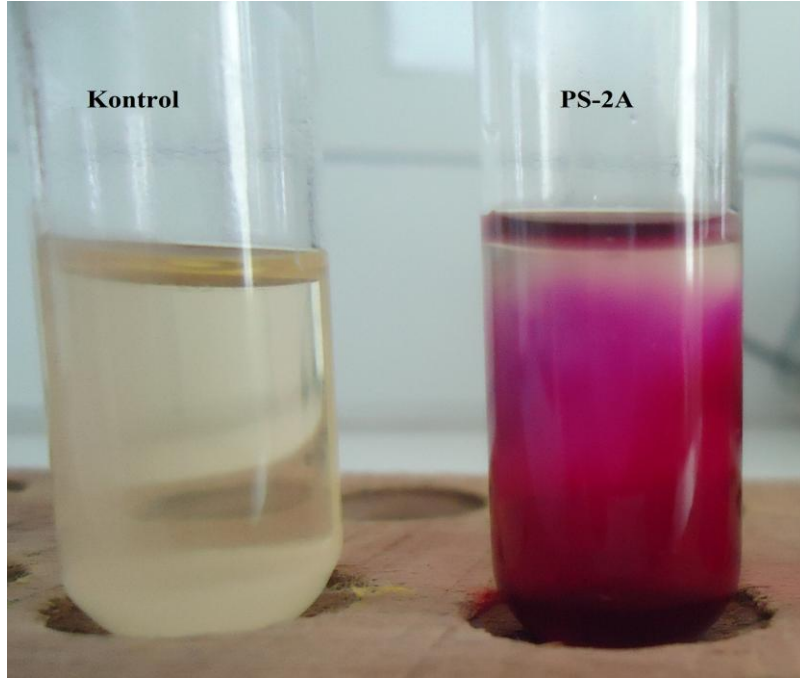
şekil 4.6. PS-2A'nın lipaz testi

PS-2A'nın yağları parçalayan lipaz enzimini sentezleyip sentezleyemediğini saptamak için taze kültürden yağlı agara ekim yapıldı. 1 gün inkübe edildikten sonra oluşan kolonilerin bulunduğu petri kabına aşırı doygun CuSO_4 çözeltisi eklendi ve Şekil 4.6.'da görüldüğü gibi kolonilerin etrafında mat yeşilimsi sahalar meydana geldi. Bu da PS-2A'nın lipaz sentezleyerek yağları parçaladığını göstermektedir.



Şekil 4.7. PS-2A'nın hareket testi

PS-2A'nın hareket yeteneğinin olup olmadığını tespit etmek için içinde %0.4-0.5 yarı katı agar bulunan tüplerdeki besi yerine taze kültürden ekim yapıldı ve 1 gün inkübasyona bırakıldı. Şekil 4.7.'de görüldüğü gibi PS-2A örneği kontrolle karşılaştırıldığında inokülasyon hattı boyunca üremenin olduğu ve inokülasyon hattından agarın içine doğru bir yayılma gözlenmektedir. Bu da PS-2A'nın hareketli olduğunu göstermektedir.



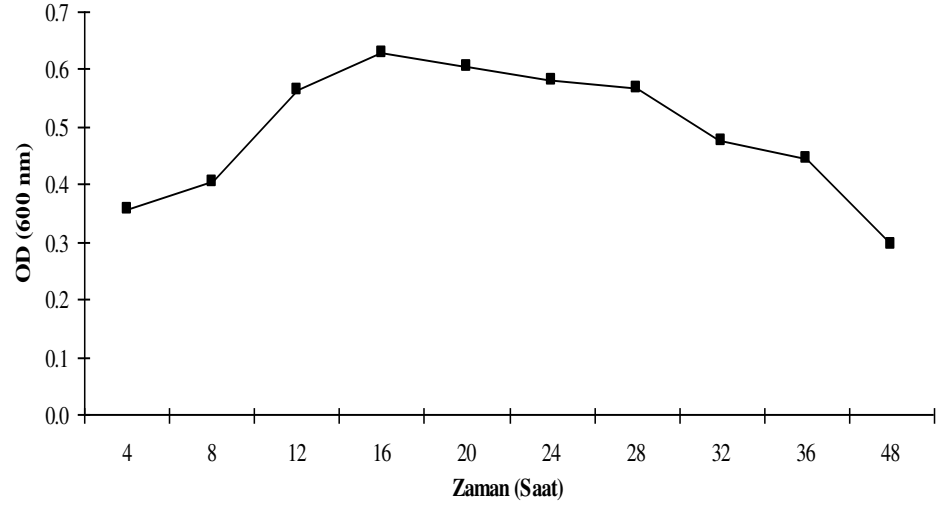
Şekil 4.8. PS-2A'nın fosfataz testi

PS-2A'nın fosfataz enzimi sentezleyip sentezlemediğini belirlemek için 10 ml'lik tüplerde hazırlanan içinde, %0.5 fenolftalein difosfat bulunan NB sıvı besiyeri yerine taze kültürden ekim yapıldı ve 1 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda tüplere 1 damla %40 NaOH solusyonu damlatılarak kırmızı rengin oluşup oluşmadığı gözlemlendi. Şekil 4.8.'de görüldüğü gibi PS-2A'nın bulunduğu tüp kontrolle karşılaştırıldığında PS-2A'nın bulunduğu tüpte kırmızı renk oluştuğu gözlemlendi. Bu da PS-2A'nın fosfataz sentezlediğini göstermektedir.

Bu veriler doğrultusunda katı nişastalı ortamda PS-2A izolatının biyokimyasal test sonuçlarından dolayı *Lactococcus* sp. olduğuna karar verildi ve α -amilaz aktivitesi göstermesinden dolayı sonraki işlemlerde bu izolat kullanıldı.

4.2. *Lactococcus* sp. PS-2A Bakterisinin Üretim Ortamının Optimizasyonu

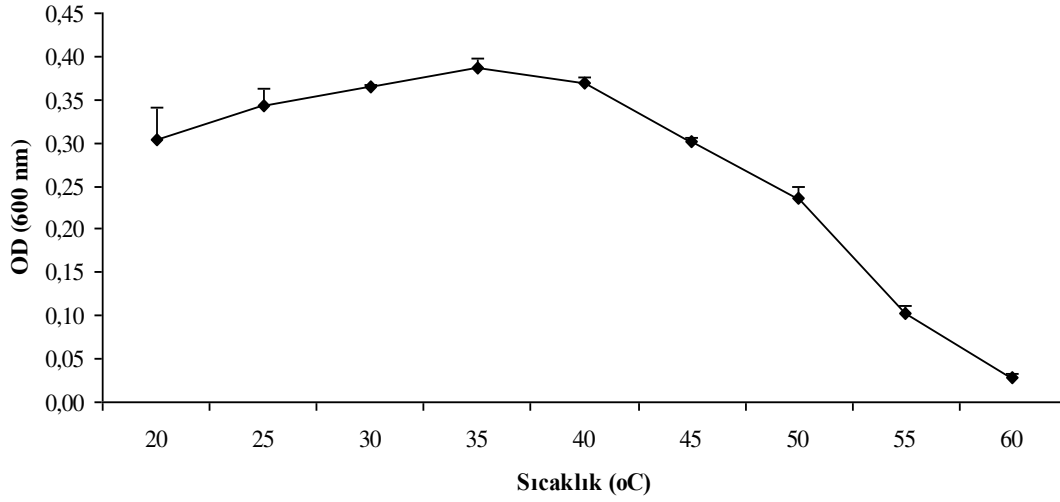
4.2.1. İnkübasyon Süresinin Mikroorganizma Gelişimi Üzerine Etkisi



Şekil 4.9. İnkübasyon süresinin mikroorganizma gelişimi üzerine etkisi

4.2.2. Sıcaklığın Mikroorganizma Gelişimi Üzerine Etkisi

Sıcaklığın mikroorganizma gelişimi üzerine etkisini belirlemek için; 20°C'den başlayarak 5°C arttırılarak 60°C'ye kadar 120 rpm'de çalkalamalı su banyosunda 16 saat üretilen *Lactococcus* sp. PS-2A izolatının her bir sıcaklık için spektrofotometrede 600 nm'de absorbansı ölçüldü.

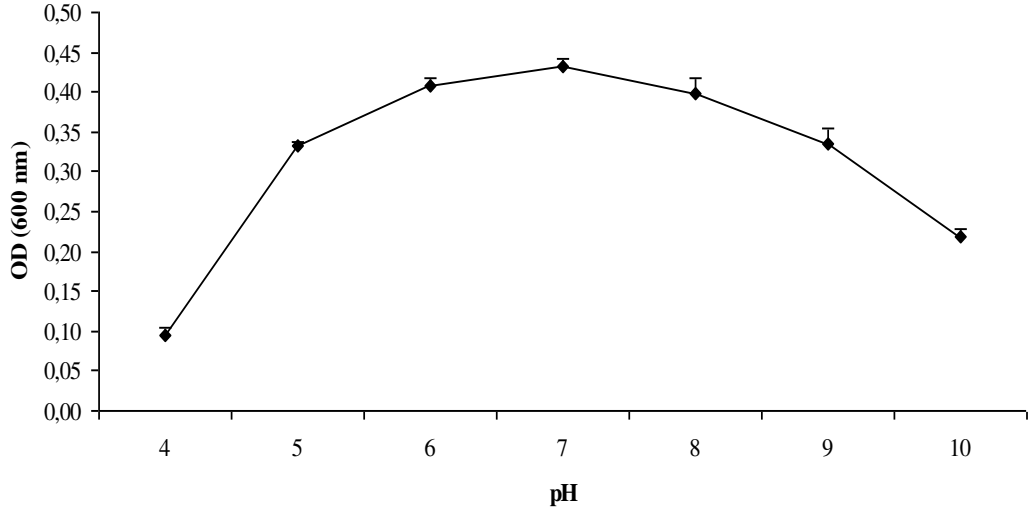


Şekil 4.10. Sıcaklığın mikroorganizma gelişimi üzerine etkisi

Şekil 4.10.'da görüldüğü gibi *Lactococcus* sp. PS-2A izolatı 20°C'den 60°C'ye kadar geniş sıcaklık aralığında büyüme gösterip 35°C'de maksimum büyüme grafiğine sahiptir.

4.2.3. pH'nın Mikroorganizma Gelişimi Üzerine Etkisi

100 ml'lik erlenlerde farklı pH'larda ayarlanmış 25 ml LB besi yerinde *Lactococcus* sp. PS-2A izolatı 35°C'de 120 rpm'de çalkalamalı su banyosunda 16 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra farklı pH'lara sahip besi yerlerindeki bakteri OD'si ölçüldü ve pH 7.0'te maksimum değerde olduğu belirlendi (Şekil 4.11.).



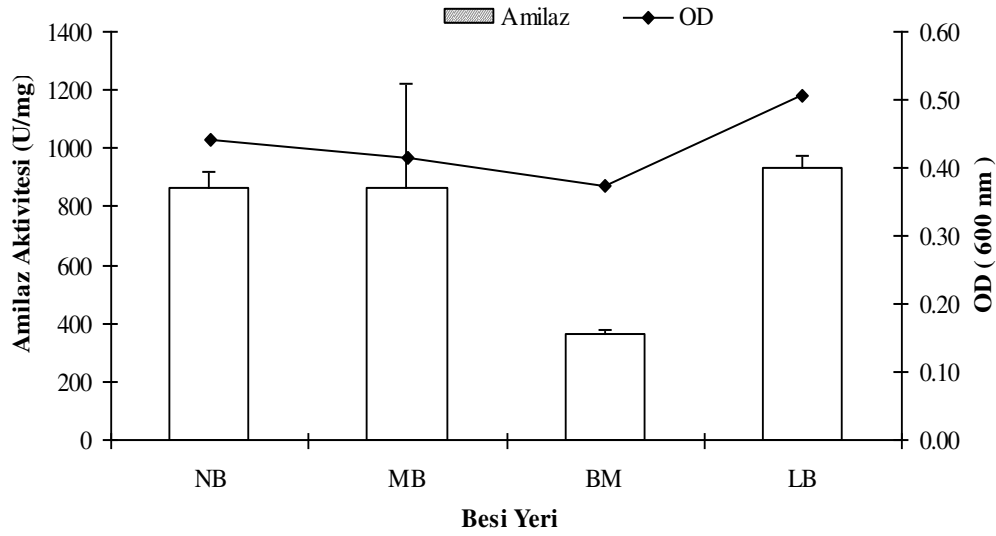
Şekil 4.11. pH'nın mikroorganizma gelişimi üzerine etkisi

4.3. *Lactococcus* sp. PS-2A Bakterisinden Elde Edilen α -Amilaz Enziminin Optimizasyonu

Çalışmanın bu bölümünde optimum kültürasyon koşullarının belirlenmesi amaçlandı. α -Amilaz sentezine etkili olabileceği düşünülen; farklı besi yerleri, üretim süresi, üretim ortamının sıcaklık ve pH'sı, üretim ortamına eklenen değişik karbon ve azot kaynaklarının etkileri çalışıldı.

4.3.1. Farklı Besi Yerlerinin α -Amilaz Üretimine Etkisi

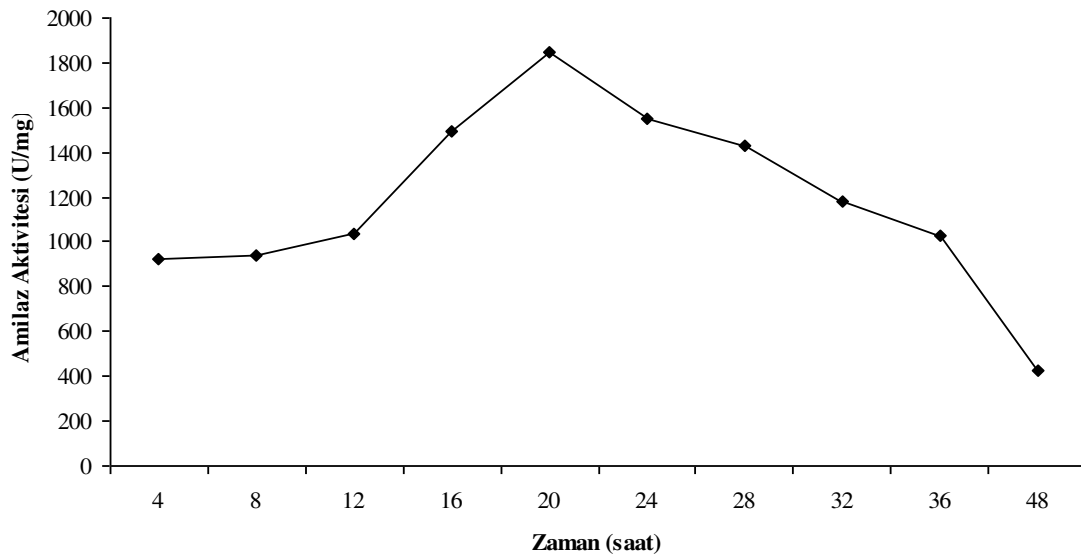
Elde edilen izolatların biyokimyasal testlerine göre, nişastalı agarda en iyi amilaz aktivitesine sahip olan izolatın *Lactococcus* sp. PS-2A olduğu tespit edildi. Daha sonraki çalışma basamaklarında bu izolat kullanıldı. *Lactococcus* sp. PS-2A için en iyi α -amilaz aktivitesinin elde edildiği besi ortamının LB, bu besi yerindeki enzim aktivitesinin 920 U/mg olduğu ve bakteri üremesinin de 0,505 (OD 600 nm) olduğu belirlendi (Şekil 4.12.).



Şekil 4.12. Farklı besi yerlerinin α-amilaz üretimine etkisi

4.3.2. İnkübasyon Süresinin α-Amilaz Üretimine Etkisi

Üretim süresinin α-amilaz üretimine etkisini görmek için üreme ortamının değişik zaman periyotlarında (4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36 ve 48. saat) bakteri kültüründen 1 ml örnek alındı. 10 000 rpm'de 10 dakika soğutmalı santrifüjde santrifüjlendi. Elde edilen süpernatant enzim kaynağı olarak kullanılıp Bernfeld yöntemine göre aktivitesi ölçüldü.

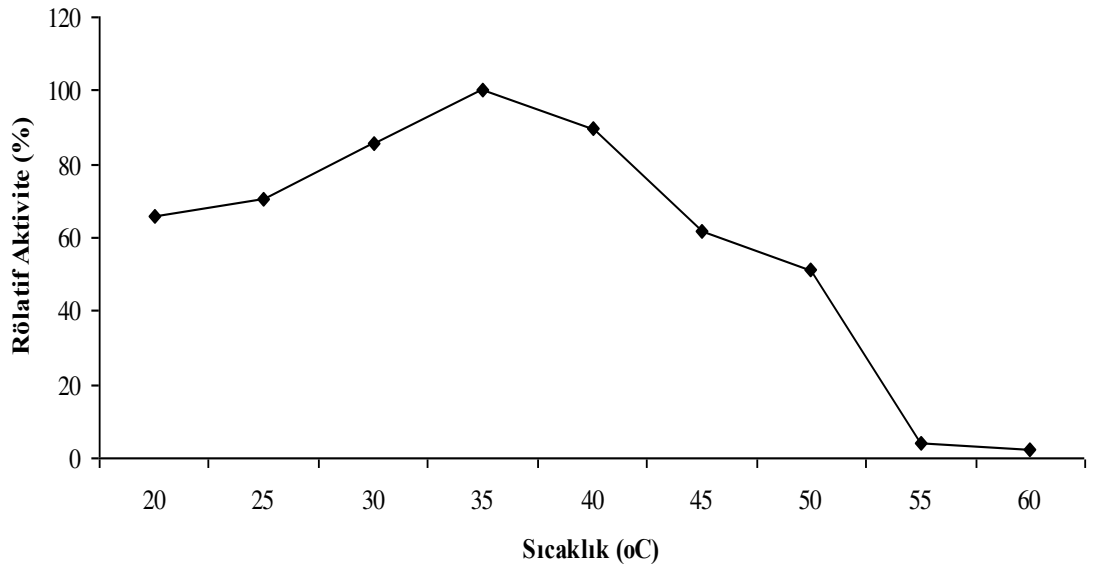


Şekil 4.13. İnkübasyon süresinin α-amilaz üretimine etkisi

Şekil 4.13.'te *Lactococcus sp.* PS-2A izolatının 20. saatte en yüksek α -amilaz aktivitesine (1847 U/mg) ulaştığı gösterilmektedir.

4.3.3. α -Amilaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Enzim olarak; LB besi ortamında optimum koşullarda üretilen bakteri kültürünün santrifüj edilmesiyle elde edilen üst sıvı kullanıldı. Daha sonra 20°C'den 5°C'lik artan sıcaklık aralıklarıyla 60°C'ye kadar Bernfeld yöntemine göre α -amilaz aktivitesi belirlendi.



Şekil 4.14. α -Amilaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Lactococcus sp. PS-2A izolatının 35°C α -amilaz aktivitesine ulaştığı Şekil 4.14.'te gösterilmektedir.

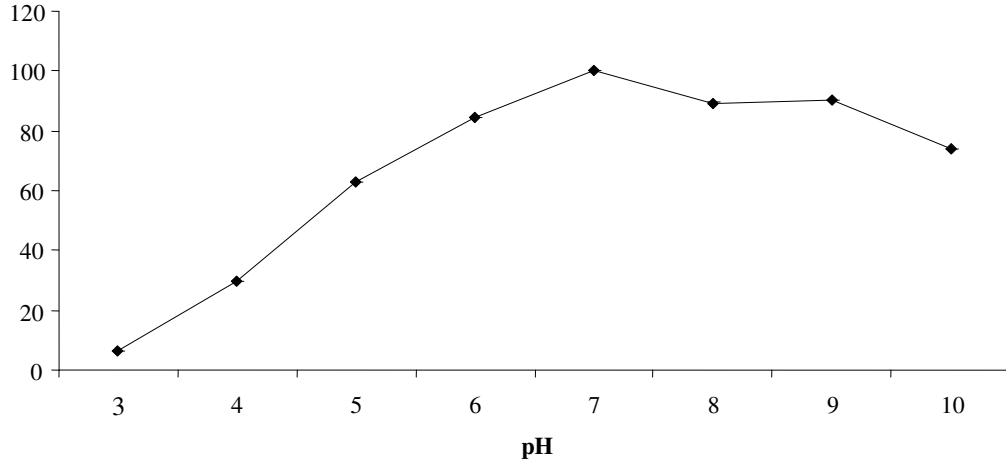
4.3.4. α -Amilaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

Enzim olarak LB besi yerinden elde edilen üst sıvı kullanıldı. Substrat olarak kullandığımız nişasta %0.5'lik olacak şekilde sırasıyla sitrik asit (0.1 M pH 4.0, 5.0 ve 6.0), Tris-HCl (0.1 M pH 7.0, 8.0 ve 9.0) ve NaHCO₃ /NaOH (0.1 M pH 9.0, 10.0) tamponları içerisinde ayrı ayrı hazırlandı. Daha sonra bakteri için optimum sıcaklıkta Bernfeld yöntemine göre α -amilaz aktivitesi ölçüldü. Şekil 4.15.'te *Lactococcus sp.* PS-

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

2A izolatının α -amilaz aktivitesinin geniş bir pH aralığına sahip olduğu ve en yüksek aktiviteye pH 7.0'de ulaşıldığı gösterilmektedir

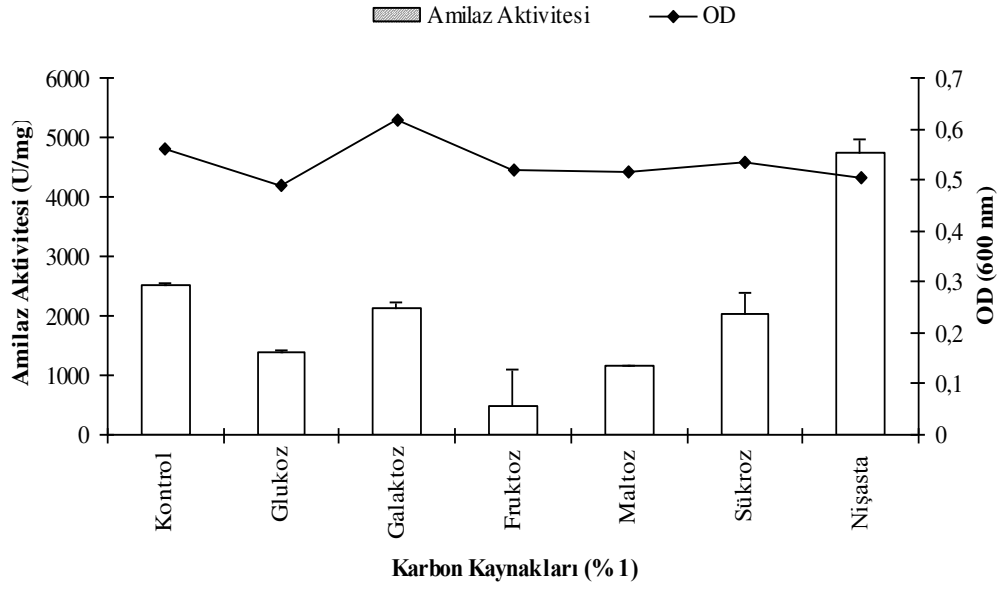
Rölatif Aktivite (%)



Şekil 4.15. α -Amilaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

4.3.5. α -Amilaz Üretimi Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisi

100 ml'lik erlenlerde 25 ml LB besi yerleri hazırlanıp otoklavlandı. LB besi yerlerinde %1 konsantrasyonda olacak şekilde karbon kaynaklarından glukoz, galaktoz, fruktoz, çözünebilir nişasta, maltoz ve süktroz tek tek ilave edildi, gecelik kültürden 1 ml bakteri ekimi yapıldı. α -Amilaz üretimi için optimum üretim zamanı, sıcaklık ve pH'da inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda 1 ml örnek alınarak 600 nm'de spektrofotometrede absorbans ölçümleri yapıldı. Daha sonra 10 000 rpm'de soğutmalı santrifüjde santrifüj edildi ve elde edilen süpernatantlardan α -amilaz aktivitesi ölçüldü ve Lowry'ye göre protein miktar tayini yapıldı.



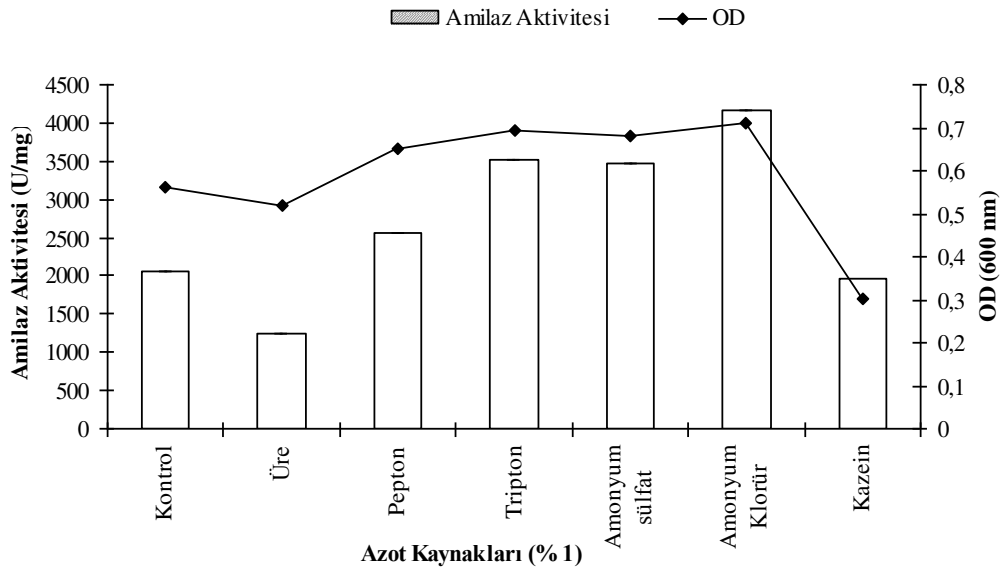
Şekil 4.16. α -Amilaz üretimi üzerine karbon kaynaklarının etkisi

%1'lik çözünabilir nişastanın α -amilaz üretimini 2 kat (4743 U/mg) arttırdığı, galaktoz (2118 U/mg) ve sukrozun (2026 U/mg) eklenmesiyle kontrole (2516 U/mg) yakın değer elde edildiği, glukoz (1392 U/mg), fruktoz (468 U/mg) ve maltoz (1158 U/mg) ilavesiyle de enzim üretiminde azalma gözlemlendiği Şekil 4.16.'da gösterilmektedir. Çözünabilir nişasta α -amilaz üretimi için en iyi karbon kaynağı olarak belirlendi.

4.3.6. α -Amilaz Üretimi Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi

100 ml'lik erlenlerde hazırlanan 25 ml'lik LB besi yerlerine %1'lik azot kaynaklarından pepton, tripton, üre, amonyum sülfat, amonyum klorür ve kazein eklendikten sonra otoklavlandı. Daha sonra gecelik bakteri kültüründen 1'er ml her erlene ayrı ayrı ekildi. Optimum koşullarda inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda 1 ml örnek alınarak 600 nm'de spektrofotometrede absorbans ölçümleri yapıldı. Bu örneklerin üst sıvısında α -amilaz aktivitesi ve protein miktar tayini yapıldı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI



Şekil 4.17. α -Amilaz üretimi üzerine azot kaynaklarının etkisi

%1'lik pepton (2550 U/mg), tripton (3527 U/mg), amonyum sülfat (3463 U/mg) ve amonyum klorür (4166 U/mg) ile α -amilaz üretiminin kontrole (2050 U/mg) göre arttığı, üre (1241U/mg) ve kazein (1960 U/mg) ilavesi ile enzim üretiminin azaldığı Şekil 4.17.'de gösterilmektedir. α -Amilaz üretimi için en uygun azot kaynağının amonyum klorür olduğu tespit edilmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Peynir altı suyu; süt ürünlerinin yapımı sırasında ortaya çıkan, sıvı atık sayılıp değerlendirilmeden kanalizasyonlara ve akarsulara verildiğinde ciddi çevre ve sağlık problemlerine neden olan, yüksek organik içeriğe sahip bir yan üründür. Aynı zamanda gelişen teknoloji ile insan ve hayvan kullanımı için bir besin kaynağı olarak kullanılabildiği ve endüstriyel önemi olan enzimleri üreten mikroorganizmaların üremesi için çok uygun bir ortam olduğu için, Diyarbakır'daki peynirciler çarşısından alınan peynir altı suyu örneklerinden bakteri izolasyonu gerçekleştirildi.

Laktik asit bakterileri için selektif besi yeri olan MRS agarda çoğaltılıp, buradan seçilen PS-2A, PS-3B, PS-3C ve PS-4B'nin morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testleri yapıldı ve <1 mm, kok şeklinde, düzgün görünümlü, pigment oluşturmeyen kolonilerden oluştukları tespit edildi. Bu bakteri örneklerinden hazırlanan preparatlardan mikroskop altında Gram boyama özellikleri ve morfolojik özellikleri incelendiğinde Gram pozitif ve kok şeklinde oldukları, laktik asit bakterileri için selektif besi yeri olan MRS agarda üremelerinden ve Gram boyanma özellikleriyle koloni şekillerinden dolayı *Lactococcus* cinsinin özellikleriyle benzerlik gösterdikleri için *Lactococcus* oldukları belirlendi.

Zamfir ve ark. 2006, Romanya'da ham ve fermente edilmiş süt, peynir gibi kaynaklardan topladıkları 110 örnekten laktik asit bakterisi izolasyonu yapmış ve buradan elde ettikleri 599 izolatin Gram boyamasını, katalaz aktivitesini ve morfolojisini test etmişlerdir. İzolatlardan çoğunun *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc spp.*, *Enterococcus spp.* ve *E. saccharominimus* türleri olduklarını tespit etmişlerdir.

Adnan ve Tan 2007, keçi sütüyle yapılan tapai ve tempoyak besinlerinden laktik asit bakteri izolasyonu yapmışlar. 126 suş izole ederek Gram boyama ve katalaz aktivitelerini saptamışlardır. Bu suşlardan yedi tanesini tanımlayıp ikisinin laktobasil, birinin de laktokok olduğunu belirlemişlerdir.

Muyanja ve ark. 2003, Uganda yöresel fermente ev yapımı ve laboratuvar yapımı gıdası “ bushera” ‘dan elde ettikleri 351 izolattan 113 laktik asit bakterisi izole etmişlerdir. Çeşitli biyokimyasal testler ve Gram boyama yaparak identifikasyonlarını gerçekleştirmişlerdir.

Sengun ve ark. 2009, yoğurt ve buğday unundan yapılan “Tarhana” dan MRS, M17 ve SBM besi yerlerini kullanarak 226 Gram pozitif ve katalaz negatif bakteri izole etmişlerdir. İzolatları fenotipik ve genotipik birçok yöntem kullanarak identifiye etmişler ve gruplandırmışlardır.

Cengiz ve Uraz 2001, Atatürk Orman Çiftliği süt fabrikasından değişik zaman dilimlerinde alınan çiğ süt örneklerinden bakteriyolojik çalışma ile laktik asit bakterilerinden stafilocok izolasyonu yapmışlardır. Besi yerinde üreyen bakterilerin kültür, hareket, hemoliz, morfolojik ve biyokimyasal özellikleri, katalaz, koagülaz, gram boyanma gibi özelliklerini incelemişlerdir.

Toksoy ve ark. 1999, değişik marka sucuk ve sosis örneklerinden izole ettikleri bakterilerin identifikasyonlarında, bakterilerin morfolojik özelliklerini saptamış ve biyokimyasal testlerden yararlanmışlardır.

İzole ettikleri bakteriler arasından *Lactobacillus* bakterilerini diğer bakteri gruplarından ayırmak için, morfolojik şekilleri, hareketlilik, spor oluşturma durumları, gram ve katalaz reaksiyonları, katı besi yerindeki kolonilerin şekli ve yapıları incelemişlerdir.

Önceki çalışmalardan farklı olarak, laktik asit bakterilerinin izolasyon işlemi çalışmamızda kaynak olarak peynir altı suyundan gerçekleştirilmiş; fakat benzer şekilde Gram boyama, katalaz aktivitesi ve morfolojikler testler vb. testler yapılarak identifikasyon gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak peynir altı suyu örneklerinden izole ettiğimiz *Lactococcus* sp. PS-2A'nın kesin olarak tanımlanması için ileri düzeyde identifikasyon tekniklerinin uygulanması gerekmektedir.

Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle biyoteknolojinin endüstriyel enzimler ile ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar daha da önem kazanmaktadır (Kıran ve ark. 2006).

Endüstriyel alanda kullanılan enzimler bitkisel, hayvansal ve mikroorganizma tarafından elde edilmekle birlikte ağırlıklı olarak mikroorganizmalardan izole edilmektedirler.

Mikroorganizma kaynaklı enzimler, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve daha ucuz olmaları, katalitik aktivitelerinin yüksek olması, fazla ve yüksek saflıkta elde edilmesi gibi avantajlara sahip olmasından dolayı tercih edilirler (Tatar 2007).

α -Amilaz enzimi yaygın şekilde mikroorganizmalardan elde edilir ve başlıca, gıda endüstrisinde nişastanın maltoza hidrolize edilmesi, maltoz şuruplarının hazırlanması ile ekmek ve bira üretiminde kullanılmaktadır. Ayrıca gıdalarda tatlandırıcı ve kaliteyi artırıcı olarak, kağıt ve tekstil endüstrisi, çeşitli içeceklerin saflaştırılması ve berraklaştırılması, gibi geniş bir kullanım alanına sahiptirler.

Çalışmamızda izole ettiğimiz laktik asit bakterilerinde ekstraselüler α -amilaz salgılanıp salgılanmadığı taranarak en iyi ve maksimum α -amilaz üreten *Lactococcus* sp. PS-2A örneği seçilerek NB, LB, MB ve BM gibi farklı besi ortamlarında inkübasyona bırakıldı ve uygun besi ortamının LB olduğu tespit edildi.

Sonraki aşamada uygun besi ortamında 4-48 saat arasında inkübasyona bırakılarak 16. saatte optimum üreme gösterdiği, pH 4.0-10.0 arasında pH denemeleri gerçekleştirilerek, optimum üreme pH'sının 7.0 olduğu belirlendi. 20°C-60°C arasında sıcaklık denemelerinde ise optimum üreme sıcaklığın ise 35°C olduğu tespit edildi.

Felis ve ark. 2007, Sardinaria inekleri ve koyunlarının ham sütünden ve koyunların sütünden yapılan Gioddu adlı yoğurtlarından; MRS Agar kullanarak %5 CO₂ içeren ortamda, 37°C'de, 24-48 saat inkübe ettikten sonra laktik asit bakterileri izole ederek bu bakteri suşlarının genotipik ve fenotipik metotlarla karakterizasyonunu yapmışlardır. İzole ettikleri bu bakterilerini büyük bir kısmının *Lactobillus* suşları olduğunu belirlemişlerdir.

Badis ve ark. 2004, 4 farklı Cezayir ırkı keçinin sütünden izole ettikleri 725 laktik asit bakterisini karakterize etmişlerdir. 30 ve 45°C inkübasyon sonrasında birinci *Lactococcus* 'ları; Elliker besi yerinde, 30°C'de, 72 saat, aerobik ortamda üretmişlerdir.

Sıcaklık, mikroorganizmanın büyümesi ve buna bağlı olarak α -amilaz üretimiyle ilişkilidir. Çoğu araştırmacı tarafından bakterilerde optimum bakteri büyümesi ve α -amilaz üretimi için geniş sıcaklık aralığı (35-80°C) verilmiştir (Asgher 2007).

Konsula ve Kyriakides tarafından taze koyun sütünden izole edilen *B.subtilis*'in ekstraselüler maksimum α -amilaz üretiminin 40°C'de olduğu belirtilmiştir. Elde ettiğimiz *Lactococcus* sp. PS-2A'nın ürettiği ekstraselüler α -amilaz enziminin optimizasyonu yapılarak, optimum sıcaklık 35°C olarak tespit edilmiştir. Çalışmamız yukarıda belirtilen çalışmalarda *Lactobacillus* ve *Lactococcus*'ların belirtilen optimum üretim sıcaklıklarıyla benzer özellik göstermektedir.

Fiziksel parametreler arasında büyüme ortamının pH'sı mikroorganizmadaki morfolojik değişimler ve buna bağlı olarak enzim sentezinin artmasında önemli bir rol oynamaktadır (Asgher 2007).

Ticari olarak kullanılan pek çok *Bacillus* suşunda bakteri üretimi ve ekstraselüler α -amilaz üretimi için optimum pH, 6.0 ve 9.0 arasında verilmektedir (Burhan ve ark. 2003), (Castro ve Bull 1992), (Jin ve Patel 1999).

Bizim çalışmamızda da *Lactococcus* sp. PS-2A bakterisi optimum büyümeyi ve maksimum ekstraselüler α -amilaz üretimini pH 7.0'de gerçekleştirmiştir.

Konsula ve Kyriakides 2004, taze koyun sütünden izole ettikleri ılımlı termofilik *Bacillus subtilis* suşundan elde ettikleri ekstraselüler termostabil α -amilazın nişasta hidrolizine etkisini araştırmışlardır. Maksimum amilaz üretiminin düşük nişasta içeren ortamda ve 40°C'de elde etmişlerdir.

Najafi ve ark. 2005, topraktan izole ettikleri *Bacillus subtilis* AX20'nin ekstraselüler α -amilaz enziminin optimum sıcaklığını 55°C, optimum pH'sını 6.0 olarak bulmuşlardır.

Sanni ve ark. 2002, Nijerya'nın yöresel fermente edilmiş yiyeceklerinden, amilaz üreten amilolitik laktik asit bakterileri izole etmişlerdir. Çalıştıkları 3 farklı suşun α -amilaz aktivitesi için optimum koşulları belirlemek için 12 saat inkübasyon ve pH 4.0-7.0 ve sıcaklığı 30-80°C'lerde denemişlerdir.

İzole etmiş oldukları *L. plantarum* suşundan elde ettikleri α -amilazın optimum pH 6.0 ve 65°C'de, *L. fermentum* K9 suşu için ise pH 4.0 ve 45°C maksimum aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir.

Ekstraselüler α -amilazların optimum pH'sı 3.0-10.0 arasında değişmektedir. Çoğu çalışmada, bakteri ve funguslardan elde edilen α -amilazların optimum pH'sı asidik ve nötral olarak belirtilmektedir (Gupta ve ark. 2003). Nötral pH'da maksimum aktivite gösteren enzimler özellikle kuru temizlemede kullanılmaktadır.

Çalışmamızda elde ettiğimiz bakterinin ekstarselüler α -amilazının nötral koşullarda maksimum aktivite göstermesi endüstriyel işlemlerde kullanılabilir özelliğinin olduğunu göstermektedir.

Enzimler modern deterjanların içeriğinde bulunmaktadırlar. α -Amilazlar 1975'ten beri çamaşır makinesi deterjanlarında kullanılmaktadır (Gupta ve ark. 2003). Yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz α -amilaz 35°C'de maksimum aktivite göstermektedir. Bu özelliği ile düşük ısıda yıkama işlemini gerçekleştiren çamaşır makinelerinde kullanılan deterjanların içeriğinde kullanılabilir.

Enzimin aktivitesi üzerine bazı azot ve karbon kaynaklarının etkisi araştırılarak maksimum α -amilaz üretiminin %1 nişasta içeren ortamda 35°C'de olduğu saptanmıştır.

Çoğu araştırmacı amilolitik enzim biyosentezinin ve özellikle α -amilaz biyosentezinin nişasta varlığında indüklendiğini belirtmişlerdir (Konsula ve Kyriakides 2004).

Yaptığımız çalışmadan maksimum α -amilaz üretimi %1 nişasta içeren ortamda gerçekleşmiştir. *Lactococcus* sp. PS-2A bakterisinin üretimi için gerekli olan besi yeri, sıcaklık, pH gibi koşulların ekonomik olmasından dolayı ve α -amilazı salgılamalarından dolayı endüstriyel alanda kullanılabilir olduğunu göstermektedir.

Değerlendirilmeden doğaya bırakılan çok ciddi çevre ve sağlık sorunlarına yol açabilen peynir altı suyundan izole ettiğimiz *Lactococcus* sp. PS-2A'dan optimum koşullar sağlanarak büyük endüstriyel önemi olan α -amilaz enzimi kolay ve ekonomik proseslerle üretilerek karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Böylece yapılan bu çalışma ile peynir altı suyundan ekonomik ve biyoteknolojik olarak fayda sağlanabileceği ortaya konmuştur.

Peynir altı suyunun, planlanacak başka çalışmalarla yalnızca α -amilaz ve diğer enzimleri üreten mikroorganizma kaynağı olarak değil aynı zamanda, gelişen teknolojik

imkanlarla farklı biyoteknolojik uygulamalar için kullanılabileceği, çevre kirliliği ve sağlık problemlerine etkisinin azaltılabileceği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Adnan, A. F. M., Tan, İ. K. P. 2007. Isolation of lactic acid bacteria from Malaysian foods and assessment of the isolates for industrial potential. *Bioresource Technology*, 98:1380–1385.
- Aguilar G., Morlon-Guyot, J., Trejo-Aguilar, B., Guyot, J.P. 2000. Purification and characterization of an extracellular α -amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010^T, an amylolytic lactic acid bacterium. *Enzyme and Microbial Technology*, 27:406–413.
- Agüloğlu, S., 1996. Değişik amino asit ve antibiyotiklerin *Bacillus subtilis* α -amilazın membrandaki sentezi ve salgılanması üzerine etkileri ve tripsinin α -amilaz üzerine olan proteolitik etkisinin incelenmesi. Doktora Tezi, D.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.
- Ammor, M. S., Flo'rez, A. B., Mayo, B. 2007. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology*, 24:559–570.
- Asgher, M., Asad, M. J., Rahma, S.U., Legge, R.L. 2007. A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *Journal of Food Engineering*, 79:950–955.
- Ayad, E.H.E., Verheul, A., Wouters, J.T.M., Smit, G. 2002. Antimicrobial-producing wild *lactococci* isolated from artisanal and non-dairy origins. *International Dairy Journal*, 12:145–150.
- Aygan, A. 2008. Haloalkalofil *Bacillus* sp. izolasyonu, amilaz, selüloz ve ksilanaz enzimlerinin üretimi, karakterizasyonu ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilirliği. Doktora tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana. 186.
- Babaoğlu, M. Biyoteknoloji ve Bitki Biyoteknolojisinin Tanımları. Erişim: [http://www.biyoteknoloji.gen.tr/biyoteknoloji.htm]. Erişim Tarihi: 18.05.2011.
- Badis, A., Guetarni, D., Boudjema, B. M., Henni, D.E., Kihal, M. 2004. Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiology*, 21:579–588.
- Balkan, B. 2008. Katı substrat fermentasyonu ile ham nişastayı parçalayan yeni bir fungal amilaz üretimi saflaştırılması ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi. Doktora tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.
- Baran, M. 2001. Mikrobakterilerden α amilaz enziminin ayırımı ve saflaştırılması. Yüksek lisans tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta. 63.
- Beilen, J. B., Li, Z. 2002. Enzyme technology: an overview. *Current Opinion in Biotechnology*, 13:338–344.
- Bernfeld P., 1955. Enzymes Carbohydrate Metabolism. In *Methods In Enzymology* Academic Press, 17:149-158.
- Bilgehan, H. 1999. Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi. Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları, Sayfa: 103-104. İzmir.

- Burhan, A., Nisa, U., Gokhan, C., Omer, C., Ashabil, A., & Osman, G. 2003. Enzymatic properties of a novel thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkalophilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. *Process Biochemistry*, 38:1397–1403.
- Casalta, E., Montel, M.- C. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology* 126:271–273.
- Castro, P. M. L., Hayter, P. M., Ison, A. P., Bull, A. T. 1992. Application of statistical design to the optimization of culture medium for recombinant interferon-gamma production by Chinese hamster ovary cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38:84–90.
- Çağırğan, H. 2004. Biotyping of *Lactococcus garvieae* isolated from Turkey. *Ege University Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, 21(3-4): 267– 269.
- Cengiz, S. A., Uraz, G. 2001. Çiğ süten izole edilen stafilokokların sefalosporinlere ve karbapenemlere karşı duyarlılıklarının araştırılması. *Van Tıp Dergisi*, 2(8):43-46.
- Coşkun, A. 2010. Endüstriyel enzimler üreten yeni *Bacillus* sp. suşlarının izolasyonu ve karakterizasyonu. Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.115.
- Deveci, R. 2006. Glikoz izomeraz enziminin sıkıştırılmış yatak reaktörler ve akışkan yatak reaktörlerde çalışma kinetiklerinin incelenmesi ve karşılaştırılması ve reaktörler boyunca fruktoza dönüşüm profillerinin çıkarılması. Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana. 46.
- Evans, J. J., Pasnik, D. J., Klesius, P. H., Al-Ablani, S. 2006. First report of *Streptococcus agalactiae* and *Lactococcus garvieae* from a wild bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 42(3):561–569.
- Françoise, L. 2010. Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products. *Food Microbiology*, 27:698-709.
- Felis, G. E., Ortu, S., Marzotto, M., Deriu, A., Mollicotti, P., Sechi, L. A., Dellaglio, F., Zanetti, S. 2007. Identification and functional characterization of *Lactobacillus* strains isolated from milk and Gioddu, a traditional Sardinian fermented milk. *International Dairy Journal*, 17:1312–1320.
- Fernandez-Lafuente, R. 2009. Stabilization of multimeric enzymes: strategies to prevent subunit dissociation. *Enzyme and Microbial Technology*, 45:405–418.
- Filer, K. Production of enzymes for the feed industry using solid substrate fermentation. Erişim:[<http://en.engormix.com/MA-feed-machinery/formulation/articles/production-enzymes-feed-industry-t334/800-p0.htm>]. Erişim Tarihi:18.05.2011.
- Fukara, G. 2007. Bazı ekstrem termofil bakterilerin amilazlarının özelliklerinin belirlenmesi. Yüksek lisans tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Ghaly, A. E., Kamal, M. A. 2003. Submerged yeast fermentation of acid cheese whey for protein production and pollution potential reduction. *Water Research*, 38:631–644.

Gönenç, İ. 2006. Bazı yağ asitlerinin doğal mısır nişastasının retrogradasyonuna etkisinin araştırılması. . Yüksek lisans tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Gözükara, M. E. 1997. Biyokimya. Nobel Tıp Kitabevleri. Sayfa: 572-573.

Gupta, R., Gigras. P., Mohapatra. H., Goswami, V.K., Chauhan, B., 2003. Microbial α -amylase: biotechnological perspective. Enzyme and Microbial Technology, 38: 1599-1616.

Habibi, A. E., Khajeh, K., Naderi-Manesh, H., Ranjbar, B., Nemat-Gorgani M. 2006. Thermostabilization of *Bacillus amyloliquefaciens* α -amylase by chemical cross-linking. Journal of Biotechnology, 123:434-442.

Haki, G. D., Rakshit, S. K., 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes a review. Bioresource Technology, 89:17-34.

Hmidet, N., Bayoudh A., Berrin, J. G., Kanoun, S., Juge, N., Nasri, M. 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.

Jin, B., Van-Leeuwen, J. H., Patel, B. 1999. Mycelial morphology and fungal protein production from starch processing wastewater in submerged cultures of *Aspergillus oryzae*. Process Biochemistry, 34:335–340.

Katla, A.-K., Kruse, H., Johnsen, G., Herikstad, H. 2001. Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy products. International Journal of Food Microbiology, 67:147-152.

Kav, K., Erganiş, O. 2007. Konya bölgesinde bulunan gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) çiftliklerinden *Lactococcus garvieae* izolasyonu, identifikasyonu ve fenotipik özelliklerinin belirlenmesi. Veterinerlik Bilimleri Dergisi, 23(1):7-17.

Kıran, Ö. E., Çömlekçioglu, U., Dostbil N. 2006. Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları. KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi, 9(1):12-19.

Kim, J., Sunako, M., Ono, H. Murooka, Y., Fukusaki, E., Yamashita, M. 2008. Characterization of gene encoding amylopullulanase from plant-originated lactic acid bacterium, *Lactobacillus plantarum* L137. Journal of Bioscience and Bioengineering, 106 (5): 449–459.

Konsula, Z., Liakopoulou-Kyriakides, M. 2004. Hydrolysis of starches by the action of an α -amylase from *Bacillus subtilis*. Process Biochemistry, 39:1745–1749.

Kos, A. Structure of amylopectin. Erişim: [http://tr.wikipedia.org]. Erişim Tarihi: 18.05.2011.

Koutinas, A. A., Athanasiadis, I., Bekatorou, A., Psarianos, C., Kanellaki, M., Agouridis, N., Blekas, G. 2007). Kefir-yeast technology: industrial scale-up of alcoholic fermentation of whey, promoted by raisin extracts, using kefir-yeast granular biomass. Enzyme and Microbial Technology, 41:576–582.

Kubilay, A., Altun, S., Uluköy, G., Diler, Ö. 2005. *Lactococcus garvieae* suşlarının antimikrobiyal duyarlılıklarının belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi, 1(1):39-48.

Kuzu, B. 2008. Kitinaz üreten *Bacillus* izolasyonu, enzimin kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu. Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana. 82.

Küfrevioğlu, İ., Keha, E. 2007. Biyokimya Ders Kitabı. Aktif Yayınevi. Sayfa: 91.

Li, C., Zhang, R., Withers, S. G., Brayer, G. D. 2009. Directed "in situ" inhibitor elongation as a strategy to structurally characterize the covalent glycosyl-enzyme intermediate of human pancreatic alpha-amylase. Biochemistry, 48: 10752-10764.

Liu, B., Wang, Y., Zhang, X. 2006. Characterization of a recombinant maltogenic amylase from deep sea thermophilic *Bacillus* sp. *WPD616*. Enzyme and Microbial Technology, 39: 805–810.

Liu, X. D. Xu, Y. 2007. A novel raw starch digesting α -amylase from a newly isolated *Bacillus* sp. *YX-1*: purification and characterization. Bioresource Technology, 99:4315–4320. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193:265–275

Marek, P., Nair, M. K. M., Hoagland, T., Venkitanarayanan, K. 2004. Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* O157.H7 in pasteurized Cheddar cheese whey. International Journal of Food Microbiology, 94:1-7.

Matpan, F. 2007. Diyardin (Ağrı) sıcak su kaynaklarından bakteri izolasyonu ve bazı enzimleri üzerinde çalışmalar. Yüksek lisans tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.

Muyanja, C. M. B. K., Narvhus, J.A., Treimo, J., Langsrud, T. 2003. Isolation, characterization and identification of lactic acid bacteria from bushera: a Ugandan traditional fermented beverage. International Journal of Food Microbiology, 80:201– 210.

Najafi, M. F., Deobagkar, D., Deobagkar, D., 2005. Purification and characterization of an extracellular α -amylase from *Bacillus subtilis* AX20. Protein Expression and Purification, 41: 349–354.

Nazmi, A. R., Reinisch, T., Hinz, H. 2006. Ca-binding to *Bacillus licheniformis* α -amylase (BLA). Archives of Biochemistry and Biophysics, 453:18–25.

Özen, A. E., Kılıç, M. 2007. Peynir altı suyundan elde edilen serum proteinlerinin fonksiyonel özellikleri. Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, (3):45-49.

Öztolan, Ö. 2007. Alfa amilaz-dekstran konjugatlarının sentezi ve karakterizasyonu. Yüksek lisans tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Palalı, H. 2007. Laktik asit bakterilerinde transkripsiyon regülasyonu. Yüksek lisans tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.

Pescuma, M., He'bert, E. M., Mozzi, F., de Valdez, G. F.. 2008. Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: evolution of carbohydrates and protein content. Food Microbiology, 25:442–451.

- Raissy, M., Ansari, M. 2011. Antibiotic susceptibility of *Lactococcus garvieae* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran fish farms. African Journal of Biotechnology, 10(8):1473-1476.
- Rajagopalan, G., Krishnan, C. 2008. α -Amylase production from catabolite derepressed *Bacillus subtilis* KCC103 utilizing sugarcane bagasse hydrolysate. Bioresource Technology, 99:3044–3050.
- Ravelo, C., B. Magarinos, Romalde, J. L., Toranzo, A. E. 2001. Conventional versus miniaturized systems for the phenotypic characterization of *Lactococcus garvieae* strains. Bulletin European Association of Fish Pathologists, 21(4):136-144.
- Reddy, G., Altaf, M., Naveena, B.J., Venkateshwar, M., Kumar, E. V. 2008. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation - A review. Biotechnology Advances, 26:22–34.
- Renault, R. 2002. Genetically modified lactic acid bacteria: applications to food or health and risk assessment. Biochimie, 84:1073–1087.
- Sanni, A.I., Morlon-Guyot, J., Guyot, J.P. 2002. New efficient amylase-producing strains of *Lactobacillus plantarum* and *L. fermentum* isolated from different Nigerian traditional fermented foods. International Journal of Food Microbiology, 72:53–62.
- Saxena, R. K., Dutt, K., Agarwal, L., Nayyar, P. 2007). A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5. Bioresource Technology, 98:260–265.
- Sharifiyazdi, H., Akhlaghi, M., Tabatabaei, M., Mostafavi Zadeh, S. M. 2010. Isolation and characterization of *Lactococcus garvieae* from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) cultured in Iran. Iranian Journal of Veterinary Research, Vol. 11, No. 4, Ser. No. 33.
- Sengun, I. Y., Nielsen D. S., Karapinar M., Jakobsen M. 2009. Identification of lactic acid bacteria isolated from Tarhana, a traditional Turkish fermented food. International Journal of Food Microbiology, 135:105–111.
- Sidhu, G. S., Sharma, P., Chakrabarti, T., Gupta, J. K. 1997. Strain improvement for the production of a thermostable α -amylase. Enzyme and Microbial Technology, 21:525–530.
- Soltani, M., Nikbakht, G.H., Ebrahimzadeh, H. A., Ahmadzadeh, N. 2008. Epizootic outbreaks of *Lactococcus garvieae* in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran. Bulletin European Association of Fish Pathologists, 28:209-214.
- Tatar, S. 2007. Termofil moderately halofilik *Bacillus* sp. suşlarından amilaz enzimi üretimi ve endüstriyel kullanım olanaklarının araştırılması. Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana. 95.
- Toksoy, A., Beyatlı, Y., Aslım, B. 1999. Sucuk ve sosislerden izole edilen *Lactobacillus plantarum* suşlarının bazı metabolik ve antimikrobiyal aktivitelerinin incelenmesi. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 23:533-540.
- Vendrell, D., Balcázar, J. L., Ruiz-Zarzuela, I., de Blas, I., Gironés, O., Múzquiz, J. L. 2006. *Lactococcus garvieae* in fish: A review. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 29(4): 177-198.

Vinh, D. C., Nichol, K. A., Rand, F., Embil, J. M. 2006. Native-valve bacterial endocarditis caused by *Lactococcus garvieae*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 56:91–94.

Yarkın, Z. 2007. İki farklı fermantasyon tekniği ile *Aspergillus sclerotiorum*’dan amilaz üretimi ve nişasta hidrolizinde kullanılması. Yüksek lisans tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.

Yılmaz, R., Temiz, A. 2003. *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* ’un klasik ve moleküler yöntemler kullanılarak tanımlanması ve karakterizasyonu. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 03(01):19-42.

Zamfir, M., Vancanneyt, M., Makras, L., Vaningelgem, F., Lefebvre, K., Pot, B., Swings, J., De Vuyst, L. 2006. Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products. Systematic and Applied Microbiology, 29:487–495.

ÖZGEÇMİŞ

ADI SOYADI: İhsan REZZUKOĞLU

DOĞUM TARİHİ: 02.01.1985

DOĞUM YERİ: HATAY

YABANCI DİLİ: İngilizce

E-POSTA : ihsanrezzuk@gmail.com

ÖĞRENİMİ:

Lise: Hatay Osman Ötken Anadolu Lisesi (1999-2003) - Fen Bilimleri

Lisans: Dicle Üniversitesi (2004-2008) - Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans: Dicle Üniversitesi (2008-2011) - Moleküler Biyoloji

YER ALDIĞI PROJE: Kurumsal (DÜBAP)

PROJENİN NUMARASI: 09-FF-53

PROJENİN ADI: Laktik Asit Bakterisinden α -Amilaz İzolasyonu ve Karakterizasyonu