

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Termofilik *Bacillus* İzolatlarınca Üretilen Alfa-amilaz
Enzimlerinin Kısmi Karakterizasyonu**

Seda TORUN

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Mayıs, 2024

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Termofilik *Bacillus* İzolatlarınınca Üretilen Alfa-amilaz
Enzimlerinin Kısmi Karakterizasyonu**

Seda TORUN

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Bu Yüksek Lisans Tezi 10/05/2024 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Değerlendirilmiş ve Oy Birliği / Oy Çokluğu ile Kabul Edilmiştir.

Jüri : Prof. Dr. Makbule BAYLAN (Danışman)
: Prof. Dr. B. Devrim ÖZCAN
: Doç. Dr. Dilek TEKDAL

Bu Tez Fen Bilimleri Enstitüsü BİYOTEKNOLOJİ Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.
Tez No:

Prof. Dr. Sadık DİNÇER
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Ç.Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2021-13602

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

İÇİNDEKİLER

ÖZ	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR.....	III
ÇİZELGELER DİZİNİ	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	VI
1. GİRİŞ	1
1.1. Polimerik Karbonhidratlar ve Özellikleri.....	5
1.2. Enzimlerin Üretim Kaynakları	8
1.2.1. Bitkisel Kaynaklı Enzimler	8
1.2.2. Hayvansal Kaynaklı Enzimler	8
1.2.3. Mikrobiyal Kaynaklı Enzimler	9
1.3. Endüstride Enzimlerin Kullanım Alanları.....	12
1.3.1. Alkol Endüstrisi	12
1.3.2. Ekmek Endüstrisi.....	13
1.3.3. Meyve Suları.....	13
1.3.4. Deri İşleme ve Deri Endüstrisi	13
1.3.5. Et Yumuşatma Endüstrisi	13
1.3.6. Kağıt Endüstrisi	13
1.3.7. Kauçuk Endüstrisi.....	13
1.3.8. Fotoğraf Endüstrisi	14
1.3.9. Eczacılık	14
1.3.10. Nişasta Endüstrisi	14
1.3.11. Deterjan Endüstrisi	14
1.3.12. Yem Endüstrisi	14
1.3.13. Tekstil Endüstrisi	14
1.3.14. Tarım Endüstrisi	15
1.4. Nişasta Hidroliz Enzimleri	15
1.4.1. Amilaz Enzimi ve Özellikleri	15
1.4.2. α -Amilazlar	17
1.4.3. Sıcaklığa Dirençli α -Amilazlar ve Termofil Mikroorganizmalar	19
1.5. Çalışmanın Amacı ve Kapsamı	20
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	23
3. MATERYAL VE METOT	27
3.1. Materyal	27

3.1.1. Bakteriler.....	27
3.1.2. Kimyasal ve Diğer Sarf Malzemeler.....	27
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Aletler.....	27
3.2. Metot.....	27
3.2.1. Bakterilerin İzolasyonu.....	27
3.2.2. İzolatlarda alfa-amilaz aktivitelerinin belirlenmesi.....	28
3.3. Antibiyogram Testi.....	28
3.4. Enzimatik Analizler.....	29
3.5. Optimum Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi.....	29
3.6. Enzimlerin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değerlerinin Belirlenmesi.....	30
3.7. Enzimlerin Termal Kararlılık Değerlerinin Belirlenmesi.....	30
3.8. Bazı Kimyasalların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi.....	30
3.9. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrophorezi(SDS-PAGE).....	31
3.10. Bakterilere Ait Hücre dışı Protein Örneklerinin Hazırlanması.....	31
3.11. SDS-PAGE'nin hazırlanması ve örneklerin elektrophorezi.....	32
3.12. SDS-PAGE Jelin Boyanması.....	32
3.13. Filogenetik Analizler.....	33
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	35
4.1. BULGULAR.....	35
4.1.1. İzolatların Antibiyogram Analizleri.....	35
4.1.2. Enzimatik Özellikler.....	35
4.1.3. Filogenetik Analiz Sonuçları.....	42
4.2. Tartışma.....	46
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	49
KAYNAKLAR.....	51
ÖZGEÇMİŞ.....	59
EKLER.....	61
Ek A. Kullanılan Çözeltiler.....	63

**Termofilik *Bacillus* İzolatlarınınca Üretilen Alfa-amilaz
Enzimlerinin Kısmi Karakterizasyonu**

Seda TORUN

Danışman: Prof. Dr. Makbule BAYLAN

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

ÖZ

Bu çalışmada, Çukurova Üniversitesi kampüs alanı içinden alınan toprak numunelerinden üç adet termofilik *Bacillus* sp. bakterisinin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen bakteriler sırasıyla *Bacillus* sp. izolat SD1, SD2 ve SD3 olarak adlandırılmıştır. Bakteriler tarafından üretilen α -amilaz enzimlerinin izolasyonu ve kısmi karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Enzimlerin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerleri SD2 ve SD3 izolatları için 50 °C, SD1 izolatı için ise 40 °C olarak belirlenmiştir. SD1 α -amilazı optimum aktivitesini 8.0 pH değerinde gösterirken, SD2 ve SD3 α -amilazları 6.0 pH değerinde göstermişlerdir. Bakterilerin besiyerlerine inokülasyonlarından itibaren SD2 α -amilazı 24. saatte en yüksek aktivite seviyesine ulaşırken, SD1 ve SD3 α -amilazları 48. saatte ulaşmışlardır. Her üç enzim de 30 ve 40 °C’de 15 dk. ön inkübasyon sonrasında aktivitelerini tamamen korumuşlardır. 50 °C’den sonra ise 15 dk ön inkübasyon sonrasında kalan aktivite kayıpları meydana gelmiş, 100 °C’de ise aktivitelerinin büyük bir kısmını kaybetmişlerdir. Kimyasal maddelerden Ca, Mg ve Co her üç enzim üzerinde de değişik oranlarda stimülatör etki ortaya koyarken, K ve EDTA inhibisyon etkisi göstermiştir. 16S rDNA dizileme analizi *Bacillus* sp. SD1 ve SD2 suşunun suşunun büyük oranda benzerlik gösterdiğini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus* sp., alfa-amilaz, izolasyon, karakterizasyon

**Partial Characterisation of Alpha-amylase Enzymes
Produced by Thermophilic *Bacillus* Isolates**

Seda TORUN

Advisor: Prof. Dr. Makbule BAYLAN

Department of Biotechnology

ABSTRACT

In this study, three thermophilic *Bacillus* sp. bacteria were isolated from soil samples taken from Çukurova University campus area. The isolated bacteria were named as *Bacillus* sp. SD1, SD2 and SD3, respectively. Isolation and partial characterisation of α -amylase enzymes produced by the bacteria were carried out. The optimum temperature values at which the enzymes showed optimum activity were determined as 50 °C for SD2 and SD3 isolates and 40 °C for SD1 isolate. SD1 α -amylase showed its optimum activity at pH 8.0, while SD2 and SD3 α -amylases showed their optimum activity at pH 6.0. After inoculation of bacteria into the media, SD2 α -amylase reached the highest activity level at 24 h, while SD1 and SD3 α -amylases reached at 48 h. All three enzymes completely retained their activities after 15 min pre-incubation at 30 and 40 °C. After 50 °C, the remaining activity losses occurred after 15 min pre-incubation, and they lost most of their activity at 100 °C. Among the chemicals, Ca, Mg and Co showed stimulatory effect on all three enzymes at different rates, while K and EDTA showed inhibition effect. 16S rDNA sequencing analysis revealed that the strains of *Bacillus* sp. SD1 and SD2 were highly similar.

Keywords: *Bacillus* sp., alfa-amylase, isolation, characterization

TEŞEKKÜR

“Termofilik *Bacillus* İzolatlarınca Üretilen Alfa-amilaz Enzimlerinin Kısmi Karakterizasyonu” konulu bu çalışma, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır. Yüksek Lisans çalışmam boyunca desteğini esirgemeyen, bilgi donanımı ve tecrübeleriyle çalışmama yön gösteren değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Makbule BAYLAN’a sonsuz teşekkür ederim. Çalışma sürecim boyunca labortuvar çalışmalarında her zaman destek ve yardımını esirgemeyen, bilgi ve yönlendirmeleriyle yoluma ışık tutan Sayın Prof. Dr. Bahri Devrim ÖZCAN’a sonsuz teşekkür ederim. Deney çalışmalarımın üzerinde emeği olan ve süreçte birlikte ilerlediğim Biyolog Elif DİKKAYA’ya teşekkür ederim. Çalışma boyunca hep yanımda olan eşime, sabırla bekleyen canım oğlum ve canım kızıma, inanarak ilerlediğim süreçte desteğini her zaman hissettiğim değerli anneme ve babama sonsuz teşekkür ederim.

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Enzimlerin İsimlendirilmesi.....	2
Çizelge 1.2. Enzimlerin Sınıflandırılması.....	2
Çizelge 1.3. Amilolitik enzimlerin enzim kod numaraları (EC numaraları) ve başlıca substratları ..	5
Çizelge 1.4. <i>Bacillus</i> Taksonomi Basamakları	10
Çizelge 1.5. <i>Bacillus</i> Tür Listesi	12
Çizelge 4.1. Metal iyonlarının relatif aktivite yüzdeliği üzerine etkisi.....	40
Çizelge 4.2. <i>Bacillus</i> sp. SD1 bakterisine ait rDNA sekansı.....	42
Çizelge 4.3. <i>Bacillus</i> sp. SD2 bakterisine ait rDNA sekansı.....	43
Çizelge 4.4. <i>Bacillus</i> sp. SD3 bakterisine ait rDNA sekansı.....	44



ŞEKİLLER DİZİNİ

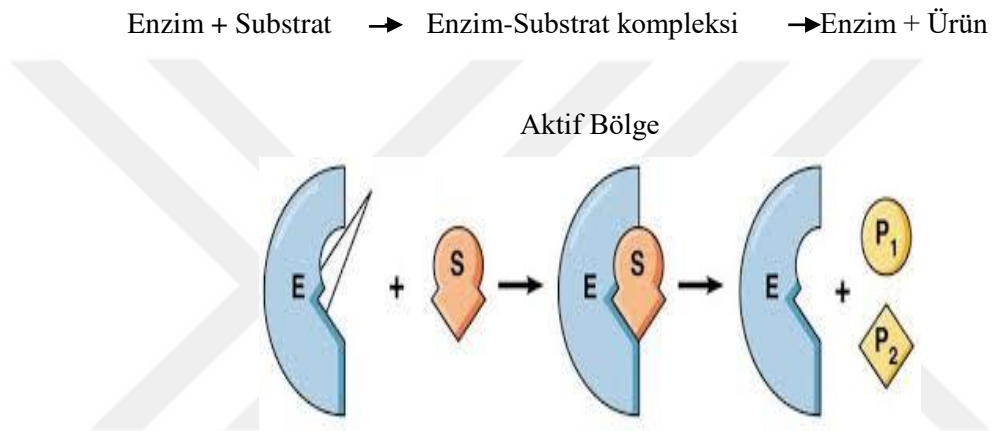
Şekil 1.1. Enzim-Substrat spesifik çalışması (Michaelis ve Menten Denklemi)	1
Şekil 1.2. Amiloz ve amilopektinin kimyasal yapı modeli (Vazquez ve ark., 2012).....	7
Şekil 1.3. Takım halinde çalışan enzimler ve aktiviteleri	8
Şekil 1.4. Amilozun kimyasal yapısı (Asi, 1996)	16
Şekil 1.5. Alfa Amilaz Enzimi aktivitesi (Brad Smith,2021).....	18
Şekil 3.1. SDS-PAGE Çalışmaları	31
Şekil 3.2. İzolatlara ait hücre dışı proteinlerin SDS-PAGE'ye yüklenmesi ve elektroforezi.....	32
Şekil 4.1. <i>Bacillus</i> sp. suşlarının antibiyotik emdirilmiş disklerle yapılan antibiyogram görüntüsü (AMP:Amfisilin; P: Penisilin; S: Streptomisin; TE: Tetrasiklin; CN: Gentamisin; SH: Spektinomisin, RD: Rifamisin)	35
Şekil 4.2. SD1, SD2 ve SD3 izolatlarının zamana göre α -amilaz üretimi	37
Şekil 4.3. İzolatlara Ait α -Amilaz Enzimlerinin Değişik Sıcaklık Koşullarındaki Relatif Aktivite Değerleri.....	38
Şekil 4.4. İzolatlara Ait α -Amilaz Enzimlerinin Değişik pH Koşullarında Gösterdikleri Relatif Aktivite Değerleri.....	39
Şekil 4.5. Enzimlerin farklı sıcaklık koşullarında gösterdikleri termal kararlılık grafiği	40
Şekil 4.6. Bazı kimyasal maddelerin enzimlerin aktiviteleri üzerine olan etkileri.....	41
Şekil 4.7. İzolatlara ait SDS-PAGE (M: Markır, A: SDS-PAGE'de toplam proteinler)	41
Şekil 4.8. 16S rDNA gen bölgesine ait kısmi dizilere dayalı Kimura-2 parametrelili maksimum olabilirlik metoduna (Kimura, 1980) göre oluşturulan moleküler filogenetik ağaç. İlişkili taksonların bir arada kümelendiği tekrarlı ağaçların yüzdeliği dalların yanında gösterilmektedir. Daire ve kare sembolleri izolatları göstermektedir. NCBI GenBank'sında belirtildiği şekilde tür adları ve erişim numaraları verilmiştir. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> dış grup olarak kullanılmıştır.	45

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	: Santigrat derece
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
bç	: Baz çifti
CMCaz	: Karboksimetil selülaz
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNS	: Dinitro salisilik asit
EDTA	: Etilendiaminotetraasetik asit
gr	: Gram
GRAS	: Generally Recognized As Safe (Genel Olarak Güvenli Kabul Edilen)
kbç	: Kilobaz çifti
kDa	: Kilodalton
L	: Luria besiyeri
LB	: Luria Bertani
M	: Molar
mA	: Miliamper
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
OD	: Optikal densite
RNA	: Ribonükleik asit
rpm	: Dakikada devir sayısı
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
sp.	: Tür
TCA	: Trikloro asetik asit
Tris	: 2-Amino-2-Hidroksimetilpropan-1,3-diol
U/mg	: Ünite/miligram
U/ml	: Ünite/mililitre
V	: Volt
v/v	: Hacim/hacim
w/v	: Ağırlık/hacim
α	: Alfa
β	: Beta

1. GİRİŞ

Enzim, katıldığı tepkimelerde reaksiyonun başlaması için gerekli minimum enerji olan aktivasyon enerjisini düşürerek, reaksiyonu katalizleyen protein yapılı biyolojik katalizörlerdir. Enzimler, başlamış olan tepkimeye hız kazandırmaktadır. Dolayısıyla enzimler reaksiyonları başlatmaz. Reaksiyonu başlatan faktör aktivasyon enerjisidir. Canlı organizmada hücrelerin aktivasyon enerjisi ise ATP ve sıcaklıktır. Enzimin aktivasyonu etki edeceği metaboliti tanımasıyla başlamaktadır. Enzimin etki gösterdiği metabolit substrat olarak tanımlanmakta ve enzim substrat kompleksi aktif bölge uyumu gerektirmektedir. Enzimin substrata olan etkisi Michaelis ve Menten tarafından bir denklemle ifade edilmektedir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Enzim-Substrat spesifik çalışması (Michaelis ve Menten Denklemi)
<https://www.bioinforange.com/wp-content/uploads/2021/12/Seyma-Erkaya.Enzim-Kinetigi.derlemesi.pdf>

Enzimler başlangıç olarak reaksiyona giren metabolit yani substratı ile geçici kimyasal bileşik oluşturmaktadırlar. Reaksiyon bitince yeni tepkimeleri katalize etmek için eski formlarına geri dönmektedir. Enzimin substratı ile geçici ilişkisi iyon bağları, vanderwalls çekimleri, hidrojen bağları gibi zayıf etkileşimler ile gerçekleşmektedir.

Enzimler işlev yerlerine göre 2 grupta incelenebilir. Organizmada hücre içinde işlev gören enzimlere endoenzim (intraseküler), hücrede üretilip hücre dışı ortama salgılanan ve aktivite gösteren enzimlere ise ekzoenzim (ekstraseküler) denilmektedir. Ekstraseküler enzimler besiyeri ve hücre duvarı dış yüzeyi ile bağlantılı olan enzimlerdir (John ve Sons., 1998; Madsen ve ark., 1973). Ekstraseküler enzimler genellikle moleküler ağırlığı yüksek substrat ile çalışmaktadır.

Enzimlerin isimlendirilmesi genel olarak substrata göre ya da gerçekleştirdiği reaksiyona göre yapılmaktadır (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Enzimlerin İsimlendirilmesi

Substrata göre isimlendirme	Reaksiyona göre isimlendirme
Protein → Proteinaz	Oksidasyon → Oksidaz
Karbonhidrat → Karbonhidraz	Hidrolizasyon → Hidrolaz
Lipit(Yağ) → Lipaz	Redüksiyon → Redüktaz
Üre → Üreaz	Dekarboksilasyon → Dekarboksilaz

Enzimlerin sınıflandırılması aşağıdaki tablo ile gösterilebilir:

Çizelge 1.2. Enzimlerin Sınıflandırılması (Ananthanarayan, 2008)

NNo	Sınıfı	Görevi	Örnekler
11	Oksidoredüktazlar	Redoks tepkimelerini katalizlerler. (İndirgenme yükseltgenme tepkimeleri)	Dehidrogenazlar: Elektron kazandırıcı tepkimeleri etkilerler. Redüktazlar: Substratı bir redükte aracılığıyla indirgeyen enzimlere denir. Oksidazlar: Elektron kaybeden tepkimeleri etkilerler. Transhidrogenazlar: Bir molekülden diğerine hidrojen taşıyarak onu indirger. Hidroksilazlar: Substratlarına bir hidroksi ya da su molekülü katan enzimlere denir.
22	Transferazlar	Grup transfer tepkimelerini katalizlerler. Hidrojen dışında bir atomun veya atom grubunun bir molekülden diğerine aktarılmasını sağlarlar.	Aspartat transaminaz, Alanin transaminaz Dekarboksilazlar: Karboksilik asitten CO2 çıkmasını sağlarlar.
33	Hidrolazlar	İşlevsel grupların suya transferi yani hidroliz tepkimelerini katalizlerler.	Esterazlar: Ester bağını yıkan enzimlerdir. (lipaz, ribonükleaz, fosfataz, pirofosfataz, glikozidaz). Proteazlar: Peptit bağını yıkan enzimlerdir (proteinaz).
44	Liyazlar	Çift bağlara grupların ilavesi ve grupların yer değiştirmesiyle çift bağların oluşmasını katalizlerler.	Pirüvat dekarboksilaz, Sitrat sentetaz
55	İzomerazlar	İzomerik formları oluşturmak üzere moleküller içinde grupların transferini katalizlerler.	Epimeraz, Razameraz

66	Ligazlar	ATP'nin uzaklaşmasıyla eşleşmiş C-C bağlarının oluşmasını katalizlerler.	DNA Ligaz
----	----------	--	-----------

Organik besinlere etki edecek enzimler genel ifade olarak; karbonhidratlara etki eden karbonhidraz, proteinlere etki eden proteinaz, yağlara etki eden lipaz enzimleri olarak belirlenebilir. Tepkimelerin sürecinde enzimler uzun zamandır kullanılmaktadır. Tepkimelerde önem taşıması enzimlerin ekonomik olarak elde edilmesini gerektirmektedir. Terim olarak ilk enzim kavramı Kuhne tarafından kullanılmıştır. Kuhne (1878) enzim kavramını fermente anlamında kullanmış olup Yunanca maya anlamı taşımaktadır (Paulo ve Gubitz, 2003). Fermantasyon yöntemlerinde organizma metabolizmalarındaki enzim aktivitelerinden ve enzimatik tepkimelerin değişimlerinden faydalanılmaktadır.

Özellikle maya içerikleri olan gıdalarda (ekmek, peynir, bira, şarap, turşu, sirke, yoğurt gibi), meyve suyu üretiminde, et yumuşatma, kauçuk üretimi, kağıt endüstrisi alanında, deri işleme sanayi, deterjan üretimi gibi temizlik sanayinde, yem sanayi gibi tarımsal alanlarda, su ürünleri yetiştiriciliğinde, kontak lens temizleyiciliği alanında, fotoğraf endüstrisi alanında kullanıldığı bilinmektedir (Kirkvd., 2002). Enzimlerin bu denli geniş ölçüde kullanımının olması çeşitli yollardan enzim üretiminin araştırılmasını gerektirmiştir.

Endüstriyel enzim üretiminde göz önünde bulundurulması gereken önemli özellikler bulunmaktadır. İlk olarak seçilecek suşların üretime uygun olması gerekmektedir. Ayrıca, suşların patojenik özellikte olmaması, toksik özellikte olmayan ürünler vermesi ve biyolojik açıdan stabil olmaları, geniş pH aralıklarında üreyebilmeleri, üreme hızlarının yüksek olması beklenmektedir (Fukara, 2007).

Endüstriyel anlamda enzimlerin çeşitli dallarda değerlendirilmesi için üretiminin ekonomik yollarla olması, çeşitli endüstri dallarında kullanılabilme özelliğine sahip olması, alerjen etki göstermemesi veya bulunduğu ortamda zehirli etki oluşturmaması, kısacası her yönüyle güvenilir özellikte olması gerekmektedir (Wiseman, 1987). Teknolojinin gelişmesi ve üretim tekniklerinde ilerleme kaydedilmesi ile enzimler daha saf ve ekonomik olarak üretilmektedir. Biyoteknoloji çalışmalarında ilerleme kaydedilmesi ile birlikte enzimler daha uygun, ekonomik ve pratik açıdan daha çok mikroorganizmalardan elde edilmektedir.

Mikroorganizmalardan faydalanılarak ticari amaçlı kullanılabilecek enzimler üretilmektedir. Ticari enzimlerin üretimi için birçok canlı organizma kullanılabiliyor olsa da, mikrobiyal açıdan bakteri, küf ve mayalar tercih edilmektedir. Bu mikroorganizma gruplarından genellikle küfler amilaz, proteaz, katalaz, selülaz, pektinaz, glikoz oksidaz, lipaz ve selülaz, mayalar invertaz ve laktaz, bakteriler ise proteaz, amilaz, streptokinaz, streptodornaz, ksilanaz gibi enzimlerin üretiminde kullanılmaktadır. Endüstriyel alanda kullanımı gerçekleştirilen enzimlerin %59'unu proteazlar, %28'ini karbohidrazlar, %3'ünü lipazlar ve %10'unu ise diğer enzim

çeşitlerinin oluşturduğu görülmektedir (Wiseman, 1987). α -Amilaz enzimi ticari olarak kullanılan karbohidraz enzim çeşitlerindendir ve α -amilaz enzimi %13 oranında üretimi ile büyük önem oluşturmaktadır (Wiseman, 1987). Farklı bir çalışmada ise, mikrobiyal enzimlerden olan ticari öneme sahip alkali proteazlar %25, diğer proteazlar %21, amilazlar %18, yine bir proteaz olan rennin %10, tripsin %3, lipaz %3 ve diğer karbonhidrat türevi polisakkaritleri parçalayan hidrolitik enzimlerin (selüloz, ksilanaz vb.) ise %10, farmasötik ve analitik alanda kullanılan enzimlerin ise yine %10 oranlarında kullanıldığı görülmektedir (Rao ve ark., 1998). Enzimlerin endüstriyel açıdan kullanım alanları incelendiğinde ise; %34'ü yiyecek ve hayvan yemi, %29'u deterjan ve temizlik, %11'i selüloz ve kağıt, %17'si ise tekstil, deri ve kürk gibi çeşitli alanlarda kullanıldığı bildirilmiştir (Parameswaran ve ark., 2013).

Endüstride yaygın olarak kullanılan enzimlerin başlıcaları, amilaz, glikoamilaz, glikoizomeraz, proteaz, lipaz, karbonhidrataz olarak sıralanabilir (Çizelge 1.3). Ticari alanda kullanılan ilk fungal enzim 20. yy başlarında, ilk mikrobiyal enzim kullanımı 1. Dünya savaşı sırasında başlamıştır. İlk ticari amaçlı amilaz enzimi üretimi ise 1939 yılında, Japonya'da *Bacillus subtilis* suşlarından elde edilmiştir (Casida, 1964). İlk kez canlı hücreden enzim aktivasyonunu maya ekstraktı kullanarak Buhner gerçekleştirmiştir.

Üretim teknolojisi olarak enzim elde etme metodları oldukça gelişme göstermektedir ortaya çıkan ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması gibi nedenlerden dolayı biyoteknolojinin, endüstriyel enzimler alanında yapılan araştırmalarının daha fazla önemli olduğu görülmektedir. Son dönemde biyoteknoloji çalışmaları ve buna bağlı olarak rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesi ile birlikte enzim üretimi ve kullanımı büyük oranda artış göstermekte ve son dönemde yüksek üretim oranı elde edilmektedir (Gessesse, 1998).

Endüstriyel enzim üretiminde göz önünde bulundurulması gereken önemli özellikler bulunmaktadır. İlk olarak seçilecek suşların üretime uygun olması gerekmektedir. Ayrıca, suşların patojenik özellikte olmaması, toksik özellikte olmayan ürünler vermesi ve biyolojik açıdan stabil olmaları beklenmektedir.

Enzim üretimi için ekstrem koşullara dayanıklı organizma tercihi de büyük önem taşımaktadır. Gerek ortamın sıcaklığı, gerek ortam pH'ı ve iyon içeriği bakımından organizmanın sert koşullara dayanıklı olması da yine istenilen özellikleri arasındadır.

Endüstride nişasta hidrolizinde kullanılan 5 grup enzim vardır;

1. Endo-amilazlar (iç etkili)
2. Ekzo-amilazlar (dış etkili)
3. Dallanmayı kırıcı enzimler
4. İzomerazlar
5. Transferazlar (Yiğit ve Koca, 2011)

Çizelge 1.3. Amilolitik enzimlerin enzim kod numaraları (EC numaraları) ve başlıca substratları (Polaina ve MacCabe, 2007)

Enzim	EC numarası	Domain	Başlıca substratı
Amilosükraz	2.4.1.4	--	Sükroz
Sükroz fosforilaz	2.4.1.7	--	Sükroz
Glukon dallanma enzimi	2.4.1.18	A,B,F	Nişasta,glukojen
Siklodekstrin glikozil transferaz	2.4.1.19	A,B,C,D,E	Nişasta
Amilomaltaz	2.4.1.25	A,B1,B2	Nişasta,glukojen
Amilopentoz oluşturan amilaz	3.2.1	A,B,I	Nişasta
α -Amilaz	3.2.1.1	A,B,C	Nişasta
Oligo (1-6)glukozidaz	3.2.1.10	A,B	Amilopektin
α -Glukozidaz	3.2.1.20	---	Nişasta
Amilopullulanaz	3.2.1.41	A,B,H,G,I	Pullulan
Siklomaltodekstrinaz	3.2.1.54	A,B	
Siklodekstrinler İzopullulanaz	3.2.1.57	---	Pullulan
Izoamilaz	3.2.1.68	A,B,F,7	Amilopektin
Maltotetroz oluşturan amilaz	3.2.1.60	A,B,C,E	Nişasta
Siklodekstranaz	3.2.1.70	---	Nişasta
Teraloz 6-fosfat hidrolaz	3.2.1.93	---	Teraloz
Maltoheksoz oluşturan amilaz	3.2.1.98	----	Nişasta
Maltojenik amilaz	3.2.1.133	---	Siklodekstrinler,nişasta

1.1. Polimerik Karbonhidratlar ve Özellikleri

Yapısal ve işlevsel olarak birçok araştırma ve çalışmada incelenen nişasta molekülü suda çözünme özelliği çok az olan doğal bir karbonhidrat türüdür. Bitkilerin fotosentez ürünü olarak üretilen glikoz monomerinin depo formudur.

Nişasta molekülü endüstride özellikle tutkal, kağıt ve tekstil yapımında kullanılmaktadır. Gıda sanayisinde kıvam arttırıcı, sıvıları koyulaştırma ve stabilizatör olarak kullanılmaktadır. Çoğunlukla patates ve tahıllardan oluşturulan tadı ve kokusu olmayan toz yapıdadır. Ülkemizde mısır, buğday, pirinç gibi tahıllar, patates gibi nişasta içeriği fazla olan depo besinler kullanılarak nişasta elde edilmektedir.

Kimyasal olarak nişasta, amiloz ve amilopektin isimli iki polimerik karbonhidratın (polisakkaritin) birleşiminden oluşmaktadır. Amiloz, glikoz monomer birimlerinin alfa-1,4 bağlantılarıyla ucuca eklenmesinden oluşur. Amilopektin ise amilozdan farklı olarak dallanma yapısı göstermektedir. Amilopektinde yan zincir oluşumu alfa-1,6 bağlantısı ile başlamaktadır (Ölçer, 2008).

Amiloz doğrusal bağlantı oluşturmuş, molekül yapısındadır. Bağlantıların çizgi görünümünün yanı sıra yapıdaki glikoz birimlerinin yaptığı açıl bağlantılar molekülde sarmal yapıyı oluşturmaktadır. Amiloz molekülleri yaptığı bağlantılar haricinde kendi aralarında da sarmallar oluşturabilmektedir. Amiloz moleküllerinin oluşturduğu sarmalın iç kısmı hidrofobik özelliktedir. Bu durum iç kısımda bulunan su moleküllerinin, hidrofobik özellikteki moleküllerle daha rahat yer değiştirebilmesine olanak sağlamaktadır. Ayrıca olarak kullanılan iyot molekülleri nişasta varlığını tespit etmek

amacıyla kullanılmaktadır. İyot molekülleri nişasta yapısını oluşturan amiloz moleküllerinin oluşturduğu sarmallar içinde dizilerek mavi renk oluşumuna neden olmaktadır. Hidrojen bağları oluşumu molekülde su tutma özelliğini azaltmaktadır. Amiloz moleküllerini oluşturan sarmal yapılarda hidrojen bağları içermektedir. Bu durum amilozda su kapasitesini azalttığı için kıvamlı bir yapı oluşturmaktadır (Kumar ve Nussinov, 2001).

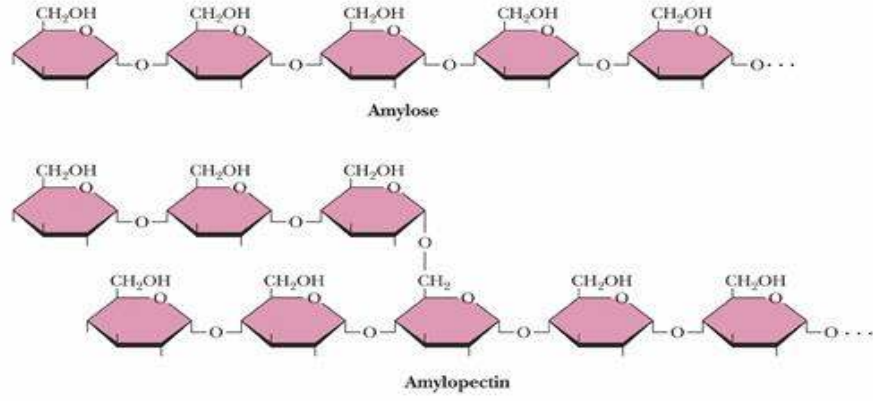
Glikoz zinciri dallarından oluşan polisakkarit yapı amilopektin, birçok dallanma yaparak dallanma bölgelerinden paralel çizgiler şeklinde uzanmaktadır. Uzanan bu paralel yapılarda birbirine bağlanarak sarmal çiftleri oluşturmaktadır. Dallı yapıya sahip olan amilopektin, dallanmalarını ortadan dışa doğru açan ve bu şekilde genişleyen bir ağaç dalı görünümü almaktadır. Dallanma bölgelerinde molekül görünümü düzeni kaybetmiştir. Bu bölgelerde oluşan sarmal yapılar çiftler halinde yerleşimini sistemli bir şekilde yaparak kristal bir oluşum yapmaktadır. Oluşan bu kristaller mikroskopla incelendiğinde dallanma bölgelerindeki düzenlenme farklılıkları nişasta yapısında içten dışa halkasal bir görünüm oluşturmaktadır (Tutar, 2012).

Düz zincir yapıdaki amiloz ve dallanmalar oluşturan amilopektin polisakkaritleri glikoz monomerinden oluşmaktadır. Amiloz doğrusal polisakkariti 500-20.000 glikoz monomeri, dallı yapıya sahip olan amilopektin polisakkariti ortalama bir milyon glikoz monomeri taşımaktadır. Nişasta molekülü depo polisakkariti olma özelliğini, yapıdaki amilopektinin dallanmaları ile oluşturduğu sarmal şekillerden kazanmaktadır.

Nişasta polisakkariti düz zincir polimerlerinin birbirine bağlanması sonucu oluşmaktadır. Amilopektin polimerinde görülen dallanmalar alfa-1,4 bağlantılarının arasında alfa-1,6 bağlantılarının oluşmasıyla gerçekleşmektedir. Amiloz ve amilopektin oranları bitkiden bitkiye göre, hatta aynı bitkideki farklı bölümlerinde (cultivar) değişebilmektedir. Bu değişkenliğe örnek olarak amiloz bakımından yoğun olan mısır nişastasında %85 oranında amiloz bulunurken, yapışkan yapısı ile karakterize edilen (waxy) mısır türünde amilopektin polimeri %99 oranında bulunmaktadır. Granül oluşumlarında yapı, şekil ve boyutsal olarak bazı farklılıklarda görülebilmektedir (Polaina ve MacCabe, 2007).

Dallanmalar sonucu oluşan amilopektin zincirleri birçok tahıl nişastasında daha katı bir şekilde düzenlenirken (A-tipi nişasta), bitkisel kaynaklı olan bitkilerde daha seyrek bir şekilde düzenlenmektedir (B-tipi nişasta) (Ölçer, 2008).

Glikoz monomerinin üstünde yer alan fosfat grupları polar özellik göstermektedir ve bu durum amilopektin polimerlerinin yapısal özelliğini oluşturmakla birlikte nişastada suyun kolay bir şekilde emilmesini sağlamaktadır. Nişasta, amilopektin polimerinin yapısındaki hidrojen bağlarından dolayı az miktarda su içeren ve kristal özellikte tanecikler olarak bitkilerde depolanmaktadır. Bu depo polisakkariti tanecik boyutu bakımından bitki türleri arasında farklılık göstermektedir.

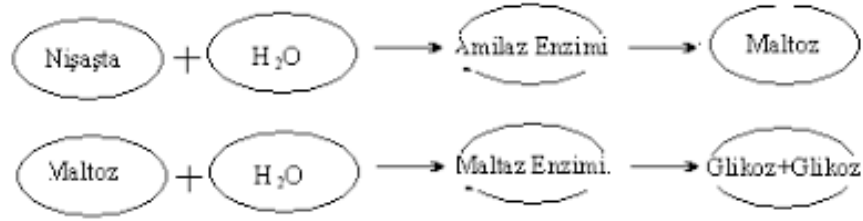


Şekil 1.2. Amiloz ve amilopektinin kimyasal yapı modeli (Vazquez ve ark., 2012).

Vazquez ve ark. (2012), amiloz üzerine butilakrilatingraft kopolimerizasyonunu incelemişlerdir ve metakrilik asidin patates nişastasına $H_2O_2-(NH_4)_2Fe(SO_4)_2$ redoks sistemi kullanarak çalışmıştır (Vazquez ve ark, 1992). Görülen nişasta moleküllerindeki baskın olan amilopektin molekülü, amilozdan çok daha büyük olan dallanmış bir polimerdir (Thomas ve ark. 1999).

Nişasta depo polisakkariti besin deposu ile birlikte enerji deposu olarak işlev göstermektedir. Nişasta polisakkaritinin glikoz monomerleri arasında bağ kurulması ile sentezinde ve bu polisakkaritin depolanmasında görev alan bitkisel organeller genel anlamda plastid olarak adlandırılan kloroplast ve amyloplast organelleridir.

Nişasta molekülü suda çözünmeyen ya da çok az çözünebilme özelliği gösteren bir moleküldür. Bu nedenle sindirilmesi hidroliz yoluyla olmaktadır. Hidroliz reaksiyonlarını katalizleyen amilaz enzimleri ise nişasta polisakkaritini oluşturan glikoz monomerleri arasındaki glikozit bağlarını kesmektedir. Hayvanlar alemine ait canlılarda nişastanın hidrolizinde görev alarak yapı birimlerinden faydalanmamızı sağlayan amilaz enzimleri bulunmaktadır. Amilaz enzimleri arasında farklılıkların görülmesi nişasta polimerinin hidrolizinde farklı etki oluşturmalarına neden olmaktadır. Nişasta polimerinin hidrolizinde etki gösteren enzim değişikliği ile birlikte ürünlerde de farklılık söz konusu olmaktadır. Hidrolizde nişasta polimerine etki göstererek farklı ürün oluşumuna neden olan birçok enzim çeşidi bulunmaktadır (Gupta ve ark., 2003). Nişasta parçalandıkça dekstrin, maltoz ve glikoz gibi ürünler oluşmaktadır. Ayrıca maltoz disakkaritinin hidrolizi maltaz enzimi tarafından da gerçekleşmektedir (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Takım halinde çalışan enzimler ve aktiviteleri

Enzimlerin takım halinde çalışmasına üstte örnek verilmektedir.

1.2. Enzimlerin Üretim Kaynakları

Enzimler hayvan, bitki ve mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Mikroorganizmalardan elde edilen enzimler, bitki ve hayvanlardan elde edilen enzimlere göre, rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak daha ucuz ve pratik olarak üretilmektedir. Aynı zamanda mikrobiyal enzimler dış ortamdan daha az etkilenmektedir. Bu özelliklerinden dolayı ticari amaçlı üretilen enzimlerde mikroorganizmaları kullanmak daha avantajlıdır (Wiseman, 1987).

1.2.1. Bitkisel Kaynaklı Enzimler

Bitkisel kaynaklı dokuların miktarları kısıtlıdır. Çünkü bitkisel kaynaklar toprak miktarı ve kalitesi, mevsim ve iklimsel değişimler, işgücü durumu ve elde edilen ürün kalitesine bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir. Bu durumlardan dolayı bitkisel kaynaklı enzimlerde üretim standarttan uzaklaşabilmekte ve stabilitesi değişebilmektedir. Bu faktörlerin etkisiyle bitkisel kaynaklı enzim üretimi ekonomik açıdan daha kısıtlı olmaktadır.

Bitkilerden elde edilen biyoteknolojik enzimler daha çok güvenilir, yenilebilir özellik göstermektedir. Aynı zamanda toksik etki göstermemektedir (John,1987). Bitkisel kaynaklı enzimlere daha çok proteaz enzimleri örnek verilebilmektedir. Papain, soya fasulyesi lipoksigenazı, tahıl amilolitik enzimleri gibi. Örneğin proteazlar proteinlerin aminoasitlere hidrolizi ve mayaların kullanabileceği azotlu madde oluşumunda, papain bira yapımında, amilolitik enzimler nişastanın fermente edilerek amilopektin 1-6 bağlarının hidrolizi aşamasında kullanılmaktadır.

1.2.2. Hayvansal Kaynaklı Enzimler

Hayvansal kaynaklı enzimlerde izolasyon işlemi daha çok tavuk yumurtası beyazı (yumurta albümini), domuz midesi, geniş getiren hayvanlarda karın bölgesi, pankreas gibi yapılardan gerçekleştirilmektedir (John, 1987).

Kullanımı ve üretimi fazla enzimler, hayvanlarda daha çok sığır ve domuzun mide, pankreas gibi organlarından üretilmektedir. Hayvansal kökenli enzimlere ise pankreatik lipaz ve proteazlar, pepsinler, pregastrik esterazlar ve rennetler örnek olarak verilebilir. Köken olarak hayvanlardan edinilen enzimler için örnek pankreatin ve tripsin olarak bilinmektedir. Pasta sektöründe kullanılan

enzimlerin temel amacı, hamurda hacimsel artışı sağlamak, ürünün uzun ömürlü olmasını sağlamak, kırıntı içeriğini yönlendirmektir. Hayvansal enzimler aynı zamanda, süt kesiği oluşturularak peynir üretiminde ve süt kesilmesi ile oluşan yapının şekillendirilmesinde kullanılarak süt ürünleri sektöründe önem taşımaktadır. Mikrobiyal rennet (mikrobiyal maya) peynir sektöründe çoğunluk peynir üreticileri tarafından kullanılmaktadır. Mikrobiyal rennet yapmak için, bir doğal kültür ortamı oluşturulmalıdır. Bu doğal kültür ortamını oluşturmak için ise süt, peynir altı suyu, pankreatin laktos veya kurutulmuş mayakullanılmaktadır. Bu şekilde sığır ve domuz gibi hayvanlar kullanılarak lipaz enzimleri elde edilmektedir. Hayvansal kaynaklı enzimlerin üretiminde, hayvanların yetiştirilmesi ve taşınmasında riskli faktörlerin bulunması (örneğin viral enfeksiyonlar) kısıtlamaların oluşmasına neden olmaktadır (Godfrey ve West, 1996).

1.2.3. Mikrobiyal Kaynaklı Enzimler

Mikrobiyal kaynaklar kullanılarak edinilen enzimler daha çok bakteri, maya ve küflerden elde edilmektedir. Ticari alanda mikrobiyal kaynaklı enzimlerin tercih edilmesindeki temel faktörü ise üretiminin ekonomik koşullarda olması, biyolojik açıdan stabil özellik göstermeleri, ekstrem koşullara dayanıklı olması, toksik özelliklerinin minimum olması, üreyebilme kolaylığı, üremelerinde sıcaklık ve pH skalalarının geniş olması oluşturmaktadır. Mikrobiyal kaynaklı enzim üretimi bu özelliklerinden dolayı bitkisel ve hayvansal kaynaklı enzimlere göre tercih edilmelerine neden olmaktadır (Wiseman, 1987). Yine mikrobiyal kaynaklı enzimlerin bu özellikleri dikkate alınarak günümüzde de kullanımı önemli ölçüde artış göstermektedir (Demain ve Solomon, 1981). Mikrobiyal kaynaklı enzim üretiminde ise daha çok *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger* ve *Aspergillus oryzae* gibi mikroorganizmaların kullanımı tercih edilmektedir (Glazer ve Nikaido, 1995). Enzim üretimi için kullanılan mikroorganizmaların zehirleyici etki gösterip göstermemesi, hastalık yapıcı etkisinin olup olmaması gibi özellikleri bakımından da değerlendirilmektedir. Bu özellikler haricinde enzim üretimi faaliyetlerinde yüksek olması gerekmektedir.

Olumsuz koşullara dayanıklı olan ekstremofilik özellikte mikroorganizmalar, volkanların yüksek sıcaklıklarında, kutuplardaki gibi çok düşük sıcaklıklarda, tuz oranı yüksek ortamlarda, çok düşük ve çok yüksek pH'a sahip ortamlarda yaşama adapte olmuş canlılardır (Niehaus ve ark., 1999).

Farklı ekstrem koşullarda yaşamaya dayanıklılık gösterebilen mikroorganizmalar, termofiller, halofiller, asidofiller, alkalifiller, psikrofiller olmak üzere 5 grupta sınıflandırılmıştır (Zeikus, 1979). Bu ekolojik koşullarda yaşama özelliği gösterebilen termofilik, asidofilik ve alkalifilik mikroorganizmalardan elde edilen enzimler çok yüksek sıcaklık, yoğun tuz konsantrasyonu (%5-30), düşük ve yüksek pH aralıklarında da (pH 0-3 veya pH 10-12) işlevsel özellik gösterebildiği için endüstride kullanım alanlarında daha fazla tercih edilmektedir (Kindle, 1983).

Enzimlerin katıldığı reaksiyon tipine göre sınıflandırılmasında endüstride önemli yer tutan grup hidrolaz enzimleridir. Hidrolizasyonda görev alan hidrolazlar mikrobiyal kökenli

enzimlerdendir. Mikrobiyal kaynaklı hidroliz enzimlerinin çoğu ekstraselüler olup besiyeri ve hücre duvarı dış yüzeyi ile bağlantılıdır (Madsen ve ark., 1973; John ve Sons., 1998).

Mikrobiyal enzim üretiminde öncelikle dikkat edilmesi gereken hususlar aşağıda maddeler halinde sıralanmıştır:

- Organizmanın güvenli olup olmaması (toksik veya patojenik özellikleri)
- Farklı bir organizmaya ihtiyaç duyulup duyulmayacağı
- Organizmanın saklama koşulları (kültür ortamı)
- Çalışılacak organizmanın ihtiyaç duyacağı besinler
- Besinlerin optimum veya ekonomik konsantrasyonları
- Besinlerin sterilizasyonu
- Organizmanın optimum büyüme koşulları
- Kullanılan hammaddeler veya ürünlerin inhibe edici özellikte olup olmaması

Bacillus Cinsi

Ekstrem ekolojik koşullara dayanıklılık özellik gösteren bakteri sınıflandırılmasında *Bacillus* türü de yer almaktadır. *Bacillus*, çubuk ya da çomak şekilli, gram pozitif özellikte, aerob, fakültatif anaerob ve endospor oluşturabilen bir bakteri cinsidir. Sporları ısıya dayanıklı özellikte olup, havada, suda (deniz suyu veya tatlı su), dışkıda ve daha çok toprakta bulunmaktadır. Bilimsel sınıflandırmada *Bacillus* Çizelge 1.4'te verildiği gibidir.

Çizelge 1.4. *Bacillus* Taksonomi Basamakları

Üst âlem:	Bacteria
Şube:	Firmicutes
Sınıf:	Bacilli
Takım:	Bacillales
Familya:	Bacillaceae
Cins:	<i>Bacillus</i>

Bacillus cinsi mikroorganizmalar tabiatta geniş alanda yer edinmektedirler. Sistematik yeri belirlemek için yapılan araştırmalarda doğada oldukça yaygın olup, genetik olarak da yüksek çeşitlilik göstermektedirler (Yumoto ve ark., 2003).

*Bacillus*lar, gıdalarda patojen ve toksik özellikteki mikroorganizmaların büyümesini önleyen veya patojenik özellikleri öldürebilen bakteriosinler üretebilmektedir. Bu nedenle güvenilir mikroorganizmalardır. Patojenik bakteri ve funguslara karşı terapötik etki oluşturmaktadır. Çoğu peptit kökenli olmak üzere antimikrobiyal bileşik üretebilmektedir (peptitler, lipopeptitler, polienler,

fosfolipitler gibi). Tarım ve endüstri alanında kullanılan birçok maddenin sentezinde rol alması sebebiyle büyük önem taşımaktadır.

Bacillus 'ların ürettiği antimikrobiyal özellikteki bileşikler ise günümüzde çoğunlukla gıda biyokoruyucusu olarak kullanılmaktadır. Cins olarak *Bacillus* ilk defa Cohn tarafından 1872 yılında tanımlanmıştır (Slem, 2010). *Bacillus* cinsinin tip türü ise *Bacillus subtilis* 'dir. Bu cins daha çok toprak ve toprakla ilişkili ekosistemlerden izole edilmektedir. Aynı zamanda bu habitatta yaşam süren canlı grupları yani bitki ve hayvanlardan da elde edilebilmektedir. *Bacillus* bakterilerin endüstri alanında kullanımı açısından tercih edilmelerinin birden fazla nedeni bulunmaktadır. Öncelikle cinsin enzim çeşitliliğinin oldukça zengin içerikte olması endüstride fazlasıyla tercih edilmesine neden olmaktadır.

Ayrıca termofilik, psikrofilik ve mezofilik türleri bulunduran *Bacillus* cinsi bakterilerde aktivasyon genel olarak 35-37°C sıcaklıkta, pH:7 civarında maksimum olarak gözlenir de bazı türler farklı ekstrem ekolojilerde de aktivasyon gösterebilmektedir.

Organik asit, alkol, şeker, amonyum içeriği fazla olan ortamlarda da üreyebilme yeteneğine sahiptirler. Çoğunlukla kemoototrof özellik göstermeleri bakımından besin ihtiyaçlarını karşılayabilmekte ve ortamdan besin istekleri minimum olmaktadır. Bu özelliklerle beraber *Bacillus* 'lar heterojen özellikte değildir ve kolayca kültüre alınabilmektedir.

İçerikleri bakımından endüstriyel kullanım alanlarında yüksek sıcaklık, farklı pH aralıkları, ortamın iyon konsantrasyonu gibi değişkenlere dayanıklı olan mikroorganizmalar günümüzde ekonomik üretimi sağlaması açısından daha çok tercih edilmektedir. Sayılmış temel özelliklerde, *Bacillus* cinsi bakterilerin endüstriyel çalışma alanlarında aranan mikroorganizma olduğunu göstermektedir.

Kullanılan ekstrem termofillerden elde edilen enzimlerin olumsuz koşullara dayanıklı olması endüstride ekstremofillere olan ilgiyi arttırmaktadır (Fukara, 2007).

Bacillus cinsine ait güncel tür listesi Çizelge 1.5'de verilmiştir.

Çizelge 1.5. *Bacillus* Tür Listesi

• <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>stercoris</i>
• <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>
• <i>B. vallismortis</i>
• <i>B. mojavensis</i>
• <i>B. atrophaeus</i>
• <i>B. amyloliquefaciens</i>
• <i>B. licheniformis</i>
• <i>B. pumilus</i>
• <i>B. firmus</i>
• <i>B. lentus</i>
• <i>B. sporothermodurans</i>
• <i>B. sonorensis</i>
• <i>B. psychrosaccharolyticus</i>
• <i>B. frigoritolerans</i>
• <i>B. muralis</i>
• <i>B. asahii</i>

1.3. Endüstride Enzimlerin Kullanım Alanları

Günümüzde enzimlerin hücre dışı aktivasyonlarından yararlanılarak; gıda, gıda analizi, ilaç, boya, temizlik malzemeleri üretimi ve kimya endüstrisinde, tıp, veterinerlik, biyoloji, biyoteknoloji çalışmalarında, deri ve deri işleme sanayisi, tarımda yem sanayinde kullanımı büyük oranda artış göstermektedir (Brzozowski, 1997). Aynı zamanda enzim faaliyetleri ile endüstride çalışmalar sırasında oluşan atık ve atık madde değerlendirilmesi gerçekleştirilebilmektedir. Bu yöntemler ile de atıkların neden olabileceği çevresel kirliliğinde önlenmesini sağlamaktadır.

Genel olarak amilaz ve diğer enzimlerin endüstride kullanım alanlarını işlevleriyle sınıflandıracak olursak;

1.3.1. Alkol Endüstrisi

Arpanın ezilmesi sonucu açığa çıkan özellikle amilaz ve proteaz enzimleri bira yapımında geçmiş yıllardan bu yana kullanılmaktadır. Amilaz ve proteaz gibi termostabil enzimler nişasta ve protein hidrolizinde kullanılmaktadır. Aynı zamanda farklı enzim faaliyetleri ile basit şeker formları da açığa çıkmaktadır. Hidroliz sonucu oluşmuş şekerler ortamda fermantasyona uğrayarak alkol oluşumu gerçekleştirilmektedir. Ham maddesi arpa olan bira üretimi gerçekleştirilirken de arpada bulunan nişasta yoğunluğunu azaltmak için α -amilaz enzimi kullanılmaktadır. Hidroliz sonucu oluşan ürünü mayalar etil alkol fermantasyonunu gerçekleştirmek için kullanılmaktadır (Wiseman, 1987). Proteaz enzimi ise aynı zamanda üretilen alkolün berraklaştırılmasında ve biranın muhafaza edildiği süre içinde korunup bulanıklığın önlenmesinde kullanılmaktadır.

1.3.2. Ekmek Endüstrisi

Fungus kaynaklı alfa amilaz enzimleri, ekmek yapımı sırasında ekmek hamurunun mayalanması ve hacminin artmasında görev almaktadır. Aynı zamanda ekmek hamuru iç yapısını değiştirerek kalite oranında da artış gözlenmektedir. Pişmiş ekmekte amilaz enzimi bayatlamayı önleyici etki göstermektedir. Ekmeğin bayatlama süresini uzatmak için amilaz enziminin yanı sıra glikozdan üretimi gerçekleştirilen fruktoz şurubu da ekmek ve pasta yapımında kullanılmaktadır. (Şimşek, 2006). Pentosanazlar ekmek üretiminde rutubet arttırarak hamurun hazırlanma süresini kısaltır ve hazırlarken uygulanan kuvveti azaltmaktadır.

1.3.3. Meyve Suları

Meyve suyu üretiminde selüloz enzimi berraklaştırma işlemlerinde kullanılmaktadır. Aynı zamanda amilaz enzimi faaliyeti sonucu açığa çıkan dekstrinlerden kıvam arttırma ve koyulaştırma işlemlerinde faydalanılmaktadır (Keskin, 1982).

1.3.4. Deri İşleme ve Deri Endüstrisi

Bakteriyel proteazlar, deride doku dışındaki proteinlerin temizlenmesinde kullanılmaktadır. Aynı zamanda deriden kılların ayrılması ve derinin yumuşatılması işlemlerinde de proteazlardan faydalanılmaktadır (Lindner ve Neuber, 1990; Karaboz ve ark., 2003). Amilaz enzimi ise dericilikte renklendirme işlemlerinde kullanılmaktadır.

1.3.5. Et Yumuşatma Endüstrisi

Etin pişirimi sırasında yumuşaması ve lezzetlenmesi için papain enzimi kullanılmaktadır (Özalpar,2019).

1.3.6. Kağıt Endüstrisi

Kağıda şekil verilmesi ve kaplanması sırasında amilaz enzimi kullanılmaktadır. Ksilenz enzimi kağıt hamurunu beyazlatmak amacıyla kullanılmaktadır. Selüloz enzimi ise kağıttan mürekkebin silinmesine yardımcı olmaktadır. Kağıttaki sertliği ve kaliteyi arttırmak için enzimlerden faydalanılmaktadır (Bruinenberg ve ark.,1996; Gupta ve ark., 2003).

1.3.7. Kauçuk Endüstrisi

Zehirli özellik gösteren hidrojen peroksitin parçalanarak su ve oksijene dönüşümünün gerçekleştirilmesi ve bu işlemler ile sünger ve kauçuk imalatı katalaz enzimi ile gerçekleştirilmektedir (Şahin,2023)

1.3.8. Fotoğraf Endüstrisi

Fotoğraf filmlerinin içindeki gümüşü elde etmek jelatin çözme işlemlerinde protez enzimi kullanılmaktadır (Yüksel, 2009).

1.3.9. Eczacılık

Sindirimi kolaylaştıran ilaçların temel maddesi proteinin parçalanması işleminde proteaz, nişastayı parçalamak için selülaz, yağları parçalamak için ise lipaz enzimi kullanılmaktadır (Kiliç, 2012).

1.3.10. Nişasta Endüstrisi

Amilaz enzimi nişasta hidrolizinde ilk aşamada dekstrin zincirlerinin elde edilmesinde kullanılmaktadır. Glikoamilaz ve izomeraz enzimleri ise son aşamada nişastadan glikoz ve fruktoz şurubu elde etmek için kullanılmaktadır. Karbonhidraz enzimi ise ucuz nişasta şurubunu pahalı olan şeker şurubuna dönüştürmektedir. İlk nişasta hidrolizi ve alt ürünlerin oluşturulması 1811 yılında gerçekleştirilmiştir ve bu tarihte uygulanan yöntem nişastaya asitle yapılan işlemle gerçekleştirilmiştir. Aynı yöntem kullanılarak 1831 yılında Amerika’da yaklaşık 115 litre şurup üretimi gerçekleştirilmiştir (BeMiller ve Whistler, 2009).

1.3.11. Deterjan Endüstrisi

Termostabil enzimler ortam koşullarında olumsuzluk yani sıcaklık pH (alkali) gibi değişkenler karşısında denatürasyonlara karşı direnç göstermektedir. Bu durum deterjan endüstrisinde kullanımlarını yaygınlaştırmıştır. Çamaşır makinesi deterjanı üretiminde amilaz enzimi sıvılaştırıcı olarak işlev göstermektedir. Deterjanlar pH bakımından yüksek alkali ve okside ortam koşullarında uygulama alanında olduklarından enzimlerin surfaktanlara karşı dirençli olması gerekmektedir. Metal iyon ajanlar ve proteazlar deterjan içeriğine eklenmektedir (Nielsen ve Borchert, 2000).

1.3.12. Yem Endüstrisi

Yem endüstrisinde termostabil amilaz, ksilanaz, β -glukanaz gibi enzimlerden faydalanılmaktadır. Kullanım amaçları yüksek sıcaklıkta faaliyet gösterebilmeleri ve hayvanların sindirim kanalı enzimlerini destekleyerek substrata etkisini kolaylaştırmaktır. Yem içeriğinde α -amilaz enziminin kullanılması ağırlık artışı, özellikle but ve göğüste deri ve yağ oran kalitesini arttırmak için uygun olmaktadır (Canoğulları, 1999).

1.3.13. Tekstil Endüstrisi

Tekstil üretim işlemlerinde hem çevresel etkileri, hem ürün kalitesine olan etkisi nedeniyle enzimlerden yaygın olarak faydalanılmaktadır. Tekstil sektöründe çoğunlukla oksidoredüktaz grubu enzimleri ve amilaz, selülaz, proteaz, lipaz, pektinaz gibi hidrolaz grubu enzimleri kullanılmaktadır.

Tekstil sektöründe kullanılan enzimler daha çok dokuma sırasında pamuk birleştirilmesi sırasında jelatin ile kaplama işlemlerinde kullanılmaktadır. Aynı zamanda liflerin işlenmesi ve terbiyesi, renklendirme aşamalarında da enzimlerden faydalanılmaktadır. Tekstil sektöründe kullanılan α -amilaz enzimleri su kaybını önleyici ve yüzey gerilimi düşürücü özellikte olan surfaktanlarla karışık bulunabildiği gibi saf olarak da bulunabilmektedir. Dokunmuş kumaşa nişasta fazlalığını uzaklaştırma işlemleri sırasında da α -amilaz enzimi kullanılmaktadır (Tarakçıoğlu, 1979).

1.3.14. Tarım Endüstrisi

Tarımda özellikle verimi arttırmak amacıyla ürünlerin büyük, gösterişli, kaliteli ve bol üretimi için mutlak elementlerin yanı sıra enzimlerden faydalanılmaktadır. Biyoteknolojik çalışmalarda da ıslah yöntemleri sonucunda üründe kalite ve verimin artırılması hedeflenmektedir. Yine kalitesiz bitkisel yağlardan daha kaliteli yağların elde edilmesi işlemlerinde selülozlu atıklar karbon kaynağı olarak kullanılmaktadır (Harlander,1992; Preist 1992).

1.4. Nişasta Hidroliz Enzimleri

1.4.1. Amilaz Enzimi ve Özellikleri

Amilaz enziminin tarihçesi nişastayı hidroliz edebilme özelliği gösteren enzimi 1811 de Kirchof'un keşfiyle başlamaktadır. Sonraki yıllarda ise Ohlsson malttaki nişasta sindirebilen enzimlerin enzimatik reaksiyonları sonucu oluşan ürünlere göre amilaz enziminin α -amilaz ve β -amilaz şeklinde sınıflandırmayı teklif etmiştir (Gupta ve ark., 2003). Ticari olarak kullanıma sunulan α -Amilaz enzimi ilk Japonya'da üretilmiştir. Bu üretim 1939 yılında gerçekleştirilmiş olup, üretimde *Bacillus subtilis* suşları kullanılmıştır (Syu ve Chen, 1997).

Amilaz enzimleri nişastayı parçalama işlevlerine göre farklı şekilde sınıflandırılmaktadır. Bu sınıflandırma α -amilazlar, β -amilazlar, amiloglikozidazlar, pullulanazlar, α -glukozidazlar ve CGT azlar olarak yapılmaktadır.

Glikoz birimlerinin bağlanarak oluşturduğu nişasta polimerindeki glikoz birimleri arasındaki glikozit bağlarına etki eden ve bu şekilde nişasta molekülünde katabolik etki gösteren enzim çeşitlerini başlıca dört grupta toplayabilir ve inceleyebiliriz:

1. Endoamilazlar (α -amilaz),
2. Ekzoamilazlar (β -amilaz, glukoamilaz),
3. Dallanma kırıcı enzimler (izoamilaz, pullulanaz),
4. Transferazlar (amilomaltaz, siklodekstrin glikoziltransferaz)

Endoamilazlar

Nişasta polimeri içindeki α -1,4 bağlarını kırarak nişasta yıkımını katalize etmektedirler ve reaksiyon sonucunda α -anomerik ürünler oluşmaktadır (Şekil 1.2.). Alfa-amilazlar endoamilazları temsil eden en önemli enzimlerin başında gelmektedir (Pandey ve ark., 2000).

Ekzoamilazlar

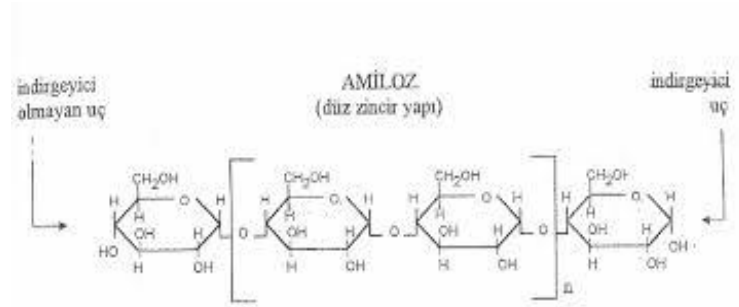
Nişasta polimerindeki α -1,4 veya α -1,6 bağlarını indirgeyici özellik göstermeyen uçtan (dış kısımdaki redükte olan uç) katabolik tepkimeyi gerçekleştirmektedir. Katabolik tepkime ile birlikte α - veya β -anomerik ürünler oluşturmaktadır (Şekil 1.4.).

Dallanma kırıcı enzimler

Nişasta polimerinde bulunan bağlardan yalnızca α -1,6 bağları üzerinde katabolik etki göstererek yıkım sonucunda uzun zincirli lineer moleküller oluşturur.

Transferazlar

Karşılıklı olarak glikoz monomerlerinden oluşan polimerlerin, birinin arasındaki glikozit bağlarından α -1,4 bağlarını ayırarak, diğerk molekülde yeni bir glikozit bağı oluşturmak için yer değışimini gerçekleştirmektedir (Yamagata ve Uda, 1994; Bertoldo ve Antranikian, 2002; Haki ve Rakshit, 2003).



Şekil 1.4. Amilozun kimyasal yapısı (Asi, 1996)

α -Amilazların aktivasyonunda optimum çalışması pH 2.0-12.0 aralığında değışkenlik gösterebilir (Odibo ve UlbrichHofmann, 2001; Kusuda ve ark., 2003; Moreira ve ark., 2004; Wanderley ve ark., 2004). Fakat α -Amilaz enzimleri genel çalışmasında ortalama pH 4.0-11.0 arasında stabil aktivasyon gösterebilmektedir. Bu açıdan değışlendirildiğinde ise amilaz enzimleri optimum çalışmasını daha çok nötr ortamlarda gösteren enzim grubudur. Genellikle de pH 5.0-7.5 aralığında optimum bir çalışma göstermektedir. Endüstriyel alanda deterjan üretiminde kullanılan amilazlar daha çok pH 8.0-11.0 aralığında optimum çalışabilmektedir. Amilaz enzimlerinin yanı sıra deterjan üretiminde; proteazlar, lipazlar, oksidazlar, peroksidazlar ve selüloz enzimleri de kullanılmaktadır (Pandey ve ark., 2000; Reddy, 2003). Deterjan üretiminde görev alan amilaz

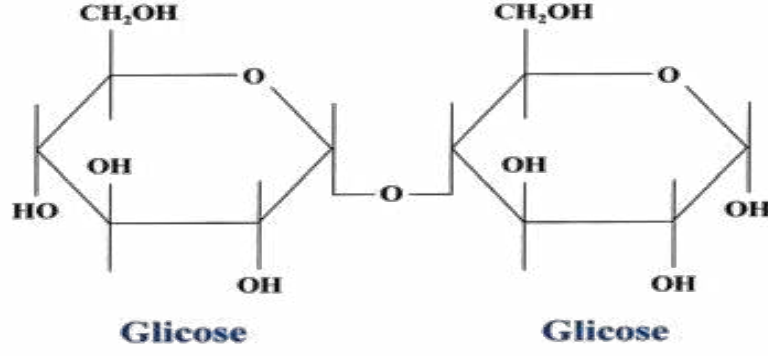
enzimleri alkalifik *Bacillus* türlerinden elde edilebilmektedir. Endüstride kullanım olarak amilaz enzimlerinin deterjan üretiminin yanı sıra aynı zamanda bira yapımı ve damıtma yöntemi ile içki üretiminde, çikolata üretiminde, tahıl ürünleri işleme gibi alanlarda kullanım alanlarının oldukça yaygın olduğu görülmektedir (Loffler, 1986). Endüstriyel kapsamda kullanım alanı oldukça fazla yer kaplayan amilaz enzimleri genel anlamda birçok alanda etkili şekilde kullanılmaktadır. Glikoz, fruktoz üretimi, nişasta sıvılaştırılması, ekmek üretimi, alkol üretimi, tekstil alanında nişasta kirliliğini ortadan kaldırma işlemleri de bu kullanım alanlarına örnek olarak verilebilmektedir (Igarashi ve ark., 1998; Uhlig, 1998).

1.4.2. α -Amilazlar

α -Amilazlar endoamilaz grubunda sınıflandırılan ve nişasta, glikojen gibi karbonhidrat polimerlerinde bulunan α -1,4 glikozit bağlarının yıkımını gerçekleştiren enzimlerdir. α -Amilaz enzimleri, glikoz monomerlerinin uzun zincirleri ile oluşan amiloz molekülünün içindeki glikoz monomerleri arasındaki 1,4- α -D-glikozidik bağlarını hidroliz edebilen ekstraselüler çalışma gösteren enzimlerdendir (Aquino ve ark., 2003; Moreira ve ark., 2004).

α -Amilaz enzimleri kararlılık, bütünlük aktivasyonu için kalsiyum iyonlarına ihtiyaç duymaktadır. Kalsiyum iyon içerikleri nedeniyle metal içerikli enzimler olarak da adlandırılmaktadır. α -Amilazların endüstriyel alanda geniş alanda kullanımına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle dünyada α -amilazların üretimi diğer enzimlere oranla %30'u bulmaktadır. Genel olarak bakıldığında α -amilazlar hayvan, bitki, fungus, maya gibi canlılardan elde edilebilir olsa da, daha çok fungus, maya ve bakteriler tercih edilmektedir. Bu canlılardan bakteri ve fungus üyelerinden elde edilen amilaz enzimlerinin asidik veya alkali ortamlarda optimum pH'ları değişkenlik gösterebilmektedir. Bu özellikleri de dikkate alınarak endüstride kullanım açısından daha çok bakteriyel enzimler yaygınlık göstermektedir. Endüstriyel alanda yaygın kullanım alanına sahip olan başlıca türler;

Bacillus sp. ve *Aspergillus* sp. türleridir. *B. licheniformis* ve *B. amyloliquefaciens* olarak adlandırılan türler *Bacillus* sp. türlerine örnek verilebilir (Gupta ve ark., 2003). α -Amilaz enzimleri, suda çözünürlüğü arttıracak ve viskoziteyi azaltacak yönde işleminden geçirilmiş, özellikleri istenen yönde değiştirilmiş olan nişasta kullanılarak analiz edilmektedir. α -Amilaz aktivitesi (Şekil 1.5) ise nişasta molekülü ile çeşitli metotlar kullanılarak tayin edilebilmektedir. Nişasta karışımına ait akıcılığın değişkenliğinin incelenmesi, nişasta karışımına ait renk değişiminin kontrolü, indirgen özellikte olan redukte şekerlerin ortamdaki artışı, nişasta iyot renk yoğunluğundaki değişkenlik gibi faktörleri amilaz aktivitesi tayin yöntemleri arasında sayılabilmektedir (Bernfeld, 1955; Gupta ve ark., 2003).



Şekil 1.5. Alfa Amilaz Enzimi aktivitesi (Brad Smith,2021)

β-Amilazlar

β-Amilaz enzimi genellikle bitkilerden köken alan bir enzim çeşididir ve maltohidrolaz olarak adlandırılmaktadır. Bitki orijinli olsa da mikroorganizmalardan da elde edilebilmektedir. Amiloz, amilopektin ve glikojen gibi moleküllerin indirgen özellik göstermeyen uçlarına etki gösterirler ve aktivasyonunu bu moleküllerin redükte olmayan ucundan başlatıp hidrolizlerini gerçekleştiren ekzoamilaz enzimdir. β-Amilazlar nişasta molekülünün dış tarafında bulunan 1,4 bağlarına etki göstermektedir. Bu dış etkiden dolayı ekzoamilaz olarak adlandırılmaktadır. β-Amilazlar, nişasta molekülüne etki ederek, içeriğindeki glikoz birimlerini birleştiren glikozit bağlarının yıkımını gerçekleştirmektedir. Bu yıkım sonucunda β anomerik formu olan maltoz molekülü oluşturmaktadır. β-Amilaz dallanma özelliği gösteren ve α-1,6-glikozidik bağlarından oluşan amilopektin polimerine tamamen etki edemez. Böylece sınır dekstrinler oluşturmaktadır. Bu nedenle hidroliz sonucunda %50-60 oranında maltoz oluşumu ile dekstrin oluşumu görülmektedir. β-Amilazı sentezleyen mikroorganizmalar arasında *Clostridium* sp. (anaerobik), *Pseudomonas* sp. (aerobik) ve *Bacillus* sp. türlerine ait suşlar, *Streptomyces* sp. gibi filament oluşturan ve spor oluşturabilen suşlar ile *Rhizopus* sp. gibi fungal suşlar örnek olarak gösterilebilmektedir (Ha ve ark., 2001; Gupta ve ark., 2003).

Pullulanazlar

Pullulanazlar bulundukları ortamda glikoz ve maltoz verimini arttırmaktadır. Bu artış etki ettikleri molekülün α-1,6 bağlarına hidrolitik etki göstermelerinden kaynaklanmaktadır. Moleküle özgü aktivite göstermeleri sınır dekstrinaz olarak adlandırılmalarına neden olmaktadır (Ulutürk ve ark., 2011).

Amiloglikozidazlar (Glikoamilazlar)

Nişasta zincirinin dış kısmına etki gösteren, glikozları ayırarak etki gösteren ekzoenzimdir. Ürün olarak sadece glikoz elde edilmektedir. Oluşan ürünün tek olması amiloglikozidazların α- ve

β -amilazdan ayıran temel özelliktir. α -1,4 ve α -1,6 bağlarına etki göstermektedir (Coral ve ark., 2000).

α -Glukozidazlar, CGTazlar (Siklodekstrin glukanoferaz)

Kısa zincirli oligosakkaritlere etki gösterebilen enzimlerdir. Aynı zamanda oligosakkaritlerin α -1,4 bağlarını hidroliz etmekte ve glikoz monomerlerinin oluşumunu sağlamaktadır (Aiyer, 2005). Nişastayı, siklodekstrin olarak adlandırılan, 6,7 veya 8 glikoz birimlerinden oluşan siklik D-glikozil birimlerini oluşturan enzimlerdir. *Bacillus macerans* bakterisine ait amilazlar CGTazlara örnek verilebilir (Aiyer, 2005).

1.4.3. Sıcaklığa Dirençli α -Amilazlar ve Termofil Mikroorganizmalar

Ekstrem koşullarda yaşam sürebilen mikroorganizmalar ile yapılan çalışmalar son zamanlarda büyük oranda artış göstermektedir. Ekstremofil mikroorganizmalardan ise en çok tercih edileni ise termofil mikroorganizmalar olarak görülmektedir. Termofilik mikroorganizmaların sahip oldukları biyokatalitik özellikleri ve enzimlerin aktivasyonu ile ilgili fazla sayıda çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Gomes ve Steiner, 2004).

Çalışmalarda termofil mikroorganizmaların tercih edilmesindeki önemli faktörler arasında; mezofil mikroorganizmalara göre üreme hızlarının daha yüksek olması, biyostabil özelliklerinden dolayı son ürün gözlenmesindeki kolaylık, sıcaklığında etkisiyle daha hızlı reaksiyon katalizleme, nişasta, selüloz gibi polisakkaritleri doğrudan fermente edebilme özellikleri sayılabilmektedir.

Stabilite kavramı ekstrem koşullar altında belirlenen bir özelliğin korunması olarak tanımlanmaktadır (Jaenicke ve Böhm, 1998; Jaenicke, 2000). Genel anlamda stabilite dayanıklılık, sağlamlık ve kararlılıktır. Termostabilite kavramında da geneli enzim aktivasyon kaynaklı olan modifikasyonların oluşumu ve bu modifikasyonların kazandırdığı özellikler olarak adlandırılabilir (Scandurra ve ark. 1998). Koşulların ekstrem olarak belirlendiği ortamlarda gerçekleştirilen adaptasyondaki asıl mekanizmanın, moleküllerdeki fonksiyonel içeriğin korunup, esneklik ve stabilite arasında uyum gerçekleştirilmesiyle oluştuğu gözlenmektedir (Tsou, 1998).

Termofilik mikroorganizmaların yaşam yerleri daha çok volkanik yanardağlar, kaplıca gibi jeotermal kaynaklar, deniz dibi gibi sıcak su kaynağı oluşumu görülen bölgeler olarak görülmektedir. Optimum aktivasyonu 50-60°C'de olanlar ılımlı termofil olarak adlandırılırken, 60-80°C'de optimum aktivasyon gösterebilenler ekstrem termofiller olarak adlandırılmaktadır. 80-110°C'de optimum aktivasyon gösterebilenler ise hipertermofiller olarak adlandırılmaktadır. *Bacillus*, *Clostridium*, *Thermoanaerobacter*, *Thermus*, *Fervidobacterium*, *Thermotoga* ve *Aquifex* cinsleri ekstrem termofillere örnek oluşturabilirken, *Aquifex* ve *Thermotoga* cinsi bakteriler ile arkea bakterilerden; *Desulfurococcus*, *Sulfolobus*, *Pyrodictium*, *Pyrobaculum*, *Thermoproteus*, *Methanopyrus*, *Pyrococcus*, *Thermococcus*, *Methanococcus* ve *Archaeoglobus* hipertermofillere örnek olarak verilebilmektedir (Brock, 1978).

Termofil mikroorganizmalarda termostabil mekanizmaları özellikle taşıdıkları özel enzimlerden (süper DNA sarmalları oluşmasına neden olan ters giraz (reverse gyrase) enzimleri) kaynaklanmaktadır. Ayrıca enzimatik mekanizmaları sayesinde yüksek sıcaklık haricinde proteazlar ve diğer organik çözücülerin denatürasyon etkilerine karşı daha dayanıklı olmaktadır (Lopez, 1999; Kumar ve Nussinov, 2001).

Hücre içindeki aktivasyonunu yanı sıra canlı dışında da faaliyet göstermeleri enzimlere endüstride daha çok ihtiyaç olduğunu göstermektedir. Nişasta hidrolizinde kullanılan enzimlerin sıcaklığa dirençli yani termostabil özellikte olması pek çok biyoteknolojik çalışmalarda tercih edilmektedir. Örneğin termostabil olarak tanımlanan nişasta hidrolizinden sorumlu olan amilaz, glikoamilaz, pullulanaz gibi enzimler gıda, kimya ve farmakoloji alanında çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır. Termostabil enzimler biyoteknolojik açıdan da büyük işlevlere sahiptir. Çünkü yüksek sıcaklıktaki biyoteknolojik işlemlerde çalışma sırasında avantaj sağlamaktadır. Örnek olarak düşük çözünürlüğe sahip bileşiklerde çözünmeyi arttırmak için sıcaklığın artırılması enzimin denatüre olmadan reaksiyon hızını artırarak çalışmasını devam ettirmektedir. Yüksek sıcaklık tepkimeyi daha da hızlandırdığı gibi ortamdan kaynaklı kontaminasyon riskini de minimal düzeye indirgemektedir. Termofil özellik gösteren enzimlerin, faaliyet mekanizmaları mezofil özellikteki enzimlere benzerlik göstermektedir (Adams, 1993; Danson ve Hough, 1998).

Termostabil amilaz enzimlerini elde etme kaynağı olarak, termofilik ve mezofilik bakteriler ve funguslar gibi mikroorganizmalar gösterilmektedir. Termostabil enzimlerden nişasta polisakkaritini parçalayabilen ve zincirlerine kadar ayrıştırabilen amilaz enzimi gibi glikoamilaz ve pullulanaz olarak adlandırılan enzimlerde endüstriyel alanda kimya, gıda ve farmakolojide ürün elde etmek üzere kullanılmaktadır. Enzim üretimini arttırmak amacıyla biyoteknolojik uygulamalar gerçekleştirilerek mikroorganizmalar arasında gen transferleri gerçekleştirilmektedir. Bu sayede mezofil mikroorganizmalarda amilolitik enzimleri kodlayan genlerin faaliyeti ile termostabil özellikteki enzimlerin üretiminde artış gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda ise endüstride çalışma alanında kullanılacak termostabil enzimlerin miktarı artırılmış olup aynı zamanda istenen üründe de verim elde edilmektedir. Ilık sıcaklıkları seven mikroorganizmalarda üretilen termostabil enzimler konak hücre proteolizisine karşı dayanıklı olmasına rağmen denatürasyon ile konak hücre enzimlerinden kolaylıkla ayrılabilir özellik göstermektedir.

1.5. Çalışmanın Amacı ve Kapsamı

Bu çalışmanın amacı, öncelikle Çukurova Üniversitesi kampüs alanı içinde farklı lokasyonlardan alinantoprak örneklerindeki *Bacillus* sp.'lerin ilk aşamada izolasyonunun gerçekleştirilmesi, sonrasında sıcaklığa direnç çalışması yapılarak α -amilaz üreten suşların belirlenmesi ve sıcaklığa karşı direnç gösteren α -amilaz enzimlerinin optimum aktive gösterebildiği pH, enzim substrat aktivasyonu, sıcaklık, enzim iyon aktivasyonu gibi özellikleri yönünden karakterizasyonunun yapılmasıdır.

Bu tez çalışmasının kapsamı ise aşağıda maddeler halinde verilmiştir:

- 1- Bakterilerin izolasyonu için toprak örneklerinin toplanması,
- 2- Toprak örneklerinin 80°C sıcaklıkta pastörize edilerek vejetatif hücrelerin öldürülmesi,
- 3-Aerobik ortamda *Bacillus* suşlarının çimlendirilerek vejetatif forma dönüştürülmesi
- 4- İzolatların nişasta içeren agar besiyerlerinde α -amilaz aktivite durumlarının belirlenmesi,
- 5- α -Amilaz üreten izolatların antibiyogram analizleri,
- 6- α -Amilaz enzimlerinin optimum sıcaklık, optimum pH, sıcaklık derenci, zamana göre enzim aktivitesi, bazı metal iyonlarının enzim aktiviteleri üzerine etkisi gibi bazı özelliklerinin belirlenmesi,
- 7- İzolatlara ait hücre dışı proteinlerin SDS-PAGE analizi,
- 8- Tezin yazılması ve sunumu.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Silaban ve ark. (2018), yaptıkları çalışmada amilaz enzimleri üretme potansiyeline sahip pirinç toprağı örneklerinden amilolitik bakterilerin izolasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar BernField (1955) yöntemi ile amilaz aktivitesini belirlemişlerdir. Makroskobik ve mikroskobik olarak karakterize ettikleri 14 adet izolatın amilaz enzimlerini üretme potansiyeline sahip olduklarını bildirmişlerdir.

Alariya ve ark. (2013), yaptıkları çalışmalarında, çeşitli toprak ve atık maddelerden bakterilerin izolasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar izolatların optimum gelişme sıcaklığını 35-40°C, pH değerini ise 7.0 olduğunu, maksimum üremenin ise %1 dekstroz konsantrasyonunda gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Son olarak araştırmacılar izolatlar için diğer optimum parametreler arasında nitrojen kaynağı olarak maya ekstraktı, klorür olarak kalsiyum klorür ve amilaz üretimi için sülfat kaynağı olarak manganez sülfat bulunduğunu belirtmişlerdir.

Panneerselvam ve Elavarasi (2015), bahçe toprağından izole ettikleri *Bacillus subtilis* suşunun, yapısal olarak polisakkaritleri hidrolize etme yetenekleri açısından test etmişlerdir. Araştırmacılar izolatın en iyi 37°C'de ve %2 nişasta konsantrasyonunda, nötre yakın pH koşullarında en iyi gelişimi gösterdiğini bildirmişlerdir.

Rehman ve Saeed (2015), Karaçi, Pakistan'ın farklı bölgelerinden topladıkları toprak örneklerinden 89 farklı bakterinin izolasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar morfolojik ve biyokimyasal tanımlama ile 39 izolatın *Bacillus* cinsine ait olduğunu belirlemişlerdir. Bu izolatlardan amilaz üretenlerden 5 tanesini ileri araştırmalar için belirlemişler, bu 5 izolat arasından da as-2'nin 3179.62 IU/ml min değeri ile en yüksek enzim üreten izolat olduğunu bildirmişlerdir.

Singh ve Kumari (2016), yaptıkları çalışmalarında muz, patates, şeker kamışı tarlalarından topladıkları toprak numunelerinden amilaz aktivitesine sahip bakterilerin izolasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar 35-45°C arasındaki farklı sıcaklıklarda gösterilen amilaz aktivitesinin 0,992 U/ml'den 0,545 U/ml'ye kademeli olarak azaldığını, maksimum amilaz aktivitesinin pH 7.0'de gözlemledikleri amilaz aktivitesinin pH 5.0'da 0,910 U/ml, pH 10.0'da ise 0,089 U/ml olduğunu bildirmişlerdir.

Padhiar ve Kommu (2016), çalışmada amilaz üreten suşları izole etmek için farklı kaynaklardan toprak örnekleri toplamışlardır. Tüm izolatları nişasta agar plak yöntemi ile amilolitik aktivitelere göre taramışlardır. Amilolitik aktivite gösteren toplam 20 bakteri suşunu izole etmişlerdir. Sıcaklık, pH, farklı karbon ve nitrojen kaynakları, metal tuzları ve smf kullanarak ortamın farklı substrat konsantrasyonları etkilerini optimize etmişlerdir. Maksimum enzim üretimini sıcaklık 40°C'de ve pH 7.0'de 72 saat inkübasyondan sonra olduğunu, en iyi amilaz üretiminin çeşitli karbon ve azot kaynakları arasında %1 glikoz ve %1 tripton varlığında, substrat olarak ise %5 nişasta içeren ortamda gerçekleştiğini bildirmişlerdir,

Islam (2016), 17 tanesi amilaz üreten toplam 48 adet bakteriyi topraktan izole etmiştir. Araştırmacı amilaz zon çaplarını göz önünde bulundurarak yüksek amilaz aktivitesine sahip 2 adet izolatu ileri çalışmalar için belirlemiştir. Araştırmacı gram boyama ve spor boyaması ile izolatların gram pozitif, çubuk şeklinde, tek başına ve zincirler halinde düzenlendiğini ve endosporlar oluşturduğunu, 16S rRNA sekans analizi ile 14 izolatın *Bacillus* cinsine ait olduğunu, filogenetik ağaç ile de *Bacillus cereus* türüne ait olduklarını bildirmiştir. Son olarak araştırmacı enzim için optimum sıcaklık ve pH koşullarının sırasıyla 75°C ve 7.0 olduğunu bildirmiştir.

Behailu ve Abebe (2018), çalışmada atık olarak meyve kabuğu içeren toprak örneklerinden toplamda 89 mantar izolatu elde etmişlerdir. İzolatların amilaz üretim potansiyellerini nişasta agar ortamında belirlemişler, en yüksek amilaz üretimi gerçekleştiren izolatın da *Aspergillus niger* olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca amilaz üretiminin en iyi pH 6.0'da ve 45°C sıcaklık koşullarında gerçekleştiğini, maksimum amilaz üretiminin ise inkübasyon periyodunun 3. gününde olduğunu, bunu da sırayla 4., 5. ve 6. günlerin takip ettiğini bildirmişlerdir.

Mankar ve Barate (2018), yaptıkları çalışmada mutfak atıkları ve tarımsal atıkların bulunduğu toprak örneklerinden 29 tanesi amilaz aktivitesine sahip toplam 65 izolatu izole ettiklerini, amilaz üreten bu 29 izolatdan 10 tanesinin belirgin aktivite gösterdiğini, yüksek aktivasyonlu izolatların çoğunun *Bacillus* cinsine ait olduğunu, bu cinsin haricinde izolatların arasında *Pseudomonas* spp., *Serratia marcesens* ve *Staphylococcus aureus* türlerinin de olduğunu bildirmişlerdir.

Luang-In ve ark. (2019), yaptıkları çalışmalarında Tayland'ın Mahasarakham Eyaleti, Kantarawichai Bölgesinde bulunan Nasinuan Ormanı'ndan amilaz enzimi üreten bakterileri izole ve karakterize etmişlerdir. Araştırmacılar amilaz üretici 13 izolatın 16S rRNA sekans analizini yapmışlar, bu analiz sonucuna göre 12 izolatın gram pozitif *Bacillus* spp. diğerinin ise Gram negatif, çubuk şekilli *Enterobacter cloacae* olduğunu bildirmişlerdir. Sonuç olarak 2. günde en yüksek spesifik aktiviteyi gösteren *Bacillus cereus* sp. suşunu 3,5 AL1>1,4 AL3 olarak belirlemişlerdir. Dolayısıyla 2 günlük enzim indüksiyonunu ileri analiz için seçmişlerdir. *Bacillus* sp. suşunun 3,5 AL2' nin 0,05 M'de %1 nişasta ile PBS tampon çözeltisinde 30 dakika inkübasyon sonrasında 60°C ve PH 7,0 deki optimum koşullarda en yüksek spesifik amilaz aktivitesi gerçekleştiğini gözlemlemişlerdir.

Yiğit ve Koca (2011), çalışmalarında hayvanlarda büyüme hızı ve verim gücünün aldıkları yem ile doğru orantılı olduğunu gözlemlemişlerdir. Yem içeriğindeki amilazın, özellikle genç hayvanlarda nişasta hidrolizini kolaylaştırdığını ve bu etkin parçalanmadan hayvanların besin içeriğinden faydalama yönünden olumlu etkilendiğini belirtmişlerdir. Bu nedenle son yıllarda, yem katkı maddelerinden olan enzimlerin, yemden yararlanmayı arttırmak için hayvansal üretimde kullanımının giderek yaygınlaştığını belirtmişlerdir.

Kutlu ve Özen (2009), yüksek verimli hayvanların çok sayıda besin maddesine ihtiyaç duyduklarını ve bu gereksinimin bir iki yemle karşılanamayacağını belirtmişlerdir. Hayvanlara verilen yem açısından oran ve dengenin mutlaka dikkate alınması gerektiğini öne sürmüşlerdir. Et,

süt, yumurta artışıındaki faktörlerin ise sadece genetiksel özellik olmadığını aynı zamanda hayvan beslenmesinde özellikle yem ve yem teknolojisindeki artan çalışmalardan kaynaklandığını belirtmişlerdir. Yemdeki amilaz etkinliği sonucu oluşan ürünlerin, hastalık yapıcı patojen bakterilerin hücre duvarına tutunarak bağırsak iç yüzeyine tutunmasına engel olduğunu belirtmişlerdir.

Tatar (2007), yaptığı çalışmasında haloalkalofilik ve termofilik *Bacillus* sp. suşlarından termostabil amilaz enzimi izolasyonu ve karakterizasyonunu gerçekleştirmiştir. Araştırmacı, bakterilerin, 20-60°C aralıklarında üreme gösterdiğini, enzim sentezinin ise 20-55°C aralıklarında gerçekleştiğini bildirmiştir. Ayrıca, araştırmacı bakterilerin 7,0-12,5 pH aralığında üreme ve enzim sentezi gerçekleştirebildiğini, optimum üreme ve sentezin ise 8,5 pH ve 55°C sıcaklık koşullarında gerçekleştiğini belirtmiştir. Son olarak, araştırmacı enzimin deterjanlara dirençli, halofil, ekstrem alkalofili pH stabil, ultratermofil, indüklenebilir termostabil özellik gösterdiğini, bu özellikleri ile enzimini nişasta sıvılaştırılmasında ve tekstil endüstrisinde kullanım alanı bulabileceğini de bildirmiştir.

Baltaş (2012), çalışmasında termofilik *Anoxybacillus gonensis* bakterisinin Z4 suşundan ekstraselüler amilaz enzimini jel filtrasyon kromatografisi kullanarak saflaştırmış ve karakterize etmiştir. Araştırmacı enzimin optimum aktivitesini 5.5-10.6 pH aralığında ve 70°C sıcaklık koşullarında gösterdiğini, 10 gün sonunda aktivitesini +4°C’de tamamını, 70°C’de %65’ini, 90°C’de ise %43’ünü koruyabildiğini bildirmiştir.

Başkurt (2012), çalışmasında *Bacillus* sp. suşunun amilaz üretimini etkileyen bazı fiziksel faktörlerin etkisini araştırmıştır. Optimum pH, optimum sıcaklık, çalkalama, inokulum miktarı, inokulum yaşı gibi birtakım fiziksel parametreleri araştırdığı çalışmasında araştırmacı, *Bacillus* sp. suşunun maksimum amilaz üretimini, nişasta ortamında 37°C sıcaklık ve 7.0 pH’da, 150 rpm çalkalama, %2.5 inokülasyon miktarında ve 2 gün süren üreme periyodunda optimum düzeyde gerçekleştirdiğini bildirmiştir.

Aygan (2008), çalışmasında Van Gölü’nden izole ettiği haloalkalofil *Bacillus* sp. suşları tarafından üretilen amilaz, selülaz ve ksilanaz enzimlerinin izolasyonunu ve suşların üreme, enzim üretme yeteneği, aktivite gösterdikleri optimum sıcaklık, pH, NaCl konsantrasyonu gibi karakterizasyonlarını gerçekleştirmişlerdir. Suşlardan bazılarının optimum aktivitesini 150°C’de ve pH 10,5’da, bazılarının ise 40-50°C’de ve 5.0-11.0 pH aralığında gösterdiğini bildirmiştir. Araştırmacı elde ettiği bulgulara dayanarak amilaz enziminin nişastanın sıvılaştırılması ve tekstil endüstrisinde nişastanın uzaklaştırılmasında kullanılabilecek potansiyele sahip olduğunu da belirtmiştir.

Fernandez ve ark. (2001), yaptıkları çalışmalarında seyrek bulunan balık türlerinde, bağırsaklarında bulunan amilaz aktivitesini ölçmüş ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Çalışmayı aynı kıyı sularında bulunan beş Akdeniz Sparid türü üzerinde gerçekleştirmişlerdir. PAGE, zimgram analizi ve IEF kullanılarak yaptıkları çalışmada amilaz aktivitesi farklılıkları

olduğunu ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar gözlenen amilaz etkinliğinde ki farklılığın daha çok incelenen balıklarda beslenme alışkanlıkları ile ilişkili olduğunu, ayrıca çeşitli amilaz etkinliğine sahip türler için ekolojik avantaj oluşturabileceğini de belirtmişlerdir.

Kumar ve ark. (2006), 60 gün süren çalışmalarında eksojen amilaz katkılı veya katkısız olan hem jelatinleştirilmiş hem de jelatinize edilmemiş mısırın kuru madde sindirilebilirliği, sindirim enzimleri ve doku glikojen içeriği üzerindeki etkilerini belirlemeyi amaçlamışlardır. Araştırmacılar, elde ettikleri sonuçlarda hepatosomatik indeks karaciğer, glikojen ve jelatinleştirilmiş nişasta ile beslenen grupların intestinal amilaz aktivitesini, jelatinleştirilmemiş mısırla beslenen gruplara göre önemli ölçüde daha yüksek olduğunu, bununla birlikte gastrosomatik indeks, kas glikojeni ve bağırsak proteaz aktivitesi için ters eğilim oluştuğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, araştırmacılar 50 mg amilaz yem ilavesinin, jelatinleştirilmiş mısırla beslenen gruplara veya 100/150 mg amilaz yemle takviye edilmiş jelatinize edilmemiş mısıra benzer şekilde, jelatinize edilmemiş nişasta ile beslenen grupların kuru madde sindirilebilirliğini geliştirdiğini, karaciğer ve bağırsağın proteaz aktivitesini daha yüksek ham proteinle beslenen gruplarda en yüksekte, fakat bağırsağın proteaz aktivitesini amilaz takviyeli gruplarda önemli ölçüde daha yüksek olarak gözlemlediklerini de bildirmişlerdir.

Igarashi ve ark. (1998), alkalifilik özellik gösteren *Bacillus* türlerine ait izolasyonları yapmışlardır ve izole ettikleri türler ile çalışma yaparak alkali izoamilaz, alkali dirençli neopullulanaz ve yüksek alkali olan pullulanaz gibi bazı enzimlerin karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Karakterize ettikleri enzimlerin α -amilaz ile çalışma koşullarını belirtmişlerdir. Aynı enzimler ve α -amilazın endüstride kullanım alanlarını değerlendirmişlerdir. İzole ettikleri amilaz enziminde optimum sıcaklığı 55°C, optimum pH'ı ise 8.0-8.5 olarak belirlemişlerdir.

Kim ve ark. (1995), alkalifilik özellikteki *Bacillus* sp. suşundan belirli koşulları baz alarak alfa-amilaz üretimini gerçekleştirmişlerdir. α -amilaz üretimi için pH 11.0-12.0 aralığını tercih etmişlerdir. Bu aralıkta en iyi aktivite gösteren 3 glikoz molekülünden oluşan, maltotrioz olarak adlandırılan bir trisakkarit çeşidi üreten alkali α -amilaz üretimini gerçekleştirmişlerdir.

Sidhu ve ark. (1997), *Bacillus* sp. suşu üzerinde yaptıkları genetik çalışmalarda termostabil enzim üretimi ve verimini arttırmayı amaçlamışlardır. Çalışmalarında mutasyon sürecini etil metan sülfanat kullanarak üründe verim artışını sağladıklarını bildirmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Bakteriler

Çalışmada kullanılan *Bacillus* sp. SD-1, SD-2 ve SD-3 bakteri suşları, Adana ili Çukurova Üniversitesi Kampüs alanı içinden toplanan toprak örneklerinden bu çalışma kapsamında izole edilmiştir.

3.1.2. Kimyasal ve Diğer Sarf Malzemeler

Çalışma için kullanılması gereken kimyasallar ve diğer malzemeler aksi belirtilmedikçe Merc, Sigma, Ambresco'dan kimyasal malzeme satan firmalar aracılığı ile temin edilmiştir.

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Aletler

Çalışma için kullanılan aletler santrifüj (Hettich), otoklav (Hirayama), inkübatörler (Nüve ve Memmert), su banyosu (Memmert), spektrofotometre (Pharmacia), hassas terazi (Denver), vorteks ve manyetik karıştırıcı (Ika), steril kabin (Nuair), buzdolabı (Arçelik), çalkalayıcı (Ika), pHmetre (Hanna), protein jel elektroforez takımı ve güç kaynağı (Atto), otomatik pipetler (Brand ve Axygen) çalışmanın yürütüldüğü Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootehni Bölümü Hayvansal Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Laboratuvarı'nda mevcut bulunmaktadır.

3.2. Metot

3.2.1. Bakterilerin İzolasyonu

Bakterilerin izolasyonu için kullanılan toprak örnekleri, öncesinde sterilizasyonu gerçekleştirilmiş olan numune kaplarına alınmış ve kapların ağzı kapalı bir şekilde laboratuvara taşınmıştır. Laboratuvara belirtildiği şekilde getirilmiş olan toprak örnekleri önce steril saf su ile sulandırılarak iyice karıştırılmış, karıştırma sonrasında çökme işleminin gerçekleşmesi için yarım saat beklendikten sonra üstte kalan sıvı kısımdan 1 ml numune alınmıştır. Alınan sıvı numune 85°C'de 15 dakika inkübe edilerek vejetatif bakterilerin ölmesi sağlanmıştır. Daha sonra alınan numuneler, termofilik *Bacillus* sporlarının çimlenmesi için 25 ml hacimli LB besiyerine (%10 w/v tripton, %5 w/v maya özütü, %10 w/v NaCl, pH 7.5) aktararak 55°C'de çalkalama yöntemiyle 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün bakterilerin üremesinin gözlendiği kültür sıvısından alınarak seri sulandırmalar yapılmıştır. 10^{-4} - 10^{-6} oranlarında sulandırılmış olan numunelerden 100'er µl alınarak cam çubukla (drigalski spatülü) yayma tekniği ile LB-nişasta-agar (%0.5 w/v çözünür nişasta, %1.5 w/v agar) plaklarına ekimleri gerçekleştirilmiştir. 55°C sıcaklığa ayarlanmış inkübatöre ekimleri yapılan plaklar ters çevrilerek yerleştirilmiş ve 24 saat süreyle bakterilerin koloni oluşturmaları sağlanmıştır. Ertesi gün kültür ortamında gelişen bakteri kolonileri steril kürdan kullanılarak toplanmış ve numaralandırılmış olan LB-agar plaklarına ikişer kopya

olacak şekilde aktarılmıştır. Bakterilerin üremesi için plaklar 55°C’de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işleminin ardından daha sonra gerçekleştirilecek araştırmalar ve çalışmalar için parafilm ile sarılarak +4°C sıcaklığa sahip ortama alınmıştır.

3.2.2. İzolatlarda alfa-amilaz aktivitelerinin belirlenmesi

Koloni gelişimi gerçekleşen ve her bir izolatın ikişer adet ekildiği plaklardan birer tanesi alınmış ve petri kapağına birkaç parça iyot kristali ezilmiştir. Bakterilerin bulunduğu agar taşıyan petri ise kapağın üzerine kapatılmış ve 3-5 dk oda sıcaklığında beklenerek iyot buharının besiyerindeki nişastayı maviye boyaması sağlanmıştır. Maviye boyanan agar zemininde etrafında beyazımtırak zon olan izolatlar α -amilaz pozitif bakteriler olarak belirlenmiştir. Bu bakterilerin numaraları not edilerek, iyot ile boyanmamış olan kopya petri kabından aynı numarayı taşıyan bakteriler alınmıştır. α -amilaz pozitif olduğu belirlenen bu bakterilerin hem master hem de gliserol stokları hazırlanmıştır. Master plaklar her bir bakteri için ayrı olacak şekilde, LB-nişasta-agar plaklarında koloniler tek tek düşecek şekilde hazırlanmış ve +4°C’de muhafaza edilmiştir. Çalışmalarda bakteriler bu master plaklardan tek koloni olacak şekilde alınarak çoğaltılmış ve kullanılmıştır. Gliserol stok için, tek koloniden ekilerek LB-sıvı besiyeri yerinde üremiş olan bakterilerden steril gliserol içerisinde %20 v/v konsantrasyonda olacak şekilde hazırlanmış (%20 bakteri kültürü, %80 gliserol) ve etiketlendikten sonra -20 °C’de muhafaza edilmişlerdir.

3.3. Antibiyogram Testi

İzolatların antibiyogram testleri ticari antibiyotik diskleri (Oxoid) kullanılarak aşağıda verilen protokol uyarınca yapılmıştır (Hudzicki, 2009).

1. İzolatlar LB besiyerinde 24 saat süreyle 37°C’de inkübasyona bırakılmışlardır.
2. Süre sonunda izolatlardan 100’er µl alınarak LB-agar plaklarına drigalski spatülü ile yayma yöntemiyle ekimleri yapılmıştır.
3. Ekimi tamamlanan plaklar üzerine, uygun aralıklarla ve sterilize edilmiş laboratuvar pensi ile antibiyotik emdirilmiş diskler (P: Penisilin (10 µg), AMP: Amfisilin (10 µg), S: Streptomisin (10 µg), CN: Gentamisin (10 µg), SH: Spektinomisin (10 µg), TE: Tetrasiklin (30 µg), RD: Rifampisin (5 µg)) yerleştirilmiştir.
4. Plak yüzeyleri 10 dk süreyle kurutulduktan sonra, uygun sıcaklık koşullarına ayarlanmış inkübatörde 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmışlardır.

Süre sonunda plaklar incelenerek, antibiyotik diski etrafında bakteri gelişiminin bulunma durumuna göre dirençli veya duyarlı olma durumları not edilmiştir.

3.4. Enzimatik Analizler

Enzim analizleri, 24 saat süreyle LB-sıvı besiyerinde üremiş olan bakteri kültürlerinin santrifüj edilmesi sonucu elde edilmiş olan hücre dışı sıvı kısımların (süpernatant) kullanılması ile gerçekleştirilmiştir. Substrat olarak Na-fosfat tampon içerisinde %2 w/v oranında otoklav yapılarak çözünmüş olan çözünür nişasta solüsyonu kullanılmıştır. Tüm reaksiyon bileşenleri önceden etiketlenerek hazırlanmış olan 20 ml hacimli cam deney tüplerinde yürütülmüştür. Reaksiyon bileşenleri aşağıda verildiği şekilde hazırlanmıştır:

Kontrol grubu : 1 ml sodyum-fosfat bafır (1 adet)

Enzim Kontrol Grubu : 0.5 ml süpernatant + 0.5 ml Na-fosfat tampon (5 adet)

Substrat Kontrol Grubu : 0.5 ml substrat solüsyonu + 0.5 ml Na-fosfat tampon (5 adet)

Enzim-Substrat Grubu : 0.5 ml süpernatant+ 0.5 mlsubstrat solüsyonu

Tüplerde ölçülen değerlerde hazırlanan bileşenler vortekslenmiştir ve karışması sağlanmıştır. Reaksiyon bileşenleri 55°C'deki su banyosunda 30 dakika bekletilmiş ve böylece enzimin substratı hidrolize etmesi sağlanmıştır. Süre sonunda tüpler su banyosundan çıkarılmış ve her birine 1.5'er ml DNS solüsyonu eklenerek vortekslenmiştir. Tüpler kaynar su içinde 5 dakika bekletilmiş ve açığa çıkan şeker miktarına bağlı olarak renk değişiminin gerçekleşmesi sağlanmıştır. Tüpler oda sıcaklığında soğuduktan sonra kontrol grubu kör olarak kullanılmış ve spektrofotometre'de OD₅₄₀ nm dalga boyunda ölçümleri yapılmıştır.

Enzim+substrat grubunun ortalama değerlerinden enzim kontrol ve substrat kontrol gruplarının ortalama değerleri çıkarılmış ve böylece açığa çıkan şeker miktarlarına bağlı olan spektrofotometrik veriler elde edilmiştir. En yüksek spektrofotometrik değer 100 olarak kabul edilmiş ve diğer değerler buna orantılanarak her bir muamelenin relatif aktivite değeri elde edilmiştir.

3.5. Optimum Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi

Enzimlerin aktivite gösterdiği sıcaklık değerleri 30-80°C aralığı için her bir 10°C olacak şekilde araştırılmıştır. Her bir sıcaklık değeri için hazırlanan reaksiyon tüpleri belirtilen sıcaklık değerlerine ayarlanmış su banyosunda 30 dk süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda tüpler su banyosunda uzaklaştırılarak üzerilerine 1.5 ml DNS solüsyonu ilave edilmiş, sonrasında ise 5 dk süreyle kaynar suda tutularak oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Spektrofotometrik okumalardan sonra her bir sıcaklık derecesi için relatif aktivite değerleri hesaplanmış ve grafikler oluşturulmuştur.

3.6. Enzimlerin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değerlerinin Belirlenmesi

Enzimlerin optimum aktivite gösterdikleri pH değerleri 4.0-11.0 aralığında araştırılmıştır. Optimum pH çalışmasında sırasıyla Na-asetat tampon (pH 4.0, 5.0 ve 6.0), Na-fosfat tampon (pH 6.0-7.0) ve Tris tampon (7.0, 8.0, 9.0, 10.0 ve 11.0) kullanılmıştır. Substrat solüsyonları (%2 w/v nişasta) her bir pH değeri için hazırlanan tamponlar kullanılarak ayrı ayrı olacak şekilde hazırlanmıştır. Cam tüplere hazırlanan reaksiyon bileşenleri herbir enzim için optimum sıcaklık değerine hazırlanmış su banyosunda 30 dk süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tüpler su banyosunda uzaklaştırılarak üzerilerine 1.5 ml DNS solüsyonu ilave edilmiş, sonrasında ise 5 dk süreyle kaynar suda tutularak oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Spektrofotometrik okumalardan sonra herbir pH değeri için relatif aktivite değerleri hesaplanmış ve grafikler oluşturulmuştur. Grafiklerin oluşturulmasında her bir tampon için çalışma değerleri (Na-asetat ve Na-fosfat için pH 6.0, Na-fosfat ve Tris için pH 7.0) birbirlerine eşitlenerek ayarlama yapılmıştır.

3.7. Enzimlerin Termal Kararlılık Değerlerinin Belirlenmesi

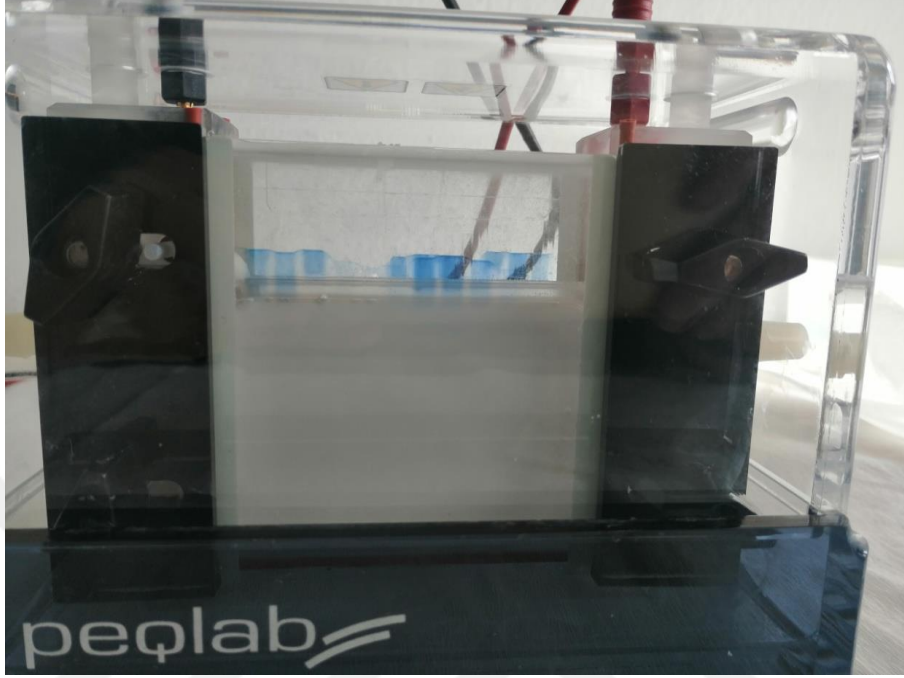
Enzimlerin termal stabiliteleri 30-100°C'ler arasındaki sıcaklık değerleri için araştırılmıştır. Enzim örnekleri (süpernatant) substrat ile reaksiyon sokulmadan önce her bir sıcaklık değerinde ayrı ayrı olacak şekilde 15 dk süreyle ön inkübasyona bırakılmışlardır. Ön inkübasyon sonrasında cam tüplerde reaksiyon bileşenleri hazırlanmış ve her bir enzimin optimum sıcaklık değerinde 30 dk süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda tüpler su banyosunda uzaklaştırılarak üzerilerine 1.5 ml DNS solüsyonu ilave edilmiş, sonrasında ise 5 dk süreyle kaynar suda tutularak oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Spektrofotometrik okumalardan sonra her bir sıcaklık derecesi için relatif aktivite değerleri hesaplanmış ve termal stabilite grafikleri oluşturulmuştur.

3.8. Bazı Kimyasalların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

Her bir enzimin aktivitesi Ca, Mg, Co, K ve EDTA varlığında araştırılmıştır. Kimyasal maddeler enzimlere 5'er mM olacak şekilde ilave edilmiş, herhangi bir kimyasal madde ilave edilmeyen kontrol grupları oluşturulmuştur. Hazırlanan reaksiyon bileşenleri enzimin optimum sıcaklık değerinde 30 dk süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda tüpler su banyosunda uzaklaştırılarak üzerilerine 1.5 ml DNS solüsyonu ilave edilmiş, sonrasında ise 5 dk süreyle kaynar suda tutularak oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Spektrofotometrik okumalardan sonra her bir kimyasal madde varlığındaki relatif aktivite değerleri hesaplanmış ve grafikleri oluşturulmuştur.

3.9. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroföresi(SDS-PAGE)

SDS-PAGE alışmaları Laemmli (1970)'göre yapılmıştır (Şekil 3.1)



Şekil 3.1. SDS-PAGE alışmaları

3.10. Bakterilere Ait Hücre dışı Protein Örneklerinin Hazırlanması

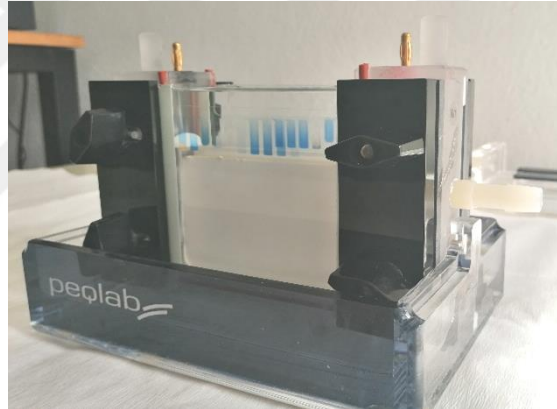
Hücre dışı protein örneklerinin hazırlanması aşağıda verilen protokol uyarınca yapılmıştır:

1. Bakteriler LB sıvı besiyerinde 48 saat süreyle üretilmiş ve sonrasında 4950 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüj edilerek hücreler sıvı kısımdan ayrılmıştır.
2. Süpernatantlar 5 mL olacak şekilde tüplere paylaştırılmış ve üzerlerine bir hacim %20 w/v TCA eklenerek homojonize edilmişlerdir.
3. Örnekler ertesi güne kadar oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmışlardır.
4. Ertesi gün örnekler 4950 rpm'de santrifüj edilmiş ve denatüre proteinlerin pelet oluşturması sağlanmıştır.
5. Tüpler ters çevrilerek protein peletlerinin oda sıcaklığında 30 dk süreyle kurumaları sağlanmıştır.
6. Protein peletleri 50-100 µL arasında değişen hacimlerde (peletin büyüklüğüne göre) Tris-Cl tampon (1 M, pH 8.0) ile çözülmüş sonrasında etiketlenerek -20°C'ye kaldırılmıştır.

7. Örnekler jele yüklenmeden hemen önce, üzerlerine hacmin yarısı kadar kaynatma solüsyonu (0.5 M pH:6.8 Tris-HCL, %25 0.8 ml SDS, 1 ml gliserol, 0.5 ml betamerkaptoetanol, %0.01 bromophenol blue kristali) eklenerek vortekslenmiştir.
8. Örnekler kaynar su içerisinde 5 dk bekletilmiş ve sonrasında SDS-PAGE jele yüklenmiştir.

3.11. SDS-PAGE'nin hazırlanması ve örneklerin elektroforezi

SDS-PAGE Çizelge 3.1 ve 3.2'de verildiği şekilde %12'lik olacak şekilde hazırlanmıştır. Jel düzeneğine önce ayırıcı jel dökülmüş ve polimerizasyon için 45 dk beklenmiştir. Daha sonra ayırıcı jelin üzerine bu sefer toplayıcı jel dökülmüş ve üstten jel tarağı yerleştirildikten sonra polimerizasyon için 45 dk daha beklenmiştir. Süre sonunda jel tarağı üstten çıkarılmış ve jel, elektrod solüsyonu bulunan jel tankının içine konulmuştur. Jel kuyularına protein örnekleri 50'şer µl olacak şekilde bir mikropipet yardımıyla yüklenmiş ve jele, örnekler toplayıcı jelde 25 mA, 60 V, ayırıcı jelde ise 40 mA, 80 V uygulanmıştır. İzleme boyasının jelin sonuna gelmesi ile elektroforez işlemi sonlandırılmıştır.



Şekil 3.2. İzolatlara ait hücre dışı proteinlerin SDS-PAGE'ye yüklenmesi ve elektroforezi

3.12. SDS-PAGE Jelin Boyanması

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra cam levhalar arasından jel dikkatli bir şekilde çıkarılmıştır. Jel, boyama solüsyonu (%40 v/v metanol, %10 v/v glisial asetik asit, %0.1w/v coomassie blue R250, %50 v/v saf su) içerisine balınmış ve jelin boyanması için yaklaşık 1 saat süre ile arada hafif çalkalama yapılarak bekletilmiştir. Süre sonunda jel boya solüsyonundan alınmış ve bu sefer fazla boyanın uzaklaştırılması için destain (yıkama) solüsyonu (%40 metanol, %10 glisial asetik asit, %50 saf su) içerisine aktarılmıştır. Jel bu solüsyonun içinde ertesi güne kadar bekletilmiştir. Bu süre zarfında destain solüsyonu birkaç kere değiştirilmiştir. Ertesi gün jel, ışıklı pano üzerine alınarak protein bantları fotoğraflanmıştır.

3.13. Filogenetik Analizler

Örneklere ait 16S rDNA, Sanger Dizileme hizmet alımı ile Macrogen Hollanda laboratuvarında, ABI 3730XL Sanger dizileme cihazı (Applied Biosystems, Foster City, CA) ve BigDye Terminator v3.1 Cycle Dizileme Kiti kullanılarak yaptırılmıştır (Applied Biosystems, Foster City, CA). 16S rDNA sekanslarının karşılaştırılması MEGA7 programı (<https://www.megasoftware.net/>) kullanılarak yapılmış ve NCBI GenBank veri tabanından alınan diğer *Bacillus* türleri ile Maksimum olabilirlik filogenetik ağacı oluşturulmuştur (Kumar ve ark. 2016).



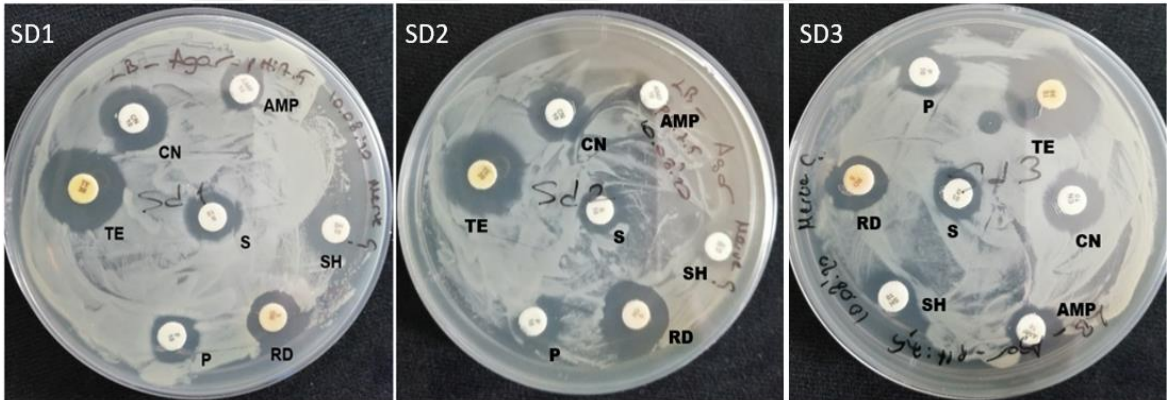
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. BULGULAR

Çalışmada Çukurova Üniversitesi Kampüsünden alınan toprak örneklerinden üç adet termofilik *Bacillus* sp. bakterisi izole edilmiştir. İzolatlar aerobik ortamda spor formundan izole edildikleri için *Bacillus* olarak tanımlanmışlardır. Bakteriler *Bacillus* sp. SD1, SD2 ve SD3 olarak isimlendirilmişlerdir.

4.1.1. İzolatların Antibiyogram Analizleri

Bacillus sp. SD1, SD2 ve SD3 izolatlarının ayrı işleme alınacak şekilde ticari olarak kullanıma hazır olan antibiyotik diskleri ile antibiyogram testleri yapılmıştır. Antibiyogram disklerinin etrafında bakteri kolonilerinin gelişme durumları göz önüne alındığında, SD1 ve SD3 izolatlarının denenen tüm antibiyotiklere karşı değişen oranlarda hassas olduğu, SD2 izolatının ise amfisilin ve spektinomisin antibiyotiklerine karşı dirençli, diğer antibiyotiklere karşı ise değişen oranlarda hassas olduğu belirlenmiştir(Şekil 4.1).



Şekil 4.1. *Bacillus* sp. suşlarının antibiyotik emdirilmiş disklerle yapılan antibiyogram görüntüsü (AMP:Amfisilin; P: Penisilin; S: Streptomisin; TE: Tetrasiklin; CN: Gentamisin; SH: Spektinomisin, RD: Rifamisin)

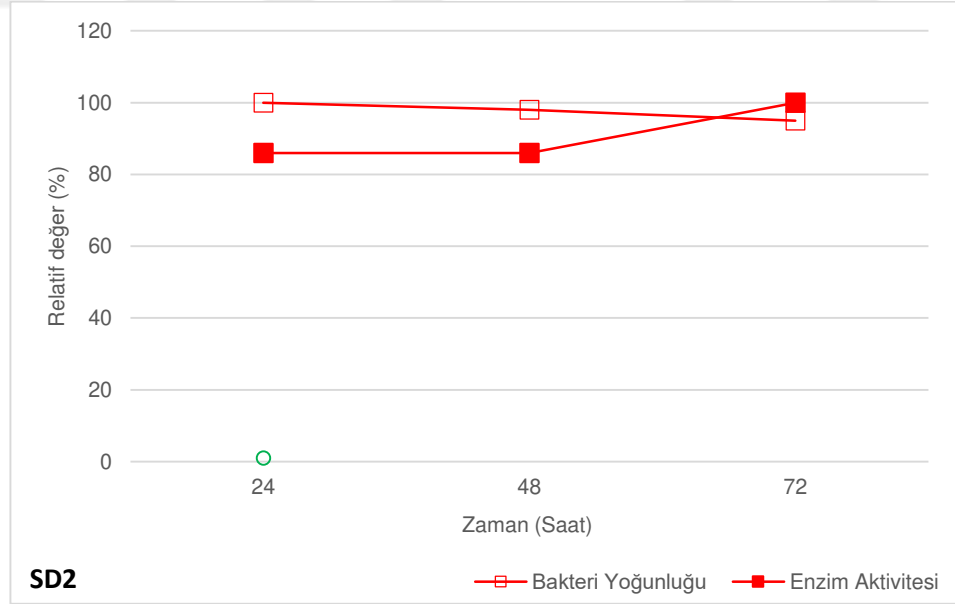
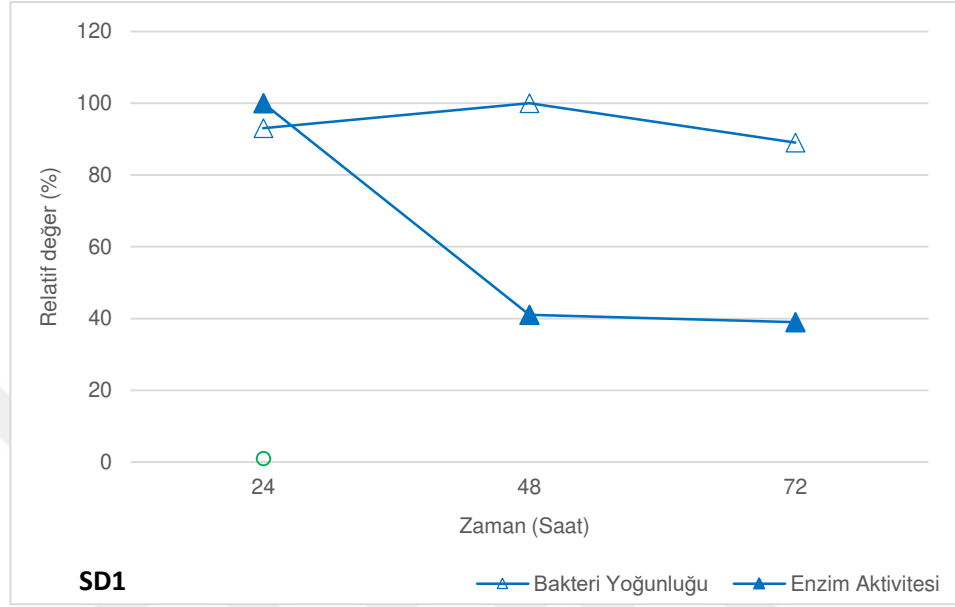
4.1.2. Enzimatik Özellikler

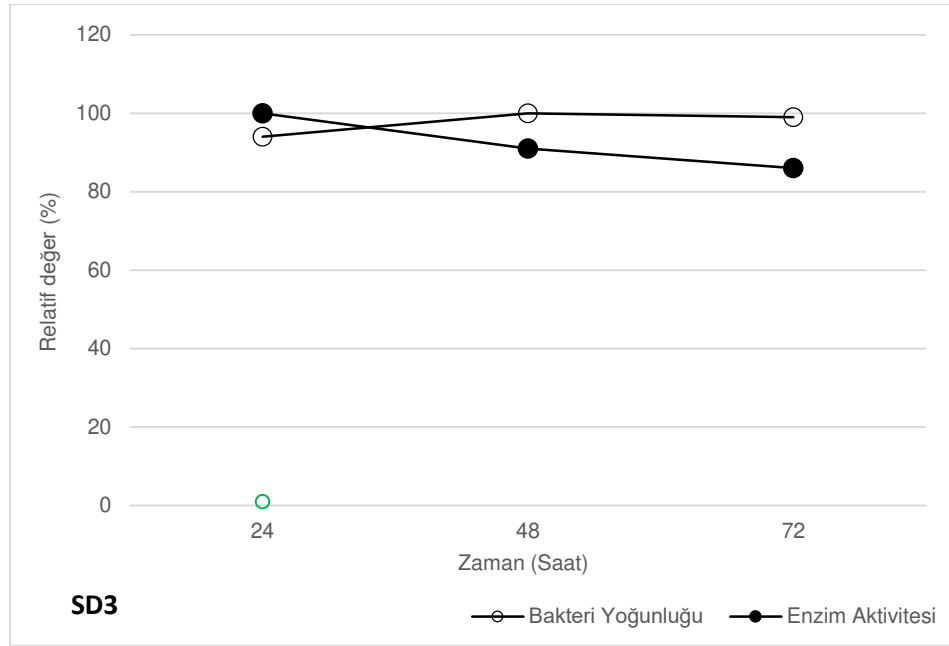
Bacillus sp. SD1, SD2 ve SD3 izolatlarının 72 saatlik üreme periyotları boyunca her 24 saatte bir bakteri kütle artışları ve enzim aktivite düzeyleri belirlenmiştir.

Zamana Göre α -Amilaz Üretimi

Bacillus sp. SD1, SD2 ve SD3 bakterilerinin zamana göre enzim aktivite düzeyleri belirlenmiştir. Elde edilen bulgular SD1 izolatında en yüksek hücre kütle artışlarının 24. saatte, enzim aktivitelerinin ise 48. saatte gerçekleştiğini, SD2 izolatında ise en yüksek hücre kültür artışının 24. saatte, enzim aktivitesinin ise 72. saatte gerçekleştiğini ve SD3 izolatında ise en yüksek hücre kütle artışlarının 72 saatte, enzim aktivitelerinin ise 24. saatte gerçekleştirdiğini ortaya koymuştur.

SD2 ve SD3 izolatlarında oransal enzim aktivite düzeyleri 72 saatlik üreme periyodu boyunca %80'in üzerinde seyrederken, SD1 izolatında enzim aktivitesi üreme periyodunun 48. ve 72. saatlerinde yaklaşık %60 düşüş göstermiştir (Şekil 4.2).

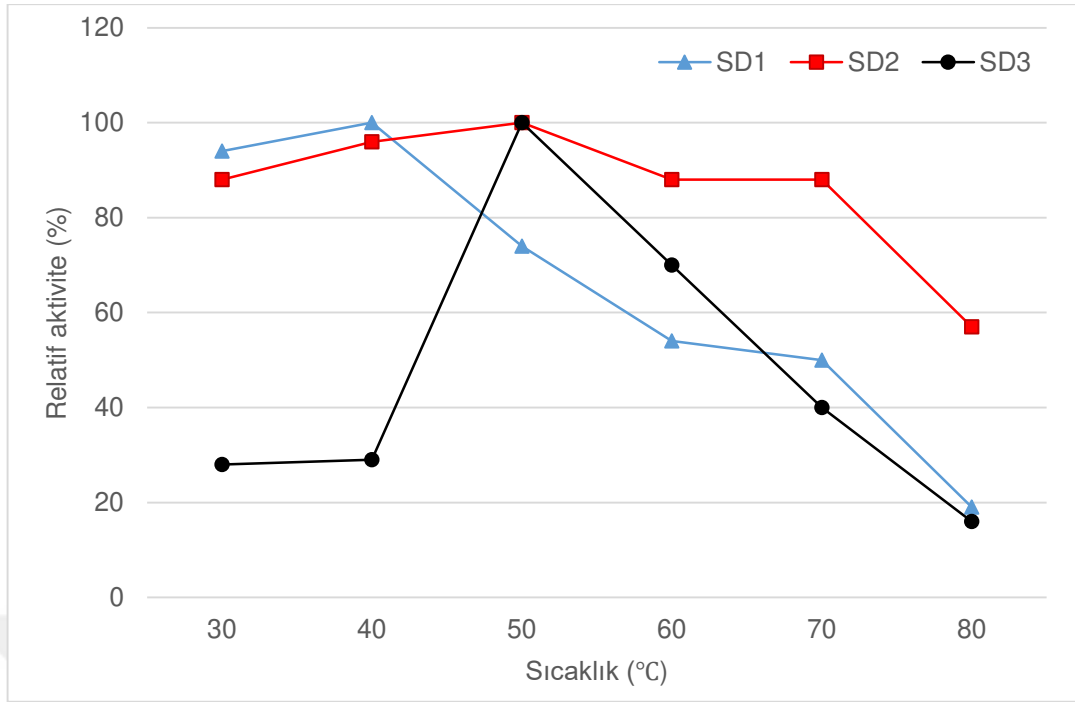




Şekil 4.2. SD1, SD2 ve SD3 izolatlarının zamana göre α -amilaz üretimi

Enzimlere Ait Optimum Sıcaklık Değerleri

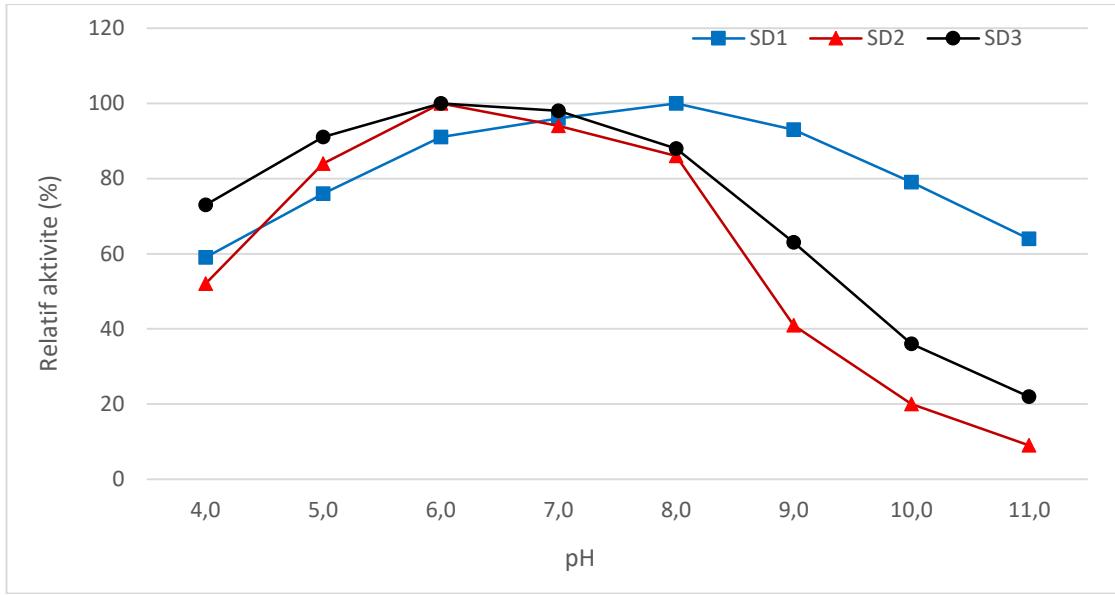
Bacillus sp. SD1, SD2 ve SD3 izolatları tarafından üretilen α -amilaz enzimlerine ait optimum sıcaklık değerleri belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre SD1 izolatı tarafından üretilen α -amilaz enzimi optimum aktivitesini 40°C’de gösterirken, SD2 ve SD3 izolatları tarafından üretilen α -amilaz enzimleri optimum faaliyetlerini 50°C’de göstermişlerdir (Şekil 4.3). *Bacillus* sp SD1, SD2 ve SD3 α -amilazlarının 30°C’deki relatif aktivite değerleri sırasıyla %94, 88 ve 28 olarak gerçekleşmiştir. Yine her üç enzimin de 60-80°C’ler arasındaki ortalama relatif aktiviteleri ise yine aynı sırayla %41, 78 ve 42 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.3. İzolatlara Ait α -Amilaz Enzimlerinin Değişik Sıcaklık Koşullarındaki Relatif Aktivite Değerleri

α -Amilaz Enzimlerine Ait Optimum pH Değerleri

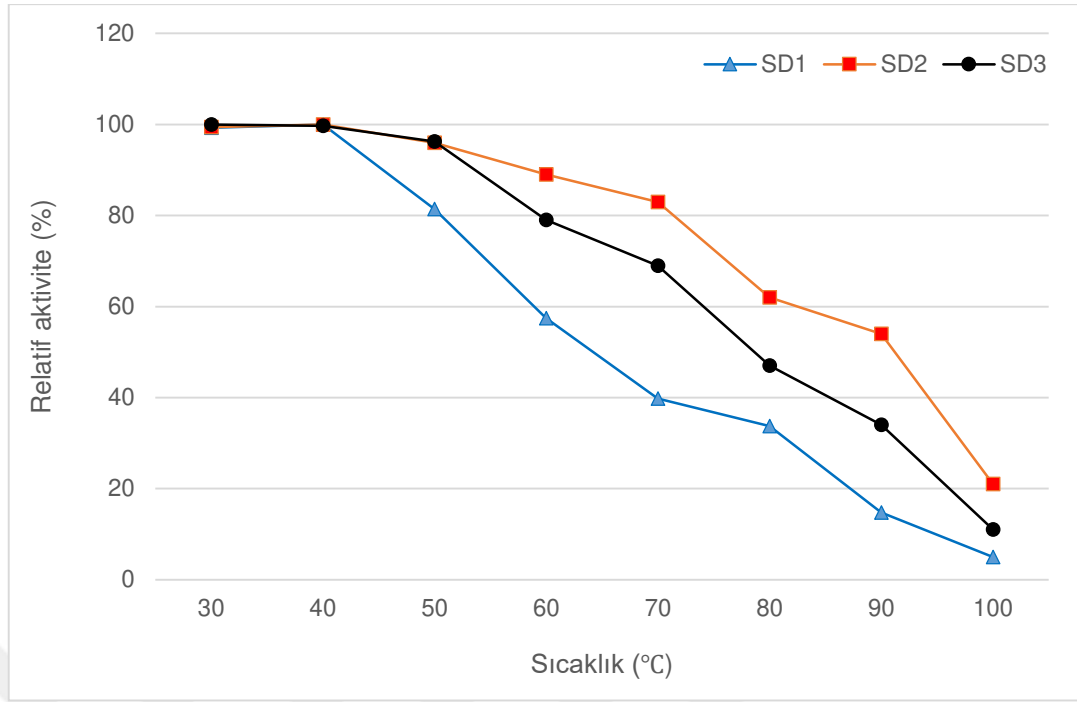
Bacillus sp. SD1, SD2 ve SD3 α -amilazları içinfarklı pH değerlerinde gösterdikleri relatif aktivite düzeyleri belirlenmiştir. *Bacillus* sp. SD1 α -amilazı optimum aktivitelerini pH 8.0'de gösterirken, SD2 ve SD3 α -amilazları optimum faaliyetlerini 6.0 pH değerinde göstermişlerdir (Şekil 4.5). SDS α -amilazı 4.0-7.0 pH değerleri arasında ortalama %80.6 relatif aktivite gösterirken, 9.0-11.0 pH değerleri arasında ortalama %79 relatif aktivite göstermiştir. 4.0-5.0 pH değerlerinde SD2 ve SD3 α -amilazları sırasıyla %68 ve %82 relatif aktivite gösterirken, 7.0-11.0 pH değerleri arasında aynı sırayla %50 ve %61 ortalama relatif aktivite göstermişlerdir.



Şekil 4.4. İzolatlara Ait α -Amilaz Enzimlerinin Değişik pH Koşullarında Gösterdikleri Relatif Aktivite Değerleri

α -Amilaz Enzimlerinin Sıcaklığa Dirençliliklerinin Belirlenmesi

Bacillus sp. SD1, SD2 ve SD3 α -amilaz enzimlerinin farklı sıcaklık değerlerinde gösterdikleri termal kararlılık değerleri relatif olarak hesaplanmıştır. Her üç enzim de 30 ve 40°C’de 15 dk. ön inkübasyon sonrasında aktivitelerini tamamen korumuşlardır. SD1 α -amilazı 50, 60, 70, 80, 90 ve 100°C sıcaklık değerlerinde 15 dk ön inkübasyon sonrasında sırasıyla %81, 57, 40, 34, 15 ve 5 kalan aktivite gösterirken, SD2 α -amilazı aynı sırayla %96, 89, 83, 62, 54 ve 21 kalan aktivite, SD3 α -amilazı ise yine aynı sırayla %96, 79, 69, 47, 34 ve 11 kalan aktivite göstermiştir (Şekil 4.6).



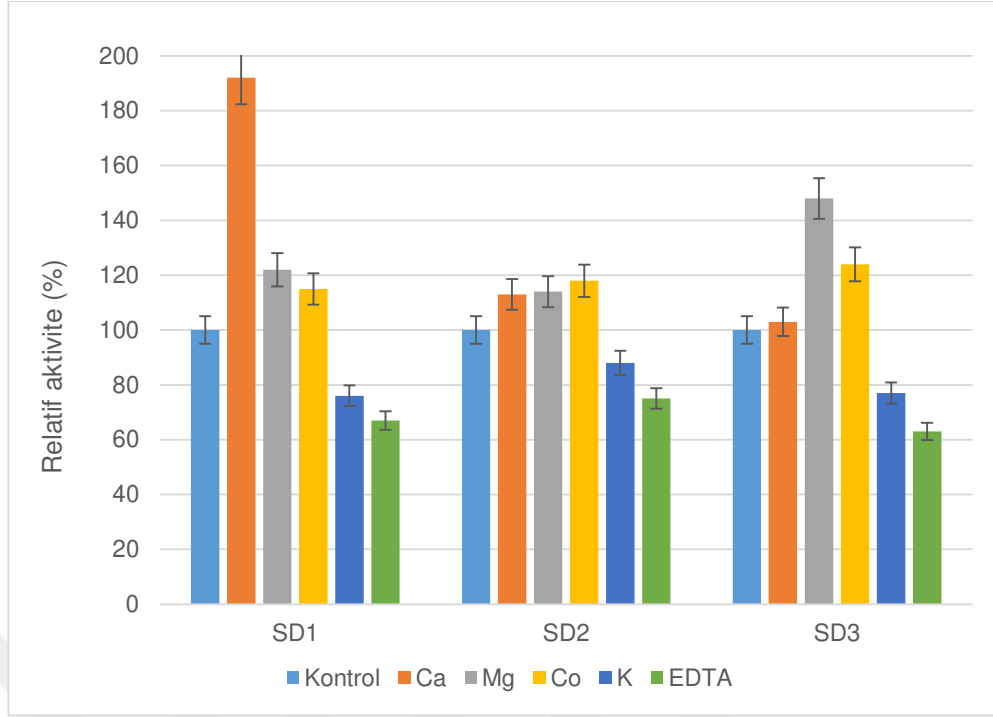
Şekil 4.5. Enzimlerin farklı sıcaklık koşullarında gösterdikleri termal kararlılık grafiği

Bazı kimyasal maddelerin enzimlerin aktiviteleri üzerine etkisi

Kimyasal maddelerden Ca, Mg, Co, K ve EDTA'nın 5'er mM konsantrasyonlarının varlığında *Bacillus* sp. SD1, SD2 ve SD3 enzimlerinin aktiviteleri üzerine etkileri belirlenmiştir. Ca, Mg ve Co her üç enzim üzerinde de değişik oranlarda stimülatör etki ortaya koyarken, K ve EDTA inhibisyon etkisi göstermiştir (Çizelge 4.1; Şekil 4.6). Ca en yüksek stimülatör etkiyi %92 ile SD1, Mg %48 ile SD3 ve Co %24 ile yine SD3 α -amilazları üzerinde göstermiştir. Benzer şekilde, K en yüksek inhibisyon etkisini %24 ile SD1, EDTA ise %37 ile SD3 α -amilazları üzerinde göstermiştir.

Çizelge 4.1. Metal iyonlarının relatif aktivite yüzdeliği üzerine etkisi

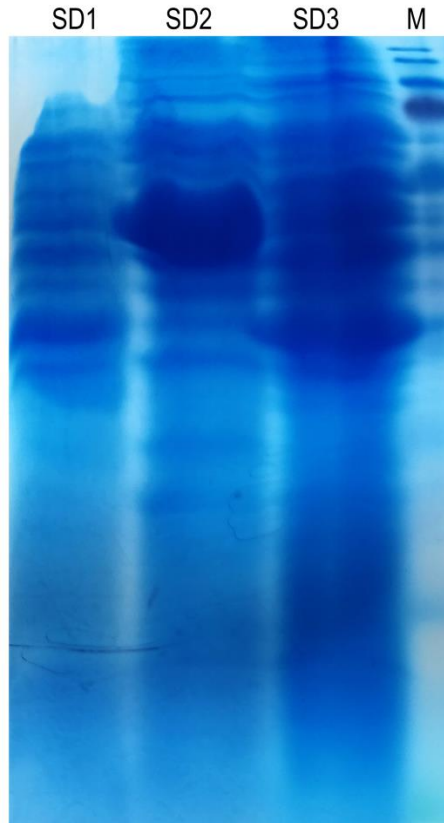
Metal İyonu	Relatif Aktivite (%)		
	SD1	SD2	SD3
Kontrol	100	100	100
Ca	192	113	103
Mg	122	114	148
Co	115	118	124
K	76	88	77
EDTA	67	75	63



Şekil 4.6. Bazı kimyasal maddelerin enzimlerin aktiviteleri üzerine olan etkileri

SDS-PAGE Analizleri

Her üç izolata ait toplam proteinler SDS-PAGE’de karşılaştırılmıştır. Hücre dışı proteinlerin bant profilleri her üç izolata da birbirinden farklı olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. İzolatlara ait SDS-PAGE (M: Markır, A: SDS-PAGE’de toplam proteinler)

4.1.3. Filogenetik Analiz Sonuçları

Çalışmada izole edilen *Bacillus* sp. SD1, SD2 ve SD3 bakterilerinin 16S rDNA sekansları sırasıyla Çizelge 4.2, Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. *Bacillus* sp. SD1 bakterisine ait rDNA sekansı

```
GATTAAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCCAT
AAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTTCGAA
ATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTA
ACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC
ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAG
CAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCT
AGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGC
CGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTT
CTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAGTGGGAGACTTGAGT
GCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGT
GGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT
AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGT
GCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAAT
TGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCA
GGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGT
GCATGGTTGTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGA
TCTTAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGG
GGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAA
AGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGATTGTAGGCTGC
AACTCGCCTACATGAAG
```

Çizelge 4.3. *Bacillus* sp. SD2 bakterisine ait rDNA sekansı

AGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGG
GTAACCTGCCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAAC
CGCATGGTTGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACCTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCT
AGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACA
CTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGA
AAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGG
AAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACT
ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGC
GCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACT
GGGAGACTTGAGTGAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATG
GAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTAAGTACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGG
AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTT
TCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGA
AACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGAAGCAACGCG
AAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAG
AGTGACAGGTGGTGATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGA
GCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAAC
CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACA
ATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCC
GATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTA

Çizelge 4.4. *Bacillus* sp. SD3 bakterisine ait rDNA sekansı

```
CCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACCGGCCAG
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCG
TGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAA
GCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTTCTTAAGTCTG
ATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGG
AAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCG
ACTTTCTGGTCTGTAACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTG
GTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTA
ACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGC
CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACA
TCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGT
CGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGC
CATCATTAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC
AAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAA
GACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTA
C
```

Bacillus sp. SD1, SD2 ve SD3 bakterilerinin elde edilen sekans dizilerinin yanısıra NCBI (National Center for Biotechnology Information) veritabanından alınan *Bacillus* cinsine ait 16S rDNA sekans verileri kullanılarak yakın mikroorganizmalarla sekans benzerlik düzeyleri karşılaştırılmış ve buna bağlı olarak maksimum olabilirlik metoduna göre oluşturulan moleküler filogenetik analiz Şekil 4.8’de verilmiştir. Her 3 suşa ait 16S rDNA sekans verileri NCBI Veri bankasına girilmiş ve erişim numaraları sırası ile SD1 için PP784494, SD2 için PP784495 ve SD3 için PP784495 olarak temin edilmiştir.



Şekil 4.8. 16S rDNA gen bölgesine ait kısmi dizilere dayalı Kimura-2 parametrelili maksimum olabilirlik metoduna (Kimura, 1980) göre oluşturulan moleküler filogenetik ağaç. İlişkili taksonların bir arada kümelenildiği tekrarlı ağaçların yüzdeliği dalların yanında gösterilmektedir. Daire ve kare sembolleri izolatları göstermektedir. NCBI GenBank’ında belirtildiği şekilde tür adları ve erişim numaraları verilmiştir. *Agrobacterium tumefaciens* dış grup olarak kullanılmıştır.

4.2. Tartışma

Bacillus sp. cinsi bakterilerde nişastayı hidroliz eden birçok tür bulunmaktadır. Bu türler arasında *B. stearothermophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. circulans*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. thuringiensis*, *B. coagulans*, *B. globisporus*, *B. alvei* ve *B. macerans* nişastayı parçalayan enzimleri üretmektedir (Claus ve Berkeley, 1986). Bu türlerden *B. stearothermophilus* ve *B. licheniformis* bakterilerince üretilen sıcaklığa dirençli α -amilaz enzimleri yoğun bir endüstriyel kullanım alanı bulmuşlardır. Endüstriyel üretim safhalarında uygulanan ısı işlemlere karşı dayanıklılık göstermesi ve aktivitelerini koruyabilmelerinden dolayı sıcaklığa dirençli enzimleri üreten termofilik mikroorganizmalar büyük önem kazanmıştır (Burhan ve ark., 2003). Termofilik mikroorganizmaların optimum çalışma, üreme ve gelişme sıcaklığı 50-80° C'dir (Vieille ve Zeikus, 1979). Bu çalışmada *Bacillus* sp. SD2 ve SD3 bakterilerince üretilen α -amilaz enzimleri optimum aktivitelerini 50 °C'de gösterirken, SD1 izolatına ait α -amilaz enzimi 40 °C'de göstermiştir. Bu sonuçlar SD2 ve SD3 enzimlerinin termostabil olduğunu ortaya koymaktadır. SD1 enzimi ise daha çok mezofilik bir karakter ortaya koymuştur. *Bacillus* sp. SD1, SD2 ve SD3 bakterilerince üretilen her üç enzimin de 60-80 °C'ler arasındaki ortalama relatif aktiviteleri sırayla %41, 78 ve 42 olarak hesaplanmıştır. Bu veri bize SD2 α -amilazının yüksek sıcaklık değerlerinde yüksek oransal aktivite göstermesinden dolayı endüstriyel kullanım için SD1 ve SD3 α -amilazlarına göre daha tercih edilebilir olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan, SD3 α -amilazı her ne kadar 50 °C'de optimum aktivite gösterse de, bu sıcaklık değerinden uzaklaştıkça hızlı bir aktivite kaybı gözlenmiştir. Oysa SD2 α -amilazı yine optimum aktivitesini 50 °C'de göstermekle birlikte geniş bir sıcaklık aralığında (30-70 °C) aktivitesini büyük oranda korumuştur. Bu veri, SD2 α -amilazının endüstriyel kullanım için SD1 α -amilazına göre tercih edilebilir olmasının bir diğer nedenidir.

Literatür taramaları 40- 55°C'de optimum faaliyet gösteren enzimleri üreten bakterilerin izolasyonlarına yönelik bir çok çalışma olduğunu ortaya koymaktadır (Manning ve Campbell, 1961; Boyer ve Ingle, 1972; Fogarty, 1983; Jamuna ve ark., 1991; Kumar ve ark., 2005).

Bacillus sp. SD2 ve SD3 bakterilerine ait α -amilaz enzimleri optimum aktivitelerini 6.0 pH değerinde gösterirken, SD1 α -amilazı 8.0 pH değerinde göstermiştir. SD2 ve SD3 α -amilaz enzimleri 8.0 pH değerinden sonra hızlı bir aktivite kaybına uğrarken, SD1 α -amilaz enzimi 5.0-11.0 pH değerleri arasında %70'in üzerinde bir oransal aktivite ortaya koymuştur. Geniş bir pH aralığında yüksek oransal aktivite göstermesi, farklı endüstriyel alanlarda uygulanabilirliğini artıracığından SD1 α -amilazı SD2 ve SD3 α -amilaz enzimlerine göre daha tercih edilebilir konumdadır.

Bakteriyel α -amilazlar pH optimumları bakımından farklı karakterler ortaya koyabilirler. Bu karakterler asidik veya alkali olabileceği gibi, geniş pH aralığında aktivite gösteren α -amilaz enzimleri de bildirilmiştir. α -Amilaz enzimlerinin pH optimumları genel olarak 2.0-12.0 arasında değişiklik gösterebildiği bildirilmiştir (Whinen ve Mantsala, 1989). Bununla birlikte pH 4.0-11.0 aralıklarında ise enzimlerin kararlı yapıda olduğu ifade edilmiştir (Fogarty ve Kelly, 1979; Khoo ve ark., 1994; Hamilton ve ark., 1999). Nötr ya da alkali ortamlarda optimum faaliyet gösteren termofil

amilaz enzimleri de bulunmaktadır (Rasooli ve ark., 2008; Oyeleke ve Oduwale, 2009; Gaur ve ark., 2012). Bezbaruah ve ark. (1991) *Bacillus* suşlarına ait α -amilaz enzimlerinin genellikle alkali açıdan hoşgörülü ve alkali pH'da daha kararlı kaldığını belirtmişlerdir.

Bacillus sp. SD1, SD2 ve SD3 enzimlerinin çalışması üzerinde, Ca, Mg, Co, K ve EDTA kimyasal maddelerinin etkisi araştırılmıştır. Elde edilen veriler Ca, Mg ve Co'nun her üç enzim üzerinde de değişen oranlarda aktivatör etki gösterdiğini, K ve EDTA'nın ise yine her üç enzim üzerinde de inhibitör etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Özellikle Ca ilavesi SD1 α -amilaz enziminin aktivitesini %92 oranında artırmıştır. Diğer taraftan Mg ilavesi SD3 α -amilaz enziminin oransal aktivitesini %48 düzeyinde artırmıştır. Bu veriler enzimlerin endüstriyel kullanımları esnasında enzimlerin verimliliğini artırmak için bu kimyasal maddelerin kullanılıp kullanılmayacağı, kullanılacak ise hangi konsantrasyonlarda kullanılacağı hususunda önemli olmaktadır. Yapılan bir çalışmada PPO enzim aktivitesi üzerine Fe^{+3} , Cu^{+2} , Mg^{+2} , Ba^{+2} , Ca^{+2} , Li^{+1} , Mn^{+2} , Pb^{+2} , Na^{+1} , K^{+1} , Ni^{+2} , Cd^{+2} , Hg^{+2} ve Al^{+2} metal iyonlarının etkisi incelenmiş, Hg^{+2} iyonunun enzim üzerinde oldukça büyük bir aktivasyona; Ca^{+2} , Fe^{+3} , Pb^{+2} , Li^{+1} , Mn^{+2} iyonlarının ise büyük oranda inhibisyona neden oldukları bildirilmiştir (Cerrahoğlu, 2014). Dey ve ark. (2003) ise yaptıkları çalışmada Mg^{+2} ve Co^{+2} iyonlarının serbest olmayan α -amilazın aktivitesini artırdığını, Hg^{+2} , Cu^{+2} ve Fe^{+2} metal iyonlarının inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Ca^{+2} iyonlarının α -amilaza bağlanmasının enzimin çalışma hızında ve enzimin kararlılığını sağlamada önemli bir yere sahip olduğu belirtilmiştir (Tanaka ve Hoshino, 2002; Haq, 2003).

Bacillus sp. SD1, SD2 ve SD3 izolatları spor formundan aerobik ortamda çimlendirilerek elde edildikleri için cins düzeyinde *Bacillus* olarak kabul edilmişlerdir. Organizmaların genetik kodlarının değişmeyen bölgeleri, genomdaki sekansları karşılaştırarak filogenetik ilişkileri belirlemek mümkündür (Woese et al., 1985). Bu sekanslar genellikle bakterilerde bulunan ve taksonomik amaçlar için sıkça kullanılan 16S rDNA genlerini kodlayan genlerdir (Harmsen ve Karch, 2004). 16S rDNA'nın filogenetik ilişkilerin belirlenmesinde önemli bir rol oynaması, bu genin bakteriler arasında yaygın olarak bulunmasından kaynaklanmaktadır (Woese, 1987). İzolatların tür düzeyinde kesin tanımlarının yapılmasında 16S rRNA sekans analizi önemli bir veri sağlamakla birlikte, tam tür teşhisleri için birtakım biyokimyasal testlerin yapılması zorunludur. Bu çalışmada da *Bacillus* sp. SD1, SD2, SD3 bakterilerinin filogenetik ilişkilerini belirlemek için 16S rDNA sekansları kullanılmıştır. *Bacillus* SD1, SD2, SD3 bakterilerinin dizileri ile NCBI Genbank veri tabanından alınan diğer *Bacillus* türlerinin sekans dizileri seçilerek MEGA7 programında filogenetik ilişki belirlenmiştir. Bu türlerin yakın mikroorganizmalarla benzerlik düzeyleri ortaya konulmuş ve filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Filogenetik ağaçta, *Bacillus* sp. SD1 ile SD2 suşunun birbirlerine büyük oranda benzerlik gösterdiği gözlenmiştir.



5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yapılan çalışmada enzimlerin kısmi karakterizasyonunu belirlemek amacıyla sıcaklığa dirençli α -amilaz enzimleri üreten üç adet *Bacillus* sp. izole edilmiştir. Yapılan enzim analizleri her üç enzimin de optimum sıcaklık ve pH değerlerini ve farklı kimyasal madde varlığında aktivite düzeylerini ortaya çıkarmıştır. Elde edilen veriler farklı özellikler için farklı enzimlerin avantajlı olduğunu ortaya koymuştur. Örneğin sıcaklık aktivite değerleri göz önünde bulundurulduğunda SD2 α -amilaz enzimi endüstriyel uygulamalar için SD1 ve SD3 α -amilaz enzimlerine göre daha ön plan çıkarken, pH aktivite değerleri göz önünde bulundurulduğunda SD1 α -amilaz enzimi SD2 ve SD3 enzimlerine göre daha ön plana çıkmıştır.

İzolatların tam olarak aydınlatılmaması, bu izolatların doğrudan endüstride kullanımını kısıtlamaktadır. Burada yapılması gereken, bu enzimlerin üretiminden sorumlu genlerin genomdan izole edilerek endüstriyel üretim suşu olan ve GRAS olarak tabir edilen bakterilerde klonlanması ve daha saf ve ekonomik üretimlerinin sağlanmasıdır. Ayrıca hedefe yönelik mutajenez çalışmaları ile enzimlerin bir takım özelliklerinin geliştirilmesi de endüstriyel kullanımlarında ayrıca büyük avantajlar sağlayacaktır.



KAYNAKLAR

- Adams, J. C., & Watt, F. M. 1993. Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development*, 117(4), 1183-1198.
- Aiyer, P. V., 2005. Amylases and their applications. *African Journal of Biotechnology*, 4(13):1525-1529.
- Asi T., 1996, Tablolarla Biyokimya, Tayf Ofset, 71-116.
- Aquino A.C.M.M., Jorge J.A., Terenzi H.F. Polizeli M.L.T.M. 2003. Studies on a thermostable α -amylase from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 61: 323-328.
- Aygan, A., Arıkan, B., Korkmaz, H., Dinçer, S., and Çolak, Ö. 2008. Highly thermostable and alkaline α -amylase from a halotolerant-alkaliphilic *Bacillus* sp. AB68. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 547-553.
- Baltaş, N. 2012. *Anoxybacillus gonensis* Z4 suşundan ekstraselüler?- amilaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu. Karadeniz teknik üniversitesi/ Fen Bilimleri Enstitüsü/ Kimya Ana Bilim Dalı-Biyokimya 110s.
- Başkurt, M. 2012. Topraktan izole edilen *Bacillus* sp. Suş'undan α -amilaz üretimini etkileyen fiziksel faktörlerin araştırılması. Master's thesis, Bursa Uludag University, Turkey.
- Behailu, A., and Abebe, G. 2018. Isolation, production and characterization of amylase enzyme using the isolate *Aspergillus niger* FAB-211. *International Journal of Biotechnology and Molecular Biology Research*, 9(2), 7-14.
- BeMiller, J., Whistler, R. Starch . 2009 Chemistry and Technology. Hobbs, L. Sweeteners from Starch: Production, Properties and Uses. p 808. Academic Press is an imprint of Elsevier.
- Bernfeld P. 1955. Amylase, α and β . *Methods Enzymol.* 1:149-1589 Birch GG, Schallenberger RS. 1973. Configuration, conformation and the properties of food sugars. In *Molecular structure and function of food carbohydrate*. Birch G.G and Green LF (ed). London. Applied Science. pp. 9-20.
- Bezbaruah, R.L., R.K. Gogoi, K.R. Pillaı and J.N. Nigam. 1991. Amylase production by tree *Bacillus* strains active at alkaline pH. *J. Basic Microbiol.* 31(1):13-20.
- Boyer E.W. and Ingle, M.B. 1972. Extracellular alkaline amylase from *Bacillus* species. *J. Bacteriol.* 110(3):992-1000.
- Brock TD. 1978. *Thermophilic microorganisms and life at high temperatures*. Springer-Verlag, New York.
- Bruinenberg, P. M., Hulst, A. C., Faber, A., & Voogd, R. H. 1996. A process for surface sizing or coating of paper. European Patent Application.

- Brzozowski, A. M., Davies, G. J. 1997. Structure of the *Aspergillus Oryzae* alpha-amylase complexed with the inhibitor acarbose, at 2 resolution , *Biochemistry*, 36,10837-10845.
- Burhan, A., Nisa, U., Gökhan, C., Ömer, C., Ashabil, A., & Osman, G. 2003. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. *Process Biochemistry*, 38(10), 1397-1403.
- Canogulları, S. 1999 Etlik piliç karma yemlerinde enzim kullanımı ve kullanım koşulları. Doktora Tezi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Zootekni Anabilim Dalı, Adana.
- Casida, L., Johnson, J. Klein, D. 1964. Soil Dehydrogenase activity. *Soil Science*, 98, 371-376.
- Cerrahoğlu, E. 2014. Eflatun çiçekli balıbbaba (*lamium purpureum*) bitkisinden polifenol oksidaz enziminin karakterizasyon ve immobilizasyonunun incelenmesi. Doctoral dissertation, Sakarya Üniversitesi (Turkey).
- Claus D & Berkeley RCW 1986 *Bacillus* Cohn 1872. In: Sneath PHA (Ed) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Cilt 2 (s. 1105–1139). Baltimore, Williams ve Wilkins Co.
- Cohn, F. 1872. Ueber Bacterien, die kleinsten lebenden Wesen. İçinde: *Sammlung Gemeinverständlicher Wissenschaftlicher Vorträge* (Virchow, R. ve v. Holtzendorff, F., Eds.), s. 2–35, Lüderitz'sche Verlagsbuchhandlung, Berlin.
- Coral, G., & Çolak, Ö., 2000. Bir *Aspergillus niger* izolatına ait glikoamilaz enziminin izolasyonu ve karakterizasyonu. *Turk J Biol*, 24, 601-609.
- Danson, M. J., and Hough, D. W. 1998. Structure, function and stability of enzymes from the Archaea. *Trends in microbiology*, 6(8), 307-314.
- Demain, A.L., and Solomon, N.A., 1981. In *Industrial Microbiology and the Advent of Genetic Engineering*, pp. 3-14. Scientific American, Freeman & Comp., San Francisco.
- Dey, S. 2003. Akan su altında kum yatakları üzerinde çift kabuklu kabukların başlangıç hareketi. *Mühendislik mekaniği dergisi*, 129(2), 232-240.
- Fernandez, I., Moyano, F.J., Diaz, M. and Martinez, T. 2001. Characterization of α -amylase activity in five species of Mediterranean sparid fishes (Sparidae, Teleostei). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 262: 1-12.
- Fogarty WM, Kelly CT. 1979. Mikrobiyal kökenli nişastayı parçalayan enzimler. İçinde: Bull AH (ed) *Progress in Industrial Microbiology* Cilt 15. Elsevier, Amsterdam, s. 87–150.
- Fukara G. 2007. Determination of the Properties of Amylases of Some Extreme Thermophile Bacteria. Degree Thesis. Ankara University, Institute of Science and Technology, Ankara.
- Fogarty, W.M. 1983. *Microbial enzymes and Biotechnology*. Chapter 1: Microbial amylases. Applied Science Publisher. 1-92 p
- Gaur, D., Jain, P.K., Bajpai, V. 2012. Production of extracellular α -amylase by thermophilic *Bacillus* sp. isolated from arid and semi-arid region of Rajasthan, India. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 2 (5): 675-684.

- Gessesse, A., & Mamo, G. 1998. Purification and characterization of an alkaline xylanase from alkaliphilic *Micrococcus* sp. AR-135. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 20, 210-214.
- Glazer AG, Nikaido H. 1995. *Microbial Biotechnology: Fundamental of Applied Microbiology*, Freeman and Company, Washington. pp. 256- 259.
- Godfrey, L. V., W. M. White, and V. J. M. Salters. 1996. "Dissolved zirconium and hafnium distributions across a shelf break in the northeastern Atlantic Ocean." *Geochimica et cosmochimica acta* 60.21: 3995-4006.
- Gomes, Joseph ve Walter Steiner. 2004. "Ekstremofillerin ve ekstreozimlerin biyokatalitik potansiyeli." *Gıda teknolojisi ve Biyoteknoloji* 42.4: 223-225.
- Gupta, V. D. 2003. Stability of oral liquid dosage forms of glycopyrrolate prepared using powder. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*, 7 (5), 386.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., Chauhan, B. 2003. Microbial α -amylases: A biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 38: 1599- 1616.
- Ha Y.M., Lee D.G., Yoon J.H., Park Y.H. and Kim Y. 2001. Rapid and simple purification of a novel extracellular β -amylase from *Bacillus* sp.. *Biotechnology Letters* 23: 1435-1438.
- Haq, Farzana, Meghan Mahoney ve James Koropatnick. 2003. Metalotiyonin indüksiyonu için sinyal olayları. *Mutasyon Araştırması/Mutajenezin Temel ve Moleküler Mekanizmaları* 533.1-2 211-226.
- Hamilton, L. M., Kelly, C. T., & Fogarty, W. M. 1999. Purification and properties of the raw starch-degrading α -amylase of *Bacillus* sp. IMD 434. *Biotechnology Letters*, 21, 111-115.
- Harlander, S. 1992. Food biotechnology. *Encyclopedia of Microbiology*. London, Academic press, Inc. Ltd., 2: 191-207.
- <https://www.bioinforange.com/wp-content/uploads/2021/12/Seyma-Erkaya.Enzim-Kinetigi.derlemesi.pdf>
- <https://www.megasoftware.net>
- Harmsen, D., Karch, H. 2004. 16S rDNA for diagnosing pathogens: a living tree. *American Society for Microbiology*, 70: 19–24.
- Hudzicki, Jan. 2009. "Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol." *American society for microbiology* 15.1: 1-23.
- Igarashi, K., Hatada, Y., Hagihara, H., Saeki, K., Takaiwa, S., Kobayashi, T., and Ito, S. 1998. Enzymatic Properties of a Novel Liquefying α -Amylase from an Alkaliphilic *Bacillus* Isolate and Entire Nucleotide and Amino Acid Sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 3282- 3289.
- Iyer, P. V. ve Ananthanarayan, L., 2008. Enzyme stability and stabilization-Aqueous and non-aqueous environment, *Process Biochemistry*, 43 1019–1032.

- Islam, S.N.; Nusrat, T.; Begum, P.; Ahsan, M. 2016. Carotenoids and β -carotene in orange fleshed sweet potato: A possible solution to vitamin A deficiency. *Food Chem.* 199, 628–631.
- Jaenicke, R., & Böhm, G. 1998. The stability of proteins in extreme environments. *Current opinion in structural biology*, 8(6), 738-748.
- Jaenicke, Rainer. 2000. "Stability and stabilization of globular proteins in solution." *Journal of Biotechnology* 79.3 : 193-203.
- Jamuna, R., Bindu, C. and Ramakrishna, S.V. 1991. Synthesis of thermostable α -amylase by *Bacillus* Isolate R-8. *Starch/Stärke* 43(1):28-32.
- John F.K., 1987. *Enzyme Technology*, Seventh Edition, VCH Publisher, New York.
- John, W., and Sons, I., 1998. *Industrial Enzymes and Their Applications*. United States of Amerika. 454p.
- Khoo, S.L., Amirul, A.A., Kamaruzaman, M., Nazalan, N., Azizan, M.N. 1994. Purification and characterization of alpha-amylase from *Aspergillus flavus*. *Folia Microbiologica*, Volume 39, Issue 5, Pages 392-398, Penang.
- Karaboz İ., Gülümser G. ve Eke Bayramoğlu E., 2003. Tabakhanelerde Depolama Sırasında Gelişen Bazı Fungusların Koruma Piklesi ve Kromla Tabaklama Aşamasında Deride Oluşturdukları Pigmentasyonun İncelenmesi. *E.Ü. Ziraat Fakültesi Derg.*, 40(2): 129-136.
- Keskin, H., 1982. *Besin Kimyası*. Cilt II. S : 558. Fatih Yayınevi, İstanbul.
- Kiliç, Esra., 2012. Elektrostatik eğirme yöntemi ile polibütilen süksinat esaslı nanoliflerin hazırlanması, karakterizasyonu ve doxorubicin salımında kullanımı. MS thesis. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Kim T. U., Gu B. G., Jeong J. Y., Byun S. M., and Shin Y. C. 1995. Purification and characterization of a maltotetraose-forming alkaline α -amylase from an alkalophilic *Bacillus* Strain, GM8901. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 61, No. 8, p. 3105-3112.
- Kindle, K. L. 1983. Characteristics and production of thermostable α -amylase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 8, 153-170.
- Kimura M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.
- Kirk, Ole, Torben Vedel Borchert ve Claus Crone Fuglsang. 2002. "Endüstriyel enzim uygulamaları." *Biyoteknolojide güncel görüş* 13.4: 345-351.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*; 33(7):1870-1874.
- Kumar S, Tsai CJ and Nussinov R. 2001. Thermodynamic differences between homologous thermophilic and mesophilic proteins *Biochemistry* 40 14152-65.
- Kumar, S., and Nussinov, R. 2001. How do thermophilic proteins deal with heat?. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58(9): 1216-1233.

- Kumar, S., Sharma, N.S., Saharan, M.R., Singh, R. 2005. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: Purification and characterization. *Process Biochemistry*, 40, 1701–1705.
- Kumar S, Sahu NP, Pal AK, Choudhury D, Mukherjee SC. 2006. Non-gelatinized corn supplemented with α -amylase at sub-optimum protein level enhances the growth of *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings. *Aquacult Res* 37:284–292
- Kusuda M., Nagai M., Hur T.C., Ueda M., Terashita T. 2003. Purification and some properties of α -amylase from an ectomycorrhizal fungus, *Tricholoma matsutake*. *Mycoscience* 44: 311-317.
- Kutlu HR, Özen N. 2009. Hayvan beslemede son gelişmeler. VI. Ulusal Zootekni Bilim Kongresi, Atatürk Üniversitesi, Haziran 24-27, Erzurum, Türkiye, p.72.
- Kühne, Willy. 1878. "On the stable colours of the retina." *The Journal of Physiology* 1.2-3): 109.
- Laemmli, Ulrich K. 1970. "Bakteriyofaj T4 başının montajı sırasında yapısal proteinlerin bölünmesi." *doğa* 227.5259: 680-685.
- Lindner W. ve Neuber H.U., 1990. Preservation in the Tannery. *International Biodeteriation*, 26: 195-203.
- Loffler, A. 1986. Proteolytic enzymes: sources and applications. *Food technology (USA)*, 40(12).
- Lopez, Jose A. 1999. "Methods for evaluating value-at-risk estimates." *Economic Review-Federal Reserve Bank of San Francisco* 2: 3.
- Luang-In, V., Yotchaisarn, M., Saengha, W., Udomwong, P., Deeseenthum, S., and Maneewan, K. 2019. Isolation and identification of amylase-producing bacteria from soil in Nasinuan Community Forest, Maha Sarakham, Thailand. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 12(3), 1061-1068.
- Madsen, G.B., Norman, B.E., and Slott, S., 1973. A New Heat-Stable Bacterial Amylase and its Use In High-Temperature Liquefaction .*Starke* 25, 304.
- Mankar, S. D., and Barate, D. L. 2018. Isolation and identification of amylase producing bacteria from soil receiving kitchen and agricultural waste. *Int. J. Recent Sci. Res*, 9(1), 23408-23411.
- Manning, Gilbert B. ve L. Leon Campbell. 1961. "Bacillus stearothermophilus'un Termotabil α -Amilazı: I. Kristalleşme Ve Bazı Genel Özellikler." *Biyolojik Kimya Dergisi* 236.11: 2952-2957.
- Moreira F.G., Lenartovicz V. and Peralta R.M. 2004. A thermostable maltose-tolerant α -amylase from *Aspergillus tamarii*. *J. Basic Microbiol.* 44(1): 29-35.
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kahler, M., Antranikian, G., 1999. Extremophiles As a Source of Novel Enzymes For Industrial Application. *Appl Microbiol Biotechnol.* 51: 711-729.
- Nielsen, J.E., Borchert, V., 2000. Protein engineering of bacterial-amylases. *Biochimica et Biophysica ACTA*, 1543: 253-274.
- Odibo F.J.C. and Ulbrich-Hofmann R. 2001. Thermostable α -amylase and glucoamylase from *Thermomyces lanuginosus* F1. *Acta Biotechnol.* 21(2): 141- 153.

- Oyeleke, S. B., & Oduwale, A. A. 2009. Production of amylase by bacteria isolated from a cassava waste dumpsite in Minna, Niger State, Nigeria. *African Journal of Microbiology Research*, 3(4), 143-146.
- Ölçer, Hülya, and A. K. I. N. Betül. 2008. "Starch: Biosynthesis, granule structure and genetic modifications." *Journal of Science and Technology of Dumlupınar University* 016: 1-12.
- Özalpar, Büşra. 2019. Proteazın üretimini arttırmak için kimyasal mutagenез (Etidyum bromid, EtBr) ve fiziksel mutagenез (UV) yoluyla bacillus subtilis E6-5'den mutant suş geliştirilmesi ve üretim ortamının optimizasyonu. MS thesis. Bursa Uludağ Üniversitesi
- Padhiar AR and Kommu S. 2016. Isolation, Characterization and Optimization of Bacteria producing Amylase. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.* 3(7):1-7.
- Pandey A, Nigam P, Soccol CR, Soccol VT, Singh D & Mohan R. 2000. Advance In microbial amylases. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31: 135–152.
- Panneerselvam, T., and S. Elavarasi. 2015. "Isolation of α -amylase producing Bacillus subtilis from soil." *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci* 4.2: 543-552.
- Parameswaran, M., Balaji, G., Jin, T.M., Vijila, C., Vadukumpully, S., Furong, Z., Valiyaveetli, S., 2009. Charge Transport Studies in Fluorene – Dithieno[3,2- 50 b:2',3'-d]pyrrole Oligomer Using Time-of-flight Photoconductivity Method. *Organic Electronics*, 10(8), 1534-1540.
- Paulo, A. C., Gubitz, G. M., 2003. Textile processing with enzymes. CRC press, Cornwall, England. ISBN 1 85573 610 1.
- Polaina, Julio, and Andrew P. MacCabe. 2007. *Industrial enzymes*. Netherlands: Springer.
- Preist, G.F., 1992. Enzymes, extracellular. *Encyclopedia of Microbiology*. London, Acedemic press, In. Ltd., 2: 81-93. Türkiye'nin Tarımsal Mikoflorasının Endüstriyel Öneme Sahip Bazı Enzimatik Aktivitelerinin İncelenmesi-I: Amilaz, Proteaz, Lipaz 92
- Rao, B.M., M.A. Tanksale, S.M. Ghatge, V.V. Deshpande, 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. P : 597- 635.
- Rasooli, I., Astaneh, S.D.A., Borna, H., Barchini, K.A., 2008. A thermostable α -amylase producing natural variant of Bacillus spp. isolated from soil in Iran. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 3 (3): 591-596,.
- Reddy, NS, Nimmagadda, A. ve Rao, KS. 2003. Mikrobiyal α -amilaz ailesine genel bakış. *Afrika biyoteknoloji dergisi*, 2 (12), 645-648.
- Rehman, A., Javed, K., Babri, HA ve Saeed, M. 2015. Görelî ayrımcılık kriteri – Metin verileri için yeni bir özellik sıralama yöntemi. *Uygulamalı Uzman Sistemler* 42 (7), 3670-3681.
- Scandurra, R., Consalvi, V., Chiaraluce, R., Politi, L., & Engel, P. C. 1998. Protein thermostability in extremophiles. *Biochimie*, 80(11), 933-941.
- Alariya, S. S., Sethi, S., Gupta, S., & Gupta, B. L. 2013. Amylase activity of a starch degrading bacteria isolated from soil. *Archives of applied science Research*, 5(1), 15-24.

- Syu M.J., Chen, Y.H., 1997. A study on the α -amylase fermentation performed by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Chemical Engineering Journal*, 65: 237-247.
- Slem, B., Gezgin, Y., & Eltem, R. 2016. Screening and characterization of thermostable fibrinolytic enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* EGE-B-2d. 1/*Bacillus amyloliquefaciens* EGE-B-2d. 1'den thermostabil fibrinolitik enzimin taranması ve karakterizasyonu. *Turkish Journal of Biochemistry*, 41(3), 167-176.
- 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.
- Silaban S and Simamora P. 2018. Isolasi dan karakterisasi bakteri penghasil amylase dari sampel air tawar Danau Toba Edu Chemia (Jurnal Kimia dan Pendidikan) 3 222-231.
- Singh, R., Mittal, A., Kumar, M., Mehta, P.K. 2016. Microbial proteases in commercial applications. *J Pharm Chem Biol Sci* 4: 365-374
- Smith, Brad. 2021. "10 yılda CMS inovasyon merkezi; ilerleme ve öğrenilen dersler." *New England Tıp Dergisi* 384.8: 759-764.
- Şahin, Hicret Didar., 2023. Farklı mantar türlerinden doğal boyar madde eldesi ve elyaf boyamada incelenmesi= Natural dyestuff extraction from different mushroom species and investigation in fiber dyeing. MS thesis. Sakarya Üniversitesi.
- Şimşek T., 2006. Türkiye'nin değişik bölgelerinden thermostabil α -amilaz üreten *Bacillus* sp.türlerinin izolasyonu, karakterizasyonu ve α -amilaz geninin klonlanması. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara, 8.
- Tanaka, A. ve Eiichi H. 2002. *Bacillus amyloliquefaciens* a-amilazının inaktivasyon kinetiği ile belirlenen kalsiyum bağlama parametresi." *Biyokimyasal Dergisi* 364.3 635-639.
- Tarakçıoğlu, Y., 1979. An amylase producing maltotriose from *Bacillus subtilis*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49(4):1091-1097.
- Tatar, S. 2007. Termofil moderately halofilik *Bacillus* sp. suşlarından amilaz enzimi üretimi ve endüstriyel kullanım olanaklarının araştırılması. *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Adana*.
- Temizkan, Güler, and Nazlı Arda. 2004. "Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler." *Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul* : 101-119.
- Thomas D. J. 1999. *Starches Book*, Eagen Press. St Paul, Minnesote USA, 3-4., 4-5, 5-7
- Tsou, K., et al. 1998. "Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system." *Neuroscience* 83.2: 393-411.
- Tutar, Uğur. 2012. "Eisenia fetida türü toprak solucanlarından elde edilen farklı ekstraktların bitki patojenleri üzerindeki antibakteriyel ve antifungal aktivitelerinin araştırılması Eisenia fetida türü toprak solucanlarından elde edilen farklı ekstraktların bitki patojenleri üzerindeki antibakteriyel ve antifungal aktivitelerinin araştırılması."

- Uhlig, H. 1988. Industrial enzymes and their applications. John Wiley and Sons Inc., New york, USA, 454 pp.
- Ulutürk, C., Orhan, N., Kıymaz, N. A., & Peksel, A., 2011. Hypocrea Jecorina QM9414 Suşundan Saflaştırılan Pullulanazın İmmobilizasyonu ve Bazı Özelliklerinin İncelenmesi. *Technology*, 48, 260-266.
- Vazquez, A., Cyrus, V. P., Alvarez, V. A., & Moran, J. I. 2012. "Starch/Clay NanoBiocomposites", In Environmental Silicate Nano-Biocomposites (pp. 287-321). Springer London.
- Vazquez, B., Goni, I., Gurruchaga, M., Areizaga, J., Valero, M., Guzman, G.M., 1992, Makromol. Chem., 193(9), 2189.
- Wanderley K.J., Torres F.A.G., Moraes L.M.P., Ulhoa C.J. 2004. Biochemical characterization of α -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. FEMS Microbiology Letters 231: 165-169.
- Whinen, M., and Mantsala, P. 1989. Microbial amylolytic enzymes. Crt. Rev. Biochem. Mol. Bio. 24:329-418.
- Woese, C.R., 1987. Bacterial evolution. Microbiological Reviews, 51: 221-271.
- Woese, C.R., Stackebrandt, E., Macke, T.J., Fox, G.E., 1985. A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. Systematic and Applied Microbiology, 6: 143-151.
- Wiseman A. 1987. Handbook of Enzymes Biotechnology. Second Ed. Chapter 3. The Application of Enzymes in Industry, 274-373 p.
- Yigit, N. Ö., and S. B. Koca., 2011. "The use of enzyme in fish feeds." *Journal of Fisheries Sciences*. com 5.3: 205-212.
- Yumoto, I., Yamaga, S., Sogabe, Y., Nodasaka, Y., Matsyama, H., Nakajima, K., Suemori, A. 2003. *Bacillus krulwichiae* sp. nov., a halotolerant obligate alkaliphile that utilizes benzoate and m-hydroxybenzoate. Int J Syst Evol Microbiol, 53:1531– 1536.
- Yüksel, Dilek.,2009. Farklı özelliklerdeki tekstil desenlerinin günümüzdeki baskı stilleri ile basılması. MS thesis. Marmara Üniversitesi (Turkey).
- Zeikus, J. G., 1979. Thermophilic bacteria: ecology, physiology and technology. Enzyme and Microbial Technology,1(4), 243-252.

ÖZGEÇMİŞ

Seda TORUN. İlk ve orta öğrenimini Hatay Dörtyol’da tamamladı. 2007 yılında Atatürk Üniversitesi Kimya Bölümünden mezun oldu. 2015 yılında Harran Üniversitesi Biyoloji bölümünden mezun oldu. 2021 yılında Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji AnaBilim Dalı’nda Yüksek Lisansa başladı. Mesleki olarak 2008’de hastanede laboratuarda kimyager olarak çalışmaya başladı. Daha sonra eğitimine devam ederek, 2015’de nitelikli okullarda Bölüm Başkanı olarak öğretmenlik yaptı.







EKLER



Ek A. Kullanılan Çözeltiler

Sodyum-Fosfat Tamponu

Enzimlerin pH 6.0 ile pH 8.0 arasında gerçekleştirebilecekleri aktivite düzeylerini saptamak amacıyla kullanılmıştır. Kullanılacak Tampon çözelti hazırlanırken 0.2 M NaH_2PO_4 ile 0.2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ çözeltileri azar azar karıştırılarak istenilen pH aralığındaki yeni karışım eldesi oluşturulur. Hazırlanan istendik pH aralığındaki karışıma distile sudan uygun hacimlerde eklenerek karışım oluşturulur (Temizkan ve Arda, 2004).

DNS (Dinitro Salisilik Asit)

Enzimdeki çalışma faaliyetini bloke etmek amacıyla ve indirgen şeker miktarını belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Hazırlanması aşamalarında, 20 gr Dinitrosalisilik asit, 4 gr fenol, 1 gr sodyum sülfid, 400 gr sodyum-potasyum tartarat (K-Na), 1 lt %2'lik NaOH çözeltisi içinde çözülerek saf su ile 2 lt'ye tamamlanır. DNS ilk olarak bir gece NaOH ile çalkanarak bekletilir. Ertesi gün 2 lt saf su ile tamamlanır.

Tris Tamponu

Enzimlerde pH 8.0 ile pH 12.5 arasındaki çalışma faaliyetlerini belirleyebilmek amacı ile kullanılır. Hazırlanması aşamalarında Tris 100 mM olacak şekilde tartılır ve alınan tris istenilen pH değerine ulaşana kadar uygun NaOH çözeltisinden (0.2 M NaOH ve yüksek pH değerleri için de 2 N NaOH) eklenir (Temizkan ve Arda, 2004).

SDS-PAGE Solüsyonları

SDS PAGE jel ayırıcı ve toplayıcı jel olmak üzere iki farklı kısımdan oluşturulmuştur. Toplayıcı jel olan üstteki katman proteinleri bir araya getirir jele birlikte girmelerini sağlar. Ayırıcı jel protein bantlarının moleküler ağırlıklarına göre birbirinden ayrıldığı ve bölge bölge bantlar oluşturduğu kısımdır.

Ayırıcı Jel Hazırlanması

Stok Solüsyonu	% Poliakrilamid Jel					
Akrilamid (ml) (Ek 1.8.4.)	5	6	7	10	12	15
2 M Tris, pH 8,8 (ml)	5,62	5,62	6,62	5,62	5,62	5,62
%10 SDS (ml)	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
Saf su (ml)	19,10	18,10	17,10	14,10	12,10	9,10
Toplam (ml)	30	30	30	30	30	30

Polimerizasyon için 200 ml %10 amonyumpersülfat ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$) ve 20 µl TEMED ilave edilir.

Toplayıcı Jel Hazırlanması

Stok Solüsyonu	Kullanılan Miktar (ml)
Akrilamid (Ek 1.8.4.)	1,80
0,5 M Tris-base, pH 6,8	3,65
%10 SDS	0,15
Saf Su	9,40

Polimerizasyon için 100 µl Amonyumpersülfat ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$) ve 10 µl TEMED eklenir.

SDS-Nişasta-PAGE

Alfa amilaz aktivitelerinin belirlenmesi için SDS-Nişasta-PAGE hazırlanır.

SDS-Nişasta-PAGE Hazırlanması

Stok Solüsyonu	Kullanılan Miktar (ml)					
Akrilamid	5	6	7	10	12	14
2 M Tris PH:8,8	5.62	5.62	5.62	5.62	5.62	5.62
%10 SDS	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
%1 Nişasta	3	3	3	3	3	3
Saf su	16.10	15.10	14.10	11.10	9.10	7.10
Toplam Hacim	30	30	30	30	30	30

Polimerizasyon için 200 µl Amonyumpersülfat ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$) ve 20 µl TEMED eklenir.

Renatürasyon Solüyonunun Hazırlanması (pH:7.2)

50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Hazır $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 'dan (Ma:156.01) bir litre için 5.998 gr tartılır. Saf su ile bir litreye tamamlanır.

50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Hazır $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 'dan (Ma:177.96) bir litre için 7.098 gr tartılır. Saf su ile bir litreye tamamlanır.

Hazırlanmış çözeltilerden birbirini kullanarak pH 7.2'ye ayarlanır. Daha sonra otoklavlanır.

Ortamdaki SDS'yi uzaklaştırıp proteinin denatürasyonuna yardımcı olması amacıyla %40 izopropanol alkol eklenir. Bir saat çalkama işleminden sonra SDS'nin uzaklaşması sağlanır. Süre sonunda sodyum fosfat solüsyonu (50 mM NaH_2PO_4 ve Na_2HPO_4 karıştırılarak PH 7.2'ye ayarlanmış) 5 mM beta merkaptotanol ve 1 mM EDTA ile muamele edilerek +4°C de bir gece

tutulur. pH 7.2 de hazırlanmış fosfat solüsyonundan 400 ml hazırlamak için 156 µl Beta merkaptotanol ve 0.1169 gr EDTA eklenir ve karıştırılır.

İyodin Boyası

1 gr iyodin, 10 gr potasyum iodid ve 50 ml metanol karıştırılarak saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

TCA (Trikloroasetikasit) (%20 w/v)

20 gr TCA (Trisikloasetikasit) tartılarak alınır, bir miktar saf su içerisinde çözülür. Sonrasında hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlanır

Amonyum Persülfat SDS-PAGE

Çalışmada jel hazırlığında polimerizasyon olayını gerçekleştirmek amacıyla kullanılmıştır. 0,5 gr Amonyum Persülfat tartılıp saf suyla 5 ml'ye tamamlanır.

Fosfat Solüsyonu

Sodyum fosfat monobazik ve sodyum fosfat dibazik bileşikleri ayrı ayrı tartılır.İki bileşen uygun miktarda su ile birleştirilir ve karışım homojenleştirilir.pH'nın 7.2 olması istendiği için, pH'ı 7.2'ye ayarlamak için 0.1 M HCl (hidroklorik asit) veya 0.1 M NaOH (sodyum hidroksit) çözeltisi kullanarak pH'ı ayarlanır. pH ölçüm cihazı kullanarak doğru pH ayalanır. Elde edilen tamponu 500 mL'ye kadar saf su ile tamamlanır.

Bakteri İzolasyonu İçin Kullanılan Besiyeri Hazırlanması

Besiyeri, bakterilerin izolasyonu ve oluşmuş olan bakterilerin stok kültürlerinin saklanması amacıyla hazırlanır.

LB Besiyeri (sıvı)

Bir litre için

(%1) 10 gr tryptone

(%0.5) 5 gr yeast extract (maya ekstraktı)

(%0.5) 5gr NaCl

pH:7.5

LB Besiyeri (katı)

Bir litre için,

(%1) 10 gr tryptone

(%0.5) 5 gr yeast extract (maya ekstraktı)

(%0.5) 5gr NaCl

(%1.5) 15 gr Agar
pH:7.5

Niřastalı LB Besiyeri

Enzim üretimi ve amilaz enzimin aktivitesi belirlemek amacıyla hazırlanır.

Bir litre için,

(%1) 10 gr tryptone
(%0.5) 5gr yesat extract (maya ekstraktı)
(%0.5) 5gr NaCl
(%1.5) 15 gr Agar
(%0.5) 5 gr Nişasta
pH:7.5

600 ml LB Besiyeri (pH 7.5) için;

6 gr tryptone, 3 gr maya ekstraktı, 3 gr NaCl ayrı ayrı tartılır. Sonra hazırlanan 600 ml LB Besiyerini ikiye bölünür. Bölünen LB Besiyerinde

200 ml (sıvı) kısmı otoklavlandıktan sonra erlenlerin % 10'una denk gelecek şekilde pay edilir. Bu durumun sebebi ise aerasyonu sağlayarak oksijen azalmasını önlemektir. Erlen çok dolu olursa hem karıştırmak zorlaşır hem de oksijen azalır.

400 ml (katı) kısım içine 6 gr agar, 2 gr nişasta eklenir. Ekleme işlemi yapıldıktan sonra otoklavlanır. Bu sırada nişasta ve agar erir. Fakat erime her yere eşit karışmayabilir. Bu nedenle otoklavdan çıktıktan sonra çalkama işlemi ile homojen dağılım sağlanır. Sonrasında ise petri kaplara paylaştırılır.