



T.C.  
OSMANIYE KORKUT ATA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gültekin ÖZDEMİR

TERMAL KAYNAKLARDAN SICAKLIĞA  
DİRENÇLİ ALFA-AMİLAZ ENZİMİ ÜRETEN  
BAKTERİ İZOLASYONU VE ENZİMİN KİSMİ  
KARAKTERİZASYONU

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

OSMANIYE – 2019

**T.C.  
OSMANIYE KORKUT ATA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TERMAL KAYNAKLARDAN SICAKLIĞA DİRENÇLİ  
ALFA-AMİLAZ ENZİMİ ÜRETEN BAKTERİ  
İZOLASYONU VE ENZİMİN KİSMİ  
KARAKTERİZASYONU**

**Gültekin ÖZDEMİR**

**BIYOLOJİ  
ANABİLİM DALI**

**OSMANIYE  
AĞUSTOS-2019**

## TEZ ONAYI

### TERMAL KAYNAKLARDAN SICAKLIĞA DİRENÇLİ ALFA-AMİLAZ ENZİMİ ÜRETEN BAKTERİ İZOLASYONU VE ENZİMİN KİSMİ KARAKTERİZASYONU

Gültekin ÖZDEMİR tarafından Doç. Dr. Bahri Devrim ÖZCAN danışmanlığında Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji** Anabilim Dalı'nda hazırlanan bu çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından oy birliği ile **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman:** Doç. Dr. Bahri Devrim ÖZCAN .....  
Zootečni Anabilim Dalı, ÇÜ

**Üye:** Prof. Dr. Hüsniye AKA SAĞLIKER .....  
Biyoloji Anabilim Dalı, OKÜ

**Üye:** Doç. Dr. Makbule BAYLAN .....  
Su Ürünleri Anabilim Dalı, ÇÜ

Yukarıdaki jüri kararı Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ...../...../..... tarih ve ..... /..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Doç. Dr. Coşkun ÖZALP .....  
Enstitü Müdürü, **Fen Bilimleri Enstitüsü, OKÜ**

*Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, çizelge ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.*

## TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, bu çalışma sonucunda elde edilmeyen her türlü bilgi ve ifade için ilgili kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını ve bu tezin Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlandığını bildiririm.

Gültekin ÖZDEMİR



## ÖZET

### TERMAL KAYNAKLARDAN SICAKLIĞA DİRENÇLİ ALFA-AMİLAZ ENZİMİ ÜRETEN BAKTERİ İZOLASYONU VE ENZİMİN KISMİ KARAKTERİZASYONU

Gültekin ÖZDEMİR

Yüksek Lisans, Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Bahri Devrim ÖZCAN

Ağustos 2019, 68 sayfa

Bu çalışmada, Niğde ili Ulukışla ilçesi Çiftahan bölgesi sınırları içinde bulunan kaplıcadan alınan toprak örneklerinden  $\alpha$ -amilaz aktivitesine sahip *Bacillus* izolasyonu yapılmıştır. İzolat bakterisi, *Bacillus* sp. GA4 olarak isimlendirilmiştir. *Bacillus* sp. GA4 izolatına ait  $\alpha$ -amilaz enziminin optimum aktivite sıcaklığı ve optimum pH'sı, sıcaklık stabilitesi, SDS-PAGE zimogram analizi, antibakteriyel aktivitesi ve bazı kimyasalların etkisi araştırılmıştır. Enzimin optimum pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla 6.0-8.0 ve 50 °C olarak bulunmuştur. Enzim 40 °C'de 30 dk. ön inkübasyon sonrasında aktivitesini tamamen korumuştur. Enzim, 50 °C ve 60 °C'de 30 dk. ön inkübasyon sonrasında ise sırasıyla %21 ve %37'lik aktivite kaybına uğramıştır. MgCl<sub>2</sub> ve FeSO<sub>4</sub> enzim aktivitesini sırasıyla %13 ve %12 seviyelerinde indüklerken, CuSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub> ve EDTA sırasıyla %81, %38 ve %33 oranlarında inhibe etmiştir. *Bacillus* sp. GA4  $\alpha$ -amilaz enziminin moleküler ağırlığı SDS-PAGE zimogram analizi ile yaklaşık olarak 55 kDa bulunmuştur. İzolatın CFX, CN, TE, RD, S, Amp ve P antibiyotiklerine karşı hassas, SH antibiyotigine ise dirençli olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre, GA4  $\alpha$ -amilazı mevcut özellikleri ile endüstriyel kullanımlara uygun olmamakla birlikte, moleküler genetik modifikasyonlarla uygun hale getirilebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Sıcaklık stabilitesi, *Bacillus*,  $\alpha$ -amilaz, SDS-PAGE, izolasyon

## ABSTRACT

### ISOLATION OF THERMOSTABLE ALPHA-AMYLASE PRODUCING BACTERIUM FROM THERMAL SPRINGS AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF THE ENZYME

Gultekin OZDEMIR  
M.Sc., Department of Biology  
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Bahri Devrim ÖZCAN

August 2019, 68 pages

In this study, *Bacillus* sp. strains exhibiting  $\alpha$ -amylase activity isolated from the soil samples of the thermal spring those located in the borders of Nigde province, Ulukısla subprovince, Çiftehan region. Isolated bacterium was named as *Bacillus* sp GA4. Optimum activity temperature, optimum pH value, thermal stability, SDS-PAGE zymogram analysis, antibacterial activity and the effect of some chemicals on  $\alpha$ -amylase enzyme of *Bacillus* sp. GA4 were determined. Optimum pH and temperature values of the enzyme were found 6.0-8.0 and 50 °C respectively. Enzyme activity was retained totally after pre-incubation within 30 minutes and at 40 °C. However, enzyme activity was reduced at the rate of %21 and %37 after pre-incubation at 50 °C and 60 °C, respectively. MgCl<sub>2</sub> and FeSO<sub>4</sub> inhibited enzyme activity at levels of %13 and %12, whereas CuSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub> and EDTA inhibited %81, %38 and %33 respectively. The molecular weight of *Bacillus* sp. GA4  $\alpha$ -amylase was found to be approximately 55 kDa by SDS-PAGE zymogram analysis. The isolate was found to be sensitive to CFX, CN, TE, RD, S, Amp and P, while resistant to SH. According to these results, GA4  $\alpha$ -amylase is not suitable for industrial use with its existing properties, but can be made suitable for molecular genetic modifications.

**Key Words:** Thermal stability, *Bacillus*,  $\alpha$ -amylase, SDS-PAGE, isolation



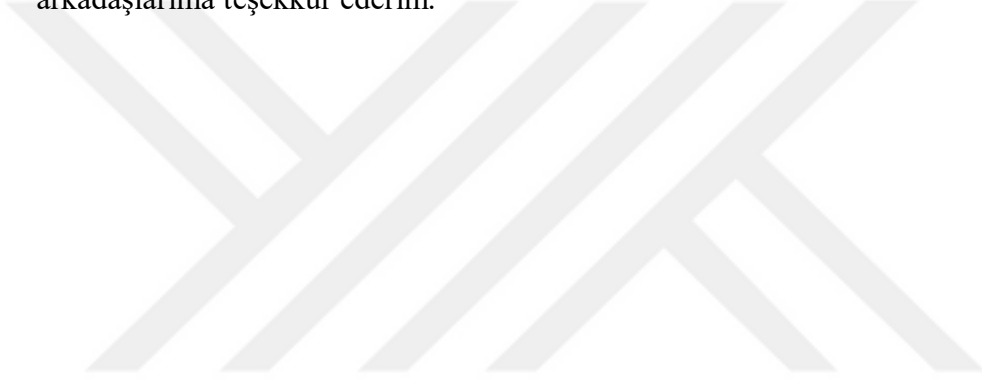
*Çok kıymetli Aileme...*

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez konumun belirlenmesinde ve çalışmaların yürütülmesi sürecinde değerli bilgi ve tecrübeleriyle katkılarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Bahri Devrim ÖZCAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarının her aşamasında değerli yardımlarını esirgemeyen ve sürekli yanımda olan Biyolog Elif DİKKAYA'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca bölümdeki çalışmalarım süresince beni destekleyen diğer bölüm hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.





# İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	
TEZ BİLDİRİMİ	
ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
İTHAF SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR .....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	ix
1. GİRİŞ .....	1
1.1. Enzim Üretim Kaynakları .....	2
1.2. Enzim Türleri .....	4
1.2.1. Proteazlar .....	4
1.2.2. Lipazlar .....	4
1.2.3. $\beta$ -Galaktozidazlar .....	5
1.2.4. Ksilanazlar .....	6
1.2.5. Selülazlar .....	6
1.2.6. Amilazlar .....	7
1.3. <i>Bacillus</i> Türlerinin Genel Özellikleri.....	7
1.3.1. <i>Bacillus</i> Türlerinin Genetik Sınıflandırılması .....	8
1.3.2. <i>Bacillus</i> Türlerinin Endüstriyel Enzim Üretimindeki Önemi .....	9
1.4. $\alpha$ -Amilazlar .....	9
1.4.1. Alkol ve Bira Üretiminde $\alpha$ -Amilazların Kullanılması .....	10
1.4.2. Nişasta Sıvılaştırılmasında $\alpha$ -Amilazların Kullanılması .....	11
1.4.3. Ekmek Sanayinde $\alpha$ -Amilazların Kullanılması .....	11
1.4.4. Tekstil Sanayinde $\alpha$ -Amilazların Kullanılması .....	11
1.4.5. Kağıt Sanayinde $\alpha$ -Amilazların Kullanılması.....	12
1.4.6. Meyve Suyu Sanayinde $\alpha$ -Amilazların Kullanılması.....	12
1.5. Nişasta .....	13
1.6. Termostabil Enzimler .....	13
1.6.1. Termostabil $\alpha$ -Amilazlar.....	15
1.7. Çalışmanın Amacı ve Kapsamı.....	16
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	18

3. MATERYAL VE METOD.....	27
3.1. Materyal .....	27
3.1.1. Cihazlar ve Sarf Malzemeler.....	27
3.1.2. Bakteri Materyali .....	27
3.2. Metod .....	27
3.2.1. Bakterilerin İzolasyonu .....	27
3.2.2. Enzime Ait Bazı Özelliklerin Belirlenmesi .....	29
3.2.2.1. Hücre Dışı Enzimlerin Elde Edilmesi .....	29
3.2.2.2. Enzime Ait Optimum Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi .....	30
3.2.2.3. Enzime Ait Optimum pH Değerinin Belirlenmesi .....	32
3.2.2.4. Enzime Ait Sıcaklık Stabilitesinin Belirlenmesi .....	33
3.2.2.5. Enzimin Zamana Göre Aktivite Seviyesinin Belirlenmesi .....	34
3.2.2.6. Bazı Kimyasalların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi .....	35
3.2.3. SDS-PAGE ve Zimogram Analizleri .....	37
3.2.3.1. Bakteriye Ait Hücre Dışı Enzim Örneklerinin Hazırlanması.....	37
3.2.3.2. SDS-PAGE'nin Hazırlanması.....	37
3.2.3.3. Enzim Örneklerinin Jele Yüklenmesi ve Elektroforezi .....	39
3.2.3.4. Elektroforez Sonrası İşlemler .....	40
3.2.3.5. Zimogram Analizi İle Enzimin Moleküler Ağırlıklarının Belirlenmesi .....	40
3.2.4. İzolatın Antibiyogram Testi.....	41
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	43
4.1. Bulgular.....	43
4.1.1. Amilolitik Bakterilerin İzolasyonu.....	43
4.1.2. <i>Bacillus</i> sp. GA4 $\alpha$ -Amilazının Bazı Enzimatik Özellikleri .....	44
4.1.2.1. <i>Bacillus</i> sp. GA4 $\alpha$ -Amilazının Sıcaklık Optimumu .....	44
4.1.2.2. <i>Bacillus</i> sp. GA4 $\alpha$ -Amilazının pH Optimumu.....	44
4.1.2.3. <i>Bacillus</i> sp. GA4 $\alpha$ -Amilazının Termal Kararlılığı .....	45
4.1.2.4. <i>Bacillus</i> sp. GA4 $\alpha$ -Amilazının Zamana Göre Aktivite Düzeyi .....	46
4.1.2.5. Bazı Kimyasalların <i>Bacillus</i> sp. GA4 $\alpha$ -Amilaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	46
4.1.3. SDS-PAGE ve Zimogram Analizine İlişkin Bulgular .....	47
4.1.4. İzolatın Antibiyogram Testi.....	48
4.2. Tartışma.....	49
KAYNAKLAR.....	52
ÖZGEÇMİŞ.....	68

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Termofilik mikroorganizmalara ait enzimlerin endüstriyel uygulamaları.....	14
Çizelge 1.2. Termostabil $\alpha$ -amilaz enzimine ait optimum sıcaklık ve pH değerleri ile mikroorganizma kaynakları .....	16



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Global enzim piyasası 2016 toplam üretim ve 2021 tahmini üretim miktarı tablosu.....	2
Şekil 3.1. Enzim aktivitesi testi için numaralandırılmış petri kaplarındaki LB-agar plaklarına ekilmiş olan <i>Bacillus</i> izolatları .....	29
Şekil 3.2. Enzim analizi örneklerinin su banyosunda inkübasyonu .....	31
Şekil 3.3. Enzim analizlerinde örneklerin üzerine DNS solüsyonlarının eklenmesi ..	32
Şekil 3.4. SDS-Poliakrilamid jelin hazırlanması .....	38
Şekil 3.5. Hücre dışı proteinleri SDS-PAGE'ye yüklenmesi ve elektroforezi.....	39
Şekil 3.6. İzolatların farklı antibiyotik diskleri ile antibiyogram analizleri .....	42
Şekil 4.1. Toprak numunelerinde <i>Bacillus</i> sporlarının LB-agar plaklarında çimlendirilmesi (A) ve iyot buharı boyaması sonucu izolatların $\alpha$ -amilaz aktivitesi bakımından fenotipik test plak görüntüsü (B) .....	43
Şekil 4.2. <i>Bacillus</i> sp. GA4 $\alpha$ -Amilaz enziminin optimum sıcaklık grafiği .....	44
Şekil 4.3. <i>Bacillus</i> sp. GA4 izolatına ait $\alpha$ -amilaz enziminin optimum pH grafiği ....	45
Şekil 4.4. <i>Bacillus</i> sp. GA4 izolatına ait $\alpha$ -amilaz enziminin termal kararlılık grafiği.....	45
Şekil 4.5. <i>Bacillus</i> sp. GA4 izolatına ait $\alpha$ -amilaz enziminin zamana göre enzim aktivite grafiği .....	46
Şekil 4.6. Bazı kimyasal maddelerin <i>Bacillus</i> sp. GA4 $\alpha$ -amilaz enzimi aktivitesi üzerine etkisi .....	47
Şekil 4.7. <i>Bacillus</i> sp. GA4 izolatına ait toplam proteinlerin SDS-PAGE'de gösterilmesi ve zimogram analizi.....	48
Şekil 4.8. <i>Bacillus</i> sp. GA4 izolatının antibiyogram plak görüntüsü .....	49

## SİMGELER VE KISALTMALAR

$\mu\text{g}$	Mikrogram
$\mu\text{l}$	Mikrolitre
$\mu\text{m}$	Mikrometre
CMCaz	Karboksimetil selülaz
DEAE	Dietilaminoetil
dk.	Dakika
DNS	Dinitro salisilik asit
EDTA	Etilendiaminotetraasetik asit
g/L	Gram/Litre
gr	Gram
kbç	Kilobaz çifti
kDa	Kilodalton
L	Luria besiyeri
LB	Luria Bertani
M	Molar
mA	Miliamper
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mmol/L	Milimol/Litre
nm	Nanometre
OD	Optikal densite
rDNA	ribozomal DNA
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/L	Ünite/litre
U/mg	Ünite/miligram
U/ml	Ünite/mililitre

V	Volt
v/v	Hacim/hacim
w/v	Ağırlık/hacim



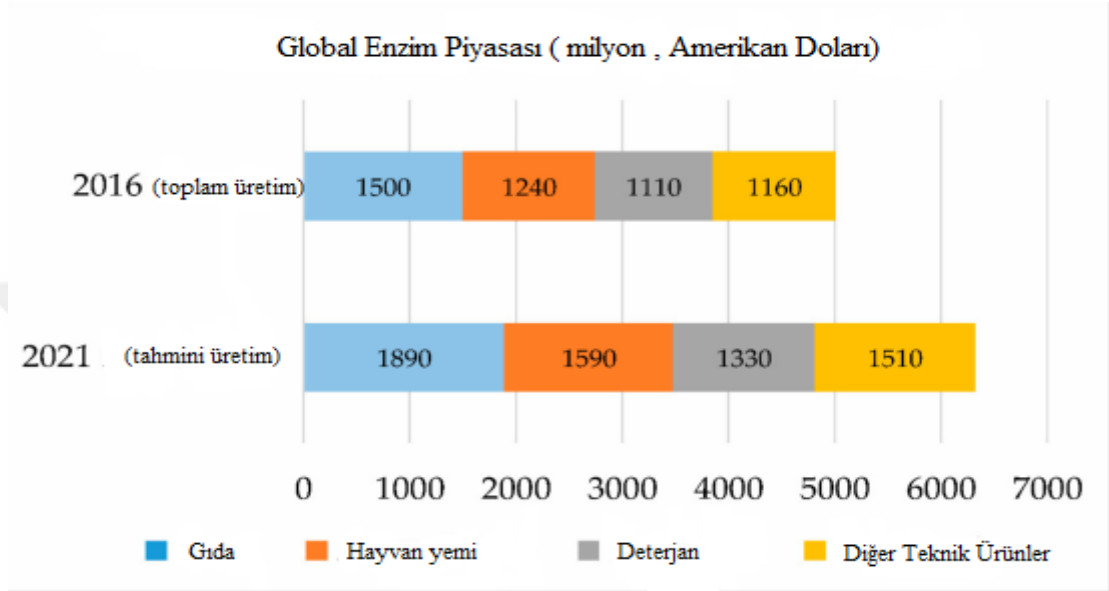
## 1.GİRİŞ

Enzimler, günümüzde hemen her sanayi kolunda yoğun kullanım alanı bulmuş vazgeçilmez biyomoleküllerdir. Kendilerinde herhangi bir değişiklik olmadan reaksiyona girdikleri substratların son ürünlere dönüşmesini katalizlerler. Enzimler, hücrelerdeki metabolik faaliyetlerin tamamında görev alan yönetici molekulldür.

Karbon, oksijen, hidrojen ve azottan oluşan enzimler, organizmaların canlılığını sağlayan ve çevreye adaptasyonunu devam ettiren biyokimyasal reaksiyonlarda katalizör olarak görev yaparlar. Metabolizma faaliyetleri için gerekli olan reaksiyonlar çok sayıda basamakta gerçekleşir ve her bir basamakta spesifik bir enzim görev yapar. (Karademir, vd., 2003; Nelson ve Cox, 2004).

Enzimler kimyasal katalizörlerle karşılaştırıldıklarında, daha az oranda zararlı yan ürün meydana getirmeleri ve daha düşük maliyetli ürün imalatı yapmaları nedeniyle ticari kullanımları daha caziptir. Enzimlerin çeşitli endüstriyel sektörlerde tercih edilmesindeki artış nedenlerinden birisi de yeni geliştirilen immobilizasyon teknolojileriyle suda çözünmeyen matrikslerden yararlanarak defalarca kullanılabilmesidir (Gümüsel, 2002). Endüstriyel enzimler laboratuvarlarda analiz için kullanılanlara nazaran kısmen saflaştırılarak ya da dökme yığın olarak ticari pazarlara sunulur. Endüstriyel enzimler, çok sayıda çeşitli bitkisel, hayvansal ya da mikrobiyal kaynaklardan elde edilir. Günümüzde kullanılan enzimlerin büyük çoğunluğu mikrobiyal kaynaklardan elde edilmektedir. Bu alanda pazarın büyük bölümünü proteazlar ve karbohidrazlar gibi ekstraselüler ürünler oluştururken bununla birlikte glukozoksidaz gibi intraselüler ürünler de yer almaktadır. Endüstriyel enzim üretiminde en önemli dönüm noktalarından birisi de mikrobiyal proteazların toz deterjanlarda kullanılması olmuştur. *Bacillus*'tan üretilen proteazlar ilk olarak 1959 yılında piyasaya sürülürken, 1963 yılında çamaşır tozu üreten ilk büyük firma faaliyete geçmiştir (Whitehurst ve Van Oort, 2009). Enzim teknolojisi OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) tarafından sürdürülebilir endüstriyel gelişim için disiplinler arası bir alan olarak tanımlanmıştır. Uygulama alanları doğrudan endüstriyel ürünlerden başlayıp tıbbi araştırma geliştirme faaliyetlerine kadar çeşitlilik arz etmektedir. Bu nedenle endüstriyel enzimler, biyoteknolojik

ürünler içerisinde önem derecesine göre ilk sırayı almaktadır (Thomas, vd., 2013). Endüstriyel enzim üretimi 1989-1990 yılları arasında dünya piyasalarında 700 milyon dolar seviyesindeyken 2010 senesinde 3.3 milyar dolar seviyesine çıkmıştır. 2015 yılına kadar yaklaşık 4.4 milyar dolara yaklaşacağı tahminleri yapılmıştır (Jaramillo, vd., 2015). Dünya geneli toplam enzim üretimi alanında yapılan başka bir araştırmada enzim üretiminin artarak devam edeceği gösterilmiştir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Global enzim piyasası 2016 toplam üretim ve 2021 tahmini üretim miktarı (Dewan, 2017).

### 1.1. Enzim Üretim Kaynakları

Enzim üretim kaynakları bitkisel, hayvansal ya da mikrobiyal olabilir. Esteraz, papain, üreaz, fisin, beta-amilaz ve aktinidin enzimleri bitkisel kökenli enzimlerden bazılarıdır. Bitkisel kökenli enzimlerin tercih edilmesindeki önemli faktörler şöyle sıralanabilir; toprakların verimli kullanılması, ürünlerin gelişim döngüsü ve tarım yapılacak bölgelerdeki iklim durumu. Ayrıca tarımsal etkinliklerinin regülasyonundan sorumlu ulusal ve uluslararası politik kuruluşların aldığı kararlar ve belirlediği politikalar bitkisel enzimlerin kullanımını doğrudan etkilemektedir (Godfrey ve West, 1996).

Tripsin, katalaz, lipaz ve pepsin hayvansal organizmalardan elde edilen enzimler arasında yer alırlar. Hayvansal kökenli enzimlerin üretiminin gelişmesini ve



büyümesini bitkisel enzimlerde olduğu gibi, hayvancılık sektörünü kontrol eden politik ve tarımsal kuruluşlar etkilemektedir. Birçok ülkede yerli ticari hayvan türlerinin koruma altında olması, hayvanların ve hayvansal dokuların ithalat rejimlerinde katı kısıtlamalar uygulanması hayvansal enzim üretimini sınırlayan diğer etkenler arasında yer almaktadır. Bununla birlikte özellikle virüs kökenli hastalıkların hayvan ve hayvan dokularıyla bulaşma riskinin yüksek olması bu alandaki en önemli endişe kaynaklarından birisidir. Bahsi geçen sorunlar nedeniyle hayvan ve hayvansal kaynaklardan üretilecek ticari değeri olan enzimler önemli bir kısıtlama ile karşılaşmaktadır. Bitkisel ve hayvansal kökenli enzim üretiminde ortaya çıkan tüm bu sorunlar mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin daha revaçta olmasını sağlamıştır (Godfrey ve West, 1996).

Mikroorganizma kaynaklı enzimler, bitkisel veya hayvansal kökenli enzimlerle karşılaştırıldığında birçok avantaja sahiptir; biyokimyasal aktivasyon düzeyleri yüksektir, zararlı yan ürün oluşturmazlar, daha dayanıklıdır, maliyetleri düşüktür, fazla miktarda üretilebilirler (Wiseman, 1987). Enzimler doğada mikrobiyal kaynak olarak çok geniş bir biyoçeşitlilik gösterirler. Mikroorganizmalar zor ve olumsuz çevre şartlarına olağanüstü bir adaptasyon yeteneğine sahiptir. Ölü deniz, Antartika, volkanik çukurlar, termal kaynaklar ve kontamine olmuş topraklar gibi alanlarda elde edilen enzimler farklı karakteristik özellikler gösterirler (Borrelli ve Trono, 2015; Bonugli-Santos, vd., 2015). Dünya genelinde üretilen ticari enzimlerin %80'i mikroorganizma kökenlidir. Kaynak olarak yararlanılan mikroorganizmalar, çoğunlukla bakteriler ve mantarlardır. Mikrobiyal enzimlerin ticari olarak başarıyla kullanılabilmesinin en önemli sebeplerinden ilk sırada gelen özelliği rekombinant teknolojiler ile genetik modifikasyon yapılabilmesidir. Bu sayede sentezlenen enzimin özellikleri değiştirebilir ve yüksek miktarda üretimi mümkün olur. Doğal kaynaklardan yaklaşık 4000 enzim türü saflaştırılmış olup 200 enzim türü endüstriyel amaçlarla kullanılmaktadır. Ticari olarak yüksek öneme sahip olan enzimlerin büyük çoğunluğu (yaklaşık %75'i) hidrolazlar grubuna aittir ve mikroorganizmalardan elde edilirler. Yüksek molekül ağırlığına sahip olan substratları kolaylıkla ürüne dönüştürürler. Hidrolazlar aynı zamanda substrat spesifitesi geniş olduğu için çok sayıda farklı molekül türüne etki edebilirler (Sharma, vd., 2001).

## 1.2. Enzim Türleri

Biyoteknoloji endüstrisi son yıllarda önemli gelişmeler kaydederek çeşitli enzim türleri üzerinde araştırma geliştirme faaliyetlerinde bulunmaktadır.

### 1.2.1 Proteazlar

Proteaz enzimi canlı organizmaların hemen hepsinden rastlanılabilen, büyüme ve çoğalma aktivitelerinde aktif görevi olan bir enzimdir (Bulut, 2007). Bitkisel, hayvansal ya da mikrobiyal kaynaklardan izolasyon yapılabilmektedir. Uzun yıllardır deterjan ve gıda endüstrisinde kendine kullanım alanı bulmuştur. Genellikle kararlı olduğu optimum sıcaklık ve pH değerleri çok yüksektir. Proteaz enzimlerinin pH değerleri deterjan endüstrisinde tercih edilmelerinin en önemli nedenidir (Suhartati, vd., 2008). Substrat olarak proteinler üzerinde etki ederler ve protein hidroliz reaksiyonlarını katalizlemeleri nedeniyle canlı hücrelerde fizyolojik yönden, ticari açıdan ise endüstriyel uygulamalarda oldukça önemlidirler. Ticari olarak kullanıldığı çeşitli sektörler; tekstil, deri, yem, gıda, fotoğrafçılık, ilaç sanayi ve sağlık alanıdır (Bulut, 2007). Enzimin sınıflandırılması aktivitesinin optimum olduğu pH aralığı esas alınarak asit, nötral ve alkalın proteazlar olmak üzere 3 temel grup şeklinde yapılmaktadır. Alkalın proteazlar deterjan üretiminde kullanılan katkı maddeleri arasında yer alır. Çevre kirliliğini azaltması ve temizleme işlemlerinde düşük yıkama sıcaklığında etkili olmaları nedeniyle kimyasal katalizörlere göre üstünlüğe sahiptir. Günümüz enzim piyasasında *Bacillus* türlerinden üretilen alkalın proteazlar yüksek bir orana ulaşmıştır (Mukherjee, vd., 2008). Termofilik ve alkalifilik *Bacillus* türlerinden yüksek sıcaklık ve pH'da kararlı alkalifilik proteazlar elde edilir (Bulut, 2007).

### 1.2.2. Lipazlar

Lipazlar lipid moleküllerinin temel yapısında trigliserid molekülünün yağ asidi zincirlerini yeni bir molekül ile değişiklik yapabilme yeteneğine sahip enzimlerdir (Barros, vd., 2010; Garcia-Galan, vd., 2013). Lipazlar, özel kompozisyonlara sahip yağ molekülleri üretilirken kontamine bir son ürün oluşmaması, yüksek katma değer elde edilmesi ve çevreye zarar verilmemesi nedeniyle kimyasal katalizörlere göre daha

üstün özelliklere sahiptir (Ray, 2012; Garcia-Galan, vd., 2013). Doğada çok yaygın olarak canlılarda rastlanan lipazlar bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar tarafından üretilmektedirler (Choudhury ve Bhunia, 2015). Peynir lezzetini artırmak için geleneksel olarak çeşitli hayvanlardan elde edilen pankreas enzimleri ya da gastrik dokulardan elde edilen enzimler kullanılırken günümüzde mikrobiyal kaynaklı lipazlar kullanılmaktadır (Aravidan, vd., 2007). Trans yağların insan sağlığına çok zararlı etkilerinin kanıtlanmasının ardından yağ endüstrisinde hidrojenizasyon yöntemlerinde önemli teknolojik gelişmeler sağlandı. Bu kapsamda katalizör ihtiyacı için kimyasal alkalın ya da enzimatik işlemler geliştirildi. Spesifik lipaz enzimleri yağ asidini gliserol molekülüne bağlamak için uygun pozisyonu değiştirmeden gerçekleştirmesi nedeniyle üstünlük sağlamaktadır (Messias, vd., 2009).

### 1.2.3. $\beta$ -Galaktozidazlar

$\beta$ -Galaktozidaz enzimleri selüloz ve benzeri farklı karbonhidrat makromoleküllerde glikozları bağlayan  $\beta$ -1,4-D-glikozidik bağlarının hidrolizini katalizler. Tanımlandığı 1951 yılından günümüze kadar bu enzim üzerinde birçok çalışma yapılmıştır. Farklı mikroorganizma türlerinde, hayvanlarda ve bitkilerde yaygın olarak gözlenmektedir (Cohn ve Monod, 1951; Appel, vd., 1965; Kurz ve Wallenfels, 1974).  $\beta$ -Galaktozidaz glikozil hidrolazların grubu içinde yer alan bir enzimdir. Bu enzim grubu, ilk önceleri fonksiyonel benzerlik esas alınarak sınıflandırılırken günümüzde aminoasit dizilimi temel alınmaktadır. Aminoasit dizi benzerliklerine göre 106 glikozil hidrolaz (GH) ailesi olarak sınıflandırılmıştır (Henrissat, 1991; Henrissat ve Balroch, 1996). 106 glikozil hidrolaz (GH) enzimleri, günümüzde 4 farklı familya altında yer almaktadır: GH-1, GH-2, GH-35 ve GH-42. Endüstriyel potansiyelleri nedeniyle üzerinde sıklıkla araştırma yapılan önemli gruplardan biri GH-42 olup ekstremofil mikroorganizmalar tarafından üretilir. GH-2 grubundaki  $\beta$ -galaktozidaz enzimi üzerinde çok sayıda çalışma yapılmıştır (Gül-Güven, vd., 2007; Holmes ve Dyll-Smith, 2000; Ohtsu, vd., 1998).  $\beta$ -Galaktozidaz üreten termofil bakteriler insan vücut sıcaklığında üreyemedikleri için patojenik özelliğe sahip değildir ve sağlık için tehlike oluşturmazlar, bu nedenle birçok uygulama için yüksek potansiyele sahiptirler (Tanrıseven ve Doğan, 2002).  $\beta$ -galaktozidaz süt laktozunu katalize ederek hidrolizini

gerçekleştirir ve bu nedenle süt endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Biswas, vd., 2003).

#### 1.2.4. Ksilanazlar

Ksilanazlar, ksilan molekülünü katalize ederek hidrolize eden enzimlerdir. Doğada bakteri, maya ve funguslara ait çeşitli mikroorganizma türleri tarafından üretilmektedir. Ksilanın yapı taşı olan ksiloz molekülleri  $\beta$ -1,4 bağları ile birbirine bağlanarak uzun zincilerden meydana gelen bir makromolekül oluştururlar. Ksilan doğada biyokütlenin %30-35'ini oluşturan hemiselülozun temel bileşenidir. Özellikle kâğıt, yem ve gıda gibi temel endüstrilerin arıtma ve geri dönüşüm uygulamalarında ksilanaz enzimi kendine kullanım alanı bulmaktadır (Sargın ve Öngen, 2003). Endüstriyel ksilanaz enzimi üretiminde genellikle bakteri ve fungus türleri kullanılmaktadır. *Bacillus* ve *Thricoderma* cinslerine ait farklı türler üzerinde çalışmalar hâlihazırda devam etmektedir (Güneri ve Dağlıoğlu, 2008). Çevresel kanunlardaki kısıtlamalar, kâğıt endüstrisinde ağartma kimyasalı olarak kullanılan klor kullanımını sektörün önemli bir sorunu haline getirmiştir. Bu durum kâğıt hamuru ağartma prosesinde ksilanaz enzimi kullanılması ile ilgili çalışmalara dikkat çekmektedir (Eren-Kıran, vd., 2006). Unlu gıda sektöründe ise ksilanazlar, un kalitesindeki farklılıktan kaynaklanan sektör sorunlarının giderilmesinde kullanılmaktadır (Güneri ve Dağlıoğlu, 2008).

#### 1.2.5. Selülazlar

Doğadaki organik kütlenin en büyük kısmını oluşturan selüloz, bitkisel kaynaklıdır ve bir disakkarit olan sellobiyozdan oluşan bir makromoleküldür (Lamed, vd., 1998). Selüloz yapısal olarak sert bir maddedir ve fibriller oluşturarak bitki hücre duvarını meydana getirir. Bitki kütlelerinin %40'ını selülozdan meydana gelir, yaklaşık 15.000 glikoz molekülü  $\beta$ -1,4-glikozidik bağlar ile lineer bir şekilde bağlanarak selülozu oluşturur. Selüloz hidrolizini katalizleyen selülaz enzimleri genellikle büyük oranlarda mantar ve bakterilerden elde edilmektedir. Selülaz enzimleri, alkol üretimi, tekstil, deterjan, fırıncılık, yem, zirai geri dönüşümü gibi ileri biyoteknolojik uygulamaların olduğu birçok sektörde geniş çapta kullanılmaktadır (Niehaus, vd., 1999). Bakteri ve

funguslardan elde edilen ticari öneme sahip birkaç selüloz enzimi vardır. Selüloz enzimi üretiminde sıklıkla başvurulmuş mikroorganizma kaynakları *Trichoderma* (Teeri, vd., 1998), *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Bacillus* (Tomme, vd., 1995; Ito, 1997)'lerdir.

### **1.2.6. Amilazlar**

Amilazlar nişastanın şeker moleküllerine yıkılmasını katalizleyen enzimlerdir. Nişasta, polisakkaritlerin depolanmasını sağlayan, insan beslenme düzeninin ana öğelerinden biridir. Bu nedenle çeşitli gıda ürünlerinin enzimatik proseslerinde kullanılmaktadır (de Souza ve de Oliveira-Magalhães, 2010). Nişasta amilolitik enzimler tarafından indirgenir. Amilazlar hayvansal, bitkisel ya da mikrobiyal kaynaklardan elde edilse de endüstriyel üretimlerde kısa sürede sonuç alınması nedeniyle mikroorganizmalar kullanılmaktadır (Burhan, vd., 2003). Nişasta sınıflandırma, şekerleşme, mayalama ile üretilen çeşitli gıda ürünleri, damıtmaya dayalı endüstriyel ürünler, kâğıt sanayi, tekstil ürünleri, deterjan endüstrisi gibi birçok alanda kullanımının artması  $\alpha$ -amilaz enziminin üretimine daha çok önem verilmesine neden olmuştur (Gupta, vd., 2003). Günümüzde tıp ve analitik kimya alanında da amilaz kullanımının artması biyoteknolojinin sınırlarını genişletmektedir. Endüstriyel enzimlerin büyük çoğunluğu mikroorganizmalardan ekstraselüler olarak temin edilmektedir. Bu tür enzimler içerisinde  $\alpha$ -amilaz ticari değer olarak en üst sırada yer almaktadır. Bakteriler ve mayalar hücre dışı sindirim amacıyla amilaz enzimlerini hücre zarlarından dışarı salgırlar. Çözünmüş nişastayı glukoz ve maltoza indirgeyerek hücre içine alıp besin olarak kullanırlar. Mikrobiyal amilaz üretimi klasik kimyasal metotlara göre daha kolay reaksiyon şartları sağladığı için tercih edilmektedir (Divakaran, vd., 2011)

### **1.3. *Bacillus* Türlerinin Genel Özellikleri**

*Bacillus* cinsi içerisinde sınıflandırılan mikroorganizmalar, çomak şekilli, endospor oluşturan, aerobik ya da fakültatif aerobik gram pozitif bakterilerdir. Bazı türlerinde bakterinin yaş ilerlemesine bağlı olarak gram negatife dönüşüm olabilir. Bu cinse ait birçok tür çok geniş bir fizyolojik yeteneğe sahip olmalarından dolayı hemen hemen

her türlü doğal çevre şartlarında varlıklarını sürdürebilirler. Arktik topraklardan, tatlı sulara, denizlerden çöllere kadar çok çeşitli habitatlarda bulunabilirler. Her hücre sadece bir adet endospor oluşturur. Sporlar sıcaklık, soğukluk, radyasyon, kuruma ve antiseptik maddelere karşı koruma sağlar. *Bacillus anthracis* gibi, omurgalılarda şarbon hastalığına neden olan türler olduğu gibi böceklerde hastalığa neden olan *Bacillus larvae* gibi türleri de vardır. İnsan ve çiftlik hayvanlarında hastalığa neden olan *Bacillus cereus* gibi patojen türleri bulunmaktadır. *Bacillus* cinsine ait birçok tür zararsız ve çürükçüdür (Turnbull, 1996).

Sıcaklığa dayanıklılık, asidik-alkali ortamlara tolerans ve büyüklük gibi nitelikleri her türün kendine özeldir: psikrofilik, termofilik, mezofilik, hipertermofilik, alkalifilik, halofilik türler *Bacillus* cinsi içinde görülür ve hücre büyüklükleri farklılık arz eder. Örneğin *Bacillus subtilis* mezofilik bir bakteri olup en düşük 5-20 °C ve en yüksek 45-55 °C sıcaklıklarda gelişir. Tuzluluk derecesi (salinite) en yüksek %7 NaCl (w/v) oranına kadar çıkabilir. *Bacillus subtilis* hücre büyüklüğüne 0.7-0.8 µm ile 2.0-3.0 µm arasında rastlanmaktadır (Zeigler ve Perkins, 2009).

*Bacillus* cinsi bakterileri türlere göre tek ya da koloni halinde yaşayabilirler. Kolonilerin renk, görünüm gibi fiziksel özellikleri ile besiyeri içeriği gibi çeşitli faktörlerden etkilenebilir. Büyük çoğunluğu normal şartlarda pigment üretmez ancak besiyerinde kullanılan katkı maddelerine göre farklı renklerde pigment oluşumuna rastlanılmaktadır (Rosovitz, vd., 1998; Sneath, 1986).

### **1.3.1. *Bacillus* Türlerinin Genetik Sınıflandırılması**

*Bacillus* cinsi türlerinde 16S rRNA sekans analiz yöntemi, belirli fenotipik özelliklere göre ayrımı yapılamayan bakterilerin tanımlanmasını sağlaması nedeniyle bu bakterilerin sınıflandırılmasında devrim etkisi yapmıştır (Ash, vd., 1991). Bu gelişmenin ardından taksonomistler dünyanın birçok farklı bölgesinden ve doğanın hemen hemen her habitatından *Bacillus* türleri tanımlamaya başlamışlardır. *Bacillus* türleri için daha önce yapılmış olan klasik sınıflandırma radikal olarak değişime uğramıştır (Zeigler ve Perkins, 2009).

### 1.3.2. *Bacillus* Türlerinin Endüstriyel Enzim Üretimindeki Önemi

*Bacillus* türleri özellikle amilaz enzimlerinin üretiminde geniş bir kullanım alanı bulmuştur. En çok tercih edilen ve önemli olan türleri arasında *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis* (Fogarty ve Kelly, 1980), *Bacillus stearothermophilus* (Wind, vd., 1994), *Bacillus subtilis* (Takasaki, 1983), *Bacillus megaterium* (Brumm, vd., 1991) ve *Bacillus circulans* (Takasaki, 1985) yer alır. *Bacillus* türlerinin kullanıldığı biyoteknolojik proseslerde çeşitli substratlar kullanılmaktadır. Nişasta (Prabakaran ve Pugalvendhan, 2009), muz kabuğu (Shaista-Kokab, vd., 2003), buğday kepeği ve pirinç (Anto, vd., 2006) üzerinde substrat olarak çalışmalar yapılmıştır. Ticari ve bilimsel olarak probiyotik özellikleri bilinen, spor oluşturmeyen laktik asit bakterileri yanında spor oluşturan bir bakteri grubu olan *Bacillus* türleri de probiyotik nitelikleri ile dikkat çekmiştir. Bu özelliği in vitro ve in vivo ortamlarda araştırılmıştır. *Bacillus* türlerinin yüksek asit toleransı ile düşük ve yüksek sıcaklık stabilitesi probiyotik ürünlerin üretiminde tercih edilmesine neden olmuştur (Bader, vd., 2012).

### 1.4. $\alpha$ -Amilazlar

$\alpha$ -Amilazlar (endo-1,4- $\alpha$ -D-glukan glukohidrolaz, E.C.3.2.1.1), bir polisakkarit molekülü olan nişastayı meydana getiren glikoz monomerleri arasındaki  $\alpha$ -1,4 glikozidik bağlarını hidrolize ederek katalizleyen enzimlerdir.  $\alpha$ -Amilazlar ilaç sanayinden üretilen spesifik maddelerden nişastanın parçalanarak glukoz şuruplarının elde edildiği dev gıda fabrikalarına kadar geniş bir kullanım alanı bulan endüstriyel enzimlerdir (Sivaramakrishnan, vd., 2006).  $\alpha$ -Amilaz 30 kadar tür içeren amilaz enzimi ailesi içinde en önemlisi olup; aminoasit benzerliğine göre sınıflandırma yapıldığı için tür sayısı konusunda çeşitli karışıklıklar olabilmektedir (MacGregor, vd., 2001). Bu enzime hayvan, bitki ve mikroorganizma türlerinde doğal olarak sıklıkla rastlanmaktadır. Biyoteknolojik olarak  $\alpha$ -amilaz üretiminde fungus, maya ve bakteriler kullanılmaktadır (Gupta, vd., 2003). Enzimin ticari olarak en çok tüketildiği nişasta endüstrisi proseslerinde, pH ve sıcaklık optimal değerleri nedeniyle bakterilerden elde edilen çeşitleri fungustan elde edilenlere tercih edilmektedir. Enzimin mikrobiyal olarak yüksek oranda saflaştırılıp kristalize edildiği türler: *Bacillus amyloliquefaciens*,

*Bacillus lincheniformis*, *Bacillus subtilis* var. *sacchariticus*, *Bacillus coagulans*, *Pseudomonas saccharophila* ve *Aspergillus oryzae* (Robyt, 2009). Nişasta molekülünü katalizleyerek gerçekleştirdiği hidroliz sonucu glikoz, dekstrin ve limit dekstrinler son ürün olarak ortaya çıkar. Laboratuvarında yapılan kimyasal analiz işlemlerinde modifiye nişasta ya da çözünür nişasta kullanılmaktadır. Enzim aktivitesini belirleyebilmek için çeşitli fiziksel ve kimyasal metotlar kullanılabilir (Bernfeld, 1955; Gupta, vd., 2003). Mikrobiyal kaynaklı farklı  $\alpha$ -amilaz enzimlerine ait moleküler, kimyasal ve fizyolojik özellikleri ile ilgili çok sayıda araştırma yapılmış ve sonuçları yayınlanmıştır. Enzimin substrat spesifitesi her tür için farklıdır ancak genel olarak değerlendirildiğinde azdan çoğa doğru; maltotrioz, glikojen, siklodekstrin, amilopektin, amiloz, nişasta olarak sıralanmaktadır. Optimum pH değerleri 2.0-12.0 arasında geniş bir aralıkta yer almaktadır (Odibo ve Ulbrich-Hofmann, 2001; Kusuda, vd., 2003; Moreira, vd., 2004; Wanderley, vd., 2004). Bakteri ve fungal türlerinden elde edilen  $\alpha$ -amilaz enzimi üzerinde uzun yıllar boyunca yapılan araştırmalar, optimum pH değerinin 4.0 ile 11.0 arasında değiştiğini ortaya çıkartmıştır (De Mot ve Verachtert, 1987; Khoo, vd., 1994; Aquino, vd., 2003; Kusuda, vd., 2003; Moreira vd., 2004). Optimum sıcaklığı düşük olan *Aspergillus ochraceus* amilazı için 30°C gerekirken, optimum sıcaklığı yüksek olan *Thermococcus aggregans* ve *Myceliophthora thermophila*  $\alpha$ -amilazları için genellikle 100-130°C gerekmektedir.  $\alpha$ -Amilazların moleküler ağırlıkları 10 ile 210 kDa arasında farklılık gösterir (Gupta, vd., 2003).  $\alpha$ -Amilazların uygulama alanı oldukça genişlemiş ve çeşitlenmiştir. Bu enzimler, nişastanın sıvılaştırılmasında, ekmekçilikte, tekstil, kâğıt, meyve suyu endüstrisinde, alkol fermentasyonunda kullanılmaktadır (Whitehurst ve Van Oort, 2009).

#### **1.4.1. Alkol ve Bira Üretiminde $\alpha$ -Amilazların Kullanılması**

Alkol ve bira üretiminde 2006 yılından itibaren dünya genelinde yaşanan tahıl üretim miktarı ve kalitesinde yaşanan sorunlar bu endüstri dalının biyoteknolojik yeniliklere daha çok ihtiyaç duymasına neden olmuştur. İklim değişiklikleri, gıda endüstrisinin diğer sektörlerinin artan talebi gibi nedenler bira üretiminde kullanılan arpa, mısır, buğday, süpürge darısı ve prinç gibi bitkilerin üretim miktarını ve kalitesini düşürmüştür. Bira teknolojisinde en çok kullanılan enzimler  $\alpha$ -amilaz, proteaz ve



ksilanazlardır. Ticari enzimler kullanılarak daha ucuz ve kalitesi düşük ham maddelerden bira üretimi mümkün olmaktadır (Whitehurst ve Van Oort, 2009).

#### **1.4.2. Nişasta Sıvılaştırılmasında $\alpha$ -Amilazların Kullanılması**

$\alpha$ -Amilaz enzimi nişasta sıvılaştırma prosesinin temel katalizörüdür. Nişasta sıvılaştırılması jelatinleştirme, sıvılaştırma ve sakkarifikasyon olarak 3 aşamada gerçekleştirilir. Her aşamada *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Aerobasidium pullulans*, *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* benzeri mikroorganizma kaynaklı termostabil  $\alpha$ -amilaz kullanılmaktadır.

#### **1.4.3. Ekmek Sanayinde $\alpha$ -Amilazların Kullanılması**

$\alpha$ -Amilazlar ekmek sanayinde ürün kalitesini artırmak ve bayatlamayı önlemek gibi birçok amaç için kullanılmaktadır. Ekmek yapımında en önemli aşama olan maya fermentasyonu için hamur içerisinde yeterli oranda monomer halinde sakkarit bulunması gerekmektedir. Ancak unlarda ürün kompozisyonunda bulunan şeker miktarı %0.1-0.5 gibi oldukça düşük bir değerde olup nişasta miktarı ise çok yüksektir. Amilaz enzimleri unun içerdiği bu yüksek miktardaki nişastayı parçalayıp monomere indirgemekte ve maya fermentasyonu için ihtiyaç duyulan şeker miktarını artırmaktadır. Kalitesi yüksek buğdaydan çekilen un dahi amilaz içeriği olarak zayıftır. Yine unda bulunabilecek enzim miktarı ürün kalitesine ve verimine bağlı olarak farklılık arz edebilir. Ülkemizde kurak iklim koşullarında yetiştirilen buğdaydan elde edilen un içeriğinde protein miktarı ve kalitesini arttırırken  $\alpha$ -amilaz oranının daha düşük olmasına neden olmaktadır. Hasat zamanı yağmura maruz kalmayan ve silo içinde çimlenmeye başlamamış tahıl ürünlerinin  $\alpha$ -amilaz içeriği azdır. Bu nedenlerle ekmekçilik sektöründe  $\alpha$ -amilaz enzimi yaygın olarak kullanılmaktadır (Elgün ve Ertugay, 1995).

#### **1.4.4. Tekstil Sanayinde $\alpha$ -Amilazların Kullanılması**

Günümüzde endüstriyel enzim kullanımı tekstil sektörünün ayrılmaz bir parçası olmuştur. Proses basamaklarının en son aşaması iki ayrı enzim tarafından

gerçekleştirilir. İlk olarak son ikmal hazırlık alanında haşıl sökmek için amilazlar kullanılır. İkinci olarak selülazlar yumuşatma, biotaşlama, pamuklu kumaşların tüylenmesini engelleme gibi işlemlerde kullanılır. Son yıllarda pektinazlar, katalazlar, lipazlar, ksilanazlar ve proteazlar da kullanılmaya başlanmıştır. Boyar maddenin etkisinin azaltılması, kot kumaşlarında soldurma, peroksit arındırma, bio-ovalama işlemleri için enzim kullanımı artmaktadır (Cavaco-Paulo ve Gubitz, 2003; Chelikani, vd., 2004; Barrett, vd., 2003; Sharma, 1993; Nalankilli, 1998; Shenai, 1990).

#### **1.4.5. Kâğıt Sanayinde $\alpha$ -Amilazların Kullanılması**

Kâğıt endüstrisi proseslerinde  $\alpha$ -amilazlar çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. İşleme sokulmamış ham haldeki nişastanın viskozitesi yüksektir ve kâğıt kaplama işlemi için uygun değildir. Enzimden yararlanılarak yüksek molekül kütlesi ve düşük viskozite ihtiyacı karşılanmış olur (Gupta, vd., 2003).

#### **1.4.6. Meyve Suyu Sanayinde $\alpha$ -Amilazların Kullanılması**

Biyoteknolojik gelişmelerin en çok etki ettiği sektörlerden birisi de meyve suyu sanayidir. Hidrolazlar ve oksidoredüktazlar en popüler gruplar olarak öne çıkmaktadır. Ürün geliştirme aşamasında aroma, lezzet ve renk özellikleri için sıklıkla enzim kullanılmaktadır (Uenojo ve Pastore, 2007). Meyve suyu endüstrisinde en büyük problemlerinden biri de olgunlaşmadan toplanmış olan meyvelerden kaynaklanan bulanıklık sorunudur. Bu nedenle  $\alpha$ -amilaz özellikle elma ve armut suyu üreten fabrikalarda berraklaştırma işlemi için kullanılır (Ekşi, 1998; Sarıkaya, 1988).

### **1.5. Nişasta**

Doğadaki bitkilerin çok büyük çoğunluğunda nişasta, besinlerin depolanmasında görev yapan polisakkarit yapıda bir makromoleküldür. Fotosentez süreçleri nişasta üretimi ile son bulur. Bitkiler gece ışık yokluğunda genelde tohum ve kök hücrelerinde yer alan amiloplastta nişasta sentezler. Hücrede daha sonraki aşamada suda çözünmeyen granüller olarak depolanır. Nişasta granüllerinin büyüklüğü ve şekli bitkinin türüne göre farklılık gösterir (Van der Maarel, vd., 2002). Nişastanın

yapıtaşları yüksek molekül ağırlığına sahip polimer yapıdaki amiloz ve amilopektindir (Metin, vd., 2010). Amiloz,  $\alpha$ -1,4 glikozidik bağ ile bağlı glikoz moleküllerinden oluşan lineer bir polimerdir (James ve Lee, 1997; Norouzian, vd., 2006). Patates kökenli amilozun polimerizasyon derecesi 1000 ile 6000 arasında iken mısır ya da buğdaydan elde edilen amiloz, 200 ile 1200 arasında polimerizasyon derecesine sahiptir. Nişastanın yapısındaki amiloz oranı %0-75 arasında değişmekle birlikte, genel olarak ortalama değer %20-25 arasındadır (Van der Maarel, vd., 2002). Amilopektin molekülünde glukoz molekülleri  $\alpha$ -1,4 bağları ile doğrusal olarak bağlıdır. Her 24-30 glukoz biriminde bir  $\alpha$ -1,6 bağı ile bir dal başlar. Amilopektin molekülü ortalama 2.000.000 glukoz molekülünden meydana gelir. Doğadaki toplam biyoküttele içerisindeki yüksek oranı bu nedendir (Buleon, vd., 1998). Hücre içerisinde nişasta granülleri kristal ve kristal olmayan bölgelerde yer alır. Amiloz, kristal olmayan bölgelerde görülür, yumru ve kök nişastalarındaki kristal bölgelerde ise sadece amilopektin vardır (Van der Maarel, vd., 2002).

## 1.6. Termostabil Enzimler

Endüstriyel önemi çok yüksek olan termostabil enzimler genellikle mikroorganizma kökenlidir (Wiseman, 1987). Ekstremofilik enzimler endüstriyel proseslerde yüksek sıcaklıkta patojenik etkilerin azaltılmasını sağlar. Enzimi oluşturan proteinler değişik denatürasyon şartlarına karşı oldukça dayanıklıdır. Bu proteinlerin yapısı incelendiğinde mezofilik proteinlere karşı daha fazla  $\alpha$  heliks ve  $\beta$  tabakası içerirler. Ayrıca kimyasal analiz yöntemlerinde önemli bir parametre olan katlanma sayısı bu proteinlerde çok yavaştır. Bu özelliğin proteinlerdeki yüksek toleransın nedenlerinden biri olduğu tahmin edilmektedir (Fujiwara, 2002; Haki ve Rakshit, 2003; Van Den Burg, 2003). Termostabil enzimlerin en önemli avantajlarından birisi de proseslerde yan ürün olarak ortaya çıkan zararlı maddelerin biyolojik olarak zararsız bir şekilde ortadan kaldırılabilmesidir ki böylece çevresel etki anlamında da önem kazanmaktadır (Gül-Güven, 2007). Birçok endüstri türünde proseslerde yüksek sıcaklık ihtiyacı söz konusudur ve genellikle 50 °C'nin üzerinde gerçekleştirilmektedir (Kristjansson ve Asgeirsson, 2002). Bu nedenle termofilik mikroorganizmalardan yeni enzimlerin geliştirilmesi biyoteknolojik araştırmalarda en çok ağırlık verilen konulardan birisi olmuştur. Termofil grubundaki mikroorganizmalardan elde edilen enzimler (Çizelge

1.1) sıcaklığa gösterdikleri yüksek toleranstan dolayı günümüzde oldukça fazla ticari kullanım alanı bulmuştur (Demirjian, vd., 2001; Gül-Güven, 2007).

Çizelge 1.1. Termofilik mikroorganizmalara ait enzimlerin endüstriyel uygulamaları  
(Demirjian, vd., 2001)

Mikroorganizma	Enzimler	Uygulama
İlımlı termofiller (45-65°C)	Amilazlar	Nişasta hidrolizi, Kâğıt beyazlatma
Termofiller (65-85 °C)	B-galaktozidaz	Süt ve süt ürünlerinde laktoz hidrolizi
Hipertermofiller (<85 °C)	DNA polimerazlar	Ekmekçilik, deterjan sanayisi

Endüstriyel proseslerde yüksek sıcaklık birçok avantaja sahiptir: organik bileşiklerin çözünürlüğü artar, substratın viskozitesi düşer ve organik bileşiklerin difüzyon katsayısı artar. Yüksek sıcaklık ile gelen kolaylıklar prosesin daha küçük hacimlerde gerçekleştirilmesini sağlar (Gül-Güven, 2007). Termostabil proteinler mezofilik proteinlerle yapısal olarak karşılaştırıldığında benzer sekonder ve tersiyer yapılaraya sahip olmalarına rağmen aminoasit içeriklerinin ve yan zincir etkileşimlerinin önemli oranda farklı olduğu görülmüştür. Aynı zamanda termostabil proteinlerin yapısında çok miktarda yüklü ve hidrofobik aminoasit vardır (Fujiwara, 2002). Bütün bu farklılıklara rağmen her iki protein türü de aynı katalitik mekanizmaya, yüksek dizi benzerliğine ve üç boyutlu yapı benzerliğine sahiptirler. Termostabil enzimler sıcaklığa gösterdikleri yüksek toleransı ortak genel özelliklerden dolayı sahip olmazlar. Her termostabil enzimin kendine özel farklılığı vardır. Bunlar artan hidrojen sayısı ve tuz köprüleri, hidrofobik merkezin farklı işleyişleri, prolin aminoasit sayısındaki değişkenlikler ve zincir yapı içine gömülü olan amino asitlerin sayısıdır. (Fitter, vd., 2001). Bu proteinlerin sıcaklık stabilitesi iki zıt özelliği arasında denge kurulmasıyla sağlanır. Bu nitelikler proteinin fleksibilitesi ve sertliğidir. Termostabil enzimler mezofilik olanlara nazaran oda sıcaklığında daha sert yapıda olurlar (Bruins, vd., 2001). Son zamanlarda Antartika'da yaşayan ekstremofillerden elde edilen termostabil enzimler günümüzde oldukça ilgi görmektedir (Gül-Güven, vd., 2007; Karasova-Lipovova, vd., 2003; Poli, vd., 2006). Günümüzde biyoteknolojik araştırmalar daha çok termofilik ve hipertermofilik arkeler ve bakterilerden elde edilen termostabil

enzimler üzerinde yoğunlaşmaktadır. Bu enzimler gıda, ilaç, tekstil, çevre biyoteknolojisi alanlarında talep görmektedir (Gül-Güven, 2007; Haki ve Rakshit, 2003; Eichler, 2001).

### 1.6.1. Termostabil $\alpha$ -Amilazlar

İlk zamanlar termostabil  $\alpha$ -amilaz *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* ve *Bacillus amyloliquefaciens* gibi *Bacillus* türlerinden elde edilmiştir. *Bacillus licheniformis*, *Myceliophthora thermophila*, *Pyrococcus wosei*, *Pyrococcus furiosus* ve *Thermococcus aggregans* türlerinden günümüzde yaygın olarak termofilik  $\alpha$ -amilaz izole edilmektedir. *Pyrococcus* türlerinden elde edilen enzimler  $Ca^{+2}$  iyonuna aktivasyon sürecinde ihtiyaç duymamaktadırlar. *Thermococcus profundus* anaerobik bir bakteri türü olup  $80^{\circ}C$ 'de kararlı olabilen termostabil  $\alpha$ -amilaz üretir ve  $Ca^{+2}$  iyonlarını kullanarak asidik şartlarda denatürasyona dayanıklıdır. *Thermoproteales*, *Thermococcales* ve *Pyrodictiales* gibi cinslere ait türlerden  $90-100^{\circ}C$  arasında termostabil  $\alpha$ -amilaz enzimi elde edilmiştir (Eichler, 2001). Termostabil  $\alpha$ -amilaz ve benzeri enzimler, farklı mikroorganizma kaynaklarından elde edilirken, bu kaynaklara bağlı olarak Çizelge 1.2. de görüleceği gibi pH ve sıcaklık değerleri ile de farklı özelliklere sahiptir.

Çizelge 1.2. Termostabil  $\alpha$ -amilaz enzimine ait optimum sıcaklık ve pH değerleri ile mikroorganizma kaynakları (Haki ve Rakshit, 2003).

<b>Organizma</b>	<b>Optimum Sıcaklık (°C)</b>	<b>Optimum pH</b>	<b>Referans</b>
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	70	7.0	Underkofler (1976)
<i>Bacillus licheniformis</i>	100	6.0-6.5	Viara, vd. (1993)
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	70-80	5.0-6.0	Vihinen ve Mantsala (1990)
<i>Bacillus subtilis</i>	70	7.0	Canganella, vd. (1994)
<i>Lactobacillus manihotivorans</i>	55	5.5	Aguilar, vd. (2000)
<i>Myceliophthora thermophila</i>	100	5.6	Ramkrishna, vd. (1993)
<i>Pyrococcus furiosus</i>	100	5.5	Laderman, vd. (1993)
<i>Pyrococcus woesei</i>	100	6.5-7.5	Koch, vd. (1991)
<i>Staphylothermus marinus</i>	65	5.0	Canganella, vd. (1994)
<i>Thermococcus aggregans</i>	100	5.5	Canganella, vd. (1994)
<i>Thermococcus celer</i>	90	5.5	Canganella, vd. (1994)
<i>Thermococcus fumicolans</i>	95	4.0-6.3	Estelle, vd. (1997)
<i>Thermococcus hydrothermalis</i>	85	4.8-7.8	Estelle, vd. (1997)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	60	5.6	Jensen ve Olsen (1991)
<i>Thermococcus profundus</i>	80	4.0-5.0	Kwak, vd. (1998)

## 1.7. Çalışmanın Amacı ve Kapsamı

Bu tez çalışmasında sıcaklığa dirençli  $\alpha$ -amilaz enzimi üreten yeni bir bakterinin izolasyonu, enzimin kısmi karakterizasyonu ve endüstriyel kullanım için uygunluğunun araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmanın kapsamı ise aşağıda maddeler halinde verilmiştir:

1. Termofilik bakterilerin izole edilebileceği bölgelerden (örneğin sıcak su kaynağı) toprak numuneleri toplamak,
2. Toplanan toprak numunelerinden pastörizasyon ve arkasından spor çimlendirme yöntemleri ile termo-stabil *Bacillus* suşlarını izole etmek,
3. İzole edilen bakteri suşlarını  $\alpha$ -amilaz aktivitesi bakımından araştırmak,
4.  $\alpha$ -Amilaz aktivite çaplarına göre bir adet izolatu ileri araştırmalar için belirlemek,
5.  $\alpha$ -Amilaz enziminin bazı özelliklerini (sıcaklık optimumu, pH optimumu, sıcaklık direnci, zamana göre enzim aktivitesi, bazı kimyasalların enzim aktivitesi üzerine olan etkisi, enzimin moleküler ağırlığı) belirlenmesi,
6. Verilerin değerlendirilerek tezin yazımı ve sunumu.

## 2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Ivanova, vd. (1993), *Bacillus licheniformis* 44MB82-A suşu tarafından üretilen ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz enzimi üzerine saflaştırma ve karakterizasyon çalışması yapmışlardır. İki fazlı seperasyon PEG-Dextran sistemi, jel filtrasyon ve iyon kromatografisi ile saflaştırma işlemini gerçekleştirdiklerini bildirmişlerdir. SDS-PAGE ve jel filtrasyon işlemi sonucu enzimin molekül ağırlığını 58 kDa olarak bulmuşlardır. Enzimin kararlı olduğu pH aralığını 6.5-8.0 olarak ve optimum pH değerini ise 6.0-6.5 olarak bulmuşlardır. Optimum sıcaklık değerini 90 °C olarak bildirmişlerdir. Saflaştırılan enzimin yarı-ömrünü 85 °C sıcaklık ve  $Ca^{2+}$  içermeyen tampon çözelti (buffer) kullanılmadığı koşullarda 10 dakika olarak belirlemişlerdir. Enzim yarı-ömrü ile ilgili yaptıkları diğer deneylerde sonuçları pH 6.5 ve 1.0 mM  $CaCl_2$  eklenmesi durumunda 30 dakika, 5.0 mM  $CaCl_2$  eklenmesi durumunda ise 120 dakika olarak açıklamışlardır. Saflaştırılan enzimin N-bromosuccinimide (NBS) ve EDTA tarafından güçlü bir şekilde inhibisyona uğradığını, dithiothreitol and iodacetamide tarafından ise herhangi inhibisyon etkisi olmadığını bildirmişlerdir.

Wind, vd. (1994), üretim prosesinde patates olan endüstriyel işletmelerden izole ettikleri *Bacillus stearothermophilus* suşundan elde ettikleri  $\alpha$ -amilaz enziminin mikroorganizmanın diğer suşlarından elde edilene göre çok daha termostabil olduğunu bildirmişlerdir. Enzimin yarı ömrü araştırmacılar tarafından 80 °C'de 5.1 saat, 90 °C'de 2.4 saat olarak, optimum sıcaklık değeri 65 °C olarak, optimum pH değeri 5.5–6.0 olarak bildirilmiştir.  $\alpha$ -Amilaz enziminin gelişim hızı ve üretim miktarının düşük nişasta konsantrasyonlarında ve düşük sıcaklık seviyelerinde daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Enzim miktarını 3.9 (U)/ml den 143 U/ml olarak artırılıp sıcaklık 65°C'den 40 °C'ye düşürülmesi durumunda üretim miktarının optimal seviyelere ulaştığını bildirmişlerdir. Batch fermentörde 65 °C'de 102 U/ml bakteri ile gerçekleştirilen maksimum  $\alpha$ -amilaz üretiminin, 65 °C erlenmayerde yapılan üretimden 26 kat fazla olduğunu bulmuşlardır.

Chakraborty, vd. (2000), topraktan izole ettikleri *Bacillus stearothermophilus* türünden sıcaklığa dayanıklı  $\alpha$ -amilaz enzimi elde ederek saflaştırmışlardır. Enzimin molekül ağırlığını 64 kDa olarak tespit etmişlerdir. pH toleransının çok geniş bir



aralıkta ve maksimum aktivite değerini pH 7.0 olarak bulmuşlardır. Saflaştırdıkları  $\alpha$ -amilaz enziminin katalitik aktivitesinin 100 °C sıcaklıkta %90 oranında etkili olduğunu gözlemişlerdir.

Cordeiro, vd. (2002), termofilik *Bacillus* suşu olan SMIA-2 ile yaptıkları çalışmada  $\alpha$ -amilaz (1,4-a-D-glucan glucanohydrolase, EC 3.2.1.1) üretim seviyesini incelemişlerdir. Çözünabilir nişasta içeren sıvı besiyeri kullanılarak ekimi yapılan bakterilerden elde edilen enzimin maksimum üretim seviyesine 48 saatte ulaştığını, optimum sıcaklık seviyesinin 70 °C olduğunu, enzim kararlılığının 2 saat süre esas alındığında 60 °C, 70 °C ve 90 °C için sırasıyla %4, %13 ve %38 olduğunu ve optimum pH değerinin 7.5 olduğunu ifade etmişlerdir. Enzimin  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  and  $\text{Ba}^{+2}$  iyonları tarafından güçlü,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Sr}^{+2}$  and  $\text{Mn}^{+2}$  iyonları tarafından ise zayıf derecede inhibe edildiğini bildirmişlerdir.

Fossi, vd. (2005), değirmenlerden ve un satışının yapıldığı pazar bölgesinden izole ettikleri *Ascomycetes* mayasından saflaştırdıkları termostabil  $\alpha$ -amilaz enzimi sentezinin optimum şartlarına ait sıcaklık ve pH değerlerinin sırasıyla 30 °C ve 4.5 olarak, kararlı olduğu sıcaklık ve pH aralığının ise 20-60 °C ve 2.0-8.0 olarak bildirmişlerdir. Optimum enzim aktivitesinin ise sıcaklık ve pH için sırasıyla 70 °C ve 5.5-6.5 olarak bulmuşlardır. Enzimin termostabilite olarak bakterilerden elde edilen amilaz enzimleriyle benzer kapasitede olduğunu bildirmişlerdir.

Orhan, vd. (2005), *Bacillus cereus* ve *Bacillus subtilis* suşları ile enzime ait kısmi saflaştırma ve karakterizasyon çalışması yapmışlardır. Kısmi saflaştırma işleminde amonyum sülfat çöktürme, diyaliz ve DEAE-selüloz iyon değişim kromatografisi uygulamışlardır. Elde ettikleri proteaz enzimine ait molekül ağırlığını SDS-PAGE analizi ile 45 kDa olarak bulmuşlardır. *Bacillus subtilis* suşuna ait spesifik enzim aktivitesini 84 U/mg olarak bulmuşlardır. *Bacillus subtilis*'ten elde edilen proteaza ait optimum pH 8.4 olarak ve *Bacillus cereus*'tan elde edilen proteaz için optimum pH değerini 7.4 olarak bulmuşlardır. Her iki suştan elde edilen proteaza ait optimum sıcaklık değerini 60 °C olarak açıklamışlardır.

Ariffin, vd. (2006), *Bacillus pumilus* EB3 suşuna ait izolasyon ve karakterizasyon çalışmasını substrat olarak carboxymethyl cellulose (CMC) kullanılarak yapmışlardır. Palm yağı endüstrisi kompostlarından izole edilen bakteriden iyon değişim kromatografisi yöntemiyle selülaz enzimini saflaştırılmışlardır. Maksimum enzim aktivitesi değerlerini CMCaz (carboxymethyl cellulase) ve  $\beta$ -glucosidase enzimleri için sırasıyla 0.079 ve 0.038 U/ml olarak bildirmişlerdir. Enzimin molekül ağırlığını 30-65 kDa olarak açıklamışlardır. Optimum sıcaklık ve pH değerini sırasıyla 60 °C ve 6.0 olarak bildirmişlerdir.

Kubrak, vd. (2010), yaptıkları çalışmada doğal substratlar kullanarak izole ettikleri *Bacillus* BKL20 suşlarından saflaştırdıkları alkali termostabil  $\alpha$ -amilaz enzimi üretiminin besiyeri koşullarında nişasta varlığından bağımsız olarak pepton (%0.3, w/v) ve maya ekstratı (%0.2, w/v) varlığında olumlu etkilendiğini bildirmişlerdir. İnkubasyon sırasında enzimin amolitik aktivitesinin 60 ve 70 °C sıcaklıkta 30 dakika aktif olduğunu ayrıca pH 6.0-11.0 aralığında yüksek aktivitenin devam ettiğini bildirmişlerdir. *Bacillus* suşu BKL20  $\alpha$ -amilaz enzimi  $\text{Ca}^{+2}$  ve benzeri bivalent katyonlar tarafından inhibe edilmediğini bu nedenle  $\text{Ca}^{+2}$  bağımsız enzim (independent enzyme) olarak tanımlamışlardır bununla birlikte 1–10 mmol/L EGTA ve EDTA ile inhibe edildiğini bildirmişlerdir. Aynı zamanda enzimin oksidasyon ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ve denatürasyona (üre) dirençli olduğunu da bildirmişlerdir.

Mahdavi, vd. (2010), çay tarımı yapılan asidik topraklardan temin ettikleri *Bacillus* sp. GUF8 suşlarından 16S rDNA sequence metoduyla belirledikleri *Bacillus cereus* suşundan saflaştırdıkları  $\alpha$ -amilaz enzime ait karakterizasyon çalışması yapmışlardır. Bilinen  $\alpha$ -amilaz enzimlerinden farklı olarak saflaştırdıkları enzimin kararlı olduğu sıcaklık aralığını 10-70 °C olarak ve optimum sıcaklık değerini ise 50° C olarak bulmuşlardır. Enzime ait optimum pH değerini 6.0, maksimum aktivitesini pH 8.0 ve 9.0 değerlerinde %75 ve %50 olarak bildirmişlerdir. Aynı enzimin  $\text{Zn}^{+2}$  iyonuyla güçlü şekilde inhibe olduğunu,  $\text{Ni}^{+2}$  ve EDTA ile kısmen inhibe olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca enzimin nişastayı maltoz (G2) ve maltopentaoz (G5) gibi maltooligosakkaritlere hidrolize ettiğini gözlemişlerdir.

Özcan, vd. (2010), Çiftahan bölgesinden temin ettikleri *Bacillus* sp. DM-15 suşundan saflaştırdıkları termostabil  $\alpha$ -amilaz enziminin molekül ağırlığını 126 kDa, kararlı olduğu sıcaklık ve pH aralığını sırasıyla 40-100° ve 4.5-10.0 ve optimum enzim aktivitesinin 60 °C and pH 5.5-6.0 değerlerinde olduğunu bulmuşlardır. Enzim kararlılığının 15 dakika 60° C'de %24 olduğunu, 100 °C'de orijinal aktivitenin tamamen ortadan kalktığını bildirmişlerdir. Enzim aktivitesinin 5 mM CaCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> ve KCl (%105) arttığını ve 5 mM EDTA, CuSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, SDS (1%), Urea (8 M), Co varlığında sırasıyla yüzde olarak 98, 79, 57, 36, 33 ve 10 oranında inhibe olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar DM-15  $\alpha$ -amilaz enziminin nişasta, deterjan ve tekstil sektörleri gibi endüstriyel alanlarda kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Vaseekaran, vd. (2010), unlu mamül atıkları, un değirmeni atıkları, mutfak atıkları gibi atıkları içeren toprak örneklerinden bakteri izolasyonu yapmışlardır. 25.0 g/l agar, 3.0 g/l nişasta içeren besiyerinde 24 saat ve 37 °C de inkubasyonla 72 bakteri suşu üretmişlerdir. Unlu mamül atıkları içeren topraktan aldıkları BS1 suşu ile en yüksek  $\alpha$ -amilaz üretim miktarını 24 saat sürede 7.0  $\pm$ 0.21 U/L olarak bulmuşlardır. Enzimin en yüksek sıcaklık ve pH değerini ise sırasıyla 90 °C ve 7 olarak belirtmişlerdir.  $\alpha$ -amilaz enziminin başlangıçtaki aktivite değerini 90 °C sıcaklıkta 30 dakika sürede %37.6 oranında ve 60 dakika sürede ise %10.4 oranında koruduğunu bulmuşlardır. Enzimin yarı ömrünü 90 °C sıcaklık ve pH 7.0 şartlarında 21 dakika olarak belirlemişlerdir.

Shafaat, vd. (2011), yaptıkları bir çalışmada 45 °C ve 8.0 pH koşullarında optimum gelişme gösteren *Bacillus subtilis* bakterisini izole etmişlerdir. Araştırmacılar, bakteri tarafından üretilen alfa-amilaz enziminin optimum aktivitesini pH 7.0 ve 37 °C sıcaklık koşullarında gösterdiğini bildirmişlerdir. Yine araştırmacılar enzimin 5.0-10.0 pH aralığında kararlı olduğunu, enzimin maksimum aktivitesini %1 nişasta varlığında gösterdiğini, enzimin 43 ve 18 kDa moleküler ağırlıklarına sahip iki adet formunun bulunduğunu ve biyoteknolojik çalışmalar için uygun olabileceğini de bildirmişlerdir.

Demirkan (2011), *Bacillus subtilis* ve U 2-6 mutant suşları tarafından  $\alpha$ -amilaz üretiminde karbon ve azot kaynaklarının etkisini araştırmıştır. Tüm suşlar için geçerli olmak üzere karbon kaynağı olarak mesoinositol kullanılırsa  $\alpha$ -amilaz üretiminin

maksimum seviyede olduğunu gözlemiştir. Azot kaynakları olarak test edilen tripton ve malt ekstratın bu enzimin üretim miktarında dikkate değer bir etki yapmadığını ifade etmiştir. *Bacillus subtilis* ve mutant suşunun (EBUE 5-3) saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enzimine ait optimum sıcaklık değerini 45 °C ve pH değerini 6.0 olarak bulmuştur. Deneyde saflaştırılan enzimlerin tahmini moleküler ağırlıkları 56 kDa olarak gözlemiştir.

Abdel-Fattah, vd. (2012), termotolerant bir tür olan *Bacillus licheniformis* izolat AI20'den elde ettikleri termostabil  $\alpha$ -amilaz enziminin üretiminde nişasta, maya özütü ve  $\text{CaCl}_2$  etkisini incelemiştir. Optimum şartlarda üretim için gerekli olan kombinasyon oranlarını %1.0 nişasta, %0.75 maya özütü ve %0.02  $\text{CaCl}_2$  olarak belirlemiştir. Çeşitli kromatografik yöntemlerle saflaştırılan enzimin molekül ağırlığını 55 kDa, saflaştırılan enzimlerin optimum sıcaklık ve pH değerlerini ise sırasıyla 60–80°C ve 6-7.5 olarak bulmuşlardır. Ek olarak SDS, EDTA, EGTA gibi deterjan solventlerin enzim aktivitesini az miktarda inhibe ettiklerini belirtmişlerdir.

Vijayalakshmi, vd. (2012), Hindistan Euphorbia Hirta bölgesinde topraktan izole ettikleri *Bacillus subtilis* KC3 suşundan saflaştırdıkları  $\alpha$ -amilaz enzim için maksimum üretim değeri 22.92 U/ml, 48 saat 40° C ve pH 7.0 koşullarında bulmuşlardır. Optimum sıcaklık ve pH değerini sırasıyla 50° C ve 6.5 olarak bildirmişlerdir. Enzimin maksimum üretim değerleri arpa, mısır ve maltozdan elde edilen nişasta için sırasıyla 27.27 U/ml, 24.30 U/ml, 19.10 U/ml olarak bildirilmiştir. Besiyerine glukoz eklenmesi durumunda  $\alpha$ -amilaz enzimi üretiminin 5.45 U/ml seviyesine kadar düştüğünü bildirmişlerdir.  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  ve  $\text{Cu}^{+2}$  iyonları ile yapılan testlerde  $\text{Ca}^{+2}$  iyonunun %0.1 bir artışla (28.83U/ml) etki gösterirken diğer iyonların inhibe edici etkisini bildirmişlerdir. Substrat oranını %2 (nişasta) oranında enzim üretimine maksimum derecede etki ettiğini ancak bu oranın üzerine çıkılması durumunda üretimin düştüğünü bulmuşlardır. *Bacillus subtilis* KC3 suşundan elde edilen  $\alpha$ -amilaz enziminin biyoteknolojik prosesler için potansiyele sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Agüloğlu Fincan, vd. (2014), Afyonkarahisar bölgesindeki kaplıcalardan izole ettikleri *Anoxybacillus flavithermus* suşuna ait termostabil  $\alpha$ -amilaz enzimini saflaştırıp karakterizasyonunu yapmışlardır. Enzimin molekül ağırlığını SDS-PAGE ile 60 kDa olarak bulmuşlardır. Bakteri gelişimi için optimum koşulları 20 saat, 55 °C ve pH 6.0 olarak bildirmişlerdir. Maksimum  $\alpha$ -amilaz aktivitesi için inkubasyon koşullarını 24 saat 55 °C ve pH 7.0 olarak bulmuşlardır. İyon değişim kromatografisi ve (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile enzim saflaştırma oranını %70 olarak bildirmişlerdir.

Kumar, vd. (2014), soya fasulyesinin fermente edilmesiyle yapılan ve Japonya’da kahvaltıda tüketilen natto yiyeceğini fermente eden *Bacillus* suşları üzerinde çalışma yapmışlardır. Bakteriler tarafından üretilen fibrinolitik nattokinaz enziminin üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. 16S rDNA sequence analizi ile izolasyonu tamamlanmış *Bacillus subtilis* tanımlanmıştır. Bakteri suşu için en iyi üreme şartlarını 72 saat, 50 °C sıcaklık ve pH 9.0 olarak bildirmişlerdir. Laktoz ve pepton enzim üretim oranını artırmıştır. SDS-PAGE analizi ile enzim saflaştırılmış ve karakterizasyonu yapılmıştır. Enzim farklı sıcaklık ve pH aralıklarında teste tabi tutulmuştur. *Bacillus subtilis* RJAS 19 tarafından üretilen fibrinolitik enzim, önleyici sağlık uygulamalarında kullanılabilir olarak bildirilmiştir.

Mathew ve Rathnayake (2014), Sri Lanka’nın Nelumwewa şehrinde yer alan kaplıca bölgesinden toprak örneklerinden izole ettikleri *Geobacillus* sp. NMS 2 suşuna ait termostabil  $\alpha$ -amilaz enziminin saflaştırma ve karakterizasyonu üzerine araştırma yapmışlardır. 50 °C ve 12 saat inkubasyon ile ortaya çıkan optimum ekstraselüler enzim üretim miktarını 43 U/ml olarak bulmuşlardır. DEAE kromatografisi ve amonyum sülfat çöktürme yöntemi ile enzimleri saflaştırmışlardır. Enzimin spesifik aktivitesini bir kat saflaştırma ile 420 U/mg olarak, kararlı olduğu sıcaklık aralığını 10-60 °C, optimum pH değerini 6.9 ve kararlı olduğu pH aralığını ise 6.9-9.0 olarak bulmuşlardır.

Roy, vd. (2014), yaptıkları bir çalışmada *Bacillus megaterium*’a ait yeni bir suş olan KAN1 (Gen bankası numarası: BankIt1545135 seq1 JX182976) ile çalışma yapmışlardır. Mikroorganizmayı Hindistan’da pirinçten üretilen geleneksel Handia içeceğinden izole etmişlerdir. Amonyum sülfat çöktürmesiyle kısmen çöktürerek

saflaştırdıkları  $\alpha$ -amilaz enziminin spesifik aktivitesini  $1.05 \text{ U mg}^{-1}$  olarak bulmuşlardır. Optimum pH değerini 11.0 ve kararlı olarak aktivite gösterdiği pH aralığı değerini ise 5.0-14.0 olarak belirtmişlerdir. Enzim aktivitesi için optimum sıcaklık değerinin  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  olduğunu ancak bu sıcaklık değerinin geniş bir aralıkta etkili olduğunu bulmuşlardır. SDS-PAGE çalışması sonucu enzimin molekül ağırlığını 67 kDa bulmuşlardır.

Prasad (2014), mutfak artıklarının atıldığı farklı toprak örneklerinden izole ettiği 12 adet *Bacillus* suşunu Bergye's klavuzuna göre tanımlamıştır. Nişasta içeren katı besiyerine ektiği bakterilere  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  ve 48 saat inkubasyon uyguladıktan sonra iodin solüsyonuna 30 dakika maruz bırakmış ve amilaz aktivitesi olmayan mavi bölgeler ile nişasta hidrolizinin olduğu renksiz bölgeleri gözlemiştir. Renksiz bölgelerden aldığı bakteriler üzerine yapmış olduğu PCR amplifikasyonunda Amy F ve Amy R primerleri kullanarak amilaz genini (Amy) UV-transilluminator cihazında gözlemiş ve daha başka biyoteknolojik çalışmalar için keserek kullanıma hazır hale getirmiştir.

Siddique, vd. (2014), topraktan izole ettikleri *Bacillus licheniformis* suşuna ait termostabil  $\alpha$ -amilaz enzimi üzerinde saflaştırma ve karakterizasyon çalışması yapmışlardır. 24 saat inkubasyon ile optimum üretim miktarı, pH ve sıcaklık değerlerini sırasıyla  $92 \text{ U/ml}$ , 7 ve  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  olarak bulmuşlardır. Patates, mısır ve buğdaydan elde edilen nişasta üzerine yaptıkları çalışmada enzim indüksiyon değerlerini belirlemişlerdir. En yüksek değer patates nişastasında olduğunu daha sonra mısır ve buğdayın geldiğini bildirmişlerdir.

Özdemir, vd. (2015), Afyonkarahisar bölgesinde çamurlu kaplıca suyundan aldıkları örneklerden izole ettikleri mikroorganizmalara uyguladıkları morfolojik ve biyokimyasal testlerde; 16S rRNA gen sekans analizi, G-C içeriği ve DNA-DNA hibridizasyon analizi sonucu elde ettikleri *Anoxybacillus flavithermus* suşlarından  $\alpha$ -amilaz enzimini saflaştırmışlardır. Enzime ait optimum sıcaklık ve pH değerini sırasıyla  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  ve 7.0 olarak belirlemişlerdir. Saflaştırdıkları termostabil  $\alpha$ -amilaz enziminin  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  ve 30 dakika koşullarında, kırmızı ve yeşil elma suyundaki çözünmüş nişastayı sırasıyla %76 ve %87 oranlarında hidrolize ettiğini bulmuşlardır.

Demirkan, vd. (2017), yaptıkları çalışmada Türkiye'nin 15 farklı ilinden topladıkları toprak örneklerinden 60 bakteri izole etmişlerdir.  $\alpha$ -Amilaz pozitif olarak belirledikleri en geniş açık zon çapına sahip 4 bakterinin *Bacillus* cinsine ait olduklarını saptamışlardır. En yüksek  $\alpha$ -amilaz aktivitesi gösteren *Bacillus* sp. M-10'un enzim üretim optimal şartlarını, nişastalı ortamda 37 °C sıcaklıkta, pH 7.0, havalandırma 150 rpm, inokülasyon miktarının %2.5 (v/v) ve inokülasyon yaşınının 2 gün olarak tespit etmişlerdir. Modifiye ettikleri bu ortam şartlarının enzim aktivitesini %42 oranında artırdığını bildirmişlerdir.

El-Kady, vd. (2017), deniz suyundan izole ettikleri *Bacillus* sp NRC12017 suşundan saflaştırdıkları  $\alpha$ -amilaz enziminin kararlı olduğu pH aralığını 5.0-11.0 olarak bildirmişlerdir. Nişasta 20 g/l, pepton 10 g/l, maya ekstat 4 g/l, MgSO<sub>4</sub> 0.5 g/l, CaCl<sub>2</sub> 0.219 g/l içeren besiyerinde dikkate değer bir enzim üretim miktarı (10.5 U/ml) bulmuşlardır. Enzimin termostabilitesi için geniş bir aralık olduğunu (35–80 °C) ve maksimum enzim aktivitesinin 45 °C'de elde edildiğini ayrıca 17.20 U/ml sonuç verdiğini bildirmişlerdir.

Kiran, vd. (2018), Hindistan Bihar bölgesindeki kaplıcalardan izole ettikleri mikroorganizmalar üzerine yaptıkları çalışmada 16S rRNA gen sekansı ile belirledikleri *Bacillus subtilis* RK6 (KX247637) suşundan saflaştırdıkları  $\alpha$ -amilaz enziminin optimum sıcaklık değerini 80 °C, optimum pH değerini 8.0, 60-90 °C sıcaklıkta 30 dakika ön inkübasyon sonucunda termostabil olduğunu, Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup>, ve Fe<sup>+2</sup> iyonları ile enzimin aktivitesinin arttığını, Zn<sup>+2</sup> and Cu<sup>+2</sup> iyonlarıyla ise enzim inhibisyona uğradığını bildirmişlerdir. *Bacillus subtilis* RK6 suşunun biyoteknolojik uygulamalar için uygun termoalkalifilik amilaz üretebileceğini bildirmişlerdir.

Ekka ve Namdeo (2018), pirinç ve şeker kamışı tarlaları ile şeker kamışı bataklık alanlarından temin ettikleri toprak örneklerinden 12 koloni izole etmişlerdir. Bunlardan altı tanesini amilaz üreten renksiz zonlardan ayırdıktan sonra kolonileri NN1, NN2, NN3, NN4, NN5 ve NN6 olarak isimlendirmişlerdir. NN1, NN3 ve NN4 izolatlarını şeker kamışı tarlalarından, NN2 izolatını pirinç tarlalarından, NN5 ve NN6 izolatlarını ise şeker kamışı bataklık alanlarındaki topraktan izole etmişlerdir. Kolonilere ait amilaz aktivitelerini NN1 0.251 (U/ml), NN2 0.127 (U/ml), NN3 0.094

(U/ml), NN4 0.115 (U/ml), NN5 0.144 (U/ml), NN6 0.098 (U/ml) olarak bulmuşlardır. Besiyeri içeriğinde farklı nitrojen kaynakları olarak amonyum sülfat, amonyum nitrat, amonyum klorid ve jelatin test etmişlerdir. En yüksek amilaz üretimini sağlayan nitrojen kaynağını tespit etmek için yaptıkları çalışmada koloni NN1 için amonyum nitrat, koloni NN2 için amonyum sülfat sonuçlarda ortaya çıkmıştır. Koloni NN5 için tüm nitrojen kaynaklarının aynı düzeyde etki ettiğini bildirmişlerdir. Enzimin maksimum aktivitesinin gerçekleştiği optimum pH değerlerini koloni NN1 ve NN2 için sırasıyla 6.0 ve 8.0 olarak bulmuşlardır.

Hu, vd. (2019), soya fasulyesinden imal edilen ve Çin geleneksel içecekleri arasında yer alan Douchi içeceğinden izole edilen ve aynı zamanda yüksek oranda fibrinolitik enzim üreten *Bacillus subtilis* DC27 suşu üzerinde çalışma yapmışlardır. UNOsphere Q column kromatografisi, Sephadex G-75 jel fitrasyonu ve yüksek performans sıvı kromatografisi kullanılarak DFE27 enzimini saflaştırmışlardır. Enzimin molekül ağırlığı, optimum sıcaklık ve pH değerleri sırasıyla 29 kDa, 45 °C ve 7.0 olarak bildirilmiştir.



### **3. MATERYAL VE METOD**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Cihazlar ve Sarf Malzemeler**

Bu tez çalışması Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü Hayvansal Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Laboratuvarı'nda yürütülmüştür. Çalışmada kullanılan cihazlar (steril kabin (Bilser), santrifüj (Hettich), hassas teraziler (Ohaus, Denver), pH metreler (Nel, Hanna), vorteksler (Cat, Ika), manyetik karıştırıcılar (Cat, Ika), çalkalayıcılar (Ika), inkübatör (Nüve), buzdolabı (Arçelik), derin dondurucular (Uğur, Arçelik), yatay elektroforez cihazı (Peqlab), dikey elektroforez cihazları (Atto, Peqlab), güç kaynakları (Atto, E-C), spektrofotometre (Pharmacia), otoklav (Hirayama), su banyosu (Memmert) ve otomatik pipetler (Brand, Eppendorf, Biohit, Socharex, Dragon) laboratuvar envanterinde mevcut bulunmaktadır. Kimyasal ve diğer sarf malzemeleri ise aksi belirtilmedikçe Sigma, Merck, Amresco, Fluka, Riedel de-Haën, Serva, Carlo Erba, Vivantis, Panreac, Tekkim, Acros Organics, Alfa Aesar, Thermo Fisher, Axygen, Brand, Eppendorf, LP, Isolab'dan satın alma yoluyla temin edilmiştir.

##### **3.1.2. Bakteri Materyali**

Çalışmada kullanılan bakteri materyali bu çalışma kapsamında Niğde ili Ulukışla ilçesi Çiftehan bölgesi sınırları içinde bulunan kaplıcadan, sıcak su tahliyesinin yapıldığı bölgeden alınan toprak numunesinden yapılmıştır.

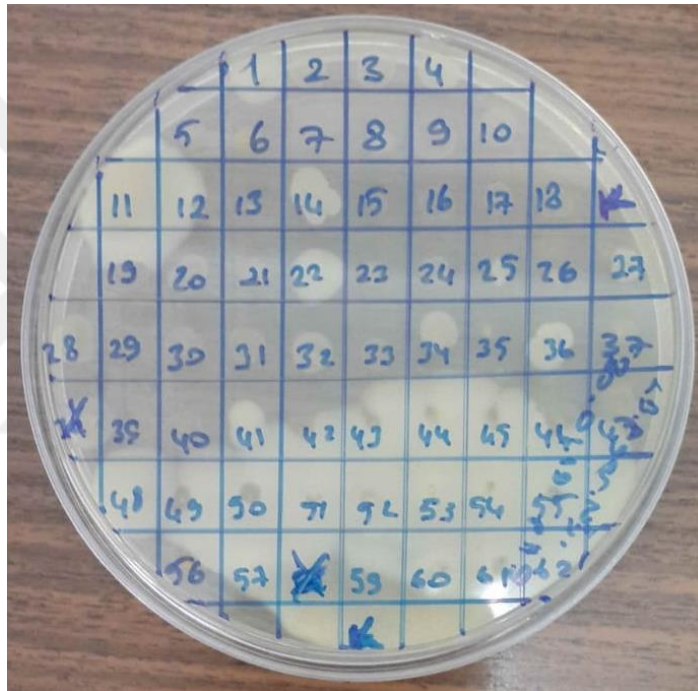
#### **3.2. Metod**

##### **3.2.1. Bakterilerin İzolasyonu**

Toprak numunesinden *Bacillus* cinsi bakterilerin izolasyonu aşağıda verilen protokol uyarınca yapılmıştır (Lennete, vd., 1985):

1. Bakteri izolasyonu için alınan toprak numunesi steril bir cam şişe içerisinde laboratuvara taşınmıştır.
2. Toprak numunesinden 1 gr örnek tartılarak alınmış ve 10 ml steril saf su ile sulandırılmıştır.
3. Toprak tortusunun çökmesi için 30 dk. süreyle beklenmiş ve üstteki sıvı kısımdan 500 µl alınarak steril bir mikrosantrifüj tüpüne (1.5 ml hacimli) aktarılmıştır.
4. Alınan bu numune vejetatif bakterilerin eliminasyonu için 80 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 15 dk. süreyle inkübe edilmiştir.
5. İnkübasyon sonrasında örnek 25 ml hacimli steril LB besiyerine (10 gr/l tryptone (bacto peptone), 5 gr/l maya ekstraktı, 10 g/l NaCl, pH 7.5) aktararak ertesi güne kadar orta çalkalama hızında 37 °C'ye ayarlanmış inkübatörde *Bacillus* sporlarının çimlenerek vejetatif hale geçmesi için inkübe edilmiştir.
6. Ertesi gün bakteri kültürü gelişmiş olan LB sıvı besi yerinden steril mikrosantrifüj tüpleri içerisinde  $10^{-6}$ 'ya kadar seri sulandırmalar yapılmıştır.
7.  $10^{-4}$ - $10^{-6}$  oranlarında sulandırılmış örneklerden mikropipet yardımıyla 100'er µl çekilerek alınmış ve LB-agar (LB besiyeri içine 10 g/l agar ilave edilir. 121 °C'de otoklavlanarak 46 °C'ye kadar soğutulur. Steril kabin içerisinde steril petri kaplarına 3-5 mm kalınlıkta olacak şekilde dökülerek 30 dk. süreyle donması için beklenir. Kullanılmadığı durumlarda buzdolabında +4 °C'de 15 gün kadar muhafaza edilir) plaklarına steril cam çubukla yayma yöntemiyle ekilmişlerdir. Petri kaplarının kapakları kapatılmadan steril kabin içerisinde 15 dk. süreyle kurumaları için beklenmiştir.
8. Petri kaplarının kapakları kapatılarak 37 °C'ye ayarlanmış inkübatöre ters çevrilmiş vaziyette konmuş ve koloni gelişimi için ertesi güne kadar inkübe edilmişlerdir.
9. Ertesi gün LB-agar plaklarında gelişmiş olan bakteri kolonilerinden değişik morfolojik karakterlere (şekil, koloni çapı, renk vs.) sahip olanlardan seçilerek steril kürdanlar yardımıyla ikişer kopya olacak şekilde, cam yazar kalemlerle numaralandırılmış LB-agar-nişasta (LB-agar, %0.5 çözünür nişasta) plaklarına tek tek aktarılmıştır. Ekimi tamamlanan plaklar ters çevrilerek 37 °C'ye ayarlanmış inkübatörde ertesi güne kadar inkübasyona bırakılmışlardır (Şekil 3.1.).

10. Plaklar inkübatörden alınmış ve iki kopyadan birer tanesi iyot buharı ile boyanmıştır. Bunun için; petri plağının kapaklarına birkaç tane iyot kristali ezilmiş, kapağın üzerine bakterilerin olduğu petri kabı ters çevrilerek konmuş ve iyot buharının nişastalı besiyerini boyaması için 1-2 dk. süreyle beklenmiştir (bekleme işleminin sıcak bir ortamda yapılması boyama sürecini hızlandırır).
11. Maviye boyanan zeminde etrafında beyazımtırak zon bulunan koloniler  $\alpha$ -amilaz pozitif koloniler olarak belirlenmiştir.
12.  $\alpha$ -Amilaz pozitif bakterilerden aktivite zon çapı göz önünde bulundurularak, bir adet izolat ileri çalışmalar için belirlenmiştir.



Şekil 3.1. Enzim aktivitesi testi için numaralandırılmış petri kaplarındaki LB-agar plaklarına ekilmiş olan *Bacillus* izolatları

### 3.2.2. Enzime Ait Bazı Özelliklerin Belirlenmesi

#### 3.2.2.1. Hücre Dışı Enzimlerin Elde Edilmesi

İleri çalışmalar için seçilen *Bacillus* izolatı LB sıvı besi yerine ekilmiş ve 37 °C'ye ayarlanmış inkübatörde 24 saat süreyle orta çalkalama hızında üremeye bırakılmıştır. Her bir enzim çalışması için gerekli olan süpernatant miktarı hesaplanmış, bakteri

kültürü o miktarda hazırlanmış olan LB-besiyerine ekilmiştir (LB besiyerleri ideal çalkalama hızı için erlenin toplam hacminin 1/10'u olacak şekilde erlenlere eklenerek hazırlanmıştır). Süre sonunda bakteri kültürü steril tüplerde (10 ml hacimli) 4900 rpm çalkalama hızında 10 dk. süreyle santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası üstte kalan ve enzim karışımı içeren süpernatant kısım deneylerde enzim kaynağı olarak kullanılmak üzere steril laboratuvar şişelerine alınmış ve deney süresince buz üzerinde muhafaza edilmiştir.

### 3.2.2.2. Enzime Ait Optimum Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi

Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerinin belirlenmesi aşağıda verilen protokol uyarınca yapılmıştır. Protokolde Na-fosfat solüsyonu (50 mM, pH 6.5; 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 50 mM NaH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> birbiri ile karıştırılarak pH 6.5 olacak şekilde hazırlanır), substrat solüsyonu (%2 w/v, Na-fosfat solüsyonunda otoklavlanarak çözülmüş çözümlü nişasta) ve enzim (bakteri süpernatantı) başlangıç tüp bileşenleri olarak kullanılmıştır.

1. Her bir sıcaklık değeri için ayrı olacak şekilde aşağıda verildiği şekilde deney tüpleri hazırlanmıştır (K: kontrol, EK: enzim kontrol, SK: substrat kontrol, ES: enzim+substrat):  
K : 2 ml Na-fosfat buffer (1 adet)  
EK : 1 ml Na-fosfat solüsyonu + 1 ml enzim (5 adet)  
SK : 1 ml Na-fosfat solüsyonu + 1 ml substrat solüsyonu (5 adet)  
ES : 1 ml enzim + 1 ml substrat (5 adet)
2. Hazırlanan deney tüpleri vortekslendikten sonra 30 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 30 dk. süreyle inkübe edilmiştir (Şekil 3.2).
3. Süre sonunda tüpler su banyosundan alınmış ve her bir tüpün içerisine 3'er ml DNS solüsyonu [10 g dinitro salisilik asit, 2 g fenol, 0.5 g NaSO<sub>3</sub>, 200 g sodyum-potasyum tartarat, 500 ml %2'lik NaOH çözeltisi içinde çözülerek saf su ile 1000 ml'ye tamamlanır (Miller, 1951)] ilave edilerek vortekslenmiştir (Şekil 3.3).
4. Tüm bu aşamalar (1., 2. ve 3. aşamalar) sırasıyla 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 °C sıcaklık değerleri için ayrı ayrı tekrar edilmiştir.

5. Tüm deney tüpleri kaynar su içerisinde 5 dk. süreyle bekletilerek son ürün (glukoz) miktarına bağlı renk değişimlerinin olması sağlanmıştır.
6. Örnekler soğuması için oda koşullarında en az 1 saat süreyle bekletilmişlerdir.
7. Kontrol grubu şahit olarak kullanılmış ve diğer tüm örneklerin spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda okumaları yapılmıştır.
8. Ortalama ES değerlerinden ortalama EK ve SK değerlerinin çıkarılması [Enzim Aktivite Değeri (EAD)=ES-(EK+SK)] ile enzim aktivitesinden kaynaklı spektrofotometrik değerler elde edilmiştir.
9. En yüksek değer 100 olarak kabul edilmiş ve diğer değerler relatif olarak hesaplanmıştır. Relatif aktivite değerleri kullanılarak enzime ait optimum sıcaklık grafiği elde edilmiştir.



Şekil 3.2. Enzim analizi örneklerinin su banyosunda inkübasyonu



Şekil 3.3. Enzim analizlerinde örneklerin üzerine DNS solüsyonlarının eklenmesi

### 3.2.2.3. Enzime Ait Optimum pH Değerinin Belirlenmesi

Enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin belirlenmesi aşağıda verilen protokol uyarınca yapılmıştır. Protokolde Na-asetat solüsyonları (50 mM, pH 5.0 ve 6.0), Na-fosfat solüsyonları (50 mM, pH 6.0 ve 7.0, 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ve 50 mM  $\text{NaH}_2\text{HPO}_4$  birbiri ile karıştırılarak hazırlanır), Tris solüsyonları (50 mM, pH 8.0-11.0), substrat solüsyonları (%2 w/v, her bir pH değerindeki solüsyondan ayrı olacak şekilde çözünür nişasta kullanılarak hazırlanır) ve enzim (bakteri süpernatantı) başlangıç tüp bileşenleri olarak kullanılmıştır.

1. Her bir sıcaklık değeri için ayrı olacak şekilde aşağıda verildiği şekilde deney tüpleri hazırlanmıştır:

K	: 2 ml Na-asetat buffer (pH 5.0) (1 adet)
EK	: 1 ml Na-asetat buffer (pH 5.0) + 1 ml enzim (5 adet)
SK	: 1 ml Na-asetat buffer (pH 5.0) + 1 ml substrat solüsyonu (5 adet)
ES	: 1 ml enzim + 1 ml substrat (5 adet)

2. Hazırlanan deney tüpleri vortekslendikten sonra enzime ait optimum sıcaklık değerine ayarlanmış su banyosunda 30 dk. süreyle inkübe edilmiştir.
3. Süre sonunda tüpler su banyosundan alınmış ve her bir tüpün içerisine 3'er ml DNS solüsyonu ilave edilerek vortekslenmiştir.
4. Tüm bu aşamalar (1., 2. ve 3. aşamalar) sırasıyla 6.0-11.0 aralığındaki tüm pH değerleri için ayrı ayrı tekrar edilmiştir.
5. Tüm deney tüpleri kaynar su içerisinde 5 dk. süreyle bekletilerek son ürün (glukoz) miktarına bağlı renk değişimlerinin olması sağlanmıştır.
6. Örnekler soğuması için oda koşullarında en az 1 saat süreyle bekletilmişlerdir.
7. Kontrol grubu şahit olarak kullanılmış ve diğer tüm örneklerin spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda okumaları yapılmıştır.
8. Ortalama ES değerlerinden ortalama EK ve SK değerlerinin çıkarılması [Enzim Aktivite Değeri (EAD)=ES-(EK+SK)] ile enzim aktivitesinden kaynaklı spektrofotometrik değerler elde edilmiştir.
9. En yüksek değer 100 olarak kabul edilmiş ve diğer absorbans değerleri relatif olarak hesaplanmıştır. Relatif aktivite değerleri kullanılarak enzime ait optimum pH grafiği elde edilmiştir.

#### **3.2.2.4. Enzime Ait Sıcaklık Stabilitesinin Belirlenmesi**

Enzimin sıcaklık stabilite değerlerinin belirlenmesi aşağıda verilen protokol uyarınca yapılmıştır. Protokolde Na-fosfat solüsyonu (50 mM, pH 6.5), substrat solüsyonu (%2 w/v, Na-fosfat solüsyonunda otoklavlanarak çözülmüş çözümlü nişasta) ve enzim (bakteri süpernatantı) başlangıç tüp bileşenleri olarak kullanılmıştır.

1. 10 ml bakteri süpernatantı (enzim) 40 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 30 dk. süreyle ön inkübasyona bırakılmıştır.
2. Daha sonra aşağıda verildiği şekilde deney tüpleri hazırlanmıştır (K: kontrol, EK: enzim kontrol, SK: substrat kontrol, ES: enzim+substrat):  
K : 2 ml Na-fosfat buffer (1 adet)  
EK : 1 ml Na-fosfat solüsyonu + 1 ml enzim (5 adet)  
SK : 1 ml Na-fosfat solüsyonu + 1 ml substrat solüsyonu (5 adet)  
ES : 1 ml enzim + 1 ml substrat (5 adet)

3. Hazırlanan deney tüpleri vortekslendikten sonra enzimin optimum sıcaklık değerine ayarlanmış su banyosunda 30 dk. süreyle inkübe edilmiştir.
4. Süre sonunda tüpler su banyosundan alınmış ve her bir tüpün içerisine 3'er ml DNS solüsyonu ilave edilerek vortekslenmiştir.
5. Tüm bu aşamalar (1., 2., 3. ve 4. aşamalar) sırasıyla 50, 60, 70, 80 90 ve 100 °C sıcaklık değerlerinde 30 dk. ön inkübasyona bırakılmış diğer enzim örnekleri kullanılarak ayrı ayrı tekrar edilmiştir.
6. Tüm deney tüpleri kaynar su içerisinde 5 dk. süreyle bekletilerek son ürün (glukoz) miktarına bağlı renk değişimlerinin olması sağlanmıştır.
7. Örnekler soğuması için oda koşullarında en az 1 saat süreyle bekletilmişlerdir.
8. Kontrol grubu şahit olarak kullanılmış ve diğer tüm örneklerin spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda okumaları yapılmıştır.
9. Ortalama ES değerlerinden ortalama EK ve SK değerlerinin çıkarılması [Enzim Aktivite Değeri (EAD)=ES-(EK+SK)] ile enzim aktivitesinden kaynaklı spektrofotometrik değerler elde edilmiştir.
10. En yüksek değer 100 olarak kabul edilmiş ve diğer değerler relatif olarak hesaplanmıştır. Relatif aktivite değerleri kullanılarak enzime ait sıcaklık stabilite grafiği elde edilmiştir.

### 3.2.2.5. Enzimin Zamana Göre Aktivite Seviyesinin Belirlenmesi

Enzimin zamana göre aktivite değerlerinin belirlenmesi aşağıda verilen protokol uyarınca yapılmıştır. Protokolde Na-fosfat solüsyonu (50 mM, pH 6.5), substrat solüsyonu (%2 w/v, Na-fosfat solüsyonunda otoklavlanarak çözünmüş çözüdür nişasta) ve enzim (bakteri süpernatantı) başlangıç tüp bileşenleri olarak kullanılmıştır.

1. 12 saat süreyle LB sıvı besiyerinde üremiş olan bakteri kültüründen 100 ml hacimli LB besiyerine 1 ml (%1 v/v) aşılama yapılmış ve 37 °C'ye ayarlanmış inkübatöre orta çalkalama hızında üremeye bırakılmıştır.
2. Aşılama yapılır yapılmaz besi ortamından steril koşullarda 10 ml çekilerek alınmış (0. saat), kalan 90 ml ise inkübatörde bakteri üremesi için inkübasyona bırakılmıştır. Alınan 10 ml örnek 495 rpm'de santrifüj edilmiş ve süpernatant kısım enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.



3. Daha sonra aşağıda verildiği şekilde deney tüpleri hazırlanmıştır (K: kontrol, EK: enzim kontrol, SK: substrat kontrol, ES: enzim+substrat):  
K : 2 ml Na-fosfat buffer (1 adet)  
EK : 1 ml Na-fosfat solüsyonu + 1 ml enzim (5 adet)  
SK : 1 ml Na-fosfat solüsyonu + 1 ml substrat solüsyonu (5 adet)  
ES : 1 ml enzim + 1 ml substrat (5 adet)
4. Hazırlanan deney tüpleri vortekslendikten sonra enzimin optimum sıcaklık değerine ayarlanmış su banyosunda 30 dk. süreyle inkübe edilmiştir.
5. Süre sonunda tüpler su banyosundan alınmış ve her bir tüpün içerisine 3'er ml DNS solüsyonu ilave edilerek vortekslenmiştir.
6. Deney tüpleri kaynar su içerisinde 5 dk. süreyle bekletilerek son ürün (glukoz) miktarına bağlı renk değişimlerinin olması sağlanmıştır.
7. Örnekler soğuması için oda koşullarında en az 1 saat süreyle bekletilmişlerdir.
8. Kontrol grubu şahit olarak kullanılmış ve diğer tüm örneklerin spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda okumaları yapılmıştır.
9. Tüm bu aşamalar (1-8. aşamalar) sırasıyla 24., 48., 72., 96. ve 120. saatler için ayrı ayrı tekrar edilmiştir.
10. Ortalama ES değerlerinden ortalama EK ve SK değerlerinin çıkarılması [Enzim Aktivite Değeri (EAD)=ES-(EK+SK)] ile enzim aktivitesinden kaynaklı spektrofotometrik değerler elde edilmiştir.
11. En yüksek değer 100 olarak kabul edilmiş ve diğer değerler relatif olarak hesaplanmıştır. Relatif aktivite değerleri kullanılarak enzime ait zamana göre aktivite grafiği elde edilmiştir.

### 3.2.2.6. Bazı Kimyasalların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Bazı kimyasalların enzim aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi aşağıda verilen protokol uyarınca yapılmıştır. Protokolde Na-fosfat solüsyonu (50 mM, pH 6.5), substrat solüsyonu (%2 w/v, Na-fosfat solüsyonunda otoklavlanarak çözünmüş çözümlü nişasta), enzim (bakteri süpernatantı) ve MgCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, FeSO<sub>4</sub>, EDTA kimyasalları başlangıç tüp bileşenleri olarak kullanılmıştır.

1. Her bir kimyasal madde için ayrı olacak şekilde aşağıda verildiği şekilde deney tüpleri hazırlanmıştır (K: kontrol, EK: enzim kontrol, SK: substrat kontrol, ES: enzim+substrat):  
K : 2 ml Na-fosfat buffer (5 mM MgCl<sub>2</sub> içeriyor) (1 adet)  
EK : 1 ml Na-fosfat solüsyonu + 1 ml enzim (5 mM MgCl<sub>2</sub> içeriyor) (5 adet)  
SK : 1 ml Na-fosfat solüsyonu + 1 ml substrat solüsyonu (5 mM MgCl<sub>2</sub> içeriyor) (5 adet)  
ES : 1 ml enzim + 1 ml substrat (5 mM MgCl<sub>2</sub> içeriyor) (5 adet)
2. Hazırlanan deney tüpleri vortekslendikten sonra enzimin optimum sıcaklık değerine ayarlanmış su banyosunda 30 dk. süreyle inkübe edilmiştir.
3. Süre sonunda tüpler su banyosundan alınmış ve her bir tüpün içerisine 3'er ml DNS solüsyonu ilave edilerek vortekslenmiştir.
4. Tüm bu aşamalar (1., 2. ve 3. aşamalar) sırasıyla CuSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, FeSO<sub>4</sub>, EDTA için ayrı ayrı tekrar edilmiştir. Ayrıca bu kimyasal maddelerin hiçbirinin kullanılmadığı bir kontrol grubu da oluşturulmuştur.
5. Tüm deney tüpleri kaynar su içerisinde 5 dk. süreyle bekletilerek son ürün (glukoz) miktarına bağlı renk değişimlerinin olması sağlanmıştır.
6. Örnekler soğuması için oda koşullarında en az 1 saat süreyle bekletilmişlerdir.
7. Kontrol grubu şahit olarak kullanılmış ve diğer tüm örneklerin spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda okumaları yapılmıştır.
8. Ortalama ES değerlerinden ortalama EK ve SK değerlerinin çıkarılması [Enzim Aktivite Değeri (EAD)=ES-(EK+SK)] ile enzim aktivitesinden kaynaklı spektrofotometrik değerler elde edilmiştir.
9. Hiçbir kimyasal malzeme içermeyen kontrol grubunun absorbans değeri 100 olarak kabul edilmiş ve kimyasal malzeme içeren grupların absorbans değerleri relatif olarak hesaplanmıştır.

### 3.2.3. SDS-PAGE ve Zimogram Analizleri

#### 3.2.3.1. Bakteriye Ait Hücre Dışı Enzim Örneklerinin Hazırlanması

İzolat bakteriden hücre dışı enzim örnekleri aşağıda verilen protokol uyarınca yapılmıştır:

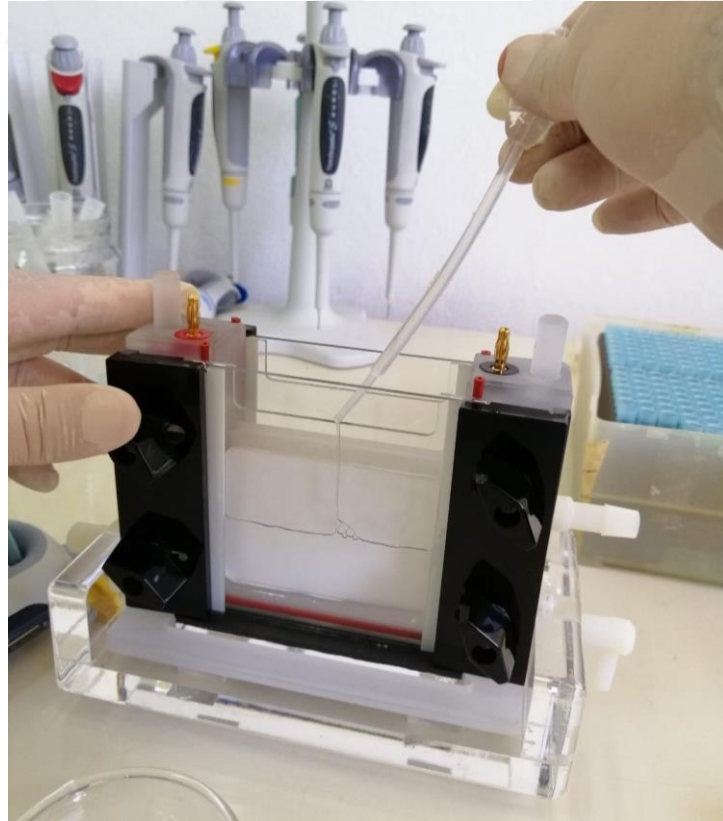
1. İzolat LB sıvı besi yerinde 37 °C’de 48 saat boyunca üretilmiştir.
2. Bakteri kültürü 4.900 rpm’de 10 dk. süreyle santrifüj edilerek hasat edilmiştir. Hücre dışı sıvı faz (süpernatant) alınarak başka steril tüplere aktarılmıştır.
3. Süpernatant örneklerinin üzerine 1:1 oranında %20 (w/v) TCA ilave edilmiştir. Örnekler bu şekilde 24 saat süreyle oda sıcaklığında bekletilmiştir.
4. Süre sonunda örnekler 4.950 rpm’de 10 dk. süreyle santrifüj edilmiş ve denatüre olmuş olan hücre dışı proteinler pelet haline getirilmiştir. Süpernatant kısım dikkatlice dökülerek uzaklaştırılmıştır.
5. Tüpler ters çevrilerek bir kurutma kâğıdının üzerine konmuş ve protein peletlerinin bu şekilde 20-30 dk. süreyle oda sıcaklığında kurumaları sağlanmıştır.
6. Protein peletleri miktarları göz önünde bulundurularak uygun hacimde (100-200 µl) tris solüsyonu (1 M, pH: 8.0) ile çözülerek daha sonra kullanılmak üzere -20° C’ye kaldırılmıştır.

#### 3.2.3.2. SDS-PAGE’nin Hazırlanması

SDS-PAGE deneyi Laemmli (1970)’e göre yapılmıştır. SDS-PAGE düzeneği üretici firma tarafından verilen protokole göre hazırlanmıştır. Jel ise %12’lik olacak şekilde aşağıda verilen protokol uyarınca hazırlanmıştır:

1. Ayırıcı jel [akrilamid-bisakrilamid solüsyonu (%30 w/v) 12.0 ml, Tris (2 M, pH 8.8) 5.62 ml, SDS (%10 w/v) 0.3 ml, nişasta solüsyonu (%3 w/v) 3 ml, saf su 9.1 ml] karışımı hazırlandıktan sonra, polimerizasyonu sağlamak için üzerine 200 µl amonyum persülfat (%10 w/v) ve 20 µl TEMED ilave edilmiştir (Ayırıcı jele nişasta bileşeni zimogram analizi için ilave edilmiştir. Zimogram analizinin yapılmadığı durumlarda jel bileşenlerinden nişasta solüsyonu çıkarılır, aynı miktarda saf su ilave edilir).

2. Hazırlanan ayırıcı jel karışımı daha önce hazırlanan iki cam levhadan oluşan düzenek arasındaki boşluğa bir pastör pipeti yardımıyla üstten yaklaşık 4 cm boşluk kalacak şekilde dökülmüştür (Şekil 3.4).
3. Jelin üzerine için ince bir katman olacak şekilde su ile satüre edilmiş bütanol (veya saf su) eklenerek polimerizasyon için 45 dk. beklenmiştir.
4. Süre sonunda üstte bulunan bütanol uzaklaştırılmış ve kalanı bir parça filtre kâğıdına emdirilerek jel bütanoldan iyice arındırılmıştır.
5. Toplayıcı jel [akrilamid-bisakrilamid solüsyonu (%30 w/v) 1.8 ml, tris (0,5 M, pH 6,8) 3.65 ml, SDS (%10 w/v) 0.15 ml, saf su 9.4 ml] hazırlanarak polimerize olması için içerisine 100 µl amonyum persülfat (%10 w/v) ve 10 µl TEMED eklenmiştir
6. Hazırlanan toplayıcı jel karışımı beklemeden bir pipet yardımıyla toplayıcı jelin üzerine dökülmüştür.
7. Üst kısımdan jel tarağı yerleştirilerek jelin donması için 45 dk. beklenmiştir.
8. Süre sonunda tarak çıkarılmış ve jel daha önce hazırlanmış olan elektroforez tankı düzeneği içerisine yerleştirilmiştir.
9. Düzeneğe, jele alttan ve üstten temas edecek şekilde elektrod solüsyonu (0.05 M glisin, 0.05 M tris-baz, % 0.1 w/v SDS) ilave edilmiştir.

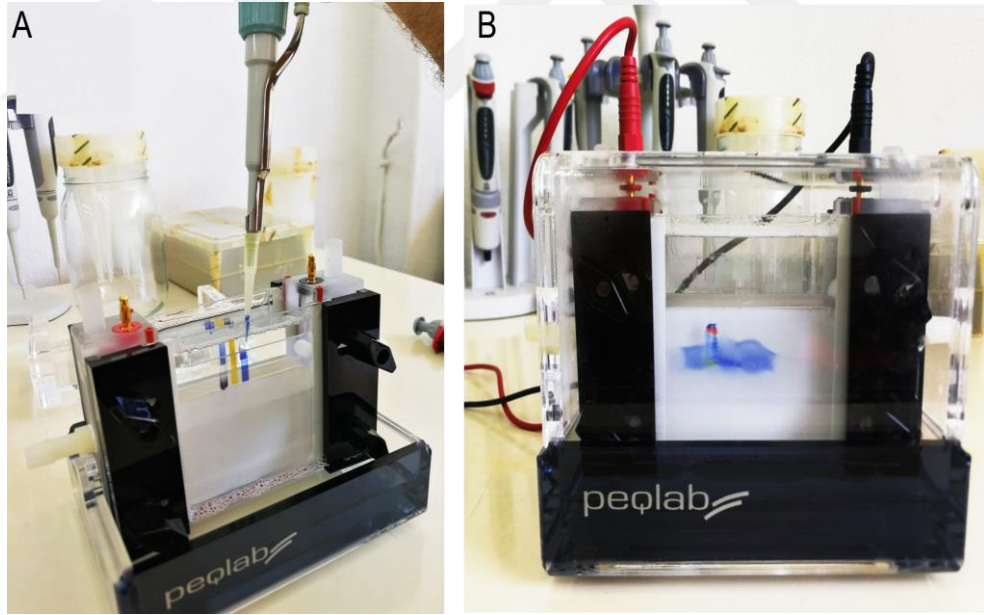


Şekil 3.4. SDS-Poliakrilamid jelin hazırlanması

### 3.2.3.3. Enzim Örneklerinin Jele Yüklenmesi ve Elektroforezi

Enzim örneklerinin jele yüklenmesi ve elektroforezi aşağıda verilen protokol uyarınca yapılmıştır:

1. Daha önce hazırlanmış olan protein örneklerinin üzerine hacmin yarısı kadar kaynatma solüsyonu [0.25 M Tris-HCL (pH 6.8), % 15 w/v SDS, %50 v/v gliserol, %25 v/v  $\beta$ -merkaptoethanol, %0.01 w/v bromophenol blue] ilave kaynar suda 3 dk. süreyle bekletilmiştir.
2. Kaynatma işlemi tamamlandıktan sonra jelin birinci kuyusuna 10  $\mu$ l ticari markır (Thermo Fisher, SM0431) sırasıyla diğer kuyulara 50  $\mu$ l olacak şekilde protein örnekleri bir mikropipet yardımıyla yüklenmiştir (Şekil 3.5A).
3. Elektroferez cihazı güç kaynağına bağlandıktan sonra protein örnekleri toplayıcı jelde 25 mA, 60 V, ayırıcı jelde ise 40 mA, 80 V akım uygulanarak yürütülmüştür (Şekil 3.5B). İzleme boyası jelin sonuna geldiğinde elektrik akım durdurularak elektroferez işlemi sonlandırılmıştır.



Şekil 3.5. Hücre dışı proteinlerin SDS-PAGE'ye yüklenmesi (A) ve elektroforezi (B)

### 3.2.3.4. Elektroferez Sonrası İşlemler

Elektroferez sonrası işlemler (jelin boyanması ve fazla boyanın uzaklaştırılması) aşağıda verilen protokol uyarınca yapılmıştır:

1. İzleme boyası jelin sonuna geldikten sonra güç kaynağı kapatılarak elektrik akımı kesilmiştir.
2. Jel, iki cam levha arasından dikkatli bir şekilde çıkarılarak içerisinde boyama solüsyonu (%40 v/v metanol, %10 v/v glasiyal asetik asit, %50 v/v saf su, %0,1 w/v Coomassie blue R 250) bulunan bir kabın içerisine aktarılmıştır. Jel bu boyanın içerisinde ara sıra hafifçe çalkalanarak 1 saat süreyle bekletilmiştir.
3. Süre sonunda jel boya solüsyonundan alınmış yıkama solüsyonu (destain, %40 v/v metanol, %10 v/v glasiyal asetik asit, %50 v/v saf su) içerisine konmuştur. İçinde yıkama solüsyonu ve jel bulunan kap çalkalayıcı üzerine konmuş ve ertesi güne kadar oda sıcaklığında hafif devirde çalkalanarak fazla boyanın uzaklaşması sağlanmıştır. Yıkama solüsyon birkaç kez değiştirilerek protein bantlarının daha net bir görüntü vermesi sağlanmıştır.
4. Jel görüntüsü netleştikten sonra fotoğraflanmıştır.

### 3.2.3.5. Zimogram Analizi ile Enzimin Moleküler Ağırlıklarının Belirlenmesi

Zimogram analizi ile enzimin moleküler ağırlığının belirlenmesi aşağıda verilen protokol uyarınca yapılmıştır:

1. Elektroferez işlemi tamamlandıktan sonra SDS-Nişasta-PAGE jel iki cam levha arasından dikkatli bir şekilde çıkarılarak Solüsyon-1 (50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + %20 v/v izopropanol) içerisine alınmış ve 1 saat süreyle çalkalanarak SDS'nin jelden uzaklaşması sağlanmıştır.
2. Süre sonunda jel Solüsyon-1'den alınarak Solüsyon-2 (50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 1 mM EDTA + 5 mM  $\beta$ -merkaptto ethanol) içerisine aktarılmıştır. Jel bu solüsyon içerisinde gece boyunca +4 °C'de muhafaza edilerek denatüre olan proteinlerin renatüre olması sağlanmıştır.
3. Ertesi sabah jel bu sefer Solüsyon-3 (50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) içerisine aktararak +4° C'de 1 saat süreyle bekletilmiştir.

4. Süre sonunda jel bu solüsyondan alınarak streç film ile iyice sarılmıştır. Bu halde jel 4-5 saat süreyle 37 °C’de inkübe edilmiş ve enzimlerin jeldeki nişastayı hidrolize etmesi sağlanmıştır.
5. İnkübasyon sonunda jel iyodin boyasına (%0,1 w/v iyodin, %50 v/v metanol) alınarak aktivite bantları görününceye kadar (20-30 dk.) bu boya içerisinde bekletilmiştir (Saul, vd., 1990).
6. Markır proteinler yardımıyla enzimlerin moleküler ağırlıkları hesaplanmıştır.

#### **3.2.4. İzolatın Antibiyogram Testi**

İzolatın antibiyotiklere karşı dirençliliklerinin belirlenmesi aşağıda verilen protokol uyarınca yapılmıştır:

1. İzolat bakteri LB-sıvı besiyerinde gece boyunca uygun çalkalama hızında üretilmiştir.
2. Üremiş olan bakteriden 100 µl alınarak LB-agar plağına cam çubukla yayma yöntemiyle ekilmiştir.
3. Farklı antibiyotikler emdirilmiş ticari antibiyotik diskleri (P10: Penicillin, TE30: Tetracycline, SH10: Spectinomycin, CN10: Gentamycin, OFX10: Travid ofloxacin, RD5: Rifampicin, S10: Streptomycin, Amp10: Ampicillin), bakteri yayılmış olan katı besi ortamına belirli aralıklarla sterilize edilmiş bir cımbız yardımıyla yerleştirilmiş ve 10-15 dk. süreyle beklenerek kuruması sağlanmıştır (Şekil 3.5).
4. Bakteri ekilmiş plaklar ters çevrilerek 37 °C’ye ayarlanmış inkübatörde ertesi güne kadar inkübasyona bırakılmıştır.
5. Ertesi gün antibiyotik disklerinin etrafında bakteri kolonilerinin gelişip gelişmediğine bakılarak bakterinin antibiyotik dirençlilik durumu belirlenmiştir.



Şekil 3.6. İzolatların farklı antibiyotik diskleri ile antibiyogram analizleri

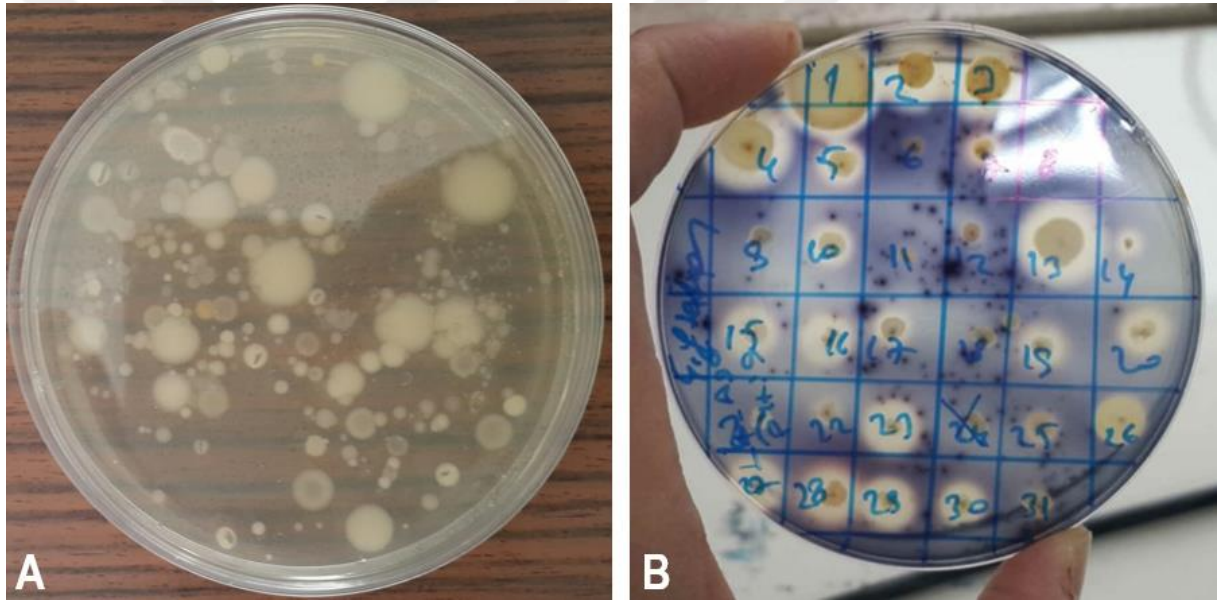


## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Bulgular

#### 4.1.1. Amilolitik Bakterilerin İzolasyonu

Bu tez çalışmasında Niğde ili sınırları içerisinde bulunan Çiftehan Kaplıcası su tahliye noktasından alınan toprak numunelerinden *Bacillus* sporlarının aerobik ortamda çimlendirilmesi ile bakterilerin izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.1A). Bakterilerin  $\alpha$ -amilaz aktivitesi LB-nişasta-agar plaklarında iyot buharı boyaması sonucu gösterilmiştir (Şekil 4.1B).



Şekil 4.1. Toprak numunelerinde *Bacillus* sporlarının LB-agar plaklarında çimlendirilmesi (A) ve iyot buharı boyaması sonucu izolatların  $\alpha$ -amilaz aktivitesi bakımından fenotipik test plak görüntüsü (B)

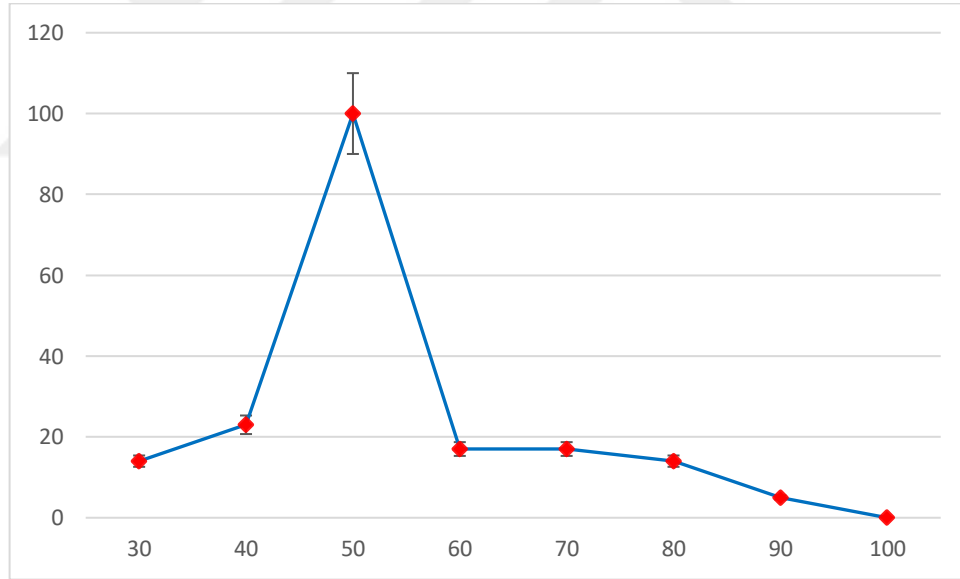
$\alpha$ -Amilaz pozitif izolatlardan aktivite zon çapı dikkate alınarak, 4 numaralı izolat (*Bacillus* sp. GA4) ileri çalışmalar için tercih edilmiştir.

#### 4.1.2. *Bacillus* sp. GA4 $\alpha$ -Amilazının Bazı Enzimatik Özellikleri

*Bacillus* sp. GA4  $\alpha$ -amilazının bazı enzimatik özellikleri (optimum sıcaklık, optimum pH, sıcaklık direnci, zamana göre enzim aktivitesi ve bazı kimyasalların enzim aktivitesi üzerine etkisi) DNS yöntemi ile ortaya çıkarılmıştır.

##### 4.1.2.1. *Bacillus* sp. GA4 $\alpha$ -Amilazının Sıcaklık Optimumu

*Bacillus* sp. GA4  $\alpha$ -amilazının optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri 50 °C olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.2). Enzim 30-50 °C sıcaklık değerleri arasında %46, 60-90 °C sıcaklık değerleri arasında %13, 30-90 °C sıcaklık değerleri arasında ise %27 relatif aktivite göstermiştir. Enzim 100 °C'de aktivitesinin tamamını kaybetmiştir. Enzimin optimum sıcaklık grafiği incelendiğinde, optimum sıcaklık değeri olan 50 °C'den uzaklaştıkça enzim aktivitesinde hızlı düşüşler olduğu gözlenmiştir.

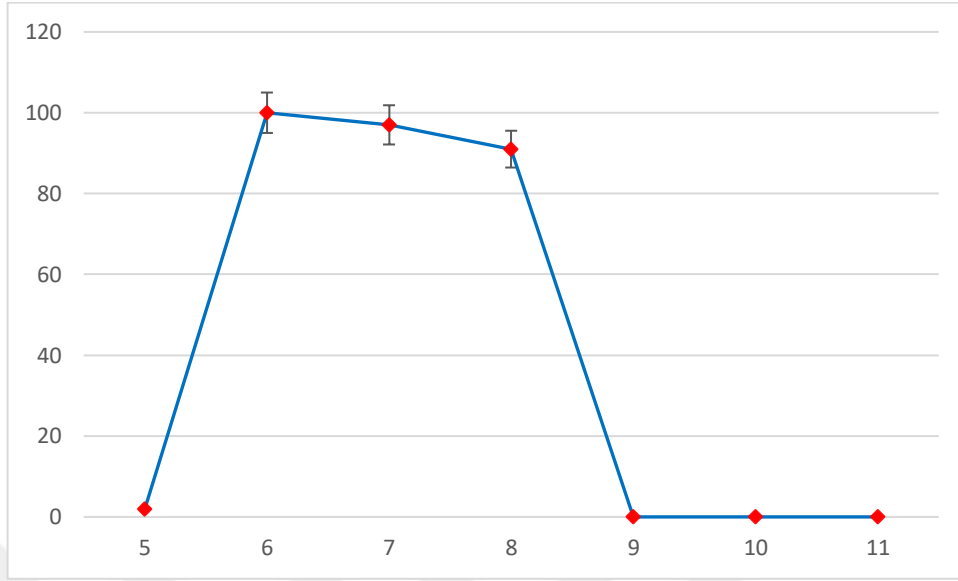


Şekil 4.2. *Bacillus* sp. GA4 izolatına ait  $\alpha$ -amilaz enziminin optimum sıcaklık grafiği

##### 4.1.2.2. *Bacillus* sp. GA4 $\alpha$ -Amilazının pH Optimumu

*Bacillus* sp. GA4  $\alpha$ -amilazının optimum aktivite gösterdiği pH değeri 6.0 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.3). Enzim 5.0-8.0 pH değerleri arasında %73 relatif aktivite göstermiştir. Enzim pH 8.0'den sonra aktivitesinin tamamını kaybetmiştir. Enzimin

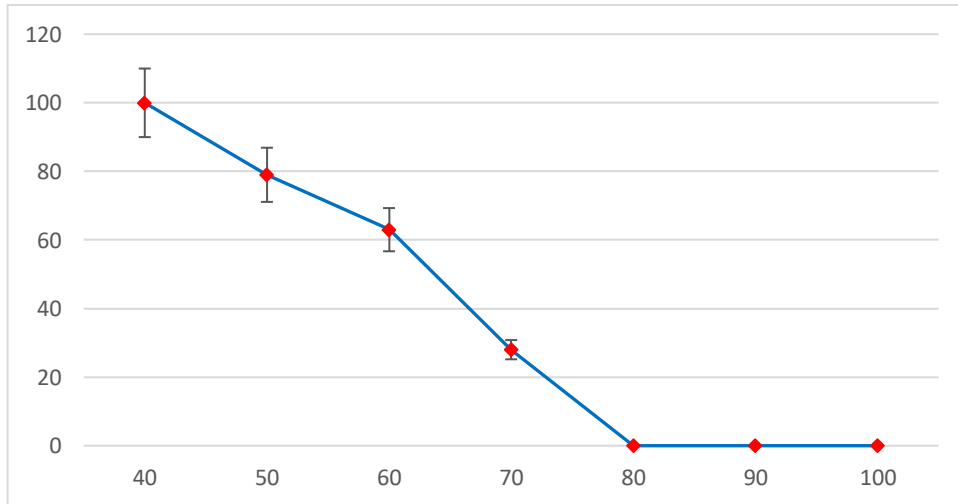
optimum pH grafiği incelendiğinde, 6.0-8.0 değerleri arasında oldukça yuđsek bir aktivite gosterdiđi goruđmuřtur.



şekil 4.3. *Bacillus* sp. GA4 izolatına ait  $\alpha$ -amilaz enziminin optimum pH grafiği

#### 4.1.2.3. *Bacillus* sp. GA4 $\alpha$ -Amilazının Termal Kararlılığı

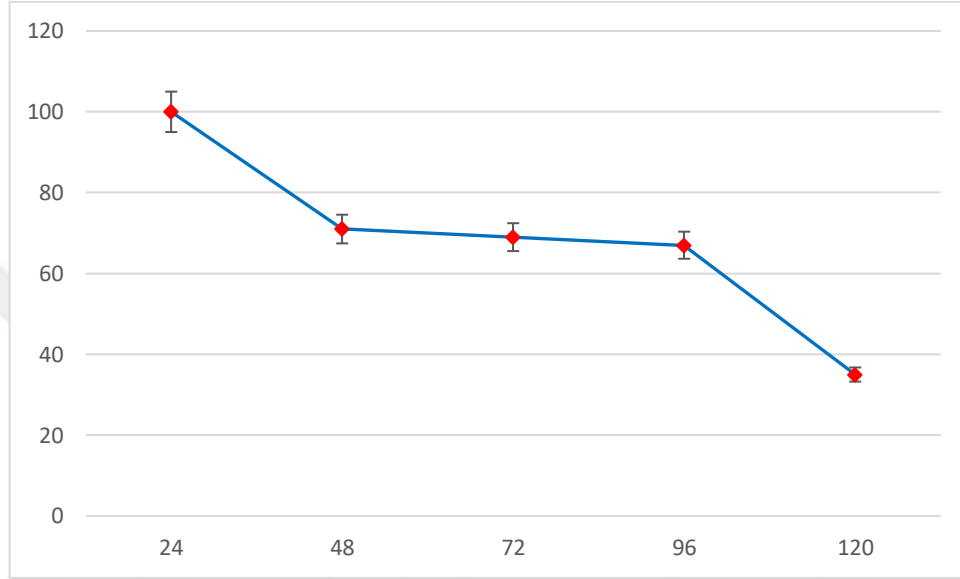
*Bacillus* sp. GA4 izolatına ait  $\alpha$ -amilaz enziminin 40 °C’de 30 dk. ön inkübasyon sonrasında aktivitesini tamamen korumuştur. Enzimin 50 ve 60 °C sıcaklıklarda 30 dk. ön inkübasyonu sonrasında sırasıyla %21 ve %37 relatif aktivite kaybı yaşamıştır. Enzim 80 °C ve sonraki sıcaklık değerlerinde ön inkübasyonu sonrasında ise aktivitesinin tamamını kaybetmiştir (şekil 4.4).



şekil 4.4. *Bacillus* sp. GA4 izolatına ait  $\alpha$ -amilaz enziminin termal kararlılık grafiği

#### 4.1.2.4. *Bacillus* sp. GA4 $\alpha$ -Amilazının Zamana Göre Aktivite Düzeyi

*Bacillus* sp. GA4 relatif olarak en yüksek düzeyde enzim aktivitesini inokülasyondan itibaren 12. saatte göstermiştir (Şekil 4.5). Enzim aktivitesi 12. saatte relatif olarak %100 kabul edildiğinde, enzim aktivitesi 48., 72., 96. ve 120. saatlerde sırasıyla %71, %69, %67 ve %35 düzeyinde olmuştur.

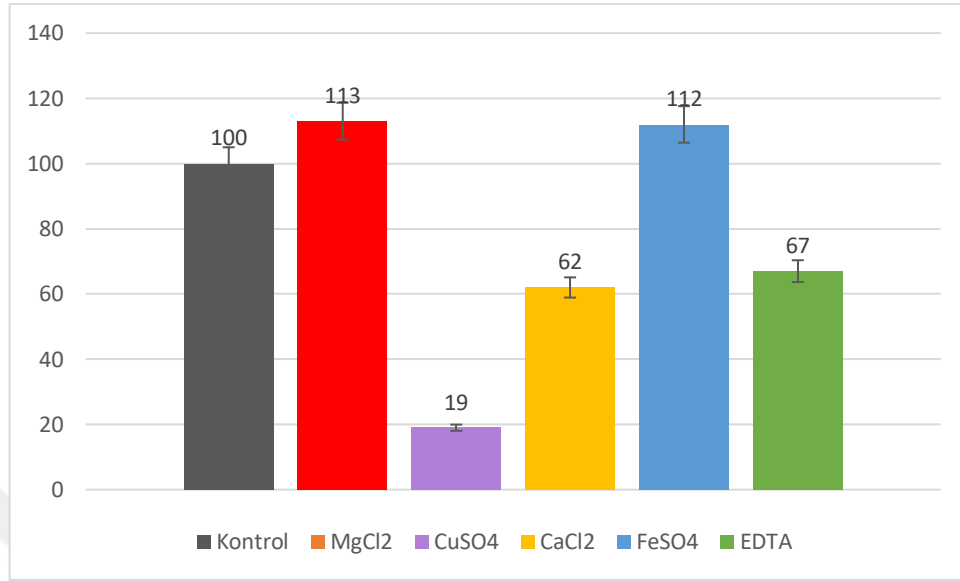


Şekil 4.5. *Bacillus* sp. GA4 izolatına ait  $\alpha$ -amilaz enziminin zamana göre enzim aktivite grafiği

#### 4.1.2.5. Bazı Kimyasalların *Bacillus* sp. GA4 $\alpha$ -Amilaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

MgCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, FeSO<sub>4</sub>, EDTA kimyasal maddelerinin *Bacillus* sp. GA4 izolatına ait  $\alpha$ -amilaz enziminin aktivitesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Hiçbir kimyasal maddenin kullanılmadığı kontrol grubunun enzim aktivite düzeyi %100 olarak kabul edilmiş ve kimyasal maddelerin kullanıldığı grupların enzim aktivite düzeyleri hesaplanarak kontrol grubuna göre relatif aktivite düzeyleri belirlenmiştir. Muamele gruplarından MgCl<sub>2</sub> ve FeSO<sub>4</sub>'ün kullanıldığı gruplarda enzim aktivitesi relatif olarak sırasıyla %13 ve %12 olarak hesaplanmıştır. CuSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub> ve EDTA'nın kullanıldığı gruplarda ise kontrol grubuna göre enzim aktivitesinde düşüş gözlenmiştir. Bu gruplardaki relatif enzim aktivitesi sırasıyla %19, %62 ve %67 olarak

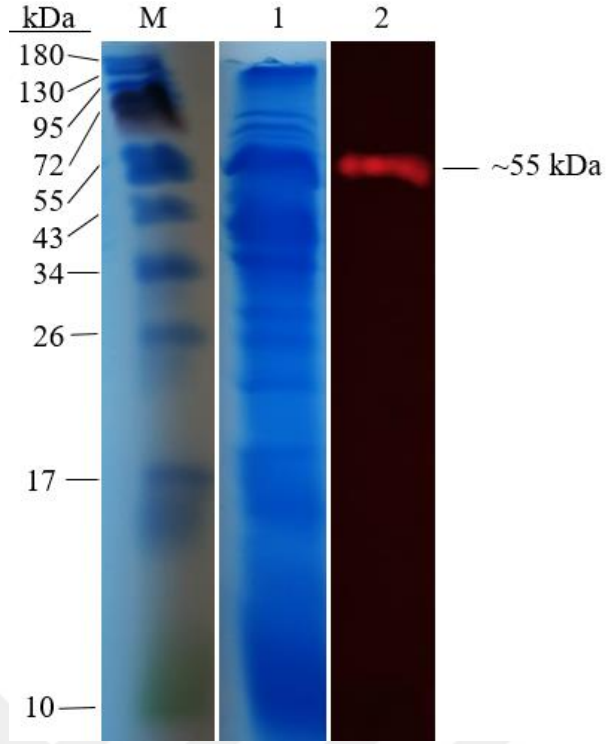
hesaplanmıştır (Şekil 4.6). Bir başka ifadeyle enzim aktivitesindeki relatif kayıp seviyesi aynı sırayla %81, %38 ve %33 seviyesinde olmuştur.



Şekil 4.6. Bazı kimyasal maddelerin *Bacillus* sp. GA4  $\alpha$ -amilaz enzimi aktivitesi üzerine etkisi

#### 4.1.3. SDS-PAGE ve Zimogram Analizine İlişkin Bulgular

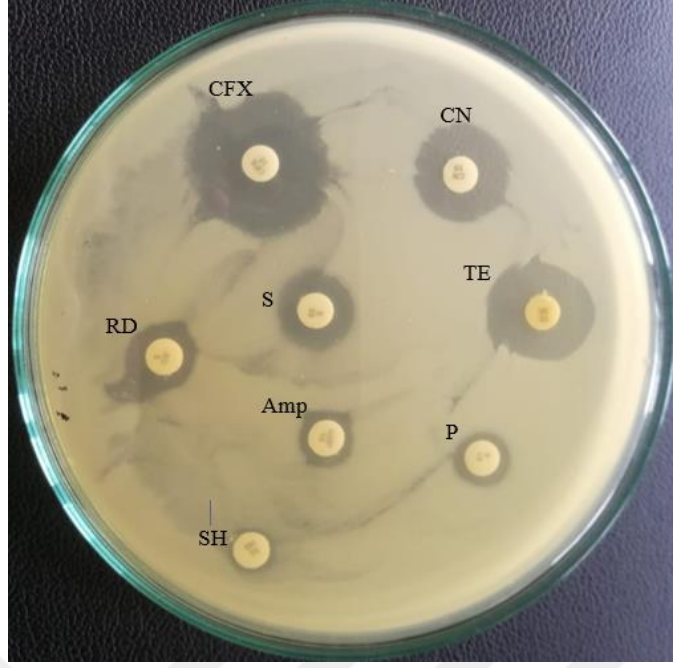
*Bacillus* sp. GA4 bakterisine ait hücre dışı toplam proteinler %12'lik SDS-PAGE'de Coomassie blue boyaması ile gösterilmiştir. Nişasta içeren SDS-PAGE'nin iyot boyaması sonucu *Bacillus* sp. GA4  $\alpha$ -amilaz enziminin moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 55 kDa olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. *Bacillus* sp. GA4 izolatına ait toplam proteinlerin SDS-PAGE'deki görüntüsü ve zimogram analizi

#### 4.1.4. İzolatın Antibiyogram Testi

*Bacillus* sp. GA4 izolatının bazı antibiyotiklerine dirençlilik durumlarını belirlemek için antibiyogram testi yapılmıştır. Antibiyogram sonucunda izolat CFX (26 mm), CN (19 mm) ve TE (20 mm) entibiyotiklerine karşı dirençlilik göstermemiştir. İzolat, RD (10 mm), S (13 mm), Amp (9 mm) ve P (9 mm) antibiyotiklerine ise kısmi dirençli bulunmuştur. Buna karşılık izolat SH antibiyotiğine tam dirençli bulunmuştur (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. *Bacillus* sp. GA4 izolatının antibiyogram plak görüntüsü (P: Penicillin, TE: Tetracycline, SH: Spectinomycin, CN: Gentamycin, OFX: Travid ofloxacin, RD: Rifampicin, S: Streptomycin, Amp: Ampicillin)

#### 4.2. Tartışma

Yapılan bu tez çalışması ile Niğde ili sınırları içerisinde bulunan Çiftahan Kaplıcası civarından alınan toprak numunesinden  $\alpha$ -amilaz üreten bakterilerin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu bakterilerden GA4 izolatı LB-nişasta-agar plağında iyot boyaması sonucu  $\alpha$ -amilaz aktivite zon çapı göz önünde bulundurularak ileri çalışmalar için belirlenmiştir. İzolat, bakteri sporunun aerobik ortamda çimlendirmesi sonucu *Bacillus* olarak tanımlanmıştır (Remize, 2017).

Bakteriyel  $\alpha$ -amilazlar oldukça yoğun çalışılmıştır. Bunun en büyük sebeplerinden birisi,  $\alpha$ -amilazların oldukça yoğun bir endüstriyel kullanıma sahip olması olarak düşünülebilir. Birçok kaynak tarafından üretiliyor olması, çalışmasının kolay ve çalışma maliyetinin düşük olması ise yoğun çalışılmasının diğer sebepleri arasındadır. Sadece  $\alpha$ -amilazlar değil, diğer bakteriyel kökenli enzimler de birçok avantajlarından dolayı bitkisel ve hayvansal kaynaklı enzimlere göre tercih edilmektedir. Mikroorganizmalar içinde özellikle *Bacillus* cinsi bakteriler endospor oluşturmaları,

patojen olmamaları ve ürettikleri enzimleri hücre dışına salgılamalarından dolayı oldukça popüler enzim üretici organizmalardır (Harwood, 1992; Vehmaanperä, 1990). Bu tez çalışması kapsamında izole edilen *Bacillus* sp. GA4 bakterisi her ne kadar 55 °C’de izole edilmiş olsa da 37 °C’ye ayarlanmış inkübatörde daha yüksek üreme gücü göstermiştir. Bu bakımdan bakteri mezofilik olarak tanımlanabilir. Fakat bakteri tarafından üretilen  $\alpha$ -amilaz enzimi optimum aktivitesini 50 °C’de göstermiştir. Mezofilik mikroorganizmalarca termostabil enzim üretimi yeni bir bulgu değildir. *Bacillus licheniformis* ve *Bacillus amyloliquefaciens* thermo-stable  $\alpha$ -amilaz üreten mezofilik bakterilerden bazılarıdır. *Bacillus licheniformis* 11-57 °C sıcaklık değerleri arasında gelişim göstermekte olup, optimum üreme sıcaklığı 49 °C olarak rapor edilmiştir (Trunet, vd., 2015). *Bacillus amyloliquefaciens* ise 37 °C’de optimum gelişme göstermekte olup, 45-50 °C’de optimum aktivite gösteren  $\alpha$ -amilaz enzimi üretmektedir. Bu çalışmada izole edilen *Bacillus* sp. GA4 bakterisinin cins düzeyinde tanımlama yapılması ancak 16S rDNA, Vitec 2 Compact, API 50 testlerinin en az bir tanesinin veya tercihen birkaç tanesinin birden yapılarak doğru tanımlamanın ortaya konulması gerekmektedir.

Endüstriyel enzim üretiminde termostabil enzimlerin mezofilik mikroorganizmalara ürettirilmesi sıklıkla başvurulan yöntemlerden birisidir. Bunun en önemli sebebi, bakteriyi mezofilik koşullarda (37 °C) düşük maliyetle üretmek, daha sonra sıcaklık uygulaması ile mezofilik kökenli enzimleri denatüre ederek thermo-stable enzimi kolaylıkla saflaştırmaktır (Özcan, 2005). Fakat bu daha çok patojen olmayan ve GRAS (Generally Recognized as Safe, Genel Olarak Güvenli) kabul edilen mikroorganizmalara ilgili enzimi üreten genin klonlanması şeklinde gerçekleştirilir. Bu çalışmada izole edilen *Bacillus* sp. GA4 bakterisinin patojenite testi yapılmamıştır. Ayrıca  $\alpha$ -amilaz gibi başka termostabil enzimler de ürettiyor olabilir. Dolayısıyla doğal izolat *Bacillus* sp. GA4 izolatı tarafından termostabil  $\alpha$ -amilaz enziminin üretimi bu açıdan bakıldığında avantajlı olmayabilir.  $\alpha$ -Amilaz geninin mezofilik başka bir endüstriyel suşta klonlanması düşünülebilir. Fakat 50 °C’de optimum aktivite gösteren enzimin, bu sıcaklık değerlerinden uzaklaştıkça aktivitesini hızla kaybetmesi endüstriyel kullanımını kısıtlayabilir. Ayrıca GA4  $\alpha$ -amilazı sadece pH 6.0-8.0 değerlerinde aktivite göstermiş, bunun dışında kalan pH değerlerinde ise aktivitesini tamamen kaybetmiştir. Kısıtlı bir pH aralığında aktivite göstermesi ve 70 °C’den



sonraki sıcaklık değerlerinde ön inkübasyon sonucu aktivitesini tamamen kaybetmesi enzimin endüstriyel kullanımını oldukça sınırlandıracaktır.

CuSO<sub>4</sub> enzimin %81 oranında aktivitesini kaybetmesine sebep olmuştur. Denenen kimyasal maddelerden sadece MgCl<sub>2</sub> ve FeSO<sub>4</sub> kısmi bir stimülasyon etki (sırasıyla %12 ve %13) göstermiştir. Daha geniş yelpazede kimyasal maddenin enzim üzerindeki aktivitesi incelenebilir ve enzimin ticari kullanımında bu veriler dikkate alınarak daha isabetli yorumlar ortaya konulabilir. Bununla birlikte klonlama ve bölge yönlendirmeli mutagenез teknikleri ile enzim özelliklerinde birtakım iyileştirmeler yapılabilir ve endüstriyel kullanım için daha uygun hale getirilebilir.

Zimogram analizi enzimin moleküler ağırlığını yaklaşık 55 kDa olarak ortaya koymuştur. Bakteriyel  $\alpha$ -amilazların moleküler ağırlıkları 10 ile 210 kDa arasında geniş bir aralığa sahiptir. *Bacillus caldolyticus* 10 kDa (Grootegoed, vd., 1973), *Bacillus subtilis* KIBGE HAS 56 kDa (Bano, vd., 2011), *Bacillus subtilis* BS5 63 kDa (Femi-Ola ve Olowe, 2011), *Chloroflexus aurantiacus* 210 kDa (Ratanakhanokchai, 1992), *Acyclobacillus acidocaldarius* 160 kDa (Matzke, vd., 1997), *Bacillus licheniformis* 31 ve 58 kDa (Bozic, vd., 2011; Hmidet, vd., 2008), *Lactobacillus manihotivorans* 135 kDa (Aguilar, vd., 2000), *Bacillus* sp. YX1 56 kDa (Liu ve Xu, 2008) amilazları bunlardan bazılarıdır. *Bacillus* sp. GA4  $\alpha$ -amilazının moleküler ağırlığı bu aralıkta yer almakta ve benzer moleküler ağırlığa sahip birçok amilaz rapor edilmiştir.

Sonuç olarak bu çalışma kapsamında sıcaklığa dirençli  $\alpha$ -amilaz enzimi üreten mezofilik *Bacillus* sp. GA4 bakterisi izole edilmiştir. Enzimin kısmi karakterizasyon sonuçları, enzimin bu haliyle endüstriyel kullanım için çok uygun olmadığını göstermektedir. Fakat moleküler genetik teknikleri ile enzimin özellikleri geliştirilebilir ve endüstriyel kullanıma uygun hale getirilebilir.

## KAYNAKLAR

- Abdel-Fattah, Y.R., Soliman, N.A., El-Toukhy, N.M., El-Gendi, H., Ahmed, R.S., Production, purification, and characterization of thermostable  $\alpha$ -amylase produced by *Bacillus licheniformis* isolate AI20, Journal of Chemistry Hindawi, 2013:11, 2012.
- Aguilar, G.J., Morlon-Guyot, B., Trejo-Aguilar, C., Guyot, J.P., Purification and characterization of an extracellular  $\alpha$ -amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010T an amyolytic lactic acid bacterium, Enzyme Microb. Technol., 27:406–413, doi: 10.1016/S0141-0229(00)00230-1, 2000.
- Agüloglu Fincan, S., Enez, B., Özdemir, S., Matpan Bekler, F., Purification and characterization of thermostable  $\alpha$ -amylase from thermophilic *Anoxybacillus flavithermus*, Journal Of Carbohydrate Polymers, 102:144-150, 2014.
- Anto, H., Trivedi, U., Patel, K.,  $\alpha$ -Amylase Production by *Bacillus cereus*, Food Technol. Biotechnol., 44(2):241-245, 2006.
- Appel, S.H., Alpersi, D.H., Tomkins, G.M., Multiple Molecular Forms of  $\beta$  Galactosidase, J.Mol.Biol., 11:12-22, 1965.
- Aquino, A.C.M.M., Jorge, J.A., Terenzi, H.F., Polizeli, M.L.T.M., Studies on a thermostable  $\alpha$ -amylase from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*, Appl Microbiol Biotechnol, 61: 323-328, 2003.
- Aravidan, R., Anbumathi, P., Viruthagiri, T., Lipase applications in food industry, Indian Journal of Biotechnology, 6: 141–158, 2007.
- Ariffin, H., Abdullah, N., Umi Kalsom, M.S., Shirai, Y., Hassan, M.A., Production and characterisation of cellulase by *Bacillus pumilus* EB3, International Journal of Engineering and Technology, 3(1):47-53, 2006.
- Ash, C., Farrow, J.A.E., Wallbanks, S., Collins, M.D., Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences, Lett. Appl. Micro-biol., 13:202–206, 1991.
- Bader, J., Albin, A., Stahl, U., Spore-forming bacteria and their utilisation as probiotics, Benef.Microbes., 3:67-75, Doi:10.3920/BM2011.0039, 2012.

- Bano, S., Qader, S.A.U., Aman, A., Syed, M.N., Azhar, A., Purification and characterization of novel  $\alpha$ -Amylase from *Bacillus subtilis* KIBGE HAS, *AAPS PharmSciTech*, 12(1): 255–261, 2011.
- Barrett, A.J., Rawlings, N.D., Woessner, J.F., *The handbook of proteolytic enzymes*, 2nd ed., Academic Press, 2003.
- Barros, M., Fleuri, L.F., Macedo, G.A., Seed lipase: sources, applications and properties a review, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 27:15–29, 2010.
- Bernfeld, P., *Amylases, Alpha and Beta*. (Editörler: Colowick, S.P., Kaplan, N.O.), *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, USA, 1:149-158, 1955.
- Biswas, I., Kayastha, A.M., Seckler, R., Purification and characterization of a thermostable  $\beta$ -galactosidase from kidney beans (*Phaseolus vulgaris L.*) cv. PDR14, *J Plant Physiol.*, 160:32-37, 2003.
- Bonugli-Santos, R.C., Vasconcelos, M.R.S., Passarini, M.R.Z., Vieira, G.A.L., Lopes, V.C.P., Mainardi, P.H., dos Santos, J.A., Duarte, L.A., Otero, I.V.R., Yoshida, A.M.S., Feitosa, V.A., Pessoa Jr., A., Sette, L.D., Marine-derived fungi: diversity of enzymes and biotechnological applications, *Frontiers in Microbiology*, 6:1–15, 2015.
- Borrelli, G. M., Trono, D., Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications, *International Journal of Molecular Sciences*, 16: 20774–20840, 2015.
- Bozic, N., Ruiz, J., Lopez-Santin, J., Vujcic, V., Production and properties of the highly efficient raw starch digesting  $\alpha$ -amylase from a *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a, *Biochem. Eng. J.*, 53:203–209, doi: 10.1016/j.bej.2010.10.014, 2011.
- Bruins, M.E., Jansen, A.E.M., Boom, R.M., *Thermozymes and Their Applications*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 90:155-186, 2001.
- Brumm, P.J., Hebeda, R.E., Teague, W.M., Purification & characterization of commercialized, cloned *Bacillus megaterium*  $\alpha$ -amylase, Part I: Purification

- &hydrolytic properties, *Starch/Stärke Biosynthesis Nutrition Biomedical*, 43(8):319–323, 1991.
- Buleon, A., Colonna, P., Planchot, V., Ball, S., Starch granules: structure and biosynthesis, *International Journal of Biological Macromolecules*, 23:85-112, 1998.
- Bulut, S., *Teredinobacter turnirae*'den proteaz üretiminde farklı stratejilerin araştırılması, *Fırat Üniv. Fen ve Müh. Bil. Dergisi-Science and Eng. Journal of Fırat Univ*, 19(4):561-568, 2007.
- Burhan, A.I., Nisa, U., Gokhan, C., Omer, C., Ashabil, A., Osman, G., Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6, *J Process Biochem.*, 38(10):1397–1403, 2003.
- Canganella, F., Andrade, C., Antranikian, G., Characterization of amylolytic and pullulytic enzymes from thermophilic archaea and from a new *Feravidobacterium* species, *Appl. Microb. Biotechnol.*, 42:239–245, 1994.
- Cavaco-Paulo, A., Gübitz, G.M., *Textile Processing with Enzymes*, Woodhead Publishing Ltd, England, 2003.
- Chakraborty, K., Bhattacharyya, B.K., Sen, S.K., Purification and characterization of thermostable alpha-amylase from *Bacillus stearothermophilus*, *Journal of Folia Microbiologica*, 45(3):207- 210, 2000.
- Chelikani, P., Fita, I., Loewen, P.C., Diversity of structures and properties among catalases, *Cell. Mol. Life Sci.*, 61(2),192-208, 2004.
- Choudhury, P., Bhunia, B., Industrial application of lipase: A review, *Biopharm Journal*, 1(2): 41–47, 2015.
- Cohn, M., Monod, J., Purification de la  $\beta$ -galactosidase (Lactase) de *Escherichia coli*, *Biochimica et Biophysica Acta.*, 7:153-173, 1951.
- Cordeiro, C.A.M., Martins, M.L.L., Bárbara Luciano, A.B., Production and properties of a-amylase from thermophilic *Bacillus* Sp., *Brazilian Journal of Microbiology*, 33(1):57-61, DOI: 10.1590/S1517-83822002000100012, 2002.

- De Mot, R., Verachtert, H., Purification and characterization of extracellular  $\alpha$ -amylase and glucoamylase from the yeast *Candida antarctica* CBS 6678, *Eur J Biochem.*, 164:643-654, 1987.
- de Souza, P.M., de Oliveira-Magalhães, P., Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry, *Braz J Microbiol.*, 41(4):850-61, 2010.
- Demirjian, D.C., Moris-Vara, F., Sassidy, C.S., Enzymes from extremophiles, *Curr Opin Chem Biol.*, 5:144–51, 2001.
- Demirkan, E., Sevgi, T., Başkurt, M., Optimization of physical factors affecting the production of the  $\alpha$ -amylase from a newly isolated *Bacillus* sp. M10 strain, *Karaelmas Fen ve Müh. Derg.*, 7(1):23-30, 2017.
- Demirkan, S., Production, purification, and characterization of  $\alpha$ -amylase by *Bacillus subtilis* and its mutant derivatives, *Turkish Journal of Biology*, 35:705-712, doi:10.3906/biy-1009-113, 2011.
- Dewan, S.S., Global markets for enzymes in industrial applications; BCC Research, Wellesly, MA, USA, 2017.
- Divakaran, D., Chandran, A., Chandran, R.P., Comparative study on production of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* strains, *Braz J Microbiol.*, 42(4): 1397–1404. doi: 10.1590/S1517 838220110004000022, 2011.
- Eichler, J., Biotechnological uses of archaeal extremozymes, *Biotechnology Advances*, 19:261-278, 2001.
- Ekka, A., Namdeo, N., Screening, isolation and characterization of amylase producing bacteria and optimization for production of amylase, *Journal of Biotechnology and Biochemistry (IOSR-JBB)*, 4(2):50-56, 2018.
- Ekşi, A., Meyve suyu durultma tekniği. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları No:9, 127 s., Ankara-Türkiye, 1998.
- Elgün, A., Ertugay, Z., Tahıl İşleme Teknolojisi, Atatürk Üniversitesi Yayınları No:356 s., 1995.
- El-Kady, E.M., Asker, M.S., Hassanein, S.M., Elmansy, E.A., El-Beih, F.M., Optimization, production, and partial purification of thermostable  $\alpha$ -amylase

- produced by marine bacterium *Bacillus* sp. NRC12017, International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, 9(8):558-570, doi: 10.25258/ijpcr.v9i08.9581, 2017.
- Eren-Kıran, Ö., Çömlekçioğlu, U., Dostbil, N., Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları, KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi, 9 (1), 2006.
- Estelle, L., Ladrat, C., Ann, G., Georges, B., Francis, D., Thermostable amylolytic enzymes of thermophilic microorganisms from deep-sea hydrothermal vents, Animal Biology CR Acad. Sci., 320:893–898, 1997.
- Femi-Ola, T.O., Olowe, B.M., Characterization of alpha-amylase from *Bacillus subtilis* BS5 isolated from *Amitermes evuncifer* Silvestri, Research Journal of Microbiology, 6(2):140-146, 2011.
- Fitter, J., Hermann, R., Dencher, N.A., Blume, A., Hauss, T., Activity and stability of a thermostable alpha-amylase compared to its mesophilic homologue mechanism of thermal adaptation, J Biochemistry, 40:10723-10731, 2001.
- Fogarty, W.M., Kelly, C.T., Amylase, amyloglucosidase and related glucanases, Economic Microbiology (Editör: Rose, A.H.), Microbial Enzymes and Bioconversion, Academic Press Inc, New York, USA, 5:115–170, 1980.
- Fossi, B.T., Tavea, F., Ndjouenkeu, R., Production and partial characterization of a thermostable amylase from *Ascomycetes* yeast strain isolated from starchy soils, African Journal of Biotechnology, 4 (1):14-18, 2005.
- Fujiwara, S., Extremophiles: Developments of their special functions and potential resources, Journal of Bioscience and Bioengineering, 94:518-525, 2002.
- Garcia-Galan, C., Barbosa, O., Ortiz, C., Torres, R., Rodrigues, R.C., Fernandez-Lafuente, R., Biotechnological prospects of the lipase from *Mucor javanicus*, Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic, 93:34-43, 2013.
- Godfrey, T., West S., Introduction to Industrial Enzymology, (Editörler: Godfrey T., West, S.), Stockton Press, New York, USA, 1996.

- Grootegoed, J.A., Lauwers, A.M., Heinen, W., Separation and partial purification of extracellular amylase and protease from *Bacillus caldolyticus*, Arch. Microbiol., 90:223, 1973.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., Chauhan, B., Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective, Process Biochem., 38(11):1599-1616, 2003.
- Gupta, V.K., Mach, R.L., Sreenivasaprasad, S., Fungal Biomolecules: Sources, Applications and Recent Developments, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK, 2015.
- Gül-Güven, R., Güven, K., Poli, A., Nicolaus, B., Purification and some properties of a beta-galactosidase from the thermoacidophilic *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *rittmannii* isolated from Antarctica, Enzyme and Microbial Technology, 40 (6):1570-1577, 2007.
- Gül-Güven, R., Sıcak su kaynaklarından bakteri izolasyonu, tanımlanması ve *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *rittmannii*'nin  $\beta$ -galaktozidaz enziminin saflaştırılması, Doktora Tezi, Dicle Üniversitesi, 196, Diyarbakır-Türkiye, 2007.
- Gümüşel, F., Biyoteknoloji, genetik ve sağlık sektörü, Kocaeli Sanayii İçin Teknolojik Uzgörü Ortak Projesi, 73-135, 2002.
- Güneri, K.G., Dağlıoğlu, O., Ksilanaz enziminin ekmek yapımında kullanımı, Türkiye 10. Gıda Kongresi; Erzurum-Türkiye, 21-23 Mayıs 2008.
- Haki, G.D., Rakshit, S.K., Developments in industrially important thermostable enzymes: a Review, Bioresour Technol., 89:17-34, 2003.
- Harwood, C.R., *Bacillus subtilis* and Its Relatives: Molecular Biological and Industrial Workhorses, Elsevier Science Publishers Ltd. U.K., 10:247-256, 1992.
- Henrissat, B., A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities, Biochem J., 280:309-316, 1991.
- Henrissat, B., Balroch, A., Updating a Sequence Based Classification of Glycosyl Hydrolases, Biochem J. 316:695- 696, 1996.

- Hmidet, N., Nedra, E. H. A., Nahed, Z. F., Anissa, H., Moncef, N., Alya, S.K., Chicken feathers: a complex substrate for the co-production of  $\alpha$ -amylase and proteases by *Bacillus licheniformis* NH1, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 37:983-990, 2010.
- Holmes, M.L., Dyall-Smith, M.L., Sequence and expression of a halobacterial  $\beta$ -galactosidase gene, *Mol. Microbiol.*, 36:114–22, 2000.
- Hu, Y., Yu, D., Wang, Z., Hou, J., Tyagi, R., Liang, Y., Hu, Y., Purification and characterization of a novel, highly potent fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* DC27 screened from Douchi, a traditional Chinese fermented soybean food, *Nature Scientific Reports*, 9(1), DOI: 10.1038/s41598-019-45686-y, 2019.
- Ito, S., Alkaline cellulases from alkaliphilic *Bacillus* enzymatic properties, genetics, and application to detergents, *J Extremophiles*, 1: 61-66, 1997.
- Ivanova, N.E., Dobрева, P.E., Emanuilova, I., Purification and characterization of a thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis*, *Journal of Biotechnology*, 28(2-3):277-289, DOI: 10.1016/0168-1656(93)90176-N, 1993.
- James, J.A., Lee, B.H., Glucoamylases: Microbial Sources, Industrial Applications and Molecular Biology, *Journal of Food Biochemistry*, 21:1-52, 1997.
- Jaramillo, P.M.D., Gomes, H.A.R., Monclaro, A.V., Silva, C.O.G., Filho, E.X.F., Lignocellulose degrading enzymes: An overview of the global market, (Editörler: Gupta, V.K., Mach, R.L., Sreenivasaprasad, S.), *Fungal Biomolecules: Sources, Applications and Recent Developments*, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK, 73-85, 2015.
- Jensen, B., Olsen, J., Physicochemical properties of a purified  $\alpha$ -amylase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*, *Enzyme Microb. Technol.*, 14:112–116, 1991.
- Karademir, G., Karademir, B., Yem katkı maddesi olarak kullanılan biyoteknolojik ürünler, *Lalahan Hay Araşt.Enst.Derg*, 43(1): 61-74, 2003.
- Karasova-Lipovova, P., Strnad, H., Spiwok, V., Mala, S., Kralova, B., Russell, N.J., The Cloning, purification and characterisation of a cold-active  $\beta$  galactosidase



- from the psychrotolerant antarctic bacterium *Arthrobacter* sp. C2, *Enzyme Microbiol Technol.*, 33:836–844, 2003.
- Khoo, S.L., Amirul, A.A., Kamaruzaman, M., Nazalan, N., Azizan, M.N., Purification and characterization of alpha-amylase from *Aspergillus flavus*, *Folia Microbiologica*, 39(5):392-398, 1994.
- Kiran, S., Singh, A., Prabha, C., Kumari, S., Kumari, S., Isolation and characterization of thermostable amylase producing bacteria from hot springs of Bihar India, *International Journal of Pharma Medicine and Biological Sciences*, 7(2):28-34, 2018.
- Koch, R., Spreinat, K., Lemke, K., Antranikan, G., Purification and properties of a hyperthermoactive  $\alpha$ -amylase from the archaeobacterium *Pyrococcus woesei*, *Arch. Microbiol.*, 15:572-578, 1991.
- Kristjansson, M.M., Asgeirsson, B., Properties of Extremophilic Enzymes and Their Importance in Food Science and Technology, *Handbook of Food Enzymology* (Editor: J.R. Whitaker), New York, USA, 77-99, 2002.
- Kubrak, O.I., M. Storey, J.M., Storey, K.B., Lushchaka, V.I., Production and properties of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. BKL20, *Canadian Journal of Microbiology*, 56(4):279-288, DOI:10.1139/W10-014, 2010.
- Kumar, D.J., Rakshitha, R., Vidhya, M.A., Jennifer, P.S., Prasad, S., Kumar, M.R., Kalaichelvan, P.T., Production, optimization and characterization of fibrinolytic enzyme by *Bacillus subtilis* RJAS19, *Pakistan Journal of Biological Sciences PJBS*, 17(4):529-534, 2014.
- Kurz, G., Wallenfels, K., Lactose and Other  $\beta$ -D-Galactosidase in Methods of Enzymatic Analysis, (Editor: Bergmeyer, H.U.) Verlag Chemie Weinheim. Academic Press Inc., New York and London, 3:1180-83, 1974.
- Kusuda, M., Nagai, M., Hur, T.C., Ueda, M., Terashita, T., Purification and some properties of  $\alpha$ -amylase from an ectomycorrhizal fungus, *Tricholoma matsutake*, *Mycoscience*, 44: 311-317, 2003.

- Kwak, Y., Akeba, T., Kudo, T., Purification and characterization of enzyme from hyperthermophilic archaeon *Thermococcus profundus*, which hydrolyses both  $\alpha$ -1-4 and  $\alpha$ -1-6 glucosidic linkages, *J. Ferment. Bioeng.*, 86:363–367, 1998.
- Laderman, K., Davis, B., Krutzsch, H., Lewis, M., Griko, Y., Privalov, P., Anfinsen, C., The purification and characterization of an extremely thermostable  $\alpha$ -amylase from the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*, *J. Biol. Chem.*, 268: 24394–24401, 1993.
- Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4, *Nature*, 227: 680-685, 1970.
- Lamed, R., Seter, E., Kening, R., Bayer, E.A., The cellulosome a discrete cell surface organelle of *Clostridium thermocellum* which exhibits separate antigenic cellulose-binding and various catalytic activities, *Biotechnology Bioengineering Symp*, 13:163-181, 1983.
- Lennete, E.H., Ballows, A., Hausler, J.W. Jr., Shadomy, J.H., *Manuel of Clinical Microbiology*, American Society for Microbiology, 4:1149, Washington D.C., USA, 1985.
- Liu, X. D., Xu, Y., A novel raw starch digesting  $\alpha$ -amylase from a newly isolated *Bacillus* sp. YX-1: Purification and characterization, *Bioresour. Technol.*, 99:4315-4320, doi: 10.1016/j.biortech.2007.08.040, 2008.
- MacGregor, E.A., Janecek, S., Svensson, B., Relationship of sequence and structure to specificities in the  $\alpha$ -amylase family of enzymes, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1546: 1-20, 2001.
- Mahdavi, A., Sajedi, R.H., Rassa, M., Jafarian, V., Characterization of an  $\alpha$ -amylase with broad temperature activity from an acid-neutralizing *Bacillus cereus* strain, *Iranian Journal Of Biotechnology*, 8(2):103-111, 2010.
- Mathew, C.D., Rathnayake, S., Isolation and characterization of alpha-amylase isolated from a hot water spring in Sri Lanka, *International Research Journal of Microbiology (IRJM)*, 5(4):50-61, DOI: 10.14303/irjm.2014.021, 2014.

- Matzke, J., Schwermann, B., Baker, E. P., Acidostable and acidophilic proteins: the example of the  $\alpha$ -amylase from *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.*, 118:475-479, 1997.
- Messias, J.M., da Costa, B.Z., Lima, V.M.G., Dekker, R.F.H., Rezende, M.I., Krieger, N., Barbosa, A.M., Screening *Botryosphaeria* species for lipases: Production of lipase by *Botryosphaeria ribis* EC01 grown on soybean oil and other carbon sources, *Enzyme and Microbial Technology*, 45:426–431, 2009.
- Metin, K., Koç, Ö., Ateşlier, Z.B., Bıyık, H.H., Purification and characterization of  $\alpha$ -amylase produced by *Penicillium citrinum* HBF62, *African Journal of Biotechnology*, 9 (45):77692-7701, 2010.
- Miller, G.L., Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Analytical Chemistry*, 426-428, 1951.
- Moreira, F.G., Lenartovicz, V., Peralta, R.M., A thermostable maltosetolerant  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus tamari*, *J. Basic Microbiol*, 44 (1):29-35, 2004.
- Mukherjee, A.K., Adhikari, H., Rai, S.K., Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using *Imperata cylindrica* grass and potato peel as low-cost medium: Characterization and application of enzyme in detergent formulation, *Biochemical Engineering Journal*, 39(2):353-361, 2008.
- Nalankilli, G., Application of enzymes in eco-friendly wet processing of cotton, *Colourage the Magazine for textile and garment processing*, 45:10, 17-19, 1998.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., *Lehninger Principles of Biochemistry*, Chapter 6, W.H. Freeman and Company, Fourth Edition, New York, USA, 2004.
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kahler, M., Antranikian, G., Extremophiles as source of novel enzymes for industrial application, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51:711-729, 1999.
- Norouzian, D., Akbarzadeh, A., Scharer, J.M., Young, M.M., Fungal glucoamylases, *Biotechnology Advances*, 24:80-85, 2006.

- Odibo, F.J.C., Ulbrich-Hofmann, R., Thermostable  $\alpha$ -amylase and glucoamylase from *Thermomyces lanuginosus* F1, *Acta Biotechnol*, 21 (2):141-153, 2001.
- Ohtsu, N., Motoshima, H., Goto, K., Tsukasaki, F., Matsuzawa, H., Thermostable beta galactosidase from an extreme *Thermophile Thermus* sp. A4: enzyme purification and sequencing, *Biosci Biotechnol Biochem.*, 62:1539-1545, 1998.
- Orhan, E., Omay, D., Güvenilir, Y., Partial Purification and Characterization of Protease Enzyme from *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 183:121–124, 2005.
- Özcan, B.D., Baylan, M., Ozcan, N., Tekdal, D., Characterization of thermostable  $\alpha$ -amylase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate DM-15, *Research Journal of Biological Sciences*, 5(1):118-124, DOI: 10.3923/rjbsci.2010.118.124, 2010.
- Özcan, B.D., Studies on cloning of thermostable amylase genes, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 2005.
- Özdemir, S., Okumus, V., Ulutas, M.S., Dündar, A., Akarsubası, A.T., Isolation of a novel thermophilic *Anoxybacillus flavithermus* SO-13 production, characterization and industrial applications of its thermostable  $\alpha$ -amylase, *J Bioprocess Biotech*, 5:237, doi: 10.4172/2155-9821.1000237, 2015.
- Poli, A., Esposito, E., Lama, L., Orlando, P., Nicolaus, G., De Appolonia, F., Gambacorta, A., Nicolaus, B., *Anoxybacillus amylolyticus* sp. a thermophilic amylase producing bacterium isolated from Mount Rittmann (Antarctica), *Systematic and Applied Microbiology*, 29:300-3007, 2006.
- Prabakaran, G., Pugalvendhan, R., Production and Immobilization of Alpha Amylase by using *Bacillus subtilis*, *Rec Res Sci Tech.*, 1(4):189-194, 2009.
- Prasad, M.P., Characterization of amylase gene in *Bacillus* species isolated from different soil samples, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences (IJCMAS)*, 3(9):891-896, 2014.

- Ramkrishna, S., Samir, K., Chakrabarty, S., Immobilization of  $\alpha$ -amylase from *Mycelophthora thermophila* D-14 (ATCC 48104), *Enzyme Microbiol. Technol.*,15:801–804, 1993.
- Ratanakhanokchai, K., Kaneko, J., Kamio, Y., Izaki, K., Purification and properties of a maltotetraose and maltotriose producing amylase from *Chloroflexus aurantiacus*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 58:2490–2494, 1992.
- Ray, A., Application of lipase in industry, *Asian Journal of Pharmacy and Technology*, 2(2): 33-37, 2012.
- Remize, F., Spore-forming bacteria, *The Microbiological Quality of Food*, (Editörler: Bevilacqua, A., Corbo, M.R., Sinigaglia, M.), Elsevier Ltd., Woodhead Publishing, Chennai, India, 2017.
- Robynt, J.F., Enzymes and their action on starch, (Editörler: BeMiller, J., Whistler, R.), *Starch, Chemistry and Technology*, Academic Press, New York, USA, 237–292, 2009.
- Rosovitz, M.I., Voskuil, M.I., Chambliss, G.H., *Bacillus*, Topley and Wilson's *Microbiology and Microbial Infectious, Systematic Bacteriology, Volume 2*, (Editörler: Collier L., Balows, A., Susman, M.), Oxford University Press, New York, USA, 709-730, 1998.
- Roy, A., Khanra, K., Mishra, A., Bhattacharyya, N., Partial purification and characterization of amylase from a newly isolated *Bacillus megaterium* strain KAN1 from fermented rice Handia, *American Journal of Current Microbiology*, 2(1):1-5, 2014.
- Sargın, S., Öngen, G., Kanatlı yemi katkıları olarak kullanılan ksilanaz enziminin katı kültür fermantasyon yöntemi ile üretiminde ölçek büyütme çalışmaları, *Ege Üniv. Ziraat Fak. Dergisi.*, 40(3):145-152, 2003.
- Sarikaya, E., *Bacillus subtilis*  $\alpha$ -amilazı üretiminin değişik ortamlarda incelenmesi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bilim Uzmanlığı Tezi (Yayınlanmamış), 37s., Ankara-Türkiye, 1988.

- Saul, D.J., Williams, L.C., Grayling, R.A., Chamley, L.W., Love, D.R., Bergquist, P.L., celB A gene coding for a bifunctional cellulase from the extreme thermophile *Caldocellum saccharolyticum*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 3117-3124, 1990.
- Shafaat, S., Akram, M., Rehman, A., Isolation and characterization of a thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis*, *African Journal of Microbiology Research*, 5(20): 3334-3338, 2011.
- Shaista-Kokab, M., Rehman, M.J., Asghar, M., Asad&Adedyo, O., Alpha amylase production from banana peel, *Int. J. Agri. Biol.*, 5(1):36-39, 2003.
- Sharma, M., Application of Enzymes in Textile Industry, *J Colourage*, 40(1):13-17, 1993.
- Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U.C., Production, purification, characterization and applications of lipases, *Biotechnology Advances*, 19:627-662, 2001.
- Shenai, V.A., *Technology of Fibres: Technology of Textile Processing*, Sevak Publication, Bombay-India, 1990.
- Siddique, F., Hussain, I., Mahmood, M.S., Ahmed, S.I., Iqbal, A., Isolation and characterization of a highly thermostable  $\alpha$ -amylase enzyme produced by *Bacillus licheniformis*, *Pak. J. Agri. Sci.*, 51(2):299-304, 2014.
- Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K.M., Soccol, C.R., Pandey, A.,  $\alpha$ -Amylases from microbial sources, *Food Technol. Biotechnol.*, 44 (2):173-184, 2006.
- Sneath, P.H.A., Endospore-Forming Gram-Positive Rods and Cocci, *Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology*, Volume 2, (Editors: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, H.E.), 1104-1139, Williams & Wilkins, Baltimore, USA, 1986.
- Suhartati, Y.T., Herasari, D., Hadi, S., The Chemical modification of protease enzyme isolated from locale bacteria isolate *Bacillus subtilis* ITBCCB148 with cyanuric chloride-polyethyleneglycol, *European Journal of Scientific Research*, Euro Journals Publishing Inc., 23(1):177-186, 2008.

- Takasaki, Y., An amylase producing maltotetrose and from maltopentose from *Bacillus circulans*, *Agric. Biol. Chem.*, 47(10):2193-2199, 1983.
- Takasaki, Y., An amylase producing maltotriose from *Bacillus subtilis*, *Agric. Biol. Chem.*, 49(4):1091-1097, 1985.
- Tanrıseven, A., Doğan, Ş., A novel method for the immobilization of  $\beta$  Galactosidase, *Process Biochemistry*, 38:27-30, 2002.
- Teeri, T.T., Koivula, A., Linder, M., Wohlfahrt, G., Divne, C., Jones, T.A., *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases: why so efficient on crystalline cellulose, *Biochemistry Society Trans*, 26:173-178, 1998.
- Thomas, L., Larroche, C., Pandey, A., Current developments in solid-state fermentation, *Biochemical Engineering Journal*, 81:146–161, 2013.
- Tomme, P., Warren, R.A., Gilkes, N.R., Cellulose hydrolysis this bacteria and fungi, *Adv. Microbiolgy Physiol*, 37:1-81, 1995.
- Trunet, C., Mtimet, N., Mathot, A.G., Postollec, F., Leguerinel, I., Sohier, D., Couvert, O., Carlin, F., Coroller, L., Modeling the recovery of heat-treated *Bacillus licheniformis* Ad978 and *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 spores at suboptimal temperature and pH using growth limits, *Applied and Environmental Microbiology*, 81(2):562-568, 2015.
- Turnbull, P.C.B., *Bacillus* structure and classification, (Editör: Baron, S.), *Medical Microbiology* 4th edition, The University of Texas Medical Branch, Galveston Texas, USA, 1996.
- Uenojo, M., Pastore, G.M., Pectinases: aplicações industriais e perspectivas, *Qui'mica Nova*, 30(2):388–394, 2007.
- Underkofler, L., *Microbial enzymes*, (Editörler: Miller, B., Litsky, W.), *Industrial Microbiology*, McGraw-Hill, New York, USA, 1976.
- Van Den Burg, B., Extremophiles as a source for novel enzymes, *J Microbiology*, 6:213-218, 2003.

- Van Der Maarel, M.J.E.C., Van Der Veen, B., Uitdehaag, J.C.M., Leemhuis, H., Dijkhuizen, L., Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family, *Journal of Biotechnology*, 94:137-155, 2002.
- Vaseekaran, S., Balakumar, S., Arasaratnam, V., Isolation and identification of a bacterial strain producing thermostable  $\alpha$ -amylase, *Tropical Agricultural Research*, 22(1):1-11, 2010.
- Vehmaanperä, J., Development of *Bacillus* strains for industrial enzyme production by gene technology, Academic Dissertation in General Microbiology, PhD Thesis, Helsinki-Finland, 1990.
- Viara, N., Elena, P., Elka, I., Purification and characterization of a thermostable alpha-amylase from *Bacillus licheniformis*, *J.Biotechnol.*, 28:277–289, 1993.
- Vihinen, M., Mantsala, P., Characterization of a thermostable *Bacillus stearothermophilus* alpha-amylase, *Biotechnol.Appl.Biochem.*, 12:427-35, 1990.
- Vijayalakshmi, K., Sushma, S., Chander, P.A., Isolation and characterization of *Bacillus Subtilis* KC3 for amyolytic activity, *International Journal of Bioscience Biochemistry and Bioinformatics*, 2(5):336-341, 2012.
- Wanderley, K.J., Torres, F.A.G., Morales, L.M.P., Ulhoa, C.J., Biochemical characterization of  $\alpha$ -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*, *FEMS Microbiology Letters*, 231:165-169, 2004.
- Whitehurst, R.J., Van Oort, M., *Enzymes in Food Tehcnology* 2nd Edition, (Editörler: Whitehurst, R.J., Van Oort, M.), Wiley-Blackwell, Chichester, England, 2009.
- Wind, R.D., Buitelaar, R.M.G., Eggink, G., Huizing, H.J., Dijkhuizen, L., Characterization of a new *Bacillus stearothermophilus* isolate: a highly thermostable  $\alpha$ -amylase, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41(2):155–162, 1994.
- Wiseman, A., Chapter 3 The Application of Enzymes in Industry, *Handbook of Enzymes Biotechnology*, (Editör: Horwood, E.), 274-373, Chichester-UK, 1987.



Zeigler, D.R., Perkins, J.B., The Genus *Bacillus*, Practical Handbook of Microbiology,  
(Editörler: Goldman, E., Green, L.H.), CRC Press Taylor & Francis Group, 309-  
314, 2009.



## ÖZGEÇMİŞ

- 1. Adı Soyadı** : Gültekin ÖZDEMİR  
**2. Doğum Tarihi** : 15.06.1973  
**3. Ünvanı** :Biyolog  
**4. Öğrenim Durumu** :Lisans

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Bitirme Yılı
Lisans	Biyoloji	Çukurova Üniversitesi	1996

### 6. İş Tecrübesi:

Görev Unvanı	Görev Yeri	Yıl
Öğretmen	Özel Osmaniye Bilim Koleji	1998-2000
Öğretmen	Özel Bodrum Evrensel Koleji	2001-2002
Öğretmen	Özel Bodrum Marmara Koleji	2002-2004
Okul Müdürü	Özel Osmaniye Bilim Koleji	2005-2013
Okul Müdürü	Özel Osmaniye Doğa Koleji	2013-

- 11. Diğer yayınlar:** Okul Öncesi Etkinlik Atölyesi, ISBN 978-605-62029-1-9