

**GAİTA BAKTERİLERİNDEN
EKTRASELÜLER AMİLAZ ÜRETİMİ,
İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

SAMET KOCABAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MOLEKÜLER BİYOOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI**

2015

T. C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GAİTA BAKTERİLERİNDEN EKTRASELÜLER AMİLAZ
ÜRETİMİ, İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Samet KOCABAY
(201292021090)

Moleküler Biyoloji Ve Genetik Ana Bilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Birnur AKKAYA

SİVAS
HAZİRAN 2015

Samet KOCABAY'ın hazırladığı ve “**Gaita Bakterilerinden Ektraselüler Amilaz Üretimi, İzolasyonu Ve Karakterizasyonu**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : **Doç. Dr. Birnur AKKAYA**
Cumhuriyet Üniversitesi

Eş/İkinci Danışman : **Prof. Dr. Ali Fazıl YENİDÜNYA**
Cumhuriyet Üniversitesi

Jüri Üyeleri :

Prof. Dr. Ali Fazıl YENİDÜNYA
Cumhuriyet Üniversitesi

Doç. Dr. Recep AKKAYA
Cumhuriyet Üniversitesi

Doç. Dr. İskender PARMAKSIZ
Gazi Osman Paşa Üniversitesi

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa DEĞİRMENCİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 20.08.2014 tarihli ve 7 sayılı kararı ile kabul edilen Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu (Yönerge)'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırlanmıştır.

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) Komisyonu tarafından F-448 Nolu proje kapsamında desteklenmiştir.

Bütün hakları saklıdır.

Kaynak göstermek koşuluyla alıntı ve gönderme yapılabilir.

© Samet Kocabay AL, 2015

Çalışma sırasında bana destek olan aileme ve tüm arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Her şeyden öte bu mesleği bırak diyen bir babama karşı, durmak yok yola devam diyerek beni motive eden ANNEM'E sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum...

ETİK

Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tez Yazım Kılavuzu (Yönerge)'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- ✓ Bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- ✓ Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- ✓ Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere, bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- ✓ Bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ✓ Tezin herhangi bir bölümünü, Cumhuriyet Üniversitesi veya bir başka üniversitede, bir başka tez çalışması olarak sunmadığımı; beyan ederim.

30-06-2015

İmza

Samet KOCABAY

KATKI BELİRTME VE TEŞEKKÜR

Bilgi ve deneyimlerinden sürekli yararlandığım, tezin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Birnur AKKAYA' ya ve Prof. Dr. Ali Fazıl YENİDÜNYA' ya çok teşekkür ederim.

Ayrıca laboratuvar çalışması süresince kısa bir süreliğine laboratuvarını bana açan gıda mühendisliği bölümü bölüm başkanı sayın Prof. Dr. Nursel DEVELİ IŞIKLI ve ekibine teşekkür ederim.

Laboratuvar süresince yardımcı olan Arş. Gör. Serap ÇETİNKAYA' ya teşekkür ederim.

Tez çalışması süresince çalıştığım kurum olan İnönü Üniversitesi Moleküler Biyoloji Ve Genetik Bölümü öğretim elemanlarına ve çalışanlarına teşekkür ederim.

ÖZET

GAİTA BAKTERİLERİNDEN EKTRASELÜLER AMİLAZ ÜRETİMİ, İZALASYONU VE KARAKTERİZASYONU SAMET KOCABAY

Yüksek Lisans Tezi

Moleküler Biyoloji Ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Birnur AKKAYA

2015, 96+ xvi sayfa

Amilazlara olan ihtiyaç günümüz biyoteknolojisinde kullanım alanlarından dolayı artmaktadır. Bu ihtiyaçların karşılanması amacıyla bakteriyel amilazların izolasyonu saflaştırılması ve karakterizasyonu günümüzde ilgi odağı oluşturmaktadır.

Gaita bakterilerinden ekstraselüler β -amilaz üreten bakterilerin hem fenotipik hem de genotipik karakterizasyonu yapılarak üretilen β -amilaz enziminin karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. 16SrDNA gen bölgeleri dizilendiğinde *Lactobacillus fermentum* olduğu saptanmıştır. Gram pozitif, %3 NaCl içeren besi yerinde üreyebilen bir bakteridir. Üretilen amilaz enzimi 20 kDa ağırlığındadır. Enzimin çalışması için optimum pH 5.0 ve 10.0'dur ve sıcaklığı 45 °C' ve 37 °C olarak bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: amilaz, biyoteknoloji, gaita, ekstraselüler enzim, nişasta

ABSTRACT

PRODUCTION, ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF EXTRACELLULAR AMYLASE ENZYME FROM GAITA BACTERIA

SAMET KOCABAY

Master of Science Thesis, Department of Molecular Biology And Genetics

Supervisor: Doç. Dr. Birnur AKKAYA

2015, 96 + xvi pages

There are much more attention on the amylase enzymes in recent biotechnology because of application of them. To provide these needed enzymes, bacterial amylase enzymes are especially focused on.

Bacteria, producing amylase enzymes and living in gaita, were characterized both phenotypic and genotypic methods, and also one of their enzymes that β -amylase enzyme, was characterized. The bacterium was identified to be *Lactobacillus fermentum* by sequencing its 16SrDNA. The bacterium grows in %3 NaCl medium and are Gram positive. Produced β -amylase enzyme has 20 kDa molecular weight. Its optimum pH and temperature were 5.0 and 10.0 and 45°C and 37°C, respectively.

Key Words: amylase, biotechnology, extracellular enzyme, gaita, starch,

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
SİMGELER DİZİNİ	xv
KISALTMALAR DİZİNİ	xvi
1.GİRİŞ	1
1.1 Enzimler.....	1
1.2 Endüstriyel Enzimler Ve Önemi.....	4
1.2.1 Proteazlar	7
1.2.2 Lipazlar	7
1.2.3 Amilolitik enzimler (Amilazlar): Çeşitleri ve özellikleri	7
1.2.3.1 Beta-amilaz enziminin katalitik mekanizması	11
1.2.3.2 Amilazların endüstriyel kullanım alanları.....	13
1.2.3.2.1 Ekmek üretimi.....	13
1.2.3.2.2 Nişastanın sıvılaştırılması ve şekerleştirilmesi.....	14
1.2.3.2.3 Tekstil ve haşıl sökme	14
1.2.3.2.4 Kağıt endüstrisi	15
1.2.3.2.5 Deterjan uygulamaları.....	15
1.2.3.2.6 Klinik kimya ve tıp analizleri	15
1.3 Nişasta.....	16
1.4 Amilaz Enziminin Aktivitesinin Tayininde Kullanılan Yöntemler.....	17
1.4.1 Nişasta-iyot renk yoğunluğundaki azalış	17
1.4.2 Dinitrosalisilik asit yöntemi (DNS)	18
1.4.3 Renkli kompleks oluşturulmuş substratın yıkımı.....	18
1.4.4 Türbiditeye dayalı yöntem	19
1.5 Mikroorganizmalar Arasında β -amilazın Dağılımı.....	19
1.5.1 <i>Lactobacillus</i>	19
1.5.1.1 <i>Lactobacillus fermentum</i>	20
1.6 Laktik Asit Bakterilerinin (LAB) Yaşam Alanları.....	20
1.7 İki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi (2D PAGE)	21
1.7.1 İzoelektrik odaklama (IEF)	22
1.8 İnce Tabaka Kağıt Kromatografisi.....	22
2.MATERYAL VE METOT	24
2.1 MATERYALLER.....	24
2.1.1 Kimyasallar.....	24
2.1.2 Gaita örnekleri.....	24
2.1.3 Besiyerleri.....	24
2.1.4 Kullanılan çözeltiler.....	24
2.1.5 Kalibrasyon eğrileri.....	24
2.1.6 Hesaplamalar.....	24
2.2 METOT.....	24
2.2.1 Bakterilerin Gaita Örneklerinden İzolasyonu.....	24
2.2.2 Amilaz Enzimi Üreten <i>Lactobacillus</i> Şuşlarının İzolasyonu.....	24

2.2.3 İzolatların Karakterizasyonu.....	25
2.2.3.1 Morfolojik karakterizasyon.....	25
2.2.3.2 Biyokimyasal karakterizasyon.....	25
2.2.3.2.1 Sıcaklık	25
2.2.3.2.2 pH	25
2.2.3.2.3 Tuz	26
2.2.3.2.4 Katalaz testi	26
2.2.3.2.5 Oksijen varlığı ve yokluğu	26
2.2.3.2.6 Gram boyama	26
2.2.3.3 Moleküler karakterizasyon	26
2.2.3.3.1 <i>Lactobacillus fermentum</i> bakterilerinin canlandırılması.....	26
2.2.3.3.2 <i>Lactobacillus fermentum</i> bakterilerinden genomik DNA izolasyonu.....	27
2.2.3.3.3 DNA agaroz jel elektroforezinin hazırlanması.....	28
2.2.3.3.4 <i>Lactobacillus fermentum</i> bakterilerinin genomik DNA örneklerinin jele yüklenmesi.....	28
2.2.3.3.5 <i>Lactobacillus fermentum</i> 16SrDNA geni amplifikasyonu.....	28
2.2.3.3.5.1 PCR amplifikasyon koşulları	28
2.2.3.3.6 PCR ürünlerin jele yüklenmesi	28
2.2.3.3.7 16S rDNA geninin dizilenmesi.....	28
2.2.3.3.8 <i>Lactobacillus fermentum</i> bakterilerinin belirlenmesi..	29
2.2.4 Logaritmik Faz Üreme Takibi.....	29
2.2.5 Protein Miktar Tayini.....	29
2.2.6 Maltoz Miktar Tayini.....	29
2.2.7 SDS PAGE ve Doğal (Natif) PAGE ve Zimogram Çalışmaları..	29
2.2.7.1 % 12' lik SDS- PAGE (20 ml)	29
2.2.7.2 % 7, 5' lik Natif PAGE	30
2.2.7.3 Zimogram analizi	30
2.2.8 İnce Tabaka Kromatografisi ile Hidrolizatların Tanımlanması... 30	
2.2.9 Enzim Aktivite Çalışmaları.....	31
2.2.9.1 Enzim üretilmesi	31
2.2.9.2 Enzimlerin kısmi saflaştırılması	31
2.2.9.3 Saflaştırılma tablosu	31
2.2.9.4 Enzim analizi	32
2.2.9.4.1 pH taraması ve enzim kararlılığı	32
2.2.9.4.2 Sıcaklık taraması ve enzim kararlılığı.....	32
2.2.9.4.3 Substrat seçiciliği	33
2.2.9.4.4 Metal iyonları ve inhibitör etkisi.....	33
2.2.9.4.5 İyonik kuvvet	33
2.2.9.4.6 Kimyasal ve deterjanlar	33
2.2.9.4.7 Aktivite kararlılığı	34
2.2.9.4.8 Kinetik çalışmalar	34
3.BULGULAR	35
3.1 Nişastayı Hidrolizleyen Bakterilerin Taranması.....	35
3.2 Logaritmik Faz Üreme Takibi.....	36
3.3 Biyokimyasal Karakterizasyon.....	36
3.4 Genotipik karakterizasyon.....	38
3.4.1 16SrDNA dizi sonuçları.....	39

3.5 Enzim karakterizasyonu.....	41
3.5.1.Doğal (natif) PAGE ve SDS-PAGE.....	41
3.5.2 İki boyutlu jel elektroforezi.....	41
3.5.3. Zimogram PAGE.....	43
3.6 İnce Tabaka Kromatografisi.....	44
3.7 Beta-amilazın Kısmen Saflaştırılması.....	44
3.8 Beta-amilaz Enziminin pH Taraması ve Enzim Kararlılığı.....	45
3.9 Beta-amilazın Optimum Sıcaklığı ve Termal Kararlılığı.....	46
3.10 Beta-amilazın Substrat Seçiciliği.....	49
3.11 Beta-amilaz Aktivitesi Üzerine İyonik Kuvvet Etkisi.....	50
3.12 Beta-amilaz Aktivitesine Metal İyonu Etkisi.....	52
3.13 Beta-amilaz Aktivitesine Çeşitli Kimyasal Ajanların Etkisi.....	54
3.14 Beta-amilazın Aktivite Kararlılığı.....	55
3.15 Beta-amilazın K_m ve V_{max} Değerlerinin Hesaplanması.....	56
4.TARTIşMA VE SONUÇ	59
KAYNAKLAR	67
EKLER	76
EK-1 Materyaller	
EK-2 Kimyasallar	
EK-3 Gaita örnekleri	
EK-4 Besiyerleri	
EK-6 Kalibrasyon grafikleri	
EK-7 Hesaplamalar	
ÖZGEÇMİş	

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1 Ticari enzimlerin % dağılım şeması.....	5
Şekil 1.2 Alfa-amilaz ailesi	9
Şekil 1.3 Arpa β -amilaz yapısı	10
Şekil 1.4 Beta-amilaz enziminin katalitik mekanizması.....	12
Şekil 1.5 Nişasta yıkımında rol alan farklı bakteriyal enzimler.....	17
Şekil 1.6 Silika jelin temel yapısı.....	22
Şekil 3.1 Enzim aktivitesinin nişastalı MRS agar besi yerinde saptanması.....	35
Şekil 3.2 Bakteri büyüme zaman ilişkisini.....	36
Şekil 3.3 Gram boyama.....	38
Şekil 3.4 Bakteri genomik DNA' sı izolasyonu sonucu	38
Şekil 3.5 Bakteri 16SrDNA'sının çoğaltılması.....	39
Şekil 3.6 16SrDNA'nın EGE 1 ileri yönlü primer dizi sonuçları.....	39
Şekil 3.7 16SrDNA'nın EGE 2 geri yönlü primer dizi sonuçları.....	40
Şekil 3.8 Dendrogram sonucu.....	41
Şekil 3.9 Beta amilaz enziminin doğal ve SDS-PAGE ve izozim sonucu.....	42
Şekil 3.10 Zimogram analizi.....	43
Şekil 3.11 İnce tabaka kromatografi sonucunu.....	44
Şekil 3.12 Enzim aktivitesine pH etkisi (37°C).....	45
Şekil 3.13 Enzimin pH kararlılığı (pH 10.0).....	46
Şekil 3.14 Enzimin pH kararlılığı (pH 5.0).....	46
Şekil 3.15 Sıcaklığın enzim aktivitesine etkisi (pH 5.0).....	47
Şekil 3.16 Sıcaklığın enzim aktivitesine etkisi (pH 10.0).....	47
Şekil 3.17 Termal kararlılık (pH 10.0).....	48
Şekil 3.18 Termal kararlılık (pH 5.0).....	48
Şekil 3.19 Enzimin substrat seçiciliği (pH 5.0).....	49
Şekil 3.20 Enzimin substrat seçiciliği (pH 10.0).....	50
Şekil 3.21 İyonik kuvvet etkisi (pH 5.0).....	50
Şekil 3.22 İyonik kuvvet etkisi (pH 10.0).....	51
Şekil 3.23 Beta-amilaz enziminin aktivite kararlılığı (+4 °C), (pH 10.0).....	55
Şekil 3.24 Beta-amilazı enziminin aktivite kararlılığı (+4 °C), (pH 5.0).....	56
Şekil 3.25 Beta-amilazın Michaelis-Menten grafiği (pH 10.0).....	57
Şekil 3.26 Beta-amilazın Lineweaver-Burk grafiği (pH 10.0).....	57
Şekil 3.27 Beta-amilazın Michaelis-Menten grafiği (pH 5.0).....	58
Şekil 3.28 Beta-amilazın Lineweaver-Burk grafiği (pH 5.0).....	58

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 1.1 Enzimlerin sistematik sınıflandırması.....	3
Çizelge 1.2 Enzimin kullanıldığı başlıca alanları	6
Çizelge 3.1 <i>Lactobacillus fermentum</i> bakterisinin biyokimyasal karakterizasyonu.....	31
Çizelge 3.2 Beta-amilaz aktivitesine metal iyon etkisi	53
Çizelge 3.3 Beta-amilaz enzim aktivitesine çeşitli kimyasal ajan etkisi.....	55

SİMGELER DİZİNİ

µl	Mikrolitre
mg	Miligram
g	Gram
mM	Milimolar
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
pH	Hidrojenin konsantrasyonunun eksi logaritması
ml	Mililitre
L	Litre
µg	Mikrogram
β	Beta
α	Alfa
U	Ünite
A	Absorbans
sn	Saniye
sa	Saat
dk	Dakika
rpm	Dakikada dönme sayısı
g	Yer çekimine bağlı dönme sayısı
S	Ribozomal alt ünite
A,T,G,C	Adenin, Timin, Guanin, Sitozin
M	Markır
F	İleri yönlü primer
R	Geri yönlü primer
Fe³⁺	Demir
Cu²⁺	Bakır
Hg²⁺	Civa
Mg²⁺	Magnezyum
Ca²⁺	Kalsiyum
Na⁺	Sodyum
Zn²⁺	Çinko
Cl⁻	Klor
log	Logaritmik
V	Hacim
Wt(MA)	Molekül ağırlığı
N	Normalite
M	Molarite
n	Mol

KISALTMALAR DİZİNİ

DNS	Dinitrosalisilik asit
PAGE	Poli akrilamit jel elektroforezi
IEF	İzoelektrik odaklama
2D PAGE	İki boyutlu poliakrilamit jel elektroforezi
MRS	<i>Lactobacillus</i> Agar (DE MAN, ROGOSA ve SHARPE)
dH₂O	Damıtık su
ddH₂O	Çift damıtık su
dNTP	Nükleotit
PCR(PZR)	Polimeraz zincir reaksiyonu
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
SDS	Sodyum dedosil sülfat
APS	Amonyum per sülfat
TEMED	N,N,N,N-Tetrametiletildiamin
DMSO	Dimetilsülfoksit
BSA	Sığır serum albümin
kDa	Kilodalton
dATP	Deoksiadenozin trifosfat
dGTP	Deoksiguanozin trifosfat
dCTP	Deoksisitidin trifosfat
dTTP	Deoksitimidin trifosfat

1. GİRİŞ

1.1 Enzimler

Enzimler, çoğu protein yapısında olan, kimyasal tepkimeleri katalizleyen, substrat veya substratların, ürün veya ürünlere dönüşmesi için aşması gereken yüksek enerji engelini düşürerek tepkimenin yürümesini kolaylaştıran, tepkimeye girdikleri gibi çıkan biyolojik katalizörlerdir. 1700'lü yıllarda etin mide tarafından sindirilmesinin fark edilmesi ile dikkat çekti, 1800'lü yıllarda nişastanın şekere dönüştürülmesinin fark edilmesi ile çalışmalara devam edildi. 1860'lı yıllarda L. Pasteur şekerin maya ile alkole fermentlendiğini ve bunun fermentasyon ortamında bulunan mikroplar tarafından sağlandığı sonucuna vardılar. Böylece ilk enzim çalışmaları alfa amilaz ve fermentasyon ile başlamış oldu. 1897'de E. Buchner, Pasteur'ün öne sürdüğü fermentasyon işleminin canlı hücre dışında da devam ettiğini, dolayısıyla başka moleküller tarafından katalitik işlevin sağlandığını keşfetti. F. Kühne ise "maya içinde" anlamına gelen "enzim" olarak adlandıran ilk kişi oldu. Enzimlerin seçici özelliği E. Fisher tarafından 1898 yılı gibi erken bir tarihte fark edildi. İlk kristallendirilen enzim ise üreaz oldu. 1926'da J.B. Sumner bu enzimi saflaştırdı ve kristallendirdi. 1930 yıllarında enzim saflaştırma işlemleri devam etti ve 1948'de J. Northrop ve meslektaşları proteolitik (pepsin, tripsin, kemotripsin) enzimlerini kristallendirip protein yapısında olduğunu ispatladılar. Aminoasit dizilimi yapılan ilk enzim Sığır Pankreatik Ribonükleaz A dır. X-ışını analizi ile yapısı aydınlatılan ilk enzim ise lizozimdir.

Bugün yaklaşık 3,700 enzim tanımlanmıştır ve yapılan tahminler doğruysa daha henüz aydınlatılmamış 25,000 enzimin var olduğu düşünülmektedir. Sayısı artmaya devam etmekle birlikte yaklaşık 300 enzim ticari olarak ulaşılabilir durumdadır.

Enzimler önceleri enzimin substratının sonuna "-az" eki getirilerek (proteinleri hidrolizleyen proteaz gibi veya substrata spesifik olan üreaz gibi), veya "sidirim" anlamına gelen "pepsin" gibi işlevine yönelik olarak adlandırılmıştır. Bazıları, enzim kaynağına göre "pankreatik Ribonükleaz" gibi, bazıları da düzenleyici rolüne göre "hormon duyarlı lipaz" gibi veya katalizlediği mekanizmaya göre "serin proteaz" gibi adlandırma yapmışlardır. Aynı enzimin birçok ad alması ve zamanla enzim sayısının artması nedeniyle enzim adlandırması karmaşık bir hal almıştır. Bunun üzerine Uluslar

arası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Derneği tarafından enzimlerin listesi ve adlandırılması yapılmaktadır.

Buna göre her enzim, tek bir isim ve dört rakamla ifade edilen, E.C a.b.c.d, kod numaraya sahiptir; E.C, 'Enzim Komisyonu'nu temsil eder, sırasıyla her harfe denk gelen numaralar şunları ifade eder: a, altı enzim sınıfından birini ifade eder (Tablo 1), b: alt sınıf prostetik grup veya kofaktöre göre belirlenir, c: substrat veya ürüne göre verilen alt sınıftır, d ise her enzime özgü seri numarasıdır.

Çizelge 1. 1 Enzimlerin sistematik sınıflandırması

Enzim Sınıfı	Tepkime Türü ve örnekler
1. Oksidoredüktazlar	Yükseltgenme indirgenme tepkimelerini katalizler, C-H, C-C, C=C bağlarının oksijenlenmesi, veya genel anlamda hidrojen veya elektronların bir vericiden alıcıya taşınımını katalizler Laktat dehidrogenaz (E.C.1.1.1.28) gibi
2. Transferazlar	İki molekül arasında aldehit, keton, açıl, şeker, fosforil veya metil gibi grupların vericiden alıcıya taşınımını (transferini) katalizler Glikoz fosfo transferaz (E.C.2.7.1.1) gibi
3. Hidrolazlar	Ester, amid, lakton, laktam, epoksit, anhidrit, glikozit gibi bağların hidrolizini katalizler Kolesterol esteraz (E.C.3.1.1.13) gibi
4. Liyazlar	Grup eliminasyonu ile C=C, C=N, C=O bağlarının oluşma tepkimelerini katalizler Karbonik anhidraz (E.C.4.2.1.1) gibi
5. İzomerazlar	Rasemizasyon, epimerizasyon ve izomerizasyon tepkimelerini katalizler Trioşfosfat İzomeraz (E.C.5.3.1.1) gibi
6. Ligazlar	C-O, C-S, C-N, C-C gibi bağların oluşumunu ATP aracılığı ile katalizlerler. Glutamin Sentetaz (E.C.6.3.1.2) gibi

Enzimin tepkimeye girerek başka bir bileşiğe (ürün) dönüştürdüğü molekül veya moleküllere “**substrat**” denir. Enzimin yapısında var olan, substratın bağlandığı ve başka bir bileşiğe dönüştürüldüğü, kofaktör ve koenzimlerin de yer aldığı, yani tepkimeye özel aminoasitlerin yer aldığı bölgeye “**aktif merkez**” denmektedir. Aktif merkez üç boyutludur, nokta ya da çizgi halinde değildir. Enzimin küçük bir hacmini kapsar, sahip oldukları yarı ve oyuklardan dolayı suyu dışlayabilir. Substratlar burada enzime çoğunlukla zayıf güçlerle bağlanırlar. Burada yer alan aminoasitler: Serin, glisin, lizin, aspartat, glutamat, sistein, tirozin, histidin'dir. Aktif merkez sadece substrata özgü değildir, aynı zamanda substratla etkileştiğinde onu ürüne dönüştürmeden önce sahip olduğu en yüksek enerjili hal olan geçiş halini de kapsayacak yapıya sahip olmalıdır

Enzimler yalnızca canlı hücreler tarafından sentezlenir. Sentezlenen bu enzimlerin bazıları hücre içinde fonksiyon görürken bazıları hücre dışında işlev görmektedir. Hücre dışında işlev gören enzimler ekstraselüler olarak adlandırılmakta iken hücre içerisinde fonksiyon gören enzimlere intraselüler enzim denmektedir [1].

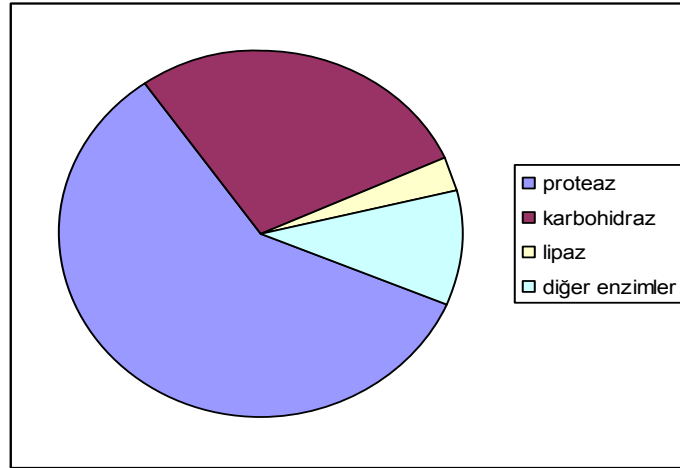
Enzimler tarafından gerçekleştirilmiş olan tepkimeler canlı organizmaların temel metabolizmasını içermektedirler ve ayrıca mükemmel, etkili, ekonomik biyokatalitik dönüşümleri gerçekleştirmek için endüstrilere müthiş fırsatlar sunmaktadırlar [2].

1.2 Endüstriyel Enzimler Ve Önemi

Dünya üzerinde yaşam mikroorganizmalar olmaksızın imkansızdır [3]. Mikroorganizmalar özellikle bizim için değerli olan ürünlerin üretiminde rol aldıklarından dolayı önemlidir. Mikroorganizmalar yüzyıllardır endüstri bilimine katkı sağlamaktadırlar [3]. Dünya üzerindeki biyokütlenin % 60'na denk gelir iken bizim vücudumuzda bulunan hücrelerin % 90'na karşılık gelmektedirler [4]. Mikroorganizmaların katkısı üç ana başlık altına incelenebilir. Geleneksel endüstriyel mikrobiyoloji: Yüzyıllardır süt ve sebzelerin korunmasında, ekmek, şarap, peynir ve diğer fermente ürünlerin yapımında rol almışlardır. Endüstriyel mikrobiyoloji (modern endüstriyel fermantasyon): 20. yüzyılın başlarında başlamıştır. Bu altın çağda solventler, enzimler, organik asitler, vitaminler, ve diğer ürünler üretilmiştir. Dönemin ortalarına doğru antibiyotik üzerine gelişmeler ile biyokimya mühendisliği adı altında yeni bir alan doğmuştur. Rekombinant DNA teknolojisi (modern biyoteknoloji): 1972 yılı sonrasında ortaya çıkmıştır. Böylelikle biyoteknoloji tanı vetedavide, tarımda,

çeşitli kimyasalların üretiminde ,petrol, madencilik, çevre, besin gibi değişik alanlarda kullanılmaktadır [3].

Endüstriyel enzimlerin çoğu mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Çünkü mikrobiyal kaynaklı ezimler bitkisel ve hayvansal enzimlere göre daha kararlı, katalitik aktiviteleri yüksek, ucuz ve çok miktarda elde edilebilmektedir [5]. Mikroorganizmalar farklı ekolojik koşullarda örneğin çok eksrem tuz, sıcaklık, pH gibi ortamlarda yaşadıkları için ürettikleri enzimler de bu ekstrem ortamlara uyum gösterdiğinden endüstriyel anlamda kullanım için avantaj sağlamaktadırlar [6]. Ticari öneme sahip enzimler genelde hidrolazlar olarak bilinmektedir ve mikrobiyal kaynaklıdır. 2000' den fazla enzim tanımlanmış olup bunların 100 kadarı ticari olarak kullanılmaktadır ve yalnızca 18'i endüstriyel amaçla üretilmektedir [7]. Ticari enzimlerin %59'unu proteazlar, %28'ini karbohidrazlar %3'ünü lipazlar ve %10'unu ise diğer enzimler oluşturmaktadır (Şekil 1.1) [8]. Ayrıca tablo1.2' de enzim teknolojilerinin kullanıldığı uygulama alanları ve araştırma başlıkları verilmiştir.



Şekil 1. 1 Ticari enzimlerin % dağılım şeması

Çizelge 1. 2 Enzimlerin kullanıldığı başlıca alanlar

Anahtar Kelimeler	Makale Başlıkları
Tarım	Besim katkı maddesi Çevre, hayvan sağlığı üzerine pozitif etkileri
	Hibrit enzim üretimi Bitkilerde lakkaz ve tripsin enzimi üretimi
Kimyasallar	Biyokatalitikler Biyotransformasyonlar üzerine derleme
	Polimerler İn vitro enzim katalizi ile polimer sentezleme
	Bol hacimde organik bileşikler Yolak mühendisliği uygulamaları üzerine derleme
Temizlik	Yeni deterjan enzimleri Rekabet artışı ve fiyat düşüşü
Enerji	Biyokütlelerden alkol yakıtı Besinde yeni enzim uygulamaları
	Besin destekleme Domates içeriğinde keroton arttırılması
İlaç	Kiral bileşikler Enantiyo seçici biyokatalistler
	Glukoprotein mühendisliği İn vitro protein glikolizasyonu
	İlaç hedefleri gibi enzimler Editlenmiş kitapta birkaç derleme
Materyaller	Kağıt, deri işleme, tekstil Extramofillerden yeni enzimler
	Biosteel(örümcek ağı) Örümcek ağının hibrit sentezi

[9].

Endüstride kullanılan enzim sınıfları:

1.2.1 Proteazlar

Doğada işlemlerinde önemli rol aldıklarından besin döngüsüne katkıda bulunmaktadır [10]. Endüstriyel açıdan enzim ticaretinin % 60'ını oluşturmaktadırlar ve en çok deterjan endüstrisinde kullanılmaktadır [5].

1.2.2 Lipazlar

Yağ ve yağ asiti esterlerini hidroliz ederler. Bu enzimin endüstriyel açıdan gıda, kağıt endüstrisi uygulamalarından tutun biyomedikal uygulamalara kadar uygulama sahası vardır [5].

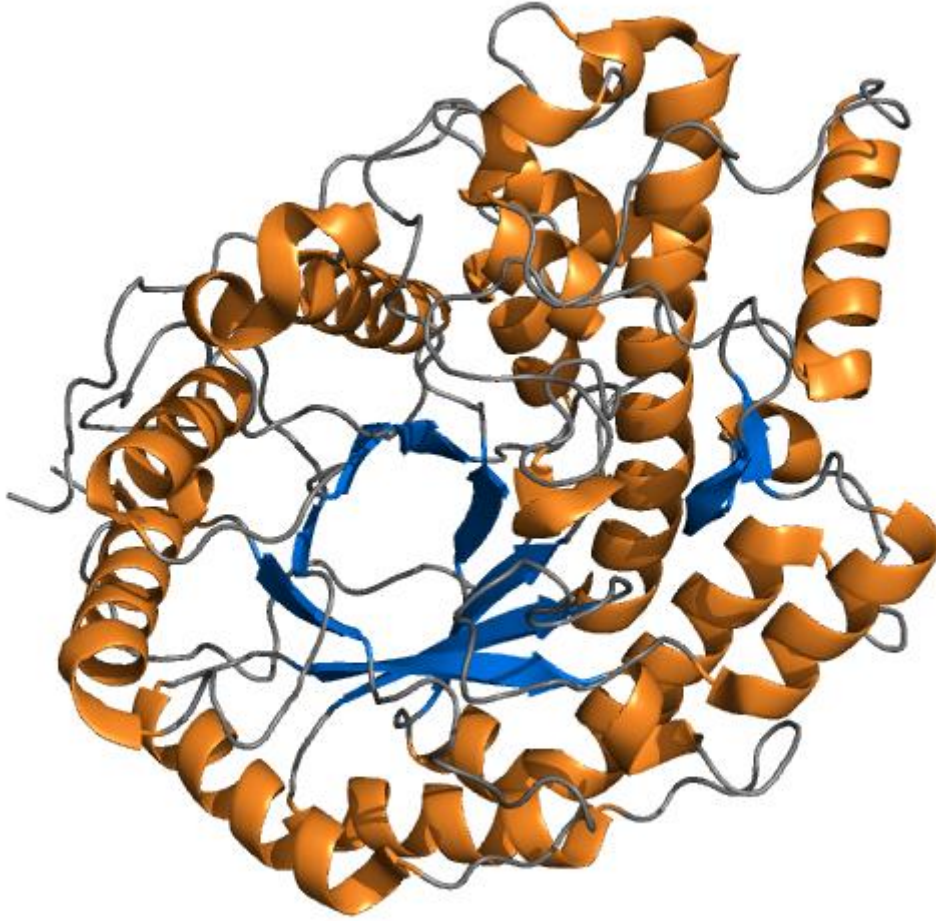
1.2.3 Amilolitik enzimler (Amilazlar): Çeşitleri ve özellikleri

Nişasta ve selüloz dünyada en çok bulunan doğal polimerlerdendir. Her ikisi de glikoz monomerlerinin farklı bağlanması ile meydana gelmektedir. Nişasta yapısında glikoz monomerleri α -glikozidik bağları ile bağlıyken, selülozda glikoz monomerleri β -glikozidik bağları ile bağlıdır. Dolayısıyla hayvanlar, insanlar ve mikroorganizmalar için önemli olan bu iki enerji kaynağı iki farklı enzim tarafından hidrolizlenir: nişasta α -glikozid hidrolazlar, selüloz ise β -glikozid hidrolazlar tarafından hidrolizlenir. Nişasta, amiloz (liner α -1,4 bağlı glukoz) ve amilopektin (liner α -1,4 bağlı glukoz, α -1,6 glukoz birimleri ile dallanmış) yapısına sahiptir [12, 13]. Dolayısıyla bu yapıların hidrolizlenmesinden sorumlu enzimlere amilolitik enzimler veya amilazlar denmektedir. Amilolitik enzimler geniş bir sınıf içermelerine rağmen, en çok bilinenleri, α -amilaz, β -amilaz ve glukoamilazlardır [11].

Nişasta enerjinin temel kaynağı olduğu için, amilolitik enzimler tüm yaşayan organizmalar tarafından üretilmektedir. Farklı amilazlar aynı substratın α -glikozidik bağlarını hidrolizlemelerine rağmen, yapısal olarak birbirlerinden farklı olabilirler. α -amilaz ve β -amilaz her ikisi de TIM-fiçisi yapısına sahiptir. Onlar katalitik bölgede (β / α)₈-fiçisi içerirler ve bu fiçisi yapısında 8 β -tabaka, 8 α -sarmal yapı tarafından çevrelenmiştir. Buna rağmen detaylarında farklılık vardır. Glukoamilazlar ise (α / α)₆-fiçisi yapısına sahiptir [11].

Birincil yapılarındaki benzerliklere ve farklılıklara dayanarak, amilolitik enzimler glikozid hidrolaz (GH) ailesine girmektedir: (i) α -amilazlar ailesi GH13; (ii) β -amilazlar (EC [3.2.1.2](#)) ailesi GH14; (iii) glukoamilazlar ailesi GH15. Bu bilgilerin detaylarına CAZy (Karbohidrat Aktif Enzimler) internet sitesinden ulaşılabilir[16]. Son yıllarda yeni dizilerinin elde edilmesi ile GH13 amilaz ailesi genişledi ve şu anda: α -amilaz (EC [3.2.1.1](#)); oligo-1,6-glukosidaz (EC [3.2.1.10](#)); α -glukosidaz (EC [3.2.1.20](#)); pullulanaz (EC [3.2.1.41](#)); siklomaltodekstrinaz (EC[3.2.1.54](#)); maltotetrose-oluşturan α -amilaz (EC [3.2.1.60](#)); izoamilaz (EC [3.2.1.68](#)); dextran glikozidaz (EC [3.2.1.70](#)); trehalose-6-fosfat hidrolaz (EC [3.2.1.93](#)); maltoheksos-oluşturan α -amilaz (EC [3.2.1.98](#)); maltotriose-oluşturan α -amilaz (EC [3.2.1.116](#)); maltojenik amilaz (EC [3.2.1.133](#)); neopullulanaz (EC [3.2.1.135](#)); malto-oligosiltrehaloz trehalohidrolaz (EC [3.2.1.141](#)); limit dekstrinaz (EC [3.2.1.142](#)); maltopentoz-oluşturan α -amilaz (EC [3.2.1.-](#)); amilosukraz (EC [2.4.1.4](#)); sukroz fosforilaz (EC [2.4.1.7](#)); dallandırıcı enzim (EC [2.4.1.18](#)); siklomaltodekstrin glukanotransferaz (CGTase) (EC [2.4.1.19](#)); 4- α -glukanotransferaz (EC [2.4.1.25](#)); izomaltuloz sentaz (EC [5.4.99.11](#)); trehaloz sentaz (EC [5.4.99.16](#)) (Şekil 2) enzimlerini içermektedir. Tüm bu enzimler GH13, GH70 ve GH77 aileleri olarak glikozid hidrolaz GH-H ailesine aittir. Bununla birlikte GH31 ve GH57 birkaç amilolitik özellik gösterebilir de GH13 ailesi ile dizi benzerliği bulunmamaktadır [11].

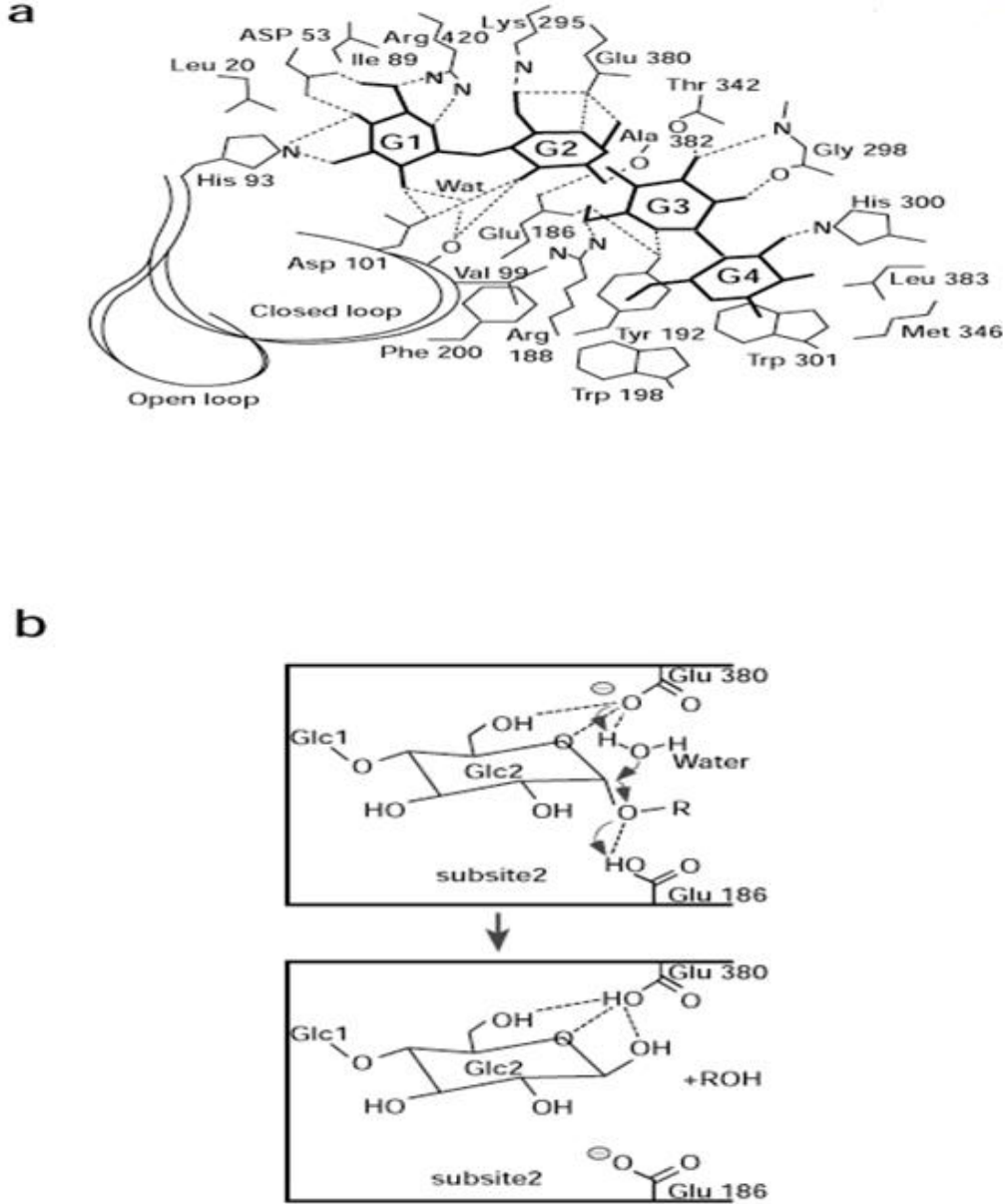
ailesine ait olan bir proteinin sahip olması gereken özellikler şu şekildedir: 1-enzim α -glikozid bağına etki etmelidir, 2- α -glikozid bağını trans glikolizasyonu ile oluşturmalı veya hidrolizlemelidir, 3- amino asit dizisinde dört korunmuş dizi bölgesi içermelidir , 4- Asp206, Glu230, ve Asp297 katalitik üçlüsünü içermelidir, 5- Onlar katalitik bölgede (β/α)₈-fiçisi içerirler ve bu fiçisi yapısında 8 β -tabaka, 8 α -sarmal yapı tarafından çevrelenmiştir . GH13 ailesine ait enzim sayısındaki artışlar bu özelliklere sahip olmayan enzimlerin de varlığını ortaya koymuştur. Mesela, α -amilaz ailesine ait olup α -1,1-, α -1,2-, α -1,3- ve α -1,5-glikozidik bağını hidrolizleyen enzimler vardır. Ayrıca, neopullulanaz enzimi α -1,4-, α -1,6 glikozidik bağlarının her ikisini de hidrolizleyip hem de transglikolizasyonla her iki bağı oluşturabilmektedir [11].



Şekil 1. 3 Arpa β -amilaz yapısı

1.2.3.1 Beta-amilaz enziminin katalitik mekanizması

Beta-amilazın katalitik mekanizması maltoz ile birlikte karışım halinde bulunan soya fasulyesi beta amilazın yapısından tahmini olarak ortaya çıkarıldı. İki maltoz molekülünün ikinci ve üçüncü alt ünitesi arasında bulunan kırma noktasının her iki yüzeyi üzerine rast gele bağlanır. Beta-maltoz alt ünite olan 1-2' ye bağlanır. Bu yüzden çok sayıda maltoz, alt ünite olan 3-4'e rast gele bağlanabilir. Şekil 1.4 a maltoz ile birlikte etkileşime giren aminoasit kalıntılarını gösterir. Alt ünite 1-3' te bulunan glikoz birimleri, protein birimleri ile birlikte 8-10 hidrojen bağları oluşturur. Alt ünite 4' te glikoz birimi His 300 ile birlikte bir tek hidrojen bağı yapmasına rağmen, komşu hidrofobik birimlerle çok sayıda Van der Waals etkileşimi yapar. Esnek halka (96-103 kalıntıları) substrat ile birlikte etkileşime girmek için apo enzim içerisinde açık bir konformasyon ve maltoz ile birlikte kompleks yapıda kapalı bir konformasyon alır. Şeker halkalarının bükülme açısı konformasyonundaki bağlı maltozun en önemli özelliği alt ünite 2 ve 3 arasında yaklaşık 180° dönmesidir. Glu186 ve Glu 380 aminoasitlerinin yan zincirleri katalitik süreçte gereklidir. Glu186 glikozidik bağına yakın bulunurken, Glu380 alt ünite 2' de maltoz ürününün O₁ beta-anomarik yapısına yakın bulunmaktadır. Şekil 1.4 b beta-amilazın indirgenmiş katalitik aktivitesini gösterir. Glu186 bir genel asit gibi davranır ve parçalanma için glikozidik bağına hidrojen verir. Diğer bölge üzerinde Glu380 genel bir baz gibi davranır ve bir su molekülünü aktive eder. Aktive olan su molekülü olası karbonyum katyonunun C1 atomuna saldırır. Glu380 yüzeyinden sadece su moleküllerinin saldırısı beta-anomerik maltoz için sıkı ürün spesifitesi verir. Esnek halka açıldığında maltoz ürünü salınır [14,15,16].



Şekil 1. 4 Beta-amilaz enziminin katalitik mekanizması.

Amilazlar en önemli enzim sınıfı arasında yer almaktadır ve günümüz biyoteknolojisinde büyük bir öneme sahiptirler. Bu enzimler bitki, hayvan ve mikrobiyal birçok kaynaktan izole edilebilmesine rağmen endüstriyel ihtiyacı karşılamak için mikrobiyal kaynak daha çok tercih edilmektedir. Amilaz kullanımı pek çok alanı kapsayacak şekilde genişlemiştir. Örneğin klinik uygulamalar, tıbbi ve analitik kimya ve bunların yanı sıra nişasta şekerleştirilmesi (sakkarifikasyon), besin, tekstil, maya ve damıtma endüstrilerinde kullanılmaktadır. Amilazların endüstriyel öneminden dolayı yeni bakteriyel türlerin izolasyonunda giderek artan bir ilgi vardır ve enzim ticaretinin yaklaşık % 25' ini oluşturmaktadır [17].

1.2.3.2 Amilazların endüstriyel kullanım alanları

Amilazlar endüstriye dayalı tüm nişastalar için en önemli hidrolitik enzimler arasındadır. Amilazların ticarileştirilmesi 1984 yılında ilk olarak sindirim bozukluklarının tedavisinde bir ilaç gibi kullanılması ile başlamıştır. Günümüzde amilazlar besin deterjan, tekstil ve kağıt endüstrisi gibi tüm endüstriyel işlemlerde nişastanın hidrolizi için kullanım alanı bulmaktadır. Bu doğrultuda nişasta işleme endüstrisinde mikrobiyal amilazlar kimyasal hidrolizleme yöntemleri ile tamamen yer değiştirmişlerdir. Aşağıda amilazların çeşitli kullanım alanlarına kısaca değinilecektir [18].

1.2.3.2.1 Ekmek üretimi

Ekmek endüstrisi yüksek kalitede çeşitli ürünleri üretmek için yüzlerce yıldır bu enzimleri kullanmıştır. Modern teknikler daha hızlı ve daha pratik ekmek üretmek için amilaz enzimlerini kullanmaktadırlar [19]. Bu alanda enzimler, ekmeklere daha büyük hacim, daha iyi renk ve daha iyi gevreklik vermek için kullanılmıştır. Bugün örneğin proteaz, ksilenaz, lipaz, pullulanaz, pentosonaz, selülaz, glikoz oksidaz, lipoksijenaz gibi pek çok enzim ekmek yapımında çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır [20,21,22,23].

Alfa-amilaz ve β -amilaz enziminin birlikte kullanımıyla fırınlanmış ürünlerin raf ömürlerinin arttırılması planlanmaktadır [24].

Raf ömrü büyük sorunlardan biridir. Ekmek kabuğu raflarda tazeliğini ve lezzetini kaybeder. Tüm bu istenmeyen değişiklikler ekmekte bayatlama olarak bilinir. Geleneksel çeşitli katkı malzemeleri, bayatlamayı engellemek ve fırın ürünlerinin dokusunu, lezzetini korumak için kullanılır. Bu katkı malzemeleri kimyasallar, küçük şekerler, enzim kombinasyonları, süt tozu, emülgatör, monogliseritler/digliseritler, şeker esterleri, lesitin vb; granullenmiş yağ, antioksidan (askorbik asit veya potasyum borat), şekerler ve tuzlardır [25]. Günümüzde, bayatlama geciktirici malzemeler ve β -amilazlar, α -amilaz dallandırıcı enzimler ve dallandırmayan enzimler, maltogenik amilazlar, amiloglikozidazlar kullanılmaktadır [26,27,28,29,30,31]. Pullulanaz ve α -amilaz kombinasyonu etkili bayatlama geciktirici özelliğinden dolayı kullanılmaktadır. Bu

enzimler jelatinizasyon sonrası aktiftirler ve fırınlama işleminin tamamlanmasından çok daha önce inaktif olurlar [18].

Beta-amilazlar besin işlenmesinde, damıtma endüstrilerinde, meyva sularının üretiminde, bira yapımında, deterjan üretim süreçlerinde sıklıkla kullanılmaktadır [32, 33, 34, 35]. Sakkarafikasyon süreci yoluyla nişastadan maltoz şurubu üretilir. Maltoz içeren şuruplar bira, ekmek, şekerleme endüstrilerinde kullanılır. Maltoz içeren şuruplar nem düzenleyici, kristallanmeyi önleyici, stabilizatör ve bayatlama engelleyici ajan olarak kullanılmaktadır [34].

1.2.3.2.2 Nişastanın sıvılaştırılması ve şekerleştirilmesi

Alfa-amilaz'ın ticaret alanında önemli bir yere sahip olmasının nedenlerinden birisi glikoz ve fruktoz gibi nişasta hidrolizatlarının üretimine bağlıdır. Mısır nişastası yüksek fruktoz şuruplarına dönüştürülür (HFCS). Yüksek tatlandırıcılık özelliğinden dolayı alkolsüz içeceklerdeki gibi içecek endüstrisinde çok miktarlarda kullanılır. Bu süreç nişasta sıvılaştırılması için çok yüksek sıcaklık kararlı α -amilazların kullanımını gerektirir.

1.2.3.2.3 Tekstil ve haşıl sökme

Kumaşların dokunması işlemlerinde dokuma süresince iplikler istenmeyen durumlarla (mekanik zorlamalar ve mekiğin gidip gelmesi neticesi) karşı karşıya kalır. Bu yüzden iplik kırılmalarının engellenmesi gerekmektedir. Bu nedenden dolayı haşılama olarak adlandırılan bir işlemle ipliğe sağlamlık kazandırmaya çalışılmaktadır. Böylece iplik dokuma süresince sağlamlaştırılarak, kopmaları engellenmiş olur. Bu amaçla uzaklaştırılabilir bir koruyucu tabaka iplikler üzerine uygulanır. Bu kumaş haşılama maddeleri için kullanılan materyaller tamamen farklıdır. Nişasta en çok kullanılanlarından bir tanesidir. Çünkü nişasta ucuzdur ve dünyanın pek çok bölgelerinde kolay bulunur ve kolaylıkla tamamen uzaklaştırılabilir. Bu haşılama malzemesinin yani nişastanın uzaklaştırılması işlemine ise haşıl sökme denmektedir. Nişasta uygulanmış kumaşların haşıl sökme işleminde ise β -amilaz [33] ve α -amilazların yeri büyüktür. Alfa-amilazlar seçici olarak nişastayı uzaklaştırır ve ipliklere saldırmazlar. Enzim aynı zamanda nişastayı rast gele dekstrinlere bölerek suda çözünür ve yıkamayla kolaylıkla uzaklaştırır hale getirir [36]. Nişasta haşılını sökmede pankreas amilazı, bakteri amilazı ve malt amilazı olmak üzere üç tip amilaz kullanılmaktadır.

1.2.3.2.4 Kağıt endüstrisi

Kağıtların kaplanması için düşük viskoziteli ve yüksek molekül kütleli nişasta kullanımı uygundur ve bunu α -amilazlar sağlar. Tekstilde olduğu gibi kağıdın kaplanma işlemi, mekanik zorlanmalara karşı kağıdın zarar görmemesi için uygulanır. Aynı zamanda kağıdın kalitesini, sertliğini ve gerginliğini artırır. [37, 38].

1.2.3.2.5 Deterjan uygulamaları

Deterjanlar kullanılacakları alana göre bileşimi değişen kompleks karışımlardır. Deterjanlarda enzim kullanılmasının temel avantajı daha çevreci şartlar sağlamasından dolayıdır. İlk üretilen otomatik bulaşık makinası deterjanları çok dejeneratif ve yutulduğunda hasara neden olmaktadır ve hassas porselen yapımında kullanılan maddelerin yıkanmasında uygun değildi. Bu durum deterjan endüstrisini daha ılımlı koşullarda kullanılan ürünler elde etmeye ve daha etkili çözümler bulmaya zorlamıştır [39]. Kullanılan enzimler aynı zamanda düşük yıkama sıcaklığında çalışabilme yeteneklerinden dolayı sıcaklığı düşürmeye de neden olur. Alfa-amilazlar 1975'den beri toz çamaşır deterjanları içerisinde kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde ise tüm sıvı deterjanların %90'ı α -amilaz içermektedir ve otomatik bulaşık yıkama deterjanları için α -amilaz kullanım talebi büyümektedir [40]. Deterjanlarda α -amilaz kullanımını sınırlandıran etkilerden birisi; yabancı tip α -amilazlar deterjan oluşturmada antioksidanlara duyarlıdır. Ev deterjanlarında antioksidanlara karşı kararlı (örneğin proteazlar gibi) diğer enzimlerle birlikte takip edilmiş başarılı stratejiler kullanmaya başlanmıştır. Günümüzde bilim insanları amilazların çamaşır suyu içerisinde iken kararlılığını arttırmak için protein mühendisliği uygulamalarını kullanmışlardır. Bu çalışmalar kapsamında bağımsız olarak antioksidan duyarlı aminoasitleri diğer aminoasitlerle yer değiştirmişlerdir. *B. licheniformis* türünde 197. konumda yer alan metionin(Met) ile lösin(Leu) aminoasitinin yer değiştirilmesi ile oksidatif bileşiklere karşı dirençliliği artırılmış amilaz elde edilmiştir. Bu oksidatif kararlılığı artırılmış enzim, daha iyi depolama kararlılığına, çamaşır suyu içeren deterjan içerisinde yüksek performansa sahip olmuştur [18].

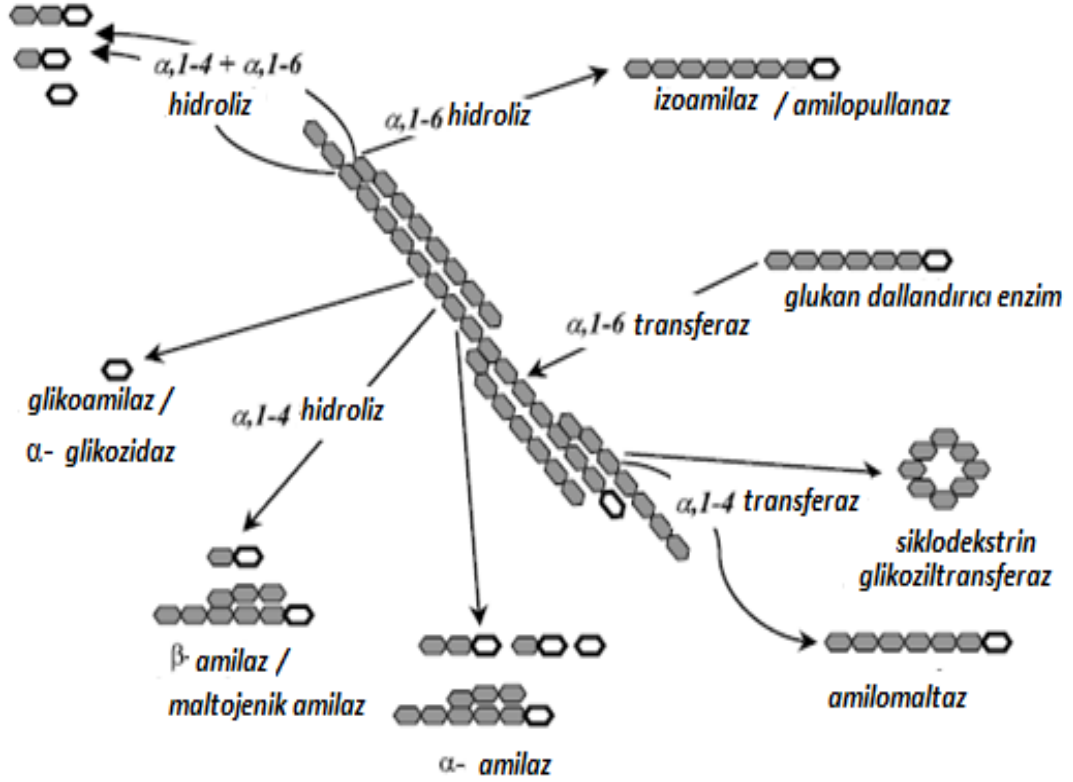
1.2.3.2.6 Klinik kimya ve tıp analizleri

Yeni uygulama alanlarının artması ile birlikte α -amilaz kullanımı analitik kimya, tıp ve klinik kimya gibi pek çok alanlara kadar genişlemiştir. Alfa-amilazın kullanımını içeren klinik ve tıp alanlarında birçok alan vardır [18]. Mesela, oligosakkaritlerin tayini için α -

amilaz kullanılmıştır. Bu metodun gümüş nitrat testinden daha etkili olması amaçlanmıştır [41].

1.3 Nişasta

Nişasta içeren tahıllar insan diyetinin önemli bir bileşenini oluşturur ve dünya popülasyonları tarafından tüketilen besinlerin önemli bir bölümü bunlardan oluşmaktadır. Nişasta üretebilen bitkilerin büyük bir çoğunluğuna rağmen sadece endüstriyel kaynaklar için mısır, tapioka buğday, patates gibi sadece birkaçı önemlidir. Bitkiler fotosentezin bir sonucu olarak nişastayı sentezlerler, bu süreçte güneş ışığındaki enerjiyi kimyasal bağ enerjisine dönüştürürler. Nişasta karanlık evre sonucu bir depo bileşiği gibi bitkinin yapraklarında bulunan plastitlerde sentezlenir. Aynı zamanda köklerde, tohumlarda, yumru köklerde, uzun süre depo bileşiği gibi sentezlenirler. Nişasta glikoz moleküllerinin C₁ oksijeni ile birbirlerine glikozidik bağ ile bağlanması sonucu oluşan polimerlerdir. Bu glikozidik bağlar yüksek ph ta kararlı iken düşük ph ta hidrolize olurlar. Polimerik zincirin sonunda nişastada glikoz moleküllerinin oluşturduğu iki tip bulunmaktadır. Bunlar amiloz ve amilopektindir. Amiloz α -1,4 glikozidik bağ ile bağlı yaklaşık 6,000 glikoz biriminden oluşmuş düz bir zincirdir. Amilopektin α -1,4 bağıyla bağlı yaklaşık 10-60 glikoz alt birimlerinin bağlanmasıyla oluşan ve α -1,6 ile bağlanmış 15-45 kadar glikoz biriminden oluşan yan zincirlere sahiptir. Amilopektinde ortalama dallanma sayısı % 5'tir. Tam bir amilopektin molekülü yaklaşık 2,000,000 glikoz birimi içerir Amilopektin suda çözünür iken amiloz ve nişasta granüllerinin kendisi soğuk suda çözünmez. Bu nedenle bitkilerden nişasta granüllerini izole etmek kolaydır [42].



Şekil 1. 5 Nişasta yıkımında rol alan farklı bakteriyal enzimler [42].

1.4 Amilaz Enziminin Aktivitesinin Tayininde Kullanılan Yöntemler

Amilazlar genellikle bir substrat gibi modifiye edilmiş nişasta veya çözünür nişastayı kullanma ile analiz edilir. Alfa-amilazlar nişasta molekülündeki α -1,4 glikozidik bağın hidrolizini katalizleyerek glikoz, dekstrinler ve sınırlı dekstrinler üretir. Tepkime indirgenmiş şeker miktarındaki artışla veya substratın iyot rengindeki azalışla izlenir. Alfa-amilazların aktivitesinin belirlenmesi için çeşitli metotlar mevcuttur. Bu yöntemler nişasta renk yoğunluğundaki azalışa, indirgeyici şeker artışına, renk oluşturmuş substratın azalmasına, nişasta süspansiyonunun akışkanlığındaki azalışa dayanmaktadır [43].

1.4.1 Nişasta-iyot renk yoğunluğundaki azalış

Amilazın dekstrinin aktivitesi substrat gibi çözünür nişastayı kullanır. Seyreltik HCl ile tepkime sonlandırıldıktan sonra iyot eklenir. 620 nm'deki absorban azalışı substrat kontrolüne karşı ölçülür. Absorbanstaki yüzde azalış bir ünite enzim aktivitesi olarak kabul edilir [44]. Nişasta iyotla birlikte derin mavi renk oluşturur. Nişastanın hidroliz süreci ile birlikte bu renk kırmızı kahverengine dönüşür. Böylelikle nişasta renk

yoğunluğundaki azalış göz önünde bulundurularak amilazın dekstrin aktivitesi belirlenir [18].

1.4.2 Dinitrosalisilik asit yöntemi (DNS)

Bu metot nişasta üzerine amilazın aktivitesinden dolayı artan indirgeyici şekerlerin belirlenmesinde kullanılır [45]. Bu metotta 3-5 dinitrosalisilik asit (DNS), Na-K tartarat, NaOH, sodyum sülfid gibi bazı kimyasallar kullanılmaktadır. DNS metodu indirgen şekerdeki serbest karbonil grupların (C=O) varlığını tespit etmeye dayanır. Bununla birlikte glikozdaki fonksiyonel aldehit grubu ile fruktozun fonksiyonel keton gruplarının oksidasyonu ve aynı anda alkali koşullar altında 3-5 dinitrosalisilik asitin 3-amino-5-dinitrosalisilik asite indirgenmesini içermektedir. Tepkimede 1 mol 3,5-dinitrosalisilik asit ve 1 mol şeker tepkimeye girerek 3-amino-5-dinitrosalisilik asit oluşturmaktadır. DNS aynı zamanda enzim aktivitesini de durdurur. Na-K tartarat su tutucudur. Ortamdaki suyu alarak tepkimenin ürünler yönünde kaymasını sağlar. NaOH tepkime ortam asitliğinin dengelenmesini sağlar. Eğer ortam asidik olursa halkanın diğer *para* kısmında nitro takılıdır. Bu istenmeyen bir durumun oluşmasına sebep olur. Bu metottaki büyük eksiklik DNSA kimyasalının bileşenleri tarafından glikoz yıkımı ve açığa çıkmış renkte yavaş bir kayıp olmasıdır. Bu nedenle kimyasalların oksidasyonunu engellemek için 0,05 % sodyum sülfid eklenir. Çözünmüş oksijeni absorblayarak, glikozun oksidasyonunda girişimde bulunmasını engeller.

1.4.3 Renkli kompleks oluşturulmuş substratın yıkımı

Birkaç yıldır bazı gruplar alternatif bir substrat kullanımı ile α -amilaz aktivitesi tayini için çalışmaktadırlar. Bunun için nişasta, kovalent bağlı şekilde, mavi boya olan örneğin Remazol brilliant Blue R veya Cibacron Blue F3 G-A gibi boyalarla kompleks hale getirilir. Bu substratların sentezlenmesi iki büyük basamak gerektirir. Çözünür nişasta alkalın şartlar altında boya kullanımı ile renklendirilir. Bu nişasta ve boya molekülleri arasında kovalent bağların oluşumuyla sonuçlanır. Çözünür nişasta sonraki basamakta 1,4-butandiol diglisid eter eklenmesiyle çapraz bağlanır ve çözünmez nişasta oluşur ve bu nişasta suda şişer. Çözünmez nişasta türevlerinin enzimatik hidrolizi renklendirilmiş markırla birlikte çözünür nişasta hidrolizatları verir. Bu metot α -amilaz aktivitesinin belirlenmesi için nispeten basit ve duyarlıdır [46].

1.4.4 Türbiditeye dayalı yöntem

Yukarıda bahsedilen yöntemlere ilaveten, hücre kültür süpernatantında çalışılabilecek yöntemlerden birde, α -amilazın nişastayı hidrolizlemesi sonucu nişastadan kaynaklanan türbiditenin azalması ile spektrofotometrik ölçüme dayanmaktadır. Türbiditenin azalmasına dayalı elde edilen başlangıç hızı enzim miktarı ile doğru orantılıdır [47].

1.5 Mikroorganizmalar Arasında β -amilazın Dağılımı

β -amilazlar bitki ve mikroorganizmalarda bulunurlar. Son 10 yıldır çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilen ekstraselüler β -amilaz enzimi üzerine araştırmalar bulunmaktadır [34]. Mikroorganizmaları kullanma ile enzim üretilmesinin büyük avantajı ekonomik üretim kapasitesi ve istenilen karakterdeki enzimi elde etmek için rekombinasyon tekniklerinin kullanılmasıdır [48, 49] .

1.5.1 *Lactobacillus*

Laktik asit bakterileri Lactobacteriaceae ailesine ait olarak tanımlanmaktadır. Bu gruptaki bakteriler farklı morfolojiler sergilemektedirler. Örneğin, uzun, kısa, çubuk şeklinde yapılara sahiptirler. Tüm üyeleri spor oluşturmazlar ve Gram pozitiflerdir. Laktik asit bakterilerinin çoğu hareketsizdir. Enerji kaynağı olarak karbohidrat kullanır ve katalaz yada sitokrom içermezler. Fakat oksijen varlığında yine büyüyebilirler. Bu nedenle Lactobacteriaceaelar fakültatif anaeropturlar [50].

Laktik asit bakterileri (LAB) probiyotik özelliğe sahiptir [51]. Spesifik ve spesifik olmayan immün cevabın oluşturulmasında ve incebağırsak enfeksiyonunun kontrolünde ve anti-karsinogenik aktivitenin güçlendirilmesinde rol aldığı bilinmektedir [52, 53, 54]. *Lactobacillus spp.* ve *Bifidobacterium* türleri normal insan incebağırsağında bulunmaktadır ve insan sağlığı üzerine pozitif etkileri bulunmaktadır [55]. *Lactobacillus* türlerinin probiyotik olarak kullanıldığına dair pek çok çalışma bulunmaktadır ve LAB tarafından üretilen bazı metabolik ürünler antimikrobiyal etkiye sahip olduğu için besinlerin uzun süre korunmasında etkilidirler [56].

Lactobacillus üyeleri Gram pozitifler ve çubuk şeklinde yapıya sahiptir [57]. Laktik asit bakterilerinin büyük bir kısmını oluştururlar ve ürettikleri asitten dolayı buldukları çevre asidiktir ve bazı zararlı bakteriler bu nedenle etraflarında üreyemezler [58].

Bazı *lactobacillus* türleri terapötik kullanım potansiyeline sahiptir. Özellikle anti-kanser ve anti-inflamatuar etkileri bulunmaktadır. 2009 yılında yapılan bir çalışma bu bakteri

türlerinin bazı üyelerinin anti-kanser ve anti-inflamatuar etkisinin olduğunu fareler üzerinde açığa çıkartmıştır [59]. *Lactobacilli* aynı zamanda vajina çevre sisteminde özel fizyolojik dengeyi yeniden oluşturmada da kullanılabilir ve görevleri: 1) patojenlerden epitelyumu ayıran bir kalın tabaka inşa ederek vajinal epitelyumu fiziksel olarak korumak. 2) yaklaşık pH 4,5 olacak şekilde vajinal bölgenin sürdürülme 3) patojenlere karşı hidrojen peroksit oluşturmaktır [60, 61, 62].

Yapılan bir karşılaştırma çalışmasında incelenen 20 *Lactobacillus* türünün 383 geni paylaştığı ve 14 bin protein kodlayan gene sahip olduğu açığa çıkartılmıştır [63]. Standart fermantasyon şartlarına maruz bırakıldığında *Lactobacillus* türleri metabolik ürünlerinin karakteristik yapılarına göre üç gruba ayrılabilir. Zorunlu hemofermantatif, fakültatif heterofermantatif, zorunlu heterofermantatif *Lactobacilli* [64].

1.5.1.1 *Lactobacillus fermentum*

Gram pozitif bakteri türleridir. Diş çürüğü ile çağrışım yapmaktadırlar [65]. Bakteri yaygın olarak bitki ve hayvan materyellerinin fermantasyonunda bulunmakla birlikte hamur mayasında da bulunmaktadır. Birkaç türü probiyotik olarak dikkate alınmaktadır ve hayvanlarda faydalıdırlar [66]. *Lactobacillus fermentum* potansiyel probiyotik olarak tanımlanmaktadır ve bazı türleri kolesterol mekanizmasıyla ilişkilendirilmiştir [67]. *Lactobacillus fermentum* 'un kolesterol azaltmada kullanmış olduğu mekanizmanın biri kolesterol mekanizmasını hızlandırmaya sebep olan kolesterol absorpsiyonudur. Diğer mekanizma ise konak vücudundaki hücre mebranına ve hücre duvarına kadar kolesterolün sokulmasını sağlar. Bir diğer mekanizma ise çok daha fazla kolesterol tüketimine neden olur. *Lactobacillus fermentum* safra tuzlarının geri dönüşümüne engel olarak kolesterolden yapılan safra tuzlarının oluşturulmasını sağlayacaktır ve böylelikle kolesterol seviyesini azaltacaktır [68].

1.6 Laktik Asit Bakterilerinin (LAB) Yaşam Alanları

Doğada laktik asit bakterilerinin dağılımı onların besin gereksinimi ve enerji döngüsünün tipi ile ilişkilidir. Toprakta ve havada nadir bulunmaktadır, genel yaşam alanları süt ve süt işleme merkezleridir (*Lactobacillus Lactis*, *L.bulgarics*, *L. helveticus*, *L.casei*, *L.fermentum*, *L. brevis*, *L. diacetalactis*). Sağlam ve çürük bitkilerde (*Lactobacillus plantarum*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *Lactococcus lactis*, *Leuconstoc mesenteroides*), hayvan ve insanların ince bağırsak boşluğunda (*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium sp.*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus*

salivarius, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*) yaşamaktadırlar [50]. İnsan bağırsak sistemi farklı mikroorganizmalara ev sahipliği yapmaktadır. Vücudumuzda bulunan hücrelerin en az 10 katı kadar daha fazla mikrobiyal hücreye ev sahipliği yapmaktayız ve bunların büyük bir çoğunluğu bağırsak boşluğunda yer almaktadırlar. Sağlıklı bir insan vücudu en az 100 trilyon mikrobiyal hücreye ev sahipliği yapmaktadır. Bu mikropların kendi aralarında ve konağı ile ilişki içerisinde olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. En önemli katkıları immün fonksiyonunun normal gelişimi ve immün hücrelerin olgunlaşmasını arttırmak için sinyal sağlayan immün hücreleri ile birlikte etkileşime girmiş olmalarıdır [69]. Moleküler biyoteknoloji ve data birikiminde artan süreçle birlikte hastalıklar ile genler arasındaki ilişkiyi anlamamız bir devrim oluşturmaktadır. Hastalıklar sadece insan genomundaki genlerle ilişkili olmamakla birlikte insan vücudunda yer alan mikrobiyal ve çevresel genlerle de ilişkilidir. Çevresel değişimin sebep olabileceği bir örnek ise mikrobiyal bağırsak komünite değişimidir. Bu komünitedeki değişim obezite, diyabet, hipertansiyon gibi hastalıklara sebep olmaktadır. Bu nedenle metabolizma ve kronik hastalıklarla ilişkili çalışmalarda bağırsak mikrobiyotası ilgi odağı olmaktadır. Ayrıca insan gen ağını kullanarak bakteriyel gen ağı etkileşimiyle hedef ilaç genleri bulmak için de çalışma odağı olmaktadır [70].

1.7 İki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi (2D PAGE)

İki boyutlu elektroforez bir dik ayırma tekniğidir ki böylelikle proteinler iki farklı fizyokimyasal prensibe dayalı bir süreç boyunca ayrılırlar. Proteinler (polipeptitler) izoelektrik fokuslama(İEF) ile net yüklerine bağlı olarak öncelikle ayrılırlar ve SDS varlığına bağlı olarak elektroforez ile molekül ağırlığına bağlı olarak yine ayrılırlar. Her iki prosedür poliakrilamid jelde gerçekleştirilir. IEF ve SDS –PAGE her ikisinde yüksek çözünür tekniğine sahiptir.

2D PAGE, proteinler IF veya SDS PAGE ile ayıramayacak derecede çok benzer moleküler ağırlığa veya izoelektrik noktaya sahip olduğunda çok kullanışlıdır.

Fakat aynı zamanda 2D PAGE olumsuz etkilere de sahiptir.150 kDa’ dan yüksek ve 8 kDa’ dan düşük moleküler ağırlıklara sahip polipeptit zincirlerinin ayrılması için kullanılamaz. Ayrıca düşük miktardaki protein örneklerini belirlemek zordur. Bunun yanı sıra güçlü alkali (pI >12) veya asidik (pI<3) proteinler güçlükle ayrılabilir.

1.7.1 İzoelektrik odaklama (IEF)

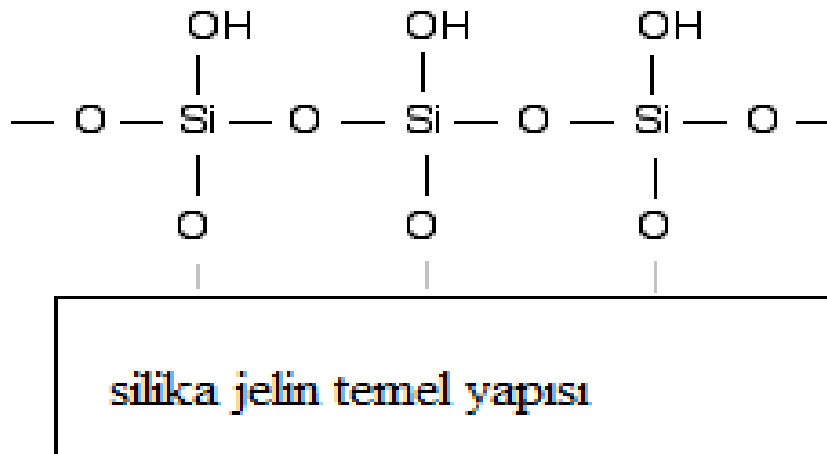
Birincil yapıda proteinler izoelektrik noktalarına göre ayrılabilirler. Çevresindeki pH gradiyentine bağlı proteinler pozitif (+), negatif (-) veya yüksüz (0) yüke sahiptirler. Proteinlerin yüksüz olduğu noktadaki pH izoelektrik nokta olarak adlandırılır. Proteinler izoelektrik noktanın altındaki pH değerlerinde pozitif yüke sahipken izoelektrik noktanın üzerindeki pH değerlerinde negatif yüke sahiptirler. Verilen bir elektrik alanda negatif yüke sahip proteinler anoda, pozitif yüke sahip proteinler katoda doğru hareket ederler. Hızları net yüklerinin büyüklüğüne bağlıdır.

Proteinler elektroforez süresince yüklerini sürekli kaybederken, protonları ya verirler veya alırlar. Hız azalır ve sonuçta pI değerine eşit pH noktasına gelindiğinde dururlar. Filtre kağıdının stripleri elektrod çözeltisine batırıldığında pH gradiyent sabitesinin amacına hizmet eder

2D –PAGE de ikinci basamak proteinler pI değerlerine göre ayrıldığında SDS PAGE (yukarıda tanımlandığı gibi) tarafından molekül ağırlığına göre ayrılırlar.

1.8 İnce Tabaka KağıtKromatografisi

Enzim ürünlerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerden birisi de kromatografik tekniklerdir. Enzim ürünü belirlemede pratik, ucuz ve verimli sonuçlar elde edilebilen ince tabaka kromatografisi ve kağıt kromatografisi kullanılmaktadır. ince tabaka kromatografisi (TLC) cam üzerine ince bir silika jelin dökülmesiyle oluşturulurken, kağıt kromatografisi wathman olarak bilinen kağıt yardımıyla yapılır. Yani selüloz bir kağıttan oluşmaktadır.



Şekil 1. 6 Silika jelin temel yapısı. Silikon atomları oksijen atomlarıyla bağlanarak cam yüzeyde oluşturmuş olduğu yapı.

Silika jel silikon dioksidin bir formudur. Silikon atomları büyük bir kovalent yapıda oksijen atomları ile bileşik oluşturur. Ancak silika jelin yüzeyinde silikon atomları OH gruplarına tutturulur. Bu nedenle silika jelin yüzeyinde Si-O-H bağları vardır [71].

Enzim ürünleri ince tabaka kromatografisinde yürütülerek ve aynı zamanda standart belirleyiciler (markır) ile kıyaslanarak nitel olarak belirlenebilir.

2. MATERYAL VE METOT

2. 1 MATERYALLER

Ek -1’de verilmiştir.

2. 1.1 Kimyasallar

Ek -2’de verilmiştir.

2.1.2 Gaita örnekleri

Ek -3’de verilmiştir.

2.1.3 Besiyerleri

Ek -4’de verilmiştir.

2.1.4 Kullanılan çözeltiler

Ek -5’te verilmiştir.

2.1.5. Kalibrasyon eğrileri

Ek -6’da verilmiştir.

2.1.6 Hesaplamalar

Ek-7’de verilmiştir.

2.2 METOT

2.2.1 Bakterilerin Gaita Örneklerinden İzolasyonu

İki bin yedi yılında Cumhuriyet üniversitesinde yapılan bir projeye (CUK.0037482) yenidoğan 8 tane bebekten toplanan gaita örnekleri – 80 °C’ de saklandı. Çalışmada bu gaita stokları kullanıldı. Gaita içerisinde bulunan bakterilerin ekstraselüler enzimleri tanımlandı. Ve amilaz enzimi üreten bakteri kolonilerini saf halde elde edilerek (Ek-3) kodlandı ve gliserol içinde krayo tüplerde stoklandı.

2. 2.2 Amilaz Enzimi Üreten *Lactobacillus* Şuşlarının İzolasyonu

MRS sıvı besiyeri (Ek-4) anlatıldığı gibi hazırlandı. Gaita örneklerinden steril bir kürdan ucu ile alınarak 10 ml MRS sıvı besi yeri içerisine steril şartlar altında ekimleri yapıldı. Bir gece 37 °C’ de inkübasyondan sonra 5000 g’ de 5 dk. santrifüj edildi.

Süpernatant kısım uzaklaştırıldıktan sonra üzerine peptonlu su (Ek-4) eklendi ve peptonlu suda 10^{10} kat ardışık seyrelttikten sonra ‘‘pour plate’’ yöntemi gereği 1 ml kadar petri kaplarına konuldu. Ve üzerine otoklavlanmış MRS agar (Ek-4), yayma yöntemi ile döküldü ve katılaşma sağlandıktan sonra 37 °C bir gece boyu inkübasyona bırakıldı. Daha sonra oluşan kolonilerden farklı şekillere sahip olanlar numaralandırıldı. Yaklaşık 100 koloni işaretlendikten sonra bu numaralı koloniler seçici besiyerine steril kürdan ile ekilerek nişastayı parçaladıkları saptandı. Bu koloniler 10 ml MRS sıvı besiyeri içerisine ekimi yapıldıktan sonra büyütülerek – 80 °C’ de % 44’ lük otoklavlanmış gliserolle 1:1 oranında karıştırılarak krayo tüplerde stoklandı.

2.2.3 İzolatların Karakterizasyonu

2.2.3.1 Morfolojik karakterizasyon

Lactobacillus fermentum suşlarının çıplak gözle görünür yapısına bakıldı. Halka şeklinde ve düz (smooth) yapıya sahip koloniler görüldü.

2.2.3.2 Biyokimyasal karakterizasyon

Biyokimyasal karakterizasyon için amilaz enzimi üreten suşların sıcaklık, pH, tuz konsantrasyonu, Gram boyama, katalaz testi, oksijen varlığı veya yokluğu parametrelerine bakıldı.

2.2.3.2.1 Sıcaklık

Amilaz pozitif olarak belirlenen koloniler MRS agara çizgi ekim yapılarak 20 °C, 25 °C, 37 °C, 40 °C, 50 °C 60 °C, 70 °C, 80 °C sıcaklıklarda inkübasyona bırakıldı. 60 °C, 70 °C, 80 °C sıcaklıklar için iki gün ve diğerleri için bir gün inkübasyonda bekletilerek koloni oluşturup oluşturmadığına bakıldı. Negatif kontrol eşliğinde sonuçlar kaydedildi.

2.2.3.2.2 pH

Farklı pH (pH 5.5, 6.3, 7, 8, 9) değerlerine sahip MRS agar besiyerleri oluşturuldu (besiyeri pH değeri HCl ile ayarlandı). Amilaz pozitif koloniler çizgi şeklinde ekimi yapıldı. Kültürler 37 °C iki gün inkübasyona bırakıldıktan sonra sonuçlar kaydedildi.

2.2.3.2.3 Tuz

MRS agar besiyeri (pH 6.3) hazırlandı. Amilaz-pozitif koloniler farklı tuz konsantrasyonlarına sahip (% 0.5, % 1, % 3, % 6) besiyerlerine çizgi şeklinde ekimi yapıldı. Kültürler 37 °C iki gün bekletildikten sonra sonuçlar kaydedildi.

2.2.3.2.4 Katalaz testi

MRS sıvı besiyeri içerisinde canlandırılan amilaz-pozitif suşlarından 1 ml alındı. Ependorf tüp içerisine konulduktan sonra 5,000 g' de santrifüj edildi. Peletler petri kabı üzerine yayıldı. Üzerine % 3' lük H₂O₂ eklendi. Hava kabarcığı olup olmadığına bakıldı. Sonuçlar kaydedildi.

2.2.3.2.5 Oksijen varlığı ve yokluğu

MRS agar besi yerine çizgi şeklinde amilaz-pozitif suşları ekildi. Oksijen içermeyen kaplara konularak gece boyu 37 °C inkübasyona bırakıldı. Benzer şekilde oksijenli ortamda üretilen bakteriler ile karşılaştırma yapıldı. Sonuçlar kaydedildi.

2.2.3.2.6 Gram boyama

Amilaz-pozitif suşları MRS sıvı besiyerinde canlandırıldıktan sonra bu örneklerden steril ependorf tüplere 500 µl alındı. 5 dk. 5000 g' de santrifüj edildi. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. 750 µl saf su eklendi. Pelet tekrar çözüldü. Ve tekrar aynı değerde santrifüj edildi. Pelet mikroskopik inceleme için kullanıldı.

Öncelikle temiz lam –lamel alınarak tekrar temizlemek için etanolden geçirildi. Ve saf suyla yıkandıktan sonra kurulandı.

Her bir örneğin pelet kısmı lam üzerine iyice yayıldı. Ve kurutuldu. Her bir lam üzerine kristal viole boyası damlatıldı (2 damla). Ve 1 dk. bekletildi. Daha sonra % 95' lik etanol eklendi (2 damla). 15 sn. kadar bekletildi. Ve musluk suyu ile yıkandı. Sonra safranin çözeltisi 2 damla damlatılarak 30 sn. beklendi. Musluk suyu ile yıkandıktan sonra havada kurutulmaya bırakıldı. Sonra her bir örneğin mikroskopik incelemesi yapılarak görüntülendi.

2.2.3.3 Moleküler karakterizasyon

2.2.3.3.1. *Lactobacillus fermentum* bakterilerinin canlandırılması

MRS sıvı besiyerinden (Ek-4) 10 ml alındı. Mavi alev altında - 80 °C bekleyen stok, amilaz üreten türler ekildi (Ek-3). Gece boyu 37 °C inkübasyona bırakıldı. Daha sonra bu sıvı besi yerinden çizgi şeklinde MRS agar (Ek-4) besiyerine ekim yapıldı. Oluşan bu yeni koloniler, takip eden çalışmalarda kaynak olarak kullanıldı.

MRS sıvı besiyeri (Ek-4)' den 10 ml alındı. Bu besiyerine önceden çizgi ekim yapılarak elde edilen kolonilerden, steril şartlar altında ekim yapıldı. Gece boyu 37 °C inkübasyona bırakıldı. Daha sonra bu kültürlerden DNA izolasyonu yapıldı.

2.2.3.3.2 *Lactobacillus fermentum* bakterilerinden genomik DNA izolasyonu

Öncelikli olarak (Ek-5)' te verilen çözeltiler hazırlandı. On ml MRS sıvı besi yeri (Ek-4) kültüründe izolat 1 gece inkübe edildi. Hücreler 5 dk. 6,000 rpm' de çöktürüldü (falkon santrifüjü). Sıvı faz (süpernatant) uzaklaştırıldı, pelet 500 µl 1X TE tamponu (pH 8) ile yıkandı. 5 dk. 6,000 rpm' de santrifüj edildi. % 25 sükröz ve 30 mg / ml lizozim içeren 200 µl 1X TE (pH 8) tamponu ile hücreler süspanse edilerek, yavaşça karıştırıldı. 1 saat 37 °C' de inkübe edildi. 1 mg / ml proteinaz K içeren 370 µl 1^x TE (pH 8) eklendi. 30 µl % 10' luk SDS eklendi. 1 saat 37 °C' de inkübasyona bırakıldı. 100 µl 5M NaCl ve 80 µl CTAB / NaCl solüsyonu (%10 CTAB, 0,7 NaCl) eklendi. 10 dk. 65 °C' de inkübe edildi. 700 µl kloroform / izoamil alkol (25:24:1) eklendi ve kuvvetlice karıştırıldı. (350 kloroform izoamil alkol, 350 fenol) 5 dk. beklenildi. 6,000 rpm' de santrifüjlendi. Üst faz yeni bir ependorf tüpe alındı. Bu işlem iki kez daha tekrar edildi. DNA' yı çöktürmek için 750 µl izopropanol eklendi. Yumak DNA gözleninceye kadar yavaşça karıştırıldı. Gözlenen yumak DNA sarı pipet ucu ile alınarak yeni bir ependorf tüpe konuldu (santrifüj yapıldı ve pelet alındı) ve üzerine 500 µl %70' lik etanol eklendi. 6,000 rpm' de 10 dk. santrifüj edildi. Alkol uzaklaştırıldı ve 37 °C' de 10 dk. kurutulmaya bırakıldı. (100 µg / µl RNaz içeren 100 µl 1X TE (pH:8)' de DNA çözüldürüldü. 37 °C' de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Soğuk - sıcak şoku uygulandı (10 dk. 80 °C ve 10 dk. -20 °C bekletildi). 350 µl fenol eklenip karıştırıldı. 6,000 rpm' de 5 dk. Santrifüjlendi. Üst faz alındı. 350 µl kloroform / izoamil alkol eklenip kuvvetlice karıştırıldı. 6,000 rpm' de 5 dk. santrifüjlendi. 1/10 hacim 5M NaCl (40 µl) ve 2 hacim (800 µl) % 99 etanol ile DNA çöktürüldü. 10 dk. santrifüj yapıldı (10,000 rpm 5 dk.). Pelet 500 µl %70 etanolde yıkandı. 6,000 rpm' de 5 dk. santrifüjlendi. Etanol uzaklaştırıldı ve tamamen DNA' yı kurutmak için 37 °C' de 10 dk. inkübe edildi. DNA miktarına göre 50 µl, 100 µl veya 150 µl 1X TE' de çözdürüldü. Sıcak-soğuk şoku uygulandı (10 dk. 80 °C ve 10 dk. -20 °C bekletildi). Tüm örnekler -20 °C de saklandı.

2.2.3.3.3 DNA agaroz jel elektroforezinin hazırlanması (% 0.8)

0.8 gram agaroz tartıldı (Ek-5). 100 ml 1^x TAE tamponunda çözüldü. Isıtıcı ile kaynatıldı. 50 µg / ml konsantrasyonundaki etidyum bromür çözeltisinden 15 µl eklendi. El yakmayacak kadar soğutulduktan sonra önceden hazırlanmış tank içerisine döküldü. Katılaştıktan sonra taraklar çıkartıldı. Daha sonra jel 1X TAE içeren elektroforez tankına konuldu.

2.2.3.3.4 *Lactobacillus fermentum* bakterilerinin genomik DNA örneklerinin jele yüklenmesi

5 µl DNA örneği ve 2 µl yükleme boyası karıştırıldı. Başlık 2.2.3.3' te hazırlanan jel kuyucuklarına yüklendi. Markır için 1 µl markır ve 2 µl boya ve 4 µl saf su içeren karışım yüklendi. 40 mA 4 saat yürütüldükten sonra jel görüntülendi. DNA izolasyonunda problem olmadığı anlaşıldığında PCR işlemine geçildi.

2.2.3.3.5 *Lactobacillus fermentum* 16SrDNA geni amplifikasyonu

Her bir örnek için gerekli olan kimyasallar (Ek-5)'te görüldüğü gibi hazırlandı. Bu içerik bir tek örnek için gerekli olan kısımdır. Örnek miktarı ile çarpılarak karışım hazırlandı (örnek DNA' sı ve enzim hariç). Her bir tüpe eşit hacimde dağıtıldı. Örnek DNA'sı eklendikten sonra hızlıca Tag DNA polimeraz enzimi eklendi ve 1 damla mineral yağı PCR tüp kapağına damlatıldı. PCR başlatıldı.

2.2.3.3.5.1 PCR amplifikasyon koşulları

PCR reaksiyonu (Ek-5)'te görüldüğü gibi 40 döngü gerçekleştirilip tamam olduktan sonra örnekler 5000 g' de 5 dk. santrifüj yapıldı (yağ tabakasından ayırmak için). Daha sonra örneklerin başlık 2.2.3.3 gibi jel elektroforezi uygulaması yapıldı.

2.2.3.3.6 PCR ürünlerin jele yüklenmesi

5 µl PCR örneği ve 2 µl boya karıştırıldı. Jel kuyucuklarına yüklendi. Markır için 1 µl markır ve 2 µl boya ve 4 µl saf su içeren karışım yüklendi. 40 mA 4 saat yürütüldükten sonra örnek sonuçları kaydedildi.

2.2.3.3.7 16SrDNA geninin dizilenmesi

PCR dizi sonuçları analiz merkezine gönderilerek dizileme gerçekleştirildi. Dizileme sonucu elimize ulaşan dizilerden hangi bakteri türü olduğu tespit edildi.

2.2.3.3.8 *Lactobacillus fermentum* bakterilerinin belirlenmesi

PCR sonuçları ileri yönlü ve geri yönlü olmak üzere iki dizi şeklinde gerçekleştirildi. Bu diziler eşleşen bölgelerinden birleştirilerek tek bir dizi haline dönüştürüldü. Elde edilen tüm 16SrDNA bölgesi NCBI gen bankasından karşılaştırılması yapılarak türler belirlendi.

2.2.4 Logaritmik Faz Üreme Takibi

MRS sıvı besiyeri hazırlandı. Amilaz üreten *Lactobacillus fermentum* suşunun ekimi gerçekleştirildi. 37 °C de inkübasyona bırakıldıktan sonra 1 saat arayla besiyeri körüne

karşı 600 nm' de 16 saat boyunca periyodik ölçümler alınarak suşun üreme zaman logaritmik grafiği çıkarıldı.

2.2.5 Protein Miktar Tayini

Bunun için Bradford yöntemi kullanıldı. Ticari satın alınan Bradford reçetesine göre gerçekleştirildi. Absorbansı okunan her bir örnek ependorf tüp içerisine alınarak 10,000 g 5 dk. santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmında protein miktarı tayin edildi. Bunun için 25 µl süpernatant örneği ile 675 µl Bradford kimyasalı karıştırıldıktan sonra 2 dk. oda sıcaklığında bekletildi. Kör için ise 700 µl Bradford kimyasalı kullanıldı. 595 nm' de ölçüm alındı. Kalibrasyon eğrisi oluşturuldu (Ek-6).

2.2.6 Maltoz Miktar Tayini

DNS yöntemi kullanıldı. Bunun için santrifüj edilen ependorf tüplerden (log faz takibi için kullanılan) süpernatant kısmından 200 µl alındı. 400 µl DNS çözeltisi (Ek-5) ve 200 µl % 2' lik nişasta çözeltisi bir ependorf tüp içerisinde karıştırıldıktan sonra 37 °C 15 dk. su banyosunda bekletildikten sonra 95 °C 5 dk. kaynatıldı ve buz içerisine konulduktan sonra 540 nm' de ölçüm alındı. Kalibrasyon eğrisi oluşturuldu (Ek-6).

2.2.7 SDS PAGE ve Doğal (Natif) PAGE ve Zimogram Çalışmaları

2.2.7.1 % 12' lik SDS- PAGE (20 ml)

Öncelikli olarak TEMED ve APS hariç diğer kimyasallar (Ek-5)'te görüldüğü gibi istenilen miktarlarda bir beher içerisine alındı. Daha sonra TEMED ve APS de aynı anda istenilen miktarları katılarak hafifçe katılaşma sağlandıktan sonra 12x18 cm' lik cam plakalar içerisine döküldü ve üzerine suyla doyurulmuş n-bütanol konuldu. 30 dakika katılaşmaya bırakıldı. Bundan sonra üzerindeki alkol uzaklaştırıldı. Saf su ile yıkandı. Sonra kurutma kağıtları ile kalan su uzaklaştırıldıktan sonra yükleme jeli (Ek-5) döküldü. Taraklar yerleştirildi, katılaşmaya bırakıldı. Sonra taraklar çıkartıldı. Protein örnekleri yüklemek için yürütme tamponu (Ek-5) içerisine alındı. Proteinler yüklendikten (Ek-5) sonra 18 saat 100 V' da yürütüldü ve boyanmaya (Ek-5) bırakıldı. Bir gece beklendikten sonra yıkama (Ek-5) çözeltisine konuldu. Protein bantları görüntülendi [72].

2.2.7.2 % 7, 5' lik Natif PAGE

Öncelikli olarak TEMED ve APS hariç diğer kimyasallar (Ek-5)'te görüldüğü istenilen miktarlarda bir beher içerisine alındı. Daha sonra TEMED ve APS de aynı anda

istenilen miktarları katılarak hafifçe katılaşıma sağlandıktan sonra 12x18 cm' lik cam plakalar içerisine döküldü ve üzerine suyla doyurulmuş n-bütanol konuldu. 30 dakika katılaşımaya bırakıldı. Bundan sonra üzerindeki alkol uzaklaştırıldı. Saf su ile yıkandı. Sonra kurutma kağıtları ile kalan su uzaklaştırıldıktan sonra yükleme jeli (Ek-5) döküldü. Başlık 2.2.7.1 de anlatıldığı gibi benzer işlemler devamında uygulandı.

2.2.7.8 Zimogram analizi

(Ek-5)' te verilen miktarlar başlık 2.2.7.1 'de anlatıldığı gibi hazırlandı. Boyama ve yıkama işlemi yapılmadan önce üzerine % 10' luk potasyum iyodür dökülerek sonuçlar kaydedildi.

Başlık 2.2.7.1'de anlatıldığı gibi benzer işlemler uygulanarak elde edilen doğal jelden protein bantları kesilerek MRS agar substratlı besiyerine konularak gece boyu 37 °C bekletildi. Üzerine % 10' luk potasyum iyodür dökülerek sonuçlar kaydedildi. Tüm bu çalışmalar negatif kontroller ile karşılaştırıldı.

2.2.8 İnce Tabaka Kromatografisi ile Hidrolizatların Tanımlanması

İnce tabaka kromatografi kağıdı eşit hacimde 3 cm aralıklar ile bölündü ve alt kısımdan da 3 cm boşluk bırakıldı. Gece boyu enzim ve % 1' lik nişasta 37 °C su banyosunda bekletildikten sonra reaksiyon kaynatılarak durduruldu ve 13000 g' de 5 dk. Santrifüj edildikten sonra süpernatant kısım enzim ürünlerini belirlemek için kromatografi kağıdında ilgili yere 2 damla enjektör iğnesi ile damlatıldı. Aynı işlemler ticari α amilaz (*bacillus subtilis*) olarak satın alınan enzim üzerinde de gerçekleştirildi. Markır olarak 0,5 mg /ml (0,5 mg glikoz, maltoz, sükroz ayrı ayrı tartıldı. Son hacimler metanol ile 1 ml' ye tamamlandı) konsantrasyonuna sahip glikoz, maltoz, sükroz örnekleri kullanıldı. Her bir işaretli yere daha önceden hazırlanan 0,5 mg /ml konsantrasyonuna sahip glikoz, maltoz, sükroz örnekleri 2 damla enjektör iğnesi ile damlatıldı. Yürütücü çözeltisi (N bütanol, piridin, saf su 6:3:1 oranında birleştirilerek yürütücü çözeltisi hazırlandı) içerisine kromatografi kağıdı yerleştirildi. 20 saat yürütüldükten sonra boyama çözeltisi (% 30' luk Ortofosforik asit, %15' lik Anilin 5:2 oranında karıştırılarak boyama çözeltisi hazırlandı) ile boyandı. Isıtıcı ile ısıtıldıktan sonra spotlar belirlendi ve sonuçlar kaydedildi.

2.2.9 Enzim Aktivite Çalışmaları

2.2.9.1 Enzim üretilmesi

Bakterilerden enzim üretilmesi için 100 ml MRS sıvı besiyeri hazırlandı. Çizgi ekim yapılarak elde edilen yeni bakteri kolonileri önce 10 ml MRS sıvı besiyeri içerisine ekildi. 3 saat sonra 100 ml MRS sıvı besiyeri içerisine aktararak gece boyu 37 °C çoğalmaya bırakıldı. Ertesi gün falkon tüplere konularak 15 dk. 5,000 g' de santrifüj (+ 4 °C) edildi. Süpernatant kısımlar cam şişeye konuldu. Üzerine 3 hacim soğuk etanol kullanıldı. Ve gece boyu – 20 °C' de bekletildi.

2.2.9.2 Enzimlerin kısmi saflaştırılması

Geceboyu bekletilen cam şişeler tekrar falkon tüplere aktararak 10 dk. 5,000 g' de +4 °C santrifüj edildikten sonra süpernatant kısım uzaklaştırıldı. Pelet ise açık havada kurutuldu. 1 gün kadar oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra bir eppendorf tüpte toplanarak + 4 °C saklandı ve ilgili çalışmalarda kullanıldı.

1 mg /ml her bir enzim örneğinin pH tamponu içerisinde solüsyonu hazırlandı. DNS yöntemi ile her bir örneğin zamana bağlı aktivasyon çalışması yapıldı.

2.2.9.3 Saflaştırılma tablosu

-80 °C' de stok olarak bulunana bakteri örneği MRS agar plaka içerisinde canlandırıldı. Daha sonrasında 10 ml MRS sıvı besiyeri içerisine ekimi yapıldı. 24 saat 37 °C çalkalamalı etüvde inkübasyondan sonra 5,000 g' de 10 dk. santrifüj edildi. Süpernatant kısım enzim kaynağı olarak kullanıldı ve aktivite ve protein miktarları tayin edildi. Arta kalan süpernatant üzerine 3 hacim soğuk etanol konuldu. Gece boyu -20 °C bekletildikten sonra 5,000 g' de 15 dk. +4 °C santrifüj edildi. Pelet kısım kurutulduktan sonra başlangıç kültür hacmi kadar pH tamponunda çözüldü. Tekrar aktivite ve protein miktarına bakıldı.

2.2.9.4 Enzim analizi

Beta-amilaz aktivitesi nişastanın hidrolizinden açığa çıkan maltozun 3,5- dinitrosalisilik asidin indirgeme hızı olarak hesaplanmaktadır [45, 73]

Bir ünite β -amilaz aktivitesi optimum koşullarda dakikada açığa çıkardığı 1 mg maltozdur [74].

Genel olarak %1' lik substratlar kullanıldı. Her substrat optimum pH tamponlarında hazırlandı. Enzim çözeltisi de optimum pH tamponlarında hazırlandı. Substrat ile enzim aynı oranda karıştırılarak uygun zaman ve sıcaklıkta inkübe edildikten sonra reaksiyon hacmi kadar DNS eklendi. 95 °C 5 dk. bekletildikten sonra buz içerisine konularak soğutuldu. 540 nm' de köre karşı okundu. Absorbans verileri kaydedildi. Kör için enzim yerine ilgili optimum pH tamponu kullanıldı.

2.2.9.4.1 pH taraması ve enzim kararlılığı

pH 2 (glisin-HCl tamponu), 3, 4, 5 (asetat tamponu), 6, 7 (fosfat tamponu), 8, 9, 10 (karbonat tamponu), 11, 12 (glisin-OH tamponu) enzim aktivitesi ve kararlılığı üzerine etkisine bakıldı. Aynı tamponlar içerisinde % 1' lik nişasta çözeltisi hazırlandı. 200 µl enzim çözeltisi ile 200 µl substrat 45 °C etkileştirilerek 10 dk. çalkalamalı su banyosunda bekletildi. 400 µl DNS çözeltisi eklenerek 5 dk. kaynar su banyosunda bekletildi. Sonra buz içerisine alınarak soğutuldu. 540 nm' de ölçümler alındı. Sonuçlar kaydedildi.

Kararlılık için her pH örneğinde enzim +4 °C ve oda sıcaklığı (22) ve 37 °C farklı zamanlarda bekletilerek DNS yöntemi ile enzim kararlılığına bakıldı.

2.2.9.4.2 Sıcaklık taraması ve enzim kararlılığı

Optimum pH belirlendikten sonra enzim örneği bu pH içerisinde (Ek-5) hazırlandı. 200 µl % 1' lik nişasta çözeltisi ile reaksiyona sokularak +4 °C, 15 °C, oda sıcaklığı (23), 37 °C, 45 °C, 60 °C, 75 °C, 90 °C sıcaklıklarda 10 dk. inkübe edilerek üzerine 400 µl DNS çözeltisi eklendi. Beş dk. kaynar su banyosunda kör ile birlikte inkübasyondan sonra buz içerisine alınarak 540 nm' de okuma gerçekleştirildi. Sonuçlar kaydedildi.

Termal denatürasyon için optimum sıcaklık ve pH belirlendikten sonra enzim tekrar optimum pH çözeltisi içerisinde hazırlandı. Aynı şekilde % 1' lik nişasta çözeltisi hazırlandıktan sonra 37 °C, 45 °C, 65 °C, 75 °C, 90 °C sıcaklıklarda 15 saat, 20 saat, 24 saat inkübe edilerek DNS yöntemi ile aktivite tayinleri sağlandı. Sonuçlar kaydedildi. Benzer işlemler pH 10.0 için de gerçekleştirildi.

2.2.9.4.3 Substrat seçiciliği

% 1' lik konsantrasyona sahip 5 farklı enzim substratı (Ek-5) pH 5.0 asetat tamponu içerisinde hazırlandı. Substrat olarak amiloz, mısır nişastası, glikojen, amilopektin, çözümlü nişasta kullanıldı. Her substrattan 200 µl alınarak 200 µl enzim çözeltisi ile 5

dk. 45°C sıcaklıkta inkübe edildikten sonra 400 µl DNS eklenerek 5 dk. 95 °C sıcaklıkta bekletildi. Buz içerisinde soğutulduktan sonra 540 nm' de ölçümler alındı ve sonuçlar kaydedildi. Benzer işlemler pH 10.0 ve 37 °C sıcaklık içinde gerçekleştirildi.

2.2.9.4.4 Metal iyonları ve inhibitör etkisi

Reaksiyon hacmi içerisinde 100 mM, 50 mM, 10 mM, 5 mM, 1 mM konsantrasyona sahip olacak şekilde yedi farklı iyon çözeltisi (Ek-5) %1'lik nişasta (pH 5.0 tamponu) çözeltisi içerisinde hazırlandı. Kullanılan metaller Mg^{++} , Cu^{++} , Ca^{++} , Na^{+} , Zn^{++} , Fe^{+++} , Hg^{++} olmak üzere hepside klor bileşiklidirler. Bu metalleri içeren substratlardan 200 µl alınarak 200 µl enzim çözeltisi ile 5 dk. 45 °C sıcaklıkta bekletildikten sonra 400 µl DNS eklenerek 5 dk. 95 °C sıcaklıkta bekletildi. Buz içerisinde soğutulduktan sonra 540 nm' de ölçümler alındı ve sonuçlar kaydedildi. Ayrıca metal iyonu içermeyen enzim aktivitesi çalışması da negatif kontrol olarak benzer şekilde gerçekleştirildi. Benzer işlemler pH 10.0 ve 37 °C sıcaklık için de gerçekleştirildi.

2.2.9.4.5 İyonik kuvvet

Reaksiyon hacmi içerisinde 0.1 M, 0.3 M, 0.5 M, 1 M, 1.5 M konsantrasyona sahip olacak şekilde NaCl (Ek-5) %1'lik nişasta (pH 5.0 tamponu) çözeltisi içerisinde hazırlandı. Bu substratlardan 200 µl alınarak 200 µl enzim çözeltisi ile 5 dk. 45 °C sıcaklıkta inkübasyondan sonra 400 µl DNS eklenerek 5 dk. 95 °C sıcaklıkta bekletildi. Buz içerisinde soğutulduktan sonra 540 nm' de ölçümler alındı ve sonuçlar kaydedildi. Ayrıca metal iyonu içermeyen enzim aktivitesi çalışması da negatif kontrol olarak benzer şekilde gerçekleştirildi. Benzer işlemler pH 10.0 ve 37 °C sıcaklık içinde gerçekleştirildi.

2.2.9.4.6 Kimyasal ve deterjanlar

Reaksiyon hacmi içerisinde %1,%5, %10 konsantrasyona sahip olacak şekilde yedi farklı kimyasal (Ek-5) %1'lik nişasta (pH 5.0 tamponu) çözeltisi içerisinde hazırlandı. Bu substratlardan 200 µl alınarak 200 µl enzim çözeltisi ile 5 dk. 45 °C sıcaklıkta inkübasyondan sonra 400 µl DNS eklenerek 5 dk. 95 °C sıcaklıkta bekletildi. Buz içerisinde soğutulduktan sonra 540 nm' de ölçümler alındı ve sonuçlar kaydedildi. Ayrıca metal iyonu içermeyen enzim aktivitesi çalışması da negatif kontrol olarak benzer şekilde muamele edildi. Benzer işlemler pH 10.0 ve 37 °C sıcaklık için de yapıldı.

2.2.9.4.7 Aktivite kararlılığı

pH 5.0 ve pH 10.0 tamponları içerisinde enzim çözeltileri hazırlandı. +4 °C sıcaklığa bırakıldı. Belirli zaman aralıkları ile aktivite tayinleri yapıldı. Başlık 2.2.9.4 anlatıldığı gibi işlemler gerçekleştirilmiştir.

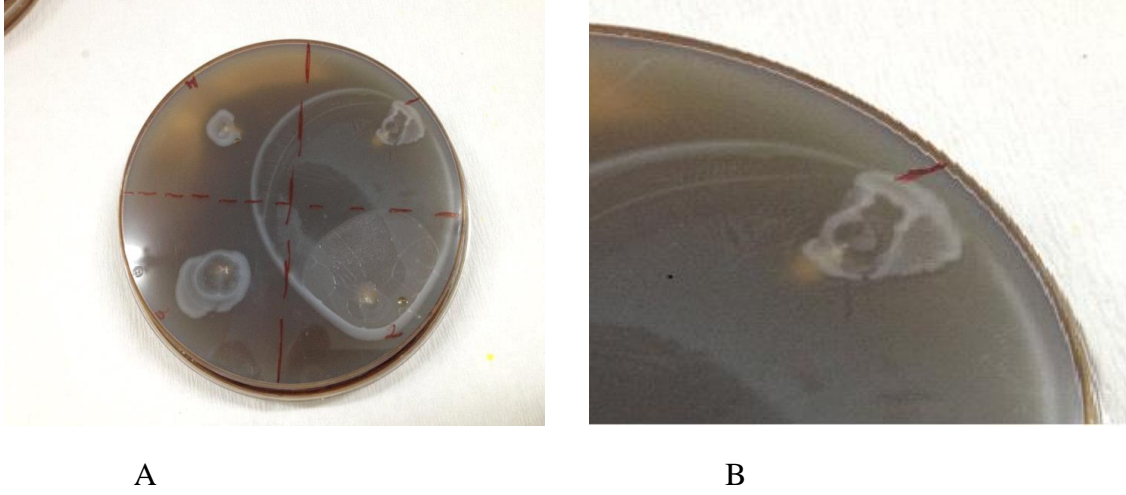
2.2.9.4.8 Kinetik çalışmalar

%4'lük , %2'lik, %1'lik, %0.5'lik, %0.25'lik ve %0.125'lik nişasta çözeltileri pH 5.0 asetat tamponu içerisinde hazırlandı. Bu substratlar kullanıldığında reaksiyon hacmindeki konsantrasyonu dört kat seyrelmektedir. 0, 10, 15, 30, 60, 120, 180 saniye enzim substrat ayrı ayrı inkübe edildi. 5 dk. 45°C sıcaklıkta bekletildikten sonra 400 µl DNS eklenerek 5 dk. 95 °C sıcaklıkta bekletildi. Buz içerisinde soğutulduktan sonra 540 nm' de ölçümler alındı ve sonuçlar kaydedildi. Benzer işlemler pH 10 ve 37 °C sıcaklık için de gerçekleştirildi. Elde edilen absorbans değerleri kullanılarak açığa çıkan maltoz miktarı hesaplandı. Buna bağlı olarak enzimin aktivitesi hesaplandı.

3.BULGULAR

3.1 Nişastayı Hidrolizleyen Bakterilerin Taranması

Gaita içerisinde farklı morfolojiler göz önünde bulundurularak işaretlenen bakteriler seçici besi yerlerine aktarıldı. Nişastaya duyarlı olanlar iyot ile boyandığında etrafında şeffaf zon oluşturdu ve saptandı.

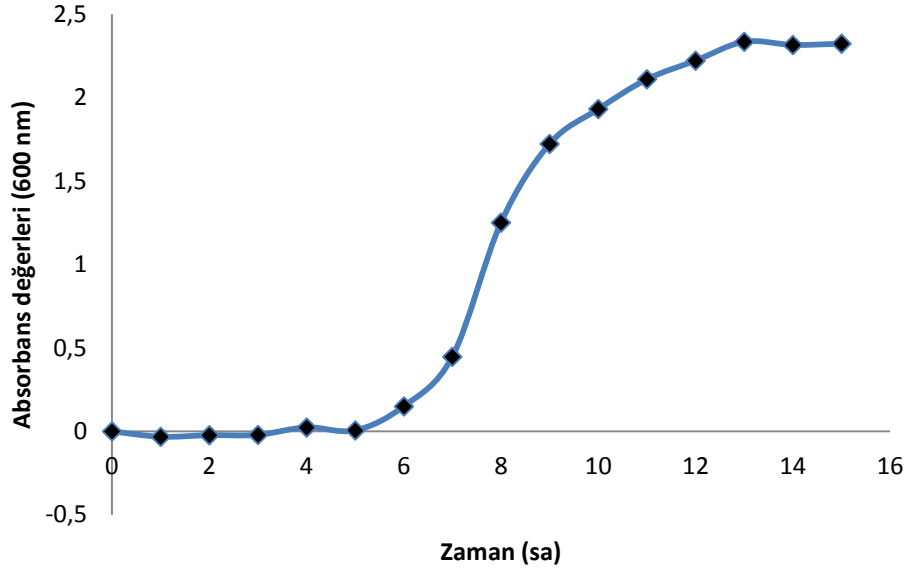


Şekil 3. 1 Enzim aktivitesinin nişastalı MRS agar besi yerinde saptanması

Bebek gaitası içerisinde yer alan farklı morfolojik yapıya sahip fakat nişastayı parçalayan bakteri kolonilerini göstermektedir (Şekil 3.1 (A)). %1 'lik nişasta içeren MRS agar besiyerine ayrı ayrı bakteri kolonileri ekimi yapıldı. Bir gece 37 °C kolonilerin büyümesi beklendi. %10' luk KI çözeltisi bir kaç damla döküldüğünde beyaz zonlar açığa çıktı. Şekil 3.1 (B) ise 1 nolu bakteri örneğinin oluşturduğu zonu daha iyi göstermek amacıyla büyütülmüştür.

Bu dört bakteriden 1 nolu örnek seçilerek biyokimyasal ve moleküler karakterizasyonu yapılmıştır.

3.2 Logaritmik Faz Üreme Takibi



Şekil 3. 2 Bakteri büyüme zaman ilişkisini.

Bakteri örneğinin zamana karşı büyümesini göstermektedir (Şekil 3.2). Bakteri ekimi 37 °C’ de yapıldıktan sonra 1 saat arayla 600 nm’ de besiyerinden oluşan köre karşı absorbans değerleri alınarak 16 saat faz takibi gerçekleştirilmiştir. İlk 5 saat lag fazı olup bundan sonra 6 saatlik kısım logaritmik faz evresinde ve geriye kalan zamanda bakteri durağan faza geçmektedir.

3.3 Biyokimyasal Karakterizasyon

Bir nolu bakteri örneğinin biyokimyasal karakterizasyonu için sıcaklık, tuz konsantrasyonu, Gram boyama, katalaz testi, pH, aerobik ve anaerobik ortam parametrelerine bakılarak sonuçlar çizelge (Çizelge 3.1) halinde gösterilmiştir.

İlgili bakteri örneğinin testlere karşı vermiş olduğu sonuçlar (Çizelge 3.1) görülmektedir. Katalaz testi için kültüre edilen bakterinin süpernatant kısmı %35’ lik H₂O₂ ile muamale edildiğinde negatif sonuç vermiştir. İlgili konsantrasyonlarda tuz çözeltileri içeren besi yerlerine kültüre edilen bakteri örneğinin % 0.5, % 1, % 3 konsantrasyonlarında NaCl içeren besi yerinde büyüme gözlemlendi; % 6 NaCl içeren besiyerinde büyüme gözlemlenmedi. pH taraması için pH 6.3 ve 7.0 olan besi yerlerinde büyüme görüldüğü ve pH 5.5 ve 8’ de az büyüme, pH 9’ da büyüme görülmediği kaydedilmiştir. Sıcaklık için 37 °C büyüme görülürken 60 °C, 70 °C, 80 °C büyüme görülmemiştir. 25 °C ise az büyüme görülmüştür. Gram boyamada bakteriler önce santrifüj edilerek lam üzerine yayma yapıldı. %1’ lik kristal viole damlatıldı. %95’ lik

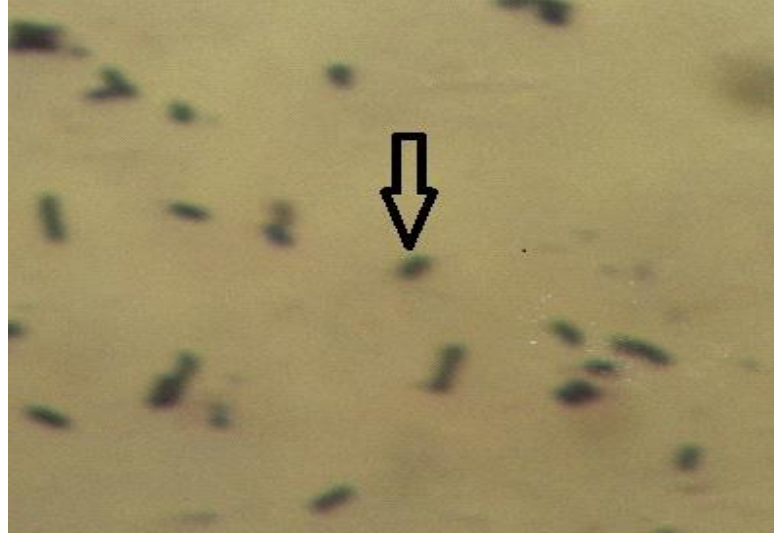
ethanol ile yıkandı. Birkaç damla safranin ile muamele edildiğinde mikroskopik inceleme sonucu hücreler diplokok olup mor renkli görülmüştür.

Çizelge 3. 1 Bir nolu bakteri örneğinin biyokimyasal karakterizasyonu sonuçları

UYGULANAN BAKTERİ ÖRNEĞİ TESTLER	UYGULANAN BAKTERİ ÖRNEĞİ TESTLER
Gram boyama +	pH 7 +
Katalaz testi -	pH 8 *
O ₂ 'li ortam +	pH 9 -
O ₂ 'siz ortam +	23 °C *
% 0.5 NaCl +	37 °C +
% 1 NaCl +	40 °C +
% 3 NaCl +	50°C +
% 6 NaCl -	60 °C -
pH 5.5 *	70 °C -
pH 6.3 +	80 °C -

* az çoğalma, + çoğalma var, - çoğalma yok

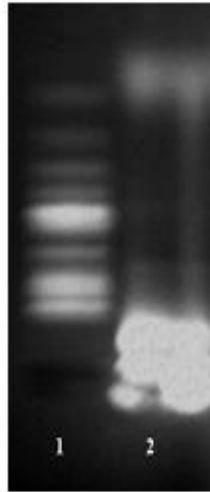
Gram boyama sonucu belirlenen noktada diplokok morfolojisine sahip hücreler Şekil 3.3 2' de gösterilmiştir. Burada ok işareti mikroskopik inceleme sonucu mor renkli diplokok hücreleri göstermektedir.



Şekil 3. 3 Gram boyama.

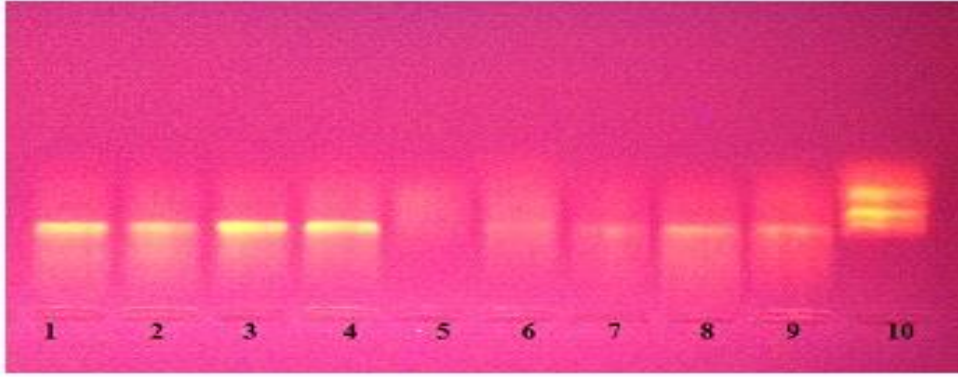
3.4 Genotipik karakterizasyon

Bakteri örneğinden izole edilen genomik DNA'yı göstermektedir (Şekil 3.4). 1 nolu kuyucukta DNA markır örneği bulunmaktadır. 2 nolu kuyucukta bakteri örneğine ait genomik DNA sonucunu göstermektedir.



Şekil 3. 4 Bakteri genomik DNA' sı izolasyonu sonucu % 0,8' lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü. 1 nolu kuyucuk markır (5µl) ve 2 nolu kuyucuk (8 µl) bakteri genomik DNA örneği (markır için 100 bp DNA ladder biolabs kullanıldı).

Daha önceden izole edilen bakteri genomik DNA'sı kullanılarak çoğaltılan PCR ürünlerinin % 0.8' lik agaroz jel elektroforezine yüklenmesi ve yürütülmesi sonucu (Şekil 3.5) elde edilmiştir. 1 nolu kuyucuk bakteri örneğine ait olup 10 nolu kuyucuk ise markırdır. Markırın en alttaki bandı yaklaşık 1,600 baz çiftine karşılık gelmektedir.



Şekil 3. 5 Bakteri 16SrDNA'sının çoğaltılması. Kuyucuklar 1' den 10'a kadar numaralandırılmıştır. 1 nolu kuyucukta (5 µl) bakteri örneğine ait PCR sonucu oluşan bantları göstermektedir. 10 nolu kuyucukta markır (5 µl) bulunmaktadır. Diğer kuyucuklarda farklı bakteri örneklerine ait PCR ürünleri bulunmaktadır.

3.4.1 16SrDNA dizi sonuçları

Bakteri örneğinin ileri ve geri yönlü dizi sonuçları (Şekil 3.6 ve 3.7) karşılaştırılarak ortak dizi kısmından biri kullanılarak tam bir 16SrDNA dizisi elde edildi. Bu tüm dizi NCBI da karşılaştırması yapılarak bakteri örneğinin hangi türe ait olduğu belirlenmiştir (Şekil 3. 8)

EGE 1 Primer sonucu

```

5'TCCCGAAAAATTCGGCAAGGGCTGGCATGGAGTGGTTGGCCGATTGCTTG
AAGGTGCTTGCACCTGATTGATTTTGGTCGCCAACGAGTGGCGGACGGGTG
AGTAACACGTAGGTAACCTGCCAGAAAGCGGGGACAACATTTGGAAACA
GATGCTAATACCGCATAACAACGTTGTTTCGCATGAACAACGCTTAAAAGAT
GGCTTCTCGCTATCACTTCTGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTTGTGGTG
GGGTAACGGCCTACCAAGGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATC
GGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA
GGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACACCGCGTGAGTG
AAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACACGTATGA
GAGTAACTGTTTCATACGTTGACGGTATTTAACCAGAAAGTCACGGCTAACT
ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTA
TTGGGCGTAAAGAGAGTGCAGGCGGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCTT
CGGCTTAACCGGAGAAGTGCATCGGAAACTGGATAACTTGAGTGCAGAA-3'

```

Şekil 3. 6 16SrDNA'nın EGE 1 ileri yönlü primer dizi sonuçları.

16SrDNA'nın EGE 1 ileri yönlü primer dizi sonucunda 660 nükleotit veri bankasında karşılaştırıldığında *Lactobacillus fermentum* bakterisinin 169,453 nükleotidi ile başlayıp 170,079 nükleotid ile eşleşmesini tamamlamaktadır.

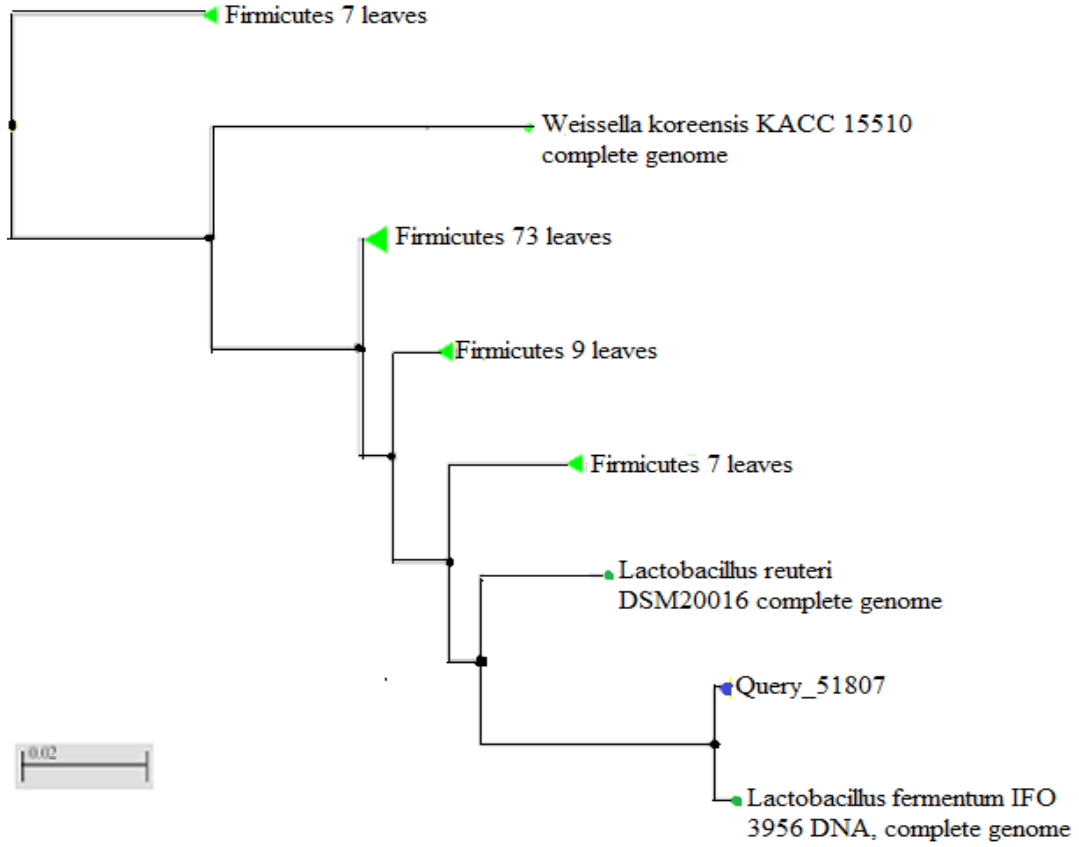
16SrDNA'nın EGE 2 geri yönlü primer dizi sonucunda 650 nükleotit veri bankasında karşılaştırıldığında *Lactobacillus fermentum* bakterisinin 170,852 nükleotidi ile başlayıp 170,253 nükleotid ile eşleşmesini tamamlamaktadır.

EGE 2 Primer sonucu

```
3'TGGGGTCTGAAAACGCGGATCTATGTTGTGACCATCGGGGGGGGCCAAA
AACTATGGGTGTTACGTTTCTCCCGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCC
GGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACT
TCGTGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAGTCCGAACGAGAACGGTTTTAAGAG
ATTTGCTTGCCCTCGCGAGTTCGCGACTCGTTGTACCGTCCATTGTAGCACG
TGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATCTGACGTCGTCGCCACCTTC
CTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCACTAGAGTGCCCAACTTAATGCTGGCAA
CTAGTAACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGAC
ACGAGCTGACGACGACCATGCACCACCTGTCATTGCGTTCCCGAAGGAAAC
GCCCTATCTCTAGGGTTGGCGCAAGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGC
GTAGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAAT
TCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGC
GTTAGCTCCGGCACTGAAGGGCGGAAACCCT-5'
```

Şekil 3. 7 16SrDNA'nın EGE 2 geri yönlü primer dizi sonuçları.

Elde edilen dizi sonuçlarında dendogram analizi yapıldığında *Lactobacillus fermentum* türüne en yakın olduğu saptanmıştır.



Şekil 3. 8 Dendrogram sonucu.

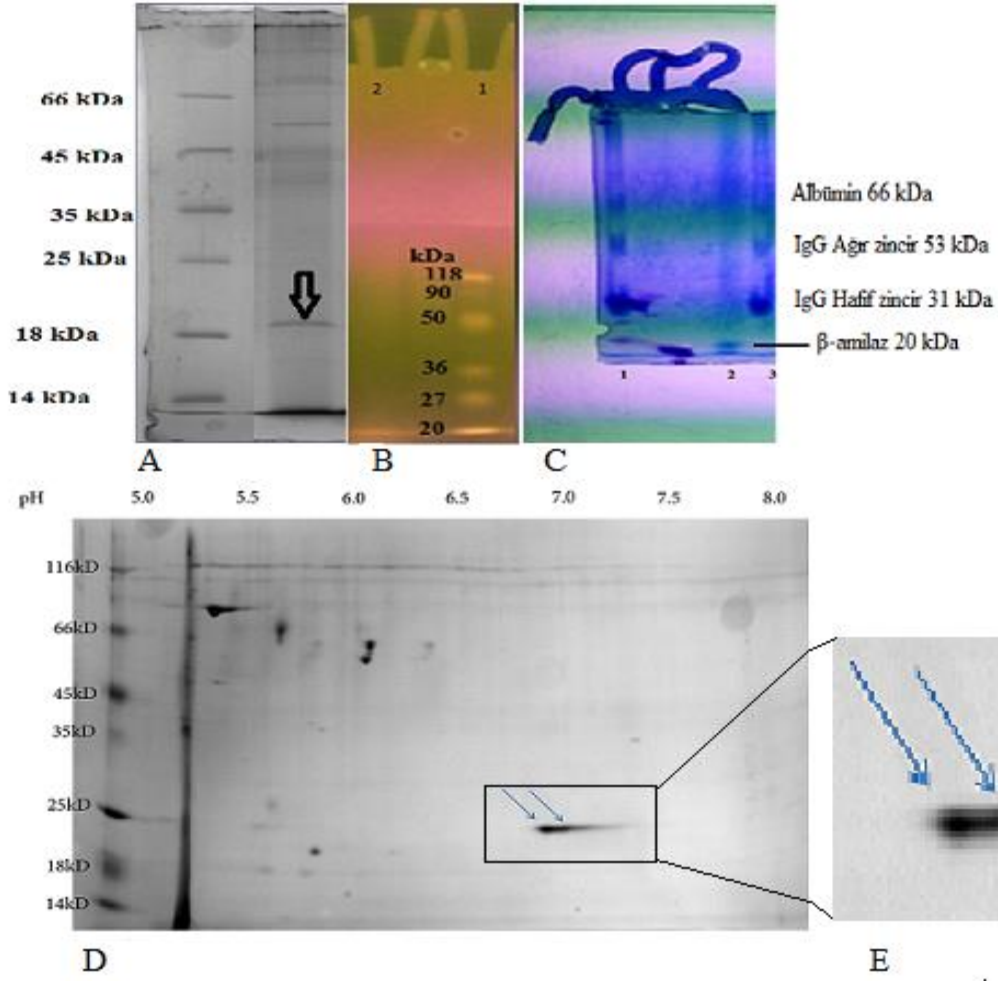
3.5 Enzim karakterizasyonu

3.5.1.Doğal (natif) PAGE ve SDS-PAGE

Enzimin doğal PAGE analizinde 20 kDa civarında görüldü (Şekil 3.9. B ve C).

3.5.2 İki boyutlu jel elektroforezi

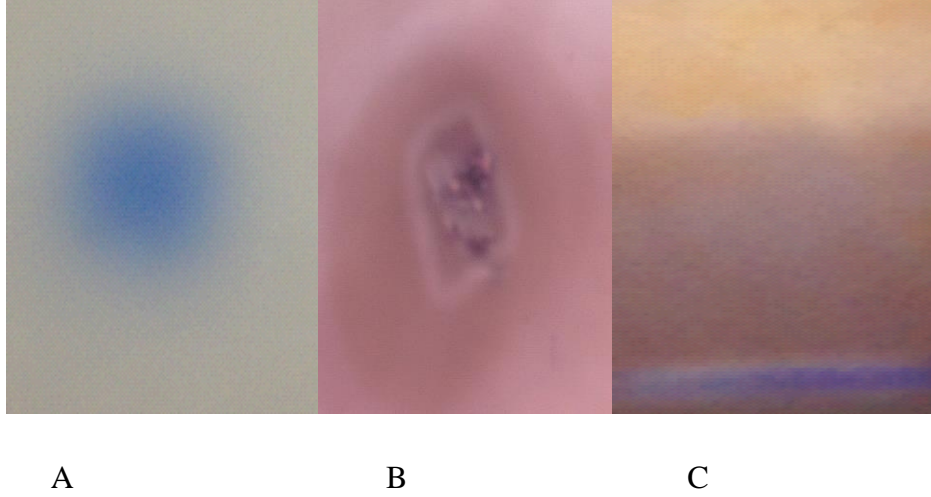
Lb. fermentum' dan kısmen saflaştırılan β -amilaz enziminin SDS-PAGE sonucu (Şekil 3.9. A) göstermektedir. Ok işareti ile gösterilen 20 kDa civarındaki bant enzime aittir. Aynı protein bandının iki boyutlu jel elektroforezinde yürütüldükten sonra elde edilen görüntüsünde (Şekil 3.9. D) görülen sekmeden enzimin izoenzim olduğu anlaşıldı. İoenzim yapının detaylı sonuçları görülmektedir (Şekil 3. 9. E).



Şekil 3. 9 Beta amilaz enziminin doğal (C) ve SDS-PAGE (A ve B) ve izozim (D ve E) sonucu. (A) hizmet sonucu elde edilen görüntüdür. Markır büyüklükleri sırasıyla verilmiştir. (B) kendi laboratuvarımızda yapmış olduğumuz sonuçtur. (C)Beta-amilaz enziminin (natif) PAGE sonucunu göstermektedir. 1 ve 3 nolu kuyucuk markır (20 μ l), 2 nolu kuyucuklar ise bakteri enzim örneği sonuçlarıdır. Markır sırasıyla albümin ve IgG ağır ve hafif zinciri proteinlerinden oluşmaktadır. (D) 2D-Jel Elektroforezi sonucunu göstermektedir. Ve ok işaretlerinin olduğu bölgede izozim yapı görülmektedir. (E) ise bölgenin büyültülmüş sonucu göstermektedir.

3.5.3. Zimogram PAGE

Kısmen saflaştırılan enzimin ortamdaki diğer protein bantlarından ayırmak ve substratına duyarlı olup olmadığını saptamak için kullanıldı. Sonuçlar Şekil 3.10'da verildi.

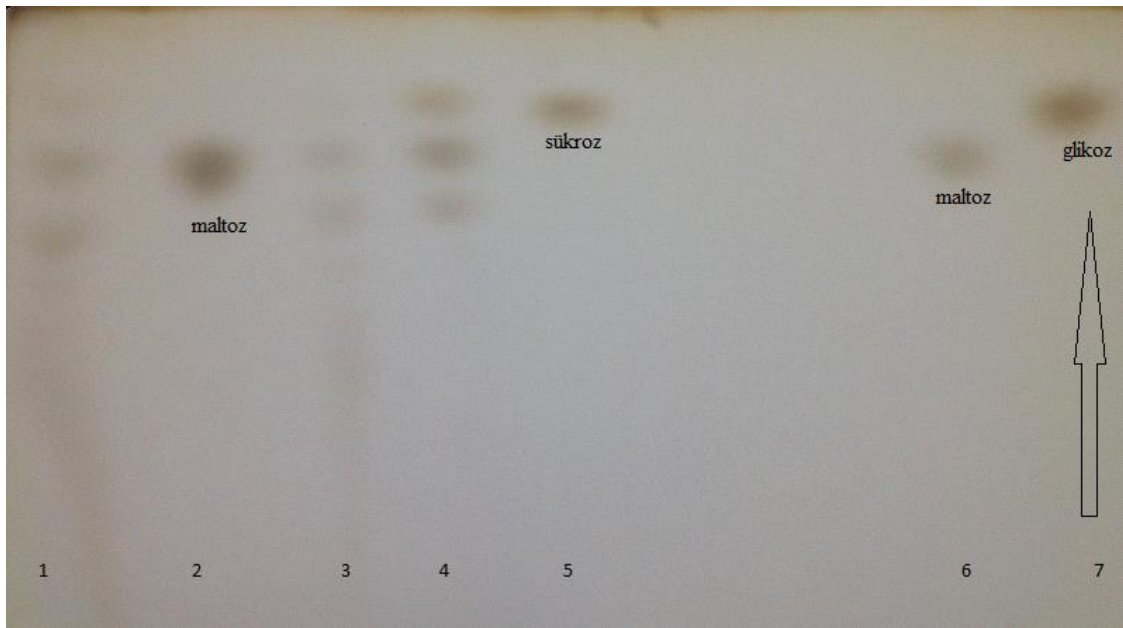


Şekil 3. 10 Zimogram analizi. PAGE jeli yapıldıktan sonra protein örneği olduğunu düşündüğümüz bant kesilerek % 1'lik nişasta içeren MRS agar besiyerine konulup çok az miktarda tampon ile jel çözündüğünde ve potasyum iyodür ile muamele edildiğinde sonucunu (B) göstermektedir. (A) negatif kontroldür. Protein olmayan kontrol PAGE jelinden aynı miktarda kesilerek nişasta içeren besi yerine konulduğundaki sonucu, (C) ise %1' lik nişasta içeren zimogram analizini göstermektedir. Örnek bakteri enziminin jelin uç kısmında lokalizasyonu ve substratını parçaladığında %10' luk potasyum iyodür ile muamele edildiğinde mat bir bant eldesi görülmektedir.

Natif PAGE'de yürütülmüş enzim örneğinin, boyama ve yıkama işleminden sonra lokalize olduğu bölgeden kesilerek %1' lik nişasta içeren MRS agar içerisine konulup birkaç damla tampon ile eritilerek gece boyu 37 °C bekletildikten sonra elde edilen zimogram görüntüsüdür (Şekil 3.10 B). %10 'luk KI damlatıldığında bandın etrafında matlık görülmüştür. Şekil 3.10 A'da kontrol amaçlı kullanılmıştır. Bunun için aynı PAGE'den enzim olmayan boş bir bölgesinden kesilerek benzer işlemler uygulandığında jelin etrafında beyazlama olmadığını göstermektedir. %1' lik nişasta içeren (Natif) PAGE, % 10' luk KI ile boyandığında enzimin lokalize olduğu bölgede mat bir bantlaşma görülmektedir (Şekil 3.10 C).

3.6 İnce Tabaka Kromatografisi

Enzim hidrolizi sonucu oluşan son ürünün belirlenmesi için gerçekleştirildi. Şekil 3.11. enzim ürünlerini göstermektedir. 1 nolu kuyucuk enzim örneği ürünü olup 2 µl damlatılmıştır. 2 nolu kuyucuk % 1' lik maltoz (standart) 3 µl, 3 nolu kuyucukta enzim ürünü 3 µl, 4 nolu kuyucukta ticari bir amilaz enzimin ürünü 3 µl, 5 nolu kuyucukta % 33' lük sukroz (standart) 5 µl, 6 nolu kuyucukta % 0,33' lük maltoz (standart) 3 µl, 7 nolu kuyucukta %1' lik glikoz (standart) 5 µl bulunmaktadır. Yürüme yönü ise numaralı kısımdan yukarı doğrudur. Bu kromatografi çalışmalarına göre son ürün maltoz olarak görüldü.



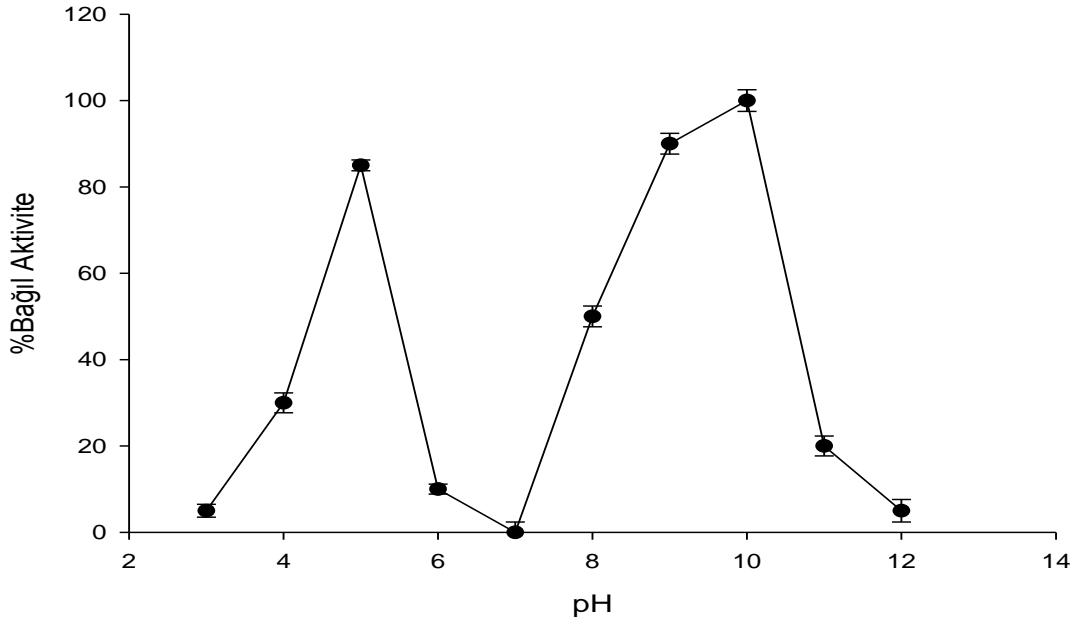
Şekil 3. 11 İnce tabaka kromatografi sonucunu. 1 nolu kuyucukta enzim ürünü, 2 nolu kuyucukta %1'lik maltoz 3 µl, 3 nolu kuyucukta 3 µl enzim ürünü, 4 nolu kuyucukta ticari amilaz enzimi 3 µl ürünü, 5 nolu kuyucukta % 33'lük sukroz (standart) 5 µl, 6 nolu kuyucukta maltoz (standart) % 0,33' lük maltoz 3 µl, 7 nolu kuyucukta % 1' lik glikoz (standart) 5 µl bulunmaktadır.

3.7 Beta-amilazın Kısmen Saflaştırılması

Mikrobiyal enzim elde edilirken MRS sıvı besiyerine ekstraselüler salgılandı ve santrifüjleme ile hücre çöktürülerek ortamdan uzaklaştırıldı. Enzim aktivitesi süpernatant ve soğuk etanol ile çöktürüldükten sonra elde edilen kuru örnek üzerinde çalışılarak enzim 4 kat saflaştırıldı.

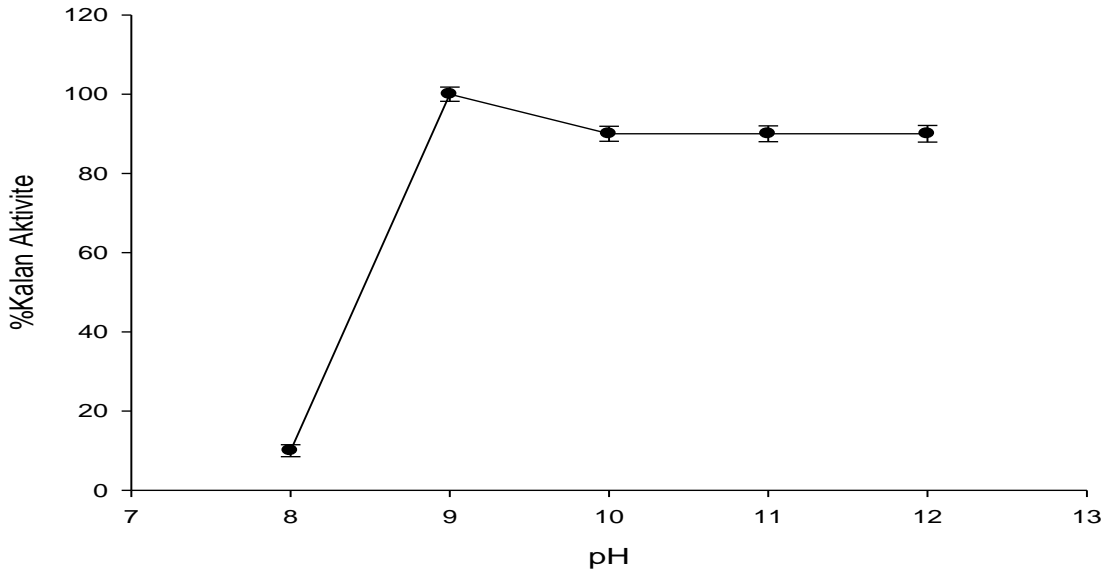
3.8 Beta-amilaz Enziminin pH Taraması ve Enzim Kararlılığı

Enzim aktivitesine pH etkisi görülmektedir (Şekil 3.12). Elde edilen sonuçlar enzimin iki optimum, pH 5.0 ve pH 10.0, maksimum aktivite gösterirken, pH 10.0' da, pH 5.0' e göre daha çok aktivite göstermiştir. pH 7.0'de aktivite göstermedi. İki farklı bölgede optimum aktivite göstermesi iki boyutlu jel elektroforezde görülen izomer varlığını ispatlamaktadır.

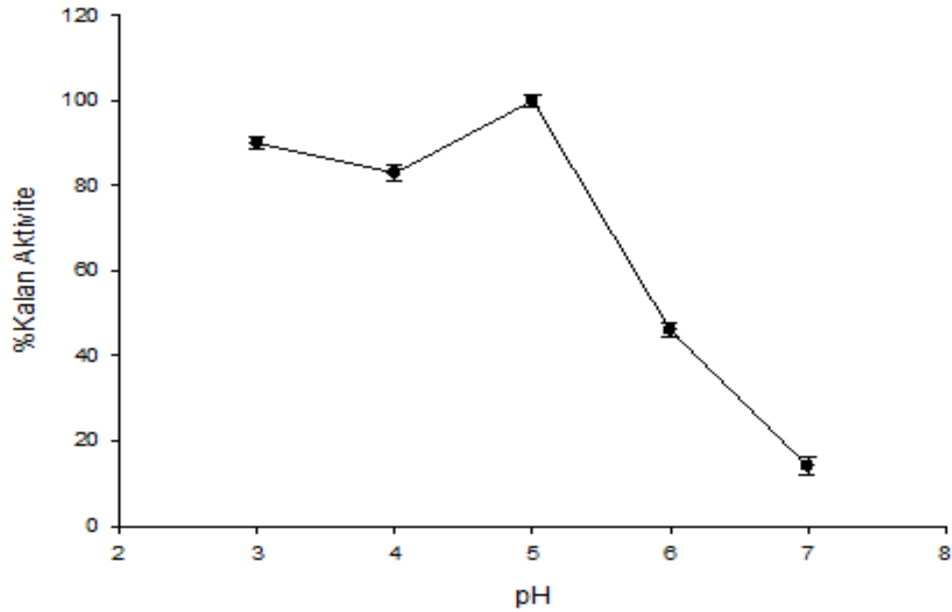


Şekil 3. 12 Enzim aktivitesine pH etkisi (37°C).

Enzimin iki farklı optimum pH değeri olduğu için enzim kararlılığı bu iki farklı değer için çalışıldı. Enzimin alkali koşullarda pH 10.0'da en kararlı olduğu görüldü (Şekil 3.13). Asidik koşullarda ise enzimin pH 5.0'de en kararlı olduğu görüldü (Şekil 3.14).



Şekil 3. 13 Enzimin pH kararlılığı (25 °C, pH 10.0, 3 saat, 0.148 mg/ml).

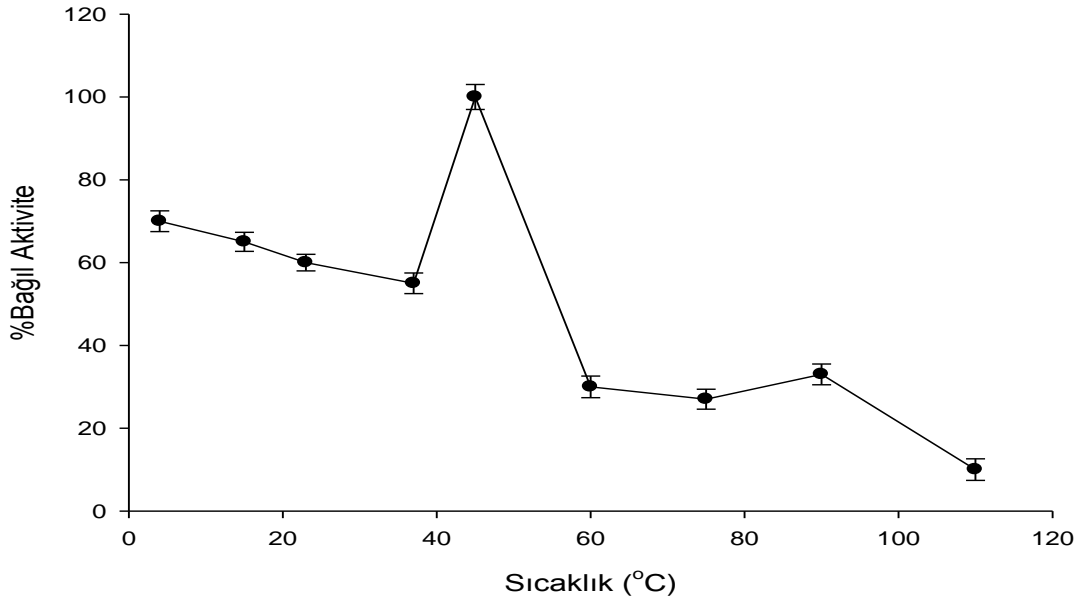


Şekil 3. 14 Enzimin pH kararlılığı (pH 5.0, 25 °C, 3 saat, 0.155 mg/ml).

3.9 Beta-amilazın Optimum Sıcaklığı ve Termal Kararlılığı

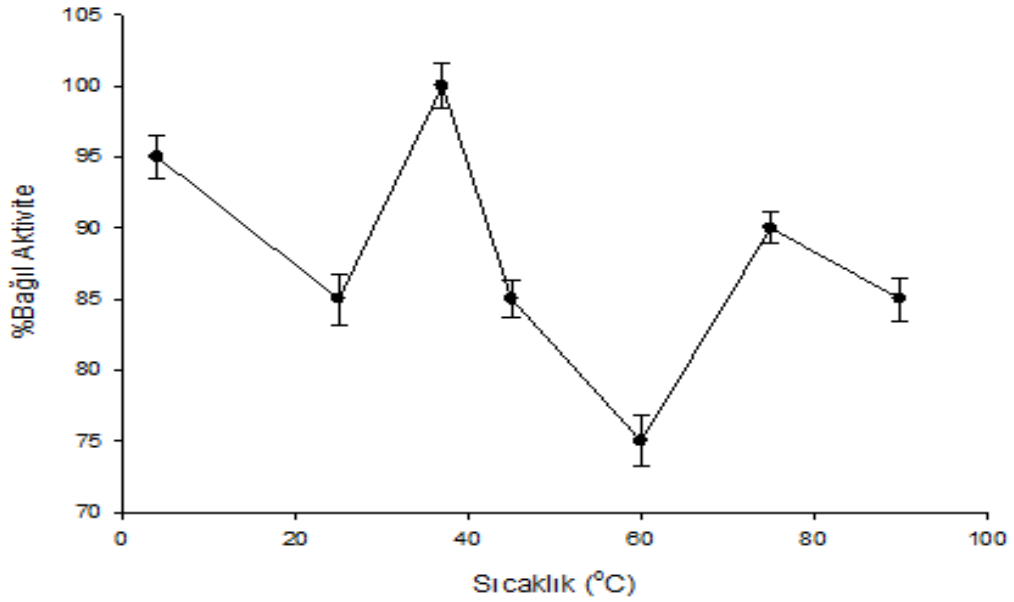
Enzim iki farklı optimum pH değerine sahip olduğu için, enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisine bakılırken bu durum göz önünde bulunduruldu.

pH 5.0 optimum değeri kullanılarak gerçekleştirilen sıcaklık taraması sonucunu göstermektedir (Şekil 3.15). Sonuçlar grafiğe döküldüğünde optimum sıcaklık 45 °C olarak belirlendi.

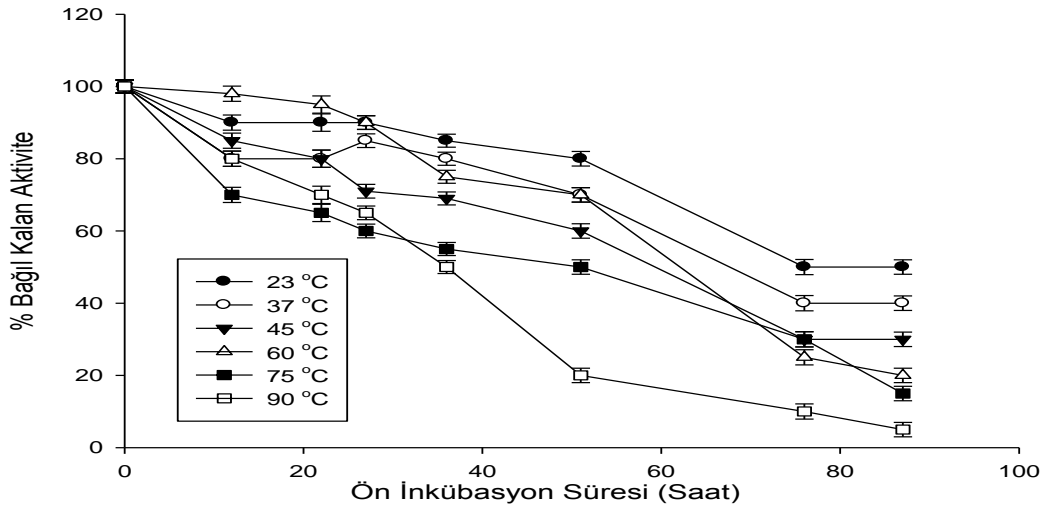


Şekil 3. 15 Sıcaklığın enzim aktivitesine etkisi (pH 5.0, 0.160 mg/ml).

Optimum pH 10.0' da sıcaklık taraması sonucunu göstermektedir (Şekil 3.16). Enzim aktivitesine sıcaklık etkisi farklı sıcaklıklarda çalışıldı ve optimum sıcaklık 37 °C olarak belirlendi.

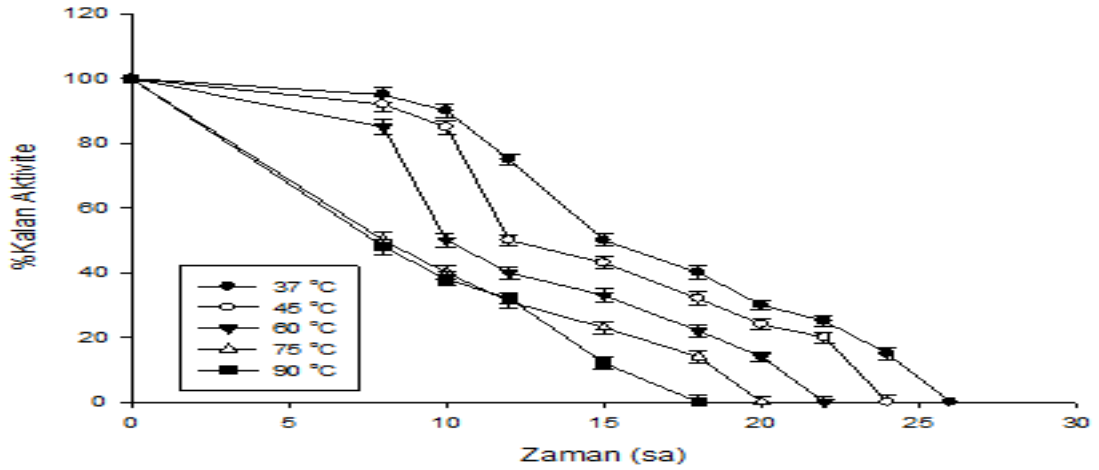


Şekil 3. 16 Sıcaklığın enzim aktivitesine etkisi (pH 10.0, 0,145 mg/ml).



Şekil 3.17 Termal kararlılık (pH 10.0, 37 °C, 0.107 mg/ml).

Enzim pH 10'da 23, 37, 45, 60, 75, 90 °C sıcaklıklarda öninkübasyona bırakıldı, belirli zaman aralıklarıyla aktivitesine bakıldığında enzimin termal kararlılığının 23 °C için 87 saat, 37 °C için 87, saat, 45°C için 87 saat, 60 °C için 87 saat, 75 °C için 87 saat ve 90 °C için 87 saat sürdüğü görüldü (Şekil 3.17).

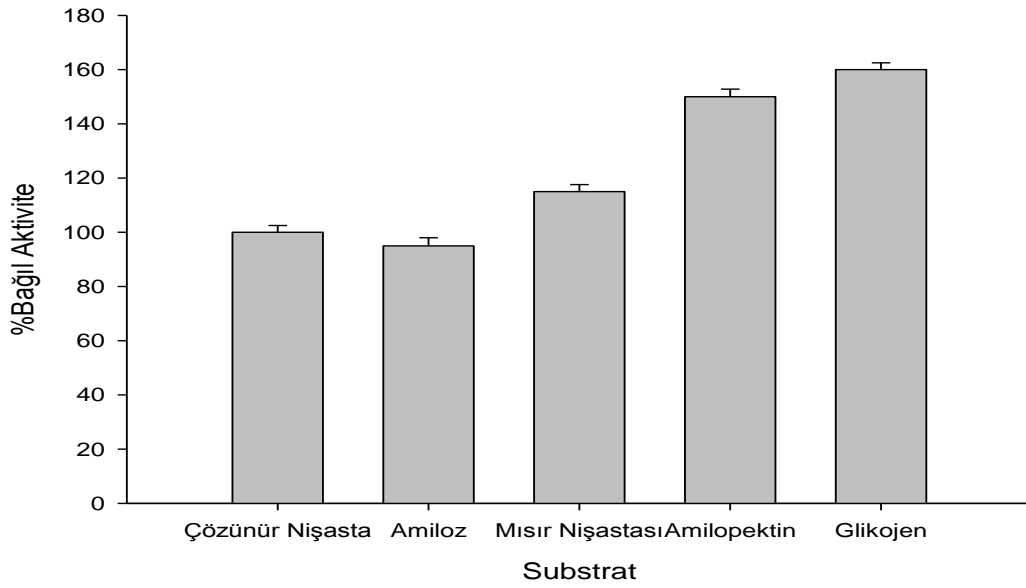


Şekil 3.18 Termal kararlılık (pH 5.0,45 °C, 0.128 mg/ml).

Enzim pH 5.0'da 37, 45, 65, 75, 90 °C sıcaklıklarda öninkübasyona bırakıldı, belirli zaman aralıklarıyla aktivitesine bakıldığında enzimin termal kararlılığının 37 °C için 26 saat, 45°C için 24 saat, 60 °C için 22 saat, 75 °C için 20saat ve 90 °C için 18 saat sürdüğü görüldü (Şekil 3.18).

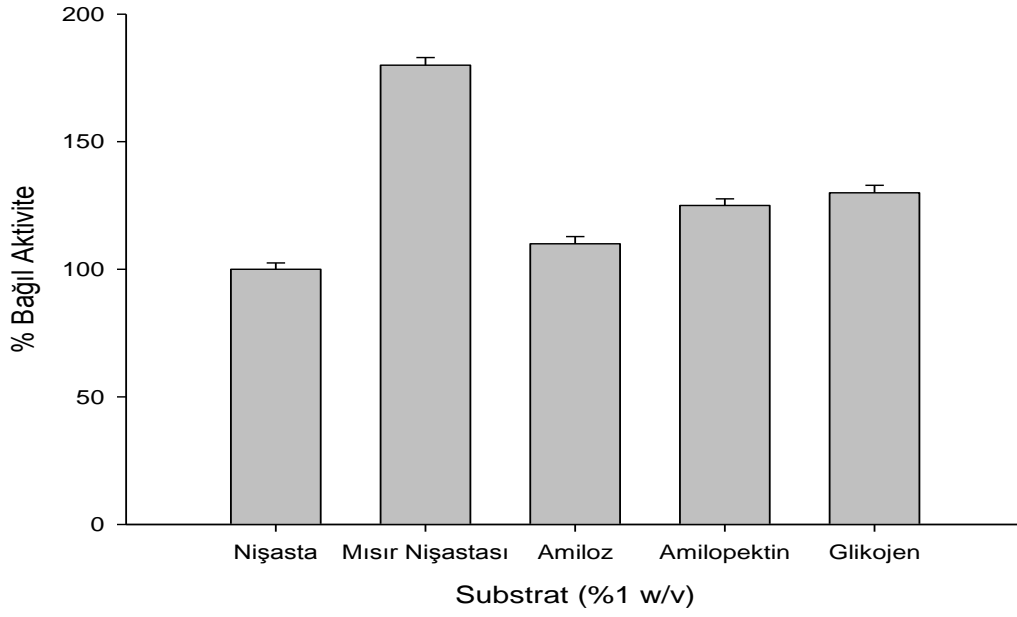
3.10 Beta-amilazın Substrat Seçiciliği

Optimum pH 5.0'de substrat seçiciliği çalışmaları sonucunda en uygun substratın glikojen olduğu Şekil 3.19'dan anlaşılmaktadır. Glikojenden sonra enzimin yüksek aktivite gösterdiği substratlar sırayla amilopektin, mısır nişastası, çözünür nişasta ve amiloz olduğu bulunmuştur.



Şekil 3. 19 Enzimin substrat seçiciliği (pH 5.0, 45°C, 0.143 mg/ml).

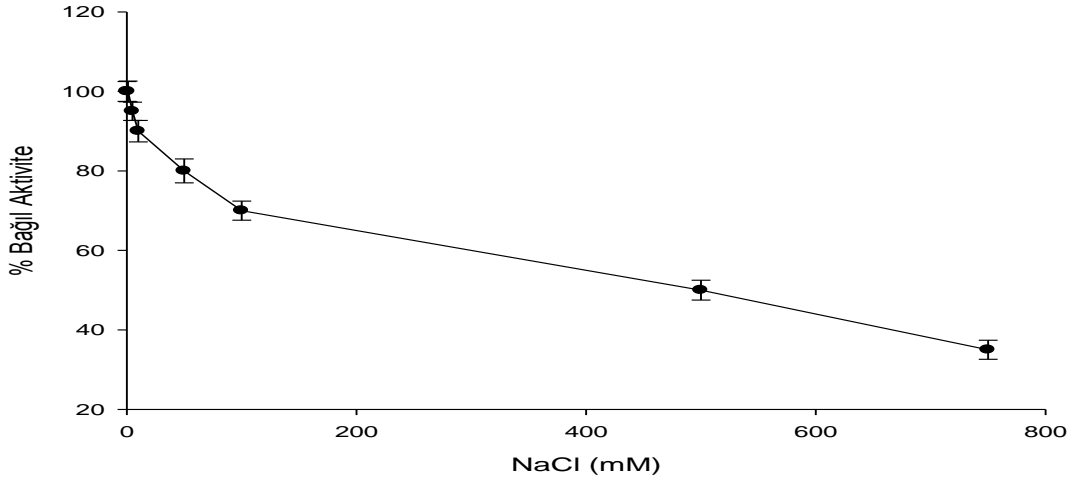
Optimum pH 10.0'da substrat seçiciliği çalışmaları sonucunda en uygun substratın mısır nişastası olduğu Şekil 3.20'den anlaşılmaktadır. Mısır nişastasından sonra enzimin yüksek aktivite gösterdiği substratlar sırasıyla glikojen, amilopektin, amiloz ve çözünür nişastadır.



Şekil 3. 20 Enzimin substrat seçiciliği (pH 10.0, 37 °C, 0.160 mg/ml).

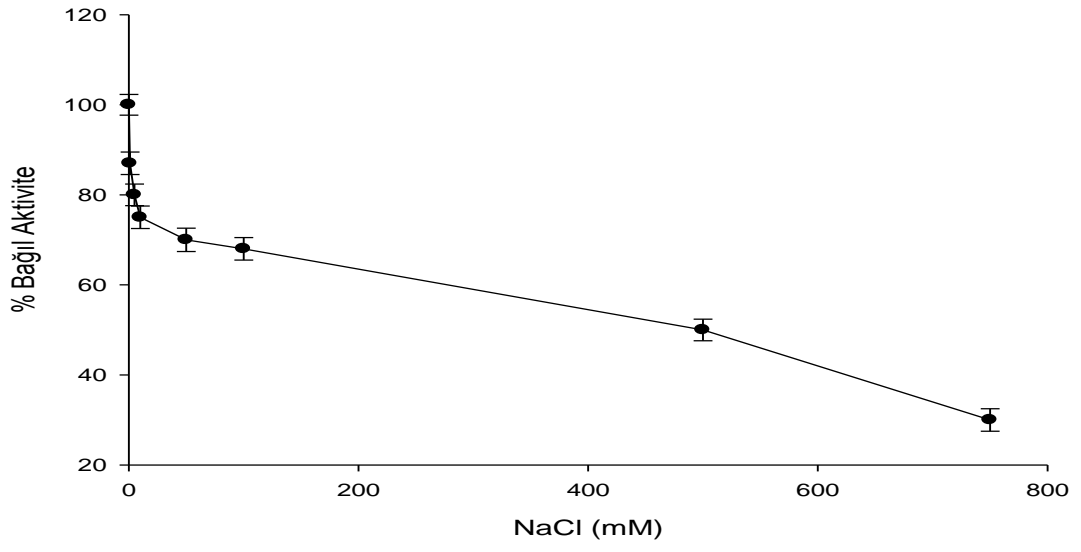
3.11 Beta-amilaz Aktivitesi Üzerine İyonik Kuvvet Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine iyonik kuvvetin etkisi sodyum klorür tuzu kullanılarak bakıldı. Asidik bölgede tuzun derişimi arttıkça enzimin % bağıl aktivitesinin düştüğü görüldü (Şekil 3.21).



Şekil 3. 21 İyonik kuvvet etkisi (pH 5.0, 45°C, 0.114 mg/ml).

Enzim aktivitesi üzerine iyonik kuvvetin etkisi sodyum klorür tuzu kullanılarak bakıldı. Alkali bölgede tuzun derişimi arttıkça enzimin % bağıl aktivitesinin düştüğü görüldü (Şekil 3.22) .



Şekil 3. 22 İyonik kuvvet etkisi (pH 10.0, 37°C, 0,138 mg/ml).

3.12 Beta-amilaz Aktivitesine Metal İyonu Etkisi

Çizelge 3. 2 Enzim aktivitesine metal iyon etkisi

Metal İyonları (mM)	%Bağlı Aktivite (pH:5.0, 45 °C, 0.180 mg/ml)	%Bağlı Aktivite (pH:10.0, 37 °C, 0.165 mg/ml)
Mg ²⁺		
1	70	90
5	68	60
10	65	30
Cu ²⁺		
1	60	100
5	60	30
10	60	30
Ca ²⁺		
1	90	100
5	90	110
10	90	130
Zn ²⁺		
1	74	87
5	70	60
10	60	50
50	0	25
Fe ³⁺		
1	30	45
5	25	30
10	0	0
Hg ²⁺		
1	50	80
5	30	25
10	20	25
Metal İyonu yok iken	100	100

Enzim aktivitesine iki farklı optimum için metal iyonu etkisinin sonuçlarını göstermektedir (Çizelge 3.2).

Enzim aktivitesi 1 mM Fe³⁺ konsantrasyonunda % Bağıl Aktivite pH:5.0, 45 °C' de 30, pH:10.0, 37 °C' de 45 olmaktadır. 10 mM konsantrasyonda % Bağıl Aktivite pH:5.0, 45 °C' de 0 ve pH:10.0, 37 °C' de 0 olduğu görüldü.

1 mM Ca²⁺ konsantrasyonunda % Bağıl Aktivite pH:5.0, 45 °C' de 74, pH:10.0, 37 °C' de 100 olmaktadır. 10 mM konsantrasyonda % Bağıl Aktivite pH:5.0, 45 °C' de 90 ve pH:10.0, 37 °C' de 130 olduğu kaydedildi.

Zn²⁺ 1 mM konsantrasyonunda % Bağıl Aktivite pH:5.0, 45 °C' de 90, pH:10.0, 37 °C' de 87 olmaktadır. 10 mM konsantrasyonda % Bağıl Aktivite pH:5.0, 45 °C' de 60 ve pH:10.0, 37 °C' de 50 olmaktadır. 50 mM konsantrasyonda % Bağıl Aktivite pH:5.0, 45 °C' de 0 ve pH:10.0, 37 °C' de 25 olmaktadır.

Hg²⁺ 1 mM konsantrasyonunda % Bağıl Aktivite pH:5.0, 45 °C' de 50, pH:10.0, 37 °C' de 80 olmaktadır. 10 mM konsantrasyonda % Bağıl Aktivite pH:5.0, 45 °C' de 20 ve pH:10.0, 37 °C' de 25 olduğu belirlendi.

Mg²⁺ 1 mM konsantrasyonunda % Bağıl Aktivite pH:5.0, 45 °C' de 70, pH:10.0, 37 °C' de 90 olmaktadır. 10 mM konsantrasyonda % Bağıl Aktivite pH:5.0, 45 °C' de 65 ve pH:10.0, 37 °C' de 30 olduğu saptandı.

Cu²⁺ 1 mM konsantrasyonunda % Bağıl Aktivite pH:5.0, 45 °C' de 60, pH:10.0, 37 °C' de 100 olmaktadır. 10 mM konsantrasyonda % Bağıl Aktivite pH:5.0, 45 °C' de 60 ve pH:10.0, 37 °C' de 30 olduğu görüldü.

3.13 Beta-amilaz Aktivitesine Çeşitli Kimyasal Ajanların Etkisi

Çizelge 3. 3 Enzim aktivitesine kimyasal ajan etkisi

Kimyasal ajanlar (% v/v)	%Bağlı Aktivite (pH:5.0, 45 °C, 0.124 mg/ml)	%Bağlı Aktivite (pH:10.0, 37 °C, 0.85 mg/ml)
β-Merkaptoetanol 1 5 10	5 5 5	90 60 30
Tween-20 1 5 10	100 86 60	50 65 70
SDS 1 5 10	0 0 0	0 0 0
Triton X-100 1 5 10	75 130 110	100 80 75
EDTA 1 5 10	5 5 5	100 100 100
DMSO 1 5 10	100 90 86	145 136 122

Enzim β-Merkaptoetanol içeren asidik koşullarda ve tüm konsantrasyonlarda aktivite göstermezken, alkali koşullarda Bağlı Aktivite 90 olmaktadır.

EDTA asidik koşullarda enzim aktivitesini inhibe ederken, alkali koşullarda inhibe etmemektedir.

SDS'nin, enzim aktivitesini tüm koşullarda ve tüm konsantrasyonlarda inhibe ettiği görüldü.

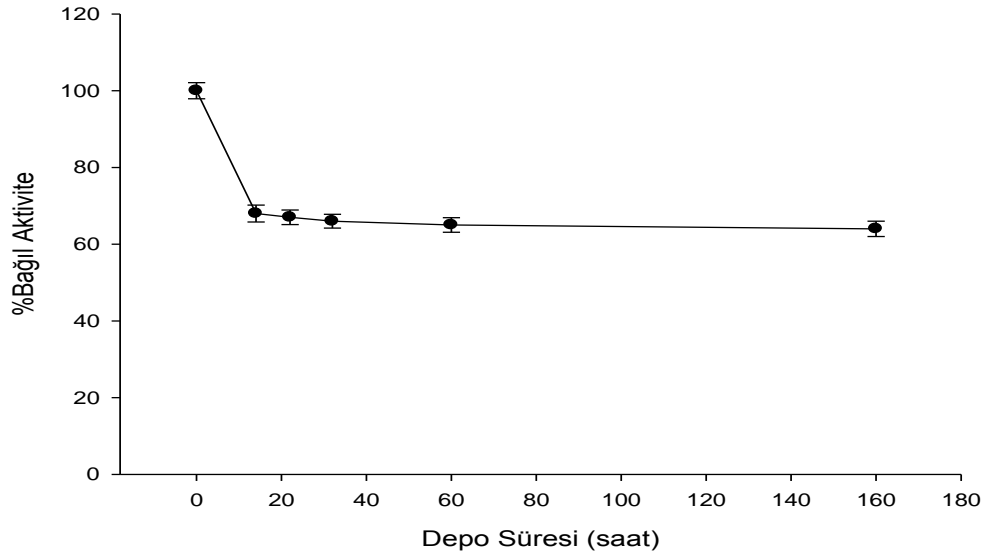
Enzim DMSO varlığında asidik koşullarda aktivite kaybına uğrarken, alkali koşullarda aktivitesinin arttığı görüldü.

Triton X-100 asidik ortamda aktiviteyi artırdığı, bazik ortamda ise azatlığı görüldü.

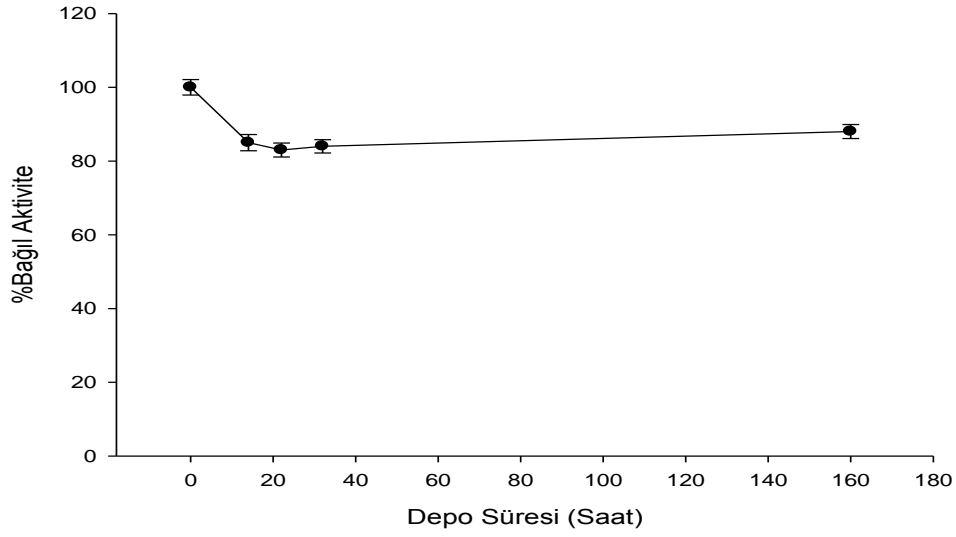
Tween-20 asidik ortamda aktiviteyi gittikçe azaltırken bazik ortamda artırdığı görüldü.

3.14 Beta-amilazın Aktivite Kararlılığı

Kısmen saflaştırılan β -amilaz enzimi +4 °C pH 10.0 ve pH 5.0 tamponları içerisinde bekletildiğinde 6 gün 18 saat sonunda aktivitesini hala koruduğu gözlemlendi(Şekil 3.23 ve 3.24).



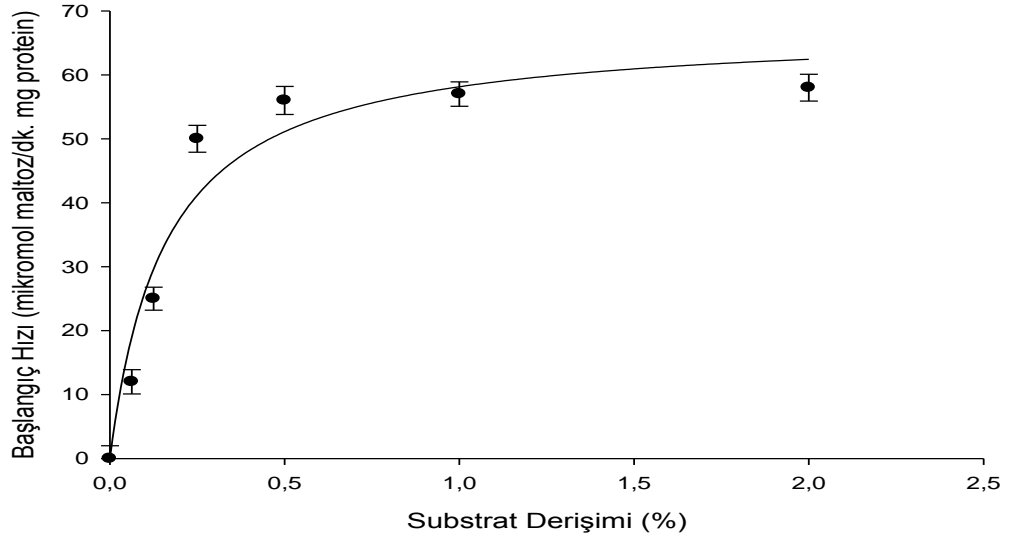
Şekil 3. 23 Beta-amilaz enziminin aktivite kararlılığı (+4 °C), (pH 10.0, 37 °C, 0.102 mg/ml).



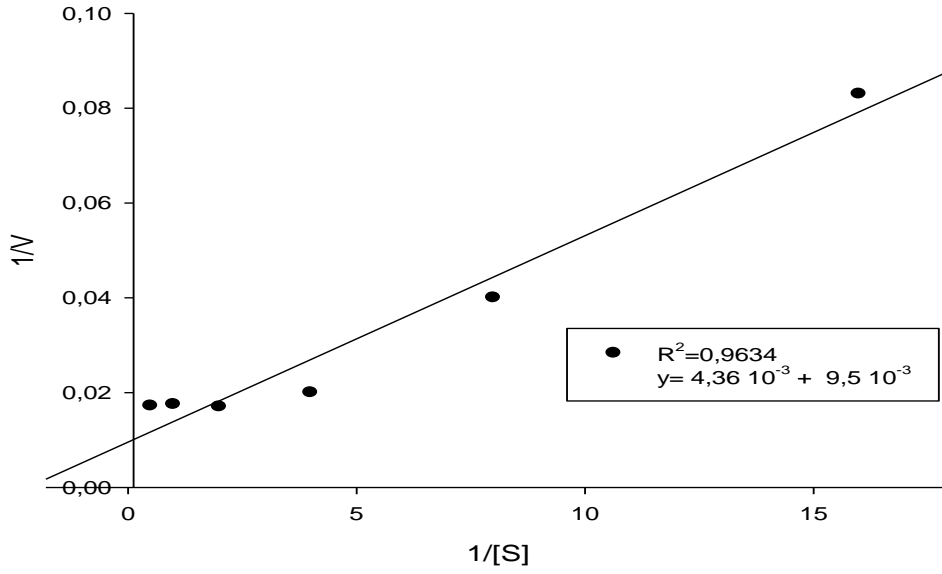
Şekil 3. 24. Beta-amilazı enziminin aktivite kararlılığı (+4 °C), (pH 5.0, 45 °C, 0.111 mg/ml).

3.15 Beta-amilazın K_m ve V_{max} Değerlerinin Hesaplanması

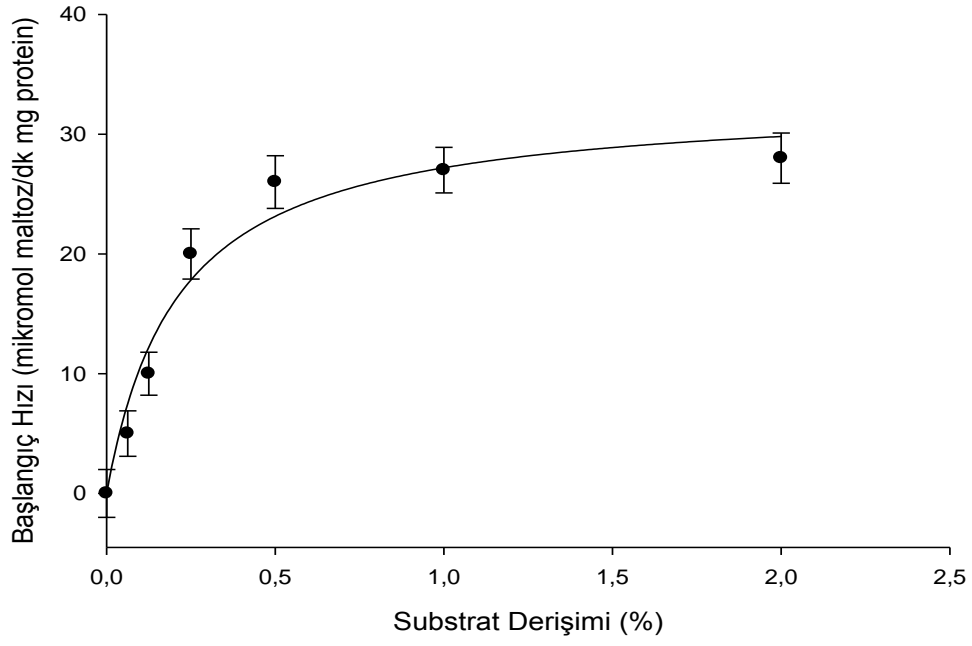
Saflaştırılan β -amilazın kinetiği farklı derişimlerde nişasta kullanılarak pH 10.0 ve pH 5.0 için çalışıldı. Bu substratla yapılan çalışmalar sonucunda β -amilaz aktivitesinin Michaelis-Menten kinetiğine uyduğu görüldü (Şekil 3.25 ve 27). K_m ve V_{max} kinetik sabitleri Lineweaver-Burk grafiği (Şekil 3.26 ve 28) çizilerek belirlendi. V_{max} değerleri pH 10.0 için 104.31 U/mg ve pH 5.0 için 51.12 U/mg olarak hesaplandı. Michaelis-Menten sabiti (K_m) ise pH 10.0 için 0.45 ve pH 5.0 için 0.49 olarak hesaplandı.



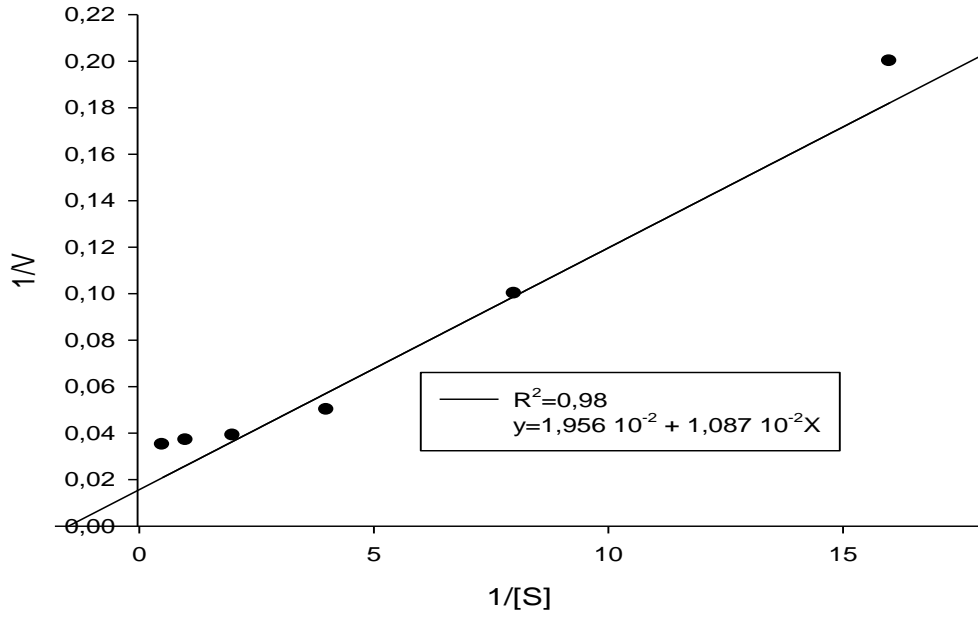
Şekil 3. 25 Beta-amilazın Michaelis-Menten grafiği (pH 10.0, 37°C, 0.143 mg/ml).



Şekil 3. 26 Beta-amilazın Lineweaver-Burk grafiği (pH 10.0, 37°C, 0.143 mg/ml).



Şekil 3. 27 Beta-amilazın Michaelis-Menten grafiği (pH 5.0, 45°C, 0.143 mg/ml).



Şekil 3. 28 Beta-amilazın Lineweaver-Burk grafiği (pH 5.0, 45°C, 0.143 mg/ml).

4.TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Bakteri örneğinin nişastayı parçalayan enzim ürettiği Şekil 3.1' de gösterilmiştir. % 10' luk KI ile muamale edildiğinde siyah bir arka plana karşılık beyaz şeffaf bir zon oluştuğu görülmektedir. Bu şeffaf halkanın bakterinin salgılamış olduğu eksraselüler enzim sonucu nişastanın sindirimi ile olmaktadır. Nişasta KI ile reaksiyon verdiği siyah veya koyu mavi renkli olmaktadır. Ortam eğer nişastanın ürünü varsa bu renk siyah olmaktan çıkıp açığa çıkan enzim ürününün çeşidine göre daha açık renklerde bulunur.

Enzim eldesi bakımından bakteri örneğinin zamana karşı büyümesi takip edildiğinde (Şekil 3.2) yaklaşık olarak 15 saat sonrasında durağan faza geçtiği görülmektedir. İlk 5 saat lag fazında durup daha sonraki 8 saatlik bölümde logaritmik faz evresine geçerek büyüme gerçekleşmiştir. Daha önceki yapılan çalışmalara bakıldığında *L. fermentum* (04BBA19) türü tarafından sentezlenen amilaz enziminin üretim seviyesinin gözle görülür hale gelmesi inkübasyondan sonra 15 saat sürdüğü, maksimum düzeye ise inkübasyondan 40 saat sonra ulaştığı [75] görülmekte iken, *L. fermentum* 04BBA19 türünden elde edilen amilaz 30 saat sonrasında maksimum seviyeye ulaşmıştır [76]. Yine başka bir çalışmada (LAB) bakterisinden amilaz üretimi için 9 saatin yeterli olduğu rapor edilmiştir [77]. Ve *Nocardiopsis sp.* türünden elde edilen amilaz aktivitesi maksimum seviyeye 72 saat sonra ulaştığı görülmüştür [78]. Logaritmik faz enzim üretiminin maksimum olduğu bölgedir. Durağan fazda enzim üretimi sabit hale geldiğinden bu evrede enzim üretimi durdurulmalıdır.

Mikroskop altında bakteri örneği incelendiğinde (Şekil 3.3) Gram pozitifdir. Daha önceki yapılan çalışmalarda amilaz kaynağı olarak kullanılan *Lactobacillus plantarum* ve *L. fermentum*, *Bacillus subtilis* türlerinden de benzer sonuçlar elde edilmiştir [79, 80, 81, 82]. Bakteri hücre duvarında kalın bir peptidoglikan tabakasının olması boyama sırasında kullanılan alkole karşı bariyer oluşturarak bağlı boyayı sökmesine sebep olmuştur bundan dolayı ikinci bir boya ile muamele edildiğinde bu boyayı alamamaktadır ve mor renkli olarak görünmektedir. Şekil olarak bakteri örneği incelendiğinde ise iki tane halka yapısından oluştuğu (Şekil 3.3) görülmektedir ve bu nedenle diplokok olarak tanımlanmıştır. Yapı bakımından bakteri örneği daha önceki yapılan çalışmalarda amilaz kaynağı olarak kullanılan *Bacillus*, *Anoxybacillus*

beppuensis TSSC-türleri ile karşılaştırıldığında benzerlik gösterdiği görülmektedir [80, 83].

Bakteri örneği fenotipik karakterizasyonuna bakıldığında %3 tuz konsantrasyonu içeren besiyerlerinde çoğalmaktadır. Bunun üzerindeki tuz konsantrasyonları içeren besiyerlerinde çoğalmadığı görülmüştür. pH değerinin 5.5 ve 8.0 olduğu durumlarda yavaş çoğalma gösterirken pH 6.3 ve 7.0 olduğu besiyerlerinde koloni oluşturduğu gösterilmiştir (Çizelge 3.1). Sıcaklık bakımından 37 °C koloniler oluşturduğu ve oda sıcaklığında ise küçük koloniler oluşturduğu görülmektedir. 60 °C ve üzeri sıcaklıklarda bakteri örneği büyüme gözlenmemiştir. İnkübasyon süresi uzatıldığı halde yine kolonilerin açığa çıkmadığı görülmüştür bu nedenle bakteri örneği termofilik olmadığından beklentilerle uyumlu sonuç vermektedir.

Bakteri örneğinin tanımlanması için total genomik DNA' sı izole edildi (Şekil 3.4). Bakteri örneğinin total genomik DNA' sı 2 nolu kuyucukta görülmektedir. Ethidium bromür ile UV ışığı altında yansıma yapan DNA gözle görülebilmektedir. Kuyucuğun uç tarafında bulunan bant ise protein kontaminasyonu olarak düşünülmektedir. Bir nolu kuyucukta ise markır örneği olup bantları ayrılmıştır. Genomik DNA büyük olduğu için yeterince yol alamamıştır.

Genomik DNA kullanılarak yapılan 16SrDNA gen bölgesi amplifikasyon ürünleri görülmektedir (Şekil 3.5). Bir nolu kuyucukta marker örneği olup fragmentlerine ayrılmış olarak görülmektedir. Yaklaşık olarak PCR ürünleri 1600 baz çiftine denk gelmektedir. Dizi sonuçları Şekil 3.6 ve 3.7' de verilmiştir. Şekil 3.6' da ileri ve Şekil 3.7' de geri yönlü PCR ürünlerinin dizi sonuçları görülmektedir. Bu iki dizinin ortak bölgeleri karşılaştırılarak NCBI nükleotit veri tabanında karşılaştırılması yapıldığında % 99 benzerlikle *Lactobacillus fermentum* olduğu saptanmıştır. Litaratür çalışmalarına bakıldığında *Lactobacillus* türlerinin amilaz ürettiği nadirdir. Fakat bazı *Lactobacillus* türlerin α -amilaz ürettiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır [84]. β -amilaz üreten *Bacillus subtilis* türlerinin olduğu saptanmıştır [85]. Elde edilen diziler NCBI veri bankasında kullanılarak dendogram sonucu elde edilmiştir (Şekil 3.8).

Enzim moleküler ağırlığına SDS-PAGE analizi ile bakıldığında yaklaşık 20 kDa olarak bulunmuştur (Şekil 3.9 A ve B). Litaratür taramasında β -amilaz enzimin diğerlerinden genel olarak çok düşük olduğu görülmektedir. *Clostridium thermosulfurogenes* SV2 bakteri türünden elde edilen β -amilaz enzimin 210 kDa [86] ve *Eleusine coracana* tohumundan elde edilen β -amilaz enziminin ise moleküler ağırlığı 60 kDa moleküler ağırlığa sahip olduğu bulunmuştur [87]. Natif PAGE sonucunda görüldüğü gibi markır

bantları ile karşılaştırıldığında 31 kDa'dan küçük olduğu anlaşılmaktadır (Şekil 3.9 C). Natif PAGE sonucunda *Clostridium thermosulfurogenes* SV2 bakterisi türünden 180 kDa [86] ve *Manihot esculenta* türünden elde edilen β -amilaz enzimin moleküler ağırlığı 34.67 kDa olarak bulunmuştur [88]. Yine *Bacillus subtilis* türünden elde edilen β -amilaz enzimin moleküler ağırlığı 42.20 kDa olarak bulunmuştur [89]. 2D boyutlu jel elektroforezi sonucuna bakıldığında ise β -amilaz enziminin izomeri olduğu ok işaretleri ile gösterilmiştir (Şekil 3.9 D). izozim yapının net bir şekilde görülmesi için büyütülmüş yapısı gösterilmiştir (Şekil 3.9 E). Daha önceki yapılan çalışmalarda *Eleusine coracana* tohumundan elde edilen β -amilaz enziminin izozim olduğu bulunmuştur [87]. Zimogram çalışmaları sonucunu göstermektedir (Şekil 3.10). SDS-PAGE sonucunda jelin üst kısmında bantlar görülmektedir (Şekil 3.9 A). Bu bantların enzimin alt ünitesi olup olmadığı zimogram çalışmaları ile anlaşılmaktadır. Şekil 3.9' da görünen 18 ile 25 kDa arasına denk gelen kalın bandın ilgilendiğimiz enzim olup olmadığı Şekil 3.10 B ve C' ye bakıldığında anlaşılmaktadır. Zimogram çalışması sonucunu içermektedir (Şekil 3.10 C). Substratlı hazırlanan (natif) PAGE jelinde elde edilen veridir. Enzimin bu bölgede katalitik aktivite gösterdiği yani substratını sindirdiği, açığa çıkan mat bir zon ile görülmektedir. Yine ilgilendiğimiz enzimin doğruluğunu tesbit etmek için (natif) PAGE de elde edilen bant kesilerek substrat içeren besiyeri üzerine konulduğunda substratını sindirdiği görülmektedir (Şekil 3.10 B). Bütün bu çalışmalar negatif kontrol eşliğinde gerçekleştirildiği için enzim harici faktörlerin bizleri yanıltması engellenmiştir (Şekil 3.10 A)

Enzim ürününe baktığımızda maltoz olarak belirlenmiştir (Şekil 3.11). Pozitif kontrol olarak ticari amilaz örneği kullanılmıştır. Ticari amilaz enzimi örneği için son ürün glikozdur. 1 nolu kuyucukta ve 3 nolu kuyucukta enzim substrat ürünleri varken, 4 nolu kuyucukta ise ticari amilaz enzimi ürünleri bulunmaktadır. Bu veriler kendi arasında kıyaslandığında bakteri amilaz enzimi ürünü maltoz olarak görülmektedir. Son ürünün maltoz olması enzimin β -amilaz olduğunun göstergesidir. Yapılan başka bir çalışmada *Salimicrobium halophilum* LY20 [90] bakterisinden ve *Clostridium thermosulfurogenes* SV2 [86] bakterisinden elde edilen β -amilaz enzimlerinin temel son ürünün maltoz olduğu bulunmakla birlikte eser miktarda glikoz ve uzun oligosakkaritlerinde açığa çıktığı saptanmıştır. Son ürünün maltoz olması enzimin indirgeyici olmayan uçtan α -1,4- bağlarını kırdığını göstermektedir. Bu bilgi enzimin beta tipi olduğuna işarettir. Enzim karakterizasyonu açısından pH taraması yapıldığında optimum pH değeri 5.0 ve 10.0 olarak görülmektedir (Şekil 3.12). Yani enzim asidik ortamda ve bazik ortamda

etkin olarak çalışmaktadır. Yine pH 1.0 ile 3.0 aralığında ve Ph 6.0 ile 7.0 aralığında enzimin çalışmadığı görülmektedir (Şekil 3.12). Önceki çalışmalara bakıldığında yine *Eleusine coracana* tohumundan elde edilen β -amilaz enziminin pH 5.0 değerinde optimum aktivite gösterdiği tespit edilmiştir [87] . Bakteriyal β -amilaz enzimleri ile kıyaslandığında *Lactobacillus plantarum* A6 ve *Lactobacillu. plantarum* MNC 21 türlerinden elde edilen β -amilaz enzimleri pH 4.8 değerinde optimum aktivite göstermektedir [91]. *L. fermentum* 04BBA19 türünden elde edilen α -amilaz enzimin pH 5.0 ile 7.0 arasında aktif olduğu bulunmuştur [84]. *Bacillus subtilis* türünden elde edilen β -amilaz enziminin pH 5.0' te optimum aktivite gösterdiği ancak pH 10.0' da da aktivitesinin % 45 koruduğu görülmüştür [89]. Yapılan başka bir çalışmada α -amilaz enzimin 2 farklı optimum çalıştığı pH bölgesi tespit edilmiştir [92].

pH 10.0, 25 °C sıcaklıkta enzimin kararlılığını görülmekte (Şekil 3.13) iken pH 5.0, 25 °C sıcaklıkta enzimin kararlılığını görülmektedir (Şekil 3.14). Enzim 37 °C ve +4 °C, 3 saat sonunda 25 °C sonundaki gibi kararlılığını koruyamamıştır. Aynı şekilde diğer pH ortamlarına göre karşılaştırıldığında β -amilaz enzimin pH 10.0 ve 12.0 aralığında ve pH 5.0' te daha stabil olduğu belirlenmiştir. Yine izozim enzimlerin bulunduğu *Eleusine coracana* tohumundan elde edilen β -amilaz enziminin pH 5.0 ve 6.0 değerlerinde 4 saat 30 C° sıcaklıkta stabil olduğu ancak aynı enzimin pH 8.0 içerisinde daha çok stabil olduğu teşhis edilmiştir [87]. *Salimicrobium halophilum* LY20 bakterisinden elde edilen β -amilaz enzimin pH 6.0 ve pH 10.0 aralığında aktivitesini % 80 sürdürmüştür [90]. *Bacillus subtilis* bakterisinden elde edilen β -amilaz enzimin oda sıcaklığında pH 4.0 ve 10.0 aralığında 6 saat boyunca aktivitesini sürdürmekte olduğu belirlenmiştir [89]. *L. fermentum* 04BBA19 türünden elde edilen α -amilaz enzimin pH 4.0 ile 7.0 arasında stabil olduğu bulunmuştur [84].

Optimum sıcaklık ise pH 5.0 ortamında ve pH 10.0 ortamında sırasıyla 45 °C ve 37 °C olarak görülmektedir (Şekil 3.15 ve Şekil 3.16). Normalde bakterinin yaşadığı ortam dikkate alındığında ise bu değerler makuldür. Aynı zamanda çok yüksek sıcaklıklarda enzimin çalışmıyor olması ve düşük sıcaklıklarda çalışıyor olması β -amilaz olduğunu göstermektedir. Yapılan çalışmalara bakıldığında *Bacillus subtilis* türünden elde edilen β -amilaz enzimin 70 °C sıcaklıkta çalıştığı bulunmuştur [88].

90 °C' de enzim aktivitesini uzun bir süre korumaktadır (Şekil 3.17). Diğer sıcaklıklar için de paralel sonuçlar görülmektedir. Bunlar arasındaki fark ise grafik eğrilerinden anlaşılacağı gibi aktivitedeki düşüş eğrileridir. Yani 90 °C' de enzim hızlı bir aktivite kaybederken 23 °C' de elde edilen eğri daha farklıdır. Bu sonuçlara bakarak enzimin

termal kararlı olduğu söylenebilir. pH 5.0 ortamına bakıldığında enzim aktivitesini uzun bir süre korumaktadır (Şekil 3.18). Fakat pH 10.0 ortamında enzim daha fazla süre kararlılığını korumuştur. Normalde β -amilaz enzimleri genellikle termal kararlı değildir. Ancak daha önceden yapılan çalışmalara bakıldığında mikroorganizmalardan elde edilen bazı β -amilaz enzimlerinin termal kararlı olduğu bulunmuştur [85, 86, 88, 93]. *Lactobacillus fermentum* türlerinden termal kararlı α -amilaz enzimlerinin olduğu daha önceden saptanmıştır [84]. Aynı türden termal kararlı β -amilaz enzimin olduğu yapılan araştırmalarda rastlanmamıştır. Bu nedenle daha çok termal kararlı enzimlerin *Bacillus* türlerinden izole edilmesine karşılık *Lactobacillus* türünden elde edilmesi yarışmalı bir enzim olarak endüstride adaydır. Çünkü kaynak bakterinin patojen olmaması nedeniyle diğer türlere göre yer değiştirebileceğini ummaktayım.

pH 5.0' de substrat seçiciliği çalışmaları sonucunda en uygun substratın glikojen olduğu anlaşılmaktadır (Şekil 3.19). Glikojenden sonra enzimin yüksek aktivite gösterdiği substratların sırayla amilopektin, mısır nişastası, çözümlü nişasta ve amiloz olduğu bulunmuştur. pH 10.0' da gerçekleştirilen substrat seçiciliği çalışmalarına bakıldığında maksimum aktivitenin elde edildiği substrat mısır nişastasıdır (Şekil 3.20). Mısır nişastasını takiben glikojen, amilopektin, amiloz, nişasta olarak görülmektedir. *G. Klattianus* türünün kabuklarından elde edilen β -amilaz enzimin pH 5.5' te aktif olduğu durumda substrat olarak mısır nişastasını tükettiği [94], *Aspergillus carbonarius* (*Bainier*) Thom IMI 366159 türünden elde edilen amilaz enzimin amilopektini pH 6.0 ile 7.0 arasında en iyi kullandığı belirlenmiştir [95]. Yine *Bacillus subtilis* türlerinden elde edilen β -amilaz enziminin pH 10.0' da mısır nişastasını en iyi tükettiği rapor edilmiştir [93].

NaCl konsantrasyonu arttıkça pH 5.0 ortamında enzim aktivitesi düşmektedir (Şekil 3.21). Yine pH 10.0' da yüksek tuz konsantrasyonu enzim aktivitesini azaltmaktadır (Şekil 3.22). 0.5 M NaCl tuz konsantrasyonunda enzim aktivitesi %30 kadar kaybetmektedir. 1.5 M NaCl tuz konsantrasyonunda yaklaşık % 30 seviyelerine kadar aktivite düştüğü görülmüştür. *Amphibacillus sp.* NM-Ra2 türünden elde edilen amilaz enzimin 1.9 M NaCl tuz konsantrasyonunda en iyi aktiviteyi elde ettikleri, 4.3 M NaCl tuz konsantrasyonuna kadar aktivite gösterdiği saptanmıştır [96]. *Bacillus subtilis* türünden elde edilen β -amilaz enzimi 10 mM NaCl tuz konsantrasyonunda aktiviteyi engellediği kaydedilmiştir [89].

Enzim aktivitesine iki farklı optimum pH değerleri için metal iyonu etkisinin sonuçları görülmektedir(Çizelge 3.2). Enzim aktivitesi, 1 mM Fe³⁺ konsantrasyonunda % Bağlı Aktivite pH:5.0, 45 °C' de 30, pH:10.0, 37 °C' de 45 olmaktadır. 10 mM konsantrasyonda % Bağlı Aktivite pH:5.0, 45 °C' de 0 ve pH:10.0, 37 °C' de 0 olmaktadır. Tüm metal iyonlarına kıyasla inhibitör etkisi göstermektedir. Başka çalışmalarda *Bacillus* türlerinden elde edilen amilaz enzimlerine inhibitör etki göstermekte iken [89, 93] *Amphibacillus sp.* NM-Ra2 türünden elde edilen amilaz enzimi üzerine hiçbir etki yapmadığı kaydedilmiştir [96].

Ca²⁺ 1 mM konsantrasyonunda % Bağlı Aktivite pH 5.0, 45 °C' de 74, pH 10.0, 37 °C' de 100 olmaktadır. 10 mM konsantrasyonda % Bağlı Aktivite pH 5.0, 45 °C' de 90 ve pH 10.0, 37 °C' de 130 olduğu görülmektedir. pH 5.0 ortamında Ca²⁺ enzim aktivitesini düşürürken pH 10.0 Ortamında enzim aktivitesi artmakta olup, Ca²⁺ aktivatör etkisi göstermektedir. Genel anlamda Ca²⁺ aktivatör etki yaparken [84,89, 93, 94,], *Aspergillus carbonarius (Bainier) Thom* IMI 366159 türünden elde edilen amilaz enzimi üzerinde inhibitör etki yaptığı rapor edilmiştir [95].

Zn²⁺ 1 mM konsantrasyonunda % Bağlı Aktivite pH 5.0, 45 °C' de 90, pH 10.0, 37 °C' de 87 olmaktadır. 10 mM konsantrasyonda % Bağlı Aktivite pH 5.0, 45 °C' de 60 ve pH 10.0, 37 °C' de 50 olmaktadır. 50 mM konsantrasyonda % Bağlı Aktivite pH 5.0, 45 °C' de 0 ve pH 10.0, 37 °C' de 25 olmaktadır. 50 mM konsantrasyona sahip iken % Bağlı Aktivite pH 5.0, 45 °C' de 0 ve pH 10.0, 37 °C' de 25 olmaktadır. Bu sonuçlardan Zn²⁺ metal iyonunun inhibitör olduğu anlaşılmaktadır. *Bacilli* izolatlarından elde edilen α -amilaz enzimi üzerine aktivatör etki yaptığı kaydedilmiştir [93].

Hg²⁺ 1 mM konsantrasyonunda % Bağlı Aktivite pH 5.0, 45 °C' de 50, pH 10.0, 37 °C' de 80 olmaktadır. 10 mM konsantrasyonda % Bağlı Aktivite pH 5.0, 45 °C' de 20 ve pH 10.0, 37 °C' de 25 olduğu görülmektedir. Civa ağır metaller arasında olup *Aspergillus carbonarius (Bainier) Thom* IMI 366159 türünden ve *Bacillus* izolatlarından elde edilen amilaz enzimi üzerine inhibitör etki göstererek yapılan çalışmalar ile paralellik göstermektedir [93, 95]

Mg²⁺ 1 mM konsantrasyonunda % Bağlı Aktivite pH 5.0, 45 °C' de 70, pH 10.0, 37 °C' de 90 olmaktadır. 10 mM konsantrasyonda % Bağlı Aktivite pH 5.0, 45 °C' de 65 ve pH 10.0, 37 °C' de 30 olduğu saptandı. Bu sonuçlardan Mg²⁺ inhibitör etki gösterdiği anlaşılmaktadır. Mg²⁺ metal iyonunun *Amphibacillus sp.* NM-Ra2 türünden elde edilen amilaz enzimi üzerine hiçbir etki yapmadığı kaydedilmiştir [96]. *Bacillus subtilis* türünden elde edilen β -amilaz enziminin aktivitesini artırdığı görülmüştür [89].

Cu^{2+} 1 mM konsantrasyonunda % Bağıl Aktivite pH 5.0, 45 °C' de 60, pH 10.0, 37 °C' de 100 olmaktadır. 10 mM konsantrasyonda % Bağıl Aktivite pH 5.0, 45 °C' de 60 pH 10.0, 37 °C' de 30 olduğu görüldü. pH 10.0 ortamında konsantrasyona bağlı olarak Cu^{2+} metal iyonları enzimi inhibe ettiği görülmektedir. pH 5.0 ortamında ise yine enzimi inhibe ettiği fakat ilgili konsantrasyon artışı aktiviteyi bir önceki konsantrasyon sonucuna göre değiştirmedeği saptanmıştır. Cu^{2+} metal iyonları enzimi inhibe ettiği yapılan çalışmalar ile tutarlılık göstermektedir [84, 89, 93, 96].

Enzim aktivitesine iki farklı optimum pH değerleri için kimyasal ajanların etkisinin sonuçları görülmektedir (Çizelge 3.3).

Enzim β -Merkaptoetanol içeren asidik koşullarda ve tüm konsantrasyonlarda aktivite göstermezken, alkali koşullarda bağıl aktivite 90 olmaktadır.

EDTA asidik koşullarda enzim aktivitesini inhibe ederken, alkali koşullarda inhibe etmediği görülmektedir. Bir çok çalışmada EDTA molekülünün inhibitör olduğu kaydedilmiştir [84, 89, 95, 96].

SDS'nin, enzim aktivitesini tüm koşullarda ve tüm konsantrasyonlarda inhibe ettiği ancak yapılan bir çalışmada *Bacilli* izolatlarından izole edilen α -amilaz enzimi üzerine aktivatör etki sağladığı rapor edilmiştir [93].

Enzim DMSO varlığında asidik koşullarda aktivite kaybına uğrarken, alkali koşullarda aktivitesinin arttırmaktadır (Çizelge 3. 4).

Triton X-100 asidik ortamda aktiviteyi artırdığı, bazik ortamda ise azalttığı görülmektedir (Çizelge 3. 5).

Tween-20 asidik ortamda aktiviteyi artan konsantrasyona bağlı olarak azaltırken, bazik ortamda ise artan konsantrasyona bağlı olarak artırdığı görülmektedir (Çizelge 3. 6).

β -amilaz enziminin pH 5.0 ve 10.0' da +4 °C bekletildikten sonra aktivite kararlılığı görülmektedir (Şekil 3.23 ve Şekil 3.24). Enzim 1 hafta süresince kararlılığını korumaya devam etmektedir. Aktivite kararlılığı açısından 40 gün aktivitesini devam ettiren *Bacillus* izolatlarından elde edilen amilaz enziminin varlığı rapor edilmiştir [93].

β -amilaz enziminin pH 10.0 ve pH 5.0 ortamında yapılan kinetik çalışmalar sonucunda sırasıyla Michaelis-Menten grafiğine bakıldığında (Şekil 3.25 ve Şekil 3.27) reaksiyon ortamında % 0.5 (% 2) nişasta varlığında enzim doygunluğa ulaştığı görülmektedir. *Hordeum vulgare L.* bitki türünden elde edilen amilaz enzimlerinin kinetik parametrelerinin karşılaştırma çalışmasında çözümlü nişasta substratına karşılık V_{max} hızlarının 642 (U/mg) ve 648 (U/mg) olduğu rapor edilmiştir. Aynı enzimlerin patates nişastasına karşılık K_m değerleri 20 (μM) olarak bulunmuştur [97]. *Bacillus*

izolatlarından elde edilen amilaz enziminin K_m ve V_{max} . değerleri sırasıyla 1.2 g/L ve 5.2 g/L.dk olarak bulunmuştur [93].

β -amilaz enzimin Lineweaver-Burk grafiğine bakıldığında (Şekil 3.26 ve Şekil 3.28) X aksisini kesen nokta $1/K_m$ değerini, Y eksenini kestiği nokta $1/V_{mak}$. değerini vermektedir.

KAYNAKLAR

- [1] **Akkaya, A. ve Pazarlıoğlu, N.** 21. *Yüzyılın Anahtar Teknolojisi: Beyaz Biyoteknoloji* Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü Bornova-İZMİR 35100
- [2] **Godfrey, T. and West, S. (eds).** (1996). *Industrial Enzymology*. London: Macmillan Press Ltd.;
- [3] **Demain, A.L. and Adrio J.L.** (2008). Contributions of Microorganisms to Industrial Biology. *Mol Biotechnol.* 38:41–55 DOI 10.1007/s12033-007-0035-z
- [4] **American Academy of Microbiology Colloquium** (2004). Microbiology in the 21st Century. Where We Are and Where We Are Going. *American Academy of Microbiology*. Washington, DC..
- [5] **Kıran, Ö.E., Çömlekçiöğlu, U. ve Dostbil, N.** (2006). Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Endüstrideki Kullanım Alanları Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Endüstrideki Kullanım Alanları KSU. *Journal of Science and Engineering* 9(1)
- [6] **Kindle, K.L.** (1983). Characterization and Production of thermostable α -Amylase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 8,153.
- [7] **Zeman, N.W. and Mccrea, J.M.** (1985). Alpha-amylase Production Using a Recombinant DNA Organism. *Cereal Foods World.* 30(1) : 777-780.
- [8] **Wiseman, A.** (1987). Handbook of Enzymes Biotechnology. Second Edition. Chapter 3. *The Application of Enzymes in Industry* p. 274-373.
- [9] **Jan B van Beilen, J.B. and Li, Z.** (2002) Enzyme technology: an overview *Elsevier Science* DOI 10.1016/S0958-1669(02)00334-8
- [10] **Aoki, K., Miyamoto, K., Murakami, S. and Shinke, R.** (1995). Anaerobic Synthesis of Extracellular Proteases by The Soil Bacterium *Bacillus* sp. AM-23: Putrifaction And Characterization of The Enzymes. *Soil Biol. Biochem.* Vol. 27. No. 11. pp. 1377-1382.
- [11] **Polaina, J. and MacCabe, P.A.** (2007). *Industrial Enzymes Structure, Function and Applications* pg 3-18
- [12] **Ball, S., Guan, H.P., James, M., Myers, A., Keeling, P., Mouille, G., Buléon, A., Colonna, P., and Preiss, J.** (1996). From glycogen to amylopectin: a model for the biogenesis of the plant starch granule. *Cell* 86, 349–352.

- [13] **Mouille, G., Maddelein, M.L., Libessart, N., Talaga, P., Decq, A., Delrue, B., and Ball, S.** (1996). Preamylopectin processing: a mandatory step for starch biosynthesis in plants. *Plant cell* 8, 1353–1366.
- [14] **Mikami, B., Hehre, E.J., Sato, M., Katsube, Y., Hirose, M., Morita, Y., and Sacchettini, J.C.** (1993). The 2.0 Å resolution structure of soybean β -amylase complexed with β -cyclodextrin. *Biochemistry* 32, 6836–6845.
- [15] **Mikami, B., Degano, M., Hehre, E.J., and Sacchettini, J.C.** (1994). Crystal structures of soybean β -amylase reacted with β -maltose and maltal: active site components and their apparent roles in catalysis. *Biochemistry* 33, 7779–7787.
- [16] **Mikami, B., Adachi, M., Kage, T., Sarikaya, E., Nanmori, T., Shinke, R., and Utsumi, S.** (1999). Structure of raw starch-digesting *Bacillus cereus* β -amylase complexed with maltose. *Biochemistry* 38, 7050–7061.
- [17] **Arikan, B., Unaldi, N., Coral, G., Colak, Ö, Aygan, A. ve Gülnaz, O.** (2003). Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. Isolate ANT-6 *Process Biochemistry* 38 1397_ 1403
- [18] **Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H. and Goswami, V.K.** (2003). Bhavna Chauhan Microbial α -amylases: a biotechnological perspective *Process Biochemistry* 38 1599_ 1616
- [19] **Singh, S., Sharma, V. and Soni, M.** (2011) Biotechnological applications of industrially important amylase enzyme. *International Journal of pharma and bio sciences* Vol 2/ issue1-jan
- [20] **Kulp, K.** (1993). Enzymes as dough improvers. In: Kamel BS, Stauffer CE, editors. *Advances in baking technology*. New York: *Blackie Academic and Professional*, VCH Publishers,:152_ 78.
- [21] **Prieto, JA., Bort, BR., Martínez, J., Rande, Gil F., Buesa, C. and Sanz, P.** (1995). Purification and characterization of a new α -amylase of intermediate thermal stability from the yeast *Lipomyces kononenkoae* . *Biochem Cell Biol*;73:41_ 9.
- [22] **Si, JQ.** (1999). Enzymes, baking, bread making. In: Flickinger MC, Drew SW, editors. *Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation*, vol. 2. Wiley,:947_ 58.

- [23] **Monfort, A., Blasco, A., Preto, J.A. and Sanz, P.** (1996). Combined expression of *Aspergillus nidulans* endoxylanase X-24 and *Aspergillus oryzae* α -amylase in industrial baker's yeast and their use in bread making. *Appl Environ Microbiol*;62:3712_5
- [24] **Van Eijk, J.H.**, (1991). Retarding the firming of bread crumb during storage. Patent application US5023094.
- [25] **Spendler, T. and Jorgensen, O.** (1997). Use of a branching enzyme in baking. Patent Application WO97/41736.
- [26] **De Stefanis, V.A. and Turner, E.W.** (1981). Modified enzyme system to inhibit bread firming method for preparing same and use of same in bread and other bakery products. Patent Application US4299848.
- [27] **Cole, M.S.** (1982). Antistaling baking composition. Patent Application US4320151
- [28] **Okada, S., Kitahata, S., Yoshikawa, S., Sugimoto, T. and Sugimoto, K.** (1984). Process for the production of branching enzyme and a method for improving the qualities of food products therewith. Patent Application US4454161.
- [29] **Carroll, J.O., Boyce, C.O.L., Wong, T.M. and Starace, C.A.** (1987). Bread antistaling method. Patent Application US4654216.
- [30] **Olesen, T.** (1991). Antistaling process and agent. Patent Application WO9104669.
- [31] **Wursch, P. and Gumy, D.** (1994). Inhibition of amylopectin retrogradation by partial beta amylolysis. *Carbohydr Res*;256:129_37.
- [32] **Ming J.W., Stephen M., Neil H., Elizabeth H. and James C.** (2011). Polymorphism and pedigree analysis of β -amylase isozymes in Australian wheat. *Journal of Cereal Science* 53 362e370
- [33] **Aehle, W.** *Enzymes in industry* (2004). pg259-260
- [34] **Muinat, M.A., Adeshola, O.A., Adeleye, O.A., Titilayo, K., Oghenedaji, M., Oluwaseyi, A.F. and Oluwatumininu, L.** (2012). Characterization of a thermostable *Bacillus subtilis* β -amylase isolated from decomposing peels of Cassava (*Manihot esculenta*) *Biokemistri Vol. 24 (1)23-30 June*
- [35] **Poddar, A., Gachhui, R. and Jana, S.C.** (2012) Optimization of physico-chemical condition for improved production of hyperthermostable β amylase

- from *Bacillus subtilis* DJ5. *J Biochem Tech* 3(4): 370-374
- [36] **Hendriksen, H.V., Pedersen, S. and Bisgard-Frantzen, H.** (1999). A process for textile warp sizing using enzymatically modified starches. Patent Application WO 99/35325.
- [37] **Bruinenberg, P.M., Hulst, A.C., Faber, A. and Voogd, R.H.** (1996). A process for surface sizing or coating of paper. European Patent Application EP 0,690,170 A1.
- [38] **Tolan, J.S.** Pulp and paper. In: Godfrey T, West S, editors. *Industrial enzymology*, 2nd ed. New York: Stockton Press, 1996:327_ 38.
- [39] **Van Ee, J.H., Van Rijswijk, W.C. and Bollier, M.** (1992). Enzymatic automated dishwasher detergents. *Chim Oggi*;10:21 _ 4.
- [40] **Kottwitz, B., Upadek, H. and Carrer, G.** (1994). Applications and benefits of enzymes in detergent. *Chim Oggi*;12:21 _ 4.
- [41] **Giri, N.Y., Mohan, A.R., Rao, L.V. and Rao, C.P.** (1990). Immobilization of a amylase complex in detection of higher oligosaccharides onpaper. *Curr Sci*;59:1339_ 40.
- [42] **Maarel, M., Veen, B., Uitdehaag, J., Leemhuis, H. and Dijkhuizen, L.** (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of Biotechnology* 94 137–155
- [43] **Priest, F.G.** (1977). Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriol Rev*;41:711_ 53.
- [44] **Fuwa, H.** (1954). A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as substrate. *J Biochem*;41:583_ 603.
- [45] **Bernfeld, P.** (1955). Amylases, a and b. *Methods Enzymol*;1:149 _ 58.
- [46] **Dhawale, M.R., Wilson, J.J., Khachatourians, G.G. and Ingledew, W.M.** (1982). Improved method for detection of starch hydrolysis. *Appl Environ Microbiol*;44:747_ 50.
- [47] **Virolle, M.J., Morris, V.J. and Bibb, M.J.** (1990). A simple and reliable turbidimetric and kinetic assay for alpha-amylase that is readily applied to culture supernatants and cell extracts. *Journal of Industrial Microbiology*. Volume 5, Issue 5, pp 295-301
- [48] **Windish, W.W. and Mhatre, N.S.** (1965). Microbial amylases. In: Wayne WU, editor. *Advances in applied microbiology*, vol. 7. New York: Academic

Press:273_ 304.

- [49] **Lonsane, B.K. and Ramesh, M.V.** (1990). Production of bacterial thermostable α -amylase by solid state fermentation: a potential tool for achieving economy in enzyme production and starch hydrolysis. In: *Advances in applied microbiology*, vol. 35. San Diego: California Academic Press:1_ 56.
- [50] **Aggarwal, S.** (2006). Isolation and characterization of starch degrading lactic acid bacteria Department of biotechnology and env.sciences thapar of engg.& technology (Deemed Universty) Patiala-147004
- [51] **Fuller, R.** (1989). Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66, 365 – 378.
- [52] **De Simone, C., Vesely, R., Bianchi Salvadori, B. and Jirillo, E.** (1993). The role of probiotics in modulation of the immune system in man and in animals. *Int. J. Immunother.* 9, 23– 28.
- [53] **Link-Amster, H., Rochat, F., Saudan, K., Mignot, O. and Aeschlimann, J.** (1994). Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 10, 55– 64.
- [54] **Majamaa, H., Isolauri, E., Saxelin, M. and Vesikari, T.** (1995). Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 20, 333– 338.
- [55] **Daly, C. and Davis, R.** (1998). The biotechnology of lactic acid bacteria with emphasis on applications in food safety and human health. *Agri. and food Sci. in Finland*, 7: 2, 251- 264.
- [56] **Soomro, A.H., Masud, T. and Anwaar, K.** (2002). Role of Lactic Acid Bacteria (LAB) in Food Preservation and Human Health – A Review. *Pakistan Journal of Nutrition* 1(1): 20-24
- [57] **Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N. et al.** (2006). "Comparative genomics of the lactic acid bacteria". *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (42): 15611– 6.doi:10.1073/pnas.0607117103. PMC 1622870.PMID 17030793
- [58] **Ljungh, A and Wadström, T.**, (2009). *Lactobacillus Molecular Biology: From Genomics to Probiotics*. Caister Akademic pres. ISBN 978-1-904455-41-7

- [59] **Chen, X., Fruehauf, J., Goldsmith, J.D., Xu, H., Katchar, K.K. Koon, H.W., Zhao, D., Kokkotou, E.G., Pothoulakis, C., Kelly, C.N.P.** (2009). Saccharomyces boulardii Inhibits EGF Receptor Signaling and Intestinal Tumor Growth in Apcmin Mice. *Gastroenterology* 137(3):914-923. Doi.10.1053/j.gastro.2009.05.050.PMC2777664. PMID19482027
- [60] **Reid, G., Dols, J. and Miller, W.** (2009). "Targeting the vaginal microbiota with probiotics as a means to counteract infections". *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 12 (6): 583–587.
- [61] **Osset, J., Bartolomé, R.M., García, E. and Andreu, A.N.** (2001). "Assessment of the Capacity of Lactobacillus to Inhibit the Growth of Uropathogens and Block Their Adhesion to Vaginal Epithelial Cells". *The Journal of Infectious Diseases* 183 (3): 485–491. doi:10.1086/318070. PMID 11133381.
- [62] **Pascual, L.M., Daniele, M.B., Ruiz, F., Giordano, W., Pájaro, C. and Barberis, L.** (2008). "Lactobacillus rhamnosus L60, a potential probiotic isolated from the human vagina". *The Journal of general and applied microbiology* 54 (3): 141–148. PMID 18654035
- [63] **Kant, R., Blom, J., Palva, A., Siezen, R.J. and de Vos, W.M.** (2010). Comparative genomics of *Lactobacillus* Microbial Biotechnology 4(3), 323–332 doi:10.1111/j.1751-7915.2010.00215.x
- [64] **Pot, B., Ludwig, W., Kersters, K., and Schleifer, K.H.** (1994). Taxonomy of lactic acid bacteria. In *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Genetics and Applications*. de Vuyst, L., and Vandamme, E.J. (eds). Glasgow, UK: Chapman & Hall, pp. 13–89.
- [65] **Dickson, E., Riggio, M.P. and Macpherson, L.** (2005). "A novel species-specific PCR assay for identifying *Lactobacillus fermentum*." *J Med Microbiol* 54 299-303
- [66] **Link-Amster, H., Rochat, F., Saudan, K., Mignot, O. And Aeschlimann, J.** (1994). Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 10, 55– 64.
- [67] **Golden, D.M., Jay, J.M. and Loessner, M.J.** (2005). Modern food microbiology. Berlin: Springer. p. 179. ISBN 0-387-23180-3.

- [68] **Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., and Pavlova, N.** (2006). "Comparative genomics of the lactic acid bacteria". *Proc Natl Acad Sci U S A* **103** (42): 15611–6. doi:10.1073/pnas.0607117103. PMC 1622870. PMID 17030793
- [69] **Clemente, C. J., Ursell, L. K., Parfrey, L. W. and Knight, R.** (2012). The Impact of the Gut Microbiota on Human Health: An Integrative View. DOI 10.1016/j.cell.2012.01.035
- [70] **Yang, X., Xie, L., Li, Y. and Wei, C.** (2009) More than 9,000,000 Unique Genes in Human Gut Bacterial Community: Estimating Gene Numbers Inside a Human Body. *PLoS ONE* 4(6): e6074. doi:10.1371/journal.pone.0006074
- [71] <http://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/thinlayer.html> Erişim tarihi: (30-06-2015)
- [72] **Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
- [73] **Murao, S., Kanamoto, J. and Arai, M.** (1979). Isolation and identification of a cellulolytic enzyme producing microorganism. *J Ferment Technol.* ;57:151–156.
- [74] **Bailey, C. P., Manley, S. J., Watson, W.P., Wonnacott, S., Molleman, A. and Little, H.J.** (1998). Chronic ethanol administration alters activity in ventral tegmental area neurons after cessation of withdrawal hyperexcitability. *Brain Res*803: 144–152.
- [75] **Fossi, B. T., Tavea, F., Jiwoua, C. and Ndjouenkeu, R.** (2011). Simultaneous production of raw starch degrading highly thermostable α -amylase and lactic acid by *Lactobacillus fermentum* 04BBA19. *African Journal of Biotechnology* Vol. 10(34), pp. 6564-6574, 11 July,
- [76] **Fossi, B. T., Tavea, F., Fontem, L. A., Ndjouenkeu, R. and Wanji, S.** (2014). Microbial interactions for enhancement of α -amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens* 04BBA15 and *Lactobacillus fermentum* 04BBA19 *Biotechnology Reports* 4 99–106
- [77] **Giraud, E., Gosselin, L., Marin, B., Parada, J. L. and Raimbault, M.** (1993). Purification and characterization of an extracellular amylase from *Lactobacillus plantarum* strain A6. *Journal of Applied Bacteriology*, 75, 276-282

- [78] **Sanni, A. I., Guyot, J. M. and Guyot, J. P.** (2002). New efficient amylase-producing strains of *Lactobacillus plantarum* and *L. fermentum* isolated from different Nigerian traditional fermented foods. *International Journal of Food Microbiology* 72 53– 62
- [79] **Stamford, T.L.M., Stamford, N.P., Coelho, L.C.B.B. and Araujo, J.M.** (2001). Production and characterization of a thermostable α -amylase from *Nocardia* sp. endophyte of yam bean. *Bioresource Technology* 76 137±141
- [80] **Arikan, B.** (2008). Highly thermostable, thermophilic, alkaline, SDS and chelator resistant amylase from a thermophilic *Bacillus* sp. isolate A3-15. *Bioresource Technology* 99 3071–3076
- [81] **Asgher, M., Asad, M.J., Rahman, S.U. and Legge, R.L.** (2007). A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *Journal of Food Engineering* 79 950–955
- [82] **Liu, J., Xia, W., Abdullahi, A.Y., Wu, F., Ai, Q., Feng, D. and Zuo, J.** (2015). Purification and Partial Characterization of an Acidic α -Amylase from a Newly Isolated *Bacillus subtilis* ZJ-1 that may be Applied to Feed Enzyme. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 45:3, 259-267, DOI: 10.1080/10826068.2014.907184
- [83] **Kikani, B.A. and Singh, S.P.** (2012). The stability and thermodynamic parameters of a very thermostable and calcium-independent β -amylase from a newly isolated bacterium, *Anoxybacillus beppuensis* TSSC-1. *Process Biochemistry* 47 1791–1798
- [84] **Fossi, B.T. and Tavea, F.** *Application of Amylolytic Lactobacillus fermentum 04BBA19 in Fermentation for Simultaneous Production of Thermostable α -Amylase and Lactic Acid.* Chapter 27. <http://dx.doi.org/10.5772/50456>
- [85] **Poddar, A., Gachhui, R. and Jana, S.C.** (2012). Optimization of physico-chemical condition for improved production of hyperthermostable β amylase from *Bacillus subtilis* DJ5 J. *Biochem Tech* 3(4): 370-374
- [86] **Reddy, P.R.M., Swamy, M.V. and Seenayya, G.** (1998). Purification and characterization of thermostable β -amylase and pullulanase from high-yielding *Clostridium thermosulfurogenes* SV2. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, Vol 14,

- [87] **Kolawole, O. A., Ajele, O. J. and Sirdeshmukh, R.** (2011). Purification and characterization of alkaline-stable β -amylase in malted African finger millet (*Eleusine coracana*) seed. *Process Biochemistry* 46 2178–2186
- [88] **Adeyanju, M. M., Adetoro, A. O., Adeshakin, A. O., Kasumu, T., Mowoe, O., Famakinwa, O. A. and Lawal O.** (2012). Characterization of a thermostable *Bacillus subtilis* β -amylase isolated from decomposing peels of Cassava (*Manihot esculenta*). *Biokemistri Vol. 24 (1)23-30 June*
- [89] **Abu, T.F.A., Enujiugha, V.N., Sanni, D.M. and Bamidele, O.S.** (2014). Purification and characterisation of α -amylase from *bacillus subtilis* isolated from fermented african locust bean (*parkia biglobosa*) seeds. *int. j. lifesc. bt & pharm. res.* vol. 3, no. 4, october
- [90] **Li, X. and Yu, H-Y.** (2012). Purification and characterization of novel organic-solventtolerant β -amylase and serine protease from a newly isolated *Salimicrobium halophilum* strain LY20. *FEMS Microbiol Lett* 329 204–211 DOI: 10.1111/j.1574-6968.2012.02522.x
- [91] **Mukisa, I.M., Byaruhanga Y.B., Muyanji, C.M.B.K., Aijuk, M. Schüller, R.B., Sahlstrøm, S., Langsrud, T. and Narvhusa, J.A.** (2012). Influence of Cofermentation by Amylolytic *Lactobacillus plantarum* and *Lactococcus lactis* Strains on the Fermentation Process and Rheology of Sorghum Porridge. *Applied and Environmental Microbiology* p. 5220–5228 August 2012 Volume 78 Number 15
- [92] **Arikan, B.** (2008). Highly thermostable, thermophilic, alkaline, SDS and chelator resistant amylase from a thermophilic *Bacillus* sp. isolate A3-15. *Bioresource Technology* 99 3071–3076
- [93] **Akkaya, B., Yenidunya, A.F. ve Akkaya, R.** (2012). Production and immobilization of a novel thermoalkalophilic extracellular amylase from bacilli isolate *International Journal of Biological Macromolecules* 50 991– 995
- [94] **Dicko, M.H., Searle-van Leeuwen, M.J.F., Hilhorst, R. and Traore, A.S.** (2000). Extraction, partial purification and characterization of β -amylase from the bulbs of *G. Klattianus*. *Bioresource Technology* 73 183±185

- [95] **Okolo, N.B., Ire, F.S., Ezeogu, L.I., Anyanwu, U.C. and Odibo, J.C. F.** (2000). Purification and some properties of a novel raw starch-digesting amylase from *Aspergillus carbonarius*. *Journal of the Science of Food and Agriculture J Sci Food Agric* 81:329±336
- [96] **Mesbaha, M.N. and Wiegelb, J.** (2014). Halophilic alkali- and thermostable amylase from a novel polyextremophilic *Amphibacillus* sp. NM-Ra2 *International Journal of Biological Macromolecules* 70 222–229
- [97] **Stewart, Y. Ma, D.C., Eglinton, J.K., Logue, S. J., Langridge, P. and Evans, D.E.** (2000). Comparative Enzyme Kinetics of Two Allelic Forms of Barley (*Hordeum vulgare* L.) Beta-amylase. *Journal of Cereal Science* 31:335–344



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel bilgiler

Adı Soyadı	Samet KOCABAY
Doğum Yeri ve Tarihi	Reşadiye, 05.05.1989
Medeni Hali	Bekar
Yabancı Dil	İngilizce
İletişim Adresi	Cumhuriyet Üniversitesi Moleküler Biyoloji Ve Genetik Bölümü 58140 Sivas
E-posta Adresi	sametgenetik@hotmail.com

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise	Tokat Gazi Osman Paşa Lisesi, 2007
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, 2012
Yüksek Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, 2015

İş Tecrübesi

İnönü Üniversitesi	Araştırma Görevlisi, 2013
--------------------	---------------------------

Kongreler ve Bildiriler

Ulusal	Türk İmmünoloji Derneği Bölgesel Sempozyumları IX
Uluslararası	IX IUGEN Molecular Biology And Genetics Student Winter School