

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Deniz Kökenli *Bacillus* sp.'den Amilaz Enzim Üretilmesi,
Karakterizasyonu ve Antimikrobiyal Etkisinin Araştırılması**

Zainab SAFIEDDIN KARABELLİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Ekim, 2024

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZ ONAYI

**Deniz Kökenli *Bacillus* sp.'den Amilaz Enzim Üretilmesi,
Karakterizasyonu ve Antimikrobiyal Etkisinin Araştırılması**

Zainab SAFIEDDİN KARABELLİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Bu Yüksek Lisans Tezi 04/10/2024 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Değerlendirilmiş ve Oy Birliği / Oy Çokluğu ile Kabul Edilmiştir.

Jüri : Prof. Dr. Burhan ARIKAN (Danışman)
: Prof. Dr. Fuat BUDAK
: Prof. Dr. Osman KOLA

Bu Tez Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.

Tez No:

Prof. Dr. Sadık DİNÇER
Enstitü Müdürü

**Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FLY 2023 15681**

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

İÇİNDEKİLER

ÖZ	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR	III
ÇİZELGELER DİZİNİ	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	V
SİMGELER VE KISALTMALAR	VI
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>Bacillus</i> Cinsi	1
1.2. Nişasta	3
1.3. Mikrobiyal Enzimler	3
1.4. Tedavide Kullanılan Bazı Antibakteriyel Enzimler	4
1.4.1. Lizinler	5
1.4.2. Otolizinler	5
1.4.3. Lizozimler	5
1.4.4. Kolajenaz	6
1.4.5. L-asparaginaz	6
1.5. Amilazlar	6
1.5.1. α -Amilaz	8
1.5.2. β -Amilaz	8
1.5.3. γ -Amilaz	8
1.6. Amilaz Enzimin Bazı Endüstriyel Uygulamaları	8
1.6.1. Nişasta Endüstrisinde Kullanım	9
1.6.2. Gıda Endüstrisinde Kullanım	9
1.6.3. Kâğıt Endüstrisinde Kullanım	10
1.6.4. Deterjan endüstrisi	10
1.6.5. Tekstil Endüstrisinde	10
1.6.6. Alkol Üretiminde	11
1.7. Elektroforez	11
1.7.1. Doğal (Native) Jel Elektroforezi	11
1.7.2. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)	11
1.8. Kromatografi	12
1.9. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)	13
1.10. Çalışmanın Amacı	14
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	15
3. MATERYAL VE METOT	19

3.1. Materyal	19
3.1.1. Bakteri İzolasyonu ve Tanımlamasında Kullanılan Besiyerleri	19
3.1.2. Kullanılan Çözeltiler	20
3.1.3. Enzimin Alt Ünite Tayininde Kullanılan Çözeltiler	22
3.1.4. SDS-PAGE İşleminde Kullanılan Solüsyonlar	23
3.1.5. İnce Tabaka Kromatografisi Solüsyonları	26
3.2. Metod	27
3.2.1. Bakteri İzolasyonu ve İdentifikasyonu	27
3.2.2. Enzim Aktivitelerinin Saptanması	27
3.2.3. SDS-PAGE Elektroforez Yöntemi ile Moleküler Ağırlığın Saptanması ve Zimogram Analizi	33
3.2.4. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) Plakalarının Hazırlanması ve Enzim-	
3.2.5. Amilaz Enziminin Antibakteriyel Aktivitesinin Tayini	35
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	37
4.1. Bakteri İzolasyonu ve İdentifikasyonuna Ait Bulgular	37
4.1.1. Deniz suyundan <i>Bacillus</i> sp. Suşlarının İzolasyonu	37
4.1.2. Bakteri İdentifikasyonu Sonuçları	37
4.2. Katı Besiyerinde Üreyen ve Enzim Sentezi Gerçekleştiren Bakteri Suşlarının Sıcaklık ve pH Aralığının Belirlenmesine Ait Bulgular	38
4.3. Amilaz Enziminin Aktivite Analizleri	40
4.3.1. Amilaz enziminin katı besiyerindeki aktivitesine dair elde edilen sonuçlar	40
4.3.2. Protein Konsantrasyonlarının Saptanması	40
4.3.3. Glukoz Kalibrasyon Grafiği ve Enzim Aktivite Analizleri	42
4.4. Enzimlerin Karakterizasyonuna İlişkin Sonuçlar	42
4.4.1. Amilaz Enziminin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Aralığının Belirlenmesine Ait Sonuçlar	42
4.4.2. Amilaz Enziminin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Değerinin Saptanmasına Ait Bulgular	44
4.4.3. Amilaz Enziminin pH Stabilesinin Saptanmasına Ait Bulgular	46
4.4.4. Amilaz Enziminin Termal Stabilesinin Belirlenmesine Ait Bulgular	47
4.4.5. Amilaz Enzimi Aktivitesi Üzerine İnhibitör, Şelatör, Metal İyonu, Deterjan ve Okside edici Ajanların Etkisinin Saptanmasına Ait Sonuçlar	49
4.4.6. Farklı NaCl'ün Konsantrasyonlarının Amilaz enziminin Aktivitesine Etkisinin Saptanmasına Ait Sonuçlar	52
4.4.7. SDS-PAGE Yöntemi ile Moleküler Ağırlığının Saptanmasının ve Zimogram Analizine Ait Bulgular	54

4.4.8. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) ile Hidroliz Ürünlerin Saptanmasına Ait	
Sonuçlar	55
4.5. Bakteri ve Enzimin Antibakteriyel etkinliğinin saptanmasına Ait Bulgular	57
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	59
KAYNAKLAR	63
ÖZGEÇMİŞ	71



Deniz Kökenli *Bacillus* sp.'den Amilaz Enzim Üretilmesi ve Antimikrobiyal Etkisinin Araştırılması

Zainab SAFIEDDIN KARABELLİ

Danışman: Prof. Dr. Burhan ARIKAN

Biyoloji Anabilim Dalı

ÖZ

Bu çalışmada Mersin ve Karataş deniz kökenli izole edilen *Bacillus* sp. suşlarından elde edilen amilaz enziminin izolasyonu ve karakterizasyonu yapılmıştır. Araştırmada, enzimin optimum sıcaklık ve pH koşulları, pH ve sıcaklık kararlılığı, farklı kimyasalların enzim aktivitelerinin sonuçları belirlenmiş, SDS-PAGE zimogram ve ince tabaka kromatografisi analizleri gerçekleştirilmiş ve ZB28 amilaz enziminin antimikrobiyal aktivitesini araştırılmıştır.

Bacillus sp. ZB28 suşuna ait amilaz enziminin SDS-PAGE zimogram analizinde 272, 160, 124, 74 ve 68 kDa ağırlıklarda beş farklı aktivite bölgesi belirlenmiştir. Enzimin pH 9.0 ve 60°C'de en yüksek aktivite göstermiştir.

Bacillus sp. ZB28 amilaz enziminin pH 6'da %99, pH 7'de ise %97 aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu bulgular, enzimin hafif asidik ve nötr pH koşullarında neredeyse tüm aktivitesini koruduğunu tespit edilmiş. ZB28 amilaz enzimi, 60 dakika süren ön inkübasyon işleminin ardından 0°C-60°C aralığında orijinal aktivitesinin %97.42'sini koruyarak yüksek stabilite sahipken NaCl'ün varlığında genel olarak düşük aktivite göstermektedir. Zn²⁺, EDTA ve SDS gibi inhibitörler enzimi büyük ölçüde inhibe ederken, β-merkaptopetanol ile aktivitesi artmıştır.

Spesifik aktivite analizlerine göre, *Bacillus* sp. ZB28 suşunun 10.31 U/mL enzim ürettiği belirlenmiştir. Protein miktarı tayini sonucunda ise, *Bacillus* sp. ZB28 amilaz enziminin protein konsantrasyonu 0.003 mg/mL olarak tespit edilmiştir.

İnce tabaka kromatografisi analizi sonucunda nişasta moleküllerini glikoz, maltoz ve maltotrioz gibi oligosakkaritlere dönüştürmesi saptanmış ve kısmi saflaştırılmış *Bacillus* sp. ZB28 amilaz enzimi, *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* 'ye karşı antibakteriyel aktivite gösterirken, *Campylobacter jejuni* ve *Pseudomonas aeruginosa* üzerinde sınırlı etki göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Antibakteriyel, Amilaz, *Bacillus* sp., Enzim aktivitesi.

**Marine *Bacillus* sp. Enzyme Production of Amylase and
Investigation of its Antimicrobial Effect**

Zainab SAFIEDDIN KARABELLİ

Advisor: Prof. Dr. Burhan ARIKAN

Department of BIOLOGY

ABSTRACT

In this study, *Bacillus* sp. isolated from Mersin and Karataş marine origin. The amylase enzyme obtained from the strains was isolated and characterized. In the research, optimum temperature and pH conditions of the enzyme, pH and temperature stability, results of enzyme activities of different chemicals were determined, SDS-PAGE zymogram and thin layer chromatography analyzes were performed and the antimicrobial activity of the ZB28 amylase enzyme was investigated.

Bacillus sp. In the SDS-PAGE zymogram analysis of the amylase enzyme of the ZB28 strain, five different activity regions with weights of 272, 160, 124, 74 and 68 kDa were determined. The enzyme showed the highest activity at pH 9.0 and 60°C.

Bacillus sp. It was observed that the ZB28 amylase enzyme showed 99% activity at pH 6 and 97% activity at pH 7. These findings showed that the enzyme retained almost all its activity in slightly acidic and neutral pH conditions. While the ZB28 amylase enzyme has high stability, preserving 97.42% of its original activity in the range of 0°C-60°C after a pre-incubation process lasting 60 minutes, it generally shows low activity in the presence of NaCl. While inhibitors such as Zn²⁺, EDTA and SDS largely inhibited the enzyme, its activity increased with β-mercaptoethanol.

According to specific activity analyses, *Bacillus* sp. It was determined that the ZB28 strain produced 10.31 U/mL enzyme. As a result of protein amount determination, *Bacillus* sp. The protein concentration of ZB28 amylase enzyme was determined as 0.003 mg/mL. As a result of thin layer chromatography analysis, it was determined that it converts starch molecules into oligosaccharides such as glucose, maltose and maltotriose, and partially purified *Bacillus* sp. While ZB28 amylase enzyme showed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, it had limited effect on *Campylobacter jejuni* and *Pseudomonas aeruginosa*.

Keywords: Antibacterial, Amylase, *Bacillus* sp., Enzyme activity.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitim ve öğretim süresince bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, sabrını, hoşgörüsünü ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, bana devamlı yol gösteren ve her zaman destek olan, tez danışmanım Sayın Hocam, Prof. Dr. Burhan ARIKAN'a,

Bu tez çalışmasının önemli bir kısmının planlanmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, çok değerli hocam Arş. Gör. Dr. Nihan ARABACI'ya,

Çalışmam sırasında çok desteğini gördüğüm değerli Dr. Tuna KARAYTUĞ'a,

Tez çalışmalarında kullanılan patojen bakteri türlerinin teminini sağlayan Arş.Gör. Fatıma MASUME USLU ve doktora öğrencisi Esra YİĞİTTEKİN'e

Eğitim ve öğretim hayatım boyunca üzerimde emeği olan, sevgili ve kıymetli TÜM ÖĞRETMENLERİM'e,

Emeği ve anlayışı sayesinde bu tezi tamamlayabildim, her zaman gösterdiği sabır ve destekleri için eşim Salih KARABELLİ'ye,

Ayrıca öğrenim hayatım boyunca sevgilerini ve maddi, manevi desteklerini her zaman hissettiğim, bana her zaman inandıkları ve hep en iyisi için çabalamama teşvik ettikleri için sevgili AİLEM'e,

Sonsuz şükran ve teşekkürlerimi sunarım.

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Amilazların uygulama alanları	9
Çizelge 3.1. N1 Besi Yerinin İçeriği	19
Çizelge 3.2. M9 Besi Yerinin İçeriği.....	19
Çizelge 3.3. Lügol Solüsyonunun İçeriği	20
Çizelge 3.4. Fosfat Tamponunun İçeriği	21
Çizelge 3.5. Glisin-NaOH Tamponunun İçeriği.....	21
Çizelge 3.6. Borax-NaOH Tamponunun İçeriği.....	22
Çizelge 3.7. A Solüsyonun İçeriği.....	23
Çizelge 3.8. B Solüsyonun İçeriği.....	23
Çizelge 3.9. C Solüsyonun İçeriği.....	23
Çizelge 3.10. Örnek Yükleme Tamponun İçeriği	24
Çizelge 3.11. Elektroforez Tamponun İçeriği.....	25
Çizelge 3.12. Staining Solüsyonun içeriği	25
Çizelge 3.13. Destaining Solüsyonun içeriği	25
Çizelge 3.14. BSA Kalibrasyon Grafiğinin Hazırlanması	29
Çizelge 3.15. Glukoz Kalibrasyon Grafiğinin Hazırlanması	30
Çizelge 3.16. Ayırıcı Jelin Bileşimi (%10'luk).....	33
Çizelge 3.17. Dengeleyici Jelin Bileşimi	34
Çizelge 4.1. <i>Bacillus</i> sp. ZB28 bakterisinin 40°C'de ve farklı pH aralıklarında M9 nişasta içeren katı besiyerinde oluşan koloni ve aktivite zon çapları incelenmiştir.....	38
Çizelge 4.2. <i>Bacillus</i> sp. ZB28 suşundan üretilen amilaz enziminin en uygun pH değeri	43
Çizelge 4.3. <i>Bacillus</i> sp. ZB28 suşundan üretilen amilaz enziminin en iyi sıcaklık değeri	44
Çizelge 4.4. <i>Bacillus</i> sp. ZB28 amilaz enziminin pH stabilitesine ait Bulguları.....	46
Çizelge 4.5. <i>Bacillus</i> sp. ZB28 suşunda üretilen amilaz enziminin sıcaklık stabilite Bulguları	48
Çizelge 4.6. İnhibitör, şelatör, metal iyonları ve deterjanların etkilerine ait bulgular.....	50
Çizelge 4.7. Farklı NaCl konsantrasyonlarının amilaz enzimi aktivitesi üzerine etkileri	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 <i>Bacillus</i> sp.'nin ışık mikroskopundaki görüntüsü	2
Şekil 1.2. <i>Bacillus</i> sp.'nin elektron mikroskopundaki görüntüsü	2
Şekil 1.3. İnce Tabaka Kromatografisi	14
Şekil 4.1. <i>Bacillus</i> sp. ZB28 Suşunun Gram Boyamasına Ait Mikroskop.....	37
Şekil 4.2. <i>Bacillus</i> sp. ZB28 suşu Katalaz testi sonucu.....	37
Şekil 4.3. <i>Bacillus</i> sp. ZB28 suşunun 40°C'de pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 ve 11.0 değerlerine sahip katı besiyerindeki koloni ve aktivite zon çapları.....	39
Şekil 4.4. <i>Bacillus</i> sp. ZB28 suşunun M9 nişasta katı besiyerinde Amilolitik aktivitesi.....	40
Şekil 4.5. ZB28 Suşundan Kısmi Saflaştırma ile Elde Edilen Enzim Çözeltilisinin M9 Agar Ortamında Gerçekleştiği Hidroliz zonu.....	40
Şekil 4.6. BSA Kalibrasyon Grafiği.....	41
Şekil 4.7. Glukoz Kalibrasyon Grafiği.....	42
Şekil 4.8. <i>Bacillus</i> sp. ZB28 enziminin en iyi aktivite sağladığı pH değeri ve aralığı.....	43
Şekil 4.9. <i>Bacillus</i> sp. ZB28 amilaz enziminin en iyi aktivite sağladığı sıcaklık değeri ve aralığı..	45
Şekil 4.10. <i>Bacillus</i> sp. ZB28 amilaz enziminin pH stabilite bulguları	47
Şekil 4.11. <i>Bacillus</i> sp. ZB28 amilaz enziminin sıcaklık stabilite bulguları.....	49
Şekil 4.12. <i>Bacillus</i> sp. ZB28 amilaz enzimi üzerine inhibitör, şelatör, metal iyonu, deterjan ve okside edici ajanların etkisine ait sonuçlar	51
Şekil 4.13. Farklı NaCl konsantrasyonlarının amilaz enzimi aktivitesine etkisi.....	53
Şekil 4.14. Zimogram analizinden ZB-28 Amilaz enziminin aktivite bantlarının görüntüsü ve moleküler ağırlıkları	54
Şekil 4.15. ZB-28 amilaz enziminin ince tabaka kromatografisi (TLC) görüntüsü.	56
Şekil 4.16. Amilaz Enzimin Antimikrobiyal Aktivitenin Sonuçları	57

SİMGELER VE KISALTMALAR

AMPS	: Amonyum Persülfat
BaCl ₂	: Baryum Klorür
BSA	: Bovine Serum Albümin
CaCl ₂	: Kalsiyum Klorür
CaCl ₂ .2H ₂ O	: Kalsiyum Klorür Dihidrat
dH ₂ O	: Distile su
DNS	: Dinitro Salisilik Asit
EDTA	: Etilen Diamino Tetra Asetik Asit
I	: İyot
kDa	: Kilo dalton
KH ₂ PO ₄	: Mono Potasyum Fosfat
KI	: Potasyum İyodür
M	: Molar
mA	: Miliamper
mg	: Miligram
MgSO ₄ .7H ₂ O	: Magnezyum Sülfat Heptahidrat
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
Na ₂ HPO ₄	: Disodyum Fosfat
NaCl	: Sodyum Klorür
NaH ₂ PO ₄	: Sodyum Dihidrojen Fosfat
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NH ₄ Cl	: Amonyum klorür
OD	: Optik Dansite
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PGA	: Poliglikolik Asit
PMSF	: Fenil metil sülfonil florid
rpm	: Dakikada devir sayısı
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
sp.	: Species (tür, tekil)
TEMED	: N,N,N,N-Tetrametil etilendiamin
TLC	: Thin Layer Chromatography
Tris	: 2-Amino-2-Hidroksimetilpropan-1,3-diol
β-Merk.	: β-Merkaptoetanol

U : Ünite
U/mg : Ünite/miligram
U/mL : Ünite/mililitre
UV : Ultraviyole
v:v : Hacim : Hacim
w:v : Ağırlık : Hacim
ZnCl₂ : Çinko Klorür
µL : Mikrolitre
µmol : Mikromol



1 GİRİŞ

Mikroorganizmaların biyokatalitik potansiyeli, bileşenlerinin biyokimyasal temelleri tam olarak anlaşılmadan yüzyıllardır ekmek, şarap, sirke ve diğer yaygın ürünlerin üretiminde kullanılmıştır. Mikrobiyal enzimler, bitki ve hayvan enzimlerine kıyasla daha yüksek kararlılık, daha iyi katalitik aktivite ve üretim ile optimizasyon kolaylıkları sunduklarından, endüstri ve tıpta yaygın olarak kullanılmakta ve bu yüzden büyük ilgi görmektedir. Azaltılmış işleme süresi, düşük enerji tüketimi, maliyet etkinliği, toksik olmama ve çevre dostu özellikleri nedeniyle enzim kullanımı, gıda, tarım, kimya ve ilaç gibi çeşitli endüstrilerde hızla yaygınlaşmaktadır. Mikrobiyal enzimler, endüstriyel ve evsel atıklardaki toksik kimyasal bileşenleri (fenolik bileşikler, nitritler, aminler vb.) bozunma veya dönüşüm yoluyla etkili bir şekilde parçalayabilir (Raveendran ve ark., 2018).

Uygun koşullar sağlandığında, enzimler doğal ortamlarının dışında da etkili olabildikleri için birçok alanda faydalanma imkânı sunar. Ayrıca, enzimler maliyetleri önemli ölçüde düşürdüklerinden, gıda, yem, tarım, kâğıt, deri ve tekstil gibi çeşitli endüstrilerde yeni uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Beilen ve Li 2002).

Son birkaç on yılda, mikrobiyal enzimlerin biyoproseslerdeki kullanımı, yüksek katalitik aktiviteleri ve kararlılıkları sayesinde hızla yaygınlaştı. Mikroorganizmalardan üretilen enzimler dünya çapında izolasyon, saflaştırma, karakterizasyon ve uygulamalar açısından kapsamlı şekilde incelenmiştir. Mikrobiyal enzimler, gıda, ilaç ve biyoteknoloji endüstrileri gibi çeşitli alanlarda geniş bir uygulama yelpazesine sahiptir. Ticari olarak, bakteri ve mantarlardan elde edilen pek çok rekombinant enzim, çeşitli biyoproseslerde kullanılmaktadır. Ayrıca, metagenomik ve genomik gibi modern teknikler, katalitik özelliklerin moleküler düzeyde daha da geliştirilmesine olanak tanıyarak yeni mikrobiyal enzimlerin keşfedilmesini sağlar (Singh ve ark., 2016).

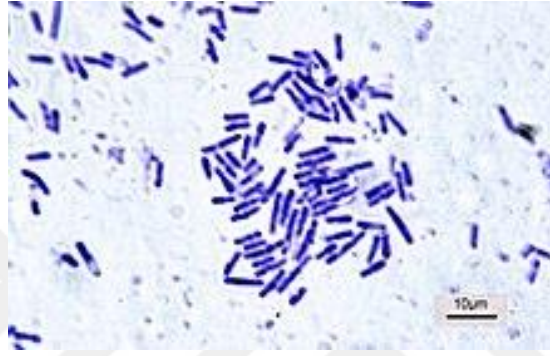
Amilazlar, en önemli ve en eski endüstriyel enzimlerden biri olup nişasta moleküllerini dekstrinler gibi çeşitli ince ürünlere hidrolize eden hidrolazlardır ve giderek daha küçük glikoz polimerleri üretirler. Büyük amilaz dizileri, nişastanın tamamen parçalanmasında görev yapar. Ancak, en çok talep gören α -amilazlar, molekülün iç kısmındaki α -1,4 glikozidik bağları hidrolize eder (Gupta ve ark., 2003).

1.1 *Bacillus* Cinsi

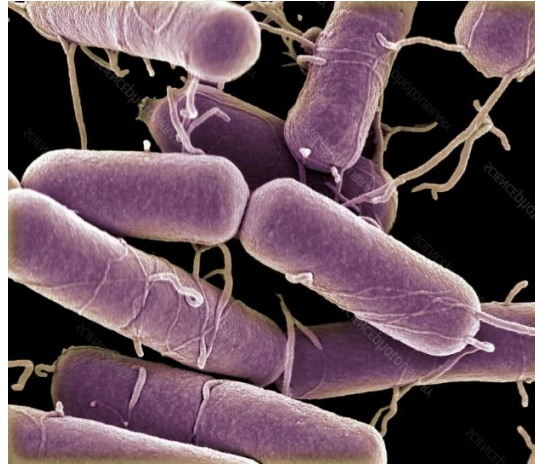
Bacillus cinsi, *Bacillaceae* familyasına ait Gram pozitif (bazı türlerinde değişken) bakterilerdir ve genellikle aerobik veya fakültatif anaerobik özellikler gösterirler. Çubuk şeklinde olup, spor oluşturan bu bakteriler genellikle mezofilik olup, bazı türleri psikrotrofik ve termofilik özellikler de gösterebilir. Endospor oluşturma yeteneğine sahip bu bakteriler, Vejetatif hücreler, boyutları $0,5 \times 1,2 \mu\text{m}$ ile $2,5 \times 10 \mu\text{m}$ arasında değişen, uçları yuvarlak ya da kare olan yapılardır. Ortamda bazen çiftler halinde ya da zincir şeklinde bir araya gelebilirler. *Bacillus* cinsine ait bakterilerin koloni morfolojisi oldukça çeşitlilik gösterir. Genellikle beyaz veya krem renkli

koloniler oluştururlar, ancak bazı türlerde sarı, pembe, turuncu ve siyah pigmentli kolonilere de rastlanabilir (Kalaylı ve Beyatlı, 2003).

Bacillus bakterileri peritrik z kam ıllara sahip olup, bu nedenle hareketlidirler. Tüm türleri endospor oluşturur ve endosporlar oval, yuvarlak veya silindirik olabilir. *Bacillus*'lar birçok zorlu koşula karşı yüksek direnç gösterir ve sıcaklık, pH ve tuzluluk gibi çevresel faktörlere karşı toleransları yüksektir. Gelişebildikleri minimum sıcaklık aralığı 25  C ile 75  C arasında değişir. Genellikle katalaz pozitif olan bu bakteriler, kemoorganotrofi metabolizması gösterir ve hem fermentatif hem de oksijenli solunum yapabilirler. Kolayca kültüre edilebilirler ve yapısal olarak heterojenlik göstermezler (Holt ve ark., 1994).



şekil 1.1. *Bacillus* sp.'nin ışık mikroskopundaki görüntüsü
https://en.wikipedia.org/wiki/Bacillus_subtilis_Gram.jpg 23.07.2023



şekil 1.2. *Bacillus* sp.'nin elektron mikroskopundaki görüntüsü
<https://www.sciencephoto.com/media/996366/view/bacillus-subtilis-sem.jpg> 23.07.2023

Bacillus türleri, özellikle proteolitik enzimler ve karbohidrazlar açısından önemli bir kaynaktır. Endüstriyel uygulamalarda büyük öneme sahip olan *Bacillus amyloliquefaciens*, 1943 yılında Japon araştırmacı Fukumoto tarafından toprakta keşfedilmiştir. Bu bakteriye, sıvılaştırıcı amilaz üretme yeteneğinden dolayı ismi verilmiştir. *Bacillus amyloliquefaciens*'ten elde edilen ürünler arasında doğal antibiyotik olan barnase proteini, deterjan sanayisinde kullanılan proteaz

subtilisin, DNA araştırmalarında kullanılan BamH1 restriksiyon enzimi ve nişasta hidrolizi için kullanılan α -amilaz enzimi yer alır (Priest ve ark., 1987).

Yaklaşık elli tre sahip olan *Bacillus* cinsinde, endosporun hücre içindeki konumu değişkenlik gösterebilir; spor hücrenin merkezinde ya da u kısımlarında bulunabilir. Endospor, vejetatif hücreden daha dar veya daha geniş olabilir. *Bacillus* türleri, şekerleri fermente ederek asit üretirler, bu süreçte gaz oluşumu gözlemlenmez. Proteinleri amonyak üretimi eşliğinde parçalayarak kokuşmaya neden olurlar. Bu türler, Nutrient Agar, Trypticase Soy Agar, Brain Heart Infusion ve Kanlı Agar gibi besiyerlerinde etkili bir şekilde rerler. Ayrıca, organik asitler, şekerler ve alkol içeren karbon kaynakları ile amonyum içeren nitrojen kaynakları içeren sentetik ortamlarda da başarılı bir şekilde gelişirler (Kalkan ve Halkman, 2006).

1.2 Nişasta

Bitkiler, güneş işığından gelen enerjiyi kimyasal enerjiye dönüştüren fotosentez süreci sonucunda nişasta üretir. Nişasta, karanlık dönemlerde solunum için bir depolama bileşiği olarak yapraklardaki plastidlerde sentezlenmektedir. Ayrıca, uzun süreli bir depolama bileşiği olarak yumrularda, tohumlarda ve köklerde bulunan amiloplastlarda da sentezlenir. Bu son organellerde, büyük miktarlarda nişasta suda çözünmeyen granüller halinde birikir (Robyt, 1998; Hazaa, 2018).

Nişasta, C1 oksijeni aracılığıyla birbirine bağlı glikoz birimlerinden oluşan bir polimerdir ve bu bağ glikozidik bağ olarak bilinir. Bu glikozidik bağ, yüksek pH'ta kararlıdır fakat düşük pH'ta hidrolize olur. Polimerik zincirin sonunda gizli bir aldehit grubu bulunur ve bu grup indirgeyici u olarak adlandırılır. Nişasta, iki tip glikoz polimerinden oluşur: (i) amiloz ve (ii) amilopektin. Amiloz, 6000'e kadar glikoz biriminden oluşan ve α ,1-4 glikozidik bağları içeren doğrusal bir polimerdir. Polimerizasyon derecesi (DP) olarak da bilinen glikoz kalıntılarının sayısı, kaynağa bağlı olarak değişir. Örneğin, patates veya manyok nişastasından elde edilen amilozun DP değeri 1000-6000 arasında değişirken, mısır veya buğday amilozunun DP değeri 200-1200 arasında değişmektedir. Nişastaların ortalama amiloz içeriği %0 ile %75 arasında değişebilir, fakat tipik olarak %20-25 civarındadır. Amilopektin, 10-60 glikoz ünitesinden oluşan kısa α ,1-4 bağlı doğrusal zincirler ile 15-45 glikoz ünitesinden oluşan α ,1-6 bağlı yan zincirlerden oluşur. Amilopektindeki dallanma noktalarının ortalama sayısı %5'tir. Tam bir amilopektin molekülü ortalama olarak yaklaşık 2.000.000 glikoz nitesi içerir ve bu nedenle doğadaki en büyük moleküllerden biridir (John, 1987; Tatar 2007).

1.3 Mikrobiyal Enzimler

Mikrobiyal kaynakların mevcut olması, bu enzimlerin geliştirilmesini büyük ölçüde mümkün kılmıştır. Mikroorganizmalar, ekonomik olarak retilbildikleri ve genetik olarak iyileştirilmeye uygun oldukları için büyük ilgi görmektedir. Mikrobiyal enzimler, birçok bitki ve hayvan enziminin yerini almıştır. Gıda, içecek, ilaç, deterjan, tekstil, deri, kimyasallar, biyoyakıt,

hayvan yemi, kişisel bakım, kâğıt hamuru, teşhis ve tedavi gibi birçok endüstride kullanım alanı bulmuştur (Sanchez ve Demain, 2017).

Genomik ve metagenomik gibi yeni moleküler yöntemler, mikroplardan yeni enzimlerin keşfi için kullanılmaktadır. Rekombinant DNA teknolojisinin gelişimi, enzim üretim seviyelerinde büyük bir etkiye sahip olmuş ve endüstriyel açıdan önemli mikrobiyal, bitki ve hayvan enzimlerinin aşırı üretimini mümkün kılmıştır. Dünya enzim pazarının %50-60'ının rekombinant enzimler tarafından karşılandığı tahmin edilmektedir (Singh ve ark, 2016).

Endüstriyel enzimlerin yaklaşık %90'ı mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir. Bunun başlıca nedenleri, mikrobiyal enzimlerin daha yüksek katalitik aktiviteye sahip olmaları, dayanıklılıklarının yüksek olması, ekonomik olarak avantaj sağlamaları, toksik etki yaratmamaları ve büyük miktarlarda üretilibilmeleridir. Ayrıca, birçok mikrobiyal enzimin *Bacillus* türleri ve alt türleri tarafından sentezlendiği bilinmektedir, bu da bu bakterilerin doğada yaygın bir şekilde bulunmalarını sağlar. 1970'lerden bu yana, endüstriyel α -amilaz üretiminde *B. subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. stearothermophilus* ve *B. licheniformis* gibi *Bacillus* türleri kullanılmaktadır (Ortakaya ve Ağuloğlu Fincan, 2019).

1.4 Tedavide Kullanılan Bazı Antibakteriyel Enzimler

İnsan hastalıklarıyla mücadele için terapötik ajanların belirlenmesi ve geliştirilmesi uzun yıllardır araştırmanın ana odak noktası olmuştur. Biyoteknolojideki son ilerlemeler, enzimlerin biyofarmasötik olarak kullanılma potansiyelini artırmıştır. Enzimler, biyofarmasötikler olarak yüksek substrat özgüllüğü ve afinitesi, düşük toksisite ile etkili kataliz ve minimum yan etki gibi avantajları sağlamaktadır (Vachher ve ark., 2021).

Tedavi amaçlı kullanılan antibakteriyel enzimleri açıklamak istediğimiz zaman ilk önce enzibiyotikler terimi tanımlamakla başlanır. Enzibiyotikler bakteriyel hücre duvarlarını hedef alan ve onları yok eden enzim tabanlı antibiyotiklerdir. Bu enzimler, özellikle bakteriyel hücre duvarındaki peptidoglikan gibi yapısal bileşenleri parçalayarak bakteriyel hücrelerin ölümüne neden olur. Enzibiyotikler, bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılan bir antibiyotik sınıfıdır ve şu özelliklere sahiptir:

1. Hedef Seçicilik: Enzibiyotikler genellikle bakteriyel hücre duvarının belirli bileşenlerini hedef alır, bu da onları diğer hücre türlerinden ayırır ve yan etkileri minimize eder.

2. Doğal ve Sentetik Kaynaklar: Enzibiyotikler hem doğal kaynaklardan (örneğin, bazı bakteriler ve mantarlar) hem de sentetik olarak laboratuvar ortamında üretilir.

3. Kullanım Alanları: Enzibiyotikler, özellikle antibiyotiklere dirençli bakterilere karşı etkili olabilecekleri için önemli bir tedavi seçeneği olarak araştırılmaktadır.

Enzibiyotikler, antibiyotiklerin etkinliğini artırmak ve antibiyotik direncini azaltmak amacıyla gelişen bir araştırma alanı olarak öne çıkmaktadır (Dams ve Briers, 2019; Kaur ve ark., 2020).

1.4.1 Lizinler

Lizinler veya endolizinler (EC 3.2.1.17), Gram pozitif bakterileri enfekte eden çift sarmallı DNA bakteriyofajları tarafından kodlanan enzimlerdir. Genellikle bir hücre duvarı bağlayıcı alan (CBD) ve bir katalitik alan içeren tek bir polipeptit zincirinden oluşurlar. Bu iki alan, esnek bir bağlayıcı ile birbirine bağlıdır. Peptidoglikan tabakasını ayrıştırarak peptidoglikan hidrolaz olarak işlev görürler. Fajın litik döngüsü sırasında, enfekte olmuş bakterilerde doğal olarak üretilir ve holinler tarafından oluşturulan zar hasarları yoluyla peptidoglikan tabakasına yayılır. Sonrasında, peptidoglikanı keserek bakteriyi yok eder ve yeni fajların salınımını sağlar.

Endolizinler, özellikle antibiyotiklere dirençli bakterilere karşı etkili olmaları nedeniyle, yeni ilaç preparatlarının geliştirilmesinde kullanılmaktadır. Klinik araştırmalar, enzibiyotiklerin enfeksiyonları tedavi etme potansiyelini değerlendirmektedir (Borysowski ve ark., 2006; Diez-Martinez ve ark., 2015).

1.4.2 Otolizinler

Otolizinler veya N-asetilmuramoil L-alanin amidazlar (EC 3.4.24.38), bakteriyel hücre duvarındaki peptidoglikan tabakasının N-asetilmuramik asit ve L-alanin arasındaki amid bağına kesen ve üretici bakteri hücresinin kendisi üzerinde etkili olan bir enzim türüdür. Bu enzimler, bakteriyel hücre duvarının dönüşümü ve olgunlaşması gibi kritik bakteriyel süreçlerle ilişkilidir. Potansiyel enzimbiyotikler olarak, bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılma olasılığı vardır.

Peptidoglikan hidrolazlar olarak işlev görebilen çeşitli enzimler arasında, bakteriyofaj kodlu otolizinler, bakteriyel amidazlar, ökaryotik glutatyonilspesmidin amidaz, NLP-/P60 ailesi proteinleri ve glutamil L-diamino endopeptidazlar bulunur. Bu enzimler, korunan amidaz motiflerini içerir. Antibakteriyel özellik gösteren ilk otolizin, Streptococcus pneumoniae suşlarından elde edilen LytA amidazıdır (Xu ve ark., 2020).

1.4.3 Lizozimler

Lizozimler veya β -1,4-N-asetilmuramidazlar (EC 3.2.1.17) peptidoglikan tabakasındaki N-asetilmuramik asit ve N-asetilglukozamin arasındaki β -1,4 glikozidik bağlarını spesifik olarak keser. Bu bağları hidrolize ederek bakteriyel hücre duvarının bütünlüğünü bozarak hücrenin ölümüne neden olurlar. Lizozimler genellikle 129 amino asitten oluşan ve yüzeyinde derin bir yarık bulunan kompakt, küresel bir protein yapısına sahiptir. Bu yapısal özellikleri, bakteriyel hücre duvarındaki peptidoglikan alt birimlerinin enzimle etkileşimini ve kesilmesini kolaylaştırır. Lizozimler çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilir ve ayrıca hayvan vücut sıvılarında, örneğin tükürükte,

gözyaşında ve yumurta akında bulunur. Lizozimler, bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmekte ve mikrobiyal kontrol uygulamalarında kullanılabilir (Pushkaran ve ark., 2015; Vachher ve ark., 2021).

1.4.4 Kolajenaz

Kolajenaz, kollajen proteinlerinin yapısındaki peptid bağlarını keserek kollajeni parçalar. Kollajen, bağ dokularında bulunan ve hücreleri destekleyen bir protein olduğundan, kolajenaz bu proteinin yapısını bozarak mikroorganizmaların etkilerini sınırlamada önemli bir rol oynar. Genellikle metaloproteaz sınıfına ait bir enzimdir ve yapısında çinko gibi metal iyonları içerir. Bu metal iyonları, enzimin aktif bölgesinde bulunarak kollajen molekülüne bağlanmasını ve kesilmesini sağlar. Kolajenazlar, çeşitli kaynaklardan elde edilebilir olmasına rağmen en yaygın olarak *Clostridium histolyticum* gibi bakterilerden üretilir. Ayrıca, bazı hayvan dokularından ve mikroorganizmaların kültürlerinden de elde edilebilir. Kolajenazlar, özellikle travmatik cerrahi işlemler ve yanık tedavilerinde kullanılır. Ayrıca, kolajenazlar, bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde, yara iyileşmesini hızlandırmak ve ölü dokuları temizlemek için de kullanılır. Ayrıca, kolajenazlar, kozmetik endüstrisinde de cilt bakım ürünlerinde kullanılabilir (Pal ve Suresh, 2016; Pequeno ve ark., 2019).

1.4.5 L-asparaginaz

L-asparaginaz, (L-asparagin amidohidrolaz, EC 3.5.1.1) l-asparagin amino asidini amonyak ve asparat bileşenlerine parçalar. Bu işlem, bakteriyel hücrelerin büyümesi ve çoğalması için gerekli olan l-asparagin azalmasına neden olur. Özellikle, l-asparaginaz, l-asparagini bitirerek bakteriyel hücrelerin hayatta kalmasını engeller ve bakteriyel enfeksiyonların kontrol altına alınmasına yardımcı olur. L-asparaginaz iki alt birimden oluşan bir tetramer yapıdadır. Enzim, l-asparagini hidrolize edebilmesi için aktif bölgelerinde belirli bir yapısal düzenlemeye sahiptir. L-asparaginaz çeşitli bakterilerden, özellikle *Escherichia coli* ve *Erwinia chrysanthemi* gibi patojenik bakterilerden üretilir. Ayrıca, bu enzim laboratuvar ortamında rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak da üretilir. L-asparaginaz, genellikle kanser tedavisinde kullanılır. Özellikle lösemi tedavisinde, kanser hücrelerinin l-asparagin üretimini engelleyerek onların ölümüne neden olur. Bu özelliği, l-asparaginazı kanser tedavisinde etkili bir araç yapar. Ayrıca, bazı bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde ve biyoteknolojik uygulamalarda da kullanılabilir (Baruch ve ark., 2014; Vimal ve Kumar, 2018).

1.5 Amilazlar

Uluslararası Biyokimya Birliği'ne göre, α -amilaz eter hidrolaz grubunda sınıflandırılır ve α -1,4 glukanglukanohidrolaz (E.C.3.2.1.1) olarak adlandırılır. Hidrolaz enzimleri, C-O, C-N, C-C ve fosforik anhidrit bağları gibi belirli bağların hidrolitik yolla koparılmasını katalize eder. Sistematik isimlendirmede "hidrolaz" terimi kullanılırken, pratikte ise substratın sonuna "-az" eki eklenir.

Amilazlar, hidrolaz grubuna dahil olup, nişasta ve glikojen gibi molekülleri hidrolize eden enzimlerdir (Baran 2001).

Amilazlar, nişasta moleküllerindeki glikozidik bağları hidrolize ederek dekstrinler ve oligosakkaritler üreten önemli hidrolaz enzimleridir. Bu enzimler, glikozit hidrolaz ailesi 13 (GH-13) üyesidir. Nişastadaki α -1,4-glikozidik bağlar, amilazlar tarafından hidrolize edilir. İlk amilaz, 1833 yılında Anselme Payen tarafından izole edilmiştir. Amilazlar iki türe ayrılır: ekzo-amilazlar ve endo-amilazlar. Ekzo-amilazlar, nişastanın indirgeyici olmayan ucunu hidrolize ederken, endo-amilazlar nişasta molekülü içindeki glikozidik bağları hidrolize eder. Biyoteknolojide, amilaz mikroorganizmalardan elde edilen ve birçok endüstriyel uygulamada kullanılan önemli bir enzimdir. (Farooq ve ark., 2021).

Amilazların tarihi, 1811 yılında Kirchhoff'un nişastayı parçalayan ilk enzimi keşfetmesiyle başlamıştır. Bunu, sindirim amilazları ve malt amilazları hakkında yapılan birkaç rapor izlemiştir. Çok daha sonra, 1930 yılında Ohlsson, malttaki nişasta sindirim enzimlerini enzim reaksiyonu ile üretilen anomerik şeker türüne göre α - ve β -amilazlar olarak sınıflandırmayı önermiştir (Gupta ve ark., 2003).

Mikroorganizmalardan elde edilen amilazlar, bitki ve hayvan amilazlarına kıyasla daha kararlı oldukları için geniş bir endüstriyel kullanım yelpazesine sahiptir. Mikroorganizmaların amilaz üretiminde kullanılmasının en büyük avantajı, ekonomik olarak büyük ölçekli üretim yapabilme kapasitesidir ve ayrıca mikropların istenen yapıdaki enzimleri elde etmek için kolayca manipüle edilebilmesidir. Nişasta parçalayıcı amilolitik enzimler, gıda, fermentasyon, tekstil ve kâğıt endüstrilerinde biyoteknolojik sektörde büyük önem taşımaktadır. Her ne kadar amilazlar bitkiler ve hayvanlar gibi çeşitli kaynaklardan elde edilebilse de mikrobiyal kaynaklardan elde edilen enzimler genellikle endüstriyel talepleri karşılar ve son 30 yılda gıda ve içecek endüstrisine önemli katkılarda bulunmuştur (Sidhu ve ark., 1997; Arıkan ve ark., 2003; Gurung ve ark., 2013).

Endoamilazlar, amiloz veya amilopektin zincirinin iç bölgelerindeki α -1,4 glikozidik bağlarını parçalayabilir. α -Amilaz (EC 3.2.1.1), bu gruba ait bilinen bir örnektir ve hem Arkea hem de Bakteri alemine ait birçok mikroorganizma tarafından sentezlenir (Pandey ve ark., 2000; Gupta ve ark., 2003).

İkinci grup enzimler olan ekzoamilazlar, ya yalnızca β -amilaz (EC 3.2.1.2) gibi α -1,4 glikozidik bağlarını keser, ya da amiloglukosidaz, glukamilaz (EC 3.2.1.3) ve α -glukozidaz (EC 3.2.1.20) gibi hem α -1,4 hem de α -1,6 glikozidik bağlarını parçalar. Ekzoamilazlar, amiloz veya amilopektinin uçtaki glikoz kalıntılarına etki ederler ve bu nedenle sadece glikoz (glukamilaz ve α -glukozidaz) ya da maltoz ve β -limit dekstrin (β -amilaz) üretirler. Ayrıca, β -amilaz ve glukamilaz, serbest kalan maltozun anomerik konfigürasyonunu α formundan β formuna çevirir (Anonymous 1988; Pandey ve ark., 2000).

1.5.1 α -Amilaz

EC 3.2.1.1, α -amilaz enziminin komisyon numarasıdır ve olarak enzimin bilimsel adı α -1,4-glukan-4-glukanohidrolaz olarak bilinir. α -amilaz, yüksek hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından salgılanan bir metaloenzimdir, yani düzgün çalışması için ihtiyaç duyduğu kalsiyum metalini yardımcı faktör olarak kullanır. α -D-(1,4) glikozidik bağı kesen ve terminal glikozu ve α -1, 6-bağlantılarını hidrolize eden bir endo-amilaz olup substratı da nişastadır. Sıcaklık ve diğer koşullar enzim aktivitesini büyük ölçüde etkiler. α -amilaz, pH 7,0'da optimum şekilde etki eder. α -Amilaz, substrata bağlanmasına yardımcı olan ve aktivitesinde oldukça spesifik olmasını sağlayan üç boyutlu bir yapıya sahiptir. α -Amilaz, 512 amino asit (57,6 kDa moleküler ağırlık) içeren tek bir oligosakkarit zincirinden oluşmaktadır. α -Amilazın A, B ve C olmak üzere üç alanı mevcuttur. Bunların arasında en büyüğü A alanı olup fıçı şeklinde olan $(\beta/\alpha)_8$ süper yapısına sahiptir. B, C ve A alanı arasında bulunan ikinci alandır. Disülfür köprüleri A alanını C alanına bağlar ve C alanının işlevi hala bilinmemektedir (Reddy ve ark., 2003; Farooq ve ark., 2021).

1.5.2 β -Amilaz

β -amilaz (EC 3.2.1.2), 1,4- α -D-glukan maltohidrolaz, glikojenaz ve sakkarojen amilaz gibi farklı adlarla da bilinir. Bu enzim, bakteri, mantar ve bitkiler tarafından sentezlenir. İndirgeyici olmayan uçlardan etki ederek, her seferinde α -1,4 glikozidik bağının hidrolizini katalizleyerek iki glikoz ünitesi olan maltozu serbest bırakır. Meyveler olgunlaşırken, β -amilaz enzimi nişastayı maltoza dönüştürerek olgun meyvenin tatlı aromasının ortaya çıkmasını sağlar. Hem α -amilaz hem de β -amilaz tohumlarda bulunur; β -amilaz çimlenmeden önce inaktif formdadır, ancak çimlenme başladığında α -amilaz ve proteazlar aktif hale gelir. Birçok mikroorganizma, nişastayı hücre dışında parçalayabilmek için amilaz üretir. Hayvan dokularında β -amilaz bulunmaz; ancak bu enzim, sindirim sistemindeki mikroorganizmalar arasında yer alabilir. β -amilazın en etkili çalıştığı pH aralığı 4 ile 5 arasındadır. (Mikami ve ark., 1993).

1.5.3 γ -Amilaz

γ -Amilaz (EC 3.2.1.3), diğer amilazlardan farklı olarak, birincil işlevi α -1,6-glikozidik bağları hidrolize etmektir. Ayrıca, amiloz ve amilopektin içerisinde bulunan indirgeyici olmayan α -1,4-glikozidik bağları hidrolize ederek glikoz meydana getirir. γ -Amilazın optimum pH değeri 3'tür, bu nedenle asidik ortamda en etkili şekilde çalışır (Gurung ve ark., 2013; Farooq ve ark., 2021).

1.6 Amilaz Enzimin Bazı Endüstriyel Uygulamaları

α -Amilaz, ticari olarak kullanılan ilk enzimdir. 1905 yılında Japonya'da tekstil endüstrisinde haşıl çözmek amacıyla *Aspergillus oryzae* kültüründen α -amilaz enzimi üretilmiştir. Boiden ve Effornt, 1908 ve 1915 yıllarında haşıl çözme için bakteriyel amilaz üretim yöntemine patent

almışlardır. 1939'da Japonya'da *B. subtilis* türünden α -amilazın endüstriyel üretimine başlanmıştır. Ardından, α -amilaz enzimi nişasta işleme sektöründe sıvılaştırma ajanı olarak kullanılmaya başlanmıştır. 1959 yılında ise, α -amilaz ve amiloglukosidaz kullanılarak nişastadan toz ve kristal dekstrozun endüstriyel üretimi gerçekleştirilmiştir (Sarıkaya, 1995).

Günümüze kadar hem Türkiye'de hem de dünya genelinde enzimler, özellikle amilaz enzimi üzerinde üretim, uygulama ve niteliklerin belirlenmesi konusunda birçok araştırma gerçekleştirilmiştir. Artan kullanım alanları sayesinde, enzim üretiminin yaklaşık %30'u amilazlardan oluşmaktadır (Maarel ve ark., 2002). Çizelge 1.1.'de Amilazların uygulama alanları görülmektedir.

Çizelge 1.1. Amilazların uygulama alanları

Sanayi	Enzim	İşlev	Mikroorganizmalar
Pişirme	Amilaz	Un ayarı, ekmek yumuşaklığı	<i>Bacillus</i> türleri
	Maltojenik α -Amilaz	Ekmeklerin raf ömrünü uzatın	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
İçecek	α - Amilaz β -Amilaz	Nişasta hidrolizi	<i>Bacillus</i> türleri
Kağıt hamuru ve kağıt	Amilaz	Mürekkep giderme, Kâğıdın yazma kalitesini yükseltmek amacıyla, nişastanın şeker oluşumu olmadan sıvı hale getirilmesi.	<i>Bacillus licheniformis</i>
Deterjan	Amilaz	Karbonhidrat lekesi çıkarma	<i>Bacillus subtilis</i>
Deri	Amilaz	Lif ayırma	<i>Bacillus subtilis</i>
Atık Yönetimi	Amilaz	Sebze atıklarının biyoremediasyonu	<i>B. licheniformis</i>
Tekstil	Amilaz	Yüksek sıcaklıklarda aralıksız haşılama süreci hızlama	<i>Bacillus</i> türleri
Şeker	Amilaz	Glikoz, fruktoz ve maltoz üreten özsudaki lifleri parçalayarak filtrasyonu sağlama.	<i>Bacillus</i> türleri

1.6.1 Nişasta Endüstrisinde Kullanım

Nişasta endüstrisi, nişastayı fruktoz ve glikoz şuruplarına dönüştüren sıvılaştırma işleminde amilazların en yaygın kullanım alanlarına sahiptir. Nişastanın tamamen enzimatik dönüşümü, nişasta granüllerinin çözünmesiyle viskoz bir süspansiyonun oluşmasını sağlayan jelatinleşme sürecini içerir. Bu süreç, kısmi hidroliz ve viskozite kaybını kapsayan sıvılaştırma ile başlar ve ardından daha fazla hidroliz ile glikoz ve maltoz üretimini içeren sakarifikasyon aşaması gelir (Gomes ve ark., 2003).

1.6.2 Gıda Endüstrisinde Kullanım

Amilaz, fırıncılık, bira üretimi, kek yapımı, sindirim yardımcıları, meyve suları ve nişasta şuruplarının hazırlanması gibi işlenmiş gıda endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle α -amilazlar, fırıncılık endüstrisinde ekmeğin bayatlamasını geciktirdiği ve raf ömrünü (2-

3 gün) uzattığı için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu enzimler, genellikle nişastayı daha küçük dekstrinlere dönüştürmek için ekmek hamuruna eklenir ve bu dekstrinler maya tarafından daha ileri düzeyde fermente edilir. α -amilaz, fermentasyon hızını artırır ve hamurun viskozitesini azaltır, bu da ürünün hacminde ve dokusunda iyileşmelere yol açar (Van Der Maarel ve ark., 2002; Gurung ve ark., 2013).

α -Amilaz enzimi, meyve suyu endüstrisinde özellikle elma ve armut sularının berraklaştırılmasında kullanılır. Meyveler tam olgunlaşmadan toplandığında, içinde hala nişasta bulunduğu için meyve suyunda bulanıklık meydana gelir. Bu sorun, ortama α -amilaz ekleyerek giderilmektedir (Ekşi, 1988).

1.6.3 Kâğıt Endüstrisinde Kullanım

α -amilazların kâğıt hamuru ve kâğıt endüstrisindeki ana kullanımı, kaplamalı kâğıdın nişastasının modifikasyonunu içerir. Bu işlem, düşük viskoziteli ve yüksek moleküler ağırlıklı nişasta üretmeyi amaçlar. Kaplama işlemi, kâğıdın yüzeyini pürüzsüz ve sağlam hale getirerek yazma kalitesini artırır (Van Der Maarel ve ark., 2002; Gurung ve ark., 2013).

1.6.4 Deterjan endüstrisi

Enzimlerin deterjan formüllerinde kullanılması, deterjanların zorlu lekeleri daha etkili bir şekilde çıkarmasına yardımcı olur ve çevre dostu olmasını sağlar. Amilazlar, enzimatik deterjan formülasyonlarında kullanılan ikinci enzim türüdür ve sıvı deterjanların %90'ını bu enzimler oluşturur. Bu enzimler, patates, sos, muhallebi ve çikolata gibi nişastalı gıdaların kalıntılarını dekstrinler ve diğer daha küçük oligosakkaritlere dönüştürmek amacıyla çamaşır ve bulaşık deterjanlarında kullanılmaktadır. Amilazlar, daha düşük sıcaklıklarda ve alkali pH ortamlarında aktivite gösterir, deterjan koşulları altında gerekli kararlılığı korur. Ayrıca, amilazların oksidatif kararlılığı, yüksek oksidasyon koşullarına sahip deterjanlarda kullanılmaları için önemli bir kriterdir. Nişastanın yüzeylerden temizlenmesi, beyazlık sağlama açısından önemli rol oynamaktadır (Souza ve Magalhaes, 2010).

1.6.5 Tekstil Endüstrisinde

Amilazlar, tekstil endüstrisinde haşıl sökme işlemlerinde kullanılmaktadır. Kumaş üretiminden önce ipliklere, nişasta gibi haşıl maddeleri eklenerek hızlı ve güvenli bir dokuma işlemi sağlanır. Haşıl sökme, nişastanın kumaştan uzaklaştırıldığı süreçtir ve dokuma sırasında çözgü ipliğinin kopmasını önlemek için güçlendirici bir ajan olarak işlev görür. α -amilazlar, nişastayı seçici bir şekilde çıkararak lifleri etkilemeden temizler (Aygan, 2008; Ahlawat ve ark., 2009).

1.6.6 Alkol Üretiminde

α -Amilaz enzimi, alkol üretiminde kritik bir rol üstlenir. Alkol üretimi için hammadde olarak kullanılan nişastalı malzemeler, α -amilaz ve amiloglukozidaz enzimleri aracılığıyla işlenir. Nişasta yeterince parçalandıktan sonra, ortam mayalarla inoküle edilerek fermentasyon aşamasına geçilir (Wiseman, 1987).

1.7 Elektroforez

Elektroforez, elektriksel bir alanda yüklü taneciklerin hareketini ifade eder ve aynı zamanda çözeltideki iyonların elektrik akımının etkisiyle meydana gelen hareketlerini tanımlamak için kullanılır. Moleküllerin elektriksel alandaki hareketi, elektrik akımının şiddeti, net yük, molekülün şekli, çözeltinin iyonik gücü, viskozite ve sıcaklık gibi faktörlere bağlıdır. Molekülün yük büyüklüğü, göç hızını belirler. Farklı yüklerdeki proteinler, zıt yükteki elektrotlara doğru hareket ederken çeşitli hızlarda ayrılırlar, bu sayede elektriksel alanda birbirlerinden ayrılırlar. (Yıldırım ve ark., 2007).

Elektroforez, elektriksel olarak yüklenmiş taneciklerin elektriksel alan içinde hareketini tanımlar. Amino asitler, peptidler, proteinler, nükleotidler ve nükleik asitler gibi biyomoleküller, iyonlaşabilen gruplara sahip olduklarından, belirli pH seviyelerine sahip çözeltilerde elektriksel olarak ya kation (+) ya da anyon (–) formunda bulunurlar. Bu yüklü tanecikler, taşıdıkları net yüke bağlı olarak, elektriksel alanın etkisi altında ya anoda ya da katoda doğru hareket ederler (Lin ve ark., 2007; Yıldırım ve ark., 2007).

1.7.1 Doğal (Native) Jel Elektroforezi

Doğal jellerde genellikle %7,5 oranında poliakrilamid kullanılır; ancak bu tür jellerde SDS (sodyum dodesil sülfat) ve β -merkaptoetanol bulunmadığı için proteinler denatüre olmaz. Bu nedenle, proteinler örnek yükleme tamponunda SDS olmadığından, jelin pH'ına bağlı olarak kendi yüklerine göre analiz edilirler. Doğal proteinlerin ayrılması, bu proteinlerin elektroforez koşullarındaki pH'ya bağlı olarak sahip oldukları yük yoğunluklarına ve jelin elek etkisi nedeniyle moleküler boyutlarına göre gerçekleşir. Bu bağlamda, doğal proteinlerin elektroforetik hareketliliği hem proteinin elektriksel yüküne hem de moleküler kütesine bağlıdır. Proteinin elektriksel yükü ise, amino asit kompozisyonu ve translasyon sonrası modifikasyonları tarafından belirlenir (Tuncer, 2009).

1.7.2 Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE), protein karışımlarının bileşenlerini ayırmak için en yaygın analitik yöntemlerden biridir. Ayrıca, bir proteinin safiyetini elektroforetik yöntemle değerlendirmek neredeyse zorunlu hale gelmiştir. SDS-PAGE, proteinlerin jel matrisi boyunca %1'den daha az farklılık gösteren elektroforetik hareketliliklerini ve moleküler

boyutlarındaki değişiklikleri kullanarak proteinleri ayırır. Bu teknik, aynı zamanda proteinlerin moleküler ağırlıklarını tahmin etmede de etkili bir araçtır (Scopes, 1993; Kuşoğlu, 2019).

Protein ve peptidlerin elektroforetik ayrımında en sık kullanılan destek malzemesi poliakrilamiddir. Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) yönteminde, akrilamid molekülleri, çapraz bağlayıcı moleküller aracılığıyla kovalent bağlar oluşturarak poliakrilamid yapısını oluşturur. Polimerizasyon işlemi kimyasal ya da fotokimyasal olarak gerçekleştirilebilir. Kimyasal polimerizasyon için amonyum persülfat, fotokimyasal polimerizasyon içinse riboflavin kullanılmaktadır. Her iki yöntemde de N,N,N',N'-Tetrametiletilediamin (TEMED) katalizör olarak işlev görür (Tuncer, 2009).

Protein ve peptidlerin denatüre olmadan doğal formlarında kullanıldığı yapı ve/veya aktivite ile ilgili çalışmalarda ve çok sayıda protein içeren karışımların ayrılmasında doğal jel elektroforezi tercih edilmektedir. Ancak bu yöntemde, moleküllerin şekli ve yükü, jeldeki göçü etkilediği için proteinlerin gerçek moleküler ağırlıkları belirlenmemektedir.

SDS-PAGE, kesintili bir tampon sistemi kullanır. Numunenin hazırlandığı tampon Tris-HCl, jelin çalıştığı tampon ise Tris-glisin olup, pH değerleri sırasıyla 6.8 ve 8.3'tür. Bu tampon sistemleri, hem bileşim hem de pH açısından farklılık göstermektedir. Kesintili tampon sistemleri, numunenin iyi çözünürlüğünü korurken jel kuyucuklarına daha fazla numune yüklenmesine olanak tanır. Bu yöntemle, aşırı yüklenen protein karışımları önce yığıcı jelde ince bantlar halinde "paketlenir" ve ardından tüm proteinler aynı anda çözücü jele geçer (Ornstein, 1964).

Sistemin bir diğer avantajı, sodyum dodesil sülfat (SDS) adlı bir deterjan ve proteinleri denatüre etmek için kullanılan indirgeyici ajanların kullanılmasıdır. SDS, proteinlere güçlü ve sabit bir oranda bağlanır; her 2 amino asit kalıntısı için 1 dodesil sülfat molekülü bağlanmaktadır (Reynolds ve Tanford, 1970).

1.8 Kromatografi

Kromatografi, 20. yüzyılın başlarında Rus botanikçi Mikhail Tswett tarafından keşfedilmiştir. Tswett, çeşitli pigmentleri içeren bir çözeltiyi, kalsiyum karbonatla doldurulmuş bir cam kolondan geçirerek başarıyla ayırmıştır. Ayrılan bileşenler, kolonda renkli bölgeler oluşturarak birbirinden ayrılmıştır. Bu ayırma yöntemine "kromatografi" adını vermiştir; bu terim, renkli fotoğraf anlamına gelmektedir. Son 50 yıl içinde kromatografi teknikleri ve uygulamaları önemli ilerlemeler kaydetmiştir. Bu alandaki katkılarından dolayı A.J.P. Martin ve R.L.M. Synge, 1952 yılında Nobel Ödülü'nü kazanmıştır (Skoog ve West, 1981).

Kromatografi, kompleks karışımlardaki çeşitli bileşenleri ayırma ve tanımlama yeteneği sağlayan bir dizi ayırma yöntemidir ve bilim insanlarının çalışmalarını kolaylaştırır. Kromatografik tekniklerin tümünde iki temel faz bulunur: "sabit faz" ve "hareketli faz." Karışımdaki bileşenler, hareketli faz tarafından taşınırken sabit faz üzerinde farklı hızlarda hareket ederler. Bu hız

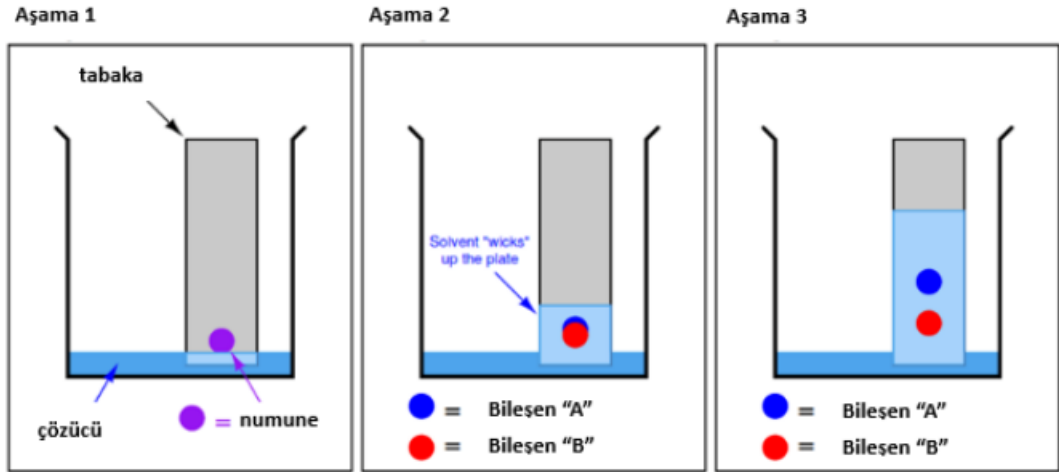
farklılıkları, bileşenlerin sabit faz üzerinde ayrışarak gruplar halinde ilerlemesine neden olur ve böylece karışım içindeki maddeler birbirinden ayrılır (Skoog ve West, 1981).

Kromatografi, molekül içeren bir akışkanın bir katı yüzeyden, gözenekli bir yataktan veya bir katmandan geçmesi prensibine dayanır (Wilson, 1966). Akışkan bu yüzeylerle temas ederken, içindeki moleküller kendilerine özgü özelliklerine göre ayrılır. Moleküllerin ayrılmasını etkileyen faktörler arasında molekül ağırlığı, afinite, hidrofobiklik, adsorpsiyon (sıvı-katı) ve bölünme (sıvı-sıvı) gibi özellikler bulunur. Bu farklılıklar nedeniyle, bazı moleküller akışkanla birlikte daha hızlı hareket ederken, diğerleri daha uzun süre durağan fazda kalır. Bu durumda kromatografik tekniklere dayalı üç farklı bileşen şu şekilde özetlenebilir;

- Sabit Faz: Bir katı faz tarafından adsorbe edilen katı veya sıvı bir katmandan oluşur.
- Mobil Faz: Gaz veya sıvı olabilen bir akışkandır.
- Ayrılmış moleküller (Köle, 2024)

1.9 İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)

TLC (İnce Tabaka Kromatografisi), hareketli fazın sıvı olduğu ve sabit fazın düz bir plaka üzerindeki ince bir malzeme tabakasından oluştuğu bir sıvı kromatografi türüdür. Bu ince malzeme tabakasına sorbent denir. Hareketli faz, geliştirme çözücüsü olarak bilinir ve çözünen maddeleri sabit faz boyunca taşır. Çözünen maddenin sabit faz boyunca hareket hızı, hareketli fazın çözüneni çözerek ve plaka boyunca yukarı taşırken uyguladığı kuvvet ile sorbentin çözüneni çözeltiden çekip geri sorbente çekerken uyguladığı direnç arasındaki dengeye bağlıdır. Moleküller, çözünen madde tekrar tekrar emilip desorbe edildikçe plaka boyunca dur-kalk hareketiyle ilerler. Bu nedenle, çözünen maddenin yalnızca küçük bir kısmı her an hareket halindedir, ancak her noktada ortalama bir mesafe kateder. Ayrı bölgeler, bireysel parçacıkların rastgele dalgalanmaları ve hareketleri ile sorbentin yüzeyindeki düzensizlikler nedeniyle yayılma gösterir. Sorbente kuvvetli bir şekilde bağlanan maddeler daha yavaş hareket ederler çünkü sorbent içinde daha fazla zaman geçirirler. Daha hızlı hareket eden maddeler ise sorbent tarafından daha az çekilir, hareketli fazda daha çözünür hale gelirler ve bu fazda daha fazla zaman geçirirler. Bu nedenle, farklı özelliklere sahip bileşikler, çözünenlerin sorbent ve hareketli faz ile çeşitli etkileşimleri kullanılarak birbirinden ayrılabilir (Fried ve Sherma, 1999; Santiago ve Strobel, 2013; Bele ve Khale, 2011).



Şekil 1.3. İnce Tabaka Kromatografisi

1.10 Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada, amilaz enzim üreticisi deniz kökenli *Bacillus* sp. suşunun izolasyonu gerçekleştirilmiş, en iyi üretici suşun seçilmesi ve üretilecek enzimin karakterizasyonu ile amilaz enzimine ait antimikrobiyal etkinin araştırılması hedeflenmiştir.

2 ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Mamo ve Gessesse (1999), Termofilik *Bacillus* sp. suşu WN11'in hücresiz kültür üst sıvısından iki α -amilaz, Amy I ve Amy II, homojenliğe kadar saflaştırılmıştır. Amy I'in molekül ağırlığı 76 kDa, Amy II'nin ise 53 kDa olarak belirlemişlerdir. 60°C'de ham nişasta enzim dozunda, Amy I'in ham patates ve mısır nişastasını hidroliz yüzdesi sırasıyla %77 ve %44 iken, Amy II'nin ise %82 ve %37'dir. Her iki enzimin de optimum sıcaklığı 75-80°C'dir ve 80°C'de 4 saat inkübasyon sonrasında orijinal aktivitelerinin yaklaşık %50'si korunmuştur. Enzimler pH 5,5'te optimum aktivite gösterir ve 5,5-9,0 pH aralığında stabildir. Hg^{2+} , Cu^{2+} ve Fe^{3+} varlığında enzim aktivitesi inhibe edilirken, Zn^{2+} varlığında herhangi bir inhibisyon gözlenmediğini bildirmişlerdir.

Arabacı (2011), Ankara ve Tuz Gölü'nden izole edilen alkalifilik *Bacillus* sp. suşlarından amilaz enzimi elde edilmiş ve karakterize etmiştir. *Bacillus* sp. NCA35 amilaz enziminin moleküler ağırlığı, SDS-PAGE zimogram analizi ile 205 kDa olarak belirlemiştir. Enzim, optimum aktivitesini 25°C ve pH 8.0'de göstermektedir. 10-40°C arasında 30 dakika inkübasyonda, aktivitesinin yaklaşık %96'sını korurken, 25°C'de 24 saat boyunca ortalama %53 stabil kalmıştır. Enzimin aktivitesi, %3 NaCl ile 60 dakika inkübasyonda %56 oranında korunmuştur. Ayrıca, %1 β -merkaptoetanol enzimin aktivitesini %103 oranında artırırken, 5mM $BaCl_2$, EDTA, $CaCl_2$, NaCl, $ZnCl_2$, $MnCl_2$, 3mM PMSF ve 8M üre sırasıyla %27, %42, %35, %43, %40, %36, %41 ve %58 oranında inhibe etmiştir. İnce tabaka kromatografisi analizi sonucunda, reaksiyon ürünlerinin glikoz, maltoz ve maltoz türevli oligosakkaritler olduğu tespit etmiştir.

Batur ve Aygan (2015), Kahramanmaraş topraklarından izole edilen *Bacillus* sp. A-3, pH 5.0-7.0 aralığında enzim sentezi gerçekleştirmiş ve maksimum amilolitik aktivitesini 37°C ve pH 6.5'te göstermiştir. SDS-PAGE analizi sonucunda enzimin moleküler ağırlığı 53.94 kDa olarak belirlenmiştir. Enzimin optimum pH aralığı 6.0-6.5, optimum sıcaklığı ise 35°C'dir ve 25-65°C arasında ortalama %68 rölatif aktivite göstermektedir. Enzim, 40°C'ye kadar termostabildir. Kimyasalların etkisi incelendiğinde, en yüksek kalan aktivite %93 ile KCl'de, en düşük aktivite ise %0.8 ile EDTA'da gözlemlenmiştir.

Sajid ve ark (2016), *Bacillus* sp. MTZ-1, çeşitli parametreler altında amilaz üretimi açısından incelemişler. Maksimum enzim aktivitesi, 96 saatlik inkübasyondan sonra pH 7'de olduğunu bildirmişler. Enzim preparatları, çeşitli bakteriyel patojenlere (VRE, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *EPEC*, *MRSA*, *Klebsiella* sp., *Shigella* sp., *Staphylococcus epidermidis*, *E. coli* ve *S. aureus*) karşı antibakteriyel aktivite gösterdiğini bulmuşlardır. Ayrıca, *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. terreus*, *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Trichophyton tonsurans* ve *Mucor* sp. gibi birçok fungal patojene karşı antifungal aktiviteye sahip olduğunu bildirmişler.

Simair ve ark (2017), nişasta agar ortamında amilaz üreten deniz mikroorganizmaları incelemişlerdir. Deniz suyu ve topraktan izole edilen 50'den fazla bakteri suşu, amilaz üretimi açısından taramışlardır. *Bacillus* sp. BCC 021-50'nin en iyi amilaz üretimini sağladığı

belirlemişlerdir. Fermantasyon koşulları optimize edilerek 5211 U/mL amilaz konsantrasyonu elde edilmiş. Bu sonuç, 20 g/L melas ve 10 g/L pepton kullanılarak 50°C'de ve pH 8,0'da 36 saatlik inkübasyonla elde edilmiş. Ham amilaz, 70°C ve pH 7,50'de maksimum aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, enzim alkali pH'ta, yüksek sıcaklıklarda, sürfaktanlar, oksitleyiciler ve ağartma maddeleri gibi koşullarda stabilite avantajları sağladığını bulmuşlar

Kaya ve Enez (2019), Toprakten izole edilen dört *Bacillus* suşundan α -amilaz izole edip karakterize etmişlerdir: *Bacillus cereus* WYS01, *Bacillus thuringiensis* VITLW1, *Bacillus thuringiensis* ES2I3P ve *Bacillus cereus* TG16. Araştırmada, tüm bakterilerin en yüksek enzim üretimini 36. saatte, pH 7.0 ve 40°C'de gerçekleştirdiği bulunmuştur. En yüksek spesifik aktivite *Bacillus cereus* WYS01'de gözlenmiştir. *Bacillus thuringiensis* VITLW1, *Bacillus thuringiensis* ES2I3P ve *Bacillus cereus* TG16'nın en yüksek aktiviteyi 40°C'de gösterirken, *Bacillus cereus* WYS01 60°C'de en yüksek aktiviteyi sergilemiştir. Tüm mikroorganizmalar pH 7.0'da en yüksek α -amilaz aktivitesini sağladığını bildirmiştir. Çalışma, bu bakterilerden elde edilen amilazın endüstriyel ve biyoteknolojik açıdan önem taşıdığını vurgulamıştır.

Özcan ve Özdemir (2020), Niğde ili Ulukışla ilçesi Çiftahan bölgesindeki kaplıcadan alınan toprak örneklerinden α -amilaz aktivitesine sahip *Bacillus* bakterisi izole etmişler ve *Bacillus* sp. GA4 olarak adlandırmışlar. *Bacillus* sp. GA4'ün α -amilaz enziminin optimum pH değeri 6.0-8.0 olarak belirlenmiş ve optimum sıcaklığı 50°C olarak tespit edilmiştir. Enzim, 40°C'de 30 dakika inkübasyon sonrasında tam aktivitesini korurken, 50°C ve 60°C'de aynı süre sonunda sırasıyla %21 ve %37 oranında aktivite kaybı yaşamıştır. MgCl₂ ve FeSO₄, enzim aktivitesini sırasıyla %13 ve %12 oranında artırırken, CuSO₄, CaCl₂ ve EDTA, enzim aktivitesini sırasıyla %81, %38 ve %33 oranında inhibe etmiştir. SDS-PAGE zimogram analizi sonucunda enzimin moleküler ağırlığı yaklaşık 55 kDa olarak belirlenmiştir.

Özdolap (2021), Çukurova Üniversitesi yerleşkesindeki toprak örneklerinden α -amilaz enzimi üreten *Bacillus* suşları izole etmiş ve *Bacillus* sp. ZF4 ve *Bacillus* sp. A4 olarak adlandırmıştır. *Bacillus* sp. ZF4'ün α -amilazı, optimum pH 6.0 ve 40°C'de en yüksek aktiviteyi gösterirken, *Bacillus* sp. A4'ün α -amilazı pH 8.0 ve 40-50°C aralığında en iyi aktivite olduğunu bulmuştur. *Bacillus* sp. ZF4'ün α -amilazı 70°C'de 15 dakika inkübasyon sonrasında tüm aktivitesini korurken, bu sıcaklık değerinden sonra hızlı bir aktivite kaybı olduğunu bildirmiştir. *Bacillus* sp. A4'ün α -amilazı ise 70°C'ye kadar büyük ölçüde stabil kalmış, 80°C'den sonra aktivite kaybı hızlanmıştır. Her iki enzim de SDS ve Co varlığında yüksek aktivite seviyelerine ulaşmış, ancak CaCl₂, MgCl₂ ve EDTA her iki enzim için de inhibe edici etkiler göstermiştir. Zimogram analizi, her iki enzimin de yaklaşık 105.4 kDa moleküler ağırlığa sahip olduğunu bulmuştur.

Aslan ve ark (2021), Bingöl İli Binkap sıcak su kaynaklarından izole edilen bakteriler üzerinde proteaz ve amilaz enzimlerinin karakterizasyonu yapmışlardır. İki bakteri suşu, 4NK ve 5NK, su ve toprak örneklerinden elde etmişlerdir. Her iki bakteri de Gram pozitif ve çubuk şeklindedir. Optimum pH değerleri her iki bakteri için 6.0 olarak belirlenmiş, optimum üreme

sıcaklıkları ise sırasıyla 40°C ve 45°C bulmuşlardır. 4NK bakterisinin proteaz ve amilaz enzimlerinin üretiminde en yüksek aktivite sırasıyla 18. saatte (195.80 U/mg) ve 15. saatte (428.33 U/mg) gözlenmiştir. Proteaz ve amilaz enzimlerinin optimum pH'ları 8.0, sıcaklıkları ise sırasıyla 40-50°C ve 50-60°C olarak belirlemişlerdir. 5NK bakterisinin proteaz ve amilaz üretimindeki optimum süre ise 24. saatte, proteaz için 260.93 U/mg ve amilaz için 380.58 U/mg olarak tespit etmişlerdir. Bu bakterinin proteaz ve amilaz enzimlerinin optimum pH'ı 8.0 ve sıcaklığı 50°C olarak bulmuşlardır.

Al-Gburı (2023), Bağdat'taki hastanelerden toplanan 112 örnek arasında balgam, idrar, dışkı, yara, yanık ve hastane atıkları bulunmaktaydı. Bu örneklerden 21 *Bacillus subtilis* izolatu elde edilip tanımlanmış. Bu isolatlar, proteaz enzimi üretme kapasitelerine göre test edilmiş ve çeşitli derecelerde proteaz üretimi göstermiş. Proteaz üretiminin optimum koşullarını belirlemek için B8 izolatu seçilmiş. Bu izolatla optimum karbon, azot, fosfor kaynakları, pH ve sıcaklık koşulları belirlenmiş. Proteaz enzimi, belirlenen optimum koşullarda dört aşamada saflaştırılmış her aşamada spesifik aktivite, protein konsantrasyonu ve toplam aktivite ölçülmüş. Son olarak, saflaştırılan enzimin birçok patojenik bakteriye karşı antimikrobiyal etkileri incelenmiştir.



3 MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

Bu çalışmada, doğal ortamdan izole edilen *Bacillus* türleri için çeşitli laboratuvar ekipmanları kullanılmıştır. Bunlar arasında su banyosu, soğutmalı santrifüj, spektrofotometre, çalkalamalı inkübatör, otoklav, hassas terazi, etüv ve steril hava akışlı kabin bulunmaktadır. Ayrıca bakteri izolasyonu, enzim üretimi ve karakterizasyonu için Aşağıdaki besi yerleri ve çözeltiler materyal olarak seçilmiş ve kullanılmıştır.

3.1.1 Bakteri İzolasyonu ve Tanımlamasında Kullanılan Besiyerleri

N1 Agar

Deniz suyundan bakterilerin izolasyonu, saf kültür elde edilmesi, stoklanma işlemi gibi aşamaları için kullanılmıştır (Arıkan, 2008).

Çizelge 3.1. N1 Besi Yerinin İçeriği

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

M9 Nişasta Agar

İzole edilen *Bacillus* suşların nişastayı hidroliz yeteneklerinin saptanması için kullanılmıştır (Aygan, 2008).

Çizelge 3.2. M9 Besi Yerinin İçeriği

Besiyeri Bileşimi	g/L
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	6
KH_2PO_4	3
NaCl	0.5
NH_4Cl	1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.24
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.24
Pepton	3
Nişasta	10
Agar	15

3.1.2 Kullanılan Çözeltiler

NaOH Çözeltisi

Besiyerlerinin pH'sını ayarlamak ve tampon çözeltileri hazırlamak için 0.2 N, 2 N ve 3 N NaOH çözeltileri hazırlanıp kullanılmıştır (Aiba ve ark., 1983).

Etanol

Sıvı besiyerlerinde üretilen enzimin çöktürülmesi ve kısmi saflaştırılması için %96'lık etanol kullanılmıştır. Etanol, kullanılmadan önce -33°C'de soğutulmuştur (Srivastava, 1987).

Lügol

Katı besiyerinde amilaz aktivitesinin belirlemek için kullanılmıştır. Potasyum iyodür ve iyot cam havan içerisinde ezilir. 100 mL distile suyun bir kısmı azar azar cam havan içerisindeki iyot karışımı üzerine ilave edilerek çözündürülür. Bir miktar distile su cam havan içerisindeki iyodun tamamını çözündürmek ve cam havanı temizlemekte kullanılır. Tüm iyot çözündüğü zaman, şişeye aktarılır. Hazırlanan karışım kullanılmadan önce 20 kat sulandırılmıştır (Arıkan ve ark., 2003).

Çizelge 3.3. Lügol Solüsyonunun İçeriği

Bileşimi	g /100mL
İyot	7 g
Potasyum iyodür	3 g
Distile Su	100 mL

Sodyum-Fosfat Tamponu (0.1 M, pH 7.0)

Çöktürme işleminden elde edilen enzimin çözülerek süspansiyon elde etmek amacıyla pH'sı 7.0 olan 0.1 M sodyum fosfat tamponu kullanılmıştır.

Sodyum-Fosfat Tamponu

Enzimlerin pH 6.0-8.0 aralığındaki aktivite seviyelerini belirlemek için sodyum fosfat tamponu kullanılmıştır. İstenen pH değerine sahip sodyum fosfat tamponunu hazırlamak için, 0.2 M NaH_2PO_4 ve 0.2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ çözeltileri uygun hacimlerde distile su ile karıştırılmıştır. (Temizkan ve Arda, 2008; Arabacı, 2011).

Çizelge 3.4. Fosfat Tamponunun İçeriği

pH	0.2 M NaH ₂ PO ₄ (27.8 g/L) (mL)	0.2 M Na ₂ HPO ₄ (53.65 g/L) (mL)	Distile su (mL)	Tolam hacim (mL)
6.0	87.7	12.3	100	200
6.5	68.5	31.5	100	200
7.0	39.0	61.0	100	200
7.5	16.0	84.0	100	200
8.0	5.3	94.7	100	200

Glisin-NaOH Tamponu

Enzimlerin pH 8.5-10.5 aralığındaki aktivitelerini belirlemek amacıyla, 0.2 M Glisin ve 0.2 M NaOH çözeltileri ile distile su uygun oranlarda karıştırılarak istenilen pH değerine sahip tampon hazırlanmıştır (Temizkan ve Arda, 2008; Arabacı, 2011).

Çizelge 3.5. Glisin-NaOH Tamponunun İçeriği

pH	0.2 M NaOH (8 g/L) (mL)	0.2 M Glisin (15.01 g/L) (mL)	Distile su (mL)	Tolam hacim (mL)
8.5	4.0	50	146	200
9.0	8.8	50	141.2	200
9.5	22.4	50	127.6	200
10.0	32.0	50	118	200
10.5	45.5	50	104.5	200

Borax-NaOH Tamponu

Enzimlerin pH 11.0-13.0 aralığındaki aktivitelerini belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Bu tamponu hazırlamak için, 50 mL 0.05 M Boraks (19.05 g/L) çözeltisine istenilen pH değerine ulaşmak için 0.2 M NaOH veya daha yüksek pH değerleri için 2 N NaOH eklenmiştir. Son olarak, hacim 200 mL'ye tamamlanana kadar distile su ilave edilmiştir (Temizkan ve Arda, 2008; Arabacı, 2011).

Çizelge 3.6. Borax-NaOH Tamponunun İçeriği

pH	0.05 M Boraks (19.05 g/L) (mL)	0.2 M NaOH/ 2 N NaOH (mL)	Distile su (mL)	Tolam hacim (mL)
11.0	50	x	x	200
11.5	50	x	x	200
12.0	50	x	x	200
12.5	50	x	x	200
13.0	50	x	x	200

Dinitro Salisilik Asit (DNS)

Enzim aktivitesini durdurmak ve indirgen şeker miktarını belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Bunun için, 1 g DNS 50 mL distile suda çözüldükten sonra, 30 g K-Na-Tartarat ve 20 mL 2N NaOH eklenmiş, ardından hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. (Aiba ve ark., 1983).

3.1.3 Enzimin Alt Ünite Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Sığır Serum Albumini (BSA) Stok Çözeltisi

1 mg BSA, 1 mL distile suda çözülerek stok çözelti hazırlanmıştır. Bu stok çözelti, BSA kalibrasyon eğrisi için gerekli çeşitli BSA konsantrasyonlarını elde etmek amacıyla kullanılmıştır (Arabacı, 2018; Bradford, 1976).

Glukoz Stok Çözeltisi

1 mg glukoz, 1 mL distile suda çözülerek hazırlanmıştır. Bu çözelti, glukoz kalibrasyon grafiği için gereken çeşitli glukoz konsantrasyonlarını elde etmek amacıyla kullanılmıştır (Arabacı, 2018; Bradford, 1976).

Renklendirme Çözeltisi

Renklendirme çözeltisi, karışımdaki protein konsantrasyonunu belirlemek için kullanılmıştır. Bu çözeltinin hazırlanması için 0.1 g Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası 50 mL etanolde çözülmüştür. Üzerine 100 mL % 85'lik fosforik asit ilave edilerek son hacim 200 mL olacak biçimde saf su ilave edilmiş. Çözelti, kaba filtre kağıdından süzülüp koyu renkli bir şişeye aktarılmıştır. (Arabacı, 2018; Şahutoğlu, 2013; Spector, 1978; Bradford, 1976)

3.1.4 SDS-PAGE İşleminde Kullanılan Solüsyonlar

Solüsyon A (Akrilamid Solüsyonu)

Çizelge 3.7. A Solüsyonun İçeriği.

Bileşimi	g/100mL
Akrilamid	29.2 g
Bisakrilamid	0.8 g
dH₂O	100mL

Akrilamid ve bisakrilamid tartılarak bir cam kapta karıştırılır ve üzerine bir miktar distile su eklenir. Karışım tamamen çözündükten sonra, son hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlanır. Elde edilen solüsyon koyu renkli bir şişeye aktarılır ve +4°C'de saklanır (Bollag ve ark., 1996). Akrilamid ve bisakrilamid toksik maddelerdir; bu nedenle, hazırlık ve kullanım sırasında eldiven ve gözlük kullanılmalıdır.

Solüsyon B (4X)

Ayırıcı jel hazırlanırken kullanılmıştır (Bollag ve ark., 1996).

Çizelge 3.8. B Solüsyonun İçeriği

Bileşimi	mL/100mL
2 M Tris-HCl (pH 8.8)	75
%10'luk SDS	4
dH₂O	21

2 M Tris-HCl'i hazırlamak için ilk önce cam şişeye tris konulur ve bir miktar distile suda çözülür, sonra hidroklorik asit ile pH'sını 8.8'e ayarlanıp son hacmine distile suyla tamamlanır. Hazırlanan 2 M Tris-HCl (pH 8.8) 'i, %10'luk SDS ve dH₂O üzerine ilave edip karıştırılır ve +4 °C'de saklanır (Bollag ve ark., 1996).

Solüsyon C (4X)

Yığılma jel hazırlamada kullanılmıştır (Bollag ve ark, 1996).

Çizelge 3.9. C Solüsyonun İçeriği

Bileşimi	mL/100mL
1 M Tris-HCl (pH 6.8)	50
%10'luk SDS	4
dH₂O	46

İlk önce 1 M Tris çözeltisi hazırlanır ve pH'sını 6.8' e aylamak için hidroklorik asit ilave edilip son hacmini distile su ile tamamlanır. Solüsyon C'yi hazırlamak için 1 M Tris-HCl (pH 6.8)'i, %10'luk SDS ve dH₂O ilave edip karıştırılır ve +4 °C'de saklanır (Bollag ve ark., 1996).

Amonyum Persülfat (AMPS) (%10)

AMPS çözeltileri kararsız olduğundan, kullanılmadan hemen önce taze olarak hazırlanmalıdır. 0,1 g AMPS, 1 mL su içerisinde çözündürülür (Tuncer, 2009).

TEMED (N, N, N', N'-tetramethylene-ethylenediamine)

TEMED (Tetrametiletilendiamin), SDS-PAGE jel polimerizasyonu sırasında serbest radikal grup AMPS (Amonyum Persülfat) ile kullanılan bir gruptur, polimerizasyonun gerçekleşmesi için katalizör görevi yapar.

Örnek Yükleme Tamponu (5X)

Çizelge 3.10. Örnek Yükleme Tamponun İçeriği

Bileşimi	Miktarı
1 mM Tris-HCl (pH=6.8)	0.6 ml
%10 SDS	2 ml
%5 β-mercaptoethanol	0.5 ml
%50 Glycerol	5 ml
%1 Bromophenol Blue	1 ml
Distile Su	0.9 ml

Çizelgedeki verilen miktarlara göre ilk önce tris çözeltisi hidroklorik asit ile 6.8 pH 'ya ayarlanır sonra SDS, β-merkatoetanol, örneklerin daha yoğun olmasını ve jelin altına çökmesini sağlamak için glycerol, jeldeki örneğin ilerlemesini izlemek için bromofenol mavisi boyası eklenir ve son olarak distile su ilave edip karıştırılır. Örnek yükleme tamponu hazırladıktan sonra 4°C'de saklanabilir (Zhang ve ark., 2009).

Protein Marker (MW: 120-20 kDa)

SDS-PAGE deneyinde örneklerin moleküler ağırlığının belirlemek için Thermo Scientific Prestained Protein Molecular Weight Marker-MAN0011770 olarak kullanılmıştır. Protein marker; 120, 85, 50, 35, 25, 20 kDa boyutlarındaki proteinleri ihtiva etmektedir.

Elektroforez Tamponu

Elektroforez Tamponu SDS-PAGE jel uygulamaları için kullanılan yürütme tamponudur. Nativ jel uygulamaları için SDS karışımından çıkarılarak ayrı bir yürütme tamponu hazırlanır. (Aygan, 2008; Bollag ve ark., 1996).

Çizelge 3.11. Elektroforez Tamponun İçeriği

Bileşimi	g/L
Tris	3
Glycine	14.4
SDS	1
dH ₂ O	1000mL

Jel boyama (Staining) Solüsyonu

Jeldeki protein bantlarını boyamak için kullanılmıştır. (Bollag ve ark., 1996).

Çizelge 3.12. Staining Solüsyonun içeriği

Bileşimi	mL/1000mL
Coomassie Brilliant Blue R-250	1 g
Methanol	450 ml
Acetic Acid	100 ml
dH ₂ O	450 ml

Coomassie Brilliant Blue metanol'da iyice çözündükten sonra filtre kâğıdından süzülüp üzerine asetik asit ve distile su eklenir. Hazırlanan boya amber şişesinde saklanır.

Jelden Boyayı Geri Alma (Destaining) Solüsyonu

Jeldeki ayrılmış protein bantlarının net görünebilmesi için fazla boyayı uzaklaştırma görevi yapar.

Çizelge 3.13. Destaining Solüsyonun içeriği

Bileşimi	mL/1000mL
Methanol	100
Acetic Acid	100
dH ₂ O	800

Destaining solüsyonunu hazırlamak için ilk önce bir beher içerisine su eklenir ardından yavaşça asetik asit eklenip karıştırılır ve son olarak metanol ilave edilir. Hazırlanan destaining solüsyonunu 4°C’de saklanır ve rengi mavi oluncaya kadar kullanılabilir (Bollag ve ark., 1996).

SDS-PAGE Zimogram Analizlerinde Kullanılan Renatürasyon Solüsyonları

Solüsyon I: 50 mM Na₂HPO₄, 50 mM NaH₂PO₄ (pH 7.2) ve %40 oranında izopropanol eklenerek hazırlanmıştır (Arıkan ve ark., 2003).

Solüsyon II: 50 mM Na₂HPO₄ ile 50 mM NaH₂PO₄ (pH 7.2) kullanılarak hazırlanmıştır (Arıkan ve ark., 2003).

Solüsyon III: 50 mM Na₂HPO₄, 50 mM NaH₂PO₄ (pH 7.2), 5 mM β-merkaptoetanol ve 1 mM EDTA’nın bileşiminden oluşmaktadır (Arıkan ve ark., 2003).

İyodin Solüsyonu

Zimogram analizinde aktivite bantlarının görünürlüğünü sağlamak için kullanılan iyodin çözeltisi, 5 g iyot ve 50 g potasyum iyodür (KI) içeren 1 L distile suda çözülerek hazırlanır (Aygan ve ark., 2014; Arkan ve ark., 2003).

3.1.5 İnce Tabaka Kromatografisi Solüsyonları

Butanol-Asetik Asit-Distile Su

Amilaz enzimine ait hidroliz ürünlerinin tayin etmek amacıyla hareketli faz olarak kullanılmıştır. Butanol- asetik asit- distile su sırasıyla 3:1:1 v/v/v hacminde hazırlanmıştır (Aygan ve ark., 2014; Arabacı, 2011).

Anilin- Difenilamin-Ortofosforik Asit Çözeltisi

Anilin (%1 v/v) ve difenilamin (%1 w/v) aseton içerisinde çözüldükten sonra karışıma, çözeltideki konsantrasyonu %10 olacak şekilde ortofosforik asit (v/v) ilave edilerek hazırlanmıştır (Aygan ve Arıkan, 2009).

D-Glikoz Çözeltisi (%4 w/v)

İnce tabaka kromatografisinde son ürünlerin belirtmek için standart olarak kullanılmıştır.

Maltoz Çözeltisi (%4 w/v)

İnce tabaka kromatografisinde son ürünlerin belirtmek için standart olarak kullanılmıştır.

Maltotrioz Çözeltisi (%4 w/v)

İnce tabaka kromatografisinde son ürünlerin belirtmek için standart olarak kullanılmıştır.

3.2 Metod

3.2.1 Bakteri İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Deniz Suyundan Bacillus sp. Suşlarının İzole Edilmesi

Mersin ve Karataş denizinden alınan deniz suyu örnekleri bir hafta -20°C’de bekletip ardından deniz suyu örneklerinden 1 mL alıp pH’sı 7.0 olan 50 mL N1 sıvı besiyeri içeren tüplere ekim yapıp 37°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminden sonra *Bacillus* sp. izolasyonu için 80°C’de 10 dakika süresiyle ısı şoku uygulanmıştır.

Örnekler, 37°C’de 24 saat çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından, tek koloniler elde etmek amacıyla pH 7.0 olan N1 agar besiyerine yayma ekimi yapılmış ve 37°C’de 72 saat inkübe edilmiştir. Bu inkübasyon süresinin sonunda, agarda farklı morfolojik özellikler gösteren tek koloniler çizgi yöntemiyle N1 agar besiyerine ekilmiş ve 37°C’de inkübe edilmiştir. N1 agar besiyerinde üreyen suşlar, sonraki analizler için stok kültür olarak saklanmıştır (Lennete ve ark., 1985).

Bakteri İdentifikasyonu

Seçilen bakteri örneklerinin tanımlanması için gram boyama ve spor oluşumu gibi mikroskopik testler gerçekleştirilmiştir (Ratanakhanokchai ve ark., 1999).

3.2.2 Enzim Aktivitelerinin Saptanması

Amilaz Enzimin Aktivitesini Katı Besiyerinde Saptanması

Morfolojik parametrelere göre tanımlanan *Bacillus* sp. suşları, M9 Nişasta agar besiyerine çizgi ekim tekniğiyle ekilmiştir. Daha sonra bu besiyeri, 37°C’de 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon tamamlandıktan sonra, amilaz aktivitesini belirlemek için koloniler iyot buharına tutulmuş ve boyama işlemi yapılmıştır.

Boyama sonucunda, nişastanın parçalanmadığı bölgeler koyu mavi renkte boyanırken, amilaz enzimi üreten ve nişastayı hidrolize eden kolonilerin etrafında şeffaf bir bölge oluştuğu gözlemlenmiştir. Etrafında bu hidroliz bölgesini gösteren koloniler amilaz pozitif olarak değerlendirilmiş, şeffaf zon oluşturmayan koloniler ise amilaz negatif olarak kabul edilmiştir (Arıkan ve ark., 2003).

Katı Besiyerinde Üreyen ve Amilaz Enzimi Sentezleyen Bacillus sp. Suşlarının pH Aralığının Belirlenmesi

Bu amaçla, pH değerleri 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0 ve 12.0 olan nişastalı M9 besiyerlerine, amilaz pozitif özellik gösteren tanımlanan suşlardan çizgi ekim yapılmıştır. Örnekler,

37°C’de üç gün inkübe edildikten sonra, hangi pH değerleri ve pH aralıklarında üreme gösterdikleri belirlenmiştir.

Besiyerinde substrat olarak nişasta kullanılmıştır. Agarda üreyen koloniler iyot buharına tutulmuş ve bu sayede enzim üretiminin gerçekleştiği pH aralığı ve pH değeri, koloni ve aktivite zonlarının çaplarını ölçerek belirlenmiştir (Arıkan ve ark., 2003).

Katı Besiyerinde Üreyen ve Amilaz Enzimi Sentezleyen Bacillus sp. Suşlarının Sıcaklık Aralığının Belirlenmesi

Bakteriler, optimum üremenin sağlandığı pH değerine sahip M9 Nişasta agar besiyerine çizgi ekim tekniğiyle ekilmiştir. Bu besiyerleri, 10°C, 20°C, 30°C, 40°C, 50°C’de sıcaklıklarında 72 saat inkübe edilmiştir. Bu işlemle, üremenin ve enzim sentezinin gerçekleştiği sıcaklık aralığı ve optimum sıcaklık değerleri belirlenmiştir (Arabacı, 2011; Voget ve ark., 2006).

Sıvı Kültürde Z28 Suşundan Amilaz Enzim Üretimi ve Kısmi Saflaştırma İşlemi

Amilaz enzim üretimi için seçilen Z28 suşu, pH 10.0 olan M9 sıvı nişasta besiyerine eklenmiş ve 40°C’de (katı besiyerinde optimum üreme sıcaklığı) ve 240 rpm’de çalkalayıcıda 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kültür, +4°C’de 7500 rpm’de 20 dakika santrifüj edilerek süpernatant elde edilmiştir ve temiz bir şişeye aktarılmıştır. Süpernatanta, örnek hacminin %70’i oranında soğuk etanol eklenmiş ve enzim presipite edilmiştir.

Presipitasyonun daha etkili olabilmesi için hazırlanan karışım -20°C’de bir gece bekletilmiştir. Sonrasında, örnek +4°C’de 10.000 rpm hızında 20 dakika santrifüj edilerek üst faz atılmış ve enzim çökeltisi elde edilmiştir. Çöken enzim, 0.1 M fosfat tamponunda (pH 7.0) yeniden sıvılaştırılmıştır (Srivastava, 1987; Arıkan, 2008).

Amilaz Enziminin Katı Besi Yeriindeki Aktivitesi

ZB28 suşunun sıvı kültüründen alkol presipitasyonu ile elde edilen amilaz enzimi optimum pH değerinde hazırlanmış %1’lik nişasta içeren agar besiyerine 100 µL damlatılmıştır. Amilaz enzimin damlatıldığı petri, enzimin üretildiği optimum sıcaklık ve inkübasyon süresine uygun olarak inkübe edilmiştir (Arabacı, 2018).

BSA Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması ve Protein Konsantrasyonunun Saptanması

Enzim çözeltilerindeki protein miktarı, Bradford yöntemine göre belirlenmiştir (Bradford, 1976). Bu yöntemi uygulamak için, BSA (sığır serum albumini) kullanılarak 1 mg BSA 1 mL pH2sı 7 tamponda çözülmüş ve BSA çözeltisinden bir stok çözelti hazırlanmıştır. Bu stok çözelti, BSA grafiği oluşturmak için kullanılmıştır. Protein miktarlarının belirlenmesi için, örneklerden alınan 0.1 mL’lik örnekler tüplere aktarılıp her birine 5 mL renklendirme çözeltisi eklenmiş ve 10 dakika inkübe

edilmiş, bu işlem Çizelge 3.15'te detaylandırılmıştır. Elde edilen karışımların 595 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri kullanılarak her BSA konsantrasyonu için (mg/mL), absorbans değerlerine karşı kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Bu grafik, protein konsantrasyonlarının doğru şekilde belirlenmesini sağlar (Bradford, 1976; Wu ve ark., 2018; Arabacı, 2018).

Çizelge 3.14. BSA Kalibrasyon Grafiğinin Hazırlanması

	BSA stok çözeltisi (mL)	pH 7.0 Tampon	Hazırlanan çözeltinin konsantrasyonu (mg/mL)
Kör	0	2	0
Örnek 1	0.0098	1.9951	0.0049
Örnek 2	0.0196	1.9804	0.0098
Örnek 3	0.04	1.96	0.02
Örnek 4	0.08	1.92	0.04
Örnek 5	0.12	1.88	0.06
Örnek 6	0.16	1.84	0.08
Örnek 7	0.2	1.8	0.1
Örnek 8	0.24	1.76	0.12
Örnek 9	0.28	1.72	0.14
Örnek 10	0.32	1.68	0.16
Örnek 11	0.36	1.64	0.18
Örnek 12	0.4	1.6	0.2

Glukoz Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması ve Amilaz Enzimine Ait Ünite Değerlerinin Hesaplanması

Enzim ünite miktarını belirlemek için gereken glukoz kalibrasyon eğrisi oluşturulurken, öncelikle 1mg/1 mL konsantrasyonda glukoz stok çözeltisi hazırlandı. Analiz için örnekler, Çizelge 3.14'te belirtildiği gibi her birinden 0.5 mL alınarak tüplere aktarıldı ve üzerlerine 1.5 mL DNS çözeltisi eklenerek işlem yapılmış. Tüpler, 10 dakika boyunca kaynar su banyosunda inkübe edildi ve daha sonra çeşme suyunda soğutulmuş. Her bir tüpe 4 mL distile su ilave edilmiş ve 540 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm yapılarak glukoz konsantrasyonlarına karşı absorbans değerleri belirlendi. Elde edilen absorbans değerleri kullanılarak glukoz konsantrasyonlarına karşı kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur (Arabacı, 2018; Msarah ve ark., 2020).

Çizelge 3.15. Glukoz Kalibrasyon Grafiğinin Hazırlanması

	Glukoz stok çözeltisi (mL)	dH ₂ O (mL)	Hazırlanan çözeltinin konsantrasyonu (μmol/mL)
Kör	0	2	0
Örnek 1	0.2	1.8	0.555
Örnek 2	0.4	1.6	1.11
Örnek 3	0.6	1.4	1.665
Örnek 4	0.8	1.2	2.22
Örnek 5	1	1	2.772
Örnek 6	1.2	0.8	3.33
Örnek 7	1.4	0.6	3.885
Örnek 8	1.6	0.4	4.44
Örnek 9	1.8	0.2	4.995
Örnek 10	2	0	5.55

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

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

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

V: Reaksiyon çözeltisinin hacmi (mL)

MA: Glukozun moleküler ağırlığı

VE: Enzimin hacmi (mL)

t: Reaksiyonun süresi (dakika)

Bir ünite (U) amilaz aktivitesi, enzimin optimum sıcaklık ve pH değerinde, nişastadan 1 dakika sonunda 1 μmol glukoz oluşturan enzim miktarı olarak ifade edilir (Bal, 2015).

Amilaz Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği pH aralığının Belirlenmesi

Alkol presipitasyon yöntemi ile kısmi saflaştırma işlemi sonucu elde edilen enzim çözeltisinin optimum aktivite gösterdiği pH değerini belirlemek amacıyla, %1'lik çözünür nişasta çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltiler, Na-fosfat (pH 6.0-8.0), Glisin (pH 8.5-10.5) ve Boraks (pH 11-13) tamponları kullanılarak oluşturulmuştur (Aygan, 2008).

Aktivite tayini için pH 6.0-13.0 aralığında %1 nişasta içeren çözeltiler hazırlanarak analiz gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için, 0.5 mL enzim ve 0.5 mL substrat karıştırılarak enzimin üretildiği sıcaklıkta 60 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, enzim-substrat karışımına eşit miktarda DNS ayırıcı (1 mL enzim + substrat, 1 mL DNS) eklenmiş ve karışım 5 dakika kaynatılmıştır.

Soğutma işleminden sonra, 540 nm dalga boyunda UV-visible spektrofotometre kullanılarak ölçüm yapılmıştır. Kontrol olarak, eşit hacimde substrat ve DNS karışımı kullanılmıştır.

En yüksek absorbans değerine sahip pH değeri 100 olarak kabul edilerek, diğer pH değerlerinden elde edilen veriler bu optimum değere göre oranlanmış ve böylece relatif enzim aktivitesi belirlenmiştir (Gessesse ve Gashe, 1997; Arıkan ve ark., 2003).

Amilaz Enzimin Aktivite Gösterdiği Optimum Sıcaklık Aralığının Belirlenmesi

Kısmi saflaştırma ile elde edilen enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerini belirlemek amacıyla, 0°C, 10°C, 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C ve 80°C sıcaklıklarda 60 dakika boyunca inkübasyonlar yapılmış ve relatif aktivite sonuçları incelenmiştir.

İnkübasyon süresinin tamamlanmasının ardından, reaksiyon karışımına eşit miktarda DNS çözeltisi eklenmiş, 5 dakika kaynatıldıktan sonra 540 nm dalga boyunda UV-visible spektrofotometre ile absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir.

Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık derecesini belirlemek amacıyla en yüksek absorbans değeri kullanılmıştır. Farklı sıcaklık derecelerinde elde edilen absorbans değerleri, optimum değere göre karşılaştırılarak relatif enzim aktivitesi hesaplanmıştır. Bu yöntem, amilaz enziminin çeşitli sıcaklıklarda nasıl performans gösterdiğini değerlendirmek için uygulanmıştır (Arıkan, 2008; Aygan, 2008; Arabacı, 2018).

Amilaz Enzimin Termal (Sıcaklık) Stabilitelerinin Belirlenmesi

Termal stabilitelerini belirlemek amacıyla enzimler, 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ve 90°C sıcaklıklarda 60 dakika ön inkübasyona tabi tutulmuştur. Bu ön inkübasyonun ardından, 0.5 mL enzim ve 0.5 mL substrat (optimum aktivitenin gerçekleştiği pH değerinde hazırlanmış) karıştırılarak, optimum aktivitenin görüldüğü sıcaklıkta 60 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda karışıma eşit hacimde DNS çözeltisi eklenmiş, 5 dakikalık soğutmanın ardından spektroskopik ölçüm gerçekleştirilmiştir.

Başlangıç enzim aktivitesini belirlemek amacıyla ön işlem görmemiş enzim kullanılarak standart aktivite analizi yapılmıştır ve bu sonuç 100 olarak kabul edilmiştir. Ön inkübasyon yapılan her sıcaklık için elde edilen sonuçlar, bu başlangıç aktivite değeriyle karşılaştırılarak yüzde olarak kalan enzim aktivitesi hesaplanmıştır (Srivastava, 1987; Gessesse ve Gashe, 1997; Aygan, 2008; Arabacı, 2018).

Amilaz Enzimin pH Stabilitelerinin Belirlenmesi

Stok enzim çözeltisinden 2 mL alınıp eppendorf tüpüne konmuş ve 11.000 devir/dakika hızında 15 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz atıldıktan sonra, tüpte kalan enzim üzerine pH 6.0, 7.0,

8.0, 9.0, 10.0, 11.0 ve 12.0 pH değerlerinde hazırlanan tampon çözeltilerinden 2'şer mL eklenerek enzim yeniden süspansiyon edilmiştir. Karışım, 37°C'de 24 saat ön inkübasyona bırakılmıştır.

Aktivite analizini yapmak için, ön inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiş enzimden 0.5 mL ve optimum pH'daki tampon çözeltisinde hazırlanmış substrattan 0.5 mL alınarak, enzimlerin optimum aktivite sıcaklığında (60°C) 60 dakika inkübe edilmiştir. Bu işlemden sonra standart aktivite analizi yapılmıştır. Başlangıç enzim aktivitesinin belirlenmesi için ön işlemden geçmemiş enzim kullanılmış ve elde edilen sonuç 100 olarak değerlendirilmiştir.

Farklı pH değerlerinde 24 saat ön işlemden geçirilen enzimlerden elde edilen aktivite sonuçları, başlangıç aktivite sonuçlarıyla karşılaştırılmış ve her pH değeri için relatif enzim aktivitesi hesaplanmıştır (Arabacı, 2018; Arıkan ve ark., 2003).

İnhibitör, Şelatör, Metal İyonu, Deterjan ve Okside Edici Ajanların Amilaz Enzimin Aktivitesi Üzerine Etkisini Saptanması

İnhibitör, şelatör, metal iyonu, deterjan ve okside edici ajan olarak EDTA, CaCl₂, ZnCl₂ ve BaCl₂ (her biri 5 mM olacak şekilde), 3 mM PMSF, %1 (v/v) SDS, %1 (v/v) β-Merkaptoetanol, %1 (w/v) Triton-X-100, %1 (v/v) Tween 80 ve PGL kullanılmıştır.

Enzim kimyasal etkileşimini belirlemek amacıyla stok enzim çözeltisinden 2 mL alınıp 8.000 dev/dk'da santrifüj edilmiştir. Üst faz atıldıktan sonra tüplere, farklı kimyasal maddelerden 2'şer mL eklenip süspansiyon hazırlanarak 35°C'de 60 dakika ön inkübasyon yapılmıştır.

Ön inkübasyon işlemine tabi tutulan enzim, optimum aktiviteyi gösterdiği substratla hazırlanan karışım kullanılarak optimum aktivite sıcaklığında 60 dakika boyunca inkübe edilmiş ve standart aktivite analizi gerçekleştirilmiştir.

Kontrol testi için, ön işlemi görmemiş enzim kullanılarak standart aktivite analizi yapılmış ve kontrol sonucu 100 olarak kabul edilmiştir. Kimyasal işlem sonuçlarıyla karşılaştırılarak kalan enzim aktivitesi belirlenmiştir (Arabacı, 2011; Arıkan, 2008).

NaCl'ün Amilaz Enzimin Aktivitesine Etkisinin Saptanması

Bacillus sp. ZB28 suşundan izole edilen amilaz enzim örneğinden 2'şer mL alınıp eppendorf tüplerine konularak, 8.000 dev/dakika 'da santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Sıvı faz atıldıktan sonra her bir tüpe sırasıyla üzerlerine 2'şer mL %3, %5, %10, %15, %20, %25 ve %30 konsantrasyonlardaki NaCl çözeltisi eklenip homojenize edilmiştir. Karışım 37°C'de 60 dakika süreyle ön inkübasyon işlemine bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda optimum sıcaklık ve pH aralığında standart enzim aktivite analizi gerçekleştirilmiştir.

Kontrol testi için, ön işlemden geçmemiş enzim kullanıp standart aktivite analizi yapılmış ve kontrolden elde edilen sonuç 100 kabul edilip, NaCl konsantrasyonlarından elde edilen sonuçlarla kıyaslanarak kalan enzim aktivitesi hesaplanmıştır. Başlangıç aktivite ölçümü kontrol (100) olarak

kabul edilmiş ve aktivite değişimi kontrol değerine göre % değer olarak belirlenmiştir (Arıkan, 2008; Arabacı, 2018).

3.2.3 SDS-PAGE Elektroforez Yöntemi ile Moleküler Ağırlığın Saptanması ve Zimogram Analizi

Amilaz enziminin moleküler ağırlığını belirlemek ve aktivitesini zimogram analizi ile incelemek için Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE) yöntemi kullanılmıştır. (Arabacı, 2011; Laemmli, 1970).

Ayırıcı Jelin Hazırlanması (%10)

%1 nişasta içeren %10'luk ayırıcı jel aşağıda verilen miktarlarda solüsyonlar ilavesiyle hazırlanmıştır (Temizkan ve Arda, 2008; Arabacı, 2011).

Çizelge 3.16. Ayırıcı Jelin Bileşimi (%10'luk)

Solüsyonlar	Miktar
Sol A	6.66 mL
Sol B	5 mL
Distile su	8.34 mL
AMPS	100 µL
TEMED	10 µL

Sol A, Sol B ve distile su, Çizelge 3.16'de belirtilen miktarlarda alınıp bir şişeye konur. Moleküler oksijenin uzaklaştırılması için 5 dakika boyunca vakum pompası kullanılarak degaz işlemi yapılır. Daha sonra, üzerine uygun miktarda yeni hazırlanmış AMPS çözeltisi ve TEMED eklenir ve hazırlanan iki cam levha arasındaki boşluğa bir şırınga yardımıyla üstten 4-5 cm boşluk kalacak şekilde dökülür. Jelin üst yüzeyi, atmosferik oksijenin geçişini engellemek ve düzgün bir yüzey elde etmek amacıyla, ince bir su tabakası eklenerek oda sıcaklığında 30-60 dakika boyunca polimerizasyona bırakılır (Bollag ve Edelstein, 1991; Arıkan ve ark., 2003; Arabacı, 2011).

Dengeleme Jelinin Hazırlanması (%5)

Çizelge 3.17. Dengeleyici Jelin Bileşimi

Solüsyonlar	Miktar
Sol A	2 mL
Sol C	2.5 mL
Distile su	5.425 mL
AMPS	75 µL
TEMED	25 µL

Polimerizasyon işlemi tamamlandıktan sonra, ayırma jelinin üst yüzeyindeki distile su boşaltılır ve üzerine uygun miktarda dengeleme jeli eklenir. Örnek sayısına uygun bir tarak yerleştirildikten sonra, jel oda sıcaklığında polimerizasyona bırakılır. Jel tamamen donduktan sonra, tarak dikkatlice çıkarılır ve jel, elektroforez tamponu ile yarısına kadar doldurulmuş tankın içine yerleştirilir; jel, kısa cam tarafı tankın içine bakacak şekilde konur. Tankın karşı tarafına iki cam levha yan yana yerleştirilir, uzun cam tarafı içeriye bakacak şekilde düzenlenir. Son olarak, iki cam levha arasına, jelin üzerine kadar ve tankın dışına 2-3 parmak yükseklikte elektroforez tamponu eklenir. (Bollag ve ark., 1996; Coşkun, 2010).

Enzim Örneklerinin SDS-PAGE Jeline Yüklenmesi ve Yürütülmesi

Polimerizasyon tamamlandıktan sonra jelde oluşan kuyulara, örnek yükleme tamponuyla karıştırılmış 40 µL enzim örneği yüklenmiştir. Elektroforez işlemi tamamlandığında, enzimin moleküler ağırlığı doğru bir şekilde belirlemek amacıyla, kuyulardan birine içeriğe ve moleküler ağırlığa bilinen bir protein standardı (marker) eklenir.

Örnekler yüklendikten sonra elektroforez işlemi başlatılır. İlk olarak, izleme boyası jel boyunca ilerleyene kadar yaklaşık 15 mA akım uygulanır; ardından akım 20 mA 'ye düşürülür. İzleme boyası jelin diğer ucuna yaklaşık 2 cm uzaklığa ulaştığında elektroforez işlemi sonlandırılır (Aygan, 2008; Arabacı, 2011).

SDS-PAGE Jelinin Boyanması

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel cam plakalar arasından çıkarılır. Marker proteininin ayrıldığı bölüm jelden kesilerek ayrılır ve marker bantlarının daha belirgin hale gelmesi için %1'lik gliserol çözeltisinde inkübe edilir. Jelin geri kalanı ise boyama çözeltisine daldırılarak 2 saat bekletilir. Bu sürenin ardından, jele bağlı fazla boyayı uzaklaştırmak için jel birkaç kez distile sudan geçirilir. Son olarak, boyanın tamamen çıkarılması için ılık bir ortamda (örneğin hafif karıştırma ile ısıtıcı plak üzerinde) 12 saat süresince destaining işlemi yapılır. Protein örneklerine

bağlanan boya jelden tamamen çıkmasa da jelin diğer bölgelerindeki fazla boya ortamdan uzaklaşır. Bu işlem sonucunda, örnekler daha belirgin hale gelir (Arabacı, 2011; Coşkun, 2010; Aygan, 2008).

SDS-PAGE Jelinin Renatürasyonu ve Zimogram Analizi

SDS-PAGE uygulamasında zimogram analizi yapılırken, elektroforez tamamlandıktan sonra boyama işlemi yerine renatürasyon süreci uygulanır. Bu süreç, jeldeki SDS'nin uzaklaştırılmasını sağlamak için üç farklı solüsyonda belirli sıcaklık ve sürelerle gerçekleştirilir. İlk olarak, jel oda sıcaklığında renatürasyon solüsyonu-1'de 1 saat, ardından solüsyon-2'de 1 saat ve son olarak solüsyon-3'te bir gece +4°C'de inkübe edilir. Son aşamada, amilaz enziminin aktivite bantlarını belirlemek için jel iyodin solüsyonu içinde 30 dakika boyanır (Arıkan ve ark., 2003).

3.2.4 İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) Plakalarının Hazırlanması ve Enzim-Substrat Reaksiyonu Sonunda Açığa Çıkan Son Ürünlerin Belirlenmesi

Nişastanın enzimatik hidrolizi sonucu oluşan ürünlerinin kalitatif olarak tayini ve amilazın tipini belirlemek için TLC analizi yapılmıştır. Sabit faz olarak TLC Silica Gel 60 F254 plakalar ve Hareketli faz olarak Butanol-asetik asit-distile su, 3:1:1 (v/v/v) kullanılmıştır. Bu işlem için 1 mL amilaz enzim çözeltisi, standart olarak 1 mL %1'lik glukoz, maltoz, maltotrioz çözeltileri kullanılmıştır.

İnce tabaka plakalarının alt kısmından 0.5 cm'lik bir boşluk olacak şekilde çizgi çizilmiştir. Sonra standart çözeltilerden sırasıyla Maltotrioz, maltoz, glukoz ve farklı oranlarda hazırlanan amilaz enzim örneklerden mikropipetle 15 µL alınarak ikişer santim aralıklarla plaklara damlatılmıştır. Hareketli faz için Butanol-asetik asit-distile su, 3:1:1 (v/v/v) karışımı hazırlandı. İnce tabaka kromatografi tankına bu karışımından 750 mL eklenmiş ve plaklar tanka yerleştirip örneklerin yürütülmesi için bir gece bekletilmiş. Yürütme işleminden sonra plaklar oda sıcaklığında 2 saat bekletmek suretiyle kurutmasını sağlanmıştır.

Boyama işlemi için Anilin- Difenilamin-Ortofosforik Asit Çözeltisi hazırlanmış. Sonra plakaları boya çözeltisiyle püskürterek boyanmasını sağlanmıştır. Boyanan plaklar oda sıcaklığında 2 saat kurutmasını beklenmiş, kuruyan plaklar 35-40 dk süreyle 120 °C'de inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Oluşan reaksiyon ürünleri ile marker karşılaştırılarak son ürün belirlenmiştir (Aygan ve Arıkan 2009; Aygan, 2008; Saraçoğlu,2010).

3.2.5 Amilaz Enziminin Antibakteriyel Aktivitesinin Tayini

Amilaz enzimi *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Campylobacter jejuni* patojen bakterilere karşı antibakteriyel aktivitesi kuyu difüzyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Yaygın patojenik bakterileri N1 sıvı besiyerine 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Bakteri süspansiyonu 10^{-2} sulandırıp pH'sı 9.0 olan N1 agar besiyerine yayma ekim ile aşılr ve 2 saat 37°C'de inkübe edildikten sonra agar petrisi üzerinde steril bir delici kullanılarak 6

mm çapında  oyuk açılır. Her kuyucuğa 100  L amilaz enzimi damlatılır. Petriler 24 saat boyunca 37 C'de ters çevrildi ve amilaz enziminin seçili patojenik bakterilere karşı antibakteriyel aktivitelerini belirlenmiştir (Al-Gburı, 2023).



4 BULGULAR VE TARTIŞMA

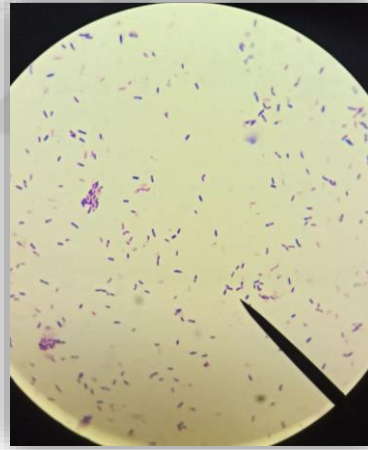
4.1 Bakteri İzolasyonu ve İdentifikasyonuna Ait Bulgular

4.1.1 Deniz suyundan *Bacillus* sp. Suşlarının İzolasyonu

Mersin İlinden ve Adana Karataş İlçesinden alınan, birbirine 5 km uzaklıkta noktalardan farklı deniz suyu örnekleri toplanmış. Toplanan örnekler, laboratuvar ortamında 80°C'de 10 dakika ön işleme tabi tutulmuş ve ardından tek koloni elde etmek amacıyla pH 7.0 olan N1 agar besiyerine ekilmiştir. Agarda tek koloni olarak üreyen, koloni morfolojisi *Bacillus* görünümlü 89 suş izole edilmiştir. Toplamda *Bacillus* benzeri 89 suş izole edilmiştir. Bu suşlardan 65 tanesi (%73) amilaz pozitif olarak tespit edilmiştir. Amilaz aktivitesi en yüksek olan ZB28 suşu, enzim üretimi ve karakterizasyonu amacıyla stok kültür olarak seçilmiş ve muhafaza edilmiştir.

4.1.2 Bakteri İdentifikasyonu Sonuçları

Seçilen suş, beyaz renkte ve dalgalı kenarlara sahip kolonilere sahip, gram pozitif, çubuk şeklinde, katalaz pozitif, aerobik ve endospor oluşturan tipik *Bacillus* bakterileri olarak tanımlanmıştır. (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. *Bacillus* sp. ZB28 Suşunun Gram Boyamasına Ait Mikroskop



Şekil 4.2. *Bacillus* sp. ZB28 suşu Katalaz testi sonucu

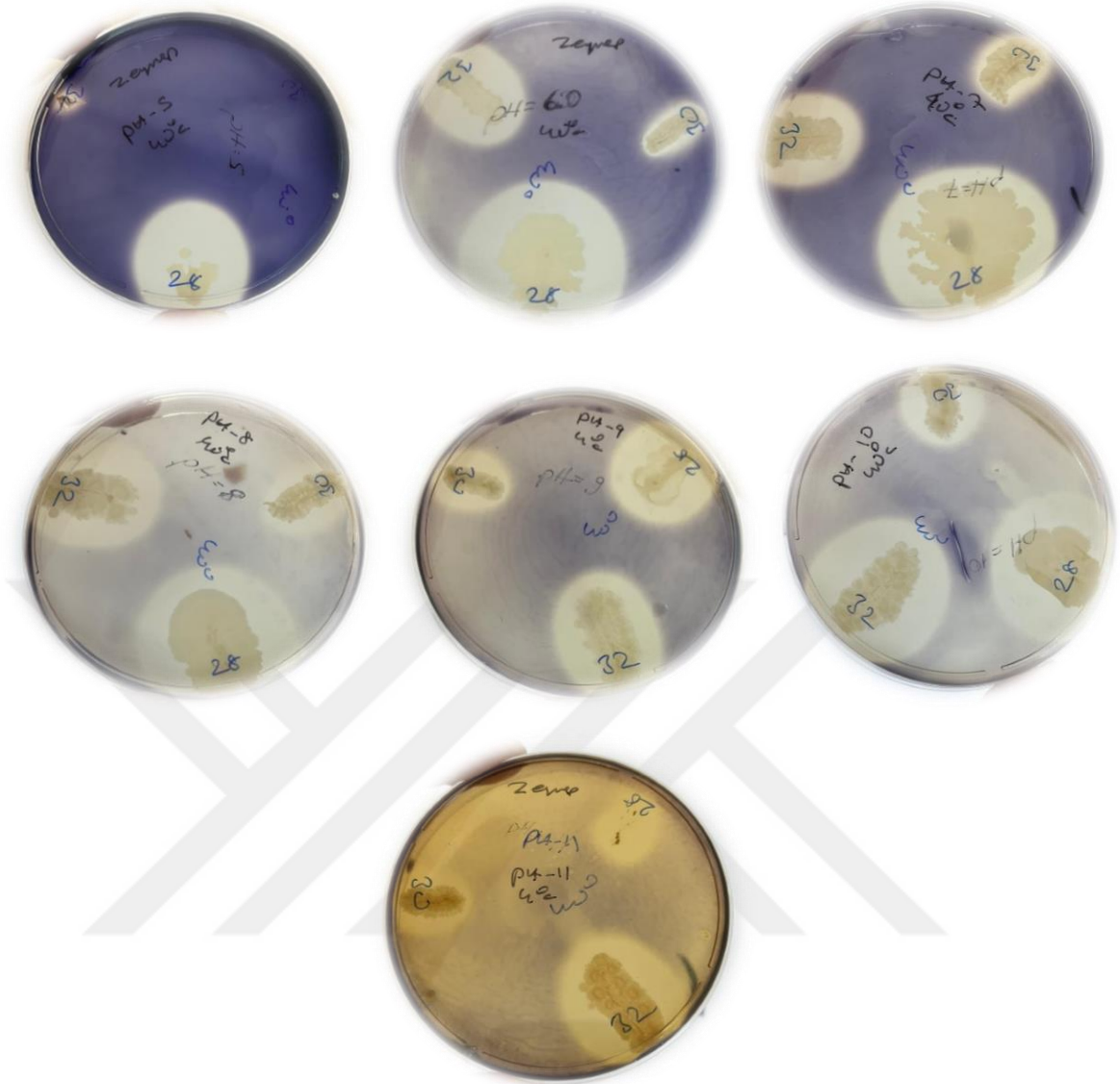
4.2 Katı Besiyerinde Üreyen ve Enzim Sentezi Gerçekleştiren Bakteri Suşlarının Sıcaklık ve pH Aralığının Belirlenmesine Ait Bulgular

İzole edilen bakteriler arasından en iyi üreme gösteren ve amilaz enzimi sentezleyen ZB28 suşu seçilmiştir. Bu suş, enzim üretimi ve karakterizasyonu için 20°C, 30°C, 40°C ve 50°C sıcaklıklarda ve pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0 ve 12.0 aralığındaki nişastalı M9 agar besiyerinde 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon tamamlandıktan sonra, bakterinin koloni çapı ve hidroliz zon çapı ölçülmüştür.

Çizelge 4.1. *Bacillus* sp. ZB28 bakterisinin 40°C'de ve farklı pH aralıklarında M9 nişasta içeren katı besiyerinde oluşan koloni ve aktivite zon çapları incelenmiştir.

İnkübasyon Sıcaklığı	İnkübasyon pH	İnkübasyon Süresi	Koloni Çapı (mm)	Zon Çapı (mm)	Net Aktivite Zonu (mm)
40°C	5	72 Saat	10	24	14
40°C	6	72 Saat	10	25	15
40°C	7	72 Saat	15	32	17
40°C	8	72 Saat	15	37	22
40°C	9	72 Saat	8	41	33
40°C	10	72 Saat	8	38	30
40°C	11	72 Saat	2	15	13
40°C	12	72 Saat	-	-	-

40°C inkübasyon koşullarında, *Bacillus* sp. ZB28 suşunun koloni çapları farklı pH değerlerinde şu şekilde ölçülmüştür: pH 5.0-6.0'da 10 mm, pH 7.0-8.0'da 15 mm, pH 9.0-10.0'da 8 mm ve pH 11.0'da 2 mm. pH 12.0'da ise bakteri çoğalması gözlemlenmemiştir. Katı besiyerindeki net aktivite zon çapları ise pH değerlerine göre şöyle belirlenmiştir: pH 5.0'de 14 mm, pH 6.0'da 15 mm, pH 7.0'de 17 mm, pH 8.0'de 22 mm, pH 9.0'da 33 mm, pH 10.0'da 30 mm ve pH 11.0'da 13 mm. En geniş net aktivite zon çapı, pH 9.0'da 33 mm olarak belirlenmiştir. (Çizelge 4.3.)



Şekil 4.3. *Bacillus* sp. ZB28 suşunun 40°C'de pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 ve 11.0 değerlerine sahip katı besiyerindeki koloni ve aktivite zon çapları

Batur ve Aygan (2015), *Bacillus* sp. A-3 suşunun pH 5.0-7.0 aralığında enzim sentezlediğini ve en yüksek amilolitik aktiviteyi 37°C sıcaklıkta ve pH 6.5'te gösterdiğini raporlamıştır.

Amilaz enzimin üretimi ve karakterizasyonu için inkübasyon sıcaklığı 40°C ve M9 nişasta besi yerin pH'sı 9 olarak seçilmiştir (Şekil 4.4).

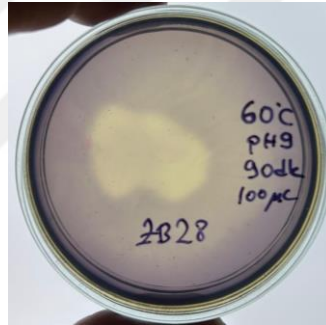


Şekil 4.4. *Bacillus* sp. ZB28 suşunun M9 nişasta katı besiyerinde Amilolitik aktivitesi

4.3 Amilaz Enziminin Aktivite Analizleri

4.3.1 Amilaz enziminin katı besiyerindeki aktivitesine dair elde edilen sonuçlar.

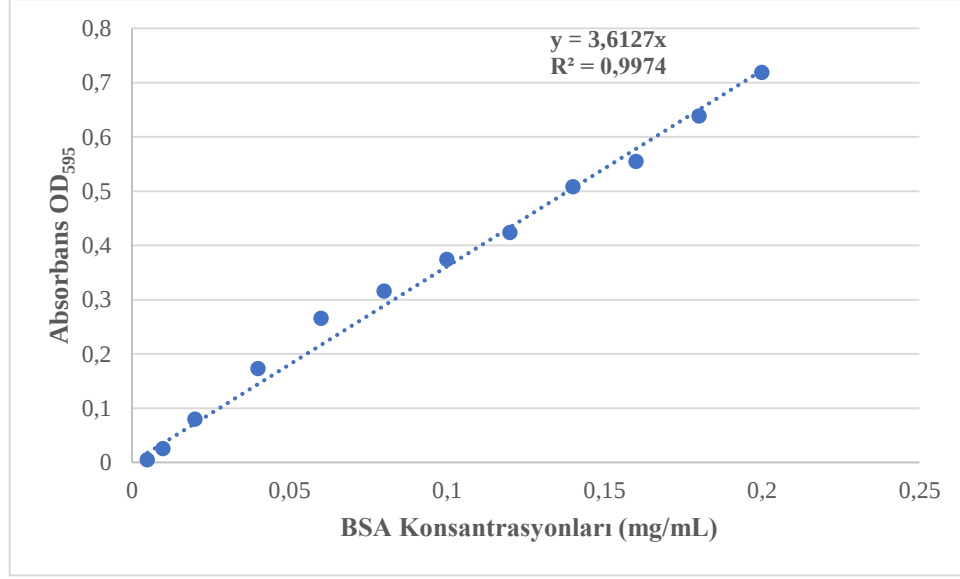
Bacillus sp. ZB28 suşunun sıvı kültüründen alkol ile çökeltilen amilaz enzimi kullanılarak nişastalı katı besiyerinde hidroliz testi gerçekleştirilmiştir. Bunun için, nişasta substratı içeren katı besiyerine 100 µL enzim damlatılmış ve optimum sıcaklık olan 60°C’de 90 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon işlemi tamamlandıktan sonra iyot ile boyama yapılmış ve oluşan aktivite zonu tespit edilmiştir. (Şekil 4. 5’te).



Şekil 4.5. ZB28 Suşundan Kısmi Saflaştırma ile Elde Edilen Enzim Çözeltilisinin M9 Agar Ortamında Gerçekleştiği Hidroliz zonu

4.3.2 Protein Konsantrasyonlarının Saptanması

Protein miktarını belirlemek için 595 nm’de 0.0049, 0.0098, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.12, 0.14, 0.16, 0.18 ve 0.2 mg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan BSA çözeltilerinin absorbans değerleri kaydedilmiştir. Şekil 4.5, BSA konsantrasyonları ile absorbans değerleri arasındaki doğrusal ilişkiyi gösterilmiştir.



Şekil 4.6. BSA Kalibrasyon Grafiği

Kalibrasyon grafiğinde elde edilen $R^2 = 0,9974$ değerine dayanarak, eğim 3,6127 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.6).

Burhanoğlu (2012) araştırmasında saflaştırdığı proteinin konsantrasyonu, Bradford yöntemi kullanılarak ölçmüştür. 595 nm'de farklı konsantrasyonlardaki BSA'nın optik yoğunlukları ile oluşturulan standart eğriye göre, saflaştırılan enzimin konsantrasyonu 1,1252 mg/mL olarak bulunmuştur.

Şahutoğlu (2013) Çalışmada, *Aspergillus oryzae*_ve_*Bacillus licheniformis*'ten elde edilen α -amilaz enzimleri ile *Aspergillus niger*'den elde edilen γ -amilaz enziminin preparat çözeltileri hazırlanmış ve bu çözeltilerin protein konsantrasyonları ile yüzdeleri Bradford yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. Elde edilen protein miktarları, *Aspergillus oryzae* α -amilazı için % 7,7 (20 mg/mL enzim preparatı içinde 1,54 mg/mL), *Bacillus licheniformis* α -amilazı için % 92,3 (4 mg/mL enzim preparatı içinde 3,7 mg/mL) ve *Aspergillus niger* γ -amilazı için % 17,0 (10 mg/mL enzim preparatı içinde 1,70 mg/mL) olarak belirlemiştir.

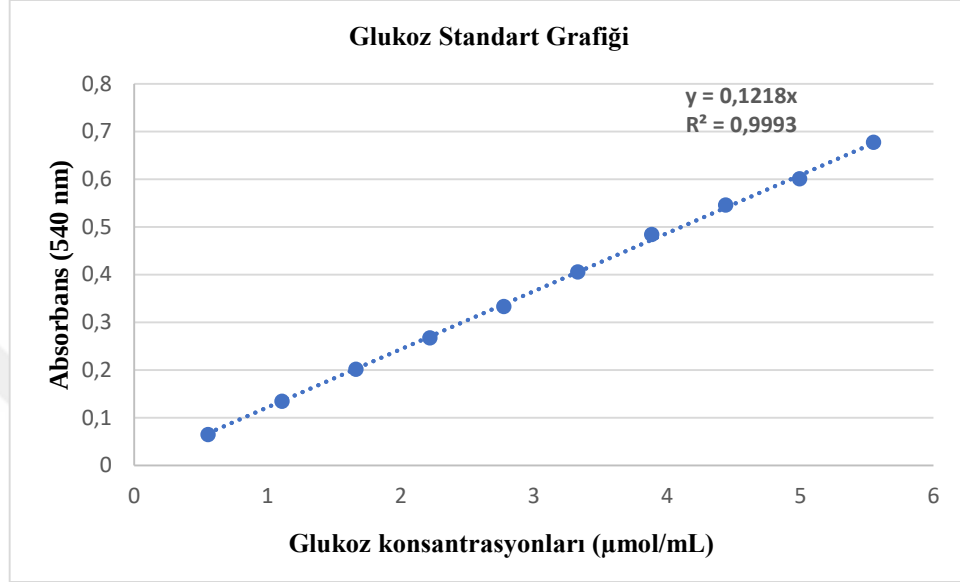
Arabacı (2018) çalışmasında izole ettiği NA1 alkali amilaz enziminin protein miktarını 0.0062 g/mL, NA2 asidik amilaz enziminin ise 0.003 mg/mL olarak tespit etmiştir.

Örtücü (2023) yaptığı çalışmada kısmi saflaştırmadan elde ettiği *Plectosphaerella cucumerina* OZ8 amilaz enzimi total protein solüsyonunun konsantrasyonu 0.037 mg/mL olarak belirlemiştir.

Bacillus sp. ZB28 suşuna ait amilaz enziminin protein miktarı 0.004 mg/mL olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuç literatür ile tam uyum içindedir.

4.3.3 Glukoz Kalibrasyon Grafiği ve Enzim Aktivite Analizleri

ZB28 amilaz enziminin spesifik aktivitesini belirlemek amacıyla, 0.555, 1.11, 1.665, 2.22, 2.772, 3.33, 3.885, 4.44, 4.995 ve 5.55 $\mu\text{mol/mL}$ konsantrasyonlarındaki glukoz çözeltilerinin 540 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ölçülmüştür. Şekil 4.6'da glukoz konsantrasyonları ile absorbans değerleri arasındaki doğrusal ilişki gösterilmiştir.



Şekil 4.7. Glukoz Kalibrasyon Grafiği

Kalibrasyon grafiğinde elde edilen $R^2 = 0,9993$ değerine dayanarak, eğim 0,1218 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.7).

Bacillus sp. ZB28 suşunun amilaz enziminin spesifik aktivitesi 10.31 U/mL olarak tespit edilmiştir.

Arabacı (2018) çalışmasında izole ettiği NA1 alkali amilaz enziminin 12.063 U/mL, NA2 asidik amilaz enziminin ise 4.604 U/mL aktiviteye sahip olduğunu bildirmiştir.

Karaca (2018) tarafından yapılan araştırmada, *Aspergillus section Nigri* izolatları arasında en yüksek aktivite değeri, buğday kepeği besiyerinde 8 gün boyunca yapılan inkübasyon sonucunda BA-14 izolatu için 1,371 U/mL olarak belirlenmiştir.

4.4 Enzimlerin Karakterizasyonuna İlişkin Sonuçlar

4.4.1 Amilaz Enziminin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Aralığının Belirlemesine Ait Sonuçlar

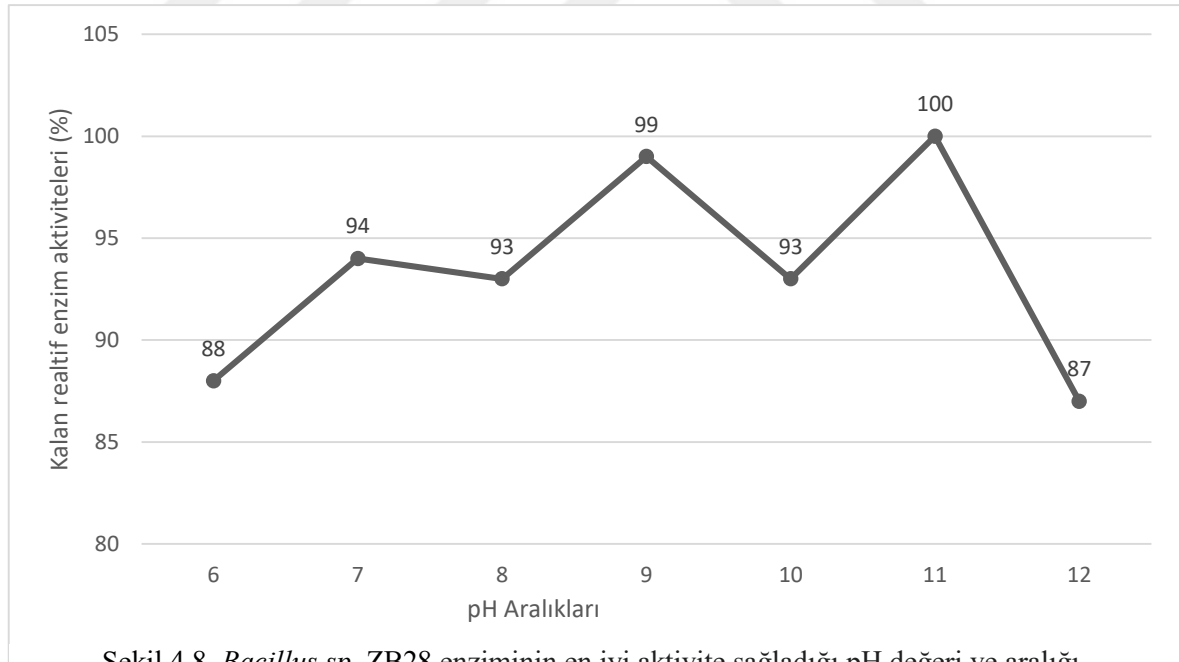
Bacillus sp. ZB28 suşundan elde edilen amilaz enziminin optimum pH değerini belirlemek amacıyla, Na-Fosfat tamponu (pH 6.0-8.0), Glisin-NaOH tamponu (pH 8.5-10.0) ve Borax-NaOH tamponu (pH 11.0-13.0) kullanılarak 40°C'de 60 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, Çizelge 4.5 ve Şekil 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. *Bacillus* sp. ZB28 suşundan üretilen amilaz enziminin en uygun pH değeri.

pH	İnkübasyon Sıcaklığı	İnkübasyon Süresi	%Aktivite
6.0	40°C	60dk	88
7.0	40°C	60dk	94
8.0	40°C	60dk	93
9.0	40°C	60dk	99
10.0	40°C	60dk	93
11.0	40°C	60dk	100
12.0	40°C	60dk	87

Bacillus sp. ZB28 amilaz enziminin pH aralığında gösterdiği aktivite incelendiğinde, en yüksek enzim aktivitesinin pH 11.0'da %100 olarak saptanmıştır. Bu bulgu, *Bacillus* sp. ZB28 amilazının alkalın koşullarda, özellikle pH 11.0 civarında optimum aktiviteye ulaştığını göstermektedir.

Diğer pH aralıkları incelendiği zaman, pH 6.0'da %88, pH 7.0'de %94, pH 8.0'da %93, pH 9.0'da %99, pH 10.0'de %93, pH 12.0'de %87 oranında aktivite gösterilmiştir. Elde edilen bütün pH'lar incelendiği zaman, enzimin %93 oranında oldukça yüksek bir ortalama aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.8. *Bacillus* sp. ZB28 enziminin en iyi aktivite sağladığı pH değeri ve aralığı.

Mamo ve Gessesse (1999), Termofilik *Bacillus* sp. WN11 suşundan ürettikleri iki α -amilaz, Amy I ve Amy II pH 5,5'te optimum aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Arabacı (2011) tarafından yapılan araştırmada, *Bacillus* sp. NCA35 suşundan elde edilen amilaz enziminin maksimum aktivitesini pH 8.0'de sergilediği tespit etmiştir.

Batur ve Aygan (2015), *Bacillus* sp. A-3 suşundan ürettikleri amilaz enzimine ait optimum pH aralığının 6.0-6.5 olduğunu bulmuşlardır.

Özdolap (2021), *Bacillus* sp. ZF4 ve *Bacillus* sp. A4 ve *Bacillus* sp. ZF4 suşundan izole edilen iki α -amilaz enzimi, *Bacillus* sp. ZF4'ün α -amilazı, optimum pH 6.0'da en yüksek aktiviteyi gösterdiğini, *Bacillus* sp. A4'ün α -amilazı ise pH 8.0'da en iyi aktivite olduğunu bulmuştur.

Asha ve arkadaşları (2013), topraktan izole ettikleri *Bacillus halodurans* bakterisinden elde ettikleri pullulanaz enziminin aktivite analizlerini pH 3.0-11.0 aralığında gerçekleştirmiştir. Bu analizler sonucunda, enzimin en yüksek aktivitesini pH 10.0'da gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Simair ve ark (2017), Deniz suyu ve topraktan izole ettikleri *Bacillus* sp. BCC 021-50 suşundan ürettikleri amilaz enziminin pH 7,50'de maksimum aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Amilazlar, pH 2 ile 12 aralığında değişken optimum pH koşullarında elde edilmiştir (Pandey ve ark. 2000); özellikle bakteriyel kökenli amilazların asidik pH seviyelerinde aktif olduğu bilinmektedir (Yang ve ark. 2011). *Bacillus* sp. ZB28 suşundan üretilen amilaz enzimine ait en iyi aktiviteye sahip olduğu pH değeri, literatürdeki bulgularla tutarlı ve uyumludur.

4.4.2 Amilaz Enziminin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Değerinin Saptanmasına Ait Bulgular

Bacillus sp. ZB28 suşundan üretilen amilaz enziminin optimum sıcaklık değerini tayin etmek amacıyla 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 ve 80°C sıcaklık derecelerinde 60 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Elde edilen bulgular çizelge 4.6 ve şekil 4.9'da yer almaktadır.

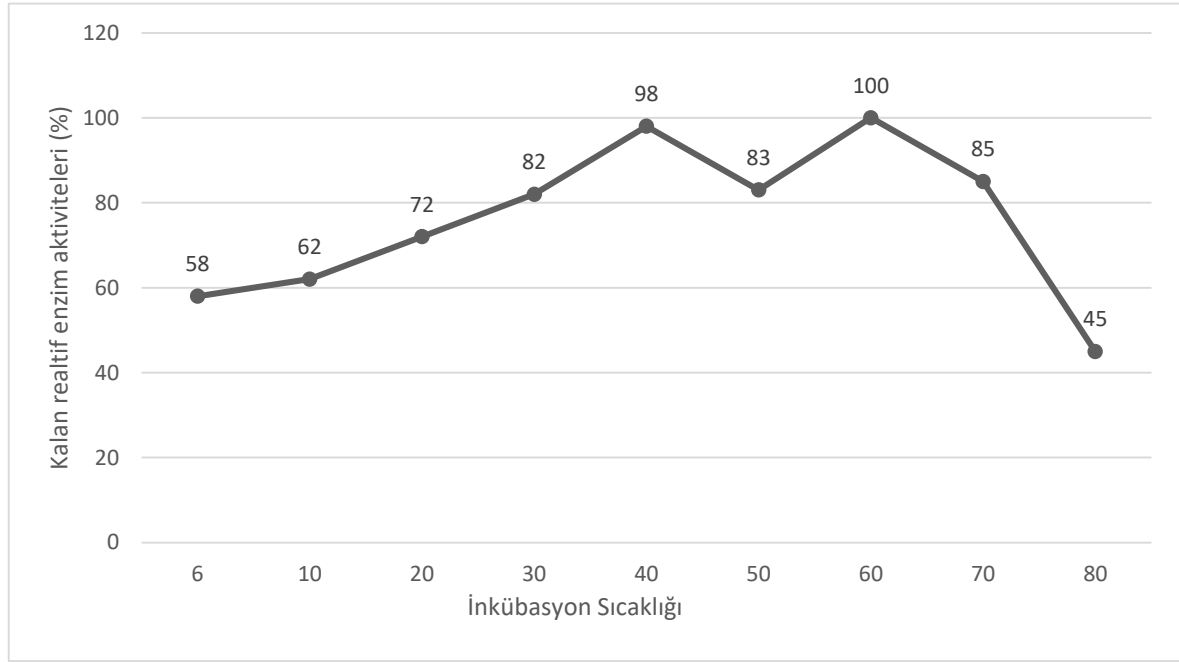
Çizelge 4.3. *Bacillus* sp. ZB28 suşundan üretilen amilaz enziminin en iyi sıcaklık değeri

İnkübasyon Sıcaklığı	İnkübasyon pH'sı	İnkübasyon Süresi	%Aktivite
0°C	11	60dk	58
10°C	11	60dk	62
20°C	11	60dk	72
30°C	11	60dk	82
40°C	11	60dk	98
50°C	11	60dk	83
60°C	11	60dk	100
70°C	11	60dk	85
80°C	11	60dk	45

Enzim aktivitesini etkileyen önemli faktörlerden biri olan sıcaklığın aktivite üzerindeki etkisi araştırıldığında, en yüksek aktivitenin 60°C'de %100 seviyesinde olduğu belirlenmiştir. Sıcaklık 40°C ile 70°C arasında enzim aktivitesi yüksek seviyelerde kalmış, 40°C'de %98, 50°C'de %83 ve 70°C'de %85 aktivite gözlenmiştir. Ancak sıcaklık 80°C'ye yükseldiğinde enzim aktivitesi belirgin

şekilde azalarak %45'e düşmüştür. Daha düşük sıcaklıklarda, özellikle 0°C ile 30°C arasında, aktivite %58 ile %82 arasında değişmektedir.

Bu veriler, *Bacillus* sp. ZB28 amilaz enzimine ait optimum sıcaklık 60°C olduğunu ve amilaz enziminin bu sıcaklıkta optimum aktiviteyi gösterdiğini ortaya koymaktadır. Ayrıca, 40°C ile 70°C arasında geniş bir sıcaklık aralığında enzim yüksek aktivitesini korumaktadır, bu da enzimin termostabil olduğunu ortaya koymaktadır.



Şekil 4.9. *Bacillus* sp. ZB28 amilaz enziminin en iyi aktivite sağladığı sıcaklık değeri ve aralığı.

Arabacı (2011), *Bacillus* sp. NCA35 suşundan izole ettiği amilaz enzimine ait maksimal aktivitesini 25°C 'de gösterdiğini tespit etmiştir.

Batur ve Aygan (2015), *Bacillus* sp. A-3 suşundan elde ettikleri amilaz enziminin en iyi sıcaklığı 35°C olup, 25-65°C arasında ortalama %68 rölatif aktiviteye sahip olduğunu belirlemişlerdir.

Tatar (2007), Termofil, alkalın ve halofil özelliklere sahip *Bacillus* sp. SB-28 suşundan üretilen amilaz enziminin en iyi aktivite sıcaklığını 140°C olarak tespit etmiştir. Aynı zamanda, amilaz enziminin 130°C'de %91, 150°C'de %93 ve 10°C'de %86.5 aktivite gösterdiğini tespit etmiştir.

Özdolap (2021), *Bacillus* sp. ZF4 ve *Bacillus* sp. A4 ve *Bacillus* sp. ZF4 suşundan izole edilen iki α -amilaz enzimi, *Bacillus* sp. ZF4'ün α -amilazı 40°C'de en yüksek aktiviteyi gösterdiğini, *Bacillus* sp. A4'ün α -amilazı ise 40-50°C aralığında en iyi aktivite olduğunu bulmuştur.

Simair ve ark (2017), Deniz suyu ve topraktan izole ettikleri *Bacillus* sp. BCC 021-50 suşundan ürettikleri amilaz enziminin 70°C'de en yüksek aktiviteyi sergilediğini tespit etmişlerdir.

Literatür verileri ile *Bacillus* sp. ZB28 suşundan izole edilen amilaz enziminin optimum aktivite sıcaklığı değerleri karşılaştırıldığında, elde edilen bulguların literatürdeki verilerle büyük ölçüde örtüştüğü görülmüştür.

4.4.3 Amilaz Enziminin pH Stabilitesinin Saptanmasına Ait Bulgular

Bacillus sp. ZB28 amilaz enzimi, pH 6.0–12.0 arasında çeşitli tampon sistemleri içeren pH çözeltilerinde 37°C'de 24 saat süreyle ön inkübasyona tabi tutulmuş ve sonrasında kalan relatif aktivite değerleri ölçülmüştür. Elde edilen bulgular, çizelge 4.7 ve şekil 4.10'da sunulmuştur.

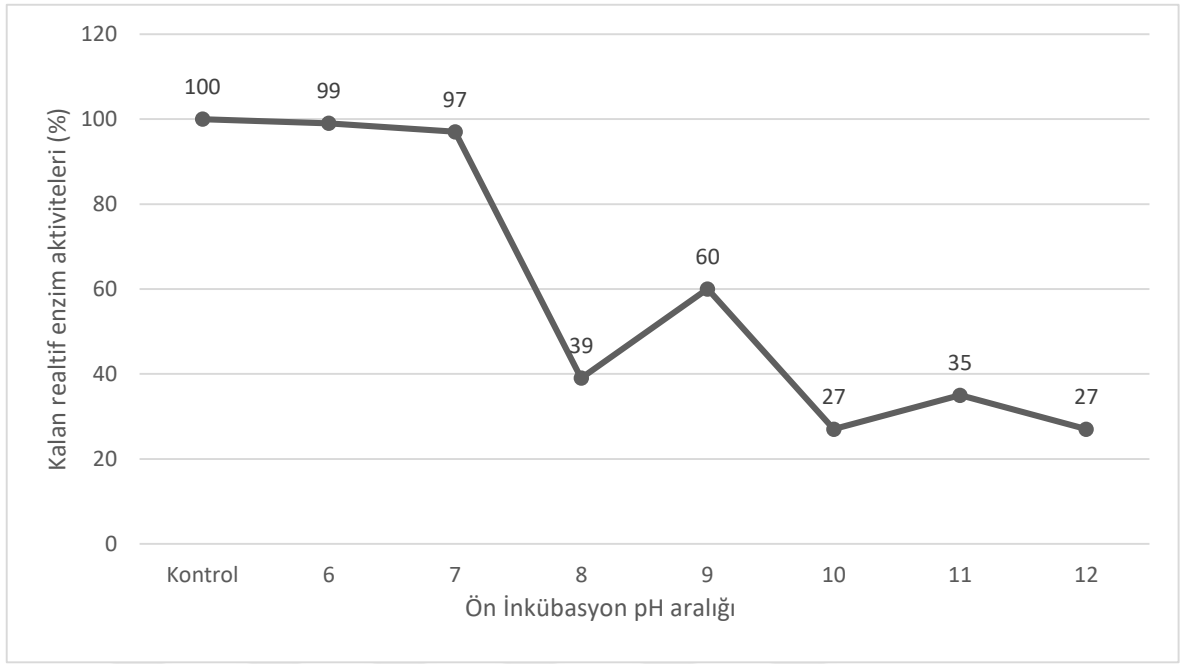
Çizelge 4.4. *Bacillus* sp. ZB28 amilaz enziminin pH stabilitesine ait Bulguları

pH	Ön İnkübasyon Sıcaklığı	İnkübasyon Sıcaklığı	Ön İnkübasyon Süresi	İnkübasyon Süresi	%Aktivite
Kontrol	-	60°C	-	60dk	100
6	37°C	60°C	24 saat	60dk	99
7	37°C	60°C	24 saat	60dk	97
8	37°C	60°C	24 saat	60dk	39
9	37°C	60°C	24 saat	60dk	60
10	37°C	60°C	24 saat	60dk	27
11	37°C	60°C	24 saat	60dk	35
12	37°C	60°C	24 saat	60dk	27

ZB28 amilaz enziminin, pH 6 ve 7 gibi hafif asidik ve nötr koşullarda oldukça yüksek bir stabilite göstermiştir. pH 6'da aktivite %99, pH 7'de ise %97 olarak gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, enzimin hafif asidik ve nötr pH'larda neredeyse tüm aktivitesini koruduğunu göstermektedir. Bu durum, *Bacillus* sp. ZB28 amilaz enziminin bu pH aralıklarında oldukça kararlı olduğunu ve bu koşullarda stabil çalışabildiğini gösterir.

pH 8'den itibaren enzim aktivitesinde önemli bir düşüş görülmektedir. pH 8'de aktivite %39'a, pH 9'da %60'a inmiştir. Daha alkali koşullarda (pH 10, 11 ve 12) enzim aktivitesi ciddi oranda düşmektedir. pH 10'da aktivite %27'ye, pH 11'de %35'e, pH 12'de ise tekrar %27'ye düşmüştür. Bu, enzimin aşırı alkali koşullarda kararlılığını kaybettiğini ve denatürasyona uğrayabileceğini göstermektedir. Özellikle pH 8'in üzerinde enzim aktivitesinde ani düşüşler, enzimin alkalik ortamda daha az stabil olduğunu göstermektedir.

İncelenen pH 8 ve üstü koşullarda enzim aktivitesinin önemli ölçüde azalması, *Bacillus* sp. ZB28 amilazının alkalik ortamlarda stabilitesinin düşük olduğunu ve optimum stabiliteyi daha nötr pH seviyelerinde gösterdiğini vurgulamaktadır.



Şekil 4.10. *Bacillus* sp. ZB28 amilaz enziminin pH stabilite bulguları

Mamo ve Gessesse (1999), Termofilik *Bacillus* sp. WN11 suşundan elde ettikleri iki α -amilaz, Amy I ve Amy II 5,5-9,0 pH aralığında stabil kaldığını tespit etmişlerdir.

Arabacı (2011), *Bacillus* sp. NCA35 suşundan izole ettiği amilaz enziminin 24 saat boyunca pH 8.0-12.0 aralığındaki alkali ortamlarda orijinal aktivitesinin ortalama %53 koruduğunu ve pH stabilitesi sergilediğini tespit etmiştir.

Bacillus sp. ZB28 amilaz enziminin pH stabilitesi ile ilgili elde edilen sonuçlar, literatürdeki verilerle büyük oranda uyumlu bir şekilde örtüşmektedir. Enzim, 24 saat boyunca pH 6.0-7.0 aralığında orijinal aktivitesinin ortalama %98'ini koruyarak pH stabil özellikler sergilemiştir.

4.4.4 Amilaz Enziminin Termal Stabilitesinin Belirlenmesine Ait Bulgular

Bacillus sp. ZB28 amilaz enziminin termal stabilite aralığını tayin etmek için amilaz enzimi 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ve 90°C aralığındaki sıcaklık değerlerinde ön inkübasyonda 60 dakika bekletilmiş. Ön inkübasyon sonrasında, pH 11.0'daki substrat çözeltisi kullanılarak optimum aktivite sıcaklığı olan 60°C'de enzim aktivitesi belirlenmiştir. Elde edilen bulgular, çizelge 4.8 ve şekil 4.11'de gösterilmiştir.

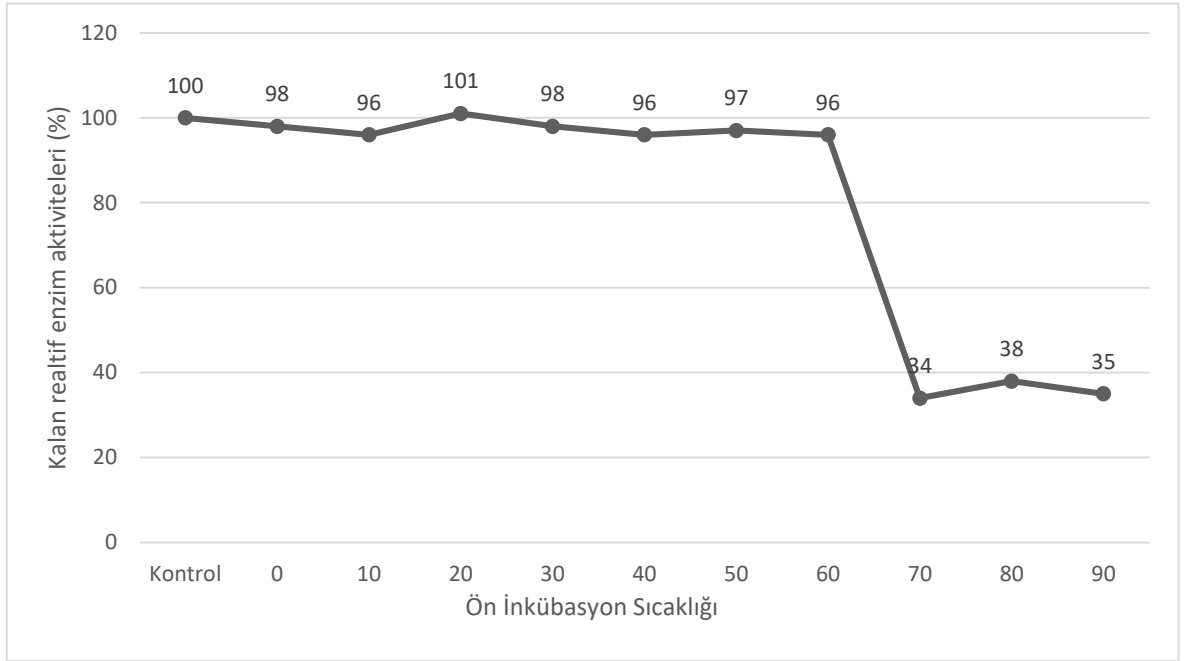
Çizelge 4.5. *Bacillus* sp. ZB28 suşunda üretilen amilaz enziminin sıcaklık stabilite Bulguları

Ön İnk. Sıcaklığı	Ön İnkübasyon Süresi	İnkübasyon pH	İnkübasyon Sıcaklığı	İnkübasyon Süresi	%Aktivite
Kontrol	-	11	60°C	60dk	100
0°C	60dk	11	60°C	60dk	98
10°C	60dk	11	60°C	60dk	96
20°C	60dk	11	60°C	60dk	101
30°C	60dk	11	60°C	60dk	98
40°C	60dk	11	60°C	60dk	96
50°C	60dk	11	60°C	60dk	97
60°C	60dk	11	60°C	60dk	96
70°C	60dk	11	60°C	60dk	34
80°C	60dk	11	60°C	60dk	38
90°C	60dk	11	60°C	60dk	35

ZB28 amilaz enziminin sıcaklık stabilitesini belirlemek amacıyla yapılan deneyde, 0-90°C arasındaki sıcaklıklarda 60 dakikalık bir ön inkübasyon uygulanmıştır. Farklı sıcaklıklarda ön işleme tabi tutulan ZB28 amilaz enzimi, 0°C ile 60°C arasındaki sıcaklık aralığında oldukça stabil bir performans sergilemektedir. Bu sıcaklıklarda aktivite %96 ile %101 arasında değişmektedir. 20°C'de enzim aktivitesi %101 ile kontrol seviyesinin de üzerine çıkmıştır, bu da enzimin bu sıcaklıkta doğal stabilitesini koruduğunu ve bazı koşullarda hafif bir aktivite artışı dahi gösterebildiğini işaret eder. Bu veriler, *Bacillus* sp. ZB28 amilazının düşük ve orta sıcaklıklarda (0°C-60°C) yüksek termal stabiliteye sahip olduğunu ve yapısal bütünlüğünü koruyabildiğini göstermektedir.

70°C'de ZB28 amilaz enziminin aktivitesi dramatik bir şekilde azalmış ve %34'e düşmüştür. 80°C ve 90°C'de de aktivite oldukça düşüktür; sırasıyla %38 ve %35 seviyelerine inmiştir. Bu sıcaklıklarda enzim yapısının bozulduğu veya denatüre olduğu düşünülebilir. 70°C ve üstü sıcaklıklar, *Bacillus* sp. ZB28 amilazı için termal stabilitenin sınırları olduğunu göstermektedir. Bu sıcaklıkta enzimin termal stabilitesinin ciddi şekilde bozulduğu gözlemlenmiştir.

60°C'ye kadar enzim aktivitesini büyük ölçüde korurken, 70°C ve üzerinde ZB28 amilazı enziminin aktivitesinde ciddi bir düşüş yaşanmaktadır. Bu, enzimin 60°C'ye kadar olan sıcaklıklarda yüksek stabiliteye sahip olduğunu, ancak bu sıcaklık eşiğinin aşılmasından sonra hızla stabilitesini kaybettiğini gösterir.



Şekil 4.11. *Bacillus* sp. ZB28 amilaz enziminin sıcaklık stabilite bulguları

Arabacı (2011), *Bacillus* sp. NCA35 amilaz enzimi, 10-40 °C arasında 30 dakika süresince inkübe edildiğinde aktivitesinin yaklaşık %96'sını korumuştur. Ayrıca, 25 °C'de 24 saat boyunca ortalama %53'lük bir stabilite sergilemiştir.

Özcan ve Özdemir (2020), *Bacillus* sp. GA4 suşundan izole edilen α -amilaz enzimi, 40 °C'de 30 dakika inkübe edildiğinde tam aktivitesini korumuştur. Ancak, 50 °C ve 60 °C'de aynı süre sonunda sırasıyla %21 ve %37 oranında aktivite kaybetmiştir.

Özdoğru (2021), *Bacillus* sp. ZF4 ve *Bacillus* sp. A4 ve *Bacillus* sp. ZF4 suşundan izole edilen iki α -amilaz enzimi, *Bacillus* sp. ZF4'ün α -amilazı 70°C'de 15 dakika inkübasyon sonrasında tüm aktivitesini koruduğunu ve bu sıcaklık değerinden sonra hızlı bir aktivite kaybı olduğunu bildirmiştir. *Bacillus* sp. A4'ün α -amilazı ise 70°C'ye kadar büyük ölçüde stabil kaldığını saptamıştır.

Batur ve Aygan (2015), *Bacillus* sp. A-3 suşundan izole ettikleri amilaz enzimin 40°C'ye kadar termostabil kaldığını bulmuşlardır.

Bacillus sp. ZB28 suşundan izole edilen amilaz enzimi, 60 °C'ye kadar termostabil kalmış olup, bu bulgu literatürdeki verilere kıyasla çok daha yüksek bir kararlılık sergilediğini göstermektedir.

4.4.5 Amilaz Enzimi Aktivitesi Üzerine İnhibitör, Şelatör, Metal İyonu, Deterjan ve Okside edici Ajanların Etkisinin Saptanmasına Ait Sonuçlar

Bacillus sp. ZB28 amilaz enziminin inhibitörler, şelatörler, metal iyonları, deterjanlar ve okside edici ajanlar üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla, 37 °C'de 60 dakika süreyle ön

inkübasyona tabi tutulmuş ve ardından kalan aktivite aralıkları hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar, Çizelge 4.9 ve Şekil 4.12'de sunulmuştur.

Çizelge 4.6. İnhibitör, şelatör, metal iyonları ve deterjanların etkilerine ait bulgular

İnhibitör	İnhibitör Konsatrasyonu	Ön İnkübasyon Sıcaklığı	Ön İnkübasyon Süresi	İnkübasyon Sıcaklığı	İnkübasyon Süresi	%Aktivite
Kontrol	-	-	-	60°C	60dk	100
EDTA	5mM	37°C	60dk	60°C	60dk	29
CaCl ₂	5mM	37°C	60dk	60°C	60dk	22
ZnCl ₂	5mM	37°C	60dk	60°C	60dk	1
BaCl ₂	5mM	37°C	60dk	60°C	60dk	17
PMSF	3mM	37°C	60dk	60°C	60dk	15
SDS	% 1	37°C	60dk	60°C	60dk	9
β-Merk.	% 1	37°C	60dk	60°C	60dk	69
TritonX-100	% 1	37°C	60dk	60°C	60dk	16
Tween 80	% 1	37°C	60dk	60°C	60dk	20
PGA	5mM	37°C	60dk	60°C	60dk	33

β-Merk.: β-Merkaptoetanol

Bacillus sp. ZB28 amilaz enzimi 5 mM konsantrasyonlarındaki EDTA, CaCl₂, ZnCl₂, ve BaCl₂ ile 60 dakika inkübasyona bırakılmış ve orjinal enzim aktivitesinin, sırasıyla, %29, %22, %1 ve %17, oranında korunduğunu saptanmıştır. Enzim, 3 mM PMSF'ye %15 direnç göstermiştir.

EDTA (5 mM) EDTA, divalent katyonları bağlayarak amilaz enzimini inhibe eder. %29 aktivite ile EDTA, enzimin aktivitesini önemli ölçüde düşürmüştür. Bu durum, enzimin işlevselliği için iki değerlikli katyonların önemli olduğunu gösterir.

CaCl₂ (5 mM) Kalsiyum iyonu (Ca²⁺), enzimin %22 aktivitesine sebep olmuştur, bu da kalsiyumun inhibe edici etkisini ortaya koyar. Kalsiyum genellikle amilazlar için stabilize edici bir etki gösterebilir, ancak bu durumda inhibe edici bir rol oynamıştır.

ZnCl₂ (5 mM) Çinko iyonu (Zn²⁺), enzimi neredeyse tamamen inhibe etmiştir ve sadece %1 aktivite gözlenmiştir. Bu, Zn²⁺'nin *Bacillus* sp. ZB28 amilazı üzerinde güçlü bir inhibitör etkisi olduğunu göstermektedir.

BaCl₂ (5 mM): Baryum iyonu (Ba²⁺), enzimin %17 aktivitesine neden olmuş ve inhibe edici bir etki göstermiştir.

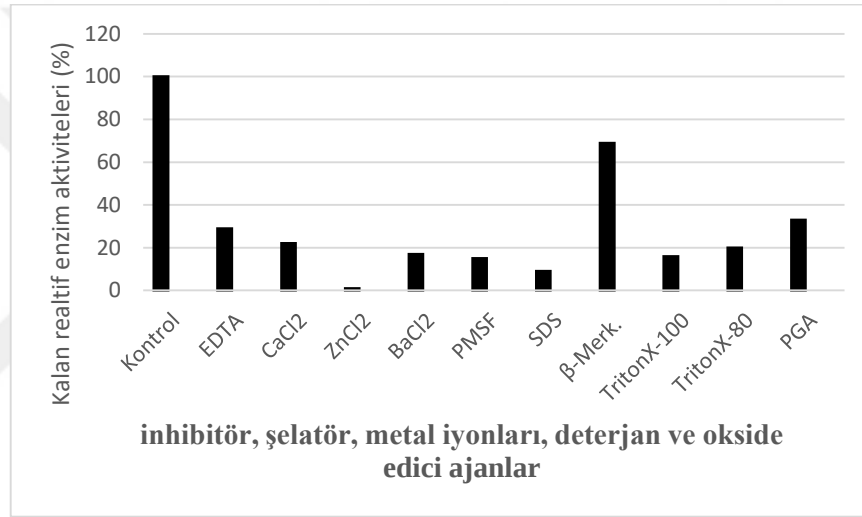
PMSF (3 mM), Serin proteaz inhibitörü olan PMSF, enzimin aktivitesini %15'e düşürmüştür. Bu, enzimin aktif bölgesinde serin proteaz benzeri bir yapı içerebileceğini düşündürülebilir.

SDS (%1), SDS, güçlü bir denatüre edici ajan olarak ZB28 amilazı enziminin %9 aktivitesine sebep olmuş, yani enzimin yapısal bütünlüğünü bozarak neredeyse tamamen inhibe etmiştir.

β -merkaptotanol (%1), ZB28 amilaz enziminin aktivitesini %69'a düşürmüş, ancak SDS kadar etkili olmamıştır. β -merkaptotanol disülfid bağlarını indirger, ancak amilaz aktivitesini tamamen yok etmemiştir. Bu, enzimin disülfid bağlarına kısmen bağımlı olduğunu gösterebilir.

İyonik olmayan deterjanlar olan Triton X-100 ve Tween 80, sırasıyla %16 ve %20 ZB28 amilaz enziminin aktivitesi ile inhibe edici etkiler göstermiştir. Bu, bu deterjanların enzimin yapısal bütünlüğünü bozarak aktivitesini azalttığını göstermektedir.

PGA (Poliglikolik Asit), ZB28 amilaz enziminin %33 aktivite göstermesine neden olmuştur. Bu, PGA'nın inhibitör etkisinin hafif olduğunu ve enzimin aktivitesini tamamen ortadan kaldırmadığını göstergesidir.



Şekil 4.12. *Bacillus* sp. ZB28 amilaz enzimi üzerine inhibitör, şelatör, metal iyonu, deterjan ve okside edici ajanların etkisine ait sonuçlar

Arabacı (2011), *Bacillus* sp. NCA35 suşundan ürettiği amilaz enzimi ile yaptığı deneylerde, 15°C'de 30 dakika ön inkübasyon işleminden sonra enzimin aktivitesini %1 β -merkaptotanol (%103) indüklediğini, 5mM BaCl₂, EDTA, CaCl₂, NaCl, ZnCl₂, MnCl₂, 3mM PMSF ve 8M üre, sırasıyla, %27, %42, %35, %43, %40 %36, %41 ve %58 inhibe etmiştir.

Batur ve Aygan (2015), *Bacillus* sp. A-3 suşundan izole ettikleri amilaz enziminin kimyasalların etkisinde en yüksek kalan aktivitesi %93 ile KCl, en düşük aktivitesi ise %0,8 ile EDTA'da olduğunu tespit etmişlerdir.

Tatar (2007), Halofil, alkalın ve termofil özelliklere sahip *Bacillus* sp. SB-28 suşundan ürettiği amilaz enzimi, optimum aktivitesini 140°C'de göstermektedir. Bu enzim, 55°C'de 30 dakika inkübasyon süresiyle aşağıdaki bileşenlerle aktivitesini korumuştur: %1 SDS de %71, β -Merkaptotanol de %81, Triton X-100 de %82, 8 M ürede %11, 3 mM PMSF de %74, 5 mM CaCl₂ de %70, ZnCl₂ de %68 koruduğu belirtilmektedir.

Özcan ve Özdemir (2020), *Bacillus* sp. GA4 suşundan izole edilen α -amilaz enzimi, $MgCl_2$ ve $FeSO_4$ varlığında sırasıyla %13 ve %12 oranında aktivite artışı göstermiştir. Öte yandan, $MgCl_2$ ve $FeSO_4$ ve EDTA'nın etkisiyle enzim aktivitesi sırasıyla %81, %38 ve %33 oranında inhibe edilmiştir.

Özdolap (2021), *Bacillus* sp. ZF4 ve *Bacillus* sp. A4 ve *Bacillus* sp. ZF4 suşundan izole edilen iki α -amilaz enzimi de SDS ve Co varlığında yüksek aktivite seviyelerine ulaşmış, ancak $CaCl_2$, $MgCl_2$ ve EDTA her iki enzim için de inhibe edici etkiler gösterdiğini bildirmiştir.

Birçok çalışmada, EDTA'nın iki değerli katyonları kelatlama yeteneği nedeniyle güçlü bir α -amilaz inhibitörü olduğu bildirilmiştir (Gupta ve ark., 2003; Nirmala ve Muralikrishna, 2003; Mamo ve Gessesse, 1999; Aguilar ve ark., 2000). ZB28 amilazı üzerinde 5 mM EDTA kullanılarak yapılan çalışmada, enzimatik aktiviteyi inhibe ettiği gözlemlenmiştir (%29). Bu sonuç, enzimin aktif bölgesine yakın bir yerde iki değerlikli bir iyonun bulunabileceğini düşündürmektedir.

Bacillus sp. ZB28 amilaz enziminin PMSF (%15) tarafından belirgin şekilde inhibe edilmesi, bu enzimin metal atomu içeren serin yapısında olduğunu göstermektedir.

Deterjanlarla yapılan çalışmalar, ZB28 amilazının iyonik olmayan deterjanlar olan Tween 80 ve Triton X-100 varlığında stabil olmadığını göstermiştir. Ayrıca, SDS'in ZB28 amilazı üzerinde denatüre edici bir etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir.

β -merkaptetanolün ZB28 amilazını inhibe etmemesi, disülfid bağlarının enzimatik aktivite için zorunlu olmadığını düşündürmektedir. Ayrıca, β -merkaptetanolün aktiviteyi artırıcı etkisi, enzimin doğal konformasyonunu koruyucu rolünden kaynaklanabilir.

4.4.6 Farklı NaCl'ün Konsantrasyonlarının Amilaz enziminin Aktivitesine Etkisinin Saptanmasına Ait Sonuçlar

%3, %5, %10, %15, %20, %25 ve %30 konsantrasyonlardaki NaCl çözeltilerinde *Bacillus* sp. ZB28 amilaz enzimi, 37 °C'de 60 dakika boyunca ön inkübasyona tabi tutulmuş ve ardından enzim aktivitesinin kalanı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, Çizelge 4.10 ve Şekil 4.13'te sunulmuştur.

Çizelge 4.7. Farklı NaCl konsantrasyonlarının amilaz enzimi aktivitesi üzerine etkileri

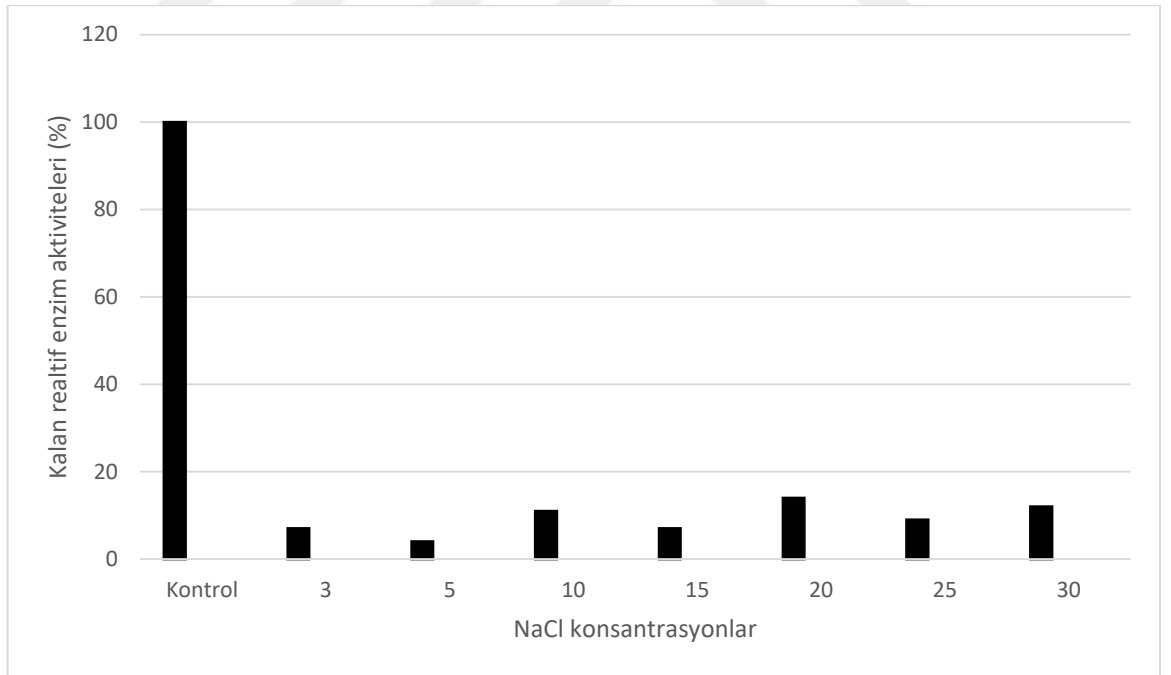
NaCl konsantrasyonu (%)	Ön İnkübasyon Sıcaklığı	Ön İnkübasyon Süresi	İnkübasyon Sıcaklığı	İnkübasyon Süresi	%Aktivite
Kontrol	-	-	60°C	60dk	100
3	37°C	60dk	60°C	60dk	7
5	37°C	60dk	60°C	60dk	4
10	37°C	60dk	60°C	60dk	11
15	37°C	60dk	60°C	60dk	7
20	37°C	60dk	60°C	60dk	14
25	37°C	60dk	60°C	60dk	9
30	37°C	60dk	60°C	60dk	12

Farklı NaCl'ün konsantrasyonlarının *Bacillus* sp. ZB28 amilaz enziminin maksimum aktivitesi %14 olarak %20 NaCl konsantrasyonunda saptanmıştır. %3, %5, %10, %15, %20, %25 ve %30 NaCl konsantrasyonları incelendiğinde, sırasıyla, %7, %4, %11, %7, %14, %9 ve %12 kalan enzim aktivitesi saptanmıştır. Tüm konsantrasyonlar göz önüne alındığında (%3-30 NaCl), enzim aktivitesinin kalanı ortalama %9 olarak belirlenmiştir.

Düşük NaCl Konsantrasyonlar, 3% NaCl ile ZB28 amilaz enziminin aktivitesi %7'ye düşmüştür. Bu, düşük sodyum klorür konsantrasyonlarının enzim üzerindeki etkisinin hemen hissedildiğini gösterir. %5 NaCl konsantrasyonunda aktivite %4'e düşmüş ve bu, enzim üzerindeki inhibisyonun daha da belirgin hale geldiğini gösterir.

Orta NaCl Konsantrasyonları, %10 NaCl ile aktivite %11 olarak gözlemlenmiştir. Bu, ZB28 amilaz enziminin aktivitesinde bir miktar artış olduğunu gösterirken, genel olarak düşük seviyelerde kalmaktadır. %15 NaCl konsantrasyonunda aktivite %7'ye düşmüştür. Bu durum, yüksek NaCl konsantrasyonlarının enzim üzerindeki inhibe edici etkisini pekiştirmektedir.

Yüksek NaCl Konsantrasyonları, %20 NaCl ile aktivite %14'e yükselmiştir, bu da ZB28 amilaz enziminin aktivitesinin belirli bir noktada hafif bir iyileşme gösterdiğini göstermektedir. %25 NaCl konsantrasyonunda aktivite %9'a düşmüştür, bu da inhibisyon etkisinin yeniden ortaya çıktığını gösterir. %30 NaCl ile aktivite %12'ye çıkmıştır.



Şekil 4.13.Farklı NaCl konsantrasyonlarının amilaz enzimi aktivitesine etkisi

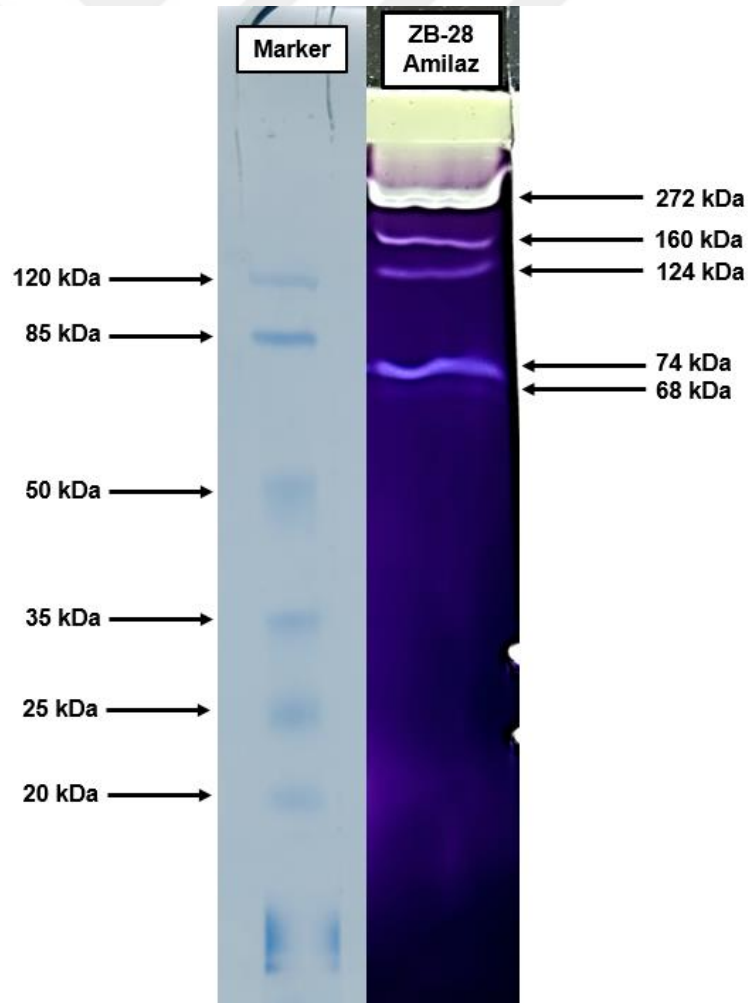
Tatar (2007), SB-28 amilaz enziminin 55 °C'de 60 dakika süreyle %3, %5, %7, %10, %15 ve %20 NaCl çözeltileriyle işlenmesi sonucunda kalan enzim aktivitelerinin sırasıyla %80, %81.3,

%84.4, %89, %73 ve %66 olarak belirlendiğini bildirmiştir. Enzim, %10'luk (2M) NaCl çözeltisinde en yüksek kalan aktiviteyi sergilemiştir.

Arıbacı (2011), NCA35 amilaz enzimini 25 °C'de 60 dakika boyunca %5, %10, %15, %20, %25 ve %30 konsantrasyonlarındaki NaCl çözeltileri ile muamele etmiş ve kalan enzim aktivitelerini sırasıyla %53, %50, %48, %46, %44 ve %42 olarak tespit etmiştir. NCA35 amilaz enzimi en yüksek gösterdiği kalan aktivite de %5 NaCl'de olduğunu bildirmiştir.

4.4.7 SDS-PAGE Yöntemi ile Moleküler Ağırlığın Saptanmasının ve Zimogram Analizine Ait Bulgular

%1 nişasta içeren %10'luk SDS-PAGE jeli hazırlanmış ve *Bacillus* sp.. ZB28 suşundan izole edilen amilaz enzimi bu jelde yürütülmüştür. Jel elektroforezden sonra, zimogram analizi ile aktivite bandının varlığı saptanmıştır. Aktivite bantlarının moleküler ağırlıklarının belirlenmesinde prestained protein marker (120, 85, 50, 35, 25, 20 kDa) kullanılmıştır. Elde edilen bulgular Şekil 4.14'te gösterilmiştir.



Şekil 4.14. Zimogram analizinden ZB-28 Amilaz enziminin aktivite bantlarının görüntüsü ve moleküler ağırlıkları

Zimogram analizi sonucunda moleküler ağırlığı yaklaşık 272, 160, 124, 74 ve 68 kDa olan beş aktivite bandı elde edilmiştir. Marker olarak Thermo Scientific marka “Prestained Protein Molecular Weight Marker”a (MAN0011770) ait protein bantları (120, 85, 50, 35, 25, 20 kDa) kullanıldı.

Mamo ve Gessesse (1999), *Bacillus* sp. suşu WN11'in hücresiz kültür üst sıvısından iki α -amilaz, Amy I ve Amy II, homojenliğe kadar saflaştırılmıştır. Amy I'in moleküler ağırlığı 76 kDa, Amy II'nin ise 53 kDa olarak belirlemişlerdir.

Arabacı (2011), *Bacillus* sp. NCA35 amilaz enziminin moleküler ağırlığı, SDS-PAGE zimogram analizi sonucunda 205 kDa olarak saptanmıştır.

Batur ve Aygan (2015), *Bacillus* sp. A-3 amilaz enzimi SDS-PAGE analizinde enzimin moleküler ağırlığı 53.94 kDa olarak tespit etmişlerdir.

Özcan ve Özdemir (2020), *Bacillus* sp. GA4'ün α -amilaz enziminin moleküler ağırlığı, SDS-PAGE zimogram analizi sonucunda yaklaşık 55 kDa olarak tespit edilmiştir.

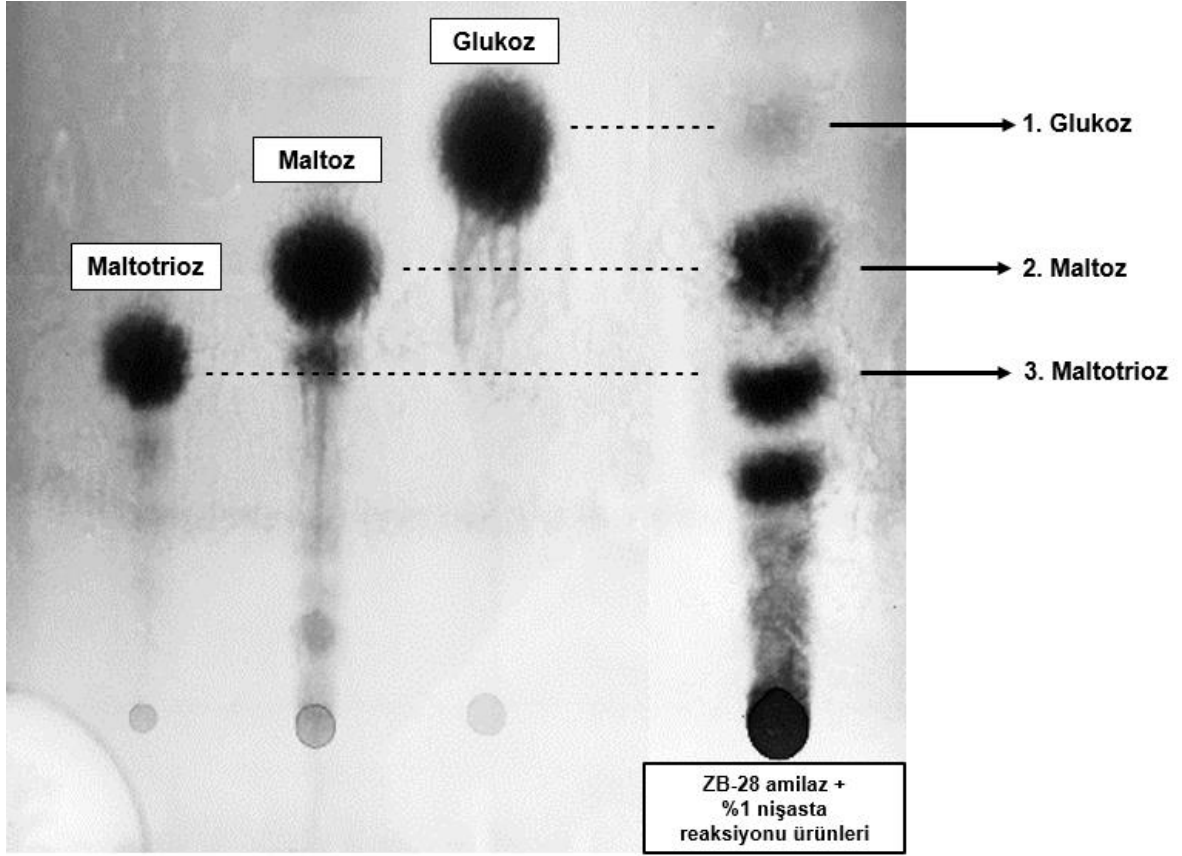
Özdolap (2021), *Bacillus* sp. ZF4 ve *Bacillus* sp. A4 α -amilazı ile yaptığı zimogram analizi sonucunda her iki enzimin de yaklaşık 105.4 kDa moleküler ağırlığa sahip olduğunu bulmuştur.

Enzimlerin moleküler ağırlıkları genellikle onların yapısal ve fonksiyonel özelliklerini belirler. *Bacillus* sp. ZB28 amilazında tespit edilen beş farklı aktivite bölgesi, enzim sisteminin karmaşık olduğunu ve farklı alt birimlerin mevcut olduğunu göstermektedir. *Bacillus* sp. ZB28 amilazın yüksek moleküler ağırlıklarının (272 kDa ve 160 kDa) olması, muhtemelen bunların oligomerik yapılar olduğunu ve birkaç alt birimden oluşabileceğini göstergesidir.

Farklı moleküler ağırlıklara sahip amilazların varlığı, *Bacillus* sp. ZB28'in çeşitli substratlarla etkileşim kurabilme kapasitesini artırabilir. Farklı aktivite bölgeleri, farklı pH, sıcaklık ve tuz konsantrasyonları gibi çeşitli çevresel koşullara karşı duyarlılık gösterebilir. Özellikle gıda ve biyoteknoloji uygulamalarında, çoklu amilaz formları, farklı nişasta türlerini ve şekeri parçalamada etkili olabilir.

4.4.8 İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) ile Hidroliz Ürünlerin Saptanmasına Ait Sonuçlar

Nişastanın enzimatik hidrolizi sonucu oluşan ürünlerin analizi ve enzim tipinin tespiti amacıyla ince tabaka kromatografisi yöntemi uygulanmıştır. Bu analizlerin sonucunda, nişastanın enzimatik hidrolizi ile meydana gelen son ürünlerin glukoz, maltoz ve maltotrioz olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.15. ZB-28 amilaz enziminin ince tabaka kromatografisi (TLC) görüntüsü.

TLC analizinde %1'lik konsantrasyondaki nişasta substratının hidrolizi sonucu açığa çıkan ürünler (1. Glukoz, 2. Maltoz, 3. Maltotrioz). Marker olarak %1'lik konsantrasyonlarda hazırlanan maltotrioz, maltoz ve glukoz çözeltileri kullanılmıştır.

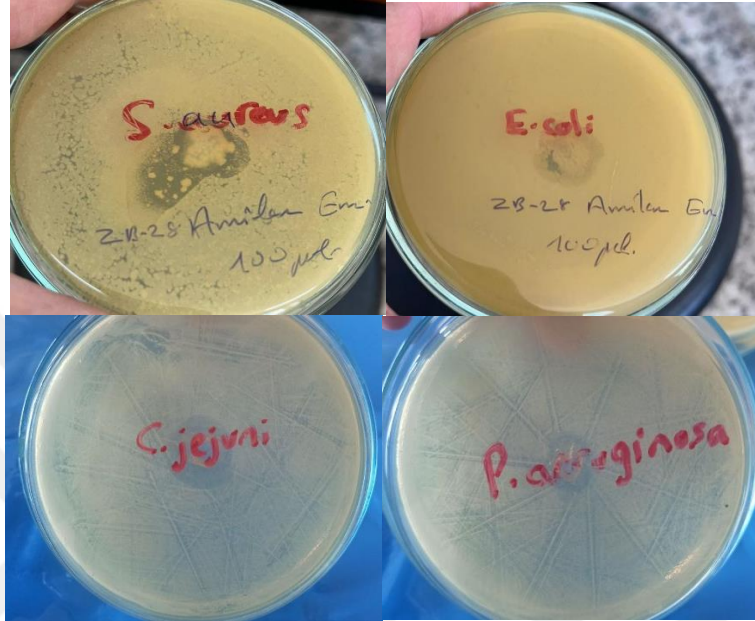
Literatürde, *Bacillus* sp. AB-17 amilaz enziminin nişastayı glikoz, maltoz ve diğer oligosakkaritlere dönüştürdüğü bildirilmiştir (Aygan, 2008). Ayrıca, Morgan ve Pires (1981) tarafından yapılan bir çalışmada, *Bacillus licheniformis* bakterisinden elde edilen amilaz enziminin nişastayı glikoz ve maltoza parçaladığı tespit edilmiştir.

Arabacı (2011), *Bacillus* sp. suşlarından amilaz enzimi izole edip karakterize etmiştir. *Bacillus* sp. NCA35 amilaz enziminin TLC analizi sonucunda, reaksiyon ürünlerinin glikoz, maltoz ve maltoz türevli oligosakkaritler olduğu belirlenmiştir.

Bacillus sp. ZB28 amilazı, nişastayı etkili bir şekilde glikoz, maltoz ve maltotrioz gibi oligosakkaritlere dönüştürerek, enerji üretimi için gerekli olan basit şekerlerin sentezinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu özellik, enzimin gıda, biyoteknoloji ve endüstriyel uygulamalar için potansiyelini artırmaktadır. Özellikle, nişasta bazlı gıda ürünlerinin işlenmesi veya şeker üretiminde kullanılabilir. Ayrıca, bu sonuçlar, *Bacillus* sp. ZB28 amilazının farklı substratlar üzerinde ne kadar etkili çalıştığını ve bu enzimlerin farklı uygulamalar için nasıl optimize edilebileceğine dair bilgiler sunmaktadır.

4.5 Bakteri ve Enzimin Antibakteriyel etkinliğinin saptanmasına Ait Bulgular

Staphylococcus aureus, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni* ve *Pseudomonas aeruginosa* dahil olmak üzere çeşitli patojenik patojenlere karşı kısmı saflaştırılmış ZB28 amilaz enziminin antibakteriyel aktivitesi saptanmıştır. ZB28 amilaz antimikrobiyal aktivitesinin şekil 4.16 gösterildiğini belirtmektedir.



şekil 4.16. Amilaz Enzimin Antimikrobiyal Aktivitenin Sonuçları

Sajid ve ark (2016), *Bacillus* sp.. MTZ-1 suşundan izole ettikleri enzim preparatları çeşitli bakteriyel patojenlere (VRE, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., EPEC, MRSA, *Klebsiella* sp., *Shigella* sp., *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus*) karşı antibakteriyel aktivite gösterdiğini bulmuşlardır. Ayrıca, *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. terreus*, *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Trichophyton tonsurans* ve *Mucor* sp. gibi birçok fungal patojene karşı antifungal aktiviteye sahip olduğunu bildirmişler.

Al-Gburı (2023), *Bacillus subtilis* B8 suşundan izole edilen proteaz enzimi *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Klebsiella pneumoniae* patojenik bakterilere karşı antimikrobiyal etkileri incelenmiş ve *Klebsiella pneumoniae* dışında diğer patojen bakterilere karşı proteaz enzimi antimikrobiyal aktivitesinin gösterildiğini saptamıştır.

Petrilerdeki kuyucuklara damlatılan 100 μ L ZB28 amilaz enzimi *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* bakterilere karşı antibakteriyel etki sahip olduğunu *Campylobacter jejuni* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakterilere ise kısmen antibakteriyel aktivite göstermiştir.

Gram pozitif bir bakteri olan *Staphylococcus aureus*, birçok enfeksiyona neden olabilen patojenik bir mikroorganizmadır. *Bacillus* sp. ZB28 amilazının bu bakteri üzerinde gösterdiği antibakteriyel etki, enzimin *S. aureus*'un hücre duvarı veya metabolizması üzerinde olumsuz etkiler yaratarak büyümesini inhibe ettiğini göstermektedir.

Gram negatif bir bakteri olan *Escherichia coli*, geniş bir grup mikroorganizmadır. *Bacillus* sp. ZB28 amilazının *E. coli*'ye karşı da etkili olduğu, bu enzimin genel olarak bakteriyel büyümeyi inhibe etme yeteneğini saptanmıştır.

Campylobacter jejuni, genellikle gıda kaynaklı enfeksiyonlara neden olan bir bakteridir. *Bacillus* sp. ZB28 amilazının bu bakteri üzerindeki sınırlı antibakteriyel aktivitesi, muhtemelen enzimatik aktivitenin bu organizmanın hücresel yapısına veya metabolizmasına yeterince etkili olmadığını göstermektedir. Bunun, *C. jejuni*'nin spesifik yapısal özellikleri veya enzim aktivitesine duyarlılığı ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Çok yönlü bir patojen olan *Pseudomonas aeruginosa* özellikle bağışıklık sistemi zayıf bireylerde ciddi enfeksiyonlara yol açabilir. *Bacillus* sp. ZB28 amilazının *P. aeruginosa* üzerinde sınırlı bir aktivite göstermesi, enzimin bu organizmaya karşı etkili bir inhibitör olamayabileceğini veya *P. aeruginosa*'nın doğal direnç mekanizmalarının bu enzim tarafından aşılmadığını düşündürmektedir.

5 SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Enzimler, antik medeniyetlerden bu yana bilinmektedir ve özellikle eski bira üretimi gibi çeşitli alanlarda yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Ancak, enzimlerin teknik olarak tanımlanması 18. yüzyılda gerçekleşmiştir. Birçok bilim insanı, enzimlerin kullanımını araştırmış ve bu çalışmalar sayesinde enzimlerin günlük hayatımızdaki önemini ve faydalarını öğrenmişizdir. Bugün, birçok büyük şirket farklı enzim türleri üretmekte ve bu enzimler gıda, süt ürünleri, deterjan ve kimyasal endüstrilerde kritik roller üstlenmektedir. Modern biyoteknoloji ve protein mühendisliğinin gelişmesiyle, özellikle enzimlerin saflaştırılması ve stabilitesi üzerine odaklanan yeni bir enzim mühendisliği alanı ortaya çıkmıştır. Bu önemli biyomoleküllerin üretiminde çeşitli mikroorganizmalar ve model sistemler yaygın olarak kullanılmaktadır. Sonuç olarak, birçok mikroorganizma ve benzersiz işlevlere sahip enzimler kapsamlı taramalar yoluyla keşfedilmiş ve şimdi endüstriyel ve tıbbi alanlarda geniş bir şekilde kullanılmaktadır. Tıbbi açıdan önemli olan bu enzimlerin geliştirilmesi, endüstriyel uygulamalar kadar kapsamlıdır ve bu da sektörün gelecekteki potansiyel ödülleri yansıtmaktadır (Gurung ve ark., 2013)

Enzimler, organik sentezler, klinik analizler, farmasötikler, deterjanlar, yiyecek üretimi ve fermentasyon gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Organik maddelerin sentezinde enzimlerin rolü günümüzde giderek artmaktadır. Yeni mikrobiyal enzimlerin keşfi, sentetik işlemler için basit yöntemler ve çevresel sorunlara çözüm sunacak yeni yollar açacaktır. Sentetik bir işlem tasarlandığında, uygun bir katalizör bulunması gerekmekte ve enzimler bu rol için ideal birer adaydır. Son on yılda, enzimlerin endüstriyel uygulamalardaki kullanımı hızla ilerlemiştir. Enzimlerin benzersiz işlevleri, özellikle gıda üretimi ve çevresel sorunların çözümü için giderek daha fazla ilgi çekmektedir. Ancak birçok endüstriyel süreçte kullanılan substratlar yapay bileşiklerdir ve bu süreçleri katalize edecek uygun enzimler henüz keşfedilmemiştir. Bu nedenle, yeni reaksiyonları katalize edebilecek enzimlerin bulunması sürekli olarak önemlidir. Ayrıca, yeni enzimlerin keşfi, yeni enzimatik süreçlerin tasarımında da ipuçları sağlayacaktır (Pandey ve ark., 2000).

Deniz kökenli *Bacillus* sp. suşlarını izole etmek amacıyla Mersin İlinde ve Adana Karataş İlçesinden deniz suyu örnekleri sıvı besi yerinde inkübasyona bırakılmış ardından sporlu bakterilerin izolasyonu için 80°C'de 10 dakika ısı şoku uygulanmıştır. Katı besiyerine yapılan yayma ekimi sonucunda, *Bacillus* sp. tipik morfolojisine sahip 89 farklı suş izole edilmiştir. Bu suşlar, pH 7.0 ve 37°C'de 72 saat boyunca inkübe edilmiş ve bunlardan 46 suşta amilaz aktivitesi gözlemlenmiştir. Amilaz aktivitesi en yüksek olan, gram pozitif, basil formda, katalaz pozitif, aerobik özellikte ve spor oluşturan *Bacillus* sp. ZB28 suşu seçilmiştir.

Seçilen *Bacillus* sp. ZB28 suşu, Katı besiyerinde üreme ve enzim sentezlemesini incelemek amacıyla, pH değerleri 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0 olan nişastalı besiyerlerine suşlar eklenmiştir. Bu suşlar, ardından 10, 20, 30, 40, 50 ve 60°C sıcaklıklarda 72 saat inkübe edilmiştir.

Bacillus sp. ZB28 suşunun nişasta içeren agar besisi yerinde en iyi şekilde ürettiği ve amilaz enzim sentezini en verimli şekilde gerçekleştirdiği pH değerinin 9.0, sıcaklığın ise 60°C olduğu tespit edilmiştir.

Bacillus sp. ZB28 amilaz enziminin izolasyonu, kısmi saflaştırma amacıyla alkol presipitasyon yöntemi kullanılarak yapılmış ve ardından karakterizasyon analizleri gerçekleştirilmiştir.

Spesifik aktivite analizlerine göre, *Bacillus* sp. ZB28 suşunun 10.31 U/mL enzim ürettiği belirlenmiştir. Protein miktarı tayini sonucunda ise, *Bacillus* sp. ZB28 amilaz enziminin protein konsantrasyonu 0.003 mg/mL olarak tespit edilmiştir.

Bacillus sp. ZB28 suşuna ait amilaz enzimi, pH 11.0'de en yüksek aktivitesini göstermektedir. Enzimin pH 6.0-12.0 aralığında ortalama aktivitesi %93 olup, en iyi aktivite pH 11.0'de olmasına rağmen enzim pH 7.0-10.0 aralığında da yaklaşık %95 aktivite sergilemektedir. Bu sonuçlar, enzimin geniş bir pH aralığında son derece yüksek bir aktivite sergilediğini ortaya koymaktadır.

Bacillus sp. ZB28 amilaz enzimi için en iyi aktivite sıcaklığı 60°C olarak belirlenmiştir. Enzim, 0°C ile 80°C arasında ortalama %76 aktivite göstermiştir. 60°C'de en yüksek aktiviteye ulaşan enzim, 40°C'de %98, 70°C'de ise %85 aktivite sergilemiştir.

Bacillus sp. ZB28 amilaz enzimi, 24 saat boyunca 37°C'de ve pH 6.0-12.0 aralığında yapılan ön inkübasyon işleminde stabilitesini ortalama %55 oranında korumuştur. Ancak, pH 6.0-7.0 aralığında enzimin ortalama %98 aktivitesini muhafaza ettiği gözlemlenmiştir.

Bacillus sp. ZB28 amilaz enzimi, 60 dakika süren ön inkübasyon işleminin ardından 0°C-60°C aralığında orijinal aktivitesinin %97.42'sini koruyarak yüksek stabilite sergilemiştir. Ancak, sıcaklık 90°C'ye yükseldiğinde enzim aktivitesi hızla azalarak %35'e düşmüştür.

Bacillus sp. ZB28 amilaz enzimi, 37°C'de 60 dakika boyunca her biri 5 mM konsantrasyonda EDTA, CaCl₂, ZnCl₂, ve BaCl₂ ile ve 3 mM PMSF ile ön inkübasyona bırakıldıktan sonra enzim aktivitesi ölçülmüş ve enzimin sırasıyla %29, %22, %1, %17 ve %15 oranında inhibe olduğu belirlenmiştir. *Bacillus* sp. ZB28, bu metal iyonları aktif bölgeyi işgal ederek aktivitesini engellediği için güçlü bir inhibisyona uğramıştır.

Enzim aktivitesi, %1 SDS ile %9, %1 TritonX-100 ile %16, %1 Tween 80 ile %20 inhibe olmuştur; buna karşın, %1 β-Merkaptoetanol kullanıldığında yaklaşık %69 artış göstermiştir.

Bacillus sp. ZB28 amilazı, metal iyonlarına ve bazı denatüranlara karşı duyarlıdır. Özellikle Zn²⁺, SDS ve EDTA, enzimi büyük ölçüde inhibe etmiştir. Enzim, β-merkaptetanol ve düşük konsantrasyonlu bazı deterjanlar gibi bazı inhibitörlere karşı daha dirençlidir. Bu sonuçlar, *Bacillus* sp. ZB28 amilaz enziminin yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin, metal iyonları ve denatüranlar tarafından büyük ölçüde etkilendiğini göstermektedir.

Bacillus sp. ZB28 amilaz enzimi, 60 dakika süreyle %3, %5, %10, %15, %20, %25 ve %30 NaCl çözeltilerinde ön inkübasyona tabi tutulmuş ve bu işlem sonucunda ortalama %9 oranında bir

aktivite değeri kalmıştır. *Bacillus* sp. ZB28 amilaz enzimi, NaCl'ün varlığında genel olarak düşük aktivite göstermektedir. Düşük NaCl konsantrasyonları, enzimin aktivitesinde belirgin bir azalmaya yol açarken, orta ve yüksek konsantrasyonlar arası dalgalanmalar, sodyum klorürün enzimin yapısı üzerindeki karmaşık etkilerini yansıtmaktadır.

Bacillus sp. ZB28 amilaz enziminin zimogram analizi sonucunda enzime ait beş aktivite bölgesi tespit edilmiştir ve bu bölgelerdeki moleküler ağırlıklar sırasıyla 272, 160, 124, 74 ve 68 kDa olarak belirlenmiştir.

Bacillus sp. ZB28 amilazının zimogram analizi, beş farklı aktivite bölgesinin varlığını ve moleküler ağırlıklarını belirlemiştir. Bu durum, enzimin biyolojik ve biyoteknolojik işlevselliği açısından önemli bilgiler sunmaktadır. Farklı moleküler ağırlıklara sahip enzim alt birimlerinin varlığı, enzim sisteminin karmaşıklığını ve çeşitliliğini, dolayısıyla farklı koşullarda etkili olma potansiyelini göstermektedir. Bu bulgular, *Bacillus* sp. ZB28 amilazının çeşitli uygulamalarda kullanılabilirliğini artırabilir.

Bacillus sp. ZB28 amilaz enziminin nişasta moleküllerini glikoz, maltoz ve maltotrioz gibi oligosakkaritlere dönüştürmesi, enzimin biyolojik ve endüstriyel uygulamalar açısından değerli olduğunu göstermektedir. İnce tabaka kromatografisi analizi, bu dönüşüm sürecini net bir şekilde ortaya koyarak amilazın potansiyel kullanım alanlarını vurgular.

Kısmi saflaştırılmış *Bacillus* sp. ZB28 amilaz enzimi, *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* 'ye karşı antibakteriyel aktivite gösterirken, *Campylobacter jejuni* ve *Pseudomonas aeruginosa* üzerinde sınırlı etki göstermektedir. Bu bulgular, *Bacillus* sp. ZB28 amilazının potansiyel antimikrobiyal uygulamalar için önem taşıdığını ve daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyduğunu göstermektedir.

Amilaz enzimi, nişasta bazlı endüstrilerde uzun yıllardır yaygın olarak kullanılmakta olup, bu enzimin verimli üretimi için birçok mikrobiyal kaynak bulunmaktadır. Ancak, yalnızca birkaç seçilmiş mantar ve bakteri türü ticari üretim kriterlerini karşılamaktadır. Amilaz üretimi için yeni mikroorganizmaların keşfi sürekli bir araştırma sürecidir. Son zamanlarda, birçok araştırmacı, yüksek saflıkta amilaz gerektiren farmasötik ve klinik uygulamalara uygun α -amilaz saflaştırma tekniklerinin geliştirilmesinde başarılı sonuçlar elde etmiştir.

Sonuç olarak;

Bu çalışmada, *Bacillus* sp. ZB28 amilaz enzimi kısmi saflaştırılmış ve karakteristik özellikleri belirlenmiştir. Amilazlar, deterjan, gıda ve tekstil endüstrilerinde ihtiyaç duyulan önemli enzimlerden biridir. Çalışma sonuçlarının sektörel uygulamalarda etkili olabilmesi için aşağıdaki öneriler dikkate alınabilir:

1. Enzim özellikleri, kullanılacak sektöre göre ihtiyaçlara uygun olarak mutasyonel değişikliklere tabi tutulabilir.
2. Amilaz enzimi kısmi saflaştırma yerin tam saflaştırma yöntemlerin uygulanabilir.

3. Amilaz enzimin antibakteriyel etkisini artırılmasına yönelik çalışmalar yapılabilir.
4. Enzimin amino asit dizisinin belirlenip, veri bankalarındaki diğer amilazlarla karşılaştırılması ve elde edilen diziyi temel alarak üretilen primerlerle kodlama bölgesinin amplifiye edilmesi önerilmektedir. Bu verilerin sağlanması, gelecekte enzimin rekombinant üretiminin yapılmasına olanak tanıyacak ve enzimlerin karakterizasyonunda gerekli olan diğer kinetik parametrelerin incelenmesini mümkün kılabilir.



KAYNAKLAR

- Aguilar G., Morlon-Guyot J., Trejo-Aguilar B., Guyot J.P., 2000. Purification and characterization of an extracellular alpha-amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* an amylolytic lactic acid bacterium. *Enzyme Microb. Technol.* 27: 406–413.
- Ahlawat S., Dhiman S. S., Battan B., Mandhan R. P., ve Sharma J., (2009). Pectinase production by *Bacillus subtilis* and its potential application in biopreparation of cotton and micropoly fabric, *Process Biochemistry*. **44**, no. 5, 521–526, 2-s2.0-64049085367,
- Aiba, S., Kılal, K., and Imanaka, A., 1983. Cloning and Expression of Thermostable a- Amylase Gene from *Bacillus stearothermophilus* in *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 32:3059-1065.
- Al-Gburı, S. S. M., 2023. *Bacillus Sp.*'Den Proteazın Tespiti, Optimizasyonu, Saflaştırılması ve Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi. Çankırı Karatekin Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi.
- Anonymous, 1988. *Handbook of Amylases and Related Enzymes*. Edited by the Amylase Research Society of Japan, Pergamon Press Oxford.
- Arabacı, N., 2011. Cold Aktif Alkalın Amilaz Enzimi Üreten *Bacillus sp.* Suşlarının İzolasyonu, Enzim Üretimi, Karakterizasyonu ve Endüstriyel Kullanım Olanaklarının Araştırılması. Ç.Ü.F.B.E. Yüksek Lisans Tezi.
- Arabacı, N., 2018. *Bacillus Sp.* Suşlarından İzole Edilen Asidik, Alkali, Termotabil Amilaz Ve Pullulanaz Enzimlerinin Üretimi, Karakterizasyonu Ve Biyoteknolojik Kullanım Olanaklarının Araştırılması. Ç.Ü.F.B.E. Doktora Tezi
- Arıkan, B., 2008. Highly Thermostable, Thermophilic, Alkaline, SDS and Chelator Resistant Amylase from a Thermophilic *Bacillus sp.* Isolate A3-15. *Bioresource Technology*, 99:3071-3076.
- Arıkan, B., Ünalı Coral, N., Mercan G., Çolak, 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.
- Asha R., Niyonzima F.N. and Sunil S.M., 2013. Purification and Properties of Pullulanase from *Bacillus halodurans*. *International Research Journal of Biological Sciences*, 2(3):35-43.
- Aslan, Z., Matpan Bekler, F., ve Güven, K. (2021). Bingöl Sıcak Su Kaplıcalarından İzole Edilen Bakterilerin Tanımlanması, Proteaz ve Amilaz Enzimlerinin Karakterizasyonu. *International Journal of Pure and Applied Sciences*, 7(3), 346-355. <https://doi.org/10.29132/ijpas.882322>
- Aygan, A. ve Arıkan, B., 2009. Production and characterization of multifunctional endoxylanase by *Bacillus sp.* X13. *Turk J. Biol*, 33:231- 237.

- Aygan, A., 2008. Haloalkalofil *Bacillus* sp. İzolasyonu, Amilaz, Selüloz ve Ksilanaz Enzimlerinin Üretimi, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulamalarda Kullanılabilirliği. Ç.Ü. F.B.E. Doktora Tezi.
- Aygan, A., Sarıtürk, S., Sedat Köstekçi and Tanis, H., 2014. Production and characterization of alkaliphilic alpha-amylase from *Bacillus subtilis* A10 isolated from soils of Kahramanmaraş, Turkey. *African Journal Microbiology Research*, 8(21):2168-2173.
- Bal, D., 2015. Investigation of the kinetic parameters of extracellular alpha-amylase from *Bacillus subtilis* SDP1 immobilized on alginate beads. Marmara Üniversitesi. Gıda Mühendisliği. Yüksek Lisans Tezi.
- Baran, M. 2001. Mikrobakterilerden α amilaz enziminin ayırımı ve saflaştırılması. Yüksek lisans tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta. 63.
- Baruch, M., Belotserkovsky, I., Hertzog, B. B., Ravins, M., Dov, E., McIver, K. S., ... & Hanski, E. (2014). An extracellular bacterial pathogen modulates host metabolism to regulate its own sensing and proliferation. *Cell*, 156(1), 97-108.
- Beilen, J. B., Li, Z. 2002. Enzyme technology: an overview. *Current Opinion in Biotechnology*, 13:338–344.
- Bele B. ve Khale, A., 2011. An overview on thin layer chromatography. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. ISSN: 0975-823
- Bollag, D.M. ve Edelsteir S.J., 1991. *Proteins Methods*. Wiley-Liss Press., USA, 180p.
- Bollag, D.M., Rozycki, M.D., Edelstein, S.J., 1996. *Protein Methods*, 2nd Edition, Wiley-Liss Press, USA, p.414.
- Borysowski, J., Weber-Dąbrowska, B., & Górski, A. (2006). Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents. *Experimental biology and medicine*, 231(4), 366-377.
- Bradford M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Anal Biochem.*, 72. pp. 248-254
- Burhanoglu, T., 2012. Molecular Cloning, Overexpression And Biochemical Characterization Of Bacterial Amylase For Biotechnological Processes.. İzmir Biyoteknoloji.Yüksek Lisans Tezi.
- Coşkun, A., 2010. Endüstriyel Enzimler Üreten Yeni *Bacillus* Sp. Suşlarının İzolasyonu ve Karakterizasyonu. Ç.Ü.F.B.E. Yüksek Lisans Tezi.
- Dams, D., & Briers, Y. (2019). Enzybiotics: Enzyme-based antibacterials as therapeutics. *Therapeutic enzymes: Function and clinical implications*, 233-253.
- Diez-Martinez, R., De Paz, H. D., García-Fernández, E., Bustamante, N., Euler, C. W., Fischetti, V. A., ve García, P. (2015). A novel chimeric phage lysin with high in vitro and in vivo bactericidal activity against *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(6), 1763-1773.

- Ekşi, A., 1988. Meyve Suyu Durultma Tekniği. Gıda Teknolojisi Derneği, yayın No : 9, 127p, Ankara.
- Farooq, M.A., Ali, S., Hassan, A. *et al.* Biosynthesis and industrial applications of α -amylase: a review. *Arch Microbiol* **203**, 1281–1292 (2021).
- Fried, B., ve Sherma J.,(1999). Thin Layer Chromatography. (4th edn.), Marcel Dekker, New York
- Gessesse, A., ve Gashe. B:A., 1997. Production of Alkaline Xylanase by an *Bacillus* sp. Isolated from an Alkaline Soda Lake. *Journal of Applied Microbiology.*, 83. 402-406.
- Gomes I., Gomes J., ve Steiner W., (2003). Highly thermostable amylase and pullulanase of the extreme thermophilic eubacterium *Rhodothermus marinus*: production and partial characterization, *Bioresource Technology*. **90**, no. 2, 207–214, 2-s2.0-0043170899,
- Gupta R, Giras P, Mohapatra H, Gaswami YK, Chauhan B. Microbial α -amylase: a biotechnological perspective. *Process Biochem* 2003; 38(11):1599-1616.
- Gurung, N., Ray, S., Bose, S., ve Rai, V., 2013. A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond. *BioMed Research International*, 2013, 329121, 18 pages, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/329121>.
- Hazaa, M.M., Sabae, S.Z., Areej Ibrahim, F. T., Eldourghamy, A.S. & Sayed, H. (2018). Production, Purification and Characterization of Alfa-amylase produced by Bacteria from Pharaonic Lake. *Journal of Basic and Environmental Sciences*, 5:162–173
- HOLT, J.G., N.R. KRIEG, P.H.A. SNEATH, J.T. STALEY and S.T. WILLIAMS. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* Ninth Edition. 559 p.
- JOHN, F.K., 1987. *Enzyme Technology* (HJ. REHM.5 G. REED editor). *Biotechnology* Vol. 7A. New York s 37-62.
- Kalaylı, E. ve Beyatlı, Y. 2003. *Bacillus* Cinsi Bakterilerin Antimikrobiyal Aktiviteleri, PHB Üretimleri ve Plazmid DNA' ları. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*. 01(12), Sayfa: 24.
- Kalkan, S. ve Halkman K. 2006. *Bacillus cereus* ve İçme Sütünde Oluşturduğu Sorunlar. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*. 04(01), Sayfa: 1.
- Karaca, M. T., 2018. *Aspergillus Section Nigri* Üyelerinin Amilaz Üretme Özelliklerinin İncelenmesi. İstanbul Teknik Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi.
- Karcıoğlu Batur, L. ve Aygan, A., 2015 Kahramanmaraş Topraklarından İzole Edilen *Bacillus* sp. Tarafından Alfa-Amilaz Üretimi ve Karakterizasyonu. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi* 5(2):68-74.
- Kaur, J., Singh, P., Sharma, D., Harjai, K., & Chhibber, S. (2020). A potent enzymiobiotic against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Virus Genes*, 56, 480-497.
- Kaya, S. ve Enez, B., 2019. Toprakta İzole Edilen *Bacillus* Türlerinden α -Amilazın İzolasyonu ve Karakterizasyonu. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi* 6(3): 494–499,

- Köle, Z., 2024. Atık Sulardan Saf Borik Asit Eldesi İçin Kromatografik Yöntemlerin Kullanılması ve Modellenmesi. Gebze Teknik Üniversitesi. Lisansüstü Eğitim Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi.
- Kuşoğlu S., 2019. Microcystis Aeruginosa Toksik Peptidlerinin Kromatografik Analizi ve Epitel Hücreleri Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi. İstanbul Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of the Bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.
- Lenette, E.H., Balows, A., Hausler, J.WJR, Shadomy, J.H., 1985. *Manual of Clinical Microbiology*. Vol. 4 Amerika. 1149p.
- Lin, A., Zhang, X., Chen, M., Cao, Q. 2007. Oxidative stress and DNA damages induced by cadmium accumulation. *Journal of Environmental Science*, 19:596-602.
- Maarel, M. J.E.C., Veen B., Uitdehaag J. C.M., Leemhuis, H., Dijkhuizen, L., 2002, Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family, Review article, *Journal of Biotechnology*, 94, 137–155.
- Mamo, G., ve Gessesse, A., (1999), Purification and characterization of two raw-starch-digesting thermostable α -amylases from a thermophilic *Bacillus*, *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 25, Issues 3–5, Pages 433-438, ISSN 0141-0229,
- MIKAMI, B., E.J. HEHRE, M. SATO, Y. KATSUBE, M. HIROSE, Y. MORITA and J.C. SACCHETTINI. 1993. The 2.0 Å resolution structure of soybean β -amylase complexed with α -cyclodextrin. *Biochemistry*. 32:6832-6845.
- MORGAN, F.J. ve PRIEST, F.G., 1981. Characterization of a thermostable α -amylase from *Bacillus licheniformis* NCIB 6346. *Journal of Applied Microbiology*, 50:107-114.
- Msarrah, J.M., Ibrahim, I., Hamid, A.A., Aqma, S. (2020). Optimisation and production of alpha amylase from thermophilic *Bacillus* spp. and its application in food waste biodegradation. *Heliyon*, 6(6), e04183.
- Nirmala, M., Muralikrishna, G., (2003), “Three α -amylases from malted finger millet (ragi, *Eleusine coracana*, Indaf-15) - Purification and partial characterization”, *Phytochemistry*, 62 (1) , 21-30.
- Ornstein, L. (1964). Disc Electrophoresis - I Background and Theory. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 121(2), 321-349. [https:// doi.org/10.1111/j.1749-6632.1964.tb14207.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1964.tb14207.x).
- Ortakaya, V. ve Ağuloğlu Fincan, S. (2019). SmF yöntemiyle topraktan izole edilen *Bacillus subtilis*'den amilaz üretimi. *Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma*, 12(3), 57-64.
- Örtücü, Z., 2023. AMİLAZ ÜRETİCİ FUNGUSLARIN İZOLASYONU VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU. Atatürk Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi.

- Özdemir, G., ve Özcan, B. D. (2020). Sıcaklığa Dirençli Alfa-amilaz Enzimi Üreten Mezofilik Bakteri İzolasyonu ve Enzimin Kısmi Karakterizasyonu. *Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 3(2), 146-153.
- Özdolap, m., (2021), Yem Katkısı Amilaz Enzimlerini Üreten Bakterilerin İzolasyonu. Ç.Ü.F.B.E. Yüksek Lisans Tezi.
- Pal, G. K., & Suresh, P. V. (2016). Microbial collagenases: challenges and prospects in production and potential applications in food and nutrition. *RSC advances*, 6(40), 33763-33780.
- Pandey A, Nigam P, Soccol CR, Soccol VT, Sing D, Mohan R. (2000). Advances in microbial amylases. *Biotechnol Appl Biochem*; 31(2):135-152.
- Pequeno, A. C., Arruda, A. A., Silva, D. F., Duarte Neto, J. M., Silveira Filho, V. M., Converti, A., ... & Lima, C. A. (2019). Production and characterization of collagenase from a new Amazonian *Bacillus cereus* strain. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 49(5), 501-509.
- PRIEST, F.G., M. GOODFELLOW, L.A. SHUTE and R.C.W. BERKELEY. 1987. *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov., nom. rev. int. J. Syst. Bacteriol. 37:69-71.
- Pushkaran, A. C., Nataraj, N., Nair, N., Götz, F., Biswas, R., & Mohan, C. G. (2015). Understanding the structure–function relationship of lysozyme resistance in *Staphylococcus aureus* by peptidoglycan O-acetylation using molecular docking, dynamics, and lysis assay. *Journal of chemical information and modeling*, 55(4), 760-770.
- Ratanakhanokchai, K., KYU, K.L., TANTICHAROEN, M., 1999. Purification and Properties of a Xylan-Binding Endoxylanase from Alkaliphilic *Bacillus* sp. Strain K-1. *Appl.Environ.Microbiol.*, 65: 694- 697.
- Raveendran, S., Parameswaran, B., Ummalyma, S.B., Abraham, A., Mathew, A.K., Madhavan, A.,Rebello, S., Pandey, A. (2018). Applications of Microbial Enzymes in Food Industry. *Food Technology & Biotechnology*, 56(1), 16-30. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.01.18.5491>.
- Reddy, N.S., Nimmagadda, A. ve Sambasiva Rao, K.R.S., 2003. An overview of the microbial α -amylase family. *African Journal of Biotechnology*, 2 (12), 645-648.
- Reynolds, J. A. ve Tanford, C. (1970). Binding of dodecyl sulfate to proteins at high binding ratios. Possible implications for the state of proteins in biological membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 66(3), 1002-1007. <https://doi.org/10.1073/pnas.66.3.1002>
- Robyt, J.F., 1998. *Essentials of Carbohydrate Chemistry*. Springer, New York.
- Sajid, Z., Shafique, M., Naz, S., ve Jabeen, N., (2016). An Economical And Energy Saving Approach For Amylase Production From *Bacillus* Sp. Mtz-1 By Submerged Fermentation Under Static Conditions: Application And Antimicrobial Potential Of Crude Preparations. *International Journal of Biology and Biotechnology*. 13. 513-521.

- Sanchez, S., ve Demain, A. L., 2017. Chapter 1 - Useful Microbial Enzymes An Introduction. Biotechnology of Microbial Enzymes, Academic Press, ISBN 9780128037256,
- Santiago, M., ve Strobel, S., 2013, Chapter Twenty-Four - Thin Layer Chromatography, Methods in Enzymology, Academic Press, Volume 533, Pages 303-324, ISSN 0076-6879,
- Saraçoğlu, Z. N., 2010. Cellulase-Free Alkaline Xylanase Enzim Üreticisi *Bacillus* sp. Suşlarının İzolasyonu, Enzim Üretimi, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Kullanım Olanaklarının Araştırılması. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Sarıkaya, E., 1995, Alfa Amilaz Üreten Bazı *Bacillus* Suşlarının Gelişme Parametreleri, Enzim Özellik ve Üretim Koşullarının Optimizasyonu, Doktora Tezi, Ankara Üniv, Ankara.
- Scopes, R. K. (1993). Protein purification: principles and practice. Springer Science & Business Media
- Sidhu G. S., Sharma P., Chakrabarti T., and Gupta J. K., (1997). Strain improvement for the production of a thermostable α -amylase, *Enzyme and Microbial Technology*. **21**, no. 7, 525–530, 2-s2.0-0343554666,
- Simair, A. A., Khushk, I., Qureshi, A. S., Bhutto, M. A., Chaudhry, H. A., Ansari, K. A. Ve Lu, C., 2017 Amylase Production from Thermophilic *Bacillus* sp. BCC 021-50 Isolated from a Marine Environment
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., Kumar Mehta, P. (2016). Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. 3 Biotech, 6, 174.
- Skoog D. A. ve West D. M., 1980 . Principles of Instrumental Analysis , Saunders Co. , New York ,
- Souza PM, Magalhaes PO. Application of microbial amylase in industry. Brazilian J Microbiol 2010; 41(4):850-861.
- Spector, T., 1978. Refinement of the Coomassie blue method of protein quantification: A simple and linear spectrophotometric assay for ≤ 0.5 to 50 μg of protein, *Anal Biochem*, 86(1):142-146.
- Srivastava, R.A.K., 1987. Purification and Chemical Characterization of Thermostable Amylases Produced by *Bacillus stearothermophilus*. Biochemistry Laboratory, Botany Department, University of Gorakhpur, Gorakhpur 273001, India.
- Şahutoğlu A. S., 2013. α – Amilaz ve γ - Amilaz Enzimlerinin Çapraz Bağlı Enzim Agregatları (CLEA) Şeklinde İmmobilizasyonu. Çanakkale On sekiz Mart Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi.
- Tatar, S., 2007. Termofil Moderately Halofilik *Bacillus* sp. Suşlarından Amilaz Enzimi Üretimi ve Endüstriyel Kullanım Olanaklarının Araştırılması. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi.
- Temizkan, G. ve Arda, N., 2008. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Nobel Tıp Kitabevi, 3. Baskı, İstanbul, s.345.

- Tuncer, M., 2009. Protein Saflaştırma 2 Elektroforetik Teknikler. Mersin Üniversitesi Fen Edebiyat Fakóltesi Biyoloji Bölümü Mersin. ISBN 9789756900239.
- Vachher, M., Sen, A., Kapila, R., ve Nigam, A., 2021. Microbial therapeutic enzymes: A promising area of biopharmaceuticals, *Current Research in Biotechnology*, Volume 3, Pages 195-208, ISSN 2590-2628,
- Van Der Maarel M. J. E. C., Van Der Veen B., Uitdehaag J. C. M., Leemhuis H., ve Dijkhuizen L., (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family, *Journal of Biotechnology*. **94**, no. 2, 137–155, 2-s2.0-0037187437,
- Vimal, A., & Kumar, A. (2018). L-Asparaginase: a feasible therapeutic molecule for multiple diseases. *3 Biotech*, 8(6), 278.
- Voget, S., Steele, H.L., Streit, W.R., 2006. Characterization of metagenomederived halotolerant cellulase. *J. Biotechnol.*, 126:26-36.
- Wiseman, A., 1987. Handbook of enzyme biotechnology. Second Edition. Chapter 3. The application of enzymes in industry, p.274-373.
- Wilson, C. L. 1966. Chromatography, An Approach to Chemical Analysis, 192-221.
- Wu X, Wang Y, Tong B, Chen X, Chen J (2018) Purification and biochemical characterization of a thermostable and acid-stable alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* B4-423. *Int J Biol Macromol* 109:329–337
- Xu, L., Liang, G., Chen, B., Tan, X., Xiang, H., & Liao, C. (2020). A computational method for the identification of endolysins and autolysins. *Protein and Peptide Letters*, 27(4), 329-336.
- Yang, H., Liu, L., Li, J., Du, G. and Chen, J., 2011. Heterologous expression, biochemical characterization and overproduction alkaline α -amylase from *Bacillus alcalophilus* in *Bacillus subtilis*. *Microb Cell Fact.*, 10, 77.
- Yıldırım, A., Bardakcı, F., Karataş, M., ve Tanyolaç B., 2007. Moleküler Kitabı. Nobel yayınevi. Sayfa: 579.
- Zhang, B., Sun, Z.W., Jiang, D.D., Niu, T.G., 2009. Isolation and purification of alkaline keratinase from *Bacillus* sp. 50-3. *African Journal of Biotechnology*, 8(11):2598-2603.



ÖZGEÇMİŞ

Zainab SAFIEDDIN KARABELLİ. İlköğretim Halep'te, Lise öğretimini ise Adana'da tamamladı. 2016-2017 akademik yılında Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi TÖMER'de, İleri Düzey Türkçe Eğitimi Programına katılarak Türkçe'yi çözdü. 2021 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezun oldu. 2021 yılında Çukurova Üniversitesinde Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitime başladı.

