



**KAPLICA SUYUNDAN İZOLE EDİLEN ILIMLI
TERMOFİLİK *Niallia alba* BT-5 AMİLAZININ
ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU VE ENDÜSTRİYEL
KULLANIM POTANSİYELİ**

Behiye TAŞER

Danışman: Prof. Dr. Hakan ÖZKAN

Doktora Tezi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

2025

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI

**KAPLICA SUYUNDAN İZOLE EDİLEN ILIMLI TERMOFİLİK *Niallia alba* BT-5
AMİLAZININ ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE
ENDÜSTRİYEL KULLANIM POTANSİYELİ**

(Production, Purification, Characterization and Industrial use Potential of Amylase of
Moderate Thermophilic *Niallia alba* BT-5 Isolated From Hot Spring Water)

DOKTORA TEZİ

Behiye TAŞER

Danışman: Prof. Dr. Hakan ÖZKAN

Erzurum
Mayıs, 2025

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü

TEZ KABUL VE ONAY TUTANAĞI

**KAPLICA SUYUNDAN İZOLE EDİLEN ILIMLI TERMOFİLİK *Niallia alba* B T5
AMİLAZININ ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE
ENDÜSTRİYEL KULLANIM POTANSİYELİ**

Prof. Dr. Hakan ÖZKAN danışmanlığında, Behiye TAŞER tarafından hazırlanan bu çalışma, 30/05/2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (5/5)** ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Danışman:	Prof. Dr. Hakan ÖZKAN <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Özkan AKSAKAL <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ <i>Erzurum Teknik Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Doç. Dr. Burak ALAYLAR <i>Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır

Enstitü Yönetim
Kurulunun .../.../.... tarih
ve sayılı kararı.

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Alper NUHOĞLU

Enstitü Müdürü
Aslı Islak İmzalıdır

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri ve TÜBİTAK BİDEB-22 11-A Yurtiçi Doktora Burs Programı kapsamında desteklenmiştir.

Proje No: FDK-2022-11511



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Doktora Tezi olarak *Prof. Dr. Hakan ÖZKAN* danışmanlığında sunulan “*Kaplıca Suyundan İzole Edilen Ilımlı Termofilik Niallia alba BT-5 Amilazının Üretimi, Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Endüstriyel Kullanım Potansiyeli*” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	11	30
Kuramsal Temeller	2	30
Materyal ve Metot	8	35
Araştırma Bulguları ve Tartışma	3	20
Sonuçlar ve Öneriler	0	20
Tezin Geneli	7	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Sunulan bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ettiğimizi beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Behiye TAŞER	Prof. Dr. Hakan ÖZKAN
28.4.2025	28.4.2025
İmza: Aslı Islak İmzalıdır	İmza: Aslı Islak İmzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ'de yayımlanmasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☒ Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Doktora tezinin deneysel çalışmaları, Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından alınan destek ile (Proje No: FDK-2022-11511) Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Merkezi Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı ve Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Bu tezin tamamlanmasında büyük destekte bulunan, beni destekleyen ve fikirleriyle bana yol gösteren, doktoram boyunca her türlü yardım ve desteği sağlayan değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hakan ÖZKAN'a,

Deneysel çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan kıymetli Prof. Dr. Furkan ORHAN'a ve tez süreci boyunca desteklerini esirgemeyen Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünden başta bölüm başkanım Sayın Prof. Dr. Kenan KARAGÖZ olmak üzere tüm hocalarıma,

Karamsarlığa kapıldığım her noktada motivasyon destekçim olan, sıkıştığım anlarda yardımına yetişen, tecrübeleriyle bana yol gösteren çok kıymetli ablam Doç. Dr. Pınar GÜLLER'e,

Bu stresli zamanlarda beni yalnız bırakmayan, kendi alanları olmadığı halde benim derdimle dertlenen ve bu zorlu süreci benim için eğlenceli hale getiren Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi'ndeki çok kıymetli ve değerli mesai arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Deniz ERÇAVUŞ, Arş. Gör. Meryem Sümeyye ÖZBAYRAK ve Doç. Dr. Fehminaz TOKMAK'a, lisanstan itibaren bağlarımı koparmayan ve desteklerini daima hissettiğim dostlarım Meltem ALP ve Zeynep HAYIRLI'ya,

Hayatım boyunca benim için mücadele eden, buralara kadar gelmemde büyük emekleri olan, bana güvenen ve inanan, yaşam kaynaklarım çok kıymetli anneme, babama ve biricik abim Dr. Öğr. Üyesi Ahmet TAŞER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

BİDEB-2211-A Yurt İçi Genel Doktora burs programı ile sağladığı maddi desteklerden dolayı Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'na teşekkür ederim.

*Farkında olabilseydi benimle gurur duyacağından emin olduğum **BABAM**'a...*

Behiye TAŞER

ÖZET

DOKTORA TEZİ

KAPLICA SUYUNDAN İZOLE EDİLEN ILIMLI TERMOFİLİK *Niallia alba* BT-5 AMİLAZININ ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE ENDÜSTRİYEL KULLANIM POTANSİYELİ

Behiye TAŞER

Danışman: Prof. Dr. Hakan ÖZKAN

Amaç: Bu çalışmada, daha önce bakteriyel çeşitliliği araştırılmamış olan Bitlis/Gülsuhan kaplıcasından bakteri izolasyonu, en yüksek amilaz aktiviteye sahip izolattan enzim üretilerek saflaştırılması ve bazı endüstriyel alanlardaki kullanım potansiyelinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmada kullanılan bakteriler Bitlis/Gülsuhan kaplıcasından temin edilen su örneğinden izole edildi. Tüm isolatların, konvensiyonel analizlerine ve 16S rRNA dizi analizlerine göre tür tanımlaması yapıldı. En yüksek amilaz aktiviteye sahip izolat belirlendi ve daha yüksek ekstraselüler amilaz üretimi için kültür parametreleri optimize edildi. Optimal değerlerde amilaz üretimi gerçekleştirildi ve kültür sıvısı süpernatantından nişasta afinite yöntemine göre enzim saflaştırıldı. Daha yüksek amilaz saflaştırması için nişasta afinite tekniği optimize edildi. Optimum değerlere göre nişasta afinite tekniği ile saflaştırılan amilazın karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. K_M sabiti ve V_{Max} değeri araştırılarak enzim kinetiği incelendi ve SDS-PAGE ile enzimin alt birim molekül ağırlığı tespit edildi. Saflaştırılan amilazın deterjan, içecek ve tekstil endüstrilerindeki kullanım potansiyeli ortaya koyuldu.

Bulgular: Kaplıca suyundan toplamda 9 bakteri izole edilerek tür tanımlamaları yapıldı ve en yüksek amilaz pozitif bakteri BT-5 izolatu olarak belirlendi. BT-5 izolatu *Niallia alba* (GenBank®: PV370379) olarak tanımlandı. İndüklenmiş sıvı besiyerine inoküle edilen BT-5'in ekstraselüler amilaz aktivitesi başlangıçta 68,14 EÜ/ml iken kültür optimizasyonu ile (pH:9, 45°C, 48 saat, %1,5 Nişasta konsantrasyonunda) 113,17 EÜ/ml aktiviteye ulaşıldı. *N. alba* BT-5 amilazının saflaştırılması için uygulanan tek basamaklı nişasta afinite tekniğinin saflaştırma verimini artırmak adına optimizasyon çalışmaları (pH:7, %2 nişasta konsantrasyonu, 30 dk) yapıldı ve diyaliz sonrası 56,7 verimle 5,23 kat saflaştırılan amilazın molekül ağırlığı 72,1 kDa olarak belirlendi. Karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilen enzimin K_M sabiti ve V_{Max} değeri sırasıyla 1,21 mg/ml ve 2000 EÜ/ml olarak belirlendi.

Sonuç: Bitlis/Gülsuhan kaplıca suyunun bakteriyel çeşitliliğinin incelenmesi ve *Niallia alba* bakterisinden amilaz eldesi literatürde ilk kez mevcut tez çalışması ile gerçekleştirildi. *N. alba* BT-5 amilazının deterjan ve içecek endüstrisi için kullanım potansiyeline sahip olduğu, tekstil endüstrisi için ise yapılacak optimizasyon çalışmaları ile iyileştirilebileceği görülmektedir. *N. alba* amilazının endüstriyel prosesler için kullanım alanı bulabileceği ortaya koyulmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Niallia alba*, amilaz, nişasta afinite tekniği, saflaştırma, endüstriyel uygulama

Mayıs 2025, 141 sayfa

ABSTRACT

DOCTORAL DISSERTATION

PRODUCTION, PURIFICATION, CHARACTERIZATION AND INDUSTRIAL USE POTENTIAL OF AMYLASE OF MODERATE THERMOPHILIC *Niallia alba* BT-5 ISOLATED FROM HOT SPRING WATER

Behiye TAŞER

Supervisor: Prof. Dr. Hakan ÖZKAN

Purpose: This study aimed to isolate bacteria from the Bitlis/Gülsuhan hot spring, which has not been previously studied for its bacterial diversity, to produce and purify the enzyme from bacteria that exhibit the highest amylase activity, and to investigate its potential applications in various industries.

Method: The bacteria used in the study were isolated from the water sample provided from the Bitlis/Gülsuhan hot springs. The species identification of all isolates was carried out according to conventional analyses and 16S rRNA sequence analyses. The isolate with the highest amylase activity was determined, and culture parameters were optimized for higher extracellular amylase production. Amylase production was carried out at optimal values, and the enzyme was purified from the culture broth supernatant by the starch affinity method. The starch affinity technique was optimized for higher amylase purification. Characterization studies were performed on amylase purified by the starch affinity technique according to the optimal values. The enzyme kinetics were examined by determining the K_M constant and V_{Max} value, and the subunit molecular weight of the enzyme was determined using SDS-PAGE. The usage potential of purified amylase in the detergent, beverage, and textile industries was revealed.

Findings: A total of 9 bacteria were isolated from the hot spring water, species identification was performed, and the highest amylase-positive bacteria was determined as BT-5 isolate. The BT-5 isolate was identified as *Niallia alba* (GenBank®: PV370379). While the extracellular amylase activity of BT-5 inoculated into induced liquid medium was initially 68.14, 113.17 EU/ml activity was reached with culture optimization (pH 9, 45°C, 48 hours, 1.5% starch concentration). To increase the purification efficiency of the one-step starch affinity technique applied for the purification of *N. alba* BT-5 amylase, optimization studies (pH 7, 2% starch concentration, 30 min) were performed, and the molecular weight of the amylase, which was purified 5.23-fold with a yield of 56.7 after dialysis, was determined as 72.1 kDa. The K_M constant and V_{Max} value of the enzyme whose characterization studies were performed were determined as 1.21 mg/ml and 2000 EU/ml, respectively.

Results: The investigation of bacterial diversity of Bitlis/Gülsuhan hot spring water and the production of amylase from *Niallia alba* bacteria were carried out for the first time in the literature with the current thesis study. It is seen that *N. alba* BT-5 amylase has the potential to be used in the detergent and beverage industry and can be improved with optimization studies for the textile industry. It has been revealed that *N. alba* amylase can be used in industrial processes.

Keywords: *Niallia alba*, amylase, starch affinity technique, purification, industrial application

May 2025, 141 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	xiv
GİRİŞ.....	1
Enzimler.....	4
Enzimlerin Sınıflandırılması ve Fonksiyonları	4
Termostabil Enzimler.....	6
Nişasta	8
Nişastayı Hidroliz Eden Enzimler.....	10
α -Amilaz (EC 3.2.1.1).....	10
β -Amilaz (EC 3.2.1.2).....	12
Glukoamilaz (EC 3.2.1.3)	12
Amilaz'ın Endüstriyel Uygulamaları	12
Deterjan endüstrisi	12
İçecek endüstrisi.....	13
Tekstil endüstrisi	13
Etanol üretim prosesi.....	14
Gıda endüstrisi	14
Kağıt endüstrisi	14
Mikrobiyal Amilaz Kaynakları	14
Amilaz Aktivitenin Ölçülmesi	16
Termofilik Bakteriler	16
<i>Niallia</i> cinsi	16
KURAMSAL TEMELLER.....	19
MATERYAL VE METOT	25
Materyal	25

Kullanılan kimyasallar	25
Kullanılan cihazlar	27
Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı	27
Metot	30
Sıcak su örneğinin toplanması ve bakteri izolasyonu	30
Bakteri izolatlarının morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testleri.....	30
İzolatların morfolojik testleri	30
İzolatların fizyolojik testleri.....	32
İzolatların biyokimyasal testleri.....	33
M9-Nişasta agar petri yöntemi ile bakterilerde amilaz varlığının test edilmesi	36
Amilaz pozitif izolatın sıvı besiyerinde geliştirilmesi ile ham enzim kaynağının üretimi ve amilaz aktivitenin tayin edilmesi.....	37
Maltoz çözeltisi ile standart eğrinin oluşturulması	38
İzolatlarının moleküler analizi ile tür tespitinin gerçekleştirilmesi	38
Amilaz üretimi için optimal kültür parametrelerinin belirlenmesi	43
Kültür sıvısından amilazın saflaştırılması.....	45
Nişasta afinite tekniğinde % tutunma oranının optimizasyonu.....	46
Diyaliz	47
Kantitatif protein tayini	48
Saflaştırılan Amilazın Karakterizasyonu	50
Saflaştırılan amilazın bazı endüstriyel uygulamalarda kullanılabilirliğinin araştırılması	52
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	56
Sıcak Su Örneğinin Toplanması ve Bakteri İzolasyonu	56
Bakteri İzolatlarının Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Testleri	56
İzolatların Hücre ve Koloni Morfolojilerinin İncelenmesi	56
Hareketlilik testi	57
Gram testi	57
Endospor testi.....	58
İzolatların Fizyolojik Testleri.....	58
İzolatların Biyokimyasal Testleri.....	59
M9-Nişasta Agar Petri Yöntemi ile Bakterilerde Amilaz Varlığının Test Edilmesi	63
İzolatların Moleküler Analizi ile Tür Tespitlerinin Gerçekleştirilmesi	66
Amilaz Pozitif İzolatın Sıvı Besiyerinde Geliştirilmesi ile Ham Enzim Kaynağının Üretimi ve Amilaz Aktivitenin Tayin Edilmesi.....	71

İzolatan sıvı besiyerinde geliştirilmesi ile ham enzim kaynağının üretilmesi	71
DNS yöntemi ile amilaz aktivite tayini	71
Maltoz çözeltisi ile standart eğrinin oluşturulması	71
Amilaz Üretimi İçin Optimal Kültür Parametrelerinin Belirlenmesi.....	73
Optimum pH değerinin belirlenmesi.....	73
Optimum substrat konsantrasyonu değerinin belirlenmesi	74
Optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi	76
Optimum inkübasyon süresinin belirlenmesi	77
Kültür Sıvısından Amilazın Saflaştırılması	79
Nişasta Afinite Tekniğinde %Tutunma Oranının Optimizasyonu	80
% Tutunma oranı için optimum pH'nın belirlenmesi	80
%Tutunma oranı için optimum çözünmez nişasta konsantrasyonunun belirlenmesi	80
%Tutunma oranı için optimum tutunma süresinin belirlenmesi	81
Diyaliz	83
Kantitatif Protein Tayini	83
Bradford yöntemi ile protein tayini	83
SDS-PAGE ile enzimin alt birimlerinin molekül ağırlığının belirlenmesi	86
Saflaştırılan Amilazın Karakterizasyonu	87
Enzim için optimum pH'nın belirlenmesi.....	87
Enzim için optimum sıcaklığın belirlenmesi	89
Enzimin ısıl kararlılığının belirlenmesi.....	91
Enzimin pH kararlılığının belirlenmesi.....	93
Metal iyonları, deterjan, şelatör ve organik çözücülerin enzim aktivitesi üzerine etkilerinin belirlenmesi.....	96
Enzimin K_M ve V_{Max} değerlerinin belirlenmesi	98
Saflaştırılan Amilazın Bazı Endüstriyel Uygulamalarda Kullanılabilirliğinin Araştırılması.....	100
Enzimin deterjan endüstrisinde kullanılabilirliğinin incelenmesi.....	100
Enzimin tekstil endüstrisinde kullanılabilirliğinin incelenmesi	103
Enzimin meyve suyu endüstrisinde kullanılabilirliğinin incelenmesi	105
SONUÇ VE ÖNERİLER	108
KAYNAKLAR.....	110
ÖZGEÇMİŞ.....	124

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 1. Fonksiyonlarına Göre Enzimlerin Sınıflandırılması (Tamura <i>et al.</i> 2013)	5
Tablo 2. Amilolitik Enzimlerden Bazıları	11
Tablo 3. <i>Niallia alba</i> ve <i>Niallia circulans</i> Bakterilerinin Bazı Fizikokimyasal Özellikleri (Thorat <i>et al.</i> 2021)	18
Tablo 4. Tez Çalışmalarında Kullanılan Kimyasallar, Kitler ve Üretici Firmalar	25
Tablo 5. Tez Çalışmalarında Kullanılan Cihazlar ve Markaları	27
Tablo 6. DNS Yöntemi ile Amilaz Aktivite için Hazırlanan Tüpler ve Reaksiyon Koşulları.	38
Tablo 7. Standart Eğri Eldesi için Hazırlanan Maltoz Standart Çözeltileri.....	38
Tablo 8. 16S rRNA PCR Analizi için Hazırlanacak Reaksiyon Karışımı ve PCR Protokolü.	39
Tablo 9. Ligasyon İşleminde Kullanılan Kimyasallar ve Uygulama Miktarları	41
Tablo 10. Koloni PCR için Hazırlanacak Reaksiyon Karışımı ve PCR Protokolü	42
Tablo 11. Bradford Yöntemi ile Protein Tayini için Hazırlanan Standart Tüpler ve Örnek Tüpü	48
Tablo 12. SDS-PAGE Bileşenleri.....	50
Tablo 13. Amilaz Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İnceleneceği Maddeler ve Hazırlanan Stok Konsantrasyonları	52
Tablo 14. Enzimin Deterjan Uyumunun Belirlenmesi için Kullanılan Deterjanların Kodları ve Konsantrasyonları	53
Tablo 15. Leke Giderimi için Beherlerin Hazırlanması.....	54
Tablo 16. Bakteri İzolatlarının Konvensiyonel Analiz Sonuçları.....	60
Tablo 17. Bakteri İzolatlarının Fizyolojik Test Sonuçları	64
Tablo 18. İzolatların Karbonhidrat Fermantasyonu ile Asit Üretimi Test Sonucu.....	64
Tablo 19. Bakteri İzolatlarının Biyokimyasal Test Sonuçları	65
Tablo 20. Bitlis/Gülsuhan Kaplıca Suyundan Saflaştırılan İzolatların Benzerlik Yüzdeleri ve Tür İsimleri	69
Tablo 21. pH 4-10 Arası Kültür Sıvılarından Elde Edilen OD ve Amilaz Aktivite Değerleri	73
Tablo 22. %0,1-%3 Arası Nişasta Konsantrasyondaki Kültür Sıvılarından Elde Edilen OD ve Amilaz Aktivite Değerleri.....	75
Tablo 23. 25-65°C Arası Sıcaklık Değerlerinde Kültür Sıvılarından Elde Edilen OD ve Amilaz Aktivite Değerleri.....	76

Tablo 24. 6. ve 96. Saatler Arası İnkübasyon Süresinde Kültür Sıvılarından Elde Edilen OD ve Amilaz Aktivite Değerleri	78
Tablo 25. Saflaştırma Optimizasyonu için Değişen Parametrelere Karşı Elde Edilen %Tutunma Oranları.....	81
Tablo 26. <i>Niallia alba</i> BT-5 İzolatından Saflaştırılan Ekstraselüler Amilazın Saflaştırma Tablosu.....	85
Tablo 27. Değişen pH Değerlerine Karşı <i>N. alba</i> BT-5 Amilazının %Bağıl Aktivite Değerleri	88
Tablo 28. Değişen Sıcaklık Değerlerine Karşı <i>N. alba</i> BT-5 Amilazının %Bağıl Aktivite Değerleri.....	90
Tablo 29. 4°C, 45°C ve 55°C Sıcaklıklarda <i>N. alba</i> BT-5 Amilazının Kalan Aktivitesinin Zamana Bağlı Değişimi	91
Tablo 30. Asetat Tamponu ile Hazırlanan Farklı pH Değerlerinde <i>N. alba</i> BT-5 Amilazının Kalan Aktivitesinin Zamana Bağlı Değişimi	93
Tablo 31. Fosfat Tamponu ile Hazırlanan Farklı pH Değerlerinde <i>N. alba</i> BT-5 Amilazının Kalan Aktivitesinin Zamana Bağlı Değişimi	94
Tablo 32. Tris-HCl Tamponu ile Hazırlanan Farklı pH Değerlerinde <i>N. alba</i> BT-5 Amilazının Kalan Aktivitesinin Zamana Bağlı Değişimi	95
Tablo 33. Metal İyonları, Deterjan, Şelatör ve Organik Çözücülerin <i>N. alba</i> BT-5 Amilazı Aktivitesine Etkisi.....	97
Tablo 34. Farklı Deterjan Uygulamaları Sonucu <i>N. alba</i> BT-5 Amilazının % Kalan Aktivite Değerleri.....	100
Tablo 35. <i>N. alba</i> BT-5 Amilazının Haşıl Giderme Etkinliği	104
Tablo 36. <i>N. alba</i> BT-5 Amilazının Taze Elma Suyundaki Bazı Parametrelere Etkisi.....	105

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Termozimlerin avantajları	7
Şekil 2. Nişasta polimerini meydana getiren amiloz ve amilopektin glukoz polimerlerinin yapısı ve glikozid bağlarının gösterimi	9
Şekil 3. α -Amilaz ile nişastanın hidrolizi	11
Şekil 4. Amonifikasyon ve denitrifikasyon reaksiyonları	35
Şekil 5. Nişasta afinite tekniği ile amilaz saflaştırmasının şematize hali.....	49
Şekil 6. Enzimin leke giderme performansının denenmesi için kurulan deney düzeneği.....	54
Şekil 7. Meyve suyu ile gerçekleştirilecek olan deney düzeneği	55
Şekil 8. a) Bitlis/Gülsuhan karışık kültürü (10^{-5} seyreltme) b) Bu karışık kültürden saflaştırılan BT-1 izolatının petri görüntüsü	56
Şekil 9. Kristal viyole ile boyanan BT-5 izolatının mikroskop görüntüsü.....	57
Şekil 10. a) BT-5 izolatının TSA besiyerindeki petri görüntüsü, b) Stereomikroskop ile elde edilen koloni morfolojisi.....	57
Şekil 11. Endospor boyama testinde hazırlanan preparatların su buharı etkisi altında malaşit yeşili ile boyanması için kurulan düzenek	58
Şekil 12. BT-5 izolatına ait endosporların mikroskop görüntüsü (immersiyon objektifi)	58
Şekil 13. BT-5 izolatının %4 ve %8 NaCl içeren sıvı besiyerinde 24 saatlik inkübasyonu sonrası kültür sıvıları	59
Şekil 14. a) %3'lük H_2O_2 çözeltisi ile gerçekleştirilen katalaz pozitif test sonucu b) %3'lük KOH çözeltisi ile gerçekleştirilen gram testinde kontrol olarak kullanılan Gr (-) <i>E.coli</i> 'nin test sonucu	59
Şekil 15. a) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'ya ait oksidaz pozitif test sonucu, b) BT-5 izolatına ait oksidaz negatif test sonucu	60
Şekil 16. BT-4 izolatının test tüpündeki nitrat üretim testi sonucu (Nitrat pozitif, fakültatif aerobik).....	61
Şekil 17. BT-4 izolatının inoküle edildiği KNO_3 içeren sıvı besiyerinde inkübasyon sonrası kültür ortamı (solda), kültür sıvısına eklenen nitrit ayracı ile enzimatik reaksiyona bağlı gerçekleşen renk değişimi (sağda)	61
Şekil 18. Eskülin agar kontrol tüpü (Solda), inkübasyon sonrası BT-5 bakterisinin enzim aktivitesiyle kültür ortamında meydana gelen renk değişimi (Sağda)	62
Şekil 19. a) D-Mannoz kontrol tüpü ve İnoküle edilen BT-5 izolatının D-Mannoz fermantasyonuyla asit üretimi sonucu renk değişimi, b) L-Arabinoz kontrol	

tüpü ve İnoküle edilen BT-5 izolatının L-Arabinoz fermantasyonuyla asit üretimi sonucu renk değişimi	62
Şekil 20. β -galaktosidaz ihtiva eden BT-5'in X-Gal ve IPTG içeren besiyerinde oluşturduğu mavi koloniler.....	63
Şekil 21. BT-5 izolatına ait M9-Nişasta agar kültüründeki hidrolizat zonu	63
Şekil 22. Bakteri izolatlarından saflaştırılan DNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü (M: DNA Markır, N: Negatif Kontrol).....	66
Şekil 23. Bakteri izolatlarına ait 16S rRNA PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü (M: DNA Markır, N: Negatif Kontrol).....	67
Şekil 24. Transformasyon sonrası amfisilinli LB agarda X-Gal ve IPTG etkisi ile mavi-beyaz koloni oluşumu	67
Şekil 25. BT-2 izolatı için seçilen 5 adet beyaz koloniden gerçekleştirilen koloni PCR'ın agaroz jel görüntüsü (M:DNA Markır, 1.K:1.Koloni, 2.K:2.Koloni, 3.K:3.Koloni, 4.K:4.Koloni, 5.K:5.Koloni, N:Negatif Kontrol. 1. 3. ve 4. kuyular pozitif sonuç).....	68
Şekil 26. Kaplıca suyundan izole edilen bakterilerin (BT kodlu) filogenetik ağacı	69
Şekil 27. a) Sterilizasyon sonrası ekim için hazır hale getirilen indüklenmiş sıvı besiyeri b) İnkübasyon sonrası bakteriyel gelişimin gözlemlendiği indüklenmiş kültür ortamı	71
Şekil 28. Maltoz standart çözeltilerinin kaynatma sonrası renk değişimi	72
Şekil 29. Maltoz standart grafiği ve eğri denklemi	72
Şekil 30. 4-10 arası pH'da değişen amilaz aktivite ve 24 saatlik inkübasyon sonucu bakteriyel OD	74
Şekil 31. %0,1-%3 arası nişasta konsantrasyonlarında değişen amilaz aktivite ve 24 saatlik inkübasyon sonrası bakteriyel OD	75
Şekil 32. 25-65°C arası sıcaklıklarda değişen amilaz aktivite ve 24 saatlik inkübasyon sonucu bakteriyel OD	77
Şekil 33. 6.-96. saatler arası inkübasyon süresinde değişen amilaz aktivite ve bakteriyel OD	78
Şekil 34. Optimum şartlar altında indüklenmiş besiyerinde inkübe edilen <i>N. alba</i> BT-5 izolatına ait kültür.....	80
Şekil 35. pH, Nişasta konsantrasyonu ve tutunma zamanı optimizasyonlarına karşı %Tutunma Oranı grafiği.....	82
Şekil 36. Diyaliz deney düzeneği	83
Şekil 37. Bradford yöntemi ile protein tayininde kullanılan standart grafiği.....	84

Şekil 38. SDS-PAGE için ayırma ve yığma jellerinin kasetlere yüklenmesi.....	86
Şekil 39. Gümüş nitrat ile boyanan SDS-PAGE jel görüntüsü (1. Kuyu Kültür sıvısı; 2. Kuyu Protein Standardı; 3. Kuyu Nişasta Afinite Tekniği ile saflaştırılan <i>N. alba</i> BT-5 amilazı).....	87
Şekil 40. Protein standardının R_f -Log M_A grafiği	87
Şekil 41. Değişen pH değerlerine karşı %Bağıl Aktivite değerlerine göre BT-5 amilazının optimum pH grafiği	89
Şekil 42. <i>N. alba</i> BT-5 amilazının değişen sıcaklık değerlerindeki aktivitesine bağlı olarak çizilen optimum sıcaklık grafiği	90
Şekil 43. <i>N. alba</i> BT-5 amilazının zamana bağlı ısı kararlılık grafiği	92
Şekil 44. <i>N. alba</i> BT-5 amilaz aktivitesinin asetat tamponu ile belirlenen pH kararlılığı grafiği	93
Şekil 45. <i>N. alba</i> BT-5 amilaz aktivitesinin fosfat tamponu ile belirlenen pH kararlılığı grafiği	94
Şekil 46. <i>N. alba</i> BT-5 amilaz aktivitesinin Tris-HCl tamponu ile belirlenen pH kararlılığı grafiği.....	96
Şekil 47. Metal iyonları, deterjan, şelatör ve organik çözücülerin <i>N. alba</i> BT-5 amilaz aktivitesi üzerine etkisine bağlı olarak % kalan aktivite grafiği.....	98
Şekil 48. <i>N. alba</i> BT-5 amilazına ait Lineweaver-Burk grafiği	98
Şekil 49. Farklı deterjan çözeltilerine karşı amilazın % Kalan aktivite grafiği	101
Şekil 50. Kumaş parçalarında homojen şekilde oluşturulan çikolata lekeleri.....	101
Şekil 51. <i>N. alba</i> BT-5 amilazının leke giderme performansının incelenmesi için 1 saatlik inkübasyon sonrası örnekler (sırasıyla Kontrol, Enzim, Deterjan ve Enzim+Deterjan uygulamaları)	102
Şekil 52. <i>N. alba</i> BT-5 amilazının leke giderme performansı analizi	103
Şekil 53. Nişasta çözeltisinde bekletilen kumaş parçasından Haşıl Giderme uygulaması için kurulan deney düzeneği	105
Şekil 54. Taze elma suyu ile karıştırılan amilazın etkisiyle meyve suyu berraklığındaki değişim	107

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

Kısaltmalar

APS	: Amonyum Persülfat
ATP	: Adenozintrifosfat
BSA	: Sığır Serum Albümin
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNS	: 3'5-dinitro salisilik asit
dNTP	: Deoksiribonükleotit trifosfat
EC	: Enzim komisyonu
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
EtBr	: Etidyum Bromür
IPTG	: izopropil β -D-1- tiyogalaktopiranosid
IUPAC	: Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
K_M	: Michaelis-Menten sabiti
LB	: Luria Bertani
OD	: Optik Dansite
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pH	: Potansiyel hidrojen
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik asit
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
TAE	: Tris-Asetik asit-EDTA
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametilendiamin
Tris	: Trihidroksimetil amino metan
TSA	: Tryptone Soy Agar
TSB	: Tryptone Soy Broth
V_{Max}	: Maksimum hız

Simgeler

%	: Yüzde
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
dk	: Dakika
EÜ	: Enzim ünitesi
g	: Gram
kDa	: Kilodalton
L	: Litre
M	: Molar
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
°C	: Santigrat derece
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
V	: Volt
v/v	: Hacim/hacim
w/v	: Ağırlık/hacim
α	: Alfa

GİRİŞ

Enzimlerin farklı endüstrilerdeki uygulamaları sürekli olarak artmaktadır. Enzimlerin endüstriyel uygulamaları arasında gıda (fırınlama, süt ürünleri, nişasta dönüşümü) ve içecek işleme (bira, şarap, meyve ve sebze suları), hayvan yemi, tekstil, kağıt, deterjan, biyosensör, kozmetik, sağlık, beslenme, atık su arıtımı, ilaç ve kimyasal üretimi ile biyodizel ve biyoetanol gibi biyoyakıtlar yer almaktadır (Homaei *et al.* 2013).

Nişasta ve glikojen gibi karbohidrat polimerlerinin hidrolizini katalizleyen amilazlar, en çok çalışılan enzimlerden olup endüstride kullanılan enzim pazarının yaklaşık %25'ini oluşturmaktadır (Podar and Reysenbach 2006). Bu kadar geniş kullanıma sahip olmasının nedeni, etki spesifikliğinden ziyade, enzimin fizyolojik ve biyoteknolojik uygulamalarından yararlanma girişimlerinin dünya çapında ilgi görmesinden kaynaklanmaktadır (Wang *et al.* 2011). Son 10 yılda amilaz ile gerçekleştirilen akademik çalışmalar araştırıldığında; kimya, biyokimya, biyoloji, tıp, immünoloji ve mikrobiyoloji, genetik ve moleküler biyoloji alanlarında yapılan çalışma sayısının giderek arttığı görülmektedir.

Karbohidrat polimerleri arasında yer alan nişasta, farklı gıda ürünlerindeki kullanışlılığı nedeniyle geçmişten günümüze giderek artan bir ilgi görmektedir. Nişasta, birçok gıdanın dokusal özelliklerine büyük ölçüde katkıda bulunması, gıda ve endüstriyel uygulamalarda koyulaştırıcı, kolloidal stabilizatör, jelleştirici veya hacim arttırıcı ajan ve su tutma ajanı olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Singh *et al.* 2007).

Nişasta molekülü, glukoz monomerlerinin α -1,4 ve α -1,6 glikozidik bağları ile bir araya gelmesi sonucu oluşan bir polimerdir. Molekülün yapısında, amiloz ve amilopektin olmak üzere yüksek molekül ağırlıklı, yapı ve özellik bakımından birbirinden farklı iki tip glikoz polimeri bulunmaktadır. Amiloz polimeri, glukoz monomerlerinin α -1,4 glikozidik bağlarının bir araya gelmesi ile oluşan doğrusal bir yapı iken, amilopektin ise α -1,4 glikozidik bağları ile bir araya gelen kısa doğrusal glukoz polimerine α -1,6 glikozidik bağı ile bağlanan kısa dallanma zincirlerine sahip polimerik yapıdır (Sørensen *et al.* 2004; Muralikrishna and Nirmala 2005).

Amilaz, substratının hidrolizinde hedef aldığı glikozidik bağa göre α -amilaz, β -amilaz ve glukoamilaz şeklinde ayrılmaktadır. α -amilaz, tüm canlı organizmalarda yaygın olarak bulunmakla birlikte amiloz ve amilopektin polimerlerinin iç kısmındaki glukoz ünitelerini bir arada tutan α -1,4 glikozidik bağına parçalamaktadır (Cherry *et al.* 2004). Nişasta, en önemli ticari enzim proseslerinden biri olan α -amilaz tarafından daha küçük oligosakkaritlere hidrolize edilir ve bu enzimler, nişastanın hidrolizi için gıda, deterjan, tekstil ve kağıt endüstrisi gibi tüm

endüstriyel işlemlerde uygulama bulmaktadır (Gupta *et al.* 2003). Nişastanın hidrolizinden sonra elde edilen sakkarit bileşimi, büyük ölçüde sıcaklığın etkisine, hidroliz koşullarına ve enzimin kökenine bağlıdır. Enzimlerin özgüllüğü, enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın ve pH'nın etkisi, bu moleküllerin endüstriyel kullanımı için kritik rol oynamaktadır (Kandra 2003).

Endüstride düşük maliyetli üretim stratejileri ve yüksek aktiviteye sahip stabil enzimler tercih edilmektedir (Nevalainen and Peterson 2014). Ayrıca termostabilite, endüstriyel enzimlerin çoğunun en çok arzu edilen özelliğidir (Sundarram and Murthy 2014). Nişastanın sınıflandırılmasında ve inceltilmesinde kullanılan α -amilaz için termostabilite özelliği tercih edilmektedir (Chiba 1988). Örneğin, nişasta endüstrisi yüksek derecede ısıya dayanıklı amilaza ihtiyaç duyarken, deterjan endüstrileri, nispeten daha yüksek sıcaklıklarda alkali koşullar altında yüzey aktif maddelerin varlığında stabiliteye ihtiyaç duymaktadır. Bununla birlikte, bir amilaz için beklenen ideal özellikler tekstil, deri, ilaç ve gıda endüstrilerinde değişiklik göstermektedir (Kikani and Singh 2021). Ayrıca, termostabil α -amilazlar mikrobiyal kontaminasyon riskini en aza indirerek ve reaksiyon süresini kısaltarak önemli ölçüde enerji tasarrufu sağlamanın yanı sıra organik bileşiklerin çözünürlüğünü de arttırmakta ve bu da substratın difüzyon katsayısını artırmak için viskoziteyi azaltmaktadır (Pandey *et al.* 2000; Kikani and Singh 2021).

Termostabil enzimler, mezofilik organizmalardan saflaştırılan enzimlere kıyasla daha yüksek sıcaklıklarda daha iyi yapısal ve biyokimyasal stabilite sergilemektedirler. Enzimin termo-stabilitesi, artan iyonik etkileşimlere, hidrojen bağlarına ve disülfid köprülerine dayandırılmaktadır. Ek olarak, gelişmiş hidrofobik etkileşimler, metal bağlama ve bazen translasyon sonrası modifikasyonlar da yüksek sıcaklıklarda bir enzimin stabilitesini artırabilir (Fitter 2005; Prakash and Jaiswal 2010). Mezofilik enzimlere kıyasla termostabil enzimlerin yapısal stabilitelerinin temeli, belirli lokalize etkilerden ziyade molekülün geneline dağılmıştır. Zincir uzunluğu ve amino asit bileşimi, termodinamik özelliklerde değişikliklere neden olarak, gelişmiş termostabiliteye yol açmaktadır (Sawle and Ghosh 2011).

Genellikle 55°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda yaşayan termofilik mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin tamamı olmasa da büyük bir çoğunluğu termostabildir. Ekstraselüler enzimler, uyumlu çözünenler gibi hücreye özgü faktörler tarafından stabilize edilemedikleri için genellikle yüksek termostabilite gösterirler (Santos and Costa 2002). Bunun dışında, düşük sıcaklıklarda gelişen mikroorganizmalardan da (ör, *Bacillus licheniformis*) termostabil enzimler tanımlanmıştır (Kristjansson 1989). Biyoişlem proseslerinde, termostabil enzimlerin seçilmesinin temel nedenleri; hammaddelerin ön işlemleri sırasında uygulanan yüksek sıcaklıklarda bile enzimlerde çok düşük aktivite kayıplarının görülmesi, uzun süreli depolama

(oda sıcaklığında), organik çözücülere karşı artan tolerans ve düşük kontaminasyon riskleridir (Turner *et al.* 2007).

Bakteri, mantar ve mayalardan elde edilen mikrobiyal amilazlar, ağırlıklı olarak endüstriyel sektörlerde ve bilimsel araştırmalarda kullanılmaktadır. Amilaz üretim düzeyi mikroorganizmalar içerisinde, aynı cins, tür ve suş arasında bile değişiklik göstermektedir. pH, sıcaklık, karbon ve nitrojen kaynakları gibi faktörler özellikle fermentasyon proseslerinde amilaz üretim hızını ve verimini etkilemektedir. Amilaz üretebilen çok çeşitli mikrobiyal türler arasında, bakterilerden üretimi diğer mikroorganizmalardan daha ucuz ve daha hızlıdır (Sundarram and Murthy 2014).

Proteazlardan sonra amilazlar deterjanlarda en yaygın kullanılan ikinci enzimdir. Bununla birlikte, bu uygulama için amilazların alkali toleranslı, ısıya dayanıklı olması ve yüzey aktif maddeler ve şelatörlerin varlığında da işlev görebilmesi gerekmektedir. Proteazlar ve lipazlarla birlikte amilazlar, yıkama etkinliklerini arttırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır (Kikani and Singh 2021).

Amilazlar ayrıca tekstil endüstrisinde haşıl giderme maddesi olarak kullanılmaktadır. Genellikle nişasta, dokuma işlemi sırasında ipliğe fiziksel mukavemet sağlamak için tekstil endüstrisinde haşıl maddesi olarak kullanılır. İşlemden sonra nişasta kalıntılarının uzaklaştırılması olarak isimlendirilen haşıl giderme prosesi için amilazlar kullanılmaktadır (Feitkenhauer 2003; Rebello *et al.* 2019). Amilazlar aynı zamanda, yazma kalitesini artırmak amacıyla yüzeyi pürüzsüz ve güçlü hale getirmek için nişastanın kağıt üzerine kaplandığı kağıt endüstrisinde de kullanılır. Doğal nişasta çok viskoz olduğu için kaplama işleminden önce amilazlar ile muamele edilir (Gupta *et al.* 2003).

Yukarıda verilen bilgiler ışığında; tezin amacı, kaplıcadan amilaz pozitif bakterilerin izole edilmesi, bu bakteriden amilazın saflaştırılarak karakterize edilmesi ve enzimin bazı endüstriyel alanlardaki kullanım potansiyelinin araştırılmasıdır. Amilaz; deterjan, tekstil, gıda ve biyoetanol üretimi gibi endüstriyel alanlarda fazlaca kullanıldığı için ticari önemi olan bir enzimdir. Bu tezde, yüksek sıcaklık gibi fiziksel parametrelerin enzim aktivitesini düşürmesinden dolayı amilaz üretimine sahip termofilik bakterilerin saflaştırılması ile termostabil amilazın üretimi amaçlanarak deterjan, içecek ve tekstil endüstrisindeki kullanılabilirliği incelenmiştir. Kaplıcadan temin edilen sıcak su örneğinden bakteri saflaştırması ile literatüre yeni bir mikrobiyal amilaz kaynağı kazandırılmıştır. İzole edildiği canlılara bağlı olarak enzimlerin etki modeli ve fiziksel parametrelerin etkisi ile aktivitesi değişmektedir. Bu nedenle, amilaz pozitif bakteriden enzim saflaştırması ve karakterizasyonu

yapılarak çeşitli fiziksel parametrelerdeki aktivite kararlılığı incelenmiş ve endüstriyel uygulamalar için uygunluğu değerlendirilmiştir.

Amilaz ile son 10 yılda birçok alanda giderek artan sayıda çalışmalar yapılmaktadır. Yüksek sıcaklık uygulamalarının gerekli olduğu endüstriyel proseslerde özellikle termostabil enzimlerin önemi daha fazladır. Bu nedenle, enzim pazarının önemli bir yüzdesini oluşturan amilaz için literatüre termostabil enzim potansiyeli taşıyan yeni bir mikrobiyal kaynak kazandırmak amacıyla daha önce çalışılmamış olan Bitlis/Gülsuhan kaplıca suyu seçilmiştir. Bu amaç doğrultusunda izole edilen bakteriler içerisinde en yüksek amilaz aktivite gösteren izolattan optimum şartlar altında ekstraselüler amilaz eldesi gerçekleştirilerek Nişasta Afinité Tekniği ile enzim saflaştırılmış, ardından enzimin karakterizasyonu ve endüstriyel kullanım potansiyeli incelenmiştir.

Enzimler

Enzimler, canlı sistemlerde kimyasalların dönüşümünü destekleyen biyolojik katalizörlerdir. Binlerce atomdan oluşan bu moleküller, biyolojik hücrelerde meydana gelen çok sayıda farklı kimyasal reaksiyonu katalizlemektedir (Berg *et al.* 2007). Ayrıca, hücrelerden izole edilerek ticari açıdan önemli reaksiyonları katalizlemek için de kullanılabilirler (Robinson 2015). Enzimler, çok yüksek derecede substrat spesifikliğı ile reaksiyonları katalizler ve böylece yan ürünlerin oluşumunu azaltır. Bazı enzimler, bir kimyasal reaksiyonun hızını, katalize edilmemiş kendiliğinden gerçekleşen reaksiyon hızını 10^{12} katına kadar hızlandırabilir. Katalizlenen reaksiyonlarda, biyolojik makromoleküller arasında sıradan organik kimya yöntemleriyle erişilemeyen bir dizi çok karmaşık kimyasal dönüşüm vardır. Bu durum, enzimleri biyoteknolojik kullanım için ilgi çekici kılmaktadır. Yirminci yüzyılın başlarında, enzimlerin fermentasyon süreçlerinden sorumlu olduğu gösterilmiş, yapıları ve kimyasal bileşimleri çalışılmaya başlanmıştır (Creighton 1984; Copeland 2000a).

Enzimlerin Sınıflandırılması ve Fonksiyonları

Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliğı (IUPAC), enzimler için sistematik bir sayısal isimlendirme geliştirmek üzere Enzim Komisyonu'nu (EC) kurmuştur. Bu sistem içinde, tüm enzimler dört parçalı bir Enzim Komisyonu (EC) numarası ile tanımlanmaktadır. EC numarasının ilk kısmı, enzimin katalize ettiği reaksiyonu ifade eder (Tablo 1). Kalan rakamlar, ilk rakamın tanımladığı reaksiyonun doğasına göre farklı anlamlar taşır (Copeland 2000b).

Biyolojik olarak aktif enzimler bitkilerden, hayvanlardan ve mikroorganizmalardan elde edilebilir. Mikrobiyal enzimler, genellikle yüksek miktarlarda elde edilebilmesi, kolay

saflaştırılabilirmeleri, kısa sürede düşük maliyetli üretimleri ve çeşitli ekstrem koşullardaki stabiliteyi nedeniyle fazlaca tercih edilmektedir. Ortama salgılanan mikrobiyal enzimler, endüstriyel işlemler ve uygulamalar için oldukça güvenilirdir. Ayrıca, konak hücre olarak seçilen mikroorganizmalardan rekombinant DNA teknolojisi aracılığıyla istenilen enzimin üretimi de gerçekleştirilebilir. Birçok mikrobiyal kaynaktan farklı enzimler elde edilebilir ve biyoremediasyon, endüstriyel proseslerde biyokatalizör gibi farklı uygulama alanlarında kullanılabilir. Endüstriyel uygulamalarda, enzim saflaştırma çalışmaları ağırlıklı olarak proteaz, lipaz ve amilaz üzerine gerçekleştirilmiştir (Anbu 2013; Gopinath *et al.* 2013, 2015; Anbu and Hur 2014).

Tablo 1. Fonksiyonlarına Göre Enzimlerin Sınıflandırılması (Tamura *et al.* 2013)

Enzim Komisyon Numarası	Enzim Sınıfı	Fonksiyonu	Örnek
EC1	Oksidoredüktazlar	Bu tür enzimler, moleküller arasında elektron transferini katalize eder. Hidrojen moleküllerinin geçişi biyolojik sistemlerde gerçekleşir. Bunu yapan enzimler genellikle dehidrojenazlar olarak adlandırılır.	Alkol Dehidrojenaz
EC2	Transferazlar	Bu tür enzimler, farklı moleküller arasında çeşitli atom formlarını hareket ettirir.	Aminotransferaz
EC3	Hidrolazlar	Bu enzim sınıfı, su yardımıyla molekülleri parçalar.	Amilaz
EC4	Liyazlar	Liyazlar, grupları çift bağ oluşturmak için uzaklaştırır veya substratlardaki grupları çift bağlara ekler.	Pektat liyaz
EC5	İzomerazlar	Bu enzimler, grupları bir konumdan diğerine hareket ettirerek aynı molekülün yapısal olarak değişmesine izin verir.	Mutaz
EC6	Ligazlar	Bu tür enzimler, molekülleri kovalent bağlarla birbirine bağlar. Bu tür reaksiyonlar, ATP ko-faktörleri şeklinde enerji girişi gerektirir.	DNA ligaz
EC7	Translokazlar	Translokazlar, iyon ve moleküllerin membranlar arası hareketini sağlar. Bu reaksiyon sırasında ATP hidrolizini gerçekleştirir. (Bu enzimler, 2018 yılından itibaren EC7 koduyla yeni bir sınıf altında toplanmıştır (Tipton, 2018))	ATP fosfohidrolaz

Termostabil Enzimler

Ekstremofiller, çeşitli ekstrem ortamlarda var olmak üzere evrimleşmiş organizmalardır ve termofiller, hipertermofiller, halofiller, psikrofiller veya piezofiller olarak sınıflandırılırlar. Bu organizmalar, mezofiller için uygun olmayan ekstrem koşullar (ekstremozimler) altında işlev görebilen değerli enzimler üretme potansiyeline sahiptirler. Ekstremofillerden çok sayıda yeni enzim izole edilmiştir ve bu yeni enzimler, endüstriyel süreçleri daha verimli hale getirmek için kullanılan umut verici katalizörlerdir. Ekstremozimler; yüksek sıcaklıklarda aktivite gösteren termozimler (Elleuche *et al.* 2015), yüksek tuz seviyelerine toleransı olan halozimler (Anithajothi *et al.* 2014), alkali koşullar altında aktif olan alkalozimler (Fujinami and Fujisawa 2010), basınç, asitlik ve benzeri koşullar altında işlev gören enzimler gibi çeşitli gruplara ayrılmaktadır.

Artan küresel nüfus, biyoyakıtlar ve kimyasal/farmasötik uygulamalar; termostabilite, pH toleransı ve organik çözücülere direnç gibi arzu edilen özelliklere sahip yeni endüstriyel enzimlere olan talebi artırarak daha fazla uygulama alanı ortaya çıkartmıştır (İbrahim and Ma 2017). Termozimler, mezofilik canlılardan elde edilen enzimlere göre benzer katalitik aktiviteye sahiptir (Vieille and Zeikus 2001). Bu nedenle, mezofilik bir konakta termozimlerin klonlanması, termal özelliklerini değiştirmez, bu da bu özelliklerin genetik olarak kontrol edildiğini gösterir (Elleuche *et al.* 2015). Farklı termofillerden elde edilen enzimler, yüksek termostabilite ve 70°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda optimal aktivite gibi özel yapısal ve fonksiyonel niteliklerle gelişmiştir (Stirnemann and Sterpone 2017). Termozimlerle daha yüksek sıcaklıklarda işlem yapmanın en önemli avantajlarından biri mikrobiyal kontaminasyon riskini azaltmasıdır. Termozimler ayrıca reaksiyon prosesleri sırasında substratların viskozitesini, geliştirilmiş transfer hızlarını ve çözünürlüğünü düşürmeye yardımcı olur (Bruins *et al.* 2001). Termostabil enzimler, geleneksel mezofillere kıyasla sahip olduğu avantajlarla birlikte birçok endüstride birden fazla alanda kullanılmaktadır (Şekil 1).



Şekil 1. Termozimlerin avantajları (Sharma *et al.* 2019)

Termostabil enzimler, genellikle yüksek sıcaklıklarda uygulanan endüstriyel prosesler için oldukça kullanışlıdır. Termozimlerin geliştirilmesindeki yenilikler biyoteknolojinin önemli bir yönüdür. Termofilik adaptasyon, yalnızca yüksek sıcaklıklara karşı kararlılık sağlamakla kalmaz, aynı zamanda endüstriyel işlemlerde sıklıkla kullanılan denatüre edici ajanlara direnç ve ortamın düşük veya yüksek pH'ı gibi zorlu fizikokimyasal koşullara karşı da direnç sağlar (Gavrilov *et al.* 2016). Ayrıca termostabil enzimler, toksik kimyasallar gerektirecek endüstriyel proseslerin zorlu koşullarına dayanabilen sağlam katalizör alternatifleri sunmaktadır (Turner *et al.* 2007). Termozimlerin endüstriyel uygulaması, çeşitli endüstriyel işlemlerde kullanılan geleneksel katalizörlerden daha avantajlıdır (Goldsmith and Tawfik 2012).

Termofilik ve hipertermofilik mikroorganizmalar, yeni termozimler üretimi için mikrobiyal kaynak görevi görmektedir. Bu termofilik mikroorganizmalar içerisinde, *Bacillus*, *Clostridium*, *Pyrococcus*, *Thermus*, *Thermotoga* ve *Aquifex* dahil olmak üzere çok çeşitli mikrobiyal cinsler bulunmaktadır (Haki and Rakshit 2003; Atomi 2005). Termofilik cinsler kaplıcalarda (Acer *et al.* 2016; Luo *et al.* 2017) ve diğer insan yapımı termal ortamlarda (Cava *et al.* 2009; Ma *et al.* 2017) rapor edilmişlerdir. Bu canlılarda var olan yapısal adaptasyonlar, termofillerin ve bileşenlerinin zorlu çevre koşullarında gelişmesini ve işlev görebilmesini sağlamaktadır. Bu adaptasyonlar, dayanıklı hücre duvarı ve hücre zarı, protein yapısını değiştiren yüksek G+C içeriğine sahip DNA molekülünün varlığı gibi değişiklikleri içermektedir (Hickey and Singer 2004; Pollo *et al.* 2015). Termostabil proteinlerde, primer yapıları meydana getirecek olan amino asit bileşimlerinin mezofiliklere kıyasla farklılıklar içerdiği belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar, termofilik proteinlerde; polar olmayan amino asitlerin, yüklü amino asitlerin, aromatik amino asitlerin sayısının arttığını ve yüksüz polar

aminoasitlerin ve metiyonin sayısının azaldığını ortaya koymaktadır (Das and Gerstein 2000). Polar olmayan amino asitler, termostabilite için önemli bir kriter olan hidrofobikliği artırarak bir proteinin sertliğini artırır. Bununla birlikte, artan yüklü amino asitler, proteinin dış kısmındaki elektrostatik etkileşimleri artırarak daha büyük iyon çifti etkileşimlerine yol açar (Sadeghi *et al.* 2006). Enzimlerin termostabilitesi, hidrojen bağları (molekül içi ve moleküller arası hidrojen bağları), elektrostatik etkileşimler, disülfid bağları, hidrofobik etkileşimler, metal bağlama ve artan paketlenme ile üstün konformasyonel yapı gibi çeşitli faktörlerin sonucudur (Li *et al.* 2005; Pollo *et al.* 2015). Biyokatalizörlerin termal adaptasyonları, onları solvent toleransı, substrat seçiciliği, daha yüksek reaksiyon hızları ve benzeri gibi ek özelliklerle donatarak, onları daha az verimli mezozimler için alternatif haline getirmektedir (Elleuche *et al.* 2015).

Endüstrilerdeki geleneksel üretim süreçleri, çok fazla hammadde ve enerji gerektirmektedir. Ayrıca istenen ürünün oluşumu için kimyasalların kullanımına gereksinim duymakta ve bu süreçler de çevre üzerinde çok fazla baskı oluşturmaktadır. Geleneksel kirletici yöntemlerin, daha temiz ve daha güvenli enzim bazlı yöntemlerle değiştirilmesi, yalnızca işlem süresinden, işletme maliyetinden ve enerji tüketiminden tasarruf sağlamakla kalmaz, aynı zamanda çevre üzerinde en az zararlı etkiye sahiptir (Jegannathan and Nielsen 2013).

Büyük önemine rağmen, enzimlerin endüstrideki kullanımı, kararlılık ve katalitik verim eksikliği gibi nedenlerden dolayı kısıtlanmaktadır (Yano and Poulos 2003; Bajaj and Wani 2011; Choi *et al.* 2015). Endüstriyel üretim süreçleri genellikle yüksek sıcaklık, aşırı pH gibi zorlu koşulları içermektedir. Bu nedenle, yüksek sıcaklık proseslerine uygun sağlam enzimler gereklidir (Turner *et al.* 2007; Chang *et al.* 2016; Denisenko *et al.* 2017). Termostabil enzimler, çeşitli endüstriyel işlemler için çok önemlidir. Örneğin termofilik kaynaklardan elde edilen amilazlar, tekstil, biracılık ve deterjan endüstrisi gibi çeşitli endüstriyel proseslerde, proteaz ve lipaz ile birlikte leke gidermede, biyoyakıt üretiminde ise fermantasyon endüstrilerinde nişastanın fermente edilebilir şekerlere dönüştürülmesinde, gıda endüstrisinde tatlı şurupların hazırlanmasında, unun diastaz içeriğinin artırılmasında oldukça fazla kullanılmaktadır (Hameed *et al.* 2017; Saini *et al.* 2017).

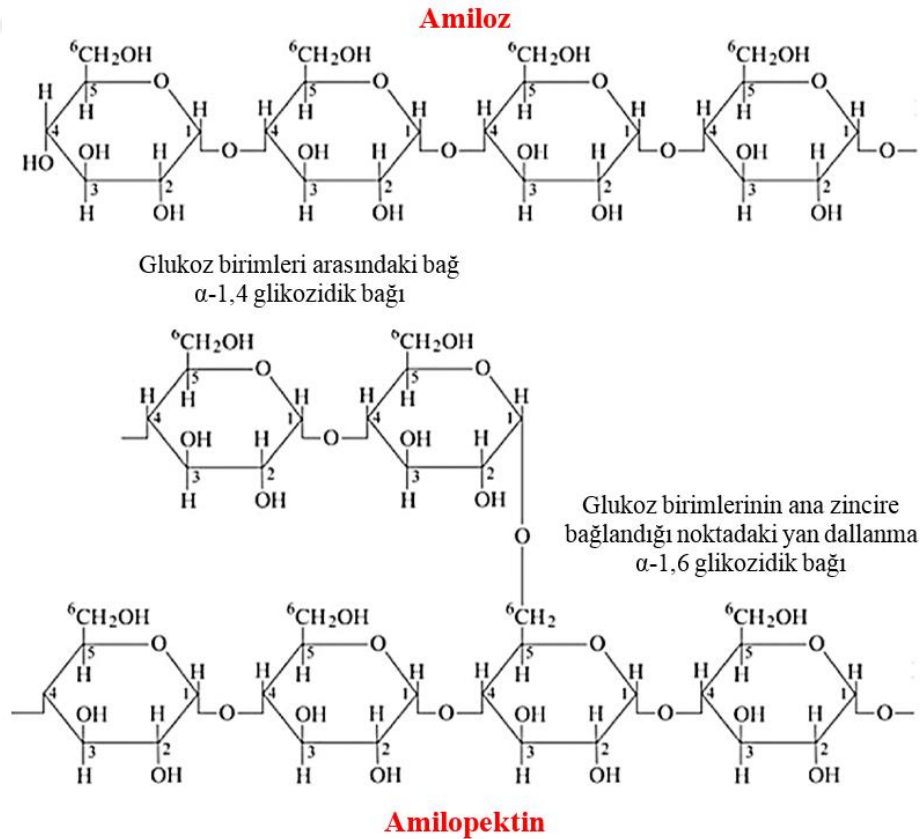
Nişasta

Nişasta, insan diyetinin önemli bir bileşenidir ve bu amaçla gıda endüstrisinde kullanılan nişasta hidrolizatları, glikoz şurupları, fruktoz, maltodekstrin türevleri gibi çeşitli ürünlerde kimyasal ve enzimatik olarak işlenirler. Ayrıca, nişasta hidrolizi ile elde edilen şekerler fermantasyon teknolojisi ile biyoetanol üretiminde ham madde olarak kullanılabilir. Nişasta üretebilen çok sayıda bitki olmasına rağmen, endüstriyel nişasta

işleme için sadece birkaç önemli bitki bulunmaktadır. Nişastanın başlıca endüstriyel kaynakları; mısır, buğday ve patatestir, ancak termal direnç, termal ayrışma gibi sınırlamalar, bazı endüstriyel gıda uygulamalarında kullanımını sınırlamaktadır (Van Der Maarel *et al.* 2002; Agrawal *et al.* 2005; Goyal *et al.* 2005).

Karbonhidrat polimerleri arasında yer alan nişasta, farklı gıda ürünlerindeki kullanışlılığı nedeniyle geçmişten günümüze giderek artan bir ilgi görmektedir. Nişasta, birçok gıdanın dokusal özelliklerine büyük ölçüde katkıda bulunması, gıda ve endüstriyel uygulamalarda koyulaştırıcı, kolloidal stabilizatör, jelleştirici veya hacim arttırıcı ajan ve su tutma ajanı olarak etkinlikleri nedeniyle yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Singh *et al.* 2007).

Nişasta molekülü, glukoz monomerlerinin glikozidik bağı ile bir araya gelmesi sonucu oluşan bir polimerdir. Molekülün yapısında, amiloz ve amilopektin olmak üzere iki tip glikoz polimeri bulunmaktadır. Bu iki glukoz polimeri yapı ve özellik olarak birbirinden farklılıklar gösterir. Amiloz polimeri, α -1,4 glikozidik bağları ile bir araya gelen yaklaşık 6000 glukoz ünitesinden oluşan doğrusal bir yapıya sahip iken, amilopektin polimeri ise kısa α -1,4 glikozidik bağları ile bir araya gelen 10-60 glukoz ünitesinden oluşan doğrusal zincirlere, 15-45 glukoz ünitesinden oluşan yan zincirleri α -1,6 glikozidik bağı ile ana zincire bağlanmaktadır (Şekil 3) (Sørensen *et al.* 2004; Muralikrishna and Nirmala 2005).



Şekil 2. Nişasta polimerini meydana getiren amiloz ve amilopektin glukoz polimerlerinin yapısı ve glikozid bağlarının gösterimi (Buléon *et al.* 1998)

Nişastayı Hidroliz Eden Enzimler

Nişastayı hidroliz eden enzimlerin keşfi 1811'de Kirchof'un çalışmaları ile başlamıştır. Bu keşfin ardından sindirim amilazları ve malt amilazları hakkında araştırmalar giderek arttı. 1833 yılında Anselme Payen tarafından nişastayı şekere dnüştüren molekülün alkol ile öktürölmesiyle amilaz enzimi ilk kez izole edildi. İlerleyen yıllarda ise Ohlsson, malt nişastasını parçalayan enzimlerin oluşturdukları son ürünlerin anomerik konfigürasyonlarına göre amilazların α - ve β -amilaz şeklinde sınıflandırılmasını önerdi (Gupta *et al.* 2003). Ticari olarak amilaz kullanımı ilk kez 1939 yılında Japonya'da *Bacillus subtilis* suşları kullanılarak elde edildi (Syu and Chen 1997).

Amilazlar nişasta molekülünü parçalamak için hedef aldıkları bağlar ve oluşturdukları son ürünlere göre başlıca dört gruba ayrılırlar.

- 1. Endoamilazlar:** Nişasta molekülünü meydana getiren amiloz ve amilopektin alt birimlerinin iç kısmında bulunan α -1,4 glikozidik bağı kıran enzimlerdir. Bu reaksiyon sonucu oluşan son ürünler α -anomerik konfigürasyondadır (Pandey *et al.* 2000). Örneğin, α -amilazlar.
- 2. Ekzoamilazlar:** Nişasta molekülünü meydana getiren amiloz ve amilopektin alt birimlerinin dış kısmında bulunan α -1,4 glikozidik ve α -1,6 glikozidik bağlarını kıran enzimlerdir. Bu reaksiyon sonucunda oluşan son ürünler α - veya β -anomerik konfigürasyondadır. Örneğin, glukoamilazlar, β -amilazlar
- 3. Transferazlar:** Karşılıklı glikoz polimerlerinden birinin α -1,4 glikozidik bağını hidroliz ederek molekülün bir kısmını alıcı moleküle yeni bir glikozidik bağ oluşturarak ekleyen enzimlerdir. Örneğin, Amilomaltazlar.
- 4. Dallanmış yapıları hidroliz edenler:** Amilopektin ve benzer polimerlerde bulunan α -1,6 glikozidik bağları hidrolizleyen enzimlerdir. Reaksiyon sonucu oluşan son ürünler uzun zincirli lineer yapıdadır. Örneğin, pullulanazlar. (Bertoldo and Antranikian 2002; Haki and Rakshit 2003).

Tablo 2'de, nişasta hidroliz eden bir grup enzimin EC numaraları, hedef glikozidik bağları ve reaksiyon sonucu oluşan son ürünleri yer almaktadır.

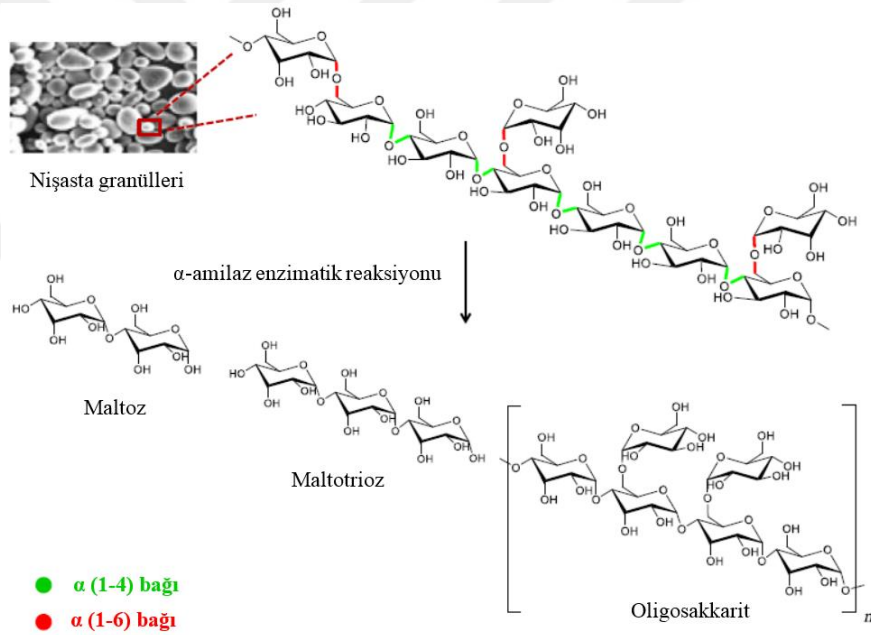
α -Amilaz (EC 3.2.1.1)

α -Amilazlar, polisakkaritlerin α -1,4 glikozidik bağlarını hidrolize edebilen, kısa zincirli dekstrinlerin üretimi ile sonuçlanan nişastayı parçalayan enzimlerdir (şekil 2). Bu enzimler tüm canlı organizmalarda yaygın olarak dağılmıştır. α -amilazların çoğu metalloenzimlerdir ve aktiviteleri, stabiliteleri ve bütünlükleri için kalsiyum iyonlarına ihtiyaç duyarlar (Janecek and

Balaz 1992; Svensson 1994; Janecek *et al.* 2014; Mehta and Satyanarayana 2016). Literatür çalışmalarına göre amilazın molekül ağırlığı 10 kDa ile 210 kDa arasında değişmektedir. En düşük molekül ağırlığına (10 kDa) sahip amilaz, *Bacillus caldolyticus* (Grootegoed *et al.* 1973)'dan, en yüksek molekül ağırlığı (210 kDa) ise *Chloroflexus aurantiacus* (Ratanakhanokchai *et al.* 1992) bakterisinden elde edilmiştir (Gupta *et al.* 2003).

Tablo 2. Amilolitik Enzimlerden Bazıları

Enzim	EC No	Etki Ettiği Glikozidik Bağ	Oluşan Son Ürün
α -Amilaz	E.C.3.2.1.1	α -1,4	Doğrusal ve dallanmış oligosakkaritler
β -Amilaz	E.C.3.2.1.2	α -1,4	Maltoz ve Limit Dekstrin
Glukoamilaz	E.C.3.2.1.3	α -1,4 ve α -1,6	Glukoz
İzoamilaz	E.C.3.2.1.68	α -1,6	Doğrusal α -(1 $\rightarrow$ 4) glukoz
Pullulanaz	E.C.3.2.1.41	α -1,6	Doğrusal α -(1 $\rightarrow$ 4) glukoz



Şekil 3. α -Amilaz ile nişastanın hidrolizi (Visvanathan *et al.* 2020)

α -amilaz, amiloz ve amilopektin polimerlerinin iç kısmındaki glukoz ünitelerini bir arada tutan α -1,4 glikozidik bağı parçalamaktadır. Nişasta, en önemli ticari enzim proseslerinden biri olan α -amilaz tarafından daha küçük oligosakkaritlere hidrolize edilir ve bu enzimler, nişastanın hidrolizi için gıda, deterjan, tekstil ve kağıt endüstrisi gibi tüm endüstriyel işlemlerde uygulama bulmaktadır (Gupta *et al.* 2003). Nişastanın hidrolizinden sonra elde edilen sakkarit bileşimi, büyük ölçüde sıcaklığın etkisine, hidroliz koşullarına ve enzimin kökenine bağlıdır. Enzimlerin özgülüğü, enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın ve pH'nın etkisi, bu moleküllerin endüstriyel kullanımı için kritik rol oynamaktadır (Kandra 2003).

β -Amilaz (EC 3.2.1.2)

β -Amilazlar, nişasta molekülünün dış kısmındaki α -1,4 glikozidik bağlarını hidroliz ettikleri için ekzoenzimler sınıfında yer alır. Nişastanın indirgen olmayan uç kısımlarını veya ayrılmış zincirlerini hidroliz ederler. Nişasta hidrolizi sonrası oluşan son ürünlerin β -anomerik konfigürasyonda olması nedeniyle β -Amilaz olarak isimlendirilirler. Bu enzimlerin katalizlediği reaksiyon sonucu maltoz ve limit dekstrin molekülleri oluşur (Telefoncu 1993; Robty 2009).

Glukoamilaz (EC 3.2.1.3)

Glukoamilazlar, nişasta molekülünde indirgen olmayan uçlardaki glukoz birimlerini uzaklaştırdıkları için ekzoenzim sınıfında yer alır. Diğer amilaz ailesinden farklı olarak hem α -1,4 hem de α -1,6 glikozidik bağlarını hedef alır fakat α -1,4 glikozidik bağlarının hidrolizi diğer bağa kıyasla çok daha yüksek hızda gerçekleşir (Al-Bedak *et al.* 2022). Glukoamilazların reaksiyonu sonucu nişasta molekülü glukoz monomerlerine kadar parçalanır. Bu enzimler, endüstriyel uygulamalarda nişastanın glukoz şurubuna dönüştürülmesinde oldukça fazla kullanılır (Robty 2009).

Amilaz'ın Endüstriyel Uygulamaları

Deterjan endüstrisi

Deterjan endüstrileri hem hacim hem de değer açısından enzimlerin birincil tüketicileridir. Deterjan formülasyonlarında enzimlerin kullanılması, deterjanların lekeleri çıkarma ve deterjanı çevre açısından güvenli hale getirme yeteneğini geliştirir. Amilazlar, enzimatik deterjan formülasyonunda kullanılan ikinci tip enzimlerdir ve tüm sıvı deterjanların %90'ı bu enzimleri içerir (Gupta *et al.* 2003; Mitidieri *et al.* 2006; Hmidet *et al.* 2009). Bu enzimler, patates, et suyu vb. nişastalı gıdaların kalıntılarını dekstrinlere ve diğer daha küçük oligosakkaritlere ayıştırmak için çamaşır ve bulaşık deterjanlarında kullanılır (Olsen and Falholt 1998; Mukherjee *et al.* 2009). Amilazlar, daha düşük sıcaklıklarda ve alkali pH'da aktivite gösterirler, deterjan koşullarında gerekli stabiliteyi korurlar ve amilazların oksidatif stabilitesi, yıkama ortamının çok oksitleyici olduğu deterjanlarda kullanımları için en önemli kriterlerden biridir (Kirk *et al.* 2002; Chi *et al.* 2009). Deterjan endüstrisinde kullanılan amilazların mikrobiyal kaynakları olarak *Bacillus* veya *Aspergillus* cinsleri örnek verilebilir (Mitidieri *et al.* 2006).

İçecek endüstrisi

Son yıllarda tüketiciler, katkı maddelerinden uzak taze sıkılmış doğal meyve sularını tüketmeyi tercih etmektedir. Taze sıkılmış meyve sularında, bulanıklığa ve yoğunluğa neden olan nişasta, pektin, selüloz gibi polisakkaritler yüksek miktarlarda bulunmaktadır. Özellikle çiğ elma ve ananas gibi meyvelerden yapılan meyve sularında karbonhidrat içeriği oldukça fazladır (Vaillant *et al.* 2001). Meyve suyu üretim proseslerinde; berraklaştırma, nihai ürünlerdeki bulanık, yoğunluk ve tortuyu gidermek meyve suyunun işlenmesinde temel adımdır. Bu işlemler genellikle enzimatik uygulama, membran filtrasyonu ya da berraklaştırmaya yardımcı maddelerin eklenmesi ile gerçekleştirilmektedir (Gainvors *et al.* 1994). Enzimatik uygulama, bu proses içerisinde ekstraksiyon verimindeki artış, indirgen şeker ve çözünür kuru madde içeriğindeki artış nedeniyle en avantajlı işlemdir. Bu amaçla, meyve suyu endüstrisinde berraklaştırma için amilaz, pektinaz, selülaz gibi enzimler kullanılmaktadır (Joshi *et al.* 1991).

Meyve sularında bulanıklığa neden olan nişasta, filtrasyonu azaltır; membran kirlenmesini, bulanıklığı ve jelleşmeyi artırır (Carrín *et al.* 2004). Enzim pazarının yaklaşık %25-33'ünü oluşturan amilazlar, nişastanın glikozidik bağlarını hidrolize ederek indirgen şeker miktarını artırır, böylece meyve sularındaki bulanıklık ve yoğunluk azaltılır (Sharma *et al.* 2017). Dey and Banerjee (2014) tarafından yapılan çalışmada, berraklaştırılmamış elma suyundaki nişasta konsantrasyonunun 1,143 g/L olduğu belirlenmiştir. Ardından, elma suyuna amilaz (%0,4) ilave edildiğinde enzim aktivitesi ile nişastanın parçalanarak konsantrasyonunun 0,33 g/L değerine düştüğü ortaya koyulmuştur (Dey and Banerjee 2014).

Tekstil endüstrisi

Tekstil endüstrisinde 'haşıllama' adı verilen bir yöntem ile kumaşın dokunacağı ipliklerin sağlam, düzgün ve kopmaya karşı dayanıklı olabilmeleri için iplikler nişasta çözeltisiyle muamele edilmektedir. Nişasta ile muamele edilen ipliklerin dokunmasından sonra kumaş üzerinde kalan fazla nişastanın giderilmesi için 'Haşıl giderme/alma' denilen bir işlem gerçekleştirilir (Tarakçıoğlu 1979). Amilazlar tekstil endüstrisinde haşıl alma işlemi için kullanılmaktadır. Substrat spesifikliği nedeniyle amilaz yalnızca nişasta makromoleküllerini parçalayıp, selüloz ve diğer liflere hiçbir şekilde zarar vermediğinden, tekstilde haşılı giderme yöntemi için güvenli bir şekilde kullanılabilir. *Bacillus* suşlarından elde edilen amilazlar, tekstil endüstrilerinde uzun süre kullanılmıştır (Gupta *et al.* 2003; Souza and Magalhães 2010).

Etanol üretim prosesi

Etanol en çok kullanılan sıvı biyoyakıttır. Etanol üretimi için nişasta, düşük fiyatı ve kolay bulunabilen hammaddesi nedeniyle dünyanın çoğu bölgesinde en çok kullanılan substrattır (Chi *et al.* 2009). Bu üretimde, fermente edilebilir şekerler elde etmek için nişastanın çözündürülmesi ve ardından iki enzimatik aşamaya tabi tutulması gerekir. İlk basamakta, nişastanın etanole biyolojik olarak dönüştürülmesi, nişastanın bir amilolitik mikroorganizma veya α -amilaz gibi enzimlerle muamele edilmesi sonucu şekere dönüştürüldüğü sıvılaştırma ve sakkarifikasyon aşamasından oluşmaktadır. İkinci basamak ise şekerin *Saccharomyces cerevisiae* gibi bir etanol fermente edebilen mikroorganizma kullanılarak etanole dönüştürüldüğü fermentasyon aşamasından oluşmaktadır (De Moraes *et al.* 1999; Toksoy 2006).

Gıda endüstrisi

Amilazlar; fırınlama, demleme, sindirim yardımcılarının hazırlanması, kek üretimi, meyve suları ve nişasta şurupları gibi işlenmiş gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Couto and Sanromán 2006). Bu enzimler, un içindeki nişastayı daha sonra maya tarafından fermente edilecek olan dekstrinlere ayırır. Hamura α -amilaz ilavesi, fermentasyon hızının arttırılmasına ve hamurun viskozitesinin azalmasına neden olarak, ürünün hacminde ve dokusunda gelişmelere yol açar. Ayrıca hamurda ilave şeker oluşturarak ekmeğin tadını, kabuk rengini ve kalitesini artırır. α -amilazlar fermente olabilen bileşikler üretmenin yanı sıra ekmek pişirmede bayatlamayı önleyici etkiye sahiptir ve unlu mamullerin yumuşaklığını korumasını geliştirerek bu ürünlerin raf ömrünü uzatır (Van Der Maarel *et al.* 2002; Gupta *et al.* 2003). Şu anda, fırıncılık endüstrisinde *Bacillus stearothermophilus*'un termostabil maltojenik amilazı ticari olarak kullanılmaktadır (Van Der Maarel *et al.* 2002).

Kağıt endüstrisi

Kağıdın nişasta ile kaplanması, yazma kalitesini iyileştirmek amacıyla kağıt yüzeyinin daha pürüzsüz ve güçlü olmasını sağlayan bir işlemdir. Fakat bu uygulamada doğal nişastanın viskozitesi işlemin gerçekleştirilebilmesi için oldukça yüksektir ve bu nedenle polimerin α -amilaz ile kısmen parçalanarak viskozitesinin düşürülmesi gerekir (Bruinenberg *et al.* 1996; Van Der Maarel *et al.* 2002; Gupta *et al.* 2003).

Mikrobiyal Amilaz Kaynakları

Mikroorganizmalar en önemli enzim üretim kaynaklarıdır. Doğru türün seçilmesi, endüstriyel kullanım için yüksek verimde uygun enzimlerin üretilmesinde önemli rol

oynamaktadır (Fossi *et al.* 2005). Oldukça fazla çeşitliliğe sahip olan mikrobiyal kaynaklardan elde edilen amilazlar gerekli endüstriyel pazar gereksinimlerini karşılamak için bol miktarda üretilmektedir. Mikrobiyal enzimler, çeşitli uygulamalarda oldukça faydalı olabilecek çok çeşitli özelliklere sahiptir (Teodoro and Martins 2000; Shiau *et al.* 2003; El-Fallal *et al.* 2012; Hussain *et al.* 2013).

Son yıllarda, endüstriyel açıdan önemli enzimlerin biyoteknolojik kaynakları olarak mikroorganizmaların kullanımı, hücre dışı enzimleri araştıran birçok çalışmacının ilgisini çekmiştir. Proteazlar ve amilazlar; biracılık, deterjan ve gıda endüstrilerinde yaygın olarak kullanıldıkları için endüstriyel olarak önemli enzimler arasında en önde gelen enzimler olarak kabul edilir (El-Fallal *et al.* 2012).

Bakteri, mantar ve mayalardan elde edilen mikrobiyal amilazlar, ağırlıklı olarak endüstriyel sektörlerde ve bilimsel araştırmalarda kullanılmaktadır. Amilaz üretim düzeyi, aynı cins, tür ve suş arasında bile bir canlıdan diğerine değişiklik göstermektedir. Ayrıca, nişasta veya amiloz bakımından zengin ortamlardan izole edilen suşların yüksek miktarlarda enzim üreteceği için mikroorganizmaların kökenine bağlı olarak amilaz üretim seviyesi de farklılık göstermektedir. pH, sıcaklık, karbon ve nitrojen kaynakları gibi faktörler özellikle fermantasyon proseslerinde amilaz üretim hızında önemli rol oynamaktadır. Mikroorganizmalar genetik mühendisliğine uygun olduğundan, daha yüksek amilaz verimi elde etmek için suşlar geliştirilebilir. Ayrıca, ekstrem koşullar altında stabil kalabilen verimli amilaz enzimlerinin elde edilebilmesi için mikroorganizmalar modifiye edilebilir. Bu tür iyileştirmeler ayrıca arka plan proteinleri tarafından kontaminasyonu azaltabilir ve reaksiyon süresini en aza indirerek amilaz reaksiyonunda daha az enerji harcanmasını sağlayabilir (Sundarram and Murthy 2014).

Amilaz salgılayan çok çeşitli mikrobiyal türler arasında, bakterilerin kullanımı ile enzim üretimi diğer mikroorganizmalardan daha ucuz ve daha hızlıdır. Ayrıca, yukarıda bahsedildiği gibi, genetik mühendisliği çalışmaları bakterilerle daha kolay gerçekleştirilebilir ve rekombinant enzimlerin üretimi için de oldukça uygun konak organizmalardır. Amilaz sekresyonu için çok çeşitli bakteri türleri izole edilmiştir. Literatürde; *Bacillus subtilis* (Baysal *et al.* 2003), *Bacillus licheniformis* (Ashraf *et al.* 2003), *Caldimonas taiwanensis* (Chen *et al.* 2005), *Halobacillus sp* (Amoozegar *et al.* 2003), *Geobacillus thermoleovorans* (Rao and Satyanarayana 2007), *Lactobacillus fermentum* (Calderon *et al.* 2003), *Lactobacillus manihotivorans* (Aguilar *et al.* 2000) gibi bakteri türlerinin amilazları çalışılmıştır.

Amilaz Aktivitenin Ölçülmesi

Amilaz aktivitesi, reaksiyon ortamında bulunan çözünebilir nişasta polimerinin glikozidik bağlarının hidrolizi sonucu glukoz, dekstrin ve limit dekstrinlerin oluşumuna bağlı olarak tespit edilebilmektedir. Dolayısıyla, reaksiyon ortamındaki artan indirgen şekerlerin miktarı hedef alınarak enzim aktivitesi ortaya koyulabilmektedir (Priest 1977). DNS (3,5-dinitro salisilik asit) metodu, nişastanın amilaz ile hidrolizi sonucu artan indirgen şeker miktarının belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Serbest aldehit veya keton grubu içeren şekerler 3,5-dinitro salisilik asidi alkali koşullarda 3-amino-5-nitro salisilik aside indirgeyerek kırmızı-kahverengi renk oluşturur. Renk oluşumuna bağlı olarak hem enzimin reaksiyon çözeltisi hem de hazırlanan standart çözeltilerin 540 nm’de absorpsanları ölçülerek amilaz aktivitesi EÜ/ml cinsinden hesaplanmaktadır (Bernfield 1955; Miller 1959).

Termofilik Bakteriler

Termofilik bakteriler; jeotermal sıcak su kaynaklarında ya da hidrotermal bacalarda yaşayabilen ve 45-50°C’nin üzerinde optimum büyüme gösteren mikroorganizmalardır (Lebedinsky *et al.* 2007). Bu mikroorganizmalar, ılımlı termofilikler ve ekstrem termofilikler olarak sınıflandırılmaktadır. Ilımlı termofillerin optimum büyüme sıcaklığı 45-60°C arasında iken 60-80°C arasında optimum gelişim gösterenleri ekstrem termofil, 80-110°C arası optimum gelişim gösteren mikroorganizmalar ise hipertermofil olarak isimlendirilmektedir. Ilımlı termofil ve ekstrem termofil sınıfına ait mikroorganizmalar endüstriyel uygulama potansiyeline sahip önemli mikrobiyal kaynaklardır (Brock 1978; Kawasaki *et al.* 2011).

Enzimlerin, hücre içi aktivitelerinin yanı sıra hücre dışında da katalitik aktivite sergileyebilmeleri özellikle endüstriyel proseslerde daha fazla kullanım alanı bulmalarını sağlamıştır. Termofilik mikroorganizmalardan elde edilen sıcaklık parametresine karşı dayanıklılık gösteren termostabil enzimler özellikle nişasta hidrolizine dayalı bazı endüstriyel uygulamalarda fazlaca tercih edilmektedir. Amilolitik termostabil enzimler kimya, gıda ve farmakoloji gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Yüksek sıcaklığa dayanıklılık bileşiklerin çözünürlüğünü kolaylaştırmak, reaksiyonun daha hızlı katalizlenmesini sağlamak, kontaminasyon riskini düşürmek gibi avantajlar sağlamaktadır (Adams and Watt 1993; Danson and Hough 1998).

***Niallia* cinsi**

Niallia, yakın zamanda *Bacillus* cinsinden ayrılarak yeni bir cins ismi olarak sınıflandırılmıştır (Gupta *et al.* 2020). *Bacillus* cinsi uzun zamandır filogenetik olarak oldukça heterojen bakteri türlerini içermektedir. Bu zamana kadar *Bacillus* cinsine ait 570’den fazla

bakteri türü bildirilmiştir. Bu cinsin içerisinde yer alan bakteriler fenotipik olarak benzerlikler göstermekteyken filogenetik olarak birbirleriyle çok az ortak noktaya sahiptir. Bu durum, tanımlanacak yeni bakteri türlerinin sınıflandırılmasında sorunlara neden olmaktadır. Modern filogenetik analizler sayesinde *Bacillus* cinsi içerisinde yer alan polifiletik gruplar aydınlatılarak yeni cins isimleri altında sınıflandırılmış ve *Bacillus* cinsi yeniden düzenlenmiştir. Yapılan çalışmalarla *Bacillus* cinsine ait tür sayısı yaklaşık 100'e kadar düşürülmüştür.

Niallia, *Bacillus* cinsinin üyelerinin sistematğine ve kullanımına yaptığı katkılardan dolayı İngiliz mikrobiyolog Prof. Niall A. Logan'ın adını almıştır. Bu cins içerisindeki türler, Fakültatif anaerobik, Gram pozitif, çubuk şeklindeki bakterilerden oluşmaktadır. *B. tuaregi* hariç tüm türleri hareketli ve endosporlardan oluşur. *B. tuaregi* hareketlidir ancak endospor oluşturmaz. *B. circulans* (Yeni ismi *Niallia circulans*), su ürünleri yetiştiriciliğinde, biyoremediasyonda, su arıtımında ve enzim üretiminde kullanılan önemli bir bakteridir ve *Niallia* cinsine ait tipik türdür (Gupta *et al.* 2020).

Niallia alba bakterisi ilk kez, Thorat *et al.* (2021) tarafından yapılan bir çalışmada sindirim enzimlerini içeren sindirim şurubundan izole edilerek tür tanımlaması yapılmıştır. Çalışmada, *N. alba*'nın en yakın filogenetik komşu türleri ile arasındaki farklı fenotipik özellikleri ortaya koyulmuştur (Tablo 3). Elde edilen sonuçlara göre *Niallia alba* UniB3^T suşuna ait karakteristik özellikler; Katalaz pozitif, Oksidaz negatif, β -galaktosidaz enzim aktivitesi pozitif, Myo-Inositol, Arabinoz ve Mannoz gibi karbonhidrat kullanımı pozitif olarak belirlenmiştir.

Niallia cinsine ait türler toprak, gıda, kanalizasyon gibi çok çeşitli kaynaklardan izole edilmiştir. *N. alba* türüne en yakın tür olan *N. circulans*'ın literatürde sıcak su kaynaklarından izole edilen suşları da mevcuttur. Johri *et al.* (2012) tarafından, Hindistan'ın Kuzey Batı Himalayalarındaki sıcak su kaynaklarından termofilik *Bacillus circulans* IIB153 bakterisi izole edilmiştir (Johri *et al.* 2012). Bir başka çalışmada Kademi *et al.* (2000) tarafından farklı bölgelerden toplanan toprak örneklerinden 50°C sıcaklıkta bakteri izole edilmiş ve ılımlı termofilik *Bacillus circulans* MAS2 suşu tanımlanmıştır (Kademi *et al.* 2000). *Bacillus circulans* termostabil enzim üretimi için de çalışılmıştır. Ashita *et al.* (2000) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, çöp sahasından izole ettikleri termofilik *Bacillus circulans* AB16 suşu ile termostabil ksilanaz üretmiş ve bakteriden iki farklı Ksilanaz (*Xyl A* ve *Xyl B*) enzimi ayrıştırılarak ayrı ayrı karakterize edilmiştir. *Xyl A* enziminin optimum sıcaklığı 75-80°C iken *Xyl B* enziminin optimum sıcaklığı 65-70°C olarak belirlenmiştir. Dey *et al.* (2002) tarafından

gerçekleştirilen bir çalışmada, topraktan izole edilen *Bacillus circulans* GRS313 bakterisinde amilaz saflaştırılmış ve enzimin 60°C'ye kadar stabilitesini koruduğu belirlenmiştir.

Tablo 3. *Niallia alba* ve *Niallia circulans* Bakterilerinin Bazı Fizikokimyasal Özellikleri (Thorat *et al.* 2021)

Fenotipik Özellik	<i>Niallia alba</i> UniB3 ^T	<i>Niallia circulans</i> DSM 11 ^T
%4 NaCl	Dirençli	Dirençli
%8 NaCl	Duyarlı	Dirençli
Myo-inositol	-	+
L-Arabinoz	+	-
Mannoz	+	-
β-galaktosidaz	+	-

KURAMSAL TEMELLER

Amilaz, endüstride çok fazla uygulama alanı bulunan en önemli ticari enzimlerden biridir. Çeşitli avantajları nedeniyle, bitki ve hayvan kökenli amilazlardan ziyade mikrobiyal kaynaklı amilaz üretimi daha fazla ilgi odağı olmuştur. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde, son yıllarda farklı mikroorganizmalardan amilaz üretimi ve saflaştırması, karakterizasyonu ile optimum aktivite gösterdiği fiziksel parametrelerin belirlenmesi ve özellikle endüstriyel uygulamalardaki kullanım potansiyelinin ortaya koyulabilmesi amacıyla yapılan çalışmalar mevcuttur.

Osunde *et al.* (2025) tarafından nişasta bakımından zengin bir kök sebze olan manyok işleme fabrikasından temin edilen atık sudan amilolitik bakteri izole edilmiştir. En yüksek amilaz aktiviteye sahip izolat belirlenerek enzim üretimi sağlanmış ve ardından enzim kısmi saflaştırılmıştır. Moleküler analizlerin sonucuna göre izolat *Bacillus subtilis* olarak tanımlanmış ve kısmi saflaştırılan amilazın spesifik aktivitesi 1,61'lik saflaştırma katsayısı ve %32,96'lık verimle 28,71 U/mg olarak belirlenmiştir. Enzimin doğal molekül ağırlığı 28,65 kDA, K_M sabiti ve V_{Max} değeri ise sırasıyla 0,3173 mg/ml ve 5405 U/mg'dır. Çalışmada, *Bacillus subtilis* C5 α -amilazının 50°C'de optimum aktiviteye sahip olduğu, yüksek V_{Max} ve düşük K_M değerlerine sahip olduğu ve bu nedenle endüstriyel ve biyokimyasal uygulamalar için uygun olabileceği sonucuna varılmıştır (Osunde *et al.* 2025).

Hossain *et al.* (2024) tarafından yapılan çalışmada, pirinç değirmeni toprağından bakteri izolasyonu gerçekleştirmiştir. *Bacillus licheniformis*, *B. amyloliquifaciens*, *B. cereus*, *B. subtilis* ve *B. paramycoides* türleri tanımlanmış ve bakterilerin amilaz aktiviteleri DNS yöntemi ile belirlenmiştir. Amonyum sülfat ile kısmi saflaştırılan amilazın aktivitesi 1484,94 U/ml olarak ölçülmüştür. En yüksek amilaz üretimi %2 nişasta konsantrasyonunda, pH 7'de, 72 saatlik optimum fermentasyon süresinde kaydedilmiş ve optimum inkübasyon sıcaklığı 65°C olarak belirlenmiştir. Amilaz ile muamele edilen elma suyunda berraklaştırma aktivitesi sonucu meyve suyunun bulanıklığı %54,18'e düşmüştür. Amilazın potansiyel antimikrobiyal özelliği incelendiğinde en yüksek inhibisyon bölgeleri *Escherichia coli* ATCC 25922'ye karşı 22,36 mm ve *Mucor* sp. ATCC 48559'a karşı 22,45 mm'dir (Hossain *et al.* 2024).

Arifeen *et al.* (2024) tarafından gerçekleştirilen çalışmada 5 farklı bölgeden toplanan toprak örneklerinde amilaz pozitif bakteri suşları taranmış ve en yüksek aktiviteye (92,21±17 IU/ml) sahip olan izolatın tür tespiti yapılarak *Bacillus licheniformis* olduğu belirlenmiştir. Enzimin optimum parametreleri 35°C, pH 5,5 ve %2 substrat konsantrasyonu olarak tespit

edilmiştir. SDS-PAGE sonucuna göre enzimin molekül ağırlığı 35 kDa bulunmuştur (Arifeen *et al.* 2024).

Sharif *et al.* (2023) tarafından yapılan çalışmada, kaplıca suyundan izole edilen 4 termofilik bakterinin tür tespiti yapılmış ve izolatlar moleküler analizlere göre *Anoxybacillus mongoliensis* (MBT001), *A. flavithermus* (MBT002), *A. flavithermus* (MBT003) ve *Bacillus* (MBT004) türleri olarak tanımlanmıştır. Bu izolatların amilaz aktiviteleri agar testi ve DNS metodu ile test edilmiştir. Optimal enzim üretimi için yanıt yüzey metodolojisi uygulanmış ve doğrulanmıştır. Enzim üretiminin optimal parametreleri; 70°C, %1,5 nişasta konsantrasyonu, pH 8 ve 48 saatlik inkübasyon süresi olarak belirlenmiştir. MBT001 ve MBT002 enzimlerinin MgSO₄ varlığında, MBT003 ve MBT004 enzimlerinin ise CaCl₂ varlığında aktivitelerinin arttığı görülmüştür. Amonyum sülfat ile kısmi saflaştırması yapılan enzimlerin leke giderme performansı incelenmiş ve ham enzimin tek başına uygulandığı prosese kıyasla deterjan ile birlikte kombinlenerek uygulanması durumunda leke gideriminin gözle görülür bir şekilde etkili olduğu görülmüştür (Sharif *et al.* 2023).

Hu *et al.* (2022) tarafından yapılan çalışmada, mısır tohumlarından saflaştırılarak tanımlanan *Bacillus velezensis* D1 suşundaki α -amilaz geni, *E.coli* bakterisinde eksprese ettirilmiş ve rekombinant enzim saflaştırılmıştır. Optimum fermentasyon koşulları pH 7,5, 44°C’de ve 48 saat olarak belirlenirken karakterizasyon analizlerinde enzimin 70°C’de 4 saatlik inkübasyona tolerans gösterdiği ve optimal reaksiyon sıcaklığının 60°C olduğu ortaya koyulmuştur. Ayrıca enzimin pH 8’de optimal aktiviteye sahip olduğu, asitlere karşı stabilitesini koruyarak pH 5.0-6.0 değerlerini tolere ettiği görülmüştür. Bütün bu sonuçlara göre *Bacillus velezensis* D1 tarafından üretilen α -amilazın hem yüksek sıcaklığa hem de düşük pH değerlerine karşı aktivitesini koruduğu ortaya koyulmuştur (Hu *et al.* 2022).

Bamigboye *et al.* (2022) tarafından, *Pleurotus tuberregium* fungusundan saflaştırılan amilazın spesifik aktivitesi 5,26 U/mg, toplam aktivitesi 189,20 U’dur. Enzim, 70°C ve pH 5’de maksimum aktivite göstermiş ve 4 dakika boyunca 30°C’de aktivitesinin %100’ünü koruyabilmiştir. *P. tuberregium* amilazı muz kabuğu, nişasta ve ananas kabuğu ile reaksiyonu sonucunda sırasıyla 42, 30 ve 29 $\mu\text{g/mL/dk}$ optimal aktivite göstermiştir. Reaksiyon karışımında Ca²⁺, Mg²⁺ ve Na⁺ iyonlarının varlığı enzim aktivitesini arttırmış, ancak KCl ve Na₂H₂PO₄ tarafından inhibe edilmiştir. Ham enzim, sıvılaştırılmış çözünür manyok nişastasını (kayda değer miktarda glikoz salınımı ile) berraklaştırdığı ve kısmen lekeli beyaz kumaşı etkili bir şekilde temizlediği görülmüştür (Bamigboye *et al.* 2022).

Pham *et al.* (2022) tarafından, amilaz üretimi ve karakterizasyonu için gıda atıklarından izole edilen FW2 suşu kullanılmış ve en yüksek amilaz üretimi, pH 7-7.5, 40-45°C sıcaklıkta

ve %0-10 NaCl konsantrasyonunda 2400 ± 45.8 U/mL aktivite ile gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan amilazın molekül ağırlığı 55 kDa olarak bulunmuştur. Ayrıca bakterinin proteaz üretimi de incelenmiş ve FW2 suşunun ekstrem çevresel koşullar altında atık bozulmasına umut verici bir kaynak olabileceği ortaya koyulmuştur (Pham *et al.* 2022).

Matpan Bekler *et al.* (2021) tarafından, termofilik amilaz üretimi için Türkiye’de Sorgun kaplıcalarından izole edilen *Anoxybacillus ayderensis* FMB1 suşu kullanılmış ve amilaz üretimi için kültür parametreleri optimize edilmiştir. 55°C ve pH 8.0’de 24 saatlik inkübasyonun sonunda maksimum amilaz aktivitesi 295.8 U/mg olarak belirlenmiştir. En iyi enzim üretimi, karbon kaynağı olarak %1,5 çözünür nişastanın ve azot kaynağı olarak %1 maya ekstraktının kullanıldığı kültür ortamlarında elde edilmiştir. Enzimin kısmi saflaştırması yapılmış 50°C’de 2 saat boyunca aktivitesini korumuş ve stabil pH aralığı 5.0-10.0 olarak bulunmuştur. Enzim aktivitesini Ca^{+2} metali artırırken, Mg^{+2} , Zn^{+2} , Ni^{+2} ve Cu^{+2} metalleri azaltmış, Hg^{+2} ise tamamen inhibe etmiştir. DTT, PMSF, PCMB, SDS ve EDTA enzim aktivitesinde azalmalara neden olmuş ve SDS-PAGE analizi ile enzimin molekül ağırlığı 58.5 kDa olarak bulunmuştur (Matpan Bekler *et al.* 2021).

Soy *et al.* (2021), termofilik bakteri *Geobacillus icigianus*’tan (BITSNS038) termostabil amilazın optimizasyonu ve enzim saflaştırması ile karakterizasyon çalışmalarını gerçekleştirmiştir. Amilaz, nişasta ve tripton varlığında sırasıyla 7,5 ve 3,0 g/L’de (pH 7.0, 70°C ve 150 rpm çalkalama hızında) 18-24 saat inkübasyonu ile optimal olarak üretilmiştir. Nişasta için K_M sabiti ve V_{Max} değeri sırasıyla 2,17 mg/ml ve 4,16 U/ml olarak bulunmuştur. Enzim, 70°C’de yüksek termal stabilite göstermiş, 8 saat sonra aktivitesini %62,5 oranında koruyabilmiştir. Nişasta hidrolizindeki etkinliği açısından test edildiğinde, mısır nişastası bulamacının %34,5’i enzim tarafından hidroliz edilmiş ve enzimin antibiyofilm aktivitesi ortaya koyulmuştur, ancak amilazın antimikrobiyal aktivitesi tespit edilememiştir. Kısmi saflaştırma sonucu amilazın molekül ağırlığı 45-66 kDa aralığındadır (Soy *et al.* 2021).

Priyadarshini *et al.* (2020) tarafından yapılan çalışmada, göl tortusundan izole ettikleri alkalifilik (pH:10) *Bacillus cereus* SP-CH11 suşundan α -amilaz saflaştırması ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Ekstraselüler amilazın molekül ağırlığı yaklaşık 55 kDa olarak belirlenmiş, saflaştırılan enzimin pH 9’da 35-65°C sıcaklık aralığında termostabil yapısını koruyarak %88-100 oranında aktivitesine devam ettiği gözlenmiştir. Sırasıyla 7 mg/ml ve 100 kat seyreltmelerde toz ve sıvı deterjanlarla stabilite göstermiş ve pamuklu kumaştan nişasta içeren lekenin gideriminde oldukça başarılı olduğu belirlenmiştir (Priyadarshini *et al.* 2020).

Abd-Elaziz *et al.* (2020) tarafından yapılan çalışmada, çeşitli bal örneklerinden amilolitik aktiviteye sahip farklı bakteri türleri saflaştırılmış ve en yüksek aktiviteye sahip tür *Bacillus atrophaeus* NRC1 suşu olarak tespit edilmiştir. Maksimum amilaz üretimi, pH 6.0'da, 40°C'de ve 24 saatlik inkübasyonda elde edilmiştir. İki amilaz izoenzimi (AmyI ve AmyII) saflaştırılmış ve ana izoenzim AmyI'in 61 kDa molekül ağırlığında, 4635 U/mg enzim aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Enzimin nişastaya karşı maksimum aktivitesi pH 6 ve 50°C olarak tespit edilmiştir. 60 ve 70°C'ye çıkıldığında aktivitesinin sırasıyla %65 ve %23'ünü koruyabildiği gözlenmiştir. Ca^{+2} , Mg^{+2} ve Ba^{+2} kasyonlarının enzim aktivitesini arttırdığı, Hg^{+2} 'nin ise tamamen inhibe ettiği belirlenmiştir. Ayrıca, EDTA, PMSF ve SDS tarafından enzimin inhibe edildiği tespit edilmiştir (Abd-Elaziz *et al.* 2020).

Elamary and Salem (2020) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, topraktan 75 amilaz pozitif suş izole edilmiş ve enzim kültür ortamından saflaştırılmıştır. Hem filtrelenmiş kültür ortamı hem de saflaştırılan amilazın insan patojenlerine karşı biyofilm oluşumu engelleme potansiyeli incelenmiştir. İzole edilmiş amilaz üreten bakterilerin süpernatantı ve saflaştırılmış amilazı, biyofilm için sırasıyla %93.7 ve %78.8 önemli inhibisyon göstermiş ve elde edilen sonuçlara göre hem süpernatantın hem de saflaştırılmış amilazın klinik ve çevresel biyofilm kontrolü için etkili olabileceğini kanısına varılmıştır (Elamary and Salem 2020).

Allala *et al.* (2019), termostabil α -amilazın saflaştırılması, biyokimyasal ve moleküler karakterizasyonu için *Tepidimonas fonticaldi* HB23 suşunu kullanmıştır. Analizler sonucu enzimin molekül ağırlığı 48 kDa, enzim aktivitesinde optimal pH 8.0, optimal sıcaklık ise 80°C bulunmuştur. İnce tabaka kromatografisi analizi, çözünür patates nişastasının enzim ile hidrolizi sonucu oluşan ürünlerin maltopentaoz, maltoz ve maltotrioz olduğu belirlenmiştir. Ayrıca enzimin organik çözücülere karşı stabil olduğu ve bazı ticari deterjanlarla mükemmel uyum gösterdiği, bu nedenle, deterjan bileşiminde katkı maddesi olarak kullanılabileceği ortaya koyulmuştur (Allala *et al.* 2019).

Sudan *et al.* (2018), termostabil amilaz eldesi için kaplıcadan izole edilen *Geobacillus* K1C suşunu kullanmıştır. Saflaştırılan amilazın optimum sıcaklık ve pH değerleri sırasıyla 80°C ve pH 6 olarak belirlenmiştir. Substrat varlığında, termostabil amilazın 70°C'de 6 saat, 80°C'de 2 saat kalması başlangıç aktivitesini %50 korumuştur. Ayrıca, pH 5.0, 6.0 ve 7.0'de 48 saatlik inkübasyonundan sonra bile başlangıç aktivitesinin %90'ını koruyarak dikkate değer bir pH stabilitesi göstermiştir. Amilaz aktivite, Ca^{+2} metalinden bağımsız iken, Cu^{+2} , Pb^{+2} ve Hg^{+2} varlığında tam inhibisyon gözlenmiştir. Ayrıca, enzim aktivitesinin deterjanlar, organik çözücüler ve Proteinaz K varlığında stabil kaldığı belirlenmiştir (Sudan *et al.* 2018).

Literatür araştırmalarına göre Bitlis/G lsuhan kaplıca sularından bu zamana kadar amilaz-pozitif termofilik bakteri izolasyonu, amilaz saflaştırması ve karakterizasyonu yapılarak elde edilen enziminin deterjan, tekstil ve meyve suyu end stirilerindeki aktivitesinin incelendiği, endüstriyel uygulanabilirliğinin araştırıldığı bir çalışma mevcut değildir. Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar ile literatüre yeni bir termostabil amilaz kaynağı kazandırılarak, enzimin endüstriyel potansiyeli ortaya koyulmuştur.

Amilaz; deterjan, tekstil, içecek end stirileri gibi alanlarda fazlaca kullanılmaktadır. Tezin başarılmasıyla, Bitlis/G lsuhan kaplıcasından en yüksek amilaz üreten bakterinin saflaştırılması, bakterinin kültür optimizasyonu, tür tespiti, bakterinin geliştiği kültür ortamından amilazın saflaştırılması ve karakterizasyonu ile enzimin belli endüstriyel alanlardaki kullanılabilirliği ortaya koyulmuştur. Yapılan tez çalışması, endüstriyel öneme sahip amilazın mikrobiyal üretimi için yeni bir kaynağın literatüre kazandırılması ve aşağıda maddeler halinde verilen endüstriyel alanlardaki kullanımına katkı sağlaması açısından önem arz etmektedir;

1. Enzimin deterjan end stirisindeki potansiyeli

Leke gideriminde proteazlarla birlikte fazlaca kullanılan amilazın, bu tez kapsamında termofilik bakteriden saflaştırılarak ticari olarak satılan deterjanlarla olan uyumluluğu incelenmiş ve uyumlu deterjan belirlendikten sonra lekeli kumaşlardaki performansı değerlendirilmiştir.

2. Enzimin tekstil end stirisindeki potansiyeli

Tekstil sektöründe, dayanıklılığı ve sağlamlığı için nişasta çözeltileri ile muamele edilen iplikler, dokuma sonrası kumaş üzerinde kalan nişastaların giderilmesi için amilaz içeren reaksiyon ortamına daldırılır. Tez kapsamında saflaştırılan amilaz, nişasta çözeltisine daldırılmış kumaş parçasındaki nişastanın giderilmesinde kullanılmış ve % haşıl giderme performansı değerlendirilmiştir.

3. Enzimin meyve suyu end stirisindeki potansiyeli

Özellikle olgunlaşmamış meyvelerde fazla miktarda bulunan nişasta, bu meyvelerden elde edilecek içeceklerde bulanıklığa neden olmaktadır. Meyve suyu end stirisinde önemli bir parametre olan berraklık için meyve suları amilaz ile muamele edilmektedir. Saflaştırılan amilaz, taze sıkılmış elma suyuna uygulayarak; % berraklık ve dekolorizasyon gibi parametreler açısından değerlendirilerek içecek end stirisindeki performansı ortaya koyulmuştur.

Bu kadar fazla kullanım alanına sahip amilaz için özellikle farklı mikrobiyal kaynakların literatüre kazandırılması amacıyla birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Mevcut doktora tezinin sonlandırılmasıyla, literatürde ilk kez *Niallia alba* BT-5 bakterisinden amilaz saflaştırması yapılarak enzim karakterizasyonu ve endüstriyel alanlarda kullanım potansiyelinin incelenmesi gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, *Niallia alba* amilazı ile çalışılarak hem literatüre yeni bir amilaz kaynağı kazandırılmış hem de henüz 2021 yılında tür tanımlaması yapıldığından çok az bilginin bulunduğu *Niallia alba* bakterisine ait yeni fizyolojik, morfolojik ve biyokimyasal analiz bilgileri verilmiştir. Ayrıca, literatür incelemelerinde Bitlis/Gölsuhan kaplıcasından bakteri izolasyonu ve tür çeşitliliği açısından herhangi bir çalışılma yapılmadığı görülmüştür. Bu kapsamda mevcut tez çalışması, Bitlis/Gölsuhan kaplıca suyundaki bakteri çeşitliliğinin incelenmesi açısından ilk olma özelliği taşımaktadır.



MATERYAL VE METOT

Materyal

Kullanılan kimyasallar

Tablo 4. Tez Çalışmalarında Kullanılan Kimyasallar, Kitler ve Üretici Firmalar

KİMYASALIN ADI	ÜRETİCİ FİRMA
TSA	Neogen
TSB	Neogen
LB Broth	Neogen
Gliserin	Tekkim
Nişasta	Isolab
Çözünmez Nişasta	Rokim
Pepton	HKM
NaCl	KimyaLab
NaH ₂ PO ₄	ThermoSientific
KH ₂ PO ₄	KimyaLab
NH ₄ Cl	KimyaLab
MgSO ₄	Carlo Erba
CaCl ₂	Isolab
Agar agar	HKM
İyot çözeltisi	Norateks
MgSO ₄ .7H ₂ O	Isolab
Maya ekstraktı	Neogen
Sodyum asetat	Isolab
D-Glukoz	AFG Bioscience
DNS (3,5-dinitro salisilik asit)	ThermoSientific
Genomic DNA purification kit	Promega
Plazmid izolasyon kiti	Promega
Primerler	Oligomer
pGEM-T Easy vector	Promega
Taq-DNA Polimeraz	Sigma
dNTP mix	Hydra
EDTA	Fisher Bioreagents

Tablo 4. (devamı)

KİMYASALIN ADI	ÜRETİCİ FİRMA
DNA marker	Genesta
Etidyum bromide solüsyonu	Carl Roth
Jel yükleme boyası	Eco-Tech
IPTG	Bioshop
X-Gal	Bio Bacis
Amfisilin	BostonChem
Amonyum sülfat	Isolab
DEAE-Sepharose® Fast Flow	Sigma
Sığır Serum Albumin (BSA)	Sigma
Fosforik asit	Isolab
Coomassie Brilliant Blue G-250	Sigma
Sodyum Dodesil sülfat (SDS)	Sigma
Trihidroksimetilaminometan (Tris)	Bioshop
N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin (TEMED)	Sigma
Akrilamid	Sigma
N,N'-Metilenbisakrilamid	Sigma
Coomassie Brilliant Blue R-250	Sigma
Agaroz	Biomax
Amonyum persülfat (APS)	Carlo Erba
Asetik asit	Isolab
Sodyum tiyosülfat	Zag Kimya
Gluteraldehit	Sigma
Formaldehit	Tekkim
Sodyum karbonat	Tekkim
Gümüş nitrat	Serva
PageRuler™ Prestained Protein Standardı	ThermoScientific
Na ₂ SO ₃	Sigma
ZnCl ₂	Sigma
Metanol	Merck
Etanol	Chem Lab
Aseton	Luxor
Tween-80	Sigma
Triton X-100	Sigma

Kullanılan cihazlar

Tablo 5. Tez Çalışmalarında Kullanılan Cihazlar ve Markaları

CİHAZ ADI	MARKA/MODEL
Çalkalayıcı İnkübatör	ZHWY-200B
Etüv	MEMMERT UN55
Buzdolabı	ARÇELİK
Derin Dondurucu	WISECRYO SIMPLIFIED FREEZING SYSTEM
Hassas Terazî	AND GR-200
Manyetik Karıştırıcı	VELP SCIENTIFICA AREC
Vorteks	BIOCOTE STUART
pH metre	HANNA INSTRUMENTS PH/ORP METER
Otoklav	SHINSAENG SACV-801
Sınıf II Steril Kabin	ESCO CLASS II BSC
Santrifüj	THERMO SCIENTIFIC SL 16R
Multiplate okuyucu	THERMO SCIENTIFIC MULTISCAN GO
Elektroforez Güç Kaynağı	CONSORT-EV265
UV Görüntüleme Sistemi	VILBER LOURMAT-QUANTUM
Buz makinası	SCOTSMAN AF-80
Sonikatör	BANDELIN SONOREX DIGITEL
Saf su cihazı	Direct-Q® 8UV
Kuru Blok Isıtıcısı	BIOER MB-102
PCR	THERMO SCIENTIFIC 5020
Çeker Ocak	Hedlab

Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı

%0,9 NaCl dilüsyon çözeltisi: 0,9 g NaCl hassas teraziden tartılarak 99,1 ml distile su içerisinde çözdürüldü. Dilüsyon tüplerine 9'ar ml olacak şekilde eklenerek kapakları kapatılıp otoklavda 121°C'de 15 dk steril edildi.

M9-Nişasta agar (g/L): 10 g Nişasta tartılarak 90-95°C sıcaklıktaki 1 litre distile suda çözdürüldü. Ardından 6 g NaH₂PO₄, 3 g KH₂PO₄, 0,5 g NaCl, 1 g NH₄Cl, 0,24 g MgSO₄, 0,24 g CaCl₂, 3 g Pepton ve 15 g Agar tartılarak içerisine eklendi. Çözeltinin pH'ı 7'ye ayarlandı ve otoklavda 121°C'de 15 dk steril edildikten sonra petrilere döküldü.

Tryptone Soy Agar (TSA): 37 g TSA besiyeri hassas terazide tartılarak 1000 ml distile suda çözdürüldü ve otoklavda 121°C'de 15 dk steril edildikten sonra petrilere döküldü.

Tryptone Soy Broth (TSB): 30 g TSB besiyeri hassas terazide tartılarak 1000 ml distile suda çözdürüldü. Çalışılacak hacimdeki erlenlere ya da tüplere aktarılarak otoklavda 121°C’de 15 dk steril edildi.

LB Broth: 25 g LB Broth besiyeri hassas teraziden tartılarak 1000 ml distile suda çözdürüldü. Çalışılacak hacimdeki erlenlere ya da tüplere aktarılarak otoklavda 121°C’de 15 dk steril edildi.

LB Agar: 40 g LB Agar besiyeri tartıldıktan sonra 1 litre distile suda çözdürüldü. 121°C’de 15 dk steril edildi ve petrilere dökülerek donması beklendi.

Amilaz üretimi için indüklenmiş sıvı besiyeri (g/100ml): %1 çözüner nişasta bir miktar distile su içerisinde 90-95°C sıcaklıkta çözdürüldü. Ardından %0,5 pepton, %0,3 maya özütü, %0,3 NaCl, %0,1 KH₂PO₄ ve %0,02 MgSO₄.7H₂O olacak şekilde kimyasallar tartılarak çözelti içerisinde çözdürüldü. pH 7’ye ayarlanarak çalışılacak hacimdeki erlenlere aktarılıp otoklavda 121°C’de 15 dk steril edildi.

DNS (3,5-dinitro salisilik asit) çözeltisi: 1. Çözelti: 20 ml distile suda 1,6 g NaOH çözdürüldü, tamamen çözüldükten sonra içerisine 1 g DNS eklendi ve bir süre sonikatörde tutuldu. 2. Çözelti: 80 ml distile suda 30 g Sodyum potasyum tartarat tetra hidrat çözdürüldü. Hazırlanan iki çözelti karıştırıldı, çözünmeyen partiküller için tekrar sonikatörde tutuldu. Tamamen çözüldükten sonra karışım filtre kağıdından geçirilerek amber şişede saklandı. Bu hazırlanan çözelti amilaz aktivite tayininde kullanıldı.

50 mM pH:7 Fosfat Tamponu: 6,8 g KH₂PO₄ bir miktar distile su içerisinde tamamen çözdürüldükten sonra pH’ı 7’ye ayarlandı. Son hacim distile su ile bir litreye tamamlandı. Kullanılincaya kadar buzdolabında saklandı.

Nişasta Çözeltisi (%1): 0,1 g çözüner nişasta bir miktar distile su içerisinde 90-95°C sıcaklıkta çözdürüldü, ardından toplam hacim 10 ml olana kadar distile su ilave edildi. Bu hazırlanan çözelti amilaz aktivitesinin tayininde substrat olarak kullanıldı.

Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisi: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 tartılarak 50 ml etanolde (%95’lik) çözdürüldü. Çözeltiye 100 ml fosforik asit (%95’lik) eklendi ve son hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı ve karanlıkta muhafaza edildi. Hazırlanan çözelti Bradford yöntemi ile protein tayininde kullanıldı.

BSA çözeltisi: 5 mg Sığır Serum Albümin (BSA) tartılarak bir miktar distile suda çözdürüldü ve son hacmi 5 ml’ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti -20°C’de saklandı. Bu çözelti protein tayininde standart tüplerinin hazırlanmasında kullanıldı.

Gümüş boyamada kullanılan çözeltiler: Tespit çözeltileri için 10 ml Asetik asit, 30 ml %96'lık etanol ve 60 ml saf su karıştırıldı. Redüksiyon çözeltileri için 4,8 g sodyum asetat tartıldı, 45 ml etanol ve 80 ml saf su ile karıştırıldı. Ardından çözelti pH'ı asetik asit ile 6'ya ayarlandı. Üzerine 150 mg sodyum tiyosülfat ve 3 ml glutraldehit eklenerek son hacim saf su ile 150 ml'ye tamamlandı. Boyama çözeltileri için 150 mg gümüş nitrat tartılarak 150 ml saf su ve 30 µl formaldehit içerisinde çözdürüldü. Yıkama çözeltileri 1 için 3,75 g sodyum karbonat tartılarak 270 ml saf su ve 120 µl formaldehit içerisinde çözdürüldü. Yıkama çözeltileri 2 için 1 ml gliserin %5 asetik asit içeren 250 ml saf su ile karıştırıldı.

Kristal viyole: 1. Çözelti: 2 g kristal viyole tartılarak 20 ml %96'lık etanol içerisinde çözdürüldü. 2. Çözelti: 0,8 g amonyum oksalat tartılarak 80 ml distile suda çözdürüldü. 1. ve 2. çözelti karıştırılarak amber şişede 24 saat bekletildi. Kullanım öncesi filtre kağıdından geçirildi.

Malaşit yeşili: 5 g malaşit yeşili tartılarak 100 ml distile suda çözdürüldü.

Safranin: %2,5'lik stok solüsyonu hazırlandı. Stok solüsyonu için 2,5 g safranin 100 ml %95'lik etil alkolde çözdürüldü. Çalışma solüsyonu olarak 10 ml stok solüsyonu 90 ml distile su ile karıştırılarak hazırlandı.

Amfisilin: 0,2 g Amfisilin 10 ml distile suda çözdürüldü, ardından sterilizasyon için 0,22 µm çaplı membran filtreden geçirildi. alikuatlara ayrılarak -20°C'de saklandı.

X-Gal: 40 mg X-Gal tartılarak 1 ml DMSO'da çözdürüldü. Sterilizasyon işlemi uygulanmadan -20°C'de donduruldu.

IPTG: 0,238 g IPTG tartılarak 10 ml distile suda çözdürüldü. 0,22 µm çaplı membran filtreden geçirildikten sonra steril eppendorf tüplerde alikuatlara ayrılarak -20°C'de donduruldu.

Amfisilinli Besiyerleri: Sterilizasyon sonrası uygun sıcaklığa kadar soğuması beklenen katı ve sıvı besiyerlerine son konsantrasyonu 100 µg/ml olacak şekilde -20°C'de saklanan Amfisilin stok çözeltisinden eklendi. Besiyerleri 4°C'de muhafaza edildi.

1XTAE buffer: 10XTAE buffer'dan 200 ml alınarak üzerine 1800 ml saf su eklendi.

%1 Agaroz: 1,2 g agaroz tartılarak 120 ml 1XTAE ile karıştırılıp mikrodalgada kaynatıldı. Kısa bir süre soğuması beklendikten sonra içerisine 2,3 µl EtBr eklendi ve elektroforez kasetine döküldü.

Metot

Sıcak su örneğinin toplanması ve bakteri izolasyonu

Amilazın mikrobiyal kaynağı olarak kullanılacak olan bakterilerin eldesi için Bitlis/Gölsuhan kaplıcasından aseptik şartlar altında sıcak su örnekleri steril şişelere toplanarak laboratuvar ortamına getirildi, hazırlanan TSB besiyerinin içerisine bir miktar eklendi. Besiyerine aktarılan bakterilerin inkübasyonu için önceden 55°C'ye ayarlanmış çalkalayıcıda 24-48 saat inkübe edildi. Örneklerin inkübasyonu sonrası gelişen bakterilerin seri dilüsyonu (%0,9'luk fizyolojik su ile 10^{-1} ile 10^{-6} arası) gerçekleştirildi ve son 3 dilüsyon tüplerinden TSA besiyerlerine 100'er µl alınarak yayma ekim yöntemi ile ekimi yapıldı. 55°C'ye ayarlanmış etüvde 1 gece inkübasyona bırakılan petrilere gelişen bakteri kolonilerinden farklı morfolojiye sahip olanları belirlendi ve yeni katı besiyerlerine aktararak çizgi ekim yöntemiyle saf kültürleri elde edildi. Hazırlanan katı besiyerleri 55°C'de etüvde 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası gelişen bakteri kültürleri 500'er µl gliserol (%30'luk) ve LB sıvı besiyeri içeren vida kapaklı tüplere aktarıldı, üzerleri etiketlenip karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra çalışmanın ilerleyen basamaklarında kullanılmak üzere -80°C'de muhafaza edildi.

Bakteri izolatlarının morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testleri

Kaplıca suyundan izole edilen bakterilerin morfolojik (koloni ve hücre morfolojisi, Gram testi, Endospor testi, hareketlilik testi), fizyolojik (Tuz toleransı ve pH aralığı) ve biyokimyasal testleri (Oksidaz, katalaz, amilaz, β-galaktosidaz, β-glikosidaz ve nitrat üretim testi) gerçekleştirildi. Deney koşullarının tüm analizlerde aynı olabilmesi için testlerin her biri 3 tekrarlı yapıldı.

İzolatların morfolojik testleri

Hücre morfolojisi

Stoğa alınan bakteri izolatları TSA besiyerine çizgi ekim yöntemi ile aktararak tek koloniler elde edildi. Ardından 55°C'de 1-2 gün süre ile inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası gelişen kolonilerden preparat hazırlandı ve kristal viyole ile basit boyama yapıldı. Bir dakika beklendikten sonra preparat yıkanarak kurutuldu, immersiyon objektifi ile mikroskopta incelendi (Saygılı 1995; Temiz 1996).

Koloni morfolojisi

Stoktaki bakteriler çizgi ekim yöntemiyle TSA besiyerine ekildi ve 55°C'de 24-48 saat inkübasyona kaldırıldı ve gelişen bakterilerin kolonileri incelendi (Saygılı 1995).

Hareketlilik testi

İzolatların hareketlilik durumları iki yöntemle gerçekleştirildi ve sonuçlar teyit edildi. Test için öncelikle stoktaki bakteriler TSB besiyerine ekilerek 55°C’de çalkalayıcı inkübatörde inkübe edildi. İlk gerçekleştirilen hareketlilik testinde izolatların gelişen ön kültürlerinden steril pipet ile bir miktar alınarak köşelerine vazelin sürülen lamelin orta kısmına aktarıldı. Lamel, çukur lamın tam orta kısmına denk gelecek şekilde yapıştırıldı ve hızlıca ters çevrildi. Mikroskop altında bakteri hareketliliği incelenerek izolatlar hareketlilik açısından pozitif veya negatif olarak değerlendirildi (Saygılı 1995).

İkinci yöntem için %0,6 agar içeren TSB besiyeri hazırlandı ve otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edildikten sonra steril deney tüplerine aktararak donması beklendi. Ardından izolatların ön kültüründen iğne uçlu öze ile alınan bakteriler deney tüplerine orta hattan inoküle edilerek 55°C’de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüplerdeki ekim çizgisi etrafındaki bakteri gelişimi incelenerek izolatlar hareketlilik açısından değerlendirildi (Baltacı 2015).

Gram testi

Gram testi ile bakteri hücre duvarındaki farklılıkların tespiti amaçlanmaktadır. Testin uygulanması için -80°C’deki bakteri stokları çizgi ekim yöntemi ile TSA besiyerine ekilerek 55°C’de inkübe edildi. Gram testi için iki farklı yöntem uygulanmıştır. Birinci yöntemde her bakteri izolatu için ayrı ayrı hazırlanan steril lamlar üzerine, %3’lük KOH çözeltisinden 1-2 damla damlatıldı. Katı besiyerinde gelişen taze kültürlerden öze dolusu alındı ve lam üzerindeki KOH çözeltisi ile karıştırıldı. Karıştırma işleminin ardından öze yukarı doğru kaldırılarak bakterinin gram özelliği incelendi. Bu noktada, eğer bakteri gram negatif özellikte ise ipliksi ve viskoz bir uzama görülecektir. Bu durum, gram negatiflerin tek katlı peptidoglikan yapıdaki hücre duvarının teikoik asit bulundurmaması nedeniyle KOH varlığında parçalanması ve hücre sitoplazması ile DNA’sının serbest hale geçmesi ile açıklanmaktadır. Eğer bakteri gram pozitif özellikte ise öze yukarı doğru kaldırıldığında sulu bir faz şeklinde olacağından herhangi bir uzama gözlenmeyecektir. Bu durum ise, kalın peptidoglikan hücre duvar yapısının teikoik asit bulundurması nedeniyle KOH varlığında parçalanmayarak hücre bütünlüğünün korunması ile açıklanmaktadır (Saygılı 1995).

Gram testi için ikinci metot olarak gram boyama gerçekleştirildi ve elde edilen sonuçların doğruluğu teyit edildi. Bu yöntemde, katı besiyerindeki taze kültürden öze ile örnek alınarak lam üzerine damlatılan distile su ile karıştırıldı ve kurumaya bırakıldı. Ardından hazırlanan preparat alevden geçirilerek fikse edildi. Fiksasyon sonrası bakteri smearını kaplayacak şekilde kristal viyole damlatıldı ve 1 dk boyanması için beklendi. Bu işlem sonrası

bütün bakteriler mor renkte boyanacaktır. Ardından saf su ile yıkanarak fazla boya uzaklaştırıldı ve Lugol (Gramın mordanı) damlatılarak 1 dk beklendi. Saf su ile preparat yıkandı ve ardından %96'lık etanol ile boyanın akması durana kadar yıkama işlemi yapıldı. Ardından saf su ile tekrar yıkama yapıldıktan sonra kalın peptidoglikan tabakaya sahip olan gram (+) bakteriler Kristal viyole-Lugol kompleksinin hücre dışına çıkmasına izin vermeyeceğinden mor renkte, gram (-)'ler ise boya kompleksinin alkol ile uzaklaştırılması nedeniyle renksiz durumdadır. Gram boyamanın son aşamasında preparata safranin damlatılarak 20 sn bekletilir ve böylece zıt boyama sonucu gram (-)'lerin pembe-kırmızı renkte boyanması sağlanır. Boyama işlemi sonrası preparatlar mikroskop altında incelenerek mor renkliler Gram (+), pembe-kırmızı renkte boyananlar ise Gram (-) olarak kaydedildi (Arslan 2016).

Endospor testi

Endospor boyama testi Schaeffer and Fulton (1933) metoduna göre gerçekleştirilmiştir. Kaplıca suyundan izole edilerek -80°C'de stoğa alınan bakteriler, TSA besiyerine çizgi ekim yöntemi ile tek koloniler elde edilecek şekilde aktarıldı, 55°C'de 3-4 gün boyunca gelişmesi için inkübasyona bırakıldı. Gelişen kolonilerden preparat hazırlanarak 20 kez alevden geçirildi. Preparattaki bakteri smearı üzerine filtre kağıdı kesilerek yerleştirildi ve kağıt tamamen malaşit yeşili ile kaplanacak şekilde boyandı. Endosporların boyanabilirliğini artırmak için preparatlar sıcak su buharı ile doyuruldu. Bu işlem sırasında filtre kağıdındaki boya kurudukça tekrar malaşit yeşili eklendi ve işlem 15 dakika boyunca devam ettirildi. Ardından preparatlar su ile yıkanarak fazla boya uzaklaştırıldı ve bakteri smearını kaplayacak şekilde %0,25'lik safranin eklenerek 15 sn beklendi. Bekleme süresinin ardından fazla boya su ile uzaklaştırıldı. Preparatlar kurumaya bırakılarak immersiyon objektifi ile mikroskopta incelendi (Schaeffer and Fulton 1933).

İzolatların fizyolojik testleri

İzolatların tuz toleransının belirlenmesi

Kaplıca suyundan izole edilen bakterilerin tuz toleranslarını belirlenmek amacıyla %4, %8 ve %12 konsantrasyonlarda NaCl içeren LB sıvı besiyeri hazırlandı ve 121°C'de 15 dk steril edildi. Stoktaki bakterilerin TSA besiyerinde canlandırılması ve inkübasyonun ardından tek düşen kolonilerin TSB besiyerine inokülasyonu ile ön kültürlerinin hazırlanması adımları gerçekleştirildikten sonra 600 nm'deki OD değerlerine göre hazırlanan NaCl besiyerlerine eşit mikrobiyal hacimde inoküle edildi. Ardından kültürler 55°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası kültürdeki bakteri yoğunluğuna bağlı olarak gelişimlerinin yorumlanabilmesi için 600 nm'de spektrofotometre ile absorbansları ölçüldü. Elde edilen OD

değerlerine göre incelenen tuz konsantrasyonlarında bakteri gelişimlerinin olup olmadığı değerlendirildi (Ventosa *et al.*1982).

İzolatların pH toleransının belirlenmesi

Bakteri izolatları önceki başlıklarda anlatıldığı gibi katı besiyerinde canlandırıldı ve tek düşen koloni TSB besiyerine inoküle edildi. Farklı tüplere hazırlanan LB sıvı besiyerlerinin pH'ı sırasıyla 5, 7, 9 ve 11 değerlerine ayarlandı ve tüpler 121°C'de 15 dk steril edildi. İzolatların ön kültürlerinin 600 nm'de absorbansı ölçülerek mikrobiyal yoğunlukları belirlendi ve her birinden eşit mikrobiyal hacimde alınarak hazırlanan besiyerlerine inoküle edildi. 55°C'de 48 saat boyunca inkübe edilen kültürlerin spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda absorbansları ölçülerek değişen pH durumlarındaki bakteriyel gelişimler OD üzerinden analiz edildi (Ventosa *et al.*1982).

İzolatların biyokimyasal testleri

Katalaz testi

Katalaz testi ile kaplıca suyundan izole edilen bakterilerin katalaz ihtiva edip etmediği araştırılmıştır. Bu enzim, aerobik veya fakültatif mikroorganizmalarda solunum sonucu açığa çıkan hidrojen peroksitin (H_2O_2) su ve oksijene dönüşümünü katalizler. Stok bakteriler TSA besiyerine çizgi ekim yöntemiyle ekildikten sonra 55°C'de 48 saat inkübe edildi. Kültürlerden temiz lamlara öze dolusu alınarak üzerine 1 damla H_2O_2 eklendi ve reaksiyon sonucu kabarcık oluşup oluşmadığı incelendi. Enzimin katalizlediği reaksiyon sonucu oksijen gazı açığa çıktığı için kabarcık oluşumu katalaz açısından pozitif, oluşmaması ise katalaz açısından negatif olarak yorumlandı (Klement *et al.*1990).

Oksidaz testi

Bu test, bakterilerin elektron transferi için sitokrom c proteinine sahip olup olmadıklarının incelenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Solunum olayında, sitokrom c proteini elektron transferinde maddeleri birinden diğerine indirgeyerek ATP oluşumunu gerçekleştirmektedir. Analiz için %1 tetramethyl-p-phenyldiamine dihydrochloride ihtiva eden stripler kullanıldı. -80°C'de stoğa alınan bakteriler çizgi ekim yöntemiyle TSA besiyerine ekilerek 55°C'de inkübasyona kaldırıldı. 1-2 günlük bakteriden bir öze dolusu alınarak striplerin ucuna uygulandı ve renk oluşumları incelendi. Eğer bakteride sitokrom c varsa substratı ile reaksiyona girecek ve mavi-mor renk oluşumuna neden olacaktır. Böyle bir renk oluşumu oksidaz pozitif olarak yorumlandı. Eğer analiz sırasında bir renk dönüşümü gözlenmez

ise durum oksidaz negatif olarak değerlendirildi (Klement *et al.* 1990; Saygılı 1995; Narayanasamy 1997).

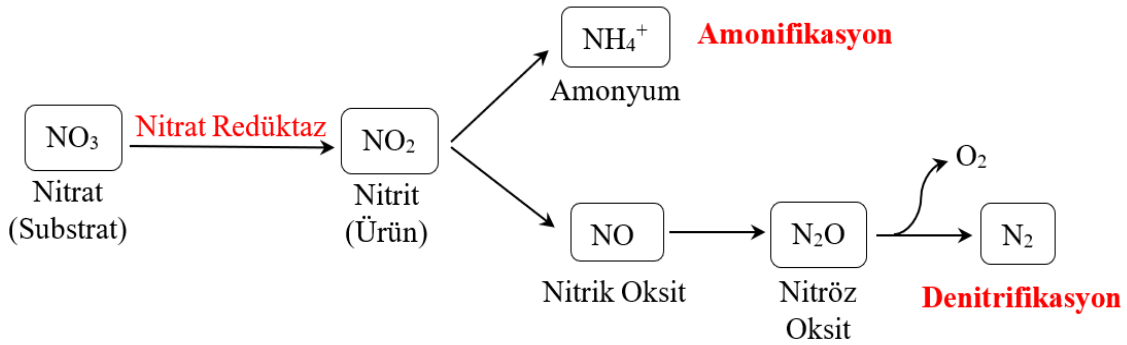
Nitrat redüksiyon testi

Nitrat redüksiyon testi iki farklı metoda göre gerçekleştirilmiştir. Birinci yöntem, KNO₃ içeren katı besiyeri hazırlanarak bakteri gelişimi üzerinden değerlendirilirken (Klement *et al.* 1990), ikinci yöntem ise KNO₃ içeren sıvı besiyerine yerleştirilen durham tüpü ve inkübasyon sonrası nitrit reaktifi olarak kullanılan Griess-Illosvay'in kültür ortamına eklenmesiyle gerçekleştirilmiştir (Harley and Prescott 2002).

Oksijen varlığında obligat aerob bakteriler nitratı, nitrit'e indirgemektedir. Birinci metod için besiyeri olarak; 5g NaCl, 2g KNO₃, 10g pepton ve 3g agar kaynatılıp 1 litre dH₂O ile çözdürülerek pH'ı 7'ye ayarlandı. Otoklavda 121°C'de 15 dk sterilizasyon işlemi gerçekleştirildikten sonra 3 ml alınarak 10 ml'lik steril tüplere aktarıldı. Besiyerleri donduktan sonra bakteri izolatlarının her biri ayrı ayrı hazırlanan tüplere iğne uçlu öze kullanılarak batırma yöntemi ile ekildi ve üzerleri otoklavlandıktan sonra sıcaklığı 50°C'ye inen %3'lük agar ile kapatıldı. Bu işlemlerin ardından, kontaminasyonun önlenmesi amacıyla tüplerin ağızları pamuk tıkaçla kapatıldı. 55°C'de 2 gece boyunca inkübasyona bırakılarak ortamdaki bakteri gelişimi incelendi. Bakteri gelişimi nitrat pozitif olarak değerlendirilirken, gelişmemesi nitrat negatif olarak yorumlandı. Ayrıca, nitrat pozitif bakteri tespit edilmesi durumunda, bakterinin gelişim gösterdiği katman incelenerek fakültatif anaerob ya da fakültatif aerob şeklinde gruplandırıldı (Klement *et al.* 1990).

İkinci metod için %2 pepton, %0,5 maya ekstraktı, %3 NaCl ve %0,2 KNO₃ içeren sıvı besiyeri hazırlandı ve pH'ı 7'ye ayarlandı, deney tüplerine belli hacimlerde aktararak içerisine durham tüpü yerleştirildi. 121°C'de 15 dakika steril edilerek soğuması için beklendi. Stoğa alınan bakteriler TSA besiyerine çizgi ekim yöntemi ile tek koloni elde edilecek şekilde ekildi ve 55°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Steril edilen nitratlı besiyerine izolatlar inoküle edilerek uygun sıcaklıkta 1 gece çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası örneklerin üzerine Griess-Illosvay ayırıcından 500 µl eklendikten sonra hafifçe çalkalandı. Bir iki dakika içinde kırmızı-pembe rengin meydana gelmesi nitratların nitritlere kadar redükte olduğunu ifade ettiği için pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi. Renk dönüşümünün gözlenmemesi durumunda tüplerin içerisine çok az miktarda (15-20 mg) çinko tozu eklendi ve hafifçe çalkalanarak bir süre bekletildi. Çinko ilavesi sonrası kırmızı-pembe renk gözlenmesi nitrat redüktaz negatif olarak değerlendirildi. Renk oluşumunun görülmemesi tam redüksiyonun gerçekleştiği (nitratların nitritlerden de sonraki moleküllere redükte olduğu) anlamına geldiği için pozitif reaksiyon olarak yorumlandı. Ayrıca nitrat redüktaz açısından

pozitif olarak değerlendirilen örneklerde bulunan durham tüplerinin gaz durumu incelendi. Gaz çıkışının olduğu tüpler Denitrifikasyon pozitif, gaz çıkışının olmadığı tüpler ise Amonifikasyon pozitif olarak değerlendirildi (Şekil 4) (Harley and Prescott 2002).



Şekil 4. Amonifikasyon ve denitrifikasyon reaksiyonları

Eskülin hidroliz testi

Bir glikozid olan eskülin, eskülinaz (β -glikosidaz) aracılığıyla hidrolize uğrar. Bu enzim, hücresel sinyalleme, yapısal ve depo polisakkaritlerinin biyosentezi-bozunumu ve konak-patojen etkileşimleri gibi çeşitli biyolojik aktivitelerde önemli bir rol oynar. β -glikosidazlar; hayvanlar, bitkiler, mantarlar, mayalar ve bakteriler arasında yaygın olarak bulunmaktadır (Kara *et al.* 2011; Tamaki *et al.* 2016; Seidel and Lee, 2020). Su örneğinden izole edilen bakterilerin β -glikosidaz üretimi açısından testi için Eskülin agar besiyeri kullanıldı.

Hazır besiyeri uygun konsantrasyonda hazırlandıktan sonra test tüplerine dökülerek 121°C’de 15 dk steril edildi. Sterilizasyon sonrası düz zeminde dik konumda tüplerin donması beklendi. Su örneğinden izole edilerek stokları alınan bakteriler katı besiyerine ekilerek 55°C’de 24 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası petrilerde tek düşen bakteri kolonileri önceden hazırlanmış olan eskülin agarlı tüplere iğne uçlu öze ile inoküle edildi. Ekim yapılmayan bir tüp kontrol olarak ayrıldı ve tüplerin hepsi 24-48 saat inkübasyona kaldırıldı. İnkübasyon sonrası kontrol tüpüne kıyasla bakteri kolonilerinin etrafında siyah-kahverengi renk oluşumu eskülinin bakteriyel enzim aracılığıyla hidrolize uğradığını ve test sonucunun pozitif olduğunu göstermektedir. Renk dönüşümünün olduğu tüpler pozitif, renk dönüşümü olmayan tüpler ise negatif olarak değerlendirildi (Chuard and Reller 1998).

Karbonhidrat fermantasyonu ile asit üretimi testi

Bakteri izolatlarının karbonhidrat fermantasyonu sonucu asit üretim potansiyelleri incelenmiştir. Bunun için kullanılan besiyeri içeriği; Pepton 2, NaCl 5, K₂HPO₄ 0,3, Bromtimol mavisi 0,03, Karbonhidrat 10 ve Agar 8 g/l şeklindedir (Winn 2006). Farklı karbonhidratlar

(Inositol, D-Mannoz ve L-Arabinoz) belirtilen miktarlarda besiyeri içerisine eklendi ve pH 7.2'ye ayarlandı, tüplere 5'er ml aktararak otoklavda steril edildi. Stoktan canlandırılan bakterilerin hazırlanan besiyerlerine iğne uçlu öze kullanılarak batırma tekniği ile ekimi yapıldı. Örnek tüpleri kontrol tüpleri ile birlikte 55°C'de 3-4 gün inkübasyona kaldırıldı. İnkübasyon sonrası kontrol tüpü ile kıyaslanarak bakteri gelişimine bağlı besiyerindeki renk değişimleri incelendi ve bakterilerin karbonhidrat fermantasyonuna bağlı asit üretimi sonuçları değerlendirildi (Barrow and Feltham 1993).

β-galaktosidaz testi

İzolatların β-galaktosidaz üretiminin testi için LB agar besiyeri üzerine 40'ar µl X-Gal ve IPTG aktarıldı ve besiyeri yüzeyine yayılarak kuruması için bekletildi. Canlandırılan bakteri izolatlarından tek düşen koloniler alınarak hazırlanan katı besiyerlerine çizgi ekimi yapıldı ve inkübasyona kaldırıldı (Gheytañchi *et al.* 2010; Vasudha *et al.* 2023). İnkübasyon sonrası β-galaktosidaz geni içeren bakteriler IPTG indüklemesi sonucu enzim salınımını gerçekleştirecek ve X-Gal sayesinde mavi koloniler oluşturacaktır. İnkübasyon sonrası mavi koloni oluşturan bakteriler β-galaktosidaz pozitif, renk dönüşümü gözlenmeyen koloniler oluşturan bakteriler ise β-galaktosidaz negatif olarak değerlendirildi.

M9-Nişasta agar petri yöntemi ile bakterilerde amilaz varlığının test edilmesi

Bakteri izolatlarında amilaz varlığını belirlemek için nişasta hidrolizi testi uygulandı. Bu test için M9-Nişasta agar (Shibuya *et al.* 1986) besiyeri kullanılmıştır. İzole edilen bakterilerin stokları TSA besiyerine ekilerek 55°C'de 24 saat inkübasyona kaldırıldı. Canlandırılan izolatların ön kültürleri için tek düşen kolonileri TSB besiyerine inoküle edilerek 55°C'de 120 rpm'de 24 saat çalkalayıcıda inkübe edildi. M9-Nişasta agar petrisine 6 mm çapındaki kuyular açıldı. İzolatların ön kültürlerinden 50'şer µl alınıp açılan kuyulara eklendi ve nişasta petrilere 55°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası petrilere %1 iyot solüsyonu yüzeyi kapatacak şekilde eklenip 10 dakika bekletildi. Yüzeydeki fazla iyot solüsyonu uzaklaştırılarak bakteri gelişimine bağlı kuyu etrafında oluşan hidrolizat zonları incelendi (Priyadarshini and Ray 2019). Nişasta varlığında koyu lacivert renge dönen Lugol solüsyonu sayesinde bakterilerin inoküle edildiği kuyu etrafında renk dönüşümünün olmadığı izolatlar amilaz pozitif, renk dönüşümünün olduğu izolatlar ise amilaz negatif olarak belirlendi. Amilaz pozitif olan izolatlar tespit edilerek en yüksek hidrolizat zon çapına sahip bakteri belirlendi ve amilaz aktivitenin belirlenmesi amacıyla sonraki çalışmalarda enzim kaynağı olarak kullanılmak üzere not edildi.

Amilaz pozitif izolatın sıvı besiyerinde geliştirilmesi ile ham enzim kaynağının üretilmesi ve amilaz aktivitenin tayin edilmesi

İzolatın sıvı besiyerinde geliştirilmesi ile ham enzim kaynağının üretilmesi

İzolatın, steril TSB besiyerinde 55°C’de 120 rpm’de 24 saat çalkalayıcıda inkübasyonu gerçekleştirilerek ön kültürleri elde edildi. Amilazın üretimi için indüklenmiş sıvı besiyeri (Annamalai *et al.* 2011; Dutta *et al.* 2017; Priyadarshini and Ray 2019) 100 ml’lik erlenlerde uygun hacimde hazırlanarak pH 7’ye ayarlandı ve otoklavda 121°C’de 15 dk steril edildi. 24 saatin sonunda bakteri ön kültürünün OD’si spektrofotometrede 600 nm’de ölçülerek uygun miktarda indüklenmiş besiyerine ekildi. Ardından hazırlanan besiyeri 55°C’de 120 rpm’de 24 saat çalkalayıcıda inkübe edildi (Annamalai *et al.* 2011). İnkübasyon sonrası, kültürden homojen şekilde 10 ml alındı ve 12000 g’de 15 dakika 4°C’de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant ile elde edilen ham enzim kaynağı yeni tüpe aktarıldı ve amilaz aktivite protokolü uygulanarak EÜ/ml biriminden aktivite hesaplaması yapıldı.

DNS yöntemi ile amilaz aktivite tayini

Amilaz aktivitesi, Miller (1959) tarafından geliştirilen metodun modifiye edilmesi ile gerçekleştirilmiştir (Miller 1959). Spektrofotometrik analizde kör olarak, 100 µl substrat (fosfat tamponu ile hazırlanan %1 nişasta çözeltisi) ve 600 µl (50 mM-pH:7) fosfat tamponu; kontrol tüpü olarak 70 µl enzim ve 630 µl fosfat tamponu, kontrol tüpünün körü olarak 700 µl fosfat tamponu kullanıldı. Örnek tüpü olarak da 3 ayrı tüpe 70 µl enzim (kültür sıvısı), 100 µl substrat ve 530 µl fosfat tamponu eklendi (Tablo 6). Hazırlanan bütün tüpler 55°C’de 20 dakika inkübasyona bırakıldı, ardından tüplerin üzerine toplam hacim kadar (700 µl) DNS çözeltisi eklenerek vortekslendi ve indirgen şeker miktarının belirlenmesini sağlayacak renk oluşumu için 10 dakika kaynatıldı. Soğumaya bırakılarak oda sıcaklığına getirilen tüplerden 96’lık mikropate’e 200’er µl aktarıldı ve mikropate okuyucuda 540 nm’de absorbansları ölçüldü. Kontrol tüpü absorbansından kontrol körü absorbans değeri çıkartılarak inkübasyon sonucu oluşan indirgen şekerlerden kaynaklı absorbans sıfırlandı. Sadece substrat ve tampon çözeltiyi içeren kör tüpünün absorbans değeri örnek absorbansından çıkartılarak kültür sıvısından kaynaklı absorbans elde edildi ve bu değerden de son olarak kontrol tüpü ve kontrol körünün farkı çıkartılarak sadece 20 dakikalık enzimatik reaksiyon sırasında gerçekleşen enzim aktivitesinden kaynaklı absorbans değerine ulaşıldı.

Bir enzim ünitesi, dakikada 1 µmol maltoza eşdeğer miktarda indirgen şeker açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Miller 1959). EÜ/ml cinsinden enzim aktivitesine ulaşabilmek için maltoz çözeltisi hazırlanarak standart eğri oluşturuldu. Standart eğrinin denklemi enzim ünitesi biriminin eldesi için kullanıldı. Amilaz testi ile seçilen en yüksek amilaz

pozitif izolatın enzim aktivitesini artırmak için moleküler tür tespiti basamağından sonra kültür optimizasyonu deneylerine geçildi.

Tablo 6. DNS Yöntemi ile Amilaz Aktivite için Hazırlanan Tüpler ve Reaksiyon Koşulları

Çalışma Tüpleri Eklenen Bileşenler	Kontrol Körü	Kontrol	Substrat Körü	Örnek Tüpü
% 1'lik nişasta	-	-	100 µl	100 µl
Enzim (Kültür sıvısı)	-	70 µl	-	70 µl
Fosfat tamponu	700 µl	630 µl	600 µl	530 µl
<i>20 dakika 55°C'de bekletme</i>				
DNS	700 µl	700 µl	700 µl	700 µl
<i>Reaksiyonu durdurmak ve renk dönüşümünün sağlamak için 10 dakika kaynatma</i>				

Maltoz çözeltisi ile standart eğrinin oluşturulması

1 mg/ml maltoz çözeltisi hazırlandı ve Tablo 7'de verilen şekilde seyreltme yapılarak DNS aktivite ölçümüne paralel şekilde absorbanları ölçüldü.

Tablo 7. Standart Eğri Eldesi için Hazırlanan Maltoz Standart Çözeltileri

	Kör	1.Tüp	2.Tüp	3.Tüp	4.Tüp	5.Tüp	6.Tüp	7.Tüp	8.Tüp
Maltoz (1 mg/ml)	-	50	100	200	300	400	500	600	700
dH₂O (µl)	700	650	600	500	400	300	200	100	-
DNS (µl)	700	700	700	700	700	700	700	700	700

İzolatlarının moleküler analizi ile tür tespitinin gerçekleştirilmesi

Bakteriden genomik DNA izolasyonu

En yüksek amilaz aktiviteye sahip bakterinin -80°C'deki stoğu TSA besiyerine ekilerek 55°C'de inkübasyona bırakıldı ve böylece bakteri canlandırıldı. Ardından petride gelişen tek bakteri kolonisi TSB sıvı besiyerine ekilerek 55°C'de çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Ön kültürü hazırlanan bakteriden genomik DNA izolasyonu için Genomic DNA purification kit protokolü uygulandı (Taşer 2019).

Bakteri ön kültüründen 2 ml eppendorf tüpe alınarak 10000 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve tüpte kalan hücre pelletinin üzerine 480 µl EDTA (50 mM-pH:8) eklenip pipetaj yapılarak karıştırıldı. Üzerine 120 µl lizozim (10 mg/ml) eklenip karıştırılarak 1 saat 30°C'de bekletildi. 13000 rpm'de 2 dk santrifüjlendikten sonra üst faz atılarak, pellet üzerine 600 µl Nükleer Lizis Solüsyonu eklenip karıştırıldı. Ardından 80°C'de 5 dk bekletildi ve oda sıcaklığına gelinceye kadar soğuması beklendi. Soğuyan numunenin

üzerine 3 µl RNase A eklenerek tüpler ters düz edildi ve 30 dk boyunca 37°C’de bekletildi. Soğuması için örnekler oda sıcaklığında bekletildi ve üzerlerine 200 µl Protein Presipitasyon solüsyonundan eklenip 20 saniye boyunca vortekslendi ve 5 dk buz üzerinde bekletildi, ardından 13000 rpm’de 30 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst faz 600 µl izopropanol içeren yeni tüplere eklendi ve çökelti oluşuncaya kadar tüpler ters düz edildi. Oluşan çökeltinin ayrılması için tüpler 2 dk süreyle 13000 rpm’de santrifüj edildi ve üst faz atıldı. Tüplere %70’lik etanolden 600 µl eklenip ters düz edilerek aynı süre ve rpm’de tekrar santrifüj edildi. Tüplerdeki süpernatant dikkatlice atılarak kalan etanolün tamamen buharlaşması için 37°C’de 20 dk boyunca bekletildi. Son olarak mikrosantrifüj tüplerinin üzerine DNA Rehidrasyon Solüsyonundan 100 µl eklendi ve 65°C’de 1 saat inkübe edildi. İçlerinde genomik DNA’nın bulunduğu tüpler kullanılıncaya kadar 4°C’de saklandı.

16S rRNA gen bölgesinin PCR ile amplifikasyonu

Tüm izolatların tür tespitinde ihtiyaç duyulan filogenetik bilgiye ulaşabilmek için 16S ribozomal RNA gen bölgesinin PCR ile çoğaltılması amacıyla izole edilen genomik DNA’nın evrensel primerler kullanılarak PCR’ının yapılması amaçlanmıştır. Tablo 8’de verilen reaktiflerin miktarlarına göre PCR karışımı hazırlandı ve yine aynı tabloda verilen PCR protokolüne uygun olarak 16S rRNA gen bölgesinin amplifikasyonu gerçekleştirildi.

Tablo 8. 16S rRNA PCR Analizi için Hazırlanacak Reaksiyon Karışımı ve PCR Protokolü

Reaksiyon Karışımı		16S rRNA PCR Protokolü			
Reaktif	Miktar (µl)	İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Döngü Sayısı
ddH ₂ O	17,9	Ön Denatürasyon	94	2	1
DMSO	3	Denatürasyon	94	1	36
PCR Buffer	3,6	Bağlanma	53	1	36
MgCl ₂	2,2	Uzama	72	2	36
dNTP	0,6	Son Uzama	72	5	1
Primer 1	0,9	Saklama	4	∞	-
Primer 2	0,9				
Kalıp DNA	0,6				
Taq DNA Pol.	0,3				
Toplam Hacim	30				

16S rRNA PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

PCR işleminin ardından %1’lik agaroz jel hazırlandı ve 3-4 dk mikrodalgada kaynatıldı. Kaynatma sonrası çeker ocağa alınan jelin sıcaklığının yaklaşık 50°C’ye inmesi beklendi ve üzerine 2,5 µl etidyum bromür eklenerek tarakların yerleştirildiği elektroforez kasetine döküldü. Jelin tamamen donması beklendikten sonra taraklar dikkatlice çıkartıldı ve jel kaseti elektroforez tankına yerleştirilerek uygun seviyeye kadar 1XTAE tamponu eklendi. Jel üzerinde oluşturulan kuyucukların ilkine 4 µl 10 kb’lık DNA markırı eklendi. PCR ürünlerinin

her birinden 5'er µl alınarak 1 µl 6X yükleme tamponu ile karıştırılıp sırasıyla diğer jel kuyucuklarına yüklendi. 100 volta ayarlanan elektroforez düzeneğinde DNA fragmentleri 1 saat yürütüldü. Yürütme işlemi sona erdikten sonra jeldeki PCR ürünlerinin bant görüntülerini incelemek için jel görüntüleme sistemi (Quantum Vilber Lourmat) aracılığıyla bilgisayar ortamında analiz edildi.

Klonlama

Kompetent hücrenin hazırlanması

16S rRNA PCR ürünlerinin bakteri hücrelerine transformasyonu ile klonlanabilmesi için öncelikle *Escherichia coli* JM101 suşlarının rekombinant vektörü hücre içerisine alabilecek hale getirilmesi gerekmektedir. *E. coli* bakterisinin stok kültürü katı besiyerine çizgi ekim yöntemiyle ekilerek canlandırıldı, ardından gelişen tek koloni LB broth besiyerine aktarılacak şekilde 37°C'de 1 gece inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kültürden 300 µl alınarak 2700 µl distile su ile seyreltildi ve 600 nm dalga boyunda spektrofotometreden absorbans ölçümü yapıldı. $(30 \times 0,1) / (A_{600} \times 10)$ eşitliği ile kültür sıvısından alınacak miktar hesaplandı. 30 ml LB besiyerine hesaplanan miktar kadar kültür ortamından eklendi ve 600 nm'deki OD değeri 0,4-0,5 aralığında elde edilinceye kadar 37°C'de yaklaşık 60 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası 4400 rpm'de 4°C'de 10 dk santrifüj edildi ve üst faz atılarak tüp dibinde kalan pelletin üzerine buzdolabında bekletilmiş CaCl₂'den (100 mM) 10 ml eklendi. Çok yavaşça vurularak tüpün dibindeki pelletin çözünmesi sağlandı ve ardından tüp 30 dk buzda bekletildi. Bekleme süresinin ardından tüp 4400 rpm'de 4°C'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst faz dikkatlice atılarak pellet üzerine 2 ml 100 mM CaCl₂ çözeltisi eklendi. Tüpün dibindeki bakteri çökeltisinin çözünebilmesi için yavaşça karıştırıldı ve hazırlanan kompetent bakteri solüsyonu buzdolabında 1 gece beklendi.

Ligasyon ve transformasyon işlemi

16S rRNA PCR ürünlerinin klonlama vektörü ile ligasyonu için pGEM-T Easy klonlama kiti firmanın belirlediği uygun konsantrasyonlarda (Tablo 9) ve sürede muamele edildi. Belirtilen ligasyon kimyasalları 0,2 ml'lik tüplerde bir araya getirilerek 16°C'de 13-15 saat inkübasyona bırakıldı ve süre sonunda 4°C'de saklandı.

Tablo 9. Ligasyon İşleminde Kullanılan Kimyasallar ve Uygulama Miktarları

Kimyasallar	Miktar (µl)
2X Ligasyon buffer	5
PCR ürünü	3
Vektör	1
T4 DNA ligaz	1

Hazır hale getirilen klonlama vektörlerinin kompetent *E. coli* JM101 suşlarına transformasyonu için 1 gece önceden hazırlanan bakteri hücreleri steril eppendorf tüplere 200 µl hacimde aktarıldı. Ardından bakteri hücrelerinin üzerine 5 µl ligasyon ürünlerinden eklenerek buzda 30 dk bekletildi. Bakteri hücrelerinin ısı şokuna maruz bırakılması amacıyla buzdan alınan örnekler 42°C'deki su banyosunda 2 dk bekletildi. Süre sonunda eppendorfların üzerine 900 µl LB broth besiyeri eklendi ve 37°C'de 100 dk inkübe edildi. Bekleme süresi sırasında oda sıcaklığındaki amfisilinli katı besiyerine 40'ar µl IPTG ve X-Gal eklenerek petri yüzeyine yayıldı. Bir süre yüzeyin kuruması için beklenen petrilerin ortasına inkübe edilmiş kompetent hücre karışımından 100 µl eklenerek drigalski özesiyle besiyeri yüzeyine yayıldı. Daha sonra hazırlanan petriler 37°C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı. PCR ürünlerini içeren vektörleri alan bakteri hücrelerinin seçimi için petriler buzdolabında 1 gece bekletildi. Amfisilin nedeniyle vektörü içerisine alamayan bakterilerin gelişimi baskılanırken, vektörü alan bakteriler ise antibiyotik direnç geni sayesinde gelişerek kolonilerini oluşturacaktır. Mavi koloniler vektör içerisine geni alamayan, dolayısıyla Lac gen bölgesi bozulmayan bakterileri kapsamaktadır. PCR gen bölgesinin vektör içerisine entegre olabildiği bakteriler ise beyaz koloni oluşturacaktır. Fakat yanlış pozitif sonuçları elemek ve doğru entegre olmuş rekombinant plazmide ulaşabilmek için beyaz koloniler içerisinde seçim yapılması gerekmektedir. İnkübasyon sonrası gelişen mavi ve beyaz kolonilerden beyaz olan koloniler seçilerek işaretlendi ve steril edilmiş pipet uçları ile dikkatlice alınarak 3 ml LB broth (amfisilinli) içeren tüplere aktarılıp 37°C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı.

Koloni PCR

Bir önceki basamakta inkübasyona kaldırılan kültürlerin her birinden 4 µl alınarak içerisinde 16 µl steril saf su bulunan etiketli tüplere aktarıldı. Isı şoku amacıyla tüpler önce su banyosunda kaynatılıp, ardından buz üzerinde 2 dk bekletildi. Bu sayede bakterilerin plazmidlerini dışarıya bırakması sağlandı. 12000 rpm'de 5 dk santrifüjlenen örneklerde üst faz yeni tüplere alınarak PCR işlemi uygulandı. Koloni PCR için Tablo 10'da verilen reaksiyon karışımı hazırlanarak belirtilen süre ve sıcaklıklarda PCR gerçekleştirildi.

Tablo 10. Koloni PCR için Hazırlanacak Reaksiyon Karışımı ve PCR Protokolü

Reaksiyon karışımı		Koloni PCR protokolü			
Bileşenler	Miktar (µl)	İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Tampon (MgCl ₂ 'li)	3	Ön Denatürasyon	94	30 sn	1
dNTP mix	0,6	Denatürasyon	94	30 sn	36
MgCl ₂ (25 mM)	1,8	Bağlanma	57	30 sn	36
ddH ₂ O	16,1	Uzama	72	2 dk	36
DMSO	1,2	Son Uzama	72	10 dk	1
T7 Primer	2	Saklama	4	∞	-
SP6 Primer	2				
Taq DNA Polimeraz	0,3				
Süpernatant	3				

(T7 Primer: 5'-AATACGACTCACTATAG-3', SP6 Primer: 5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3')

PCR'ın ardından %1'lik agaroz jel hazırlandı, jel kuyucuklarına DNA markırı, hedef geni içeren pozitif kontrol, hedef geni içermeyen negatif kontrol ile koloni PCR sonucu elde edilen amplifiye ürünler sırasıyla yüklendi. Ardından 100 volta ayarlanan elektroforez düzeneğinde 1 saat yürütüldü ve süre sonunda jel görüntüleme sistemi ile jeldeki bantlar bilgisayar ortamında incelendi. İstenen aralıkta bant veren örnekler seçilerek amfisilinli LB besiyerine belirlenen kolonilerden ekim yapıldı ve inkübasyona bırakıldı.

Plazmid izolasyonu

İnkübasyon sonunda amfisilinli LB besiyerinde gelişen bakteriden plazmit izolasyonu gerçekleştirildi. Örnekler 11000 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra üst faz atıldı ve tüp dibindeki pelletten plazmit izole edildi. Bu amaçla Plazmid izolasyon kiti kullanıldı ve firma tarafından belirtilen protokol uygulandı (Taşer 2019). Santrifüj sonrası elde edilen pellet üzerine 250 µl Cell Lysis Solution eklenip tüpler ters düz edilerek oda sıcaklığında 5 dk bekletildi. 10 µl Alkaline Protease Solüsyonu eklenip tekrar oda sıcaklığında 5 dk beklendi, daha sonra üzerine 350 µl Nötralizasyon çözeltisinden eklenip 13000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Üst fazdan 650-750 µl alınarak kolonlu eppendorf tüpüne aktarılıp 13000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Eppendorfdaki kolon üzerine 250 µl Wash Solution eklenerek tekrar 13000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi ve tüp altında toplanan sıvı uzaklaştırılarak yeniden 13000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Ardından kolon yeni bir eppendorf tüpe alınarak kolon üzerine 100 µl Nuclease-Free Water eklenip 13000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Kolon uzaklaştırılarak tüpler -20°C'de kullanılıncaya kadar saklandı.

Plazmit konsantrasyonlarının ölçülmesi ve ayarlanması

Spektrofotometrede 260 nm dalga boyunda 998 µl saf su ve 2 µl plazmit karışımının absorbansı ölçüldü. $A_{260} \times 50$ (sabit değer) $\times 500$ (seyreltme oranı) eşitliğine göre plazmit konsantrasyonu 100-200 ng olacak şekilde ayarlandı. Hesaplama sonucu uygun

konsantrasyondaki türlerden 30-50 µl alınarak MacroGen firmasına sekans analizi için gönderildi.

Sekans sonucuna göre tür tespiti

Elde edilen sekans sonuçları BioEdit ile analiz edildi ve diziler FASTA formatına çevrildi. Doğru sonuca gidebilmek için sekans dizisi içerisinde yer alan primerler ve vektöre ait kısımlar çıkartılarak diziler birleştirildi. Geriye kalan sekans dizisinin, NCBI BLAST veri tabanı aracılığıyla bu zamana kadar tanımlanmış bakteri türlerinin 16S rRNA sekans dizileri ile homoloji oranlarına bakılarak sıcak su örneğinden izole edilen bakterilerin tür tespiti gerçekleştirildi.

Amilaz üretimi için optimal kültür parametrelerinin belirlenmesi

Optimum pH değerinin belirlenmesi

Değişen pH değerinin bakteriyel gelişime bağlı olarak enzim aktivitesi üzerine etkisini inceleyebilmek için öncelikle seçilen izolatın ön kültürü hazırlandı. Bunun için -80°C'de stoğa alınan izolatın TSA besiyerine çizgi ekimi yapıldı ve 55°C'de 24 saat inkübasyona alındı. Gelişen kültürde tek düşen koloniden steril öze ile alınarak TSB besiyerine ekimi yapıldı ve 55°C'de 120 rpm'de 24 saat çalkalayıcıda inkübe edildi. 7 ayrı erlende (250 ml'lik) 100 mL besiyeri hazırlanarak her besiyerinin pH'sı sırasıyla 4,5,6,7,8,9 ve 10'a ayarlandı, 121°C'de 15 dk otoklavda steril edildi. 24 saatlik inkübasyon sonrası bakteri ön kültürünün spektrofotometrede 600 nm'de OD değeri ölçülerek 1,0 absorbans değerine ayarlandı (Diğer parametrelerin optimizasyon aşamalarında da ön kültürün absorbansı bu değere ayarlanmıştır) Steril edilmiş nişasta içeren besiyerlerine bakteri ön kültüründen %2 hacimde inoküle edildi ve inokülasyonun ardından erlenler 55°C'de 120 rpm'de 24 saat boyunca çalkalayıcıda inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, her bir pH değerinde bakteriyel gelişimin ortaya koyulabilmesi için 600 nm'de OD bakıldı. Kültür sıvısından homojen şekilde 10 ml alınarak 12000 g'de 15 dakika 4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant ile elde edilen ham enzim kaynağından DNS yöntemi ile amilaz aktivite tayini yapıldı. Sonuçlara göre izolatın amilaz aktivitesi EÜ/ml olarak hesaplandı ve değişen pH değerlerine karşı elde edilen enzim aktiviteleri ile birlikte OD değerlerinin grafiği çizildi. En yüksek aktivitenin görüldüğü değer optimum pH olarak belirlendi ve sonraki basamaklarda belirlenen bu optimum pH değeri ile çalışıldı.

Optimum substrat konsantrasyonunun belirlenmesi

Değişen nişasta konsantrasyonunun bakteri gelişimine bağlı olarak enzim aktivitesi üzerine etkisini incelenmek için 7 ayrı erlende sırasıyla % 0,1, % 0,5, % 1, % 1,5, % 2, % 2,5

ve % 3 nişasta konsantrasyonlarında sıvı besiyerleri hazırlandı. Her bir besiyeri optimal pH değerine ayarlanarak otoklavda 121°C'de 15 dk steril edildi. Optimum pH değerinin belirlenmesi başlığında anlatıldığı şekilde izolatın ön kültürü hazırlandı. Hazırlanan 24 saatlik ön kültür %2 oranında besiyerlerine inoküle edildi ve çalkalayıcıda 120 rpm'de 24 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, her bir substrat konsantrasyonunda kültürlerin 600 nm'de OD'leri ölçülerek bakteriyel yoğunlukları belirlendi. Ardından kültür sıvılarından homojen şekilde 10 ml alınarak 12000 g'de 15 dakika 4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant ile elde edilen ham enzim kaynağından amilaz aktivite tayini yapıldı, sonuçlara göre amilaz aktivitesi standart eğri denklemi kullanılarak EÜ/ml cinsinden hesaplandı. Değişen substrat konsantrasyonuna karşı enzim aktivitesi ve OD değerlerinin grafiği çizildi. En yüksek aktivitenin görüldüğü konsantrasyon optimum substrat konsantrasyonu olarak belirlendi ve çalışmanın sonraki basamaklarında optimum nişasta konsantrasyonu olarak kullanıldı.

Optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi

Değişen sıcaklık değerinin bakteriyel gelişime bağlı olarak enzim aktivitesi üzerine etkisini inceleyebilmek için öncelikle seçilen izolatın ön kültürü önceki başlıkta anlatıldığı şekilde hazırlandı. Üç ayrı erleninde optimum pH ve nişasta konsantrasyonu ile hazırlanan indüklenmiş sıvı besiyerleri 121°C'de 15 dk otoklavda steril edildi. Ön kültürün spektrofotometrede 600 nm'de absorbansı ölçülerek OD'si belirlendi. Eşit mikrobiyal hacmi elde edebilmek için bir önceki başlıklarda kullanılan OD değeri referans alınarak mikrobiyal hacim belirlendi ve bu değere göre besiyerlerine inoküle edilerek 25°C, 35°C, 45°C, 55°C ve 65°C'lerde ayrı ayrı inkübasyona alındı. İnkübasyon sonrası kültür sıvılarından homojen şekilde 10 ml alınarak 12000 g'de 15 dakika 4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant ham enzim kaynağı olarak kullanıldı ve amilaz aktivitesi DNS yöntemi ile belirlendikten sonra standart eğri denkleminde faydalanılarak aktivite EÜ/ml cinsinden hesaplandı. Ayrıca farklı sıcaklıklardaki bakteri gelişiminin incelenmesi için 600 nm'de OD ölçüldü ve değişen sıcaklıklara karşı enzim aktivitesi ile beraber grafiği çizildi. En yüksek aktivitenin görüldüğü sıcaklık değeri optimum sıcaklık olarak belirlendi ve sonraki basamaklarda bu değer ile çalışıldı.

Optimum inkübasyon süresinin belirlenmesi

Optimum pH ve optimum substrat konsantrasyonunu içeren indüklenmiş besiyeri hazırlanarak otoklavda 121°C'de 15 dk steril edildi. Önceki başlıklarda anlatıldığı şekilde hazırlanan izolatın 24 saatlik ön kültüründen 600 nm'de OD ölçüldü ve önceki parametreler için uygulanan mikrobiyal hacme uygun olarak besiyerine inoküle edildi. Optimum sıcaklığa

ayarlanan çalkalayıcıda 120 rpm’de inkübe edildi. İndüklenmiş besiyerinde bakteri gelişimine bağlı olarak zamanla meydana gelen enzim aktivitesindeki değişimi incelemek için sırasıyla 6., 12., 24., 36., 48., 72. ve 96. saatlerde 600 nm’de absorbans ölçümünden OD belirlendi, ayrıca belirtilen saatlerden sonra aseptik tekniğe uygun olarak kültürden homojen şekilde 10 ml alındı ve 12000 g’de 15 dakika 4°C’de santrifüj edildi. Ardından süpernatant ile elde edilen ham enzim kaynağından amilaz aktivite tayini yapıldı, sonuçlara göre amilaz aktivitesi standart eğri denkleminde faydalanılarak EÜ/ml cinsinden hesaplandı. Zamana karşı enzim aktivitesi ve bakteriyel OD grafiği çizildi ve en yüksek enzim aktivitesine göre optimum inkübasyon süresi belirlendi. Sonraki çalışmalar optimal inkübasyon süresine göre gerçekleştirildi.

Kültür sıvısından amilazın saflaştırılması

Bir önceki başlıkta belirlenen optimum değerlere göre hazırlanan indüklenmiş besiyerine ekilen izolat optimum sıcaklık değerine ayarlanan çalkalayıcıda 120 rpm’de optimum inkübasyon süresi boyunca inkübe edildi ve süre sonunda besiyerinin tamamı 12000 g’de 15 dakika 4°C’de santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant ham enzim kaynağı olarak kullanıldı ve amilaz için saflaştırma basamakları uygulandı.

Nişasta afinite tekniği ile amilaz saflaştırması

Nişasta afinite tekniği ile amilaz saflaştırması Najafi and Kembhavi (2005) tarafından geliştirilen yöntemin modifiye edilmesiyle gerçekleştirilmiştir (Najafi and Kembhavi, 2005). 100 ml ham enzim kaynağından 1 ml alınarak (A) % tutunma oranının belirlenebilmesi için buzdolabında bekletildi ve çalışmanın sonunda tüm örneklerle birlikte amilaz aktivite ölçümü için kullanıldı. 100 ml kültür sıvısı için kullanılacak olan 2 g çözünmez nişasta saflaştırma işlemine başlamadan önce aktivite ölçüm tamponu (50 mM pH:7 fosfat tamponu) ile karıştırılarak 10 dk oda sıcaklığında bekletildi. Nişasta içerisinde çözünür halde olan moleküllerin ayrışması için 10000 rpm’de 10 dk 4°C’de santrifüj edildi. Süpernatant dikkatlice atılarak nişasta pelleti 10 dk buzda bekletildi. Süre sonunda nişasta pelleti enzim kaynağı olarak kullanılan kültür sıvısı ile bir araya getirildi ve hazırlanan bu karışım buz üzerinde 1 saat boyunca karıştırıldı. Süre sonunda 10000 rpm’de 10 dk 4°C’de santrifüj edildi ve santrifüj sonrası süpernatanttan 1 ml alınarak (B) saflaştırma işlemleri sonlanana kadar amilaz aktivite ölçümü için buzdolabında saklandı. Santrifüj sonrası dikkatli bir şekilde süpernatant uzaklaştırıldı ve yıkama işlemi için pellet üzerine aktivite ölçüm tamponu eklenerek santrifüj tüpü yavaşça ters düz edildi. 5 dk buzda bekletildikten sonra 10000 rpm’de 10 dk 4°C’de santrifüjlendi. Yine süpernatanttan 1 ml alınarak aktivite ölçümü için buzdolabında saklandı. Süpernatant dikkatlice uzaklaştırılarak pellet üzerine 55°C’ye ısıtılmış 50 ml fosfat tamponu

(pH:7) ile hazırlanan %1'lik dekstrin çözeltisi eklendi ve 1 saat 55°C'ye ayarlanmış manyetik karıştırıcıda yavaş hızda karıştırıldı. Süre sonunda 10000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek süpernatant yeni tüpe aktarıldı ve tüm süpernatantlardan DNS ile amilaz aktivite ölçümü gerçekleştirildi (Şekil 5).

Ham enzim kaynağının DNS yöntemi sonucu belirlenen amilaz aktivite birimi başlangıç aktivitesi olarak kabul edildi ve saflaştırma işleminin ilk santrifüj basamağında elde edilen süpernatantın aktivite birimi ile aşağıdaki formül kullanılarak %Tutunma oranı hesaplandı (Goyal *et al.* 2005).

$$(\%) \text{ Tutunma Oranı} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

A: Başlangıç amilaz aktivitesi

B: Süpernatant amilaz aktivitesi

Nişasta afinite tekniğinde % tutunma oranının optimizasyonu

% tutunma oranı için optimum pH'nın belirlenmesi

Enzimin saflaştırma verimini arttırabilmek adına çözünmez nişasta ortamında enzim kaçağını minimuma indirebilmek için optimum pH değerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. İlk olarak inkübasyon sonrası kültür sıvısının pH'ı ölçüldü. Farklı pH değerlerini denemek için kültür sıvısı üç eşit hacimde ayrıldı ve sırasıyla pH 6, 7 ve 8'e ayarlandı. Her bir kültür sıvısından 1'er ml alınarak % tutunma oranı hesaplamasında başlangıç aktiviteleri olarak değerlendirilmesi için buzdolabında bekletildi ve çalışmanın sonunda tüm örneklerle birlikte amilaz aktivite ölçümü için kullanıldı. pH'ları ayarlanan kültür sıvıları önceki başlıkta anlatıldığı şekilde saflaştırma basamağı öncesi nişasta hazırlama işlemlerinin uygulandığı %2 çözünmez nişasta ile ayrı ayrı karıştırıldı ve buz üzerinde 1 saat yavaş hızda çalkalandı. 1 saatin sonunda örnekler 10000 rpm'de 10 dk 4°C'de santrifüj edildi ve santrifüj sonrası süpernatant yeni tüplere aktarıldı. Başlangıç enzimleri ile beraber tüm örneklerin DNS yöntemi ile amilaz aktivitesi hesaplandı. Elde edilen amilaz aktivite birimleri üzerinden Nişasta Afinite Tekniği ile Amilaz Saflaştırması başlığında belirtilen % Tutunma Oranı hesaplandı. Değişen pH değerlerine karşı %Tutunma oranı grafiği çizildi ve en yüksek yüzde değerine sahip pH, optimum tutunma pH'ı olarak belirlendi. Sonraki optimizasyon basamaklarında belirlenen optimum pH ile çalışıldı.

% tutunma oranı için optimum çözünmez nişasta konsantrasyonunun belirlenmesi

Saflaştırma adımının verimini arttırmak amacıyla optimum tutunma pH'ına ayarlanan kültür sıvısından başlangıç aktivitesi ölçümü için 1 ml eppendorf tüpe ayrılarak buzdolabına kaldırıldı. Geriye kalan kültür sıvısı eşit hacimlere bölünerek sırasıyla son konsantrasyonlar %1, %2, %3 ve %4 olacak şekilde önceki başlıkta anlatıldığı şekilde hazırlanan çözünmez nişasta ile 1 saat buz üzerinde yavaş hızda karıştırıldı. Sürenin sonunda 10000 rpm'de 10 dk 4°C'de santrifüj edildi ve süpernatantlar amilaz aktivite ölçümü için ayrıldı. Afinite öncesi ayrılan kültür sıvısının aktivitesi başlangıç aktivitesi olarak belirlendi ve % Tutunma Oranı hesaplandı. Değişen nişasta konsantrasyonuna karşı %Tutunma oranı grafiği çizildi ve en yüksek tutunma oranına sahip konsantrasyon optimum çözünmez nişasta konsantrasyonu olarak belirlendi. Sonraki basamaklarda belirlenen optimum nişasta konsantrasyonu ile çalışıldı.

% tutunma oranı için optimum tutunma süresinin belirlenmesi

Saflaştırma adımının verimini arttırmak amacıyla optimum tutunma pH'ına ayarlanan kültür sıvısından başlangıç aktivitesini belirleyebilmek için yaklaşık 5 ml ayrılarak buzdolabına kaldırıldı. Geriye kalan kültür sıvısının hacmi ölçüldükten sonra optimum çözünmez nişasta konsantrasyonu baz alınarak önceki başlıklarda anlatıldığı şekilde çözünmez nişasta hazırlandı ve kültür sıvısı ile karıştırılarak buz üzerinde yavaş hızda enzimin nişastaya tutunması sağlandı. Bu süre zarfında sırasıyla 30., 60., 90. ve 120. dk'larda bir miktar örnek alınarak 10000 rpm'de 10 dk 4°C'de santrifüj edildi ve süpernatantlar amilaz aktivite ölçümü için ayrıldı. İlk başta ayrılan kültür sıvısının aktivitesi başlangıç aktivitesi olarak kabul edildi ve tüm sürelerin sonunda elde edilen süpernatantların amilaz aktivite değerleri ile % Tutunma Oranı hesaplandı. Zamana karşı %Tutunma grafiği çizildi ve % Tutunma oranı en yüksek olan süre belirlendi ve enzim saflaştırma işlemi için kullanıldı.

Diyaliz

Nişasta afinite tekniği ile yapılan saflaştırma işlemlerinin daha yüksek verimde gerçekleştirilmesi için uygulanan %Tutunma oranı optimizasyonu ile optimal değerler belirlendi ve seçilen izolat ile amilaz sentezi için yüksek hacimde indükleyici besiyerinde inkübasyon gerçekleştirildi. Saflaştırma adımları uygulandıktan sonra elde edilen enzim çözeltisinde bulunan şeker türevlerinin giderilmesi için diyaliz işlemi yapıldı. Enzim çözeltisi diyaliz torbası içerisine koyuldu ve aktivite ölçüm tamponuna karşı diyaliz edildi (Roe 2001). İşlem sonrası diyaliz torbasındaki enzim çözeltisi yeni tüpe aktarılarak bir miktar örnek aktivite ölçümü için ayrıldı. Geriye kalan amilaz çözeltisi ise buzdolabına kaldırıldı.

Kantitatif protein tayini

Bradford yöntemi ile protein tayini

Kantitatif protein tayini Bradford (1976) metoduna göre gerçekleştirilmiştir. Bu metod için kullanılan Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası negatif yüklüdür ve proteindeki pozitif yüklere bağlanarak kırmızı formdan mavi forma (λ :595 nm) dönüşür. Standart olarak BSA kullanıldı ve bunun için 1 mg/ml BSA çözeltisinden Tablo 11’de verildiği gibi sırasıyla 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 μ l olacak şekilde etiketlenen standart tüplerine eklendi. Saf su ile tüplerin toplam hacmi 0,1 ml’ye tamamlandı. Tüplerin tamamına 4900 μ l Coomassie Brilliant Blue G-250 eklenerek düşük hızda vortekslendi.

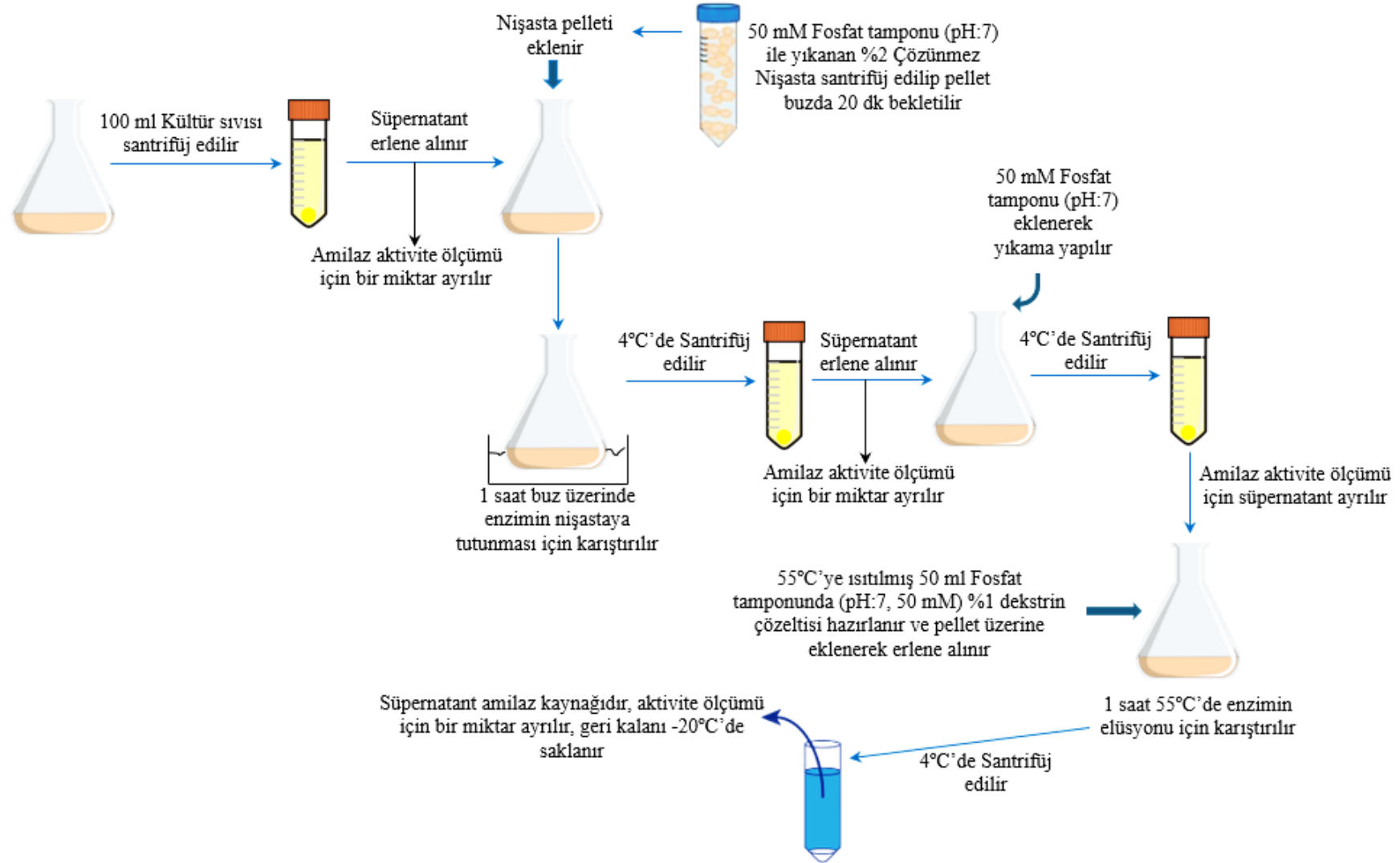
İndükleyici sıvı besiyerinde gelişen bakteriden elde edilen ham enzim kaynağı Tablo 11’deki miktarlara göre 3 tekrarlı olacak şekilde hazırlandı. En son hazırlanan tüpler düşük hızda kısa süreli vortekslendikten sonra bütün tüpler renk stabilizasyonu için 10 dk karanlıkta bekletildi. Ardından tüplerden sırasıyla 200 μ l alınarak 96’lık plate’e aktarıldı ve 595 nm’de köre karşı absorbansları ölçüldü. Elde edilen absorbans değerleri ile protein konsantrasyonuna karşı standart grafiği çizildi. Grafikten elde edilen eğri denklemine göre örnek numunenin ortalama absorbansından protein konsantrasyonuna ulaşıldı (Bradford 1976).

Tablo 11. Bradford Yöntemi ile Protein Tayini için Hazırlanan Standart Tüpler ve Örnek Tüpü

	*Kör	1.Tüp	2.Tüp	3.Tüp	4.Tüp	5.Tüp	6.Tüp	7.Tüp	8.Tüp	9. Tüp	10. Tüp	Örnek
BSA (μ l)	-	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	100
dH ₂ O (μ l)	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10	-	-
G-250 (μ l)	4900	4900	4900	4900	4900	4900	4900	4900	4900	4900	4900	4900

*

Örneğin protein içeriği ölçülürken kör olarak 0,1 ml fosfat tamponu (50 mM ve pH 7) ve 4900 μ l Coomassie Brilliant Blue’den oluşan karışım kullanılmıştır.



Şekil 5. Nişasta afinite tekniği ile amilaz saflaştırmasının şematize hali

SDS-PAGE ile enzimin alt birimlerinin molekül ağırlığının belirlenmesi

Saflaştırılan amilazın alt birim molekül ağırlığının tespiti için SDS-PAGE yapıldı. Bunun için %10 poliakrilamid jel kullanılarak Laemmli (1970)'nin yöntemine göre poliakrilamid jel elektroforezi gerçekleştirildi. SDS-PAGE için %5'lik yığma ve %10'luk ayırma jeli Tablo 12'de verilen miktarlarda hazırlanarak tanka yerleştirildi ve tank yürütme tamponuyla dolduruldu (Laemmli 1970).

Tablo 12. SDS-PAGE Bileşenleri

Bileşenler	Yığma jeli (ml)	Ayırma jeli (ml)
1,5 M Tris Tamponu (pH 8,80)	-	2,5
1,5 M Tris Tamponu (pH 6,80)	0,5	-
%30'luk akrilamid/bisakrilamid	0,67	3,3
%10'luk Amonyum persülfat	0,04	0,1
SDS (%10 w/v)	0,04	0,1
TEMED	0,004	0,004
Saf Su	2,7	4

SDS çözeltisi ile karıştırılan 40 µl enzim çözeltisi denatürasyon için kaynar su banyosunda 5 dk boyunca bekletildi ve ardından jel kuyucuklarına yüklendi. Standart protein markırları amilazların yüklendiği kuyuya paralel olarak kuyucuklara yüklendi. Yaklaşık 20 dakika 20 mA'de boyanın yığma jelinden çıkması için yürütüldü ve 1-1,5 saat 25 mA'de ise ayırma jelinin altına gelene kadar yürütüldü. Elektroforez ünitesinden çıkarılan jel gümüş boyama çözeltisi ile muamele edilerek protein bantları görünür hale getirildi (Akkemik 2012). Enzimin molekül ağırlığı, standart proteinlerin jelde kat ettikleri yol kullanılarak çizilen R_f -log M_A grafiğinden hesaplandı.

Saflaştırılan Amilazın Karakterizasyonu

Enzim için optimum pH'nın belirlenmesi

Değişen pH değerlerinin saflaştırılan amilaz aktivitesi üzerine etkisini inceleyebilmek için farklı pH değerlerine ayarlanmış tampon çözeltileri (50 mM) kullanıldı. pH 4,0-5,0 aralığında değişen asetat tamponu çözeltileri, pH 5,5-7,5 aralığında değişen fosfat tamponu çözeltileri ve pH 7,5-9,5 aralığında değişen Tris/HCl tampon çözeltileri hazırlandı ve bu tamponlar kullanılarak enzim çözeltisinde amilaz aktivite tayini yapıldı. En yüksek aktivite 100 kabul edilerek diğer sonuçlar bu değere göre kıyaslanıp % aktivite hesapları yapıldı ve değişen pH değerlerine karşı % Bağıl Aktivite grafiği çizildi. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek aktivite değerinden optimum pH belirlendi ve sonraki tüm basamaklarda tampon çözelti pH'ı olarak kullanıldı.

Enzim için optimum sıcaklığın belirlenmesi

Amilaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla optimum pH değerindeki aktivite ölçüm tamponu kullanılarak DNS yöntemi ile gerçekleştirilen amilaz aktivite reaksiyonu çeşitli sıcaklıklarda (5°C-75°C) gerçekleştirildi. En yüksek aktivite 100 kabul edilerek diğer sonuçlar bu değere göre kıyaslanıp % aktiviteleri hesaplandı ve değişen sıcaklık değerlerine karşı % Bağıl Aktivite grafiği çizildi. En yüksek aktivitenin görüldüğü sıcaklık değeri optimum sıcaklık olarak belirlendi ve sonraki basamaklarda gerçekleştirilen aktivite ölçümleri için kullanıldı.

Enzimin ısıl kararlılığının belirlenmesi

Amilazın belli sıcaklıklardaki ısıl kararlılığının belirlenmesi amacıyla, saflaştırılan amilazın depolama sıcaklığı olan 4°C’de, bakterinin en yüksek amilaz sentezini gerçekleştirdiği optimum inkübasyon sıcaklığında ve saflaştırılan enzim için belirlenen optimum sıcaklık değerinde 2 saat boyunca bekletildi. Bu süre zarfında 15., 30., 60., 90. ve 120. dakikaların sonunda enzimin belirlenen optimum fiziksel parametreleri altında aktiviteleri belirlendi. Ön işlem uygulanmamış optimum değerlerde belirlenen enzim aktivitesi referans alınarak farklı sıcaklıklarda bekletilen enzimlerin % Kalan aktiviteleri hesaplandı. Hesaplama sonrası elde edilen verilere göre zamana karşı % Kalan aktivite grafiği çizilerek enzimin ısıl kararlılığı yorumlandı.

Enzimin pH kararlılığının belirlenmesi

Saflaştırılan amilazın pH kararlılığını incelemek amacıyla, enzim çözeltisi farklı pH değerlerine ayarlanan asetat, fosfat ve Tris/HCl tamponları ile 1:1 oranında karıştırıldı. Hazırlanan reaksiyon karışımları 4°C’de 7 gün boyunca bekletildi ve her günün sonunda optimum şartlar altında hem inkübasyona bırakılan hem de işlem uygulanmamış enzim çözeltisinin aktiviteleri belirlendi. Farklı pH’larda inkübasyona bırakılmış enzim aktiviteleri, inkübe edilmemiş enzim çözeltisinin aktivite değeri ile karşılaştırılarak % Kalan aktivite değerleri hesaplandı. Hesaplama sonucu elde edilen verilere göre zamana karşı % Kalan aktivite grafiği çizildi ve enzimin pH kararlılığı yorumlandı.

Metal iyonları, deterjan, şelatör ve organik çözücülerin enzim aktivitesi üzerine etkilerinin belirlenmesi

Amilaz aktivitesi üzerine deterjan, şelatör, metal iyonlarının ve organik çözücülerin etkisini incelemek amacıyla Tablo 13’de belirtilen stok çözeltiler hazırlandı. Enzimler her bir bileşik ile ayrı ayrı 30 dakika boyunca oda sıcaklığında optimum aktivitenin gözlendiği tampon çözelti içinde inkübe edildi, ardından enzim aktivitesinin belirlenmesi için substrat ilave

edilerek aktivite tayini yapıldı. Hiçbir işlem uygulanmamış ve optimum değerler altında aktivitesi belirlenmiş enzimin değeri referans alınarak 100 kabul edildi. Diğer uygulamaların % aktivite hesapları referans aktivite ile kıyaslandı ve bileşik konsantrasyonu karşı % Bağlı Aktivite grafiği çizildi. Sonuçlara göre uygulanan bileşiklere karşı enzimin aktivitesi yorumlandı.

Enzimin K_M ve V_{Max} değerlerinin belirlenmesi

Saflaştırılan enzimin önceki adımlarda belirlenen optimum değerleri altında değişen substrat konsantrasyonları (0,014-0,21 mg/ml) ile aktiviteleri ölçüldü. Çizilen Lineweaver-Burk grafiği yardımıyla enzimin K_M sabiti ve V_{Max} değeri hesaplandı (Lineweaver and Burk 1934).

Tablo 13. Amilaz Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İnceleneceği Maddeler ve Hazırlanan Stok Konsantrasyonları

Aktivite etkenleri	Uygulanacak maddelerin stok konsantrasyonları
Metal İyonları	5 mM $CaCl_2$
	5 mM Na_2SO_3
	5 mM $ZnCl_2$
Organik Çözücüler	%10 Metanol
	% 10 Etanol
	% 10 Aseton
Deterjanlar	% 1 SDS
	% 1 Tween-80
	% 1 Triton X-100
Şelatör	5 mM EDTA

Saflaştırılan amilazın bazı endüstriyel uygulamalarda kullanılabilirliğinin araştırılması

Enzimin deterjan endüstrisinde kullanılabilirliğinin incelenmesi

Enzimin mevcut bazı deterjanlar ile kullanımının araştırılması

Saflaştırılan amilazın deterjan katkı maddesi olarak kullanılabilirliğini ortaya koymak amacıyla satın alınan farklı katı ve sıvı ticari deterjanlar D1'den D8'e kadar kodlandı (Tablo 14). Test edilecek katı deterjanların 10 mg/ml'lik, sıvı deterjanların ise %10'luk (v/v) çözeltileri hazırlandı ve bu çözeltilerin kendilerinde var olan enzim aktivitelerinin giderilmesi için 100°C'de 1 saat bekletildi. Hazırlanan ve sıcakta bekletilen bu çözeltilerde amilaz aktivitenin inhibe edildiği DNS metodu ile teyit edildi. Saflaştırılan amilazın deterjan uyumunun belirlenmesi için Hmidet *et al.* (2009) tarafından uygulanan metot kullanıldı. Hazırlanan deterjan çözeltileri saflaştırılan amilaz çözeltisi ile son konsantrasyonları 1 mg/ml (katı için) ve %1 (sıvı için) olacak şekilde karıştırıldı ve enzim karakterizasyonunda belirlenen optimal değerler altında DNS metodu ile aktiviteleri test edildi. Deterjan içermeyen kontrol grubundan

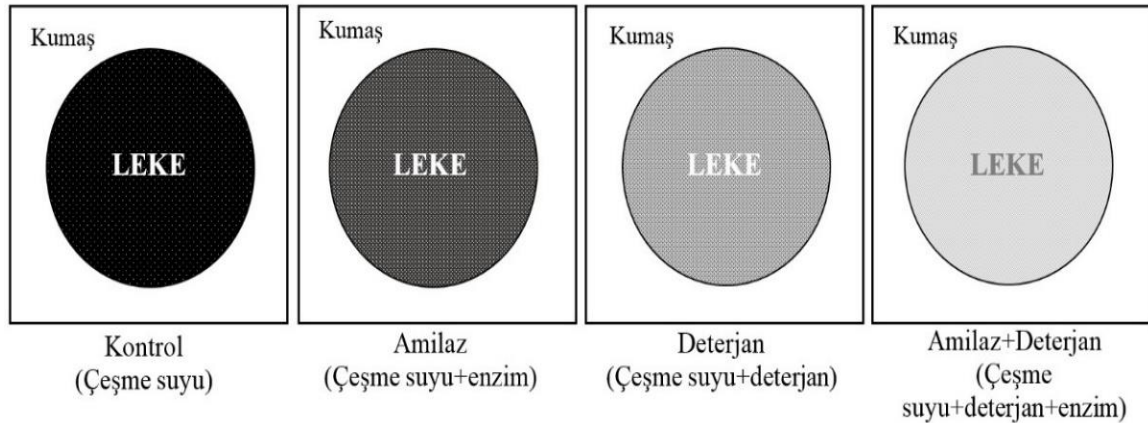
elde edilen enzim aktivitesi %100 kabul edilip % kalan aktiviteleri hesaplandı (Hmidet *et al.* 2009). Test edilen deterjanlara karşı % Kalan aktivite grafiği çizildi ve en yüksek aktivitenin olduğu deterjan belirlenerek leke giderme analizi için enzimle birlikte kullanıldı.

Tablo 14. Enzimin Deterjan Uyumunun Belirlenmesi için Kullanılan Deterjanların Kodları ve Konsantrasyonları

Deterjan Kodları	Konsantrasyon	Son Konsantrasyon
D1	%10 (v/v)	%1 (v/v)
D2	%10 (v/v)	%1 (v/v)
D3	%10 (v/v)	%1 (v/v)
D4	%10 (v/v)	%1 (v/v)
D5	%10 (v/v)	%1 (v/v)
D6	%10 (v/v)	%1 (v/v)
D7	10 mg/ml	1 mg/ml
D8	10 mg/ml	1 mg/ml

Enzimin kumaştan leke giderme performansının araştırılması

Bir önceki başlıkta elde edilen aktivite değerleri göz önüne alınarak, enzimin uyum gösterdiği deterjan ile karıştırılan amilazın kumaş parçasındaki çikolata lekesini giderme kabiliyeti Hmidet *et al.* (2009) tarafından geliştirilen metoda göre incelendi. Çikolata örneğinin sıvılaştırılması için 70°C’de bir süre ısıtıldı. Kumaş parçasında leke oluşturmak için sıvılaştırılmış çikolatadan 300 µl alınarak, 4 ayrı kumaşa aynı çapta (30 mm) homojen olacak şekilde uygulandı ve bir gün boyunca kurumaya bırakıldı (Şekil 6). Kurutulan kumaş parçaları 4 ayrı behere koyularak her biri Tablo 15’deki şekilde hazırlandı ve enzimin optimal aktivite gösterdiği sıcaklıkta 150 rpm’lik karıştırma hızında 1 saat boyunca karıştırıldı. Uygulama sonrası kumaş parçaları hızlıca sudan geçirilerek 1 gece kurumaya bırakıldı. Kumaşlardaki lekelerin giderilme durumları görsel olarak incelendi ve kontrol olarak kullanılan kumaştaki leke ile karşılaştırılarak yorumlandı (Hmidet *et al.* 2009).



Şekil 6. Enzimin leke giderme performansının denenmesi için kurulan deney düzeneği

Tablo 15. Leke Giderimi için Beherlerin Hazırlanması

<i>Beher</i>	<i>Numune</i>	<i>Bileşenler</i>
1	Kontrol	50 ml çeşme suyu
2	Amilaz	45 ml çeşme suyu + 5 ml serbest enzim (1 mg/ml)
3	Deterjan	45 ml çeşme suyu + 5 ml deterjan (% 1'lik)
4	Amilaz+Deterjan	45 ml çeşme suyu + 5 ml enzim içeren deterjan çözeltisi

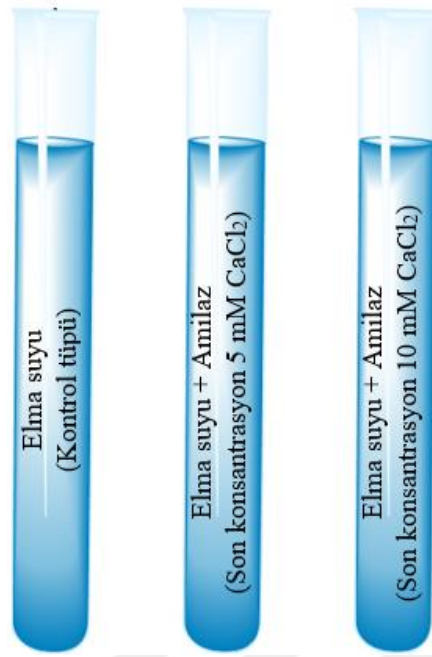
Enzimin tekstil endüstrisinde kullanılabilirliğinin incelenmesi

Tekstil endüstrisinde haşılama işlemi için kullanılan nişastanın amilaz ile kumaştan giderilmesi işlemindeki performans testi; Haq *et al.* (2010) ve Singh *et al.* (2014) tarafından uygulanan metoda göre incelendi. Öncelikle kumaş parçasının tartılarak darası alındı ve ardından 25 ml %1'lik nişasta çözeltisi içerisinde oda sıcaklığında 10 dk bekletildi. Süre sonunda kumaş parçası kurutularak tekrar tartıldı. Tartım işleminden sonra 1 ml amilaz içeren çeşme suyunda (veya tampon çözelti içerisinde en iyi aktivite gösterdiği pH değeri) enzimin optimum sıcaklık değerinde çalkalayıcıda 1 saat karıştırıldı. Uygulama sonrası kumaş parçası yıkanıp kurutuldu ve tekrar tartıldı. Elde edilen tüm tartım değerleri kullanılarak aşağıdaki eşitliğe göre amilazın % Haşıl giderme değeri hesaplandı (Haq *et al.* 2010; S. Singh *et al.* 2014).

$$\% \text{ Haşıl giderme} = \left[\frac{(\text{Haşıllanan kumaş ağırlığı (g)} - \text{Amilaz uygulaması sonrası kumaş ağırlığı (g)})}{\text{Haşıllanan kumaş ağırlığı}} \right] \times 100$$

Enzimin meyve suyu endüstrisinde kullanılabilirliğinin incelenmesi

Taze sıkılmış meyve suyundaki nişastanın, amilaz etkisi ile degradasyonu sonucu berraklaşması ve renk yoğunluğunun azaltılması açısından incelenmesi için Dey and Banerjee (2014) tarafından geliştirilen metot uygulandı. Bunun için, satın alınan elmalar küçük parçalara kesilerek blenderdan geçirilip çift kat bez yardımıyla süzüldü. Elde edilen elma suyu kullanılıncaya kadar 4°C'de saklandı. Elma suyundan iki ayrı tüpe 100'er ml alınarak üzerine son konsantrasyonları sırasıyla 5 mM ve 10 mM olacak şekilde CaCl₂ eklendi ve 90°C'de 5 dk bekletilerek hızla 50°C'ye soğutuldu. Ardından, temiz iki adet deney tüpüne ayrı ayrı 4900 µl elma suyu aktarılıp üzerlerine 100 µl amilaz eklendi ve optimum sıcaklık değerinde 3 saat yavaş hızda karıştırıldı (Şekil 7). Bekleme süresinin ardından, numune 10000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant değerlendirme için analiz edildi. Kontrol amacıyla enzimin eklenmediği elma suyu örneği aynı işlemlere tabi tutuldu ve en son santrifüj edilerek elde edilen üst faz analize dahil edildi (Dey and Banerjee 2014).



Şekil 7. Meyve suyu ile gerçekleştirilecek olan deney düzeneği

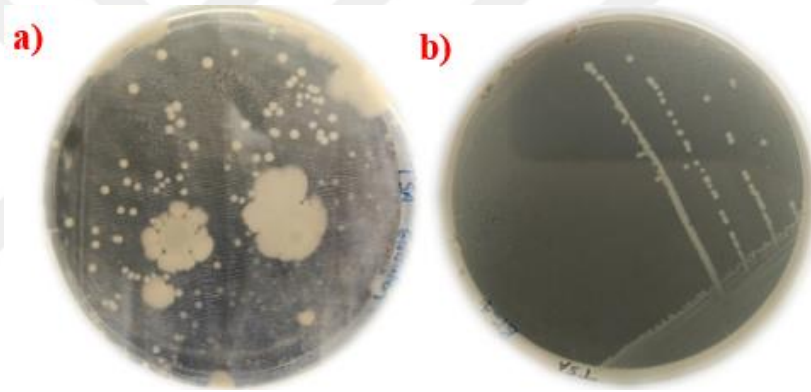
Elma suyu berraklığının yorumlanabilmesi için 660 nm’de, renk yoğunluğundaki değişimin yorumlanabilmesi için de 440 nm’de süpernatantların absorbensları spektrofotometrik olarak ölçüldü ve kontrolden elde edilen değerler ile kıyaslandı. Elma suyunda enzimin etkisiyle berraklığın yorumlanabilmesi için %berraklaştırma değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı ve değerler yorumlandı.

$$\% \text{ Berraklık} = \frac{(\text{Kontrol tüpünün absorbensı (A}_{660}) - \text{Enzim tüpünün absorbensı (A}_{660}))}{\text{Kontrol tüpünün absorbensı (A}_{660})} * 100$$

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Sıcak Su Örneğinin Toplanması ve Bakteri İzolasyonu

Çalışmada kullanılan sıcak su örneği Bitlis/Gülsuhan kaplıcasından temin edildi. Su örneğinin sıcaklığı 43°C ve pH değeri 7,5 olarak ölçüldü. Bakteri izolasyonu için kaplıca suyu TSB besiyerine aktarıldı ve 55°C’de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası seri dilüsyon işlemi gerçekleştirilerek son tüpler TSA besiyerine yayıldı ve inkübe edildi. Karışık kültürde gelişen bakteri kolonilerinden (Şekil 8a) farklı olduğu düşünülenler işaretlendi. Koloni morfolojileri ve mikroskop görüntüleri baz alınarak yeni besiyerine izolatların çizgi ekimi gerçekleştirildi ve kaplıca suyundan toplam 9 bakteri izole edildi (Şekil 8b). Elde edilen saf kültürlerin her birine kodlar tanımlanarak (BT) stokları alındı.



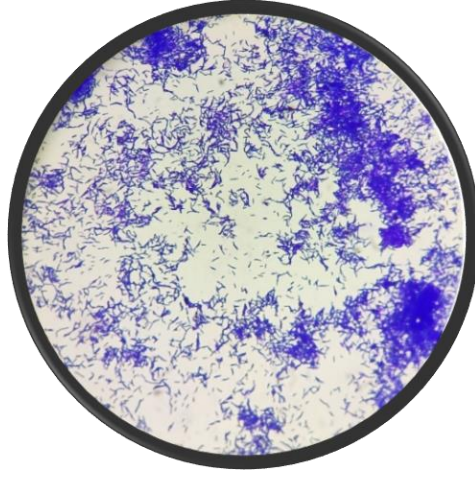
Şekil 8. a) Bitlis/Gülsuhan karışık kültürü (10^{-5} seyreltme) b) Bu karışık kültürden saflaştırılan BT-1 izolatının petri görüntüsü

Bakteri İzolatlarının Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Testleri

İzole edilen bütün bakterilerin tanımlanabilmesi için öncelikle morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerini belirlemek adına testler gerçekleştirildi. Bu testler içerisinde hücre ve koloni morfolojisi, Gram testi, Endospor varlığı, Hareketlilik testi, Tuz ve pH toleransı, Oksidaz, Katalaz, Amilaz, β -galaktosidaz, β -glukosidaz ve Nitrat Redüktaz analizleri yer almaktadır.

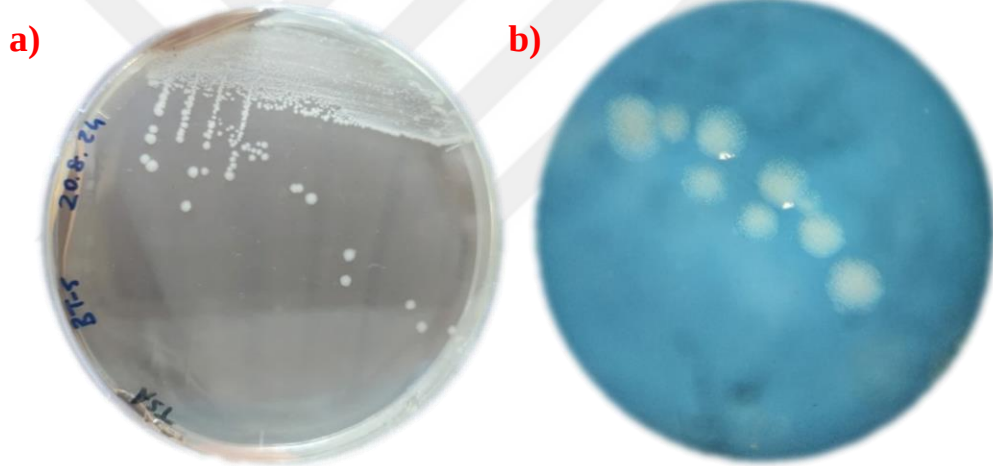
İzolatların Hücre ve Koloni Morfolojilerinin İncelenmesi

Tüm izolatlar kristal viyole ile boyanarak mikroskopta incelendi ve 9 bakterinin tamamının basil morfolojiye (Şekil 9) sahip olduğu belirlendi (Tablo 16).



Şekil 9. Kristal viyole ile boyanan BT-5 izolatının mikroskop görüntüsü

Stoktaki bakteri izolatları katı besiyerinde canlandırıldıktan sonra petrilerde gelişen koloni morfolojileri incelendi. Stereomikroskop aracılığı ile koloni morfolojileri daha detaylı incelenerek görüntüleri elde edildi (Şekil 10).



Şekil 10. a) BT-5 izolatının TSA besiyerindeki petri görüntüsü, b) Stereomikroskop ile elde edilen koloni morfolojisi

Hareketlilik testi

İzolatların hareketlilik testi hem %0,6 agar içeren besiyerinde hem de çukur lamda incelendi. Her iki test sonucuna göre izolatların tamamı hareketlilik açısından pozitif olarak belirlendi (Tablo 16).

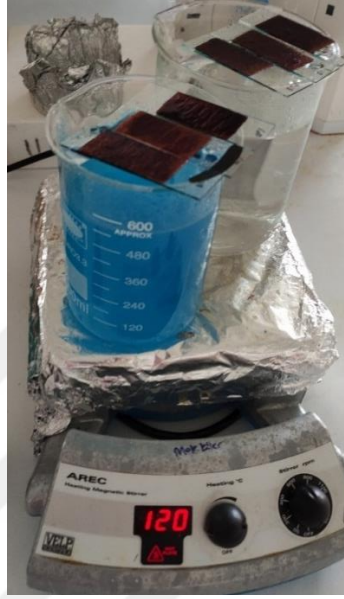
Gram testi

Gram testi için iki farklı yöntem uygulanarak sonuçlar teyit edilmiştir. İlk yöntemde bakteri kültürleri lam üzerinde %3'lük KOH çözeltisi ile karıştırıldı ve viskoz yapı gözlenmediği için tüm izolatlar gram pozitif olarak değerlendirildi (Şekil 14). İkinci yöntemde ise gram boyama protokolü uygulandı ve boyama sonrası mikroskop incelemelerinde tüm

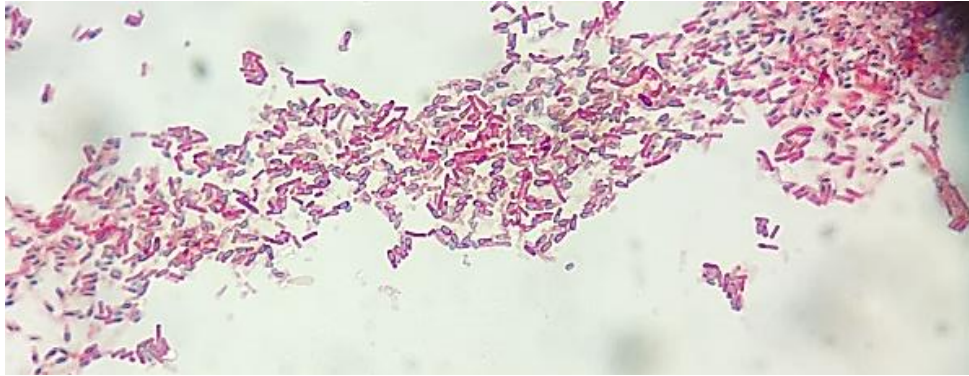
bakteriler mor renkte gözlemlendi. Böylece tüm izolatların gram pozitif olduğu teyit edildi (Tablo 16).

Endospor testi

Malaşit yeşili ve safranin boyaları kullanılarak gerçekleştirilen endospor testinde (Şekil 11) tüm izolatların preparatları hazırlanarak boyama protokolü uygulandı ve BT-6 izolatı hariç diğer tüm bakterilerin endospor pozitif olduğu gözlemlendi (Şekil 12).



Şekil 11. Endospor boyama testinde hazırlanan preparatların su buharı etkisi altında malaşit yeşili ile boyanması için kurulan düzenek



Şekil 12. BT-5 izolatına ait endosporların mikroskop görüntüsü (immersiyon objektifi)

İzolatların Fizyolojik Testleri

İzolatların fizyolojik testlerini belirleyebilmek için farklı tuz konsantrasyonları ve pH değerleri incelendi ve Tablo 17’de verildi. Sonuçlar incelendiğinde hiçbir izolat %12 NaCl içeriğinde gelişim gösteremezken %4 konsantrasyonda tüm izolatlar gelişmiştir. %8 NaCl ortamında sadece BT-5 (Şekil 13) ve BT-2 izolatları gelişim gösterememiştir. Ayrıca, izolatların farklı pH değerlerindeki gelişimleri incelendiğinde pH 11,0’de hiçbir izolat gelişim

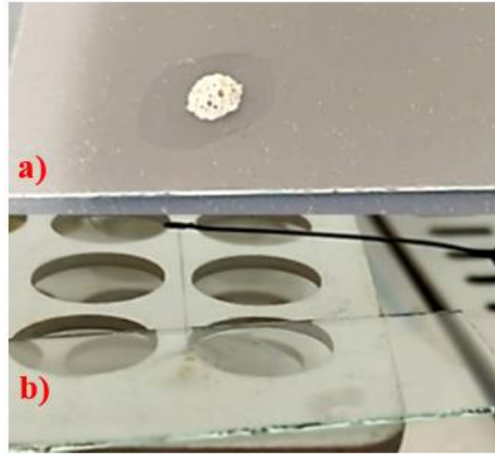
gösteremezken pH 7,0'de tüm bakteriler gelişmiştir. pH 5,0 ortamında BT-7 ve BT-8 gelişim gösteremezken BT-9 bakterisi zayıf gelişim göstermiştir. pH 9,0 ortamında ise sadece BT-5 izolatu gelişmiştir.



Şekil 13. BT-5 izolatının %4 ve %8 NaCl içeren sıvı besiyerinde 24 saatlik inkübasyonu sonrası kültür sıvıları

İzolatların Biyokimyasal Testleri

Katalaz testi için bakteri kültürleri lam üzerinde %3'lük H_2O_2 ile karıştırıldı ve kabarcık oluşturup oluşturmadığı incelendi. Tüm izolatların hazırlanan preparatlarında kabarcık oluşumu gözlemlendiği için sonuçlar katalaz pozitif olarak belirlendi (Şekil 14).



Şekil 14. a) %3'lük H_2O_2 çözeltisi ile gerçekleştirilen katalaz pozitif test sonucu b) %3'lük KOH çözeltisi ile gerçekleştirilen gram testinde kontrol olarak kullanılan Gr (-) *E.coli*'nin test sonucu

Bakteri izolatlarında sitokrom c oksidaz varlığını test etmek için tetramethyl-p-phenylendiamine dihydrochloride ihtiva eden stripler kullanıldı. Bu bileşik sitokrom c oksidaz varlığında oksitlenerek renk değişikliği meydana getirmektedir. Sonuçların güvenilirliği için oksidaz pozitif olduğu bilinen *Pseudomonas aeruginosa* kontrol olarak kullanıldı (Şekil 15) ve test sonucunda hiçbir örnekte renk değişimi gözlenmediği için sonuçlar oksidaz negatif olarak değerlendirildi (Tablo 19).



Şekil 15. a) *Pseudomonas aeruginosa*'ya ait oksidaz pozitif test sonucu, b) BT-5 izolatına ait oksidaz negatif test sonucu

Tablo 16. Bakteri İzolatlarının Konvensiyonel Analiz Sonuçları

Bakteri Kodu	İzolasyon Sıcaklığı (°C)	Hücre Morfolojisi	Gram boyama	Endospor	Hareketlilik
BT-1	55	Basil	+	+	+
BT-2	55	Basil	+	+	+
BT-3	55	Basil	+	+	+
BT-4	55	Basil	+	+	+
BT-5	55	Basil	+	+	+
BT-6	55	Basil	+	-	+
BT-7	55	Basil	+	+	+
BT-8	55	Basil	+	+	+
BT-9	55	Basil	+	+	+

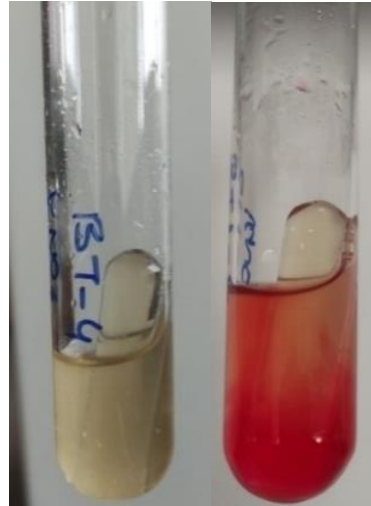
+: Pozitif, -: Negatif sonuç

Nitrat redüksiyon testi iki farklı metotta gerçekleştirildi ve sonuçlar teyit edildi. Uygulanan birinci yöntemde inkübasyon sonrası gelişim görülen kültürler nitrat pozitif olarak değerlendirildi (Şekil 16). Ayrıca tüplerdeki gelişim bölgesi incelenerek solunum tipi ortaya koyuldu. Bu yöntemle göre, BT-5 izolatı hariç diğer tüm bakteriler nitrat redüktaz pozitif ve solunum tipi açısından fakültatif aerobik olarak tespit edilmiştir.



Şekil 16. BT-4 izolatının test tüpündeki nitrat üretim testi sonucu (Nitrat pozitif, fakültatif aerobik)

İkinci yöntemde ise kültür ortamına eklenen nitrit ayracıyla meydana gelen renk değişimi incelendi. Nitrit ayracı ilave edildiğinde BT-5 bakterisi hariç diğer tüm izolatlarda renk değişimi gözlemlendi. Bu durum, ortamdaki NO_3^- 'ın NO_2^- 'e dönüştüğünü, dolayısıyla renk değişimine bağlı olarak bakterilerin nitrat redüktaz ihtiva ettiğini göstermektedir (Şekil 17). Renk değişimi gözlenmeyen BT-5 kültüründe tam redüksiyon ihtimalini ortadan kaldırmak için kültür sıvısına bir miktar Çinko tozu eklenerek karıştırıldı ve renk değişimi gözlemlendi. Bu durum, Nitrat Redüktaz içermeyen bakterinin kültür sıvısına eklenen çinkonun NO_3^- 'ı NO_2^- 'e indirgediğini ve nitrit ayracı ile renk değişiminin gerçekleştiğini ispatlamaktadır. Her iki yöntem ile gerçekleştirilen Nitrat Redüktaz test sonuçları örtüşmektedir. Ayrıca sıvı besiyerlerinin içerisine yerleştirilen Durham tüpleri ile gaz çıkışı olup olmadığı kontrol edildi ve hiçbir örnekte gaz çıkışı tespit edilmediği için Nitrat Redüktaz pozitif olan örneklerin reaksiyon modeli Amonifikasyon olarak belirlendi (Tablo 19).



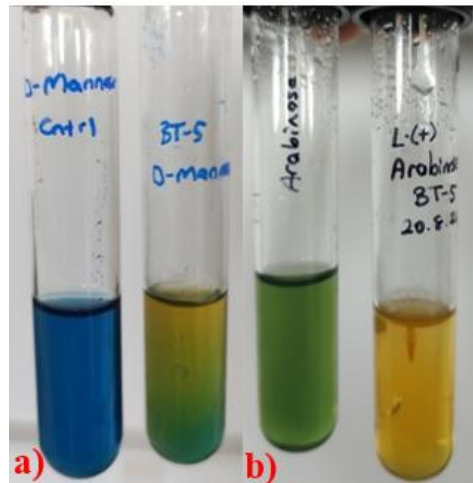
Şekil 17. BT-4 izolatının inoküle edildiği KNO_3 içeren sıvı besiyerinde inkübasyon sonrası kültür ortamı (solda), kültür sıvısına eklenen nitrit ayracı ile enzimatik reaksiyona bağlı gerçekleşen renk değişimi (sağda)

Bakteri izolatlarının β -glukosidaz ihtiva edip etmediğinin belirlenmesi için eskülin agar besiyerine bakterilerin inokülasyonu gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrası BT-2 bakterisi hariç diğer tüm bakterilerin besiyerinde renk değişimi meydana geldi ve bu izolatlar β -glukosidaz açısından pozitif olarak değerlendirildi (Şekil 18).



Şekil 18. Eskülin agar kontrol tüpü (Solda), inkübasyon sonrası BT-5 bakterisinin enzim aktivitesiyle kültür ortamında meydana gelen renk değişimi (Sağda)

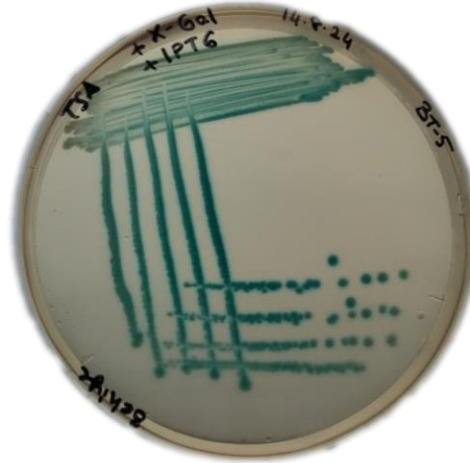
Bakterilerin karbonhidrat fermantasyonu sonucu asit üretimlerini test etmek amacıyla gerçekleştirilen analizde Inositol, D-Mannoz ve L-Arabinoz karbonhidratlarının kontrol tüpüne kıyasla bakterilerin kültür ortamında meydana gelen renk değişimleri pozitif olarak değerlendirildi (Şekil 19). Sonuçlar incelendiğinde BT-5 izolatının D-Mannoz ve L-Arabinoz için pozitif, Inositol için negatif olduğu tespit edildi. Diğer bakterilerin test sonuçları ise Tablo 18’de verildi.



Şekil 19. a) D-Mannoz kontrol tüpü ve İnoküle edilen BT-5 izolatının D-Mannoz fermantasyonuyla asit üretimi sonucu renk değişimi, b) L-Arabinoz kontrol tüpü ve İnoküle edilen BT-5 izolatının L-Arabinoz fermantasyonuyla asit üretimi sonucu renk değişimi

β -galaktosidaz testi için X-Gal ve IPTG eklenen LB agar besiyerlerinde gelişen bakteri kolonilerinin renkleri incelendi ve sadece BT-5 izolatında mavi renkli koloniler oluştuğu

gözlendi (Şekil 20). Diğer izolatların kolonileri ise kendi orijinal renklerinde gözlendi ve β -galaktosidaz açısından BT-5 pozitif, diğer izolatlar ise negatif olarak belirlendi (Tablo 19).



Şekil 20. β -galaktosidaz ihtiva eden BT-5'in X-Gal ve IPTG içeren besiyerinde oluşturduğu mavi koloniler

M9-Nişasta Agar Petri Yöntemi ile Bakterilerde Amilaz Varlığının Test Edilmesi

İzolatlardaki amilaz varlığının tespiti için M9-Nişasta agar besiyeri kullanıldı. Bakterilerin ekildiği kuyu etrafında renk değişiminin olmaması amilaz pozitif, koyu lacivert-siyah renge değişimi ise amilaz negatif olarak değerlendirildi. İzole edilen bakteriler içerisinde en yüksek hidrolizat zonunun BT-5 izolatına ait olduğu belirlendi. BT-5 izolatının ekildiği M9-Nişasta agarın kuyu etrafındaki hidrolizat zonu kumpas ile ölçüldü ve zon çapı 16 mm olarak kaydedildi (Şekil 21).



Şekil 21. BT-5 izolatına ait M9-Nişasta agar kültüründeki hidrolizat zonu

Tablo 17. Bakteri İzolatlarının Fizyolojik Test Sonuçları

<i>Bakteri Kodu</i>	<i>Tuz Aralıkları (% NaCl)</i>			<i>pH Aralığı</i>			
	4	8	12	5	7	9	11
BT-1	+	+	-	+	+	-	-
BT-2	+	+	-	+	+	-	-
BT-3	+	-	-	+	+	-	-
BT-4	+	+	-	+	+	-	-
BT-5	+	-	-	+	+	+	-
BT-6	+	+	-	+	+	-	-
BT-7	+	+	-	-	+	-	-
BT-8	+	+	-	-	+	-	-
BT-9	+	+	-	z ⁺	+	-	-

+: Pozitif, -: Negatif, z⁺: Zayıf pozitif sonuç

Tablo 18. İzolatların Karbonhidrat Fermantasyonu ile Asit Üretimi Test Sonucu

<i>Bakteri Kodu</i>	<i>Inositol</i>	<i>D-Mannoz</i>	<i>L-Arabinoz</i>
BT-1	+	+	+
BT-2	-	+	+
BT-3	+	+	+
BT-4	+	+	+
BT-5	+	+	+
BT-6	+	+	+
BT-7	+	+	+
BT-8	+	+	+
BT-9	+	+	+

+: Pozitif, -: Negatif sonuç

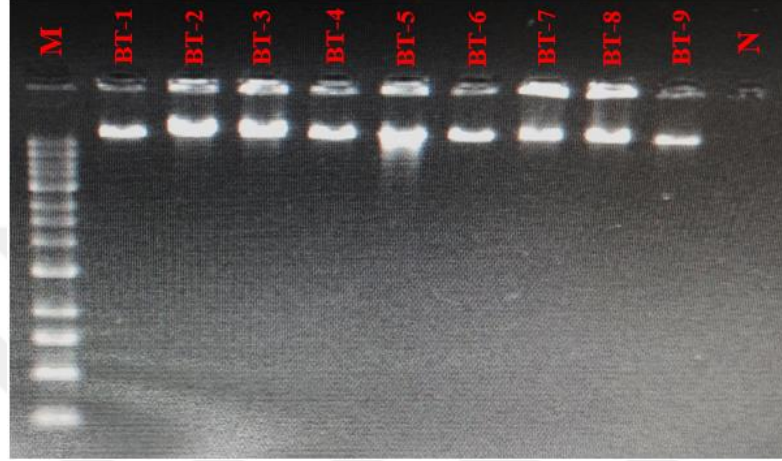
Tablo 19. Bakteri İzolatlarının Biyokimyasal Test Sonuçları

<i>Nitrat Redüktaz Reaksiyon Mekanizması</i>								
<i>Bakteri Kodu</i>	<i>Nitrat Redüktaz</i>	<i>Amonifikasyon</i>	<i>Denitrifikasyon</i>	<i>Oksidaz</i>	<i>Katalaz</i>	<i>Amilaz</i>	<i>β-glikosidaz</i>	<i>β-galaktosidaz</i>
BT-1	+	+	-	-	+	+	+	-
BT-2	+	+	-	-	+	+	-	-
BT-3	+	+	-	-	+	+	+	-
BT-4	+	+	-	-	+	+	+	-
BT-5	-	-	-	-	+	++	+	+
BT-6	+	+	-	-	+	+	+	-
BT-7	+	+	-	-	+	+	+	-
BT-8	+	+	-	-	+	+	+	-
BT-9	+	+	-	-	+	+	+	-

++: Kuvvetli pozitif, +: Pozitif, -: Negatif sonuç

İzolatların Moleküler Analizi ile Tür Tespitlerinin Gerçekleştirilmesi

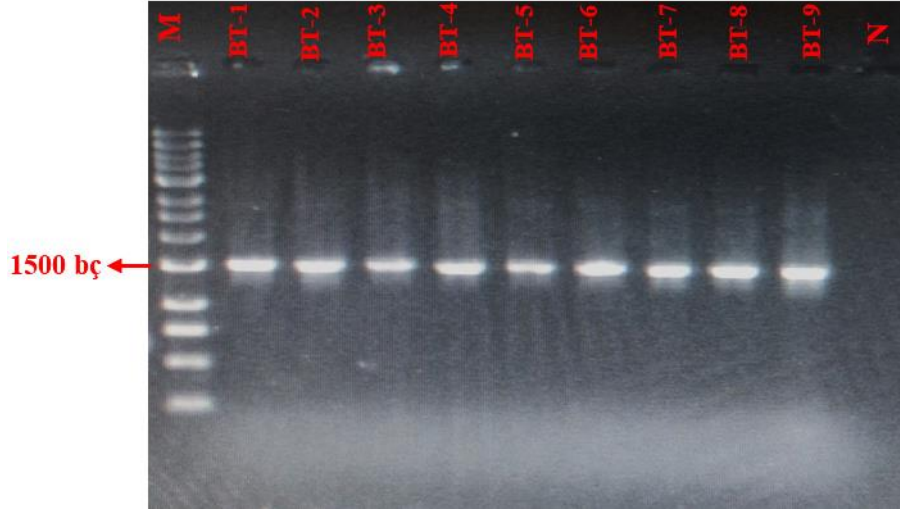
Bitlis/Gülsühan kaplıca suyundan izole edilen 9 bakterinin moleküler tür tespiti için öncelikle stoğa alınan bütün bakteriler katı besiyerine ekilerek canlandırıldı ve inkübasyon sonrası tek düşen kolonilerinden ön kültürleri hazırlandı. Ardından Genomik DNA izolasyon protokolü uygulanarak DNA'ları izole edildi. İzolasyon sonrası özellikle protein kaynaklı kirliliğin olmadığından emin olmak adına agaroz jel elektroforezinde DNA örnekleri yürütülerek jel görüntüsü incelendi (Şekil 22).



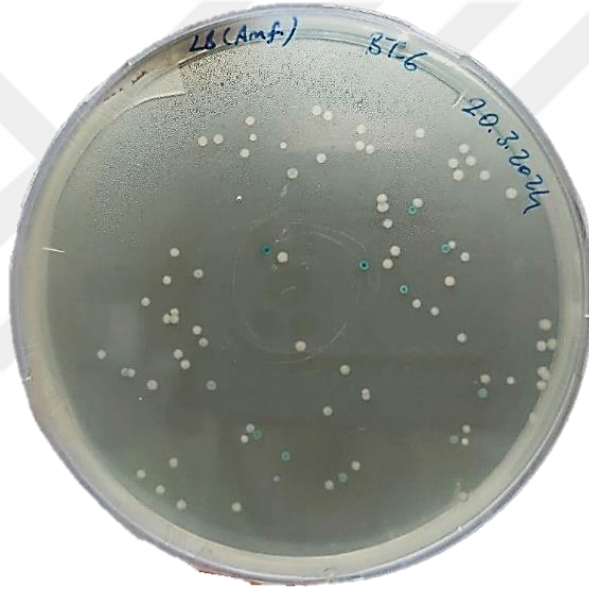
Şekil 22. Bakteri izolatlarından saflaştırılan DNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü (M: DNA Markır, N: Negatif Kontrol)

Elde edilen jel görüntüsü incelendiğinde kirlilikten kaynaklı smear, birden fazla bant ya da kuyular boyunca yayılan zayıf sinyallerin gözlenmediği ve net, keskin DNA bantların olduğu belirlendi. Böylece DNA örneklerinin saflığından emin olunarak sonrasında 16S rRNA protokolü uygulandı ve tür tespiti için kullanacak olan gen bölgesinin amplifikasyonu gerçekleştirildi. PCR işlemi sonrası hedef bölgenin amplifikasyonunun teyidi için agaroz jel elektroforezinde her bir bakteriden elde edilen PCR ürünleri yürütüldü ve DNA markırı ile kıyaslanarak jeldeki PCR bantlarının 1500 bp uzunluğunda olup olmadığı incelendi (Şekil 23). 9 bakteri izolatına ait DNA örneklerinden gerçekleştirilen PCR ampliconlarının hepsi istenen bölgede (1500 bp) bant verdiği için izolatların PCR ürünleriyle klonlama basamağına geçildi.

Bakteriyel tür tespiti için doğrudan 16S rRNA PCR ürünlerinin sekansı yerine PCR hatalarının minimuma indirilmesi ve sekans kalitesinin artırılarak en doğru diziye, dolayısıyla da en güvenilir tür tespiti sonucuna ulaşabilmek için klonlama basamağı uygulandı. Amplifikasyon sonrası izolatlara ait 16S rRNA PCR ürünlerinin pGEM-T Easy vektörüne ligasyonu yapılarak *E. coli* JM101 bakterisine transforme edildi. Transformasyon sonrası bakteriler X-Gal ve IPTG yayılan amfisilinli katı besiyerine inoküle edilerek beyaz koloni oluşturanları işaretlendi (Şekil 24).

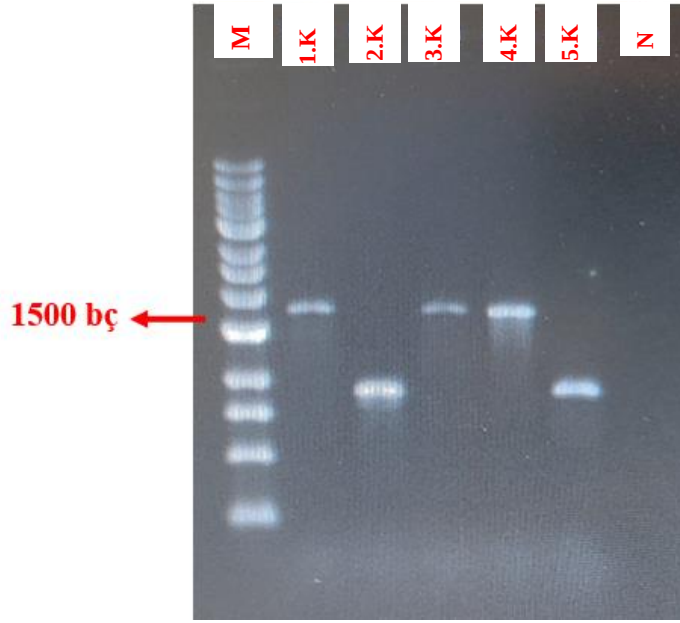


Şekil 23. Bakteri izolatlarına ait 16S rRNA PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü (M: DNA Markır, N: Negatif Kontrol)



Şekil 24. Transformasyon sonrası amfisilinli LB agarda X-Gal ve IPTG etkisi ile mavi-beyaz koloni oluşumu

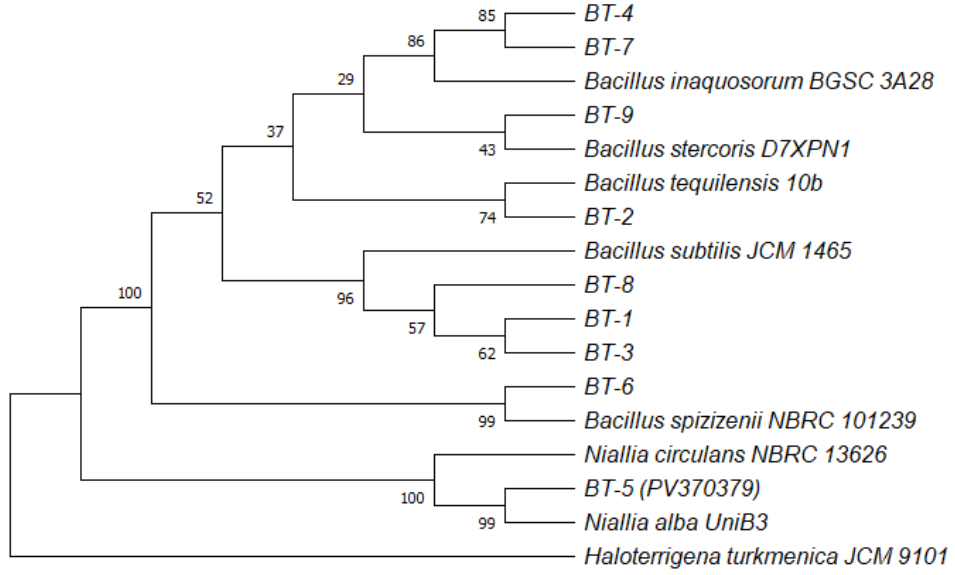
Koloni seçiminde çoğunlukla petrinin orta bölgesinde gelişim gösteren beyaz kolonilerin seçimine dikkat edildi. Petri kenarlarına yakın bölgelerde gelişen beyaz kolonilerin X-Gal ve IPTG yayılımının homojen olmaması ihtimalinden dolayı yanlış pozitifliğe sebep olabileceği için kenara yakın koloniler seçilmedi. Seçilen beyaz kolonilerin hedef gen bölgesini doğru şekilde aldığından emin olabilmek için koloni PCR ve agaroz jel elektroforezi uygulandı. Jel elektroforeziyle elde edilen görüntüde (Şekil 25) istenen bölgede bant veren kolonilerin sıvı besiyerine ekimleri yapılarak inkübasyona kaldırıldı. İnkübasyon sonrası gelişen bakteri kültürlerine plazmid izolasyon protokolü uygulandı. Böylece tür tespiti için kullanılacak olan hedef gen bölgesinin (16S rRNA) çok fazla sayıda kopyaları elde edildi.



Şekil 25. BT-2 izolatı için seçilen 5 adet beyaz koloniden gerçekleştirilen koloni PCR'ın agaroz jel görüntüsü (M:DNA Markır, 1.K:1.Koloni, 2.K:2.Koloni, 3.K:3.Koloni, 4.K:4.Koloni, 5.K:5.Koloni, N:Negatif Kontrol. 1. 3. ve 4. kuyular pozitif sonuç)

Tüm izolatların plazmid DNA'ları sekans analizi için firmaya gönderildi ve elde edilen sonuçlar BioEdit programı ile düzenlendi. Elde edilen sekans dizilerinin NCBI-Nucleotide BLAST veri tabanı aracılığıyla bu zamana kadar tanımlanmış olan bakteri türlerinin 16S rDNA sekans dizileri ile olan homolojilerine bakıldı. İzolatların benzerlik oranları ve konvensiyonel analizleri incelenerek tür tespitleri gerçekleştirildi ve GenBank® erişim numaraları alındı (Tablo 20). Tüm izolatların sekans dizileri benzerlik gösterdiği bakterilerin sekans dizileri ile hizalandı ve MEGA 11 programı ile izolatların filogenetik ağacı çizildi (Şekil 26). Amilaz kaynağı olarak kullanılan BT-5 izolatının türü elde edilen değerlendirmeler sonucunda *Niallia alba* (GenBank® Erişim Numarası: PV370379) olarak belirlendi.

Filogenetik ağaç incelendiğinde *Niallia alba* türüne en yakın tür *Niallia circulans*'tır. Literatürdeki araştırma makaleleri incelendiğinde eski ismiyle *Bacillus circulans* olan bu bakterinin enzim kaynağı olarak kullanıldığı çalışmalar mevcuttur. Yapılan bir çalışmada, 50°C'de izole edilen orta ılımlı termofilik *Bacillus circulans* MAS2 izolatı termostabil esteraz kaynağı olarak kullanılmıştır (Kademi *et al.* 2000). Bir başka çalışmada ise izole edilen termofilik *Bacillus circulans* AB 16'dan alkalitolerant ksilanaz üretimi, saflaştırması ve karakterizasyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Dhillon *et al.* 2000).



Şekil 26. Kaplıca suyundan izole edilen bakterilerin (BT kodlu) filogenetik ağacı

Tablo 20. Bitlis/Gülsuhan Kaplıca Suyundan Saflaştırılan İzolatların Benzerlik Yüzdeleri ve Tür İsimleri

İzolat Kodu	Tür adı	Benzerlik yüzdesi	GenBank® Erişim Numarası
BT-1	<i>Bacillus subtilis</i>	%99,85	PV476781
BT-2	<i>Bacillus tequilensis</i>	%99,86	PV476782
BT-3	<i>Bacillus subtilis</i>	%99,79	PV476783
BT-4	<i>Bacillus inaquosorum</i>	%100	PV476784
BT-5	<i>Niallia alba</i>	%99,93	PV370379
BT-6	<i>Bacillus spizizenii</i>	%97,02	PV476785
BT-7	<i>Bacillus inaquosorum</i>	%100	PV476786
BT-8	<i>Bacillus subtilis</i>	%99,72	PV476787
BT-9	<i>Bacillus stercoris</i>	%100	PV476788

Mikroorganizmalar; kutuplar, kaplıca suları, hidrotermal bacalar gibi birçok ekolojik ortamda mevcuttur. Özellikle kaplıca suları gibi sıcak habitatlardan izole edilen mikroorganizmaların proteinleri sıcaklığa ve kimyasal strese karşı fizyolojik adaptasyonlar gerçekleştirerek organizmaların bu çevresel ortama uyum sağlamalarını desteklemiştir (Raddadi *et al.* 2015; Saxena *et al.* 2016; Sahay *et al.* 2017). Termal kaynaklardaki mikrobiyal popülasyon enzim, şeker, uygun çözünen madde ve antibiyotikler gibi potansiyel olarak önemli ürünler için zengin kaynaklar oluşturmaktadır (Sharma *et al.* 2024). Sıcak su kaynağı mikrobiyomu endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamalara sahip birçok yeni termostabil hidrolitik enzim eldesinde kullanılmıştır. Bu termostabil enzimlerin, yüksek sıcaklıkta stabil olmaları, geniş pH aralığına tolerans göstermeleri ve yaygın mezofilik mikroorganizmalar

tarafından kontaminasyon olasılıklarının daha düşük olması gibi çeşitli avantajlara sahiptir. Ayrıca, bu enzimlerin çözücü toleransı, substrat seçiciliği ve kararlılık gibi başka avantajları da mevcuttur (Debnath *et al.* 2019). Bu avantajlarından dolayı literatürdeki çalışmalar incelendiğinde sıcak su kaynaklarından mikroorganizma izolasyonu ve bu izolatlardan enzim eldesinin gerçekleştirildiği birçok çalışma mevcuttur.

Yapılan bir çalışmada, Hindistan Himalayalarındanki sıcak su kaynaklarından toplanan 12 örnekten toplam 140 termofilik bakteri izole edilmiş ve bu izolatlar; proteaz, amilaz, ksilanaz ve selüloz gibi hücre dışı termostabil hidrolitik enzimlerin potansiyel kaynakları açısından incelenmiştir (Sahay *et al.* 2017). Ülkemizde de birçok kaplıca suyundan bakteri izolasyonu gerçekleştirilmiş ve izole edilen bakterilerin hidrolitik enzim potansiyeli araştırılmıştır. Yapılan bir çalışmada, Türkiye'nin Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde bulunan 7 farklı jeotermal sıcak su kaynağından (40 ila 85°C arasında değişen sıcaklıklarda) toplam 83 termofilik *Bacilli* suşu izole edilmiştir. Bakteriye izolatlar amilaz, selüloz, lipaz ve proteaz hidrolitik enzim aktiviteleri açısından taranmıştır (Ulucay *et al.* 2022).

Literatür çalışmaları incelendiğinde Bitlis/Gülsuhan kaplıca suyundan bakteri izolasyonu ve enzimatik aktivite değerlendirilmesi açısından yapılmış bir çalışma mevcut değildir. Bu nedenle mevcut tez çalışması literatürde ilk olma özelliği taşımaktadır. Ayrıca, literatür çalışmaları incelendiğinde ilk kez 2021 yılında sindirim şurubundan izole edilerek tür tespiti yapılan *Niallia alba* bakterisinden (Thorat *et al.* 2021) bu zamana kadar amilaz saflaştırması ve karakterizasyonu çalışmaları gerçekleştirilmemiştir. Dolayısıyla, mevcut tez çalışması sadece bakteri izolasyonunda kullanılan kaplıca suyu açısından değil aynı zamanda literatüre yeni bir amilaz kaynağı kazandırdığı için de ilk olma özelliği taşımaktadır.

Amilaz; deterjan, gıda, tekstil gibi birçok endüstriyel alanda kullanımı olan en önemli ticari enzimlerden biridir. İhtiyaç duyulan amilazın üretiminde çeşitli organizmalardan faydalanılsa da en önemli amilaz kaynağı olarak mikroorganizmalar kullanılmaktadır. Amilaz biyosentezi için mikroorganizmaların tercih edilmesinde üretim kolaylığı, düşük maliyet ve yüksek hacim gibi avantajlar sayılabilir. Bakteriye ve fungal organizmalardan elde edilen α -amilazlar çeşitli endüstriyel ortamlarda geniş uygulama alanına sahiptir (Oyenado and Omoruyi 2024). Endüstriyel öneme sahip amilaz için yeni bir mikrobiyal kaynak elde edebilmek amacıyla Bitlis/Gülsuhan kaplıca suyundan izole edilen *N. alba* BT-5 izolatı kullanılarak enzim üretimi sağlandı. Bunun için indükleyici sıvı besiyerine bakterinin inokülasyonu gerçekleştirilerek ham enzim kaynağı elde edildi.

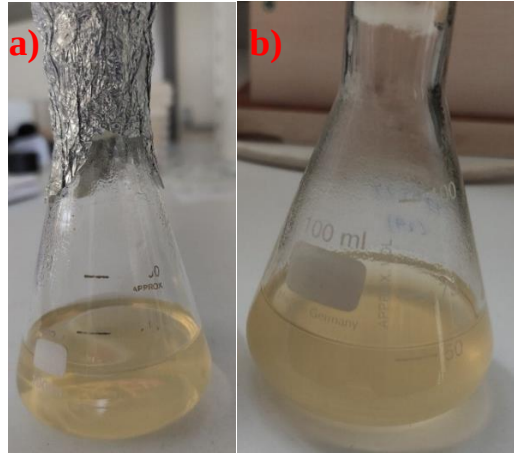
Amilaz Pozitif İzolatın Sıvı Besiyerinde Geliştirilmesi ile Ham Enzim Kaynağının Üretilmesi ve Amilaz Aktivitenin Tayin Edilmesi

İzolatın sıvı besiyerinde geliştirilmesi ile ham enzim kaynağının üretilmesi

Amilaz pozitif olarak belirlenen *N. alba* BT-5 izolatının TSB besiyerinde hazırlanan ön kültürü, amilaz üretiminde kullanılacak olan nişastalı sıvı besiyerine inoküle edildi ve 55°C’de 24 saat süreyle inkübasyona kaldırıldı (Şekil 27). İnkübasyon sonrası santrifüj edilerek süpernatant ham enzim kaynağı olarak kullanıldı.

DNS yöntemi ile amilaz aktivite tayini

İndüklenmiş sıvı besiyerinde kültürü yapılan *N. alba* BT-5’in kültür sıvısı santrifüj edilerek süpernatant amilaz kaynağı olarak kullanıldı. Süpernatanttan amilaz aktivitenin tespiti için spektrofotometrik bir yöntem olan DNS yöntemi uygulandı. DNS (3,5-dinitrosalisilik asit) yöntemi nişastanın parçalanması sonucu oluşan indirgen şeker miktarının ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Amilaz aktivitesi sonucu nişastanın parçalanarak ürettiği indirgen şeker türevleri ortama eklenen DNS’nin nitro gruplarını indirger ve sonuç olarak 3-amino-5-nitrosalisilik asit molekülü oluşur. DNS çözeltisi başlangıçta sarı renkli iken reaksiyon sonucu ortaya çıkan 3-amino-5-nitrosalisilik asit molekülü kaynatma sonrası turuncu-kırmızı renge dönüşür. Spektrofotometrede 540 nm’de ölçülen bu renk yoğunluğu ortamda bulunan indirgen şeker miktarı ile orantılıdır.

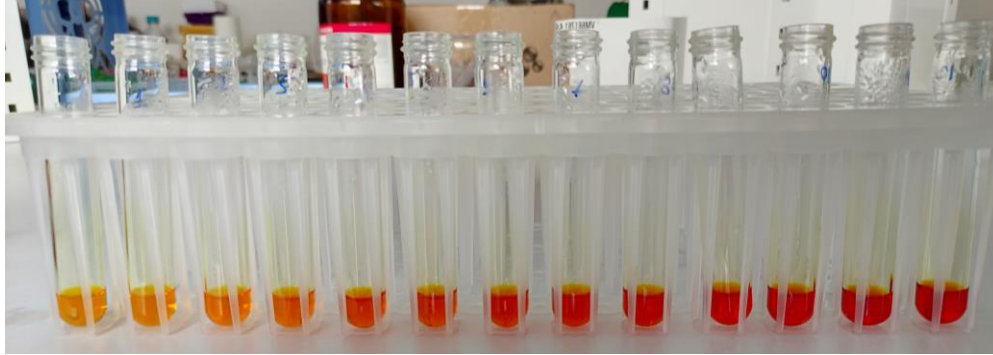


Şekil 27. a) Sterilizasyon sonrası ekim için hazır hale getirilen indüklenmiş sıvı besiyeri b) İnkübasyon sonrası bakteriyel gelişimin gözlendiği indüklenmiş kültür ortamı

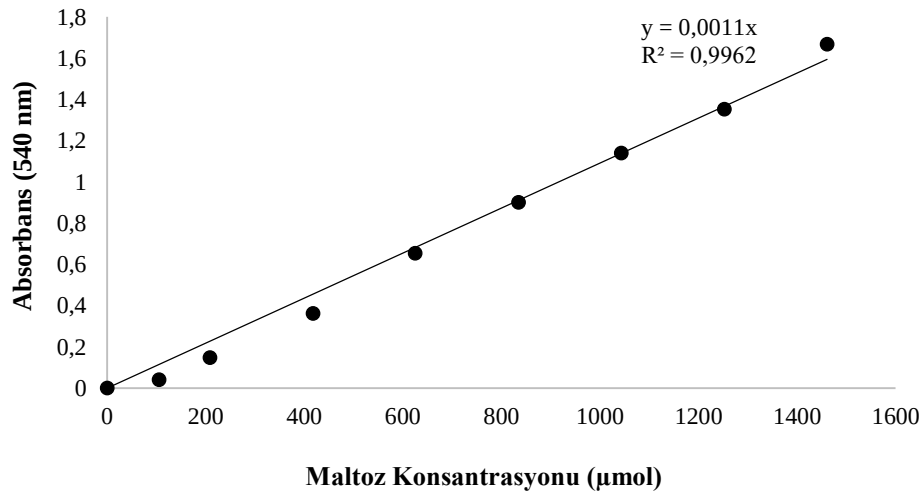
Maltoz çözeltisi ile standart eğrinin oluşturulması

DNS yöntemi ile spektrofotometrik ölçümler sonucu elde edilen absorban değerlerinden enzim birimine (EÜ/ml) ulaşabilmek için maltoz standart eğrisi oluşturuldu. Bunun için değişen konsantrasyonlarda hazırlanan maltoz çözeltilerine DNS yöntemi ile aktivite ölçüm protokolü uygulandı (Şekil 28) ve maltoz konsantrasyonuna karşı absorban

grafiği çizildi (Şekil 29). Standart grafikten elde edilen eğri denklemi deney boyunca enzim aktivitesinin birim hesaplaması için kullanıldı. İndükleyici sıvı besiyerinde kültürü yapılan *N. alba* BT-5 izolatının inkübasyon sonrası elde edilen ham enzim kaynağından DNS yöntemi ile belirlenen absorbans değerine göre amilaz aktivitesi 68,14 EÜ/ml olarak belirlendi.



Şekil 28. Maltoz standart çözeltilerinin kaynatma sonrası renk değişimi



Şekil 29. Maltoz standart grafiği ve eğri denklemi

Literatür incelendiğinde yapılan bir çalışmada, jeotermal kaplıcadan izole edilen *Aeribacillus pallidus* BTPS-2 suşu amilaz kaynağı olarak kullanılmış ve farklı besiyerlerinde bakterinin amilaz üretimi indüklenerek en yüksek aktiviteye ulaşılan indükleyici besiyeri belirlenmiştir. Amilaz aktivitenin en yüksek olduğu M3 besiyeri olarak belirlenmiş ve bakterinin bu besiyerindeki inkübasyonu (55°C’de) sonrası $6,29 \pm 0,18$ U/ml birim aktiviteye ulaşılmıştır (Timilsina *et al.* 2020). Mevcut tez çalışmasında elde edilen *N. alba* BT-5 amilazının aktivitesi (68,14 EÜ/ml) Timilsina *et al.* (2020) tarafından belirlenen termofilik bakterinin amilaz aktivitesine göre oldukça yüksektir. Bu durum, *Niallia alba* izolatının amilaz kaynağı olarak kullanılabilirliğini güçlendirmektedir. Bir başka çalışmada ise toprak örneğinden izole edilen *Paenibacillus lactis* OPA3 suşu amilaz kaynağı olarak kullanılmış ve indükleyici sıvı besiyerinde bakterinin 50°C’de inkübasyonu sonrası ekstraselüler amilaz aktivitesi $45,78 \pm 2,67$ U/ml olarak belirlenmiştir (Ugwuoji *et al.* 2023). Bu araştırmanın

sonuçlarına göre tez çalışmasında *N. alba* BT-5 bakterisinin ekstraselüler amilazı için belirlenen aktivite değerine yakın bir değer elde edilmiştir.

Amilaz kaynağı olarak kullanılan bakterilerin çevresel faktörleri enzim salınımını önemli ölçüde etkilemektedir. Bu nedenle, mevcut fermantasyon koşullarının, özellikle fiziksel ve kimyasal parametrelerin optimizasyonu, yöntemlerin ekonomisi ve uygulanabilirliği üzerindeki etkileri nedeniyle optimum fermantasyon süreçlerinin geliştirilmesi için çok önemlidir (Francis *et al.* 2003). pH, sıcaklık, metal iyonları, karbon ve nitrojen kaynakları, fosfat ve çalkalama gibi çok sayıda parametre amilaz üretimiyle ilişkili olarak incelenmiştir (Couto and Sanromán 2006). *N. alba* BT-5 suşu kullanılarak gerçekleştirilen amilaz eldesinde en yüksek enzim salınımına ulaşabilmek için çalışmanın sonraki basamaklarında kültür parametrelerinin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Amilaz Üretimi İçin Optimal Kültür Parametrelerinin Belirlenmesi

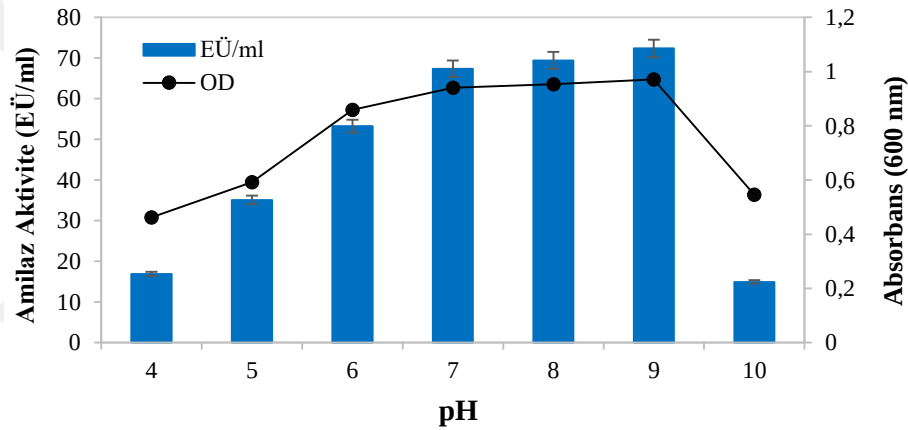
Optimum pH değerinin belirlenmesi

Besiyeri pH değerinin bakteri gelişimi ve enzim üretimindeki etkisini tespit etmek amacıyla 4,0-10,0 arasındaki pH değerleri araştırılmıştır. Elde edilen OD değerleri ve DNS yöntemi ile belirlenen enzim aktiviteleri Tablo 21’de verildi. Değişen pH değerlerine karşı mikrobiyal yoğunluk ve enzim birimlerinin grafiği çizildi (Şekil 30). Büyüme ortamının fiziksel parametreleri içerisinde yer alan pH; hücre boyutu, hücre şekli, hücre su içeriği gibi morfolojik değişiklikleri indükleyerek suştan enzim salgılanmasında önemli bir rol oynar (Cerna and Neustupa 2010; Rudenko 2010; Deljou and Arezi 2016). Veriler incelendiğinde pH 9,0’a kadar OD değerleri giderek artmış ve buna paralel olarak amilaz aktivite de artmıştır. pH 10,0’da ise bakteri gelişimi çok fazla düşmüş ve buna bağlı olarak enzim salınımı da olumsuz etkilendiğinden amilaz aktivite azalmıştır. Bu sonuçlara göre *N. alba* BT-5 izolatının amilaz aktivitesi için optimum kültür pH’ı 9,0 olarak belirlendi. Sonraki parametre optimizasyonları için hazırlanacak olan indükleyici sıvı besiyeri pH’ı 9,0’a ayarlanarak gerçekleştirildi.

Tablo 21. pH 4-10 Arası Kültür Sıvılarından Elde Edilen OD ve Amilaz Aktivite Değerleri

<i>pH</i>	<i>EÜ/ml</i>	<i>OD</i>
4,00	16,9	0,462
5,00	35,1	0,592
6,00	53,25	0,859
7,00	67,36	0,941
8,00	69,43	0,954
9,00	72,38	0,971
10,00	14,93	0,498

Literatür çalışmaları incelendiğinde daha yüksek amilaz aktivite eldesi için bakterilerin geliştiği kültür ortamında çeşitli parametrelerinin optimizasyonunu içeren birçok çalışma mevcuttur. Yapılan bir çalışmada, kaplıca suyundan izole edilen *Bacillus licheniformis*-AZ2 bakterisinden ekstraselüler amilaz üretimi gerçekleştirmiş, kültür optimizasyonu yapıldığında enzim salınımının en yüksek pH 9,0'da gerçekleştiği belirlenmiştir (Deljou and Arezi 2016). Bir başka çalışmada ise toprak örneğinden alkali proteaz üreten *Bacillus* sp. izole edilmiş ve kültür parametreleri optimize edildiğinde pH 9,0'da en yüksek amilaz aktiviteye ulaşıldığı belirlenmiştir (Joshi and Yadav 2016). Bir diğer çalışmada, *Bacillus circulans* CW2 bakterisinden amilaz üretimi gerçekleştirilmiş ve yüksek amilaz aktivitesine ulaşabilmek için kültür parametreleri optimize edildiğinde en yüksek amilaz salınımının pH 10'da gerçekleştiği belirlenmiştir (Tambekar *et al.* 2013). Tez çalışmasında kullanılan *N. alba* BT-5 amilazının optimum pH değerinin literatür verileri ile paralellik gösterdiği görülmektedir.



Şekil 30. 4-10 arası pH'da değişen amilaz aktivite ve 24 saatlik inkübasyon sonucu bakteriyel OD

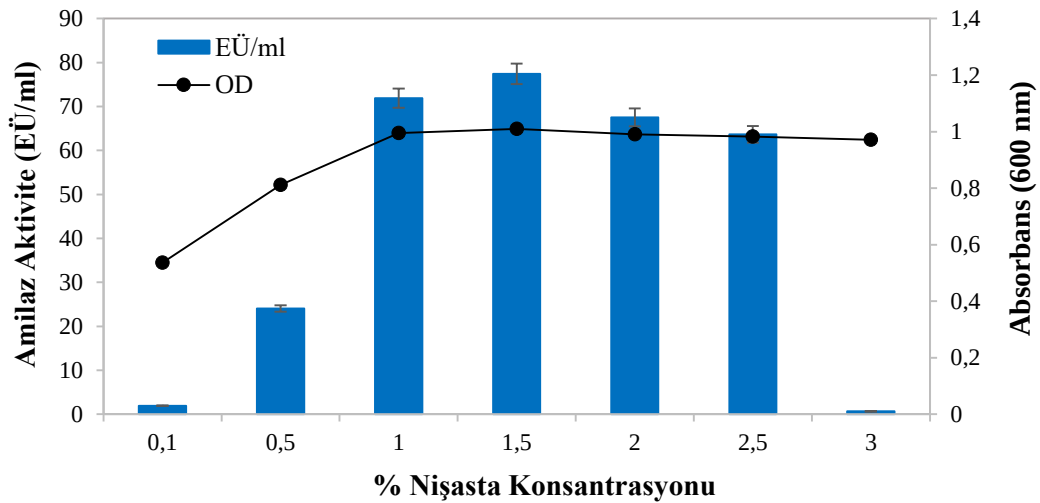
Optimum substrat konsantrasyonu değerinin belirlenmesi

Besiyeri substrat konsantrasyonunun bakteri gelişimi ve enzim aktivitesindeki değişimi üzerine etkisini incelemek ve en yüksek amilaz aktiviteye ulaşabilmek amacıyla indüklenmiş besiyerine eklenen nişasta konsantrasyonu optimize edildi. Bunun için %0,1-%3 aralığındaki çözünür nişasta konsantrasyonları pH 9,0'da test edildi. Eşit mikrobiyal hacimde inoküle edilen *N. alba* BT-5 izolatının inkübasyonundan sonrası elde edilen kültür sıvısından DNS yöntemi ile amilaz aktivite tayini yapıldı. Aynı zamanda kültür sıvılarından spektrofotometre ile OD ölçümü yapıldı. EÜ/ml cinsinden hesaplanan aktiviteler ve OD değerleri Tablo 22'de verildi ve değişen substrat konsantrasyonlarına karşı amilaz aktiviteleri ile OD değerlerinin grafiği çizildi (Şekil 31). Tablodaki değerler incelendiğinde %0,1 ve %0,5 konsantrasyonlardaki besin ortamı OD değerlerine göre bakteriyel gelişimi destekleyemediğinden muhtemelen ekstraselüler amilaz salınım seviyesi azalmış ve enzim aktivitesi düşmüştür. %1-3 arası substrat

konsantrasyonundaki değişim ise bakteriyel gelişimi çok etkilememiştir. Ancak enzim aktivitesine baktığımızda %1 substrat konsantrasyonundaki kültür ortamında teşvik edilen bakteriyel gelişim ile birlikte amilaz aktivite artmaktadır. En yüksek enzim aktivitesi %1,5 nişasta ortamında görülürken %2 konsantrasyondan itibaren amilaz aktivite muhtemelen substrat doygunluğu nedeniyle azalmaya başlamıştır. %3 nişasta konsantrasyonunda ise yüksek substrat miktarı enzimi inhibe ederek aktiviteyi oldukça fazla düşürmüştür. Tüm veriler incelendiğinde en yüksek amilaz aktivite %1,5 nişasta konsantrasyonunda gözlemlendiğinden optimum nişasta konsantrasyonu olarak belirlenmiş ve sonraki deneylerde kullanılmıştır.

Tablo 22. %0,1-%3 Arası Nişasta Konsantrasyondaki Kültür Sıvılarından Elde Edilen OD ve Amilaz Aktivite Değerleri

<i>Nişasta Konsantrasyonu (%)</i>	<i>EÜ/ml</i>	<i>OD</i>
0,1	1,95	0,936
0,5	24,03	0,989
1	71,9	0,995
1,5	77,43	1,01
2	67,53	0,99
2,5	63,66	0,982
3	0,65	0,971



Şekil 31. %0,1-%3 arası nişasta konsantrasyonlarında değişen amilaz aktivite ve 24 saatlik inkübasyon sonrası bakteriyel OD

Yapılan çalışmalar incelendiğinde, bakteri izolatlarından amilaz üretimi için gerçekleştirilen kültür optimizasyonlarında optimum nişasta konsantrasyonları kullanılan bakteri suşlarına göre değişkenlik göstermektedir. Yapılan bir çalışmada, kaplıca suyundan izole edilen bakterilerde amilaz üretimi için optimum nişasta konsantrasyonu %1,5 olarak belirlenmiştir (Sharif *et al.* 2023). Bir başka çalışmada ise topraktan izole edilen *Bacillus* sp.

bakterisinden amilaz üretimi için kültür parametreleri optimize edildiğinde optimum nişasta konsantrasyonu %2 olarak belirlenmiştir (Joshi and Yadav 2016). Bir diğer çalışmada, kaplıca suyundan izole edilen *Bacillus* sp. RSII-1b suşu amilaz kaynağı olarak kullanılmış ve daha yüksek amilaz üretimi için kültür parametreleri optimize edilmiştir. Çalışmada en yüksek amilaz aktivitesi %1,5 nişasta konsantrasyonu içeren kültür ortamında gerçekleşmiştir (Arfah *et al.* 2015). Literatür incelemelerine göre tez çalışmasında elde edilen optimum nişasta konsantrasyonu literatür ile uyumludur.

Optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi

İnkübasyon sıcaklığının bakteri gelişimi ve enzim aktivitesindeki değişimi üzerine etkisini incelemek ve en yüksek amilaz aktiviteye ulaşabilmek için farklı sıcaklık değerlerinde çalışıldı. Amilaz pozitif *N. alba* BT-5'in ön kültürü optimum değerlerde hazırlanan indüklenmiş besiyerlerine inoküle edildi, amilaz üretimi ve bakteriyel gelişimin değerlendirilmesi için 25-65°C arası sıcaklıklarda inkübe edildi. Spektrofotometreden elde edilen hücre büyüme değerleri (OD değerleri) ve DNS yöntemi ile belirlenen enzim aktiviteleri Tablo 23'de verildi. Elde edilen sonuçlara göre değişen inkübasyon sıcaklığına karşılık mikrobiyal yoğunluk ve belirlenen enzim aktivitelerinin grafiği çizildi (Şekil 32).

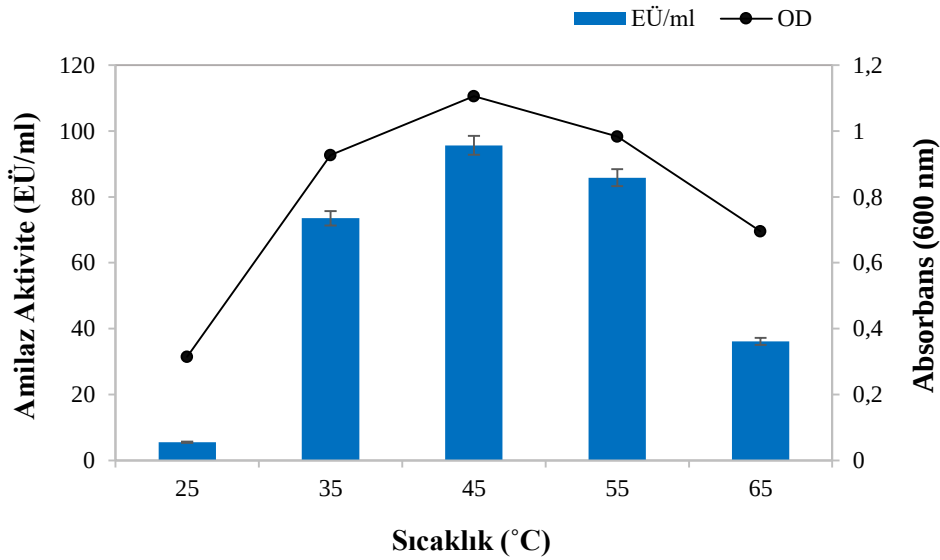
Tablo 23. 25-65°C Arası Sıcaklık Değerlerinde Kültür Sıvılarından Elde Edilen OD ve Amilaz Aktivite Değerleri

Sıcaklık (°C)	EÜ/ml	OD
25	5,54	0,315
35	73,52	0,927
45	95,63	1,106
55	85,81	0,983
65	36,14	0,696

Çalışılan 5 sıcaklık değeri incelendiğinde 35-55°C arası sıcaklıklarda daha belirgin bakteriyel gelişim ve enzim salınımı gerçekleşmiştir. 45°C'de bakteriyel gelişimin en fazla değere ulaşmasına bağlı olarak amilaz aktivite değeri oldukça yükselmiştir. Bu nedenle 45°C bakterinin amilaz üretimi için optimum kültür sıcaklığı olarak belirlendi ve sonraki basamaklarda bu sıcaklık değerinde çalışıldı.

Literatürde bakteri izolatları ile amilaz üretimi için gerçekleştirilen kültür optimizasyonu çalışmaları incelendiğinde yapılan bir çalışmada, kaplıca suyundan izole edilen termofilik *Bacillus licheniformis*-AZ2 suşundan ekstraselüler amilaz üretimi optimizasyonu 10-70°C arası sıcaklıklarda çalışılmış ve termofilik bakterinin en yüksek amilaz üretimi için optimum kültür sıcaklığı 40°C'de olarak belirlenmiştir (Deljou and Arezi 2016). Bir başka

çalışmada, kaplıca suyundan elde edilen termofilik *Bacillus subtilis* izolatı amilaz kaynağı olarak kullanılmış ve daha yüksek amilaz üretimi için kültür parametreleri optimize edilmiştir. Optimizasyon çalışmaları sonucunda en yüksek amilaz aktivite için optimum kültür parametreleri olarak 8,5 pH ve 45°C inkübasyon sıcaklığı bulunmuştur (Al-Johani *et al.* 2017). Literatür çalışmalarına göre kaplıca suyundan izole edilen termofilik bakterilerin bazıları 40-50°C sıcaklık aralığında optimum mikrobiyal gelişim göstermektedir. Bakterileri optimum gelişim gösterdiği sıcaklık değerlerine göre orta ılımlı termofilik, ekstrem termofilik ve hipertermofilik şeklinde sınıflandırmak mümkündür. Orta ılımlı termofilikler 45-64°C arası optimum gelişim göstermektedir (Stetter 2006; Kawasaki *et al.* 2011; Vaidya *et al.* 2020). Mevcut çalışmada kaplıca suyundan izole edilen *N. alba* bakterisinin farklı sıcaklıklarda elde edilen OD değerlerine göre en yüksek mikrobiyal gelişimi 45°C’de gösterdiğinden orta ılımlı termofilik olarak değerlendirilebilir. Ayrıca literatürde kaplıca suyundan izole edilen bakterilerin amilaz salınımı için belirlenen optimum sıcaklık değerleri ile mevcut tez çalışmasından elde edilen optimum sıcaklık değeri paralellik göstermektedir.



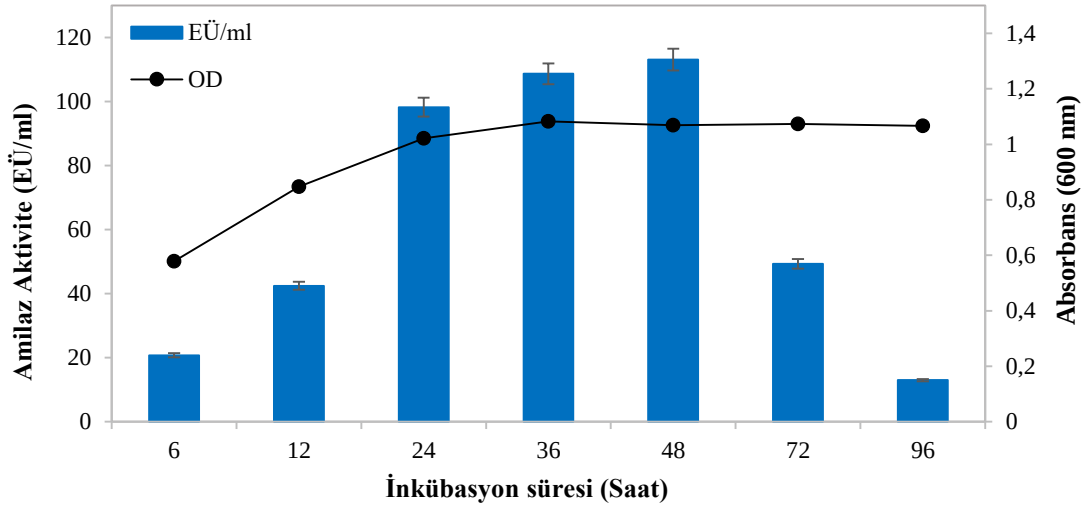
Şekil 32. 25-65°C arası sıcaklıklarda değişen amilaz aktivite ve 24 saatlik inkübasyon sonucu bakteriyel OD

Optimum inkübasyon süresinin belirlenmesi

İnkübasyon süresinin bakteri gelişimi ve enzim aktivitesindeki etkisi 4 günlük inkübasyon süresi boyunca test edilmiştir. Bunun için kültürde 6., 12., 24., 36., 48., 72 ve 96. saatlerde hücre büyümesi ve amilaz aktivitesi analiz edilmiştir. Zamana bağlı olarak hesaplanan EÜ/ml cinsinden aktivite birimleri ve ölçülen OD değerleri Tablo 24’de verildi. Verilere göre zamana karşı enzim aktivitesi ve OD değerlerinin grafiği çizildi (Şekil 33).

Tablo 24. 6. ve 96. Saatler Arası İnkübasyon Süresinde Kültür Sıvılarından Elde Edilen OD ve Amilaz Aktivite Değerleri

İnkübasyon süresi (saat)	EÜ/ml	OD
6	20,78	0,579
12	42,47	0,847
24	98,25	1,022
36	108,72	1,083
48	113,17	1,069
72	49,35	1,074
96	12,99	1,067



Şekil 33. 6.-96. saatler arası inkübasyon süresinde değişen amilaz aktivite ve bakteriyel OD

Tablo 24'deki veriler incelendiğinde bakteriyel gelişim 36. saate kadar artarken 36. saatten sonra bakteri çoğalması durup durağan faza geçmektedir. Enzim aktivitelerine bakıldığında ise başlangıç zamanlarında bakteri gelişimi ile paralellik gösterirken en yüksek aktiviteye 48. saatte ulaşılmıştır. Bu durum, *N. alba* BT-5 suşunun amilaz üretiminin maksimum geç logaritmik faz ya da erken durağan evrede gerçekleştiğini dolayısıyla bu zaman içerisinde en yüksek enzim aktivitesine ulaşıldığı yorumlanabilir. *N. alba* BT-5 izolatı için optimum inkübasyon süresi en yüksek enzim aktivitenin ulaşıldığı 48. saat olarak belirlenmiştir. Sonraki basamaklarda amilaz üretimi için belirlenen optimum değerler kullanılmıştır.

Literatür çalışmaları incelendiğinde bakteri izolatlarından ekstraselüler amilaz üretimi için kültür optimizasyonda en yüksek aktivitenin görüldüğü optimum inkübasyon süreleri değişkenlik göstermektedir. Yapılan bir çalışmada, üç farklı kaplıca suyundan izole edilen bakterilerin amilaz testi ve tür tespiti gerçekleştirilmiş, en yüksek enzim aktivitesine sahip izolatın türü *Cytobacillus firmus* OHA8 olarak belirlenmiştir. OHA8 izolatından amilaz üretimi

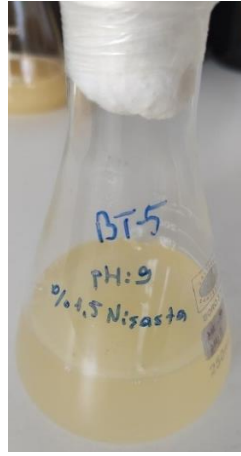
için kültür optimizasyonu gerçekleştirildiğinde optimum inkübasyon süresi 72 saat olarak tespit edilmiştir (Al-Harthy *et al.* 2024). Bir diğer çalışmada, izole edilen termofilik *B. subtilis* bakterisinden amilaz üretimi için kültür optimizasyonu yapıldığında optimum sıcaklık 45°C, optimum pH 8,5 ve optimum inkübasyon süresi ise 48 saat olarak belirlenmiştir (Al-Johani *et al.* 2017). Tez çalışması özellikle bu çalışma ile kıyaslandığında kültür optimizasyonu basamaklarında elde edilen veriler açısından oldukça fazla paralellik göstermektedir. Bir diğer çalışmada, kaplıca suyundan izole edilerek tür tespiti yapılan termofilik *Bacillus licheniformis* suşundan amilaz üretimi için kültür optimizasyonu çalışmaları gerçekleştirmiş ve en yüksek enzim aktivitesine 36 saatlik inkübasyon süresinde ulaşmıştır (Ardhi *et al.* 2020). Hindistan'daki kaplıca suyundan izole edilen *Bacillus licheniformis* TSI-14 bakterisi ile amilaz üretiminin optimizasyonu yanıt yüzey metodolojisi ile belirlenmiş ve optimum inkübasyon süresi 48 saat olarak tespit edilmiştir (Shukla and Singh 2015). Literatürde belirlenen optimum inkübasyon süreleri değişkenlik göstermekle beraber mevcut tez çalışmasında belirlenen optimal inkübasyon süresi literatür ile uyumludur.

Kültür Sıvısından Amilazın Saflaştırılması

Tek basamakta nişasta afinite tekniği ile amilaz saflaştırması geleneksel kolon kromatografik yöntemlere kıyasla önemli avantajlar sunmaktadır. Yüksek saflıkta amilaz saflaştırması için birden fazla basamak içeren geleneksel yöntemler uzun süren dengeleme, yıkama ve elüsyon işlemleriyle hem maliyet hem de zaman açısından dezavantajlıdır. Kromatografik yöntemlere kıyasla tek basamakta nişasta afinite tekniği basitleştirilmiş prosesi sayesinde oldukça hızlı, ucuz ve biyolojik olarak uyumlu olan nişasta maddesinin kullanımıyla yenilikçi bir yaklaşımdır. Geleneksel yöntemlerde birden fazla basamakta gerçekleştirilen saflaştırma işlemleri her adımda enzimin kaybına ve aktivitesinde azalmalara neden olmaktadır. Bu nedenle tek basamakta saflaştırma işlemi enzim aktivitesini daha iyi korumaktadır (Najafi and Kembhavi 2005; He and Snyder 2012; Sundarram and Murthy 2014; Fitchmun 2016).

Tek basamakta amilaz saflaştırma işlemi için Nişasta Afinite tekniği uygulandı ve optimum pH, çözünmez nişasta konsantrasyonu ve tutunma süresi gibi parametrelerin optimizasyonu ile enzimin substratına tutunma verimi üzerindeki etkisi incelenerek daha fazla tutunma, dolayısıyla da daha yüksek saflaştırma verimi eldesi amaçlandı. Şekil 5'te şematize edilen Nişasta Afinite Tekniği ile *N. alba* BT-5'in kültür sıvısından (Şekil 34) amilaz saflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Başlangıç enziminin aktivite değeri ve ilk santrifüj basamağı ile nişastaya tutunmayıp kaçan enzim çözeltisindeki aktivite değeri kullanılarak tutunma yüzdesi hesaplandığında %42,71 olarak belirlendi. Safsızlıkların giderilmesi için pellet fosfat tamponu ile yıkandı ve ardından %1 dekstrin çözeltisi ile elüe edildi. Elüsyon sonrası elde

edilen enzim çözeltisinden amilaz aktivite tayini yapıldı ve 58,25 EÜ/ml olarak hesaplandı. Daha yüksek tutunma oranına ulaşarak daha fazla enzim saflaştırabilmek için optimizasyon basamakları gerçekleştirildi.



Şekil 34. Optimum şartlar altında indüklenmiş besiyerinde inkübe edilen *N. alba* BT-5 izolatına ait kültür

Nişasta Afinite Tekniğinde %Tutunma Oranının Optimizasyonu

% Tutunma oranı için optimum pH'nın belirlenmesi

Amilazın substrata tutunma verimini artırabilmek için farklı pH değerleri incelendi. Bunun için ilk olarak kültür sıvısının pH'ı ölçüldü ve 4,8 olarak belirlendi. Ardından kültür sıvısı üç eşit hacme ayrılarak pH'ları sırasıyla 6, 7 ve 8'e ayarlandı ve Nişasta Afinite Tekniği adımları gerçekleştirildi. İlk santrifüj basamağı ile elde edilen süpernatantların ve başlangıç enzimlerinin aktiviteleri ölçülerek % tutunma oranları hesaplandı. Değişen pH değerlerine karşı hesaplanan tutunma yüzdelerinin grafiği çizildi (Şekil 35) ve değerler Tablo 25'de verildi. Tablodaki değerlere göre pH 6,0 ve pH 8,0'de enzimin substratına tutunma verimi düşerken en yüksek tutunma oranına sahip olan pH değeri 7,0 olarak belirlendi ve sonraki optimizasyon basamaklarında optimum tutunma pH'ı olarak kullanıldı.

%Tutunma oranı için optimum çözünmez nişasta konsantrasyonunun belirlenmesi

Farklı çözünmez nişasta konsantrasyonlarının enzimin substratına adsorpsiyonu üzerine etkisini incelemek için pH'ı 7,0'ye ayarlanan kültür sıvısı son konsantrasyonları %1, %2, %3 ve %4 olacak şekilde çözünmez nişasta ile karıştırıldı. Şekil 5'te şematize edilen Nişasta Afinite Tekniği ile amilaz saflaştırması gerçekleştirildi. İlk santrifüj işlemi ile elde edilen süpernatant ve başlangıç enzim çözeltisinden aktivite tayini yapıldı. Elde edilen değerler üzerinden % tutunma oranı hesaplandı. Veriler Tablo 25'de verildi ve değişen çözünmez nişasta konsantrasyonlarına karşı % tutunma grafiği çizildi (Şekil 35). Veriler incelendiğinde %2

çözünmez nişasta konsantrasyonunda enzimin substratına adsorpsiyonunun daha fazla olduğu ve dolayısıyla en yüksek %tutunma oranına sahip olduğu belirlendi. %1 nişasta konsantrasyonu enzimin tutunması için yeterli substratı sağlayamadığından daha düşük % tutunma oranına neden olmuş olabilir. Ayrıca %3 ve %4 konsantrasyonlarda da düşük tutunma oranı elde edilmiştir, bunun nedeninin yüksek substrat konsantrasyonunun enzimi inhibe etmesi dolayısıyla substrata ilgisinin azalması olduğu düşünülmektedir.

%Tutunma oranı için optimum tutunma süresinin belirlenmesi

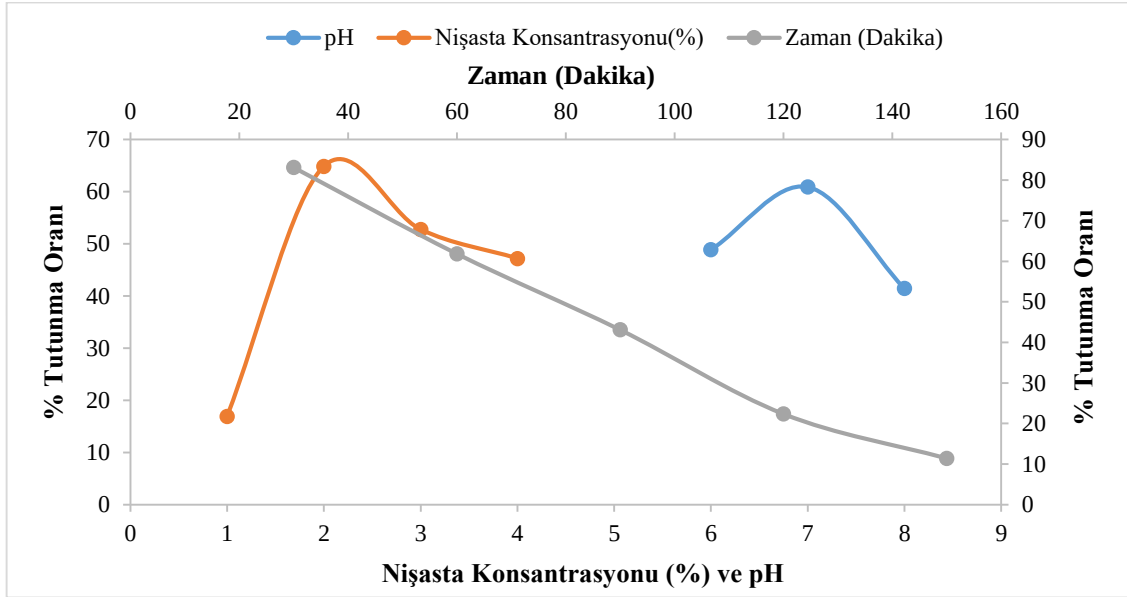
Amilazın substratına tutunması için optimum tutunma süresini belirlemek amacıyla pH 7,0'ye ayarlanan kültür sıvısı %2'lik çözünmez nişasta ile bir araya getirilerek Şekil 5'te şematize edilen Nişasta Afinite Tekniği adımları gerçekleştirildi. Sırasıyla 30., 60., 90. 120. ve 150. dk'larda numune alındı ve santrifüj edildi. Süpernatantlardan ve başlangıç enziminden aktivite tayini yapılarak % tutunma oranı hesaplandı. Sonuçlar Tablo 25'de verildi ve zamana karşı hesaplanan %tutunma oranının grafiği çizildi (Şekil 35).

Tablo 25. Saflaştırma Optimizasyonu için Değişen Parametrelere Karşı Elde Edilen %Tutunma Oranları

	Değişkenler	% TO
pH	6	48,89
	7	60,92
	8	41,48
Çözünmez Nişasta Konsantrasyonu (%)	1	16,91
	2	64,85
	3	52,78
	4	47,22
Zaman (Dakika)	30	83,15
	60	61,86
	90	43,12
	120	22,39
	150	11,43

Veriler incelendiğinde en yüksek tutunma oranının 30. dakika olduğu belirlendi. Bu süreden sonra süpernatantta enzim aktivitesinin artmasından kaynaklı tutunma oranı düşmeye başlamıştır. Bu durum enzimin substratından ayrıldığını fakat hala aktivite gösterdiğini ve bozulan enzim-substrat etkileşiminin denatürasyondan kaynaklı olmadığını göstermektedir. Enzimin substratından ayrılması BT-5 amilazının çözünmez nişastaya geri dönüşümlü olarak bağlandığını, tutunma süresinin uzatılması durumunda enzim-substrat etkileşiminden sorumlu

zayıf bağların bozulmaya başladığını ve desorpsiyonun gerçekleştiğini göstermektedir. Bu nedenle amilaz saflaştırma işleminde optimum tutunma süresi olarak 30. dk belirlendi. Optimum şartlar altında 100 ml hacimde indükleyici besiyerine *N. alba* BT-5 izolatu inoküle edildi ve inkübasyon sonrası elde edilen ham enzim kaynağından nişasta afinite tekniği ile optimal değerler kullanılarak amilaz saflaştırıldı. Saflaştırma öncesi ve saflaştırma sonrası elde edilen veriler Tablo 26’da verildi.



Şekil 35. pH, Nişasta konsantrasyonu ve tutunma zamanı optimizasyonlarına karşı %Tutunma Oranı grafiği

Literatürde amilazın saflaştırılması için kullanılan geleneksel yöntemlerde amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve iyon değişim kromatografisi gibi birden fazla basamaktan oluşan saflaştırma işlemleri gerçekleştirilmektedir (Lim *et al.* 2003). Tez çalışmasında optimize edilerek uygulanan saflaştırma işlemi daha düşük maliyetle ve daha yüksek verimde enzim eldesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan amilazın spesifik aktivite hesabı için sonraki adımlarda diyaliz işlemi ve Bradford yöntemi ile kantitatif protein tayini gerçekleştirildi.

Literatürde tek basamakta nişasta afinite metodu kullanılarak yapılan bir çalışmada, *Vibrio* sp. amilazı logaritmik fazın sonunda 8,5 U/ml aktivitede üretilmiştir. Amilaz saflaştırması için santrifüjlenen kültür sıvısından tek basamakta nişasta afinite yöntemi kullanılmış ve en son 327 U/mg spesifik aktivitede, 163,5 saflaştırma katsayısı ve %78 verimle *Vibrio* sp. amilazının saflaştırması gerçekleştirilmiştir (Najafi and Kembhavi 2005). Mevcut tez çalışması Najafi and Kembhavi (2005) tarafından elde edilen sonuçlar ile kıyaslandığında saflaştırma katsayısı ve verim açısından düşük kalmış olmasına rağmen saflaştırılan *N. alba* BT-5 amilazının spesifik aktivitesi çok daha yüksektir. Bir başka çalışmada, *Bacillus licheniformis* SO7’den amilaz saflaştırması için nişasta afinite yöntemi kullanılmıştır.

Saflaştırma sonrası 3,78 U/mg spesifik aktiviteye sahip enzim 1,95 saflaştırma katsayısı ve %28,65 verimle saflaştırılmıştır (Ölmez 2017). Tez çalışmasının verimleriyle kıyaslandığında *N. alba* BT-5 amilazının saflaştırılması için yapılan optimizasyon çalışmaları sonucu çok daha yüksek saflaştırma katsayısı ve %verim ile başarılı bir şekilde *N. alba* BT-5 amilazı saflaştırılmıştır.

Diyaliz

Saflaştırılan *N. alba* BT-5 amilaz çözeltisinin tamamı diyaliz torbasına aktararak fosfat tamponu içerisinde 24 saat buzdolabı sıcaklığında karıştırıldı (Şekil 36). Diyaliz işlemi ile enzimin elüsyonu sırasında kullanılan %1'lik dekstrin çözeltisi ve parçalanmış şeker türevleri gibi safsızlıkların uzaklaştırılması sağlandı. Diyaliz sonrası enzim çözeltisinden elde edilen veriler Tablo 26'da verildi.

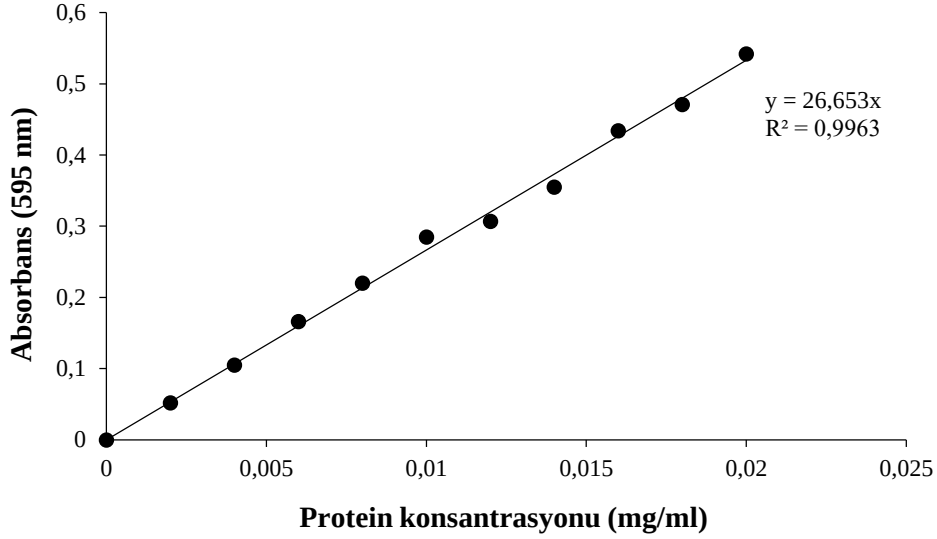


Şekil 36. Diyaliz deney düzeneği

Kantitatif Protein Tayini

Bradford yöntemi ile protein tayini

N. alba BT-5 izolatından elde edilen ham enzim kaynağı, saflaştırılan amilaz çözeltisi ve diyaliz sonrası elde edilen amilaz çözeltilerindeki protein miktarının belirlenebilmesi için Bradford yöntemi ile protein tayini gerçekleştirildi. Spektrofotometrik yöntem olan Bradford metodunda enzimin miktarına ulaşabilmek için öncelikle BSA standart çözeltileri hazırlandı ve 595 nm'de absorbansları ölçüldü. Elde edilen değerlere göre protein konsantrasyonuna karşı absorbans grafiği çizildi (Şekil 37). Standart grafiğinden elde edilen eğri denklemi kullanılarak kültür sıvısının ve saflaştırılan enzim çözeltisinin protein konsantrasyonu belirlendi. Protein konsantrasyonları kullanılarak kültür sıvısının ve saflaştırılan amilazın spesifik aktiviteleri hesaplandı.



Şekil 37. Bradford yöntemi ile protein tayininde kullanılan standart grafiği

Ham enzim kaynağına, bu enzim çözeltisinden Nişasta Afinite Tekniği ile gerçekleştirilen saflaştırma işlemine ve diyaliz sonrası elde edilen enzim çözeltisine ait veriler için tablo oluşturuldu (Tablo 26). Veriler incelendiğinde indüklenmiş besiyerinde gerçekleştirilen amilaz üretiminde kültür ortamındaki protein miktarı 0,13 mg/ml olarak belirlenirken saflaştırma sonrası elde edilen amilaz çözeltisinin protein konsantrasyonu 0,0301 mg/ml bulunmuştur. Belirlenen protein miktarı oldukça düşük ancak *Niallia alba* BT-5 amilazının spesifik aktivitesi ise çok yüksektir, bu durum *N. alba* BT-5 izolatının protein salınımının düşük olmasına rağmen enzimin katalitik olarak fazlaca aktif olduğunu göstermektedir. Diyaliz sonrası elde edilen enzim çözeltisinin protein konsantrasyonu 0,0293 mg/ml olarak belirlenmiştir. Diyaliz sonrası protein konsantrasyonunda meydana gelen azalma osmotik basınçtan dolayı su moleküllerinin membran içerisine difüzyonundan kaynaklı seyrelmesi nedeniyle gerçekleşmiştir. Diyaliz sonrası hacimdeki artışın nedeni de bu durumla açıklanmaktadır. Diyaliz işlemi sonrası meydana gelen seyrelme toplam protein, enzim aktivitesi ve toplam aktivite değerlerinin de düşmesine neden olmuştur. Fakat spesifik aktivite, saflaştırma katsayısı ve %verim artmıştır, çünkü uygulanan diyaliz işlemi sonrası enzim çözeltisi içerisindeki safsızlıklar giderilerek daha saf halde amilaz elde edilmiştir.

Literatür çalışmaları incelendiğinde, El-Sayed *et al.* (2017) tarafından yapılan çalışmada toprak örneğinden izole edilerek tür tanımlaması yapılan termofilik *Laceyella* sp. DS3 suşundan amilaz üretimi gerçekleştirilmiştir. Amonyum sülfat çöktürmesi ve kromatografik saflaştırma basamakları ile saflaştırılan amilazın karakterizasyonu yapıldığında en yüksek aktivitenin görüldüğü optimum sıcaklık 50°C, optimum pH ise 7,0 olarak belirlenmiştir. Saflaştırılan enzimin spesifik aktivitesi ise 1095,9 U/mg protein olarak bulunmuştur (El-Sayed *et al.* 2017). Bir başka çalışmada, sıcak su kaynağından izole edilerek

tür tanımlaması yapılan *Geobacillus thermoleovorans* K1C suşundan amilaz üretimi sonrası çöktürme, diyaliz ve kromatografik teknikler kullanılarak enzim saflaştırılmıştır. Çalışmada amilaz enziminin spesifik aktivitesi ham enzim ekstraktında 537 U/mg protein iken iyon değişim kromatografisi ile elde edilen amilaz çözeltisinde 3009 U/mg bulunmuştur. Uygulanan saflaştırma işlemleri sonrası saflaştırma katsayısı 6, saflaştırma verimi ise %22,1 olarak belirlenmiştir (Sudan *et al.* 2018). İncelenen bu iki çalışmada kullanılan termofilik bakterilerden saflaştırılan amilazın spesifik aktivitelerine kıyasla *N. alba* BT-5 amilazının spesifik aktivitesi daha yüksektir (4679,2 EÜ/ml). *Geobacillus thermoleovorans* K1C suşundan geleneksel kromatografik yöntemlerle gerçekleştirilen amilaz saflaştırması sonucu elde edilen saflaştırma katsayısı (Sudan *et al.* 2018), tez çalışmasında tek adımda nişasta afinite tekniği ile yapılan amilaz saflaştırma işlemi ile ulaşılan saflaştırma katsayısına yakındır (Nişasta afinite için saf. katsayısı 5,18). Ayrıca kromatografik yöntemlerle gerçekleştirilen saflaştırma işleminin verimi %22,1 iken tez çalışmasında nişasta afinite tekniği ile ulaşılan saflaştırma verimi %56,37, diyaliz sonrası ise %56,7'dir. Bu sonuçlar birden fazla adımla gerçekleştirilen kromatografik saflaştırma yöntemleriyle ulaşılan değerlere tek basamakta yapılan nişasta afinite metodu ile de ulaşılabileceğini göstermektedir.

Tablo 26. *Niallia alba* BT-5 İzolatından Saflaştırılan Ekstraselüler Amilazın Saflaştırma Tablosu

	<i>Hacim (ml)</i>	<i>Protein (mg/ml)</i>	<i>Toplam Protein (mg)</i>	<i>Aktivite (EÜ/ml)</i>	<i>Toplam Aktivite (EÜ)</i>	<i>Spesifik Aktivite (EÜ/mg)</i>	<i>Saflaştırma Katsayısı</i>	<i>% Verim</i>
<i>Ham Enzim Kaynağı</i>	100	0,13	13	116,24	11624	894,15	1	100
<i>Nişasta Afinite</i>	47	0,0301	1,415	139,41	6552,27	4630,58	5,18	56,37
<i>Diyaliz sonrası</i>	48,1	0,0293	1,409	137,1	6594,3	4679,2	5,23	56,7

El-Sayed *et al.* (2019) tarafından gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise *Laceyella* sp. DS3 suşunun amilaz sentezinden sorumlu geni *E. coli* TOP10'la klonlanıp ardından *E. coli* BL21 bakterisinde eksprese edilmiştir. Kültür sıvısındaki amilaz, jel filtrasyon ve iyon değişim kromatografi basamakları uygulanarak saflaştırılmış ve enzimin spesifik aktivitesi 41,83 U/mg protein, saflaştırma verimi %27,42, saflaştırma katsayısı ise 2,19 olarak belirlenmiştir (El-Sayed *et al.* 2019). Tez çalışmasında *N. alba* BT-5 amilazı için gerçekleştirilen tek basamaklı nişasta afinite tekniği ile saflaştırma işlemi sonucu elde edilen spesifik aktivite, %verim ve saflaştırma katsayısı değerleri El-Sayed *et al.* (2019) tarafından gerçekleştirilen çalışma verilerine göre daha yüksektir, böylece tez çalışmasında uygulanan tekniğin geleneksel

kromatografik saflaştırma basamakları kadar spesifik ve etkili bir saflaştırma yöntemi olduğunu göstermektedir.

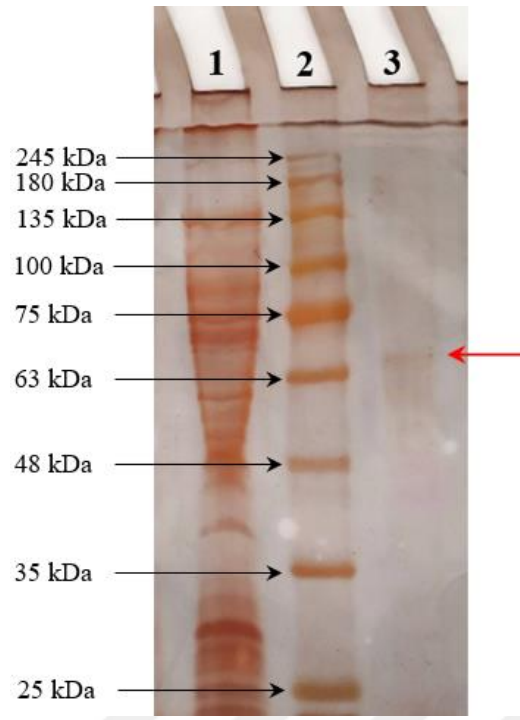
SDS-PAGE ile enzimin alt birimlerinin molekül ağırlığının belirlenmesi

N. alba BT-5 amilazının alt birim molekül ağırlığını belirlemek için SDS-PAGE uygulandı (Şekil 38). İzolatın indükleyici besiyerinde yani nişasta temelli besiyerinde inkübasyonu sonucu elde edilen kültür sıvısı, Protein Standardı ve Nişasta Afinite Tekniği ile saflaştırılan amilaz çözeltisi kuyulara yüklendi ve yürütme işlemi gerçekleştirildi. Yürütme işlemi sonlandıktan sonra bantların belirgin hale gelebilmesi için jel gümüş nitrat boyasına tabi tutuldu (Şekil 39). Jel görüntüsünde saflaştırılan amilaz çözeltisine ait kuyuda tek bir bant gözlemlendi, dolayısıyla nişasta afinite tekniği ile gerçekleştirilen saflaştırma işleminin başarılı olduğu görüldü. Ayrıca jelde tek bant görülmesi enzimin farklı molekül ağırlıklı alt birimlerden meydana gelmediğini ve tek alt birimden meydana geldiğini göstermektedir. 2. Kuyuya yüklenen protein standartlarının R_f değerleri kullanılarak molekül ağırlıklarının logaritmasına karşı grafiği çizildi (Şekil 40) ve saf enzimin R_f değeri kullanılarak *N. alba* BT-5 amilazının molekül ağırlığı 72,1 kDa olarak belirlendi.

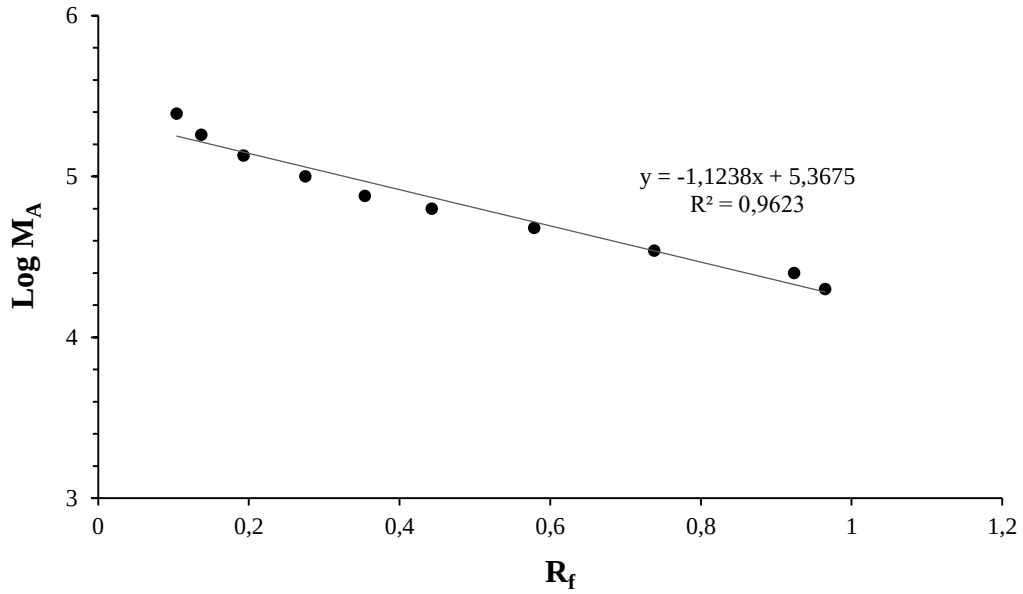


Şekil 38. SDS-PAGE için ayırma ve yığma jellerinin kasetlere yüklenmesi

Literatür çalışmalarına göre amilazın molekül ağırlığı 10 kDa ile 210 kDa arasında değişmektedir. En düşük molekül ağırlığına (10 kDa) sahip amilaz, *Bacillus caldolyticus* (Grootegeod *et al.* 1973)'dan, en yüksek molekül ağırlığı (210 kDa) ise *Chloroflexus aurantiacus* (Ratanakhanokchai *et al.* 1992) bakterisinden elde edilmiştir (Gupta *et al.* 2003). Yapılan bir çalışmada, Hindistan'daki bir kaplıcadan izole edilen termofilik *Bacillus stercoris* YSP18 amilazı monomerik yapıda ve 67 kDa molekül ağırlığında bulunmuştur (Sharma *et al.* 2025). Bir başka çalışmada ise yine kaplıca suyundan izole edilen *Geobacillus thermoleovorans* KCTC 3570 bakterisinin amilazının molekül ağırlığı yaklaşık 59 kDa olarak belirlenmiştir (Sudan *et al.* 2018). Bu sonuçlara göre mevcut çalışmada *N. alba* BT-5 amilazının belirlenen 72,1 kDa'luk molekül ağırlığı literatür ile uyumludur.



Şekil 39. Gümüş nitrat ile boyanan SDS-PAGE jel görüntüsü (1. Kuyu Kültür sıvısı; 2. Kuyu Protein Standardı; 3. Kuyu Nişasta Afinite Tekniği ile saflaştırılan *N. alba* BT-5 amilazı)



Şekil 40. Protein standardının R_f-Log M_A grafiği

Saflaştırılan Amilazın Karakterizasyonu

Enzim için optimum pH'nın belirlenmesi

Saflaştırılan enzimin hangi koşullarda en yüksek aktiviteye sahip olduğunu belirlemek özellikle endüstriyel uygulamalarda enzimden daha fazla verim elde edebilmek için oldukça önemlidir. pH, sıcaklık, metal iyonları gibi değişkenler enzim aktivitesi üzerine etki eden önemli parametrelerdir. pH'daki değişiklikler, enzimin üçüncül yapısını yerinde tutan iyonik

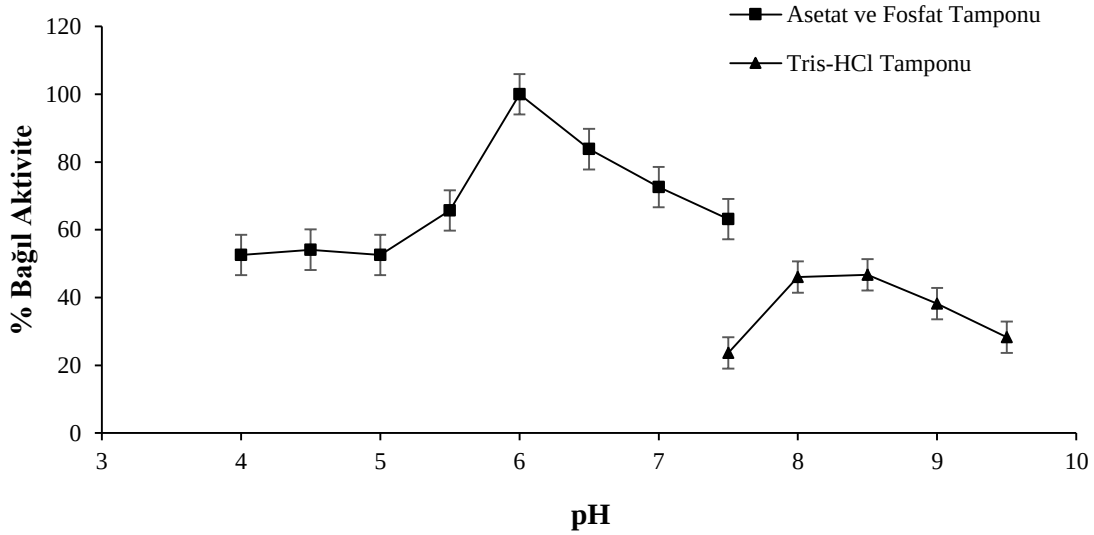
bağların kırılmasına yol açabilir ve enzimin işlevsel şeklini, özellikle aktif bölgenin şeklini kaybetmesine neden olabilir. pH değişimleri enzimlerin yapısında var olan aminoasitlerin iyonizasyon özelliklerinin ve enzim substrat bağlantı bölgesi olan aktif bölgenin yapısal değişikliklerine neden olarak enzim aktivitesini etkiler (Raza 2011). pH değişimlerine göre enzimin %Bağıl aktivitesi ortaya koyularak en yüksek aktivitenin görüldüğü pH değerinin belirlenmesi için pH 4,0-5,0 (50 mM Asetat tamponu), pH 5,5-7,5 (50 mM Fosfat tamponu) ve pH 7,5-9,5 (50 mM Tris-HCl tamponu) değerlerinde çalışıldı. En yüksek aktivite 100 kabul edilerek tüm pH değerlerine karşılık gelen %Bağıl Aktivite hesaplandı ve değerler Tablo 27’de verildi. Şekil 41’de değişen pH değerlerine karşı %Bağıl aktivite grafiği çizildi. Tüm sonuçlar incelendiğinde saflaştırılan amilazın en yüksek aktivite gösterdiği optimum pH 6,0 (Fosfat tamponu) olarak belirlendi.

Tablo 27. Değişen pH Değerlerine Karşı *N. alba* BT-5 Amilazının %Bağıl Aktivite Değerleri

pH	%Bağıl Aktivite
4,0	52,58
4,5	54,12
5,0	52,58
5,5	65,73
6,0	100
6,5	83,8
7,0	72,58
7,5	63,12/23,68
8,0	46,05
8,5	46,7
9,0	38,16
9,5	28,3

Literatürde çok farklı bakteri türlerinden amilaz saflaştırması gerçekleştirilmiş ve elde edilen enzim çözeltilisinin karakterizasyonu için farklı parametreler ile çalışılmıştır. Yapılan bir çalışmada, sıcak su kaynağından izole edilen termofilik *B. licheniformis* HULUB1 ve *B. subtilis* SUNGB2 suşlarından amilaz üretimi ve saflaştırması gerçekleştirilmiştir. Enzimin karakterizasyon çalışmalarında her iki bakterinin amilaz enzimi için en yüksek aktiviteye pH 6,0 değerinde ulaşılmıştır. Enzim üretimi için bakterilerin kültür parametreleri optimizasyonu da yapılmış, en yüksek amilaz üretimi için optimum pH 8,0 olarak belirlenirken saflaştırılan amilazın optimum pH değeri 6,0 olarak bulunmuştur (Msarah *et al.* 2020). Benzer durum mevcut tez çalışmasında da görülmüştür. *N. alba* BT-5 bakterisinin enzim üretimi için optimum başlangıç kültür pH’ı 9,0 iken bakteriden saflaştırılan enzimin en yüksek aktivite gösterdiği

optimum pH'ı 6,0 olarak belirlenmiştir. Bir başka çalışmada ise termofilik *Anoxybacillus flavithermus* sp. SO-19 bakterisinden amilazın kısmi saflaştırması yapılmış ve enzim karakterizasyonu çalışmalarında en yüksek amilaz aktivitenin görüldüğü pH değeri 6,0 olarak belirlenmiştir (Özdemir *et al.* 2016). Bu sonuçlara göre mevcut tez çalışmasından elde edilen deneysel verinin literatür ile uyum gösterdiği görülmektedir.



Şekil 41. Değişen pH değerlerine karşı %Bağıl Aktivite değerlerine göre BT-5 amilazının optimum pH grafiği

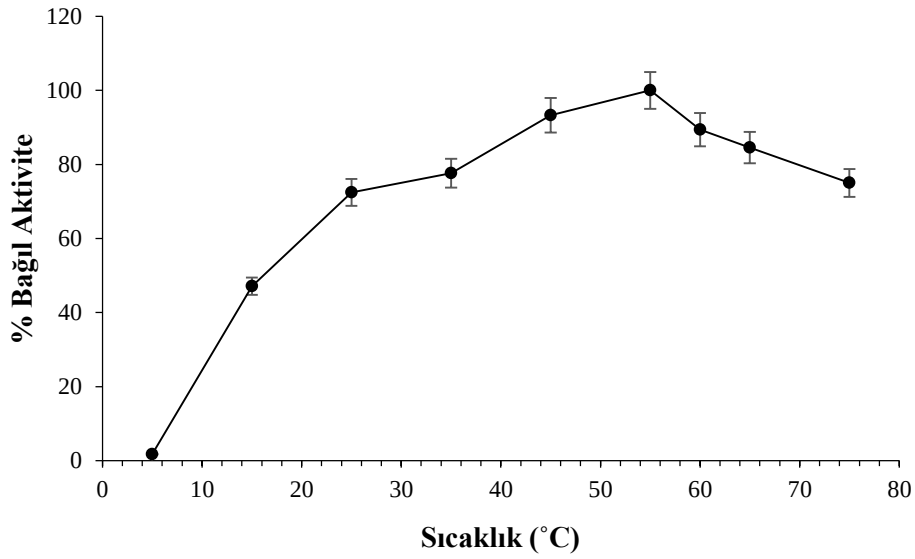
Enzim için optimum sıcaklığın belirlenmesi

Enzim aktivitesini etkileyen bir diğer parametre de sıcaklıktır. Endüstriyel uygulamalarda yüksek sıcaklıkta aktivite gösteren termostabil enzimler dayanıklılıkları nedeniyle tercih edilir. Yüksek sıcaklık hem reaksiyon hızını arttırmakta hem de mikrobiyal kontaminasyonu azaltmaktadır. Düşük sıcaklık enzimlerin aktivitesini yavaşlatırken yüksek sıcaklık ise enzimleri denatüre edebilir (Turner *et al.* 2007). Bu nedenle tüm enzimlerin en yüksek aktivite gösterdiği optimum sıcaklık değerleri mevcuttur. Saflaştırılan *N. alba* BT-5 amilazının aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini inceleyebilmek için 5-75°C arasındaki sıcaklıklar denendi ve en yüksek aktivitenin görüldüğü değer optimum sıcaklık olarak belirlendi. En yüksek aktivite 100 kabul edilerek farklı sıcaklıklarda değişen aktivitelerden %Bağıl aktivite değerleri hesaplandı. Elde edilen veriler Tablo 28'de verildi ve değişen sıcaklığa karşı %Bağıl aktivite grafiği çizildi (Şekil 42). Sonuçlar incelendiğinde, 5°C sıcaklık enzimin aktivite göstermesi için oldukça düşük iken 15°C'den itibaren enzim aktivitesi kayda değer şekilde artmaya başlamıştır. Amilazın en yüksek aktivitesi 55°C'de ölçülmüş ve 55°C'nin üzerindeki sıcaklıkların enzim aktivitesini olumsuz yönde etkilediği görülmüştür (Şekil 41). Bu durum, önceki çalışmalarda rapor edildiği gibi sıcaklığın enzimler üzerindeki denatürasyon

etkisine bağlanabilir (Anto *et al.* 2006; Daniel *et al.* 2008). Sonuç olarak, *N. alba* BT-5 amilazının en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık 55°C olarak belirlendi.

Tablo 28. Değişen Sıcaklık Değerlerine Karşı *N. alba* BT-5 Amilazının %Bağıl Aktivite Değerleri

Derece (°C)	%Bağıl Aktivite
5	1,74
15	47,11
25	72,48
35	77,68
45	93,29
55	100
60	89,40
65	84,55
75	75,03



Şekil 42. *N. alba* BT-5 amilazının değişen sıcaklık değerlerindeki aktivitesine bağlı olarak çizilen optimum sıcaklık grafiği

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde, Fincan and Enez (2022), tarafından yapılan çalışmada toprak örneğinden izole edilen *Bacillus megaterium* MD-1 bakterisinden amilaz izolasyonu gerçekleştirilmiş ve enzimin 30-55°C arası sıcaklıklarda aktivitesi incelendiğinde en yüksek amilaz aktivitesi 40°C olarak belirlenmiştir (Fincan and Enez 2022). Başka bir çalışmada ise sıcak su kaynağından saflaştırılan termofilik *Bacillus licheniformis* HULUB1 izolatından elde edilen amilazın kısmi saflaştırılması gerçekleştirilmiş ve enzim karakterizasyonunda en yüksek enzim aktivitesi 65°C’de (18,15U/mL) olarak belirlenmiştir. Bu

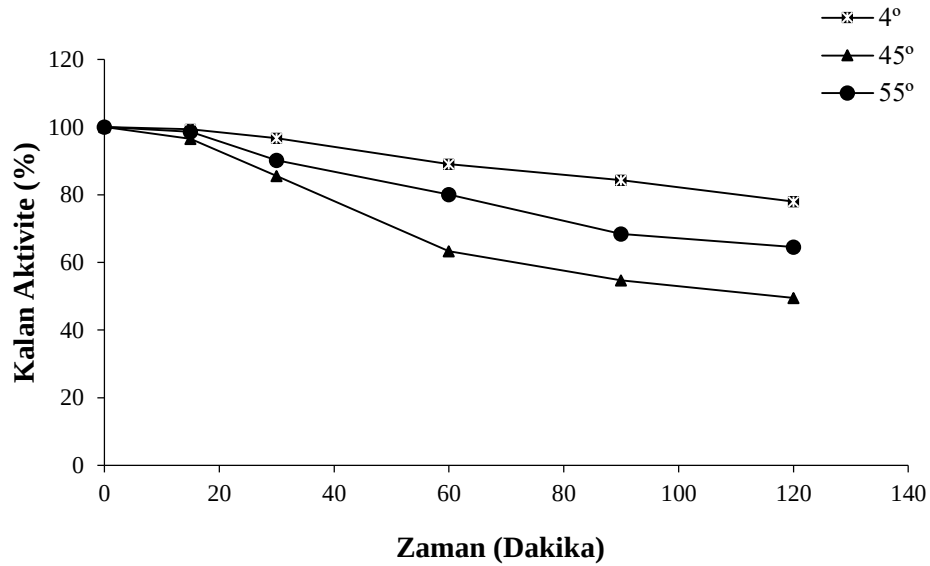
aktiviteye en yakın ikinci yüksek enzim aktivitesi ise 55°C’de rapor edilmiştir (Msarah *et al.* 2020). Aladejana *et al.* (2020) çalışmasında *Bacillus subtilis* Y25 izolatından amilaz üretimi için kültür optimizasyonu gerçekleştirmiş ve optimum inkübasyon sıcaklığı 45°C, optimum başlangıç pH’ı 8,0 olarak belirlenmiştir. İyon değişim kromatografisi ile saflaştırılan amilazın en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık 60°C olarak bulunmuştur (Aladejana *et al.* 2020). Bir başka çalışmada, Wang *et al.* (2016) *Bacillus* sp.’den izole edilen amilazın karakterizasyonu çalışmalarını gerçekleştirmiş ve en yüksek enzim aktivitesi 55°C’de (17,94U/mL) belirlenmiştir (Wang *et al.* 2016). Bu verilere göre elde edilen *N. alba* BT-5 amilazının en yüksek aktivite gösterdiği 55°C’lik sıcaklık literatürde elde edilen optimum sıcaklık değerleri ile örtüşmektedir.

Enzimin ısı kararlılığının belirlenmesi

N. alba BT-5 izolatından saflaştırılan amilaz, depolama sıcaklığı (4°C), bakterinin inkübasyon sıcaklığı (45°C) ve enzimin optimum sıcaklığında (55°C) 120 dk boyunca bekletildi. Aralıklı olarak enzimin belirlenen optimum değerleri altında aktiviteleri ölçüldü. Ön işlem uygulanmamış enzim aktivitesi ile kıyaslanarak hesaplanan aktivitelerden %Kalan aktivite hesabı yapıldı. Elde edilen sonuçlar Tablo 29’da verildi ve zamana karşı %Kalan aktivite grafiği çizildi (Şekil 43). Veriler incelendiğinde ilk yarım saat boyunca enzim aktivitesi 4°C’de %96,69 oranında korunabilmişken 45°C’de enzimin kalan aktivitesi %85,53, 55°C’de ise %90,21’dir. 1 saatlik süre sonunda 4°C, 45°C ve 55°C sıcaklıklardaki amilaz aktiviteleri sırasıyla %89,05, %63,32 ve %80,11 oranında korunmuştur. İki saatlik inkübasyonun sonunda 4°C’de enzim aktivitesinde %22’lik, 45°C’de %50,48’lik, 55°C ise %35,47’lik kayıp vardır. BT-5 amilazı 45°C sıcaklıkta 120. dakikada aktivite kaybederek yarılanma ömrüne ulaşmıştır. Sonuçlara göre *N. alba* BT-5 amilazı depolama sıcaklığında (4°C) ve en yüksek enzimatik aktivitenin görüldüğü 55°C’de aktivitesini koruyabilirken bakterinin inkübasyon sıcaklığı olan 45°C’de ise daha düşük ısı kararlılık göstermiştir.

Tablo 29. 4°C, 45°C ve 55°C Sıcaklıklarda *N. alba* BT-5 Amilazının Kalan Aktivitesinin Zamana Bağlı Değişimi

Zaman (dk)	% Kalan Aktivite		
	4°C	45°C	55°C
15	99,35	96,50	98,58
30	96,69	85,53	90,21
60	89,05	63,32	80,11
90	84,33	54,66	68,41
120	77,95	49,52	64,53



Şekil 43. *N. alba* BT-5 amilazının zamana bağlı ısıl kararlılık grafiği

Daha önce yapılan çalışmalar incelendiğinde, Aladejana *et al.* (2020) tarafından yapılan çalışmada *Bacillus subtilis* Y25 izolatından saflaştırılan ve karakterizasyonu yapılan amilazın en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık 60°C bulunmuş ve enzimin bu sıcaklıktaki termal kararlılığı incelendiğinde ise 30., 40. ve 50. dakikadaki kalan aktivitesi sırasıyla %70,39, %56,89 ve %50,44 olarak belirlenmiştir (Aladejana *et al.* 2020). Tez çalışmasında kullanılan *N. alba* BT-5 amilazının en yüksek aktivite gösterdiği 55°C'deki ısıl kararlılığı incelendiğinde 2 saatin sonunda bile yarı ömrüne ulaşmadığı ve dolayısıyla Aladejana *et al.* (2020) tarafından saflaştırılan amilazdan daha yüksek termal stabiliteye sahip olduğu belirlenmiştir. Fincan *et al.* (2014) tarafından gerçekleştirilen çalışmada sıcak su kaynağından izole edilen *Anoxybacillus flavithermus* suşundan ekstraselüler amilaz üretimi yapılmış, amonyum sülfat çöktürmesi ve iyon değişim kromatografisi ile enzim saflaştırılmıştır. Enzimin karakterizasyon çalışmalarında termofilik *Anoxybacillus flavithermus* amilazının 40 ve 45°C'de termal stabiliteye sahip olduğu ancak 55°C'de 45 dakikanın sonunda enzimin %kalan aktivitesinin yaklaşık %70 olduğu belirlenmiştir (Fincan *et al.* 2014). Mevcut çalışmada kullanılan *N. alba* BT-5 amilazı ise 55°C'de 1 saatlik süre sonunda aktivitesinin %80,11'ini korumuştur. Singh *et al.* (2016), çalışmalarında, *Bacillus sp.* B-10 suşundan ekstraselüler amilaz üretimi gerçekleştirilmiş ve enzimin termal stabilitesi araştırılmıştır. Deneysel analizler sonucu 30, 40, 50 ve 60°C sıcaklıklardaki 2 saatlik inkübasyonda enzim aktivitesi sırasıyla $95 \pm 3,97$, $74 \pm 2,11$, $59 \pm 1,88$ ve $23 \pm 1,01$ korunmuştur (Singh *et al.* 2016). Tez çalışması ile kıyaslandığında 55°C'de 2 saat inkübe edilen BT-5 amilazının kalan aktivitesine (%64,53) yakın değerler elde edilmiştir. Literatür çalışmaları ile kıyaslandığında *N. alba* BT-5 amilazının termal stabilite gösterdiği, dolayısıyla endüstriyel enzim teknolojisinde tekstil, fırıncılık ve nişasta işleme

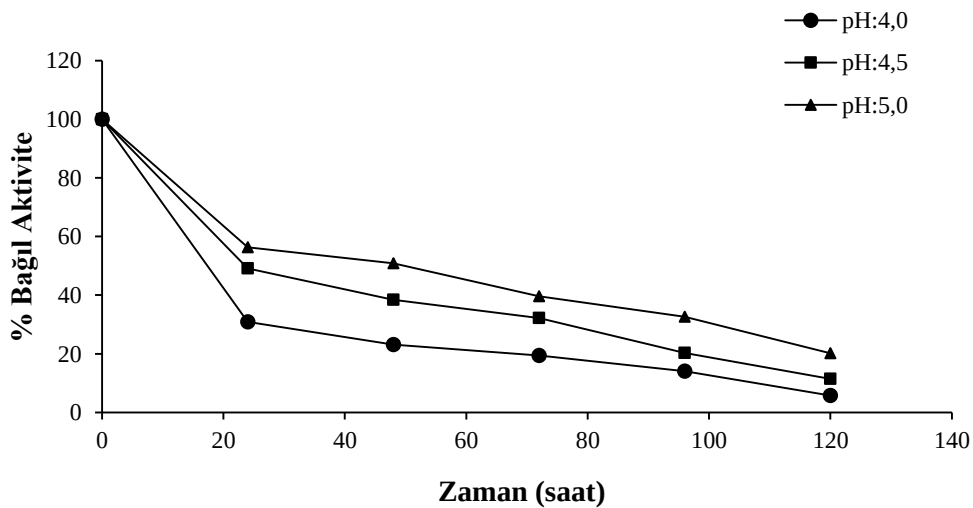
prosesleri gibi sıcaklık uygulaması gerektiren endüstriyel uygulamalarda kullanım potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir.

Enzimin pH kararlılığının belirlenmesi

Saflaştırılan *N. alba* BT-5 amilazının pH kararlılığı incelenmiş ve farklı pH değerlerindeki enzim aktiviteleri kaydedilmiştir. Asetat tamponu ile karıştırılan enzimin %Kalan aktivite değerleri Tablo 30’da verilmiş ve pH kararlılık grafiği Şekil 44’te çizilmiştir. Verilere göre ilk 24 saatte pH 4,0’de %30,91, pH 4,5’de %49,09 ve pH 5,0’de %56,36 oranında BT-5 amilazının aktivitesi korunmuştur. Diğer günlerde enzimin %kalan aktivitesi düşmüş ve 120 saatin sonunda pH 4,0, 4,5 ve 5,0’de enzimin kalan aktiviteleri sırasıyla %5,73, %11,46 ve %20,13 oranında korunmuştur. Tüm veriler incelendiğinde asetat tamponu ile gerçekleştirilen pH kararlılığında en yüksek pH 5,0’de enzimin aktivitesi korunabilmiştir.

Tablo 30. Asetat Tamponu ile Hazırlanan Farklı pH Değerlerinde *N. alba* BT-5 Amilazının Kalan Aktivitesinin Zamana Bağlı Değişimi

Saat	% Kalan Aktivite		
	pH:4,0	pH:4,5	pH:5,0
24	30,91	49,09	56,36
48	23,14	38,45	50,82
72	19,42	32,23	39,56
96	14,05	20,27	32,64
120	5,73	11,46	20,13



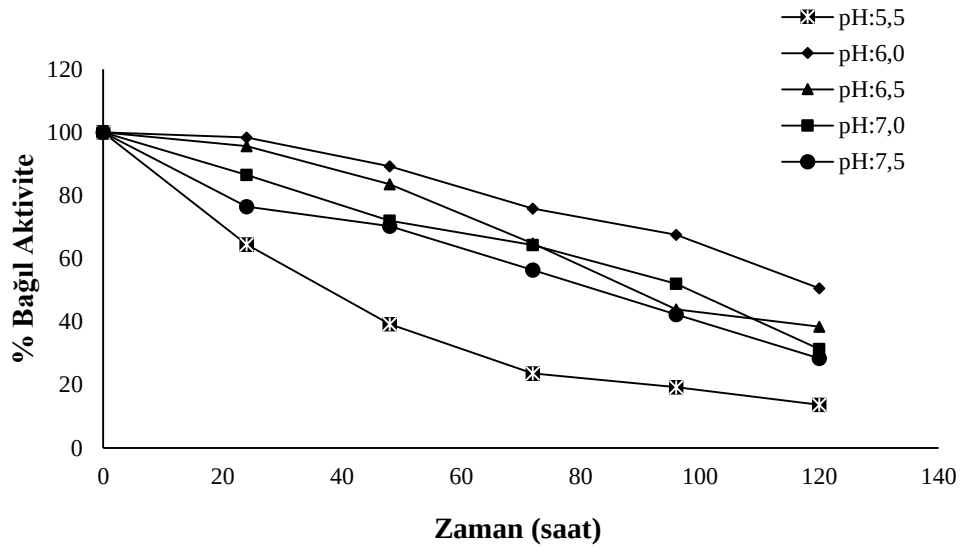
Şekil 44. *N. alba* BT-5 amilaz aktivitesinin asetat tamponu ile belirlenen pH kararlılığı grafiği

Fosfat tamponu ile karıştırılan enzimin %Kalan aktivite değerleri Tablo 31’de verilmiş ve pH kararlılık grafiği Şekil 45’te çizilmiştir. Verilere göre ilk 24 saatte en yüksek pH 6,0’da

(%98,45), en düşük ise pH 5,5’de (%64,55) enzim aktivitesi korunmuştur. Diğer zamanlarda enzimin %Kalan aktivite değerleri düşmüş ve 120 saatin sonunda korunan en yüksek enzim aktivitesi pH 6,0’da (%50,64) belirlenmiştir. Fosfat tamponu ile karıştırılan enzimin en düşük pH 5,5’da (13,64) aktivitesi korunabilmiştir.

Tablo 31. Fosfat Tamponu ile Hazırlanan Farklı pH Değerlerinde *N. alba* BT-5 Amilazının Kalan Aktivitesinin Zamana Bağlı Değişimi

Saat	% Kalan Aktivite				
	pH:5,5	pH:6,0	pH:6,5	pH:7,0	pH:7,5
24	64,55	98,45	95,73	86,55	76,55
48	39,27	89,27	83,57	72,00	70,27
72	23,60	75,91	64,82	64,27	56,36
96	19,27	67,52	43,96	52,00	42,25
120	13,64	50,64	38	31,36	28,38



Şekil 45. *N. alba* BT-5 amilaz aktivitesinin fosfat tamponu ile belirlenen pH kararlılığı grafiği

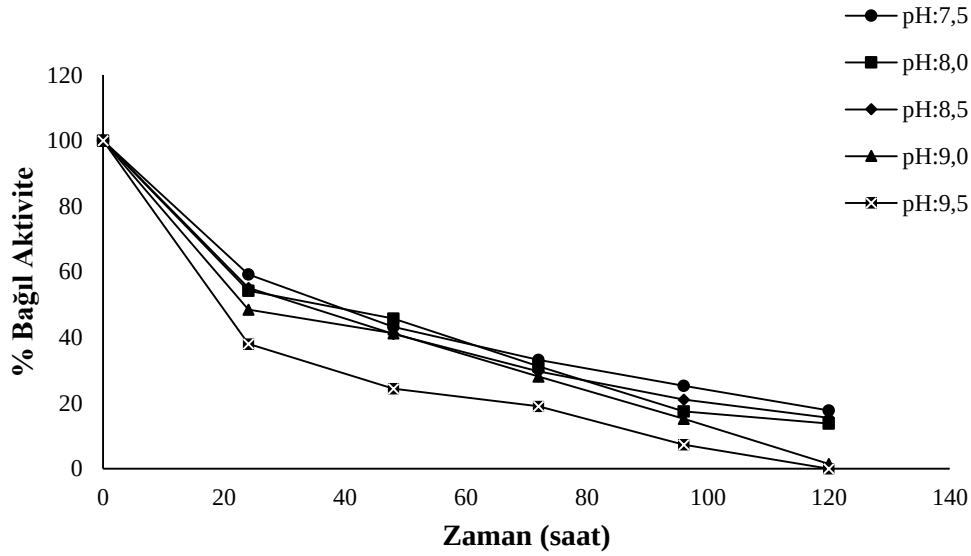
Tris-HCl tamponu ile karıştırılan enzimin %Kalan aktivite değerleri Tablo 32’de verilmiş ve pH kararlılık grafiği Şekil 46’da çizilmiştir. Verilere göre ilk 24 saatte enzimin kalan aktivitesi en yüksek pH 7,5’da (%59,27) korunmuştur. Zamanla bütün pH değerlerinde enzim aktivite kaybına uğramış ve 120 saatin sonunda pH 9,5’da aktivite tamamen kaybolduğu için deney sonlandırılmıştır.

Tablo 32. Tris-HCl Tamponu ile Hazırlanan Farklı pH Değerlerinde *N. alba* BT-5 Amilazının Kalan Aktivitesinin Zamana Bağlı Değişimi

Saat	% Kalan Aktivite				
	pH:7,5	pH:8,0	pH:8,5	pH:9,0	pH:9,5
24	59,27	54,27	55,09	48,49	38,09
48	43,27	45,82	41,09	41,27	24,36
72	33,18	31,27	29,68	28,12	19,00
96	25,27	17,52	21,09	15,27	7,36
120	17,74	13,76	15,56	1,46	0

N. alba BT-5 amilazının pH stabilitesi incelendiğinde Asetat ve Tris-HCl tamponları ile çalışılan pH değerlerinde enzimin stabilitesinin zayıf olduğu fosfat tamponu ile çalışılan pH değerlerinde ise enzimin daha stabil kaldığı görülmektedir. Tüm veriler içerisinde *N. alba* BT-5 amilazı en yüksek pH 6,0'da stabilite göstermiş ve 5. günün sonunda yarı ömrüne ulaşmıştır. Enzim pH 6,0 ve 6,5'da 24 saatin sonunda aktivitesini sırasıyla %98,45 ve %95,73 oranında korumuş, 48 saatin sonunda ise kısmen aktivite kaybına uğrasa da oldukça yüksek oranda aktivitesini koruyabilmiştir (sırasıyla %89,27 ve %83,57).

Alhazmi and Alshehri (2025), *Bacillus cereus* GL2 suşundan amilaz üretimi sonrası amonyum sülfat çöktürmesi ve kromatografik yöntemler ile enzim saflaştırmışlardır. Saflaştırılan enzimin karakterizasyonu gerçekleştirildiğinde en yüksek amilaz aktivitenin görüldüğü optimum pH 6,0 iken pH stabilitesi analizinde ise enzimin pH 5,0-7,0 arasında stabil kalarak enzim aktivitesini koruduğu gözlenmiştir (Alhazmi and Alshehri 2025). Zhang *et al.* (2021) tarafından gerçekleştirilen çalışmada ise *Bacillus velezensis*'den saflaştırılan amilazın karakterizasyonu için yapılan pH stabilizasyonunda 48 saatin sonunda pH 6,0'da enzim aktivitesinin %71,59'u korunduğu belirlenmiştir (Zhang *et al.* 2021). Bir başka çalışmada, *Bacillus* sp. B-10 izolatının amilazı için pH stabilizasyonu analizi gerçekleştirilmiş ve deneysel verilere göre pH 7,0'de en yüksek stabilizasyona ulaşılmıştır (Singh *et al.* 2016). İncelenen literatür çalışmalarına göre *Bacillus* suşlarından gerçekleştirilen amilaz saflaştırması ve karakterizasyonu verilerinde elde edilen stabil pH değerleri mevcut tez çalışmasından elde edilen değerler ile paralellik göstermektedir. *N. alba* BT-5 amilazının pH 6,0 ve 6,5 değerlerinde stabil kalabilmesi özellikle meyve suyu ya da tekstil endüstrisi gibi hafif asidik ortamlarda ihtiyaç duyulan enzimatik aktivite için kullanıma uygun olduğunu göstermektedir.



Şekil 46. *N. alba* BT-5 amilaz aktivitesinin Tris-HCl tamponu ile belirlenen pH kararlılığı grafiği

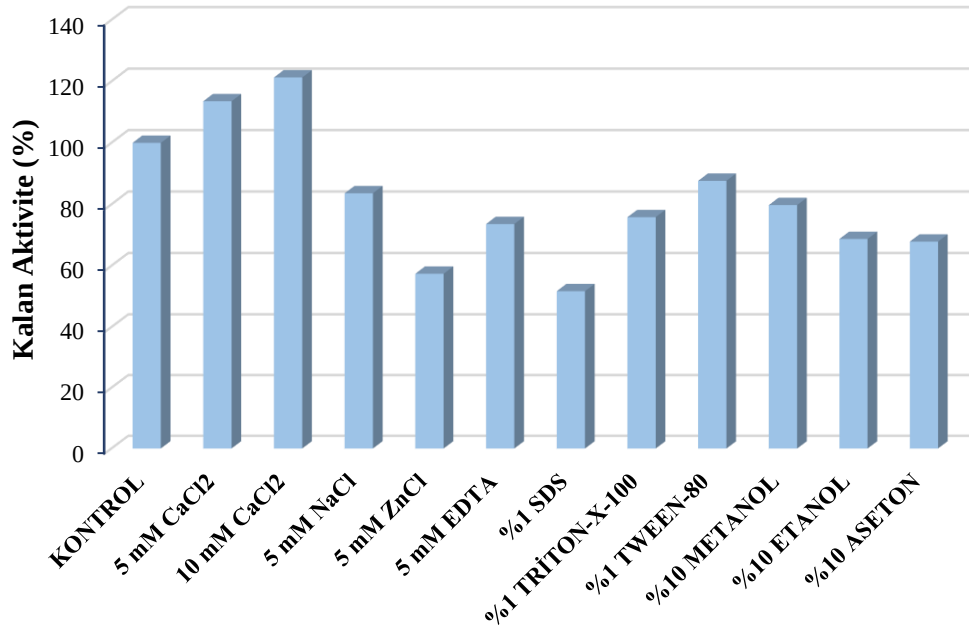
Metal iyonları, deterjan, şelatör ve organik çözücülerin enzim aktivitesi üzerine etkilerinin belirlenmesi

Saflaştırılan *N. alba* BT-5 amilazının aktivitesi üzerine Ca^{2+} , Na^+ ve Zn^{2+} metallerinin; SDS, Triton-X-100, Tween-80 deterjanlarının; Metanol, Aseton ve Etanol organik çözücülerinin ve EDTA şelatörünün etkilerini incelemek amacıyla Tablo 33’de verilen kimyasalların son konsantrasyonları kullanıldı. Kimyasallar ile karıştırılan amilazın optimum şartlar altında DNS yöntemine göre aktiviteleri ölçüldü ve işlem uygulanmamış enzimin aktivitesi 100 kabul edilerek %Kalan aktivite sonuçları Tablo 33’de verildi. Şekil 47’de enzim ile muamele edilen kimyasallara karşı amilazın %Kalan aktivite grafiği çizildi. Sonuçlar incelendiğinde, 5 mM Ca^{2+} iyonu varlığında saflaştırılan *N. alba* BT-5 amilaz aktivitesi 1,13 kat, 10 mM Ca^{2+} iyonu varlığında ise 1,21 kat artmaktadır. Diğer metal iyonlarından Na^+ ve Zn^{2+} iyonlarının varlığı ise enzimin aktivitesi inhibe etmiş ve sırasıyla %16,4 ve %42,58 oranında enzim aktivitesi kaybolmuştur. Hem organik çözücüler hem de deterjanlar BT-5 amilazı üzerine olumsuz etki göstermiştir. Metanol (%10), etanol (%10) ve aseton (%10) varlığında *N. alba* BT-5 amilazı sırasıyla %20,23, %31,25 ve %31,12 oranında aktivitesini kaybetmiştir. SDS (%1), Triton-X-100 (%1) ve Tween-80 (%1) varlığında ise *N. alba* BT-5 amilazı sırasıyla %48,24, %24,17 ve %12,34 oranında aktivite kaybına uğramıştır. Şelatör olarak kullanılan EDTA’nın (5mM) saflaştırılan amilaz üzerine etkisi incelendiğinde enzim aktivitesini inhibe ettiği ve aktivitenin %26,4’ünü kaybettiği görülmüştür. Veriler incelendiğinde Ca^{2+} metali amilazın etkisini artırırken EDTA enzim aktivitesini düşürmüştür. Bu durum *N. alba* BT-5’den saflaştırılan amilazın metaloenzim olan α -amilaz olduğuna işaret etmektedir. Sharma *et al.* (2025)’nin gerçekleştirdiği çalışmada termofilik *Bacillus stercoris*

YSP18'in amilaz geni ile *E. coli* BL21'den eksprese edilen enzim saflaştırılarak metal iyonlarının ve deterjanların enzim aktivitesine etkisi incelenmiştir. Sonuçlara göre 5 mM Ca^{2+} iyonu α -amilazın aktivitesini artırırken, 5 mM Zn^{2+} aktiviteyi düşürmüştür. %0,5'lik EDTA, SDS, Tween-80 ve Triton-X-100 ile muamele sonucu *B. stercoris* YSP18 amilazının aktivitesi düşmüştür (Sharma *et al.* 2025). Bir başka amilaz karakterizasyonu çalışmalarında ise *Geobacillus thermoleovorans* suşundan elde edilen termostabil amilaz aktivitesi üzerine metal iyonlarının, deterjanların ve EDTA'nın etkisi incelenmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre 1mM Ca^{2+} iyonu enzim aktivitesini artırırken 1 mM konsantrasyondaki Zn^{2+} iyonu aktiviteyi düşürmüştür. Ayrıca %1 SDS, %0,6 Triton-X-100 ve 5mM EDTA ile karıştırılan amilazın aktivitesi düşmüştür (Rekadwad 2015). Tez çalışmasında *N. alba* BT-5 amilazı üzerine metal iyonu, deterjan, organik çözücü ve EDTA'nın etkisini incelemek için gerçekleştirilen deneysel basamaklar sonucu elde edilen verilerin literatür ile uyum gösterdiği görülmektedir. Enzim aktivitesi üzerine etkileri incelenen kimyasallardan Ca^{2+} iyonu hem 5 mM hem de 10 mM konsantrasyonlarda *N. alba* BT-5 amilazının aktivitesini artırmıştır, bu nedenle, amilazın endüstriyel uygulamalardaki kullanım potansiyelini test edebilmek için ortama Ca^{2+} iyonu eklenerek deneysel basamaklar gerçekleştirilmiştir.

Tablo 33. Metal İyonları, Deterjan, Şelatör ve Organik Çözücülerin *N. alba* BT-5 Amilazı Aktivitesine Etkisi

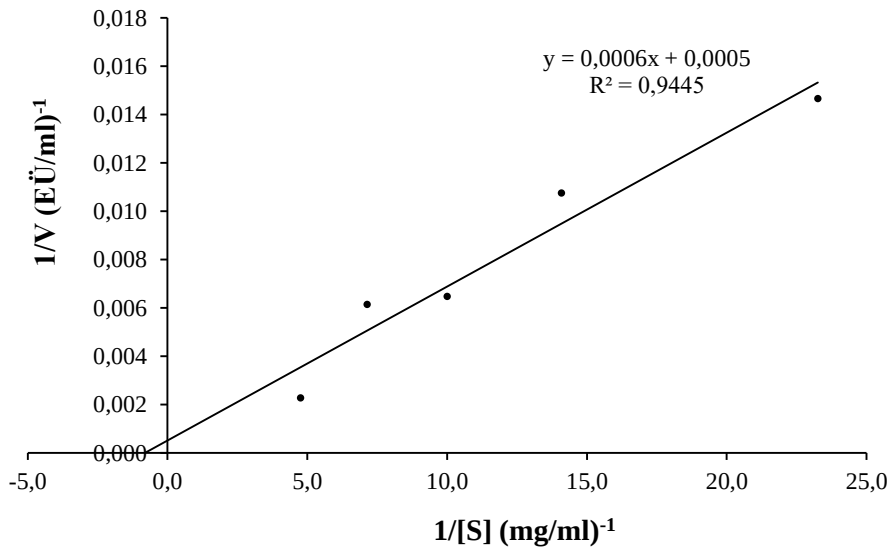
ÖRNEK	% Kalan Aktivite
5 mM CaCl_2	113,54
10 mM CaCl_2	121,28
5 mM NaCl	83,60
5 mM ZnCl	57,42
5 mM EDTA	73,60
%1 SDS	51,76
%1 TRİTON-X-100	75,83
%1 TWEEN-80	87,66
%10 METANOL	79,77
%10 ETANOL	68,75
%10 ASETON	67,87



Şekil 47. Metal iyonları, deterjan, şelatör ve organik çözücülerin *N. alba* BT-5 amilaz aktivitesi üzerine etkisine bağlı olarak % kalan aktivite grafiği

Enzimin K_M ve V_{Max} değerlerinin belirlenmesi

Saflaştırılan enzimin kinetik özelliklerini belirlemek amacıyla sabit enzim hacminde 0,014-0,21 mg/ml değişen substrat konsantrasyonlarında optimum şartlar altında enzim aktivitesi ölçüldü. K_M sabiti ve V_{Max} değerinin hesaplanabilmesi için elde edilen absorbans değerlerinden Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 48). Sonuçlara göre saflaştırılan BT-5 amilazının K_M sabiti 1,21 mg/ml, V_{Max} değeri ise 2000 EÜ/ml olarak bulunmuştur.



Şekil 48. *N. alba* BT-5 amilazına ait Lineweaver-Burk grafiği

Sharma *et al.* (2025) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, termofilik *Bacillus stercoris* YSP-18'in amilaz geni *E. coli* BL21 ile eksprese edilmiştir. Elde edilen ekstraselüler enzim

saflaştırılarak kinetik özellikleri çalışılmış ve sonuçlara göre enzimin çözünür nişasta çözeltisi için K_M değeri 1.54 ± 0.236 mg/ml olarak bulunmuştur. Bu K_M değeri tez çalışmasında elde edilen K_M değerine oldukça yakın bir sonuçtur ve literatür ile uyumlu sonuca ulaşıldığı belirlenmiştir. Aynı çalışmada enzimin çözünür nişasta için elde edilen V_{Max} değeri $135,13 \pm 0,226$ EÜ/mg protein, saflaştırma işlemi sonrası spesifik aktivite ise 101,2 U/mg protein olarak bulunmuştur (Sharma *et al.* 2025). Enzimlerin kinetik özelliklerinden biri olan V_{Max} değeri yüksek substrat konsantrasyonunda enzimin ulaştığı en yüksek hızı ifade etmektedir. Tez çalışmasında *N. alba* BT-5 amilazından elde edilen V_{Max} değeri (68259,4 EÜ/mg) *Bacillus stercoris* YSP-18 amilazından elde edilen V_{Max} değerinden çok daha yüksektir, bu da BT-5 amilazının daha etkin çalıştığını göstermektedir. Aynı şekilde *N. alba* BT-5 amilazının saflaştırma sonrası spesifik aktivitesi (4679,2 EÜ/mg protein) yine *Bacillus stercoris* YSP-18 amilazının spesifik aktivitesinden daha yüksek bulunmuştur. Tez çalışmasıyla ulaşılan yüksek V_{Max} ve yüksek spesifik aktiviteye; saflaştırmanın daha yüksek verimde gerçekleşmesinden, enzim aktivitesini inhibe eden bileşiklerin ortamdan daha etkili uzaklaştırılmasından, enzimin etkin çalışması için pH gibi uygun reaksiyon koşullarının sağlanmasından ya da *Niallia alba* bakterisinden katalitik kapasitesi daha yüksek amilaz elde edilmesinden kaynaklı ulaşılmış olabilir.

Yapılan bir çalışmada, saflaştırılan termofilik *Geobacillus icigianus* amilazının kinetik özelliği belirlenmiş, K_M sabiti ve V_{Max} değeri sırasıyla 2,17 mg/ml ve 4,16 U/ml olarak belirlenmiştir (Soy *et al.* 2021). Bir başka çalışmada ise sıcak su kaynağından izole edilen *Geobacillus thermoleovorans* suşundan ekstraselüler termostabil amilaz üretimi yapılarak amonyum sülfat çöktürmesi ve kolon kromatografisi basamakları ile enzim saflaştırması gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan amilazın K_M sabiti 2,702 mg/ml, V_{Max} değeri ise 7692.3 mmol.ml/dk olarak belirlenmiştir (Rekadwad 2015). Bir diğer çalışmada, termofilik *Alicyclobacillus acidocaldarius*'dan ekstraselüler termostabil amilaz üretimi gerçekleştirilmiş ve ardından enzim saflaştırılmıştır. Saflaştırılan amilazın kinetik özellikleri belirlendiğinde K_M sabiti ve V_{Max} değeri sırasıyla 2,9 mg/ml ve 7936 U/ml bulunmuştur (Satheesh Kumar *et al.* 2010). Bu çalışmalardaki veriler ile kıyaslandığında *N. alba* BT-5 amilazının çözünür nişastaya karşı elde edilen K_M sabiti daha düşüktür, bu da enzim-substrat kompleksinin daha sağlam olduğunu yani enzimin substrata olan ilgisinin daha yüksek olduğunu göstermektedir. Ayrıca bu çalışmalarda geleneksel kromatografik teknikler kullanılmıştır ve mevcut tez çalışmasında elde edilen K_M sabiti ve V_{Max} değeri literatür verilerine yakındır, bu da tek basamakta gerçekleştirilen saflaştırma işleminin başarılı olduğunu göstermektedir.

Enzimin deterjan endüstrisinde kullanılabilirliğinin incelenmesi

Enzimin mevcut bazı deterjanlar ile kullanımının araştırılması

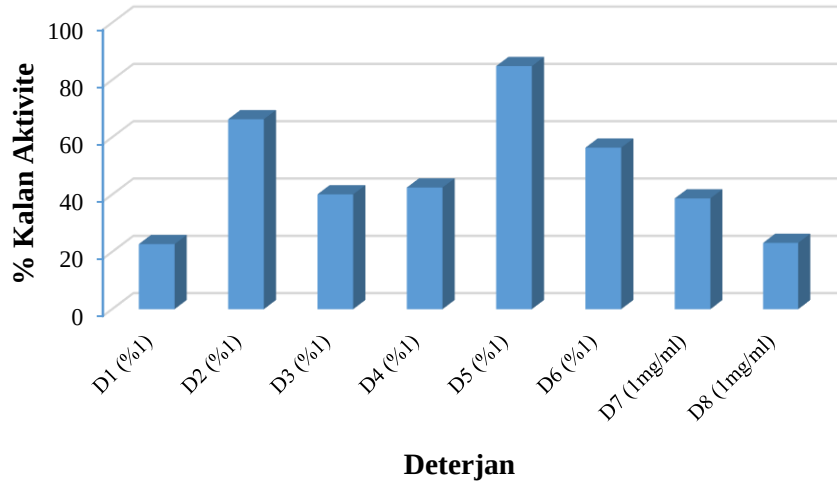
N. alba BT-5 amilazının deterjan endüstrisindeki kullanım potansiyeli ortaya koyulmadan önce ticari deterjanlar ile uyumuna bakıldı. Bunun için satın alınan farklı marka deterjanların kendilerinde var olan enzim aktivitesini sıfırlamak amacıyla çözeltileri hazırlanarak kaynatıldı. Ardından deterjan çözeltileri (D1-D8) *N. alba* BT-5 amilazı ile karıştırıldı ve hazırlanan çözeltilerden DNS ile enzim aktivitesine bakıldı. Deterjan ile karıştırılmayan enzimin aktivitesi 100 kabul edilerek deterjan uygulaması sonucu elde edilen aktivitelerin %Kalan Aktivitesi hesaplandı ve Tablo 34’de verildi. Farklı deterjan çözeltilerine karşı %Kalan aktivite değerlerinin grafiği çizildi (Şekil 49).

Tablo 34. Farklı Deterjan Uygulamaları Sonucu *N. alba* BT-5 Amilazının % Kalan Aktivite Değerleri

Deterjan Kodları	% Kalan Aktivite
D1 (%1)	22,71
D2 (%1)	66,33
D3 (%1)	40,09
D4 (%1)	42,49
D5 (%1)	84,86
D6 (%1)	56,39
D7 (1mg/ml)	38,68
D8 (1mg/ml)	23,14

Veriler incelendiğinde en yüksek %kalan aktivitenin görüldüğü deterjan uyumlu deterjan olarak seçildi. *N. alba* BT-5 amilazı ve D5 kodlu ticari sıvı deterjan karıştırıldığında enzimde var olan aktivite %84,86 oranında korunduğu için uyumlu deterjan olarak belirlendi. Leke giderme performansında amilaz ile birlikte bu deterjanın kullanılmasıyla, enzim dışında deterjanda bulunan yüzey aktif bileşen veya temizleyici diğer kimyasallar gibi maddelerin de etki etmesi sağlanmıştır. Literatürde bakterilerden saflaştırılan amilaz enzimlerinin leke giderme performanslarından önce deterjan uyumunun belirlenmesi için benzer çalışmalar yapılmıştır. Sharma *et al.* (2022), kaplıca suyu ve topraktan izole ettikleri *Bacillus licheniformis* RA31 suşundan termostabil α -amilaz üretimi gerçekleştirmiştir. Kültür sıvısındaki amilaz etanol çöktürmesi ve kromatografik yöntemler ile saflaştırılarak deterjanlar ile uyumuna bakılmıştır. Yapılan inceleme sonucu Ariel marka deterjan ile enzimin uyum sağladığı (%125) belirlenerek leke giderme performansı incelenmiştir (Sharma *et al.* 2022). Bir başka çalışmada,

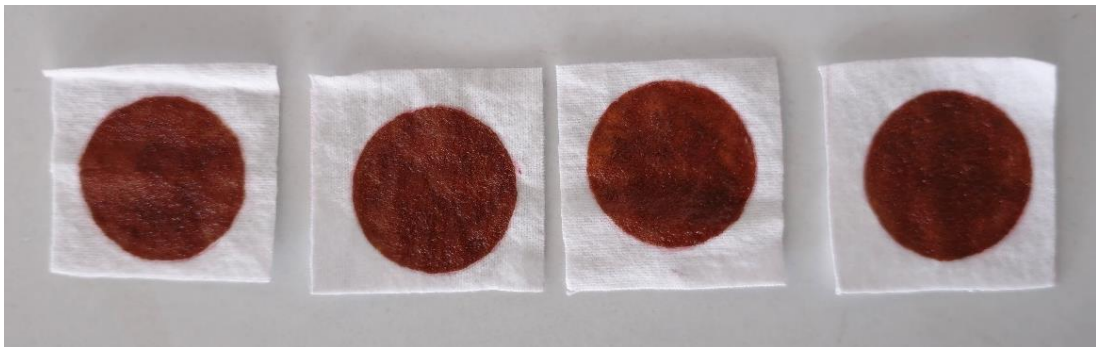
Bacillus licheniformis AS08E’den izole edilen amilazın benzer şekilde ticari deterjanlar ile uyumu incelenmiş ve en yüksek aktivitenin (%85) görüldüğü deterjan uyumlu deterjan olarak belirlemişlerdir (Roy and Mukherjee 2013). Tez çalışmasının sonraki adımında *N. alba* BT-5 amilazı ile en yüksek uyum gösteren D5 kodlu deterjan karıştırılıp lekeye uygulandığında yıkama performansı test edilerek BT-5 amilazının deterjan katkı maddesi olarak kullanılabilirliği incelendi.



Şekil 49. Farklı deterjan çözeltilerine karşı amilazın % Kalan aktivite grafiği

Enzimin kumaştan leke giderme performansının araştırılması

N. alba BT-5 amilazının kumaştan leke giderme performansını yorumlayabilmek için uyum gösterdiği ve enzimatik aktivitesi sıfırlanan deterjan (D5) ile son konsantrasyonu %1 olacak şekilde karıştırıldı. Pamuk kumaşlar üzerinde eşit çapta oluşturulan dairelere sıvılaştırılmış çikolata örneği eşit hacimde ve homojen şekilde yayıldıktan sonra (Şekil 50) sırasıyla kumaşlar kontrol, enzim, deterjan ve enzim+deterjan şeklinde etiketli erlenlere yerleştirilerek Tablo 14’de verilen düzeneğe göre hazırlandı.



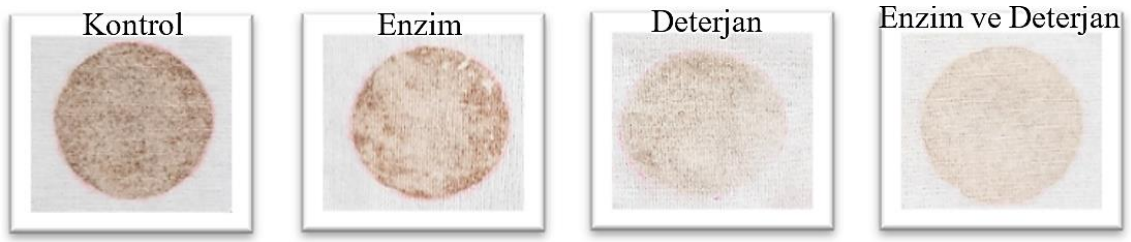
Şekil 50. Kumaş parçalarında homojen şekilde oluşturulan çikolata lekeleri

1 saatlik uygulamanın sonunda (Şekil 51) kumaş parçaları kurutulup elde edilen sonuçlar gözlemlenerek yorumlandı. Deney sonrası kurutulan kumaşlar Şekil 52’de verildi.



Şekil 51. *N. alba* BT-5 amilazının leke giderme performansının incelenmesi için 1 saatlik inkübasyon sonrası örnekler (sırasıyla Kontrol, Enzim, Deterjan ve Enzim+Deterjan uygulamaları)

Kontrol erlenindeki kumaş lekesi sadece çeşme suyu ile muamele edilmiş ve leke gideriminde çok az etki görülmüştür. Kontrol erlenindeki bu az da olsa leke giderimi çalkalamaya bağlı olarak sürtünme gibi mekanik etkilerden kaynaklanmış olabilir. Sadece deterjan uygulamasının yapıldığı kumaşın leke durumu incelendiğinde kontrol kumaşındaki lekeye kıyasla leke giderimi daha fazladır. Bunun nedeni, çalkalamaya bağlı mekanik etkilerin yanı sıra her ne kadar deterjandaki enzimatik aktivite kaynatma işlemiyle giderilse bile deterjanda var olan yüzey aktif maddeler ya da enzimleri destekleyici kimyasal maddelerin etkisiyle açıklanabilir. Sadece enzim uygulamasının yapıldığı kumaş, kontrol uygulaması ile kıyaslandığında daha fazla leke giderimi olduğu gözlenmiştir. Bunun nedeni mekanik etkinin yanı sıra amilazın nişastayı parçalaması sonucu lekenin kumaştan daha fazla uzaklaştırılması ile açıklanabilir. Ancak enzim uygulaması sadece deterjan uygulanan kumaş parçasına kıyasla leke gideriminde zayıf kalmıştır. Son olarak enzim ve enzim ile uyumluluğu ispatlanan deterjanın beraber kullanıldığı durumdaki leke durumu incelendiğinde ise tüm örneklerle kıyasla çok daha etkili bir şekilde leke gideriminin gerçekleştiği görülmektedir. Bu durum, deterjan içerisinde var olan yüzey aktif maddeler veya diğer kimyasalların amilazın katalitik aktivitesini desteklemesine ve uygulama sırasında daha stabil kalmasına bağlı olarak nişastanın daha etkili parçalanması sonucu leke giderme performansının artması ile açıklanabilir.



Şekil 52. *N. alba* BT-5 amilazının leke giderme performansı analizi

Ugwuoji *et al.* (2023) tarafından yapılan çalışmada, toprak örneğinden izole edilen *Paenibacillus lactis* OPSA3 suşundan termostabil ve alkalifilik amilaz üretimi gerçekleştirilmiş, ardından enzimin kısmi saflaştırılması yapılmıştır. Saflaştırılan amilazın pamuk kumaştaki ketçap lekesini giderme performansı 50°C sıcaklıkta incelenmiş ve enzimin leke giderme etkinliğini artırdığı görülmüştür. *P. lactis* OPSA3'den termostabil ve alkalifilik özellikte amilaz elde edilmiştir ve saflaştırma sonrası enzimin spesifik aktivitesi 26,19 U/mg olarak bulunmuştur (Ugwuoji *et al.* 2023). Tez çalışmasında *N. alba* BT-5 amilazının karakterizasyon analizinde yüksek pH değerlerinde aktivitede kayıplar olmasına rağmen Ugwuoji *et al.* (2023) tarafından yapılan çalışmaya kıyasla çok daha yüksek spesifik aktiviteye ulaşılmış (4630,58 EÜ/ml) ve dolayısıyla BT-5 amilazı belirgin alkalifilik özelliğe sahip olmasa bile yüksek katalitik aktivitesi sayesinde leke giderme performansında deterjanların etkisini artırmıştır. Bir başka çalışmada, sıcak su kaynağından alınan toprak örneğinden termofilik *Bacillus licheniformis* RA31 suşu izole edilmiş ve termostabil amilaz kaynağı olarak kullanılmıştır. Kültür sıvısından etanol çöktürmesi ve kromatografik tekniklerle amilaz saflaştırılmış ve 45°C'de leke giderme performansı incelenmiştir. Enzimin uyumlu deterjanı belirlendikten sonra kumaş parçalarındaki lekelerin giderimi için benzer bir deney düzeneği kurulmuş ve amilazın tek başına gösterdiği performansla kıyasla enzimin uyum gösterdiği deterjanla karıştırılması durumunda leke gideriminde daha etkili olduğu gözlemlenmiştir (Sharma *et al.* 2022). Tez çalışmasında da benzer sonuç gözlemlenmiş ve BT-5 amilazının tek başına leke giderimine kıyasla uyumlu deterjan ile karıştırılması durumunda leke gideriminin daha etkili olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar, *N. alba* BT-5 amilazının deterjan katkı maddesi olarak kullanım potansiyeline sahip olduğunu ve böylece tez izolatinin deterjan endüstrisine uygun yeni bir bakteriyel amilaz kaynağı olabileceğini göstermektedir.

Enzimin tekstil endüstrisinde kullanılabilirliğinin incelenmesi

Tekstil endüstrisinde kumaşın dokunacağı ipliklerin daha sağlam olabilmesi için dokuma iplikleri “Haşılama” adı verilen bir yöntemle nişasta çözeltisi içerisinde bekletilir. Ardından hazırlanan iplikler dokuma işlemiyle kumaşa dönüştürülür. Oluşan kumaş parçalarının üzerindeki fazla nişasta ise amilaz uygulaması ile giderilir ve bu işleme “Haşıl

Giderme” adı verilmektedir. *N. alba* BT-5 izolatu ile elde edilen amilazın haşıl giderme işlemindeki verimini ortaya koyabilmek için eşit büyüklükte kesilen ve başlangıç ağırlıkları kaydedilen pamuklu kumaşlar nişasta çözeltisi içerisinde bekletildi. Bu uygulamanın ardından kurumaya bırakılan kumaşların tekrar ağırlıkları tartıldı. Haşıl giderme performansını ortaya koyabilmek için nişasta çözeltisinde bekletilen kumaş parçaları amilaz çözeltisiyle muamele edildi (Şekil 53). İşlem sonrası kurumaya bırakılan kumaş parçalarının tekrar ağırlıkları tartıldı. Bütün ağırlık değerleri ve hesaplanan Haşıl Giderme yüzdeleri Tablo 35’de verildi.

Tablo 35. *N. alba* BT-5 Amilazının Haşıl Giderme Etkinliği

	<i>Başlangıç Ağırlığı</i>	<i>Nişasta sonrası ağırlık</i>	<i>Uygulama sonrası ağırlık</i>	<i>% Haşıl Giderme</i>
Kontrol	0,4994	0,535	0,5311	-
<i>N. alba</i> BT-5 Amilazı	0,4885	0,5268	0,5085	%3,47

Literatürde bakteriyel amilazların haşıl giderme performansının araştırıldığı çalışmalara bakıldığında, Mostafa *et al.* (2024) tarafından gerçekleştirilen çalışmada tarımsal atıklar kullanılarak *Bacillus* spp. NRC1 izolatından amilaz üretimi gerçekleştirilmiş ve enzimin tekstil endüstrisindeki kullanım potansiyelini ortaya koyabilmek için haşıl giderme yeteneği test edilmiştir. En yüksek haşıl giderme yüzdesine ulaşabilmek için ham enzim konsantrasyonu optimize edilmiş ve %3 enzim konsantrasyonunda 60°C sıcaklıkta en yüksek %6,1 verimlilikle kumaş parçasından nişasta giderimi gerçekleştirilmiştir (Mostafa *et al.* 2024). Bir başka çalışmada, toprak örneğinden izole edilen *Bacillus cereus* AS2 bakterisinden amilaz üretimini gerçekleştirilmiş ve ham enzim kaynağının haşıl giderme potansiyeli incelenmiştir. Çalışmada en yüksek haşıl giderme yüzdesine ulaşabilmek için enzimatik prosesin optimizasyonu gerçekleştirilmiş ve *Bacillus cereus* AS2 amilazı 60°C sıcaklıkta 15 saatlik uygulama sonucunda kumaş parçasındaki nişastayı %8,9 verimle giderebildiği belirlenmiştir (Rehman *et al.* 2023). Literatürde ulaşılan haşıl giderme yüzdeleri tez çalışmasında elde edilen yüzdeden (%3,47) fazladır. Ancak bu çalışmalar kumaş parçasından nişastanın daha fazla giderilmesini sağlamak adına optimizasyon analizlerini içerdiğinden en yüksek değerlere bu şekilde ulaşılmıştır. Enzimin haşıl giderme performansının iyileştirilebilmesi için reaksiyon ortamına ilave edilen enzim hacmi ya da uygulama süresi gibi parametreler optimize edilebilir ve bu şekilde daha yüksek haşıl giderme yüzdesi elde edilebilir.



Şekil 53. Nişasta çözeltisinde bekletilen kumaş parçasından Haşıl Giderme uygulaması için kurulan deney düzeneği

Enzimin meyve suyu endüstrisinde kullanılabilirliğinin incelenmesi

İçecek endüstrisinde taze sıkılmış meyve sularında bulanıklığa neden olan nişastanın amilaz uygulaması ile parçalanması enzimin endüstriyel uygulamalarından biridir. Taze hazırlanan elma suyundaki nişastanın *N. alba* BT-5 amilazı ile parçalanması sonucu berraklık ve renk yoğunluğu açısından performansı değerlendirildi. Bunun için son konsantrasyonları 5 mM ve 10 mM olacak şekilde CaCl_2 içeren elma suları *N. alba* BT-5 amilazı ile muamele edilerek enzim ilave edilmeyen kontrol tüpü ile kıyaslandı. Elde edilen sonuçlara göre meyve suyu işlemede amilazın performansı değerlendirildiğinde uygulama sonrası parametrelerde değişiklikler gözlemlendi. Enzim aktivitesine bağlı olarak meyve suyundaki berraklık ve renk yoğunluğu için ölçülen absorban değerleri Tablo 36’da verildi. Kontrol tüpüne kıyasla amilazın eklendiği tüplerin nişasta hidroliziyle bağlantılı olarak berraklaştırma ve renk yoğunluğunda etkili olduğu görüldü (Şekil 54).

Tablo 36. *N. alba* BT-5 Amilazının Taze Elma Suyundaki Bazı Parametrelere Etkisi

	440 nm	660 nm
Kontrol	1,145	0,3677
5 mM CaCl_2 + Amilaz	0,816	0,2298
10 mM CaCl_2 + Amilaz	0,593	0,1589

Sonuçlar incelendiğinde, renk yoğunluğundaki değişimin yorumlanabilmesi için 440 nm’deki absorbanlar incelendi ve kontrol tüpünde ölçülen absorban (1,145) *N. alba* BT-5 amilazı aktivitesiyle 5 mM CaCl_2 varlığında 0,816 değerine, 10 mM CaCl_2 varlığında ise 0,593 değerine düşmüştür. Bu durum, enzimin aktivitesiyle taze meyve sularında renk yoğunluğuna neden olan nişastaların hidrolize uğrayarak renk şiddetinin azaltıldığını göstermektedir.

Özellikle tam olgunlaşmamış meyvelerin nişasta yoğunlukları daha fazladır ve bu meyvelerin sularında nişasta yoğunluğundan kaynaklı daha bulanık bir görüntü oluşmaktadır. Meyve suyu endüstrisinde bu bulanıklık amilaz uygulaması ile berraklaştırılmaktadır (Gupta *et al.* 2003). Tez çalışmasında, taze elma suyundaki berraklaşmanın yorumlanabilmesi için hazırlanan örneklerin 660 nm'deki absorbanları ölçüldü. Sonuçlara göre, kontrol tüpünde ölçülen 0,3677 değeri, *N. alba* BT-5 amilazı ilavesiyle 5 mM CaCl₂ varlığında 0,2298 değerine, 10 mM CaCl₂ varlığında ise 0,1589 değerine düşmüştür. Böylelikle taze elma suyunun berraklaştırılmasında *N. alba* BT-5 amilazının etkili bir şekilde katalitik etki gösterdiği ve bulanıklığa neden olan nişastaların hidrolizini verimli bir şekilde gerçekleştirdiği görülmektedir. Ayrıca, 5 mM ve 10 mM CaCl₂ ortamlarında metalloenzim olan amilazın aktivitesi Ca²⁺ iyonlarının konsantrasyonlarıyla orantılı olarak artmıştır. 10 mM CaCl₂ varlığında nişasta hidrolizinin daha fazla olduğu ve dolayısıyla meyve suyu berraklaştırma ve renk yoğunluğu performanslarında daha verimli olduğu görülmektedir. *N. alba* BT-5 amilazının meyve suyu endüstrisinde kullanılabilirliğini net bir şekilde ortaya koyabilmek için % berraklık hesabı yapıldı ve 5 mM CaCl₂ varlığında %37,5, 10 mM CaCl₂ varlığında ise %56,79 olarak bulundu. Hossain *et al.* (2024) çalışmalarında, *Bacillus subtilis* fl suşundan kısmi saflaştırılan amilazın meyve suyu berraklaştırma kabiliyetini test etmiş ve berraklaştırma yüzdesi %54,18 bulunmuştur (Hossain *et al.* 2024). Tez çalışmasında 10 mM CaCl₂ varlığında elde edilen berraklaştırma yüzdesi, Hossain *et al.* (2024) tarafından yapılan çalışmadaki değere oldukça yakındır, dolayısıyla literatürle uyumlu değerlere ulaşılmıştır. Dey and Banerjee (2014)'nin yapmış olduğu çalışmada, α-amilazın elma suyunu berraklaştırma performansı test edilmiş ve 440 nm'de kontrol tüpünün 1,489 olarak ölçülen absorbansının 10 mM CaCl₂ varlığında enzimin etkisiyle 0,280'e düştüğü görülmüştür (Dey and Banerjee 2014). Literatürle uyumlu bir şekilde tez çalışmasında taze elma suyuna uygulanan *N. alba* BT-5 amilazının etkisiyle renk yoğunluğunda azalma meydana gelmiştir. Tüm bu veriler incelendiğinde *N. alba* BT-5 amilazının meyve suyu endüstrisinde kullanılabilme potansiyeli taşıdığı görülmektedir.



Şekil 54. Taze elma suyu ile karıştırılan amilazın etkisiyle meyve suyu berraklığındaki değişim

SONUÇ VE ÖNERİLER

Substrat özgülüğüne ve yüksek katalitik aktiviteye sahip olan enzimler çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılmakta ve bu alanlarda ihtiyaç duyulan enzim miktarına ulaşabilmek için birçok organizma enzim kaynağı olarak kullanılmaktadır. Bu organizmalar içerisinde yüksek üretim hacmi ve üretim maliyetlerinin düşük olması gibi nedenlerden dolayı en fazla tercih edilen enzim kaynağı mikroorganizmalardır. Literatüre bakıldığında endüstriyel enzim teknolojisi için kullanım potansiyelinin araştırıldığı ve enzim kaynağı olarak kullanılabilirliğinin ortaya koyulduğu pek çok bakteri türü çalışılmıştır. Enzim endüstrisi için özellikle termofilik mikroorganizmalardan elde edilen termostabil enzimler sıcaklık uygulamalarını içeren endüstriyel prosesler için daha caziptir. Bu nedenle pek çok kaplıca suyu bakteriyel çeşitlilik açısından incelenmiş ve amilaz üretim potansiyelleri ortaya koyulmuştur. Enzim pazarının %25'lik kısmını oluşturan amilaz; gıda, tekstil, deterjan, biyoetanol gibi birçok alanda kullanım bulmakta ve her geçen yıl bu enzime duyulan ihtiyaç giderek artmaktadır. Bu nedenle mevcut tez çalışmasında, Bitlis/Gülsuhan kaplıcasından temin edilen sıcak su örneğinden bakteri izolasyonu gerçekleştirilmiş ve farklı olduğu düşünülen toplam 9 izolat elde edilmiştir. Bu izolatların konvensiyonel analizleri gerçekleştirilerek her birinin moleküler tür tespiti yapılmıştır. Literatür çalışmaları araştırıldığında bu zamana kadar Bitlis/Gülsuhan kaplıca suyundaki bakteri çeşitliliği incelenmediğinden mevcut çalışma literatürde ilk olma özelliği taşımaktadır. İzole edilen bakteriler içerisinde en yüksek amilaz aktivite *Niallia alba* BT-5 izolatındadır ve bu bakteriden ekstraselüler enzim üretimi gerçekleştirilmiştir.

2021 yılında yapılan bir çalışma ile ilk kez tür tanımlaması yapılan *Niallia alba* bakterisinden bu zamana kadar amilaz üretimi, saflaştırılması ve endüstriyel uygulamasının incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle tez çalışması sadece mikrobiyal kaynak olarak kullanılan kaplıca suyu açısından değil, aynı zamanda amilaz kaynağı olarak kullanılan bakteri türü açısından da literatürde ilk olmakta ve bütün bunlar çalışmanın özgün değerini ortaya koymaktadır.

N. alba BT-5 amilazının saflaştırılması sırasında enzim kaybı olabileceği için mevcut aktiviteyi daha da artırabilmek adına kültür parametrelerinin optimizasyonu yapılarak daha yüksek amilaz aktiviteye ulaşılmıştır. Optimum kültür şartları altında *N. alba* BT-5 izolatından amilaz üretimi gerçekleştirilmiş ve tek basamakta nişasta afinite tekniği uygulanarak enzim saflaştırması yapılmıştır. Saflaştırma basamağında amilazın substratına daha etkili bağlanması ve böylelikle enzim kaybını azaltabilmek için saflaştırma işlemleri optimize edilmiştir. Optimal

şartlar altında *N. alba* BT-5 amilazı saflaştırılmış ve diyaliz uygulaması ile enzim çözeltisindeki safsızlıklar giderilmiştir. Literatürde geleneksel kromatografik yöntemlerle birden fazla basamakta geręekleřtirilen saflaştırma sonucu elde edilen verilerle tez verileri kıyaslandığında tek adımda başarılı bir saflaştırma işlemi uygulandığı görölmektedir.

Saflaştırılan amilazın karakterizasyon şalışmaları geręekleřtirilmiř, ardından enzimin endüstriyel alanlardaki kullanım potansiyeli incelenmiştir. Deterjan, tekstil ve içecek endüstrisi için geręekleřtirilen analizler sonucu *N. alba* BT-5 amilazının leke giderme ve meyve suyu berraklaştırma potansiyeli literatür verileri ile uyum göstermekte ve bu da enzimin endüstriyel alanlarda kullanılabilirliğini ortaya koymaktadır. Ayrıca tekstil endüstrisi için *N. alba* BT-5 amilazının haşıl giderme performansı değerlendirilmiş ve literatür verileri ile kıyaslanmıştır. Literatürdeki şalışmalara göre BT-5 amilazının haşıl giderme yüzdesi düşük kalmıştır ancak haşıl giderme analizinin optimizasyonu yapılarak daha yüksek verimlere ulaşılabilir. Tüm bu sonuçlara göre endüstriyel pazarda oldukça fazla kullanım alanına sahip amilaz için *Niallia alba* bakterisinin yeni bir amilaz kaynağı olabileceği ve bu bakteriden saflaştırılan amilazın endüstriyel alanlarda kullanım potansiyeline sahip olduğu ispatlanmıştır.

KAYNAKLAR

- Abd-Elaziz, A.M., Karam, E.A., Ghanem, M.M., Moharam, M.E. and Kansoh, A.L., 2020. Production of a novel α -amylase by *Bacillus atrophaeus* NRC1 isolated from honey: Purification and characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 148, 292-301.
- Acer, Ö., Bekler, F.M., Pirinçcioğlu, H., Güven, R.G. and Güven, K., 2016. Purification and Characterization of Thermostable and Detergent-Stable Alpha-Amylase from *Anoxybacillus* sp. AH1. *Food Technology and Biotechnology*, 54 (1), 70-77.
- Adams, J.C. and Watt, F.M., 1993. Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development*, 117(4), 1183-1198.
- Agrawal, M., Pradeep, S., Chandraraj, K. and Gummadi, S.N., 2005. Hydrolysis of starch by amylase from *Bacillus* sp. KCA102: a statistical approach. *Process Biochemistry*, 40 (7), 2499-2507.
- Aguilar, G., Morlon-Guyot, J., Trejo-Aguilar, B. and Guyot, J.P., 2000. Purification and characterization of an extracellular α -amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010(T), an amylolytic lactic acid bacterium. *Enzyme and Microbial Technology*, 27 (6), 406-413.
- Akkemik, E., 2012. Hindi Karaciğerinden NADPH-Sitokrom P450 Redüktaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Bazı Kimyasal Maddelerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Aladejana, O.M., Oyedeji, O., Omoboye, O. and Bakare, M., 2020. Production, purification and characterization of thermostable alpha amylase from *Bacillus subtilis* Y25 isolated from decaying yam (*Dioscorea rotundata*) tuber. *Notulae Scientia Biologicae*, 12(1), 154-171.
- Al-Bedak, O.A.H., Sakr, R.S. and AL-Kolaibe, A.M., 2022. The microbial amylases: an overview with practical consequences and applications. *Journal of Microbiology & Experimentation*, 10(4), 130-134.
- Al-Harthy, O.D., Hozzein, W.N., Abdelkader, H.S. and Alharbi, S.A.A., 2024. Thermostable amylase from *Cytobacillus firmus*: characterization, optimization, and implications in starch hydrolysis. *Egyptian Journal of Microbiology*, 58(1), 35-47.
- Alhazmi, L.S. and Alshehri, W.A., 2025. Purification and Biochemical Characterization of α -Amylase from Newly Isolated *Bacillus Cereus* Strain and its Application as an Additive in Breadmaking. *Polish Journal of Microbiology*, 74(1), 48.
- Al-Johani, N.B., Al-Seeni, M N. and Ahmed, Y.M., 2017. Optimization of alkaline α -amylase production by thermophilic *Bacillus subtilis*. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 14(1), 288-301.
- Allala, F., Bouacem, K., Boucherba, N., Azzouz, Z., Mechri, S., Sahnoun, M., Benallaoua, S., Hacene, H., Jaouadi, B. and Bouanane-Darenfed, A., 2019. Purification, biochemical, and molecular characterization of a novel extracellular thermostable and alkaline α -amylase from *Tepidimonas fonticaldi* strain HB23. *International Journal of Biological Macromolecules*, 132, 558-574.

- Amoozegar, M.A., Malekzadeh, F. and Malik, K.A., 2003. Production of amylase by newly isolated moderate halophile, *Halobacillus* sp. strain MA-2. *Journal of Microbiological Methods*, 52 (3), 353-359.
- Anbu, P. and Hur, B.K., 2014. Isolation of an organic solvent-tolerant bacterium *Bacillus licheniformis* PAL05 that is able to secrete solvent-stable lipase. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 61 (5), 528-534.
- Anbu, P., 2013. Characterization of solvent stable extracellular protease from *Bacillus koreensis* (BK-P21A). *International Journal of Biological Macromolecules*, 56, 162-168.
- Anithajothi, R., Nagarani, N., Umagowsalya, G., Duraikannu, K. and Ramakritinan, C.M., 2014. Screening, isolation and characterization of protease producing moderately halophilic microorganism *Halomonas meridiana* associated with coral mucus. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 96 (2), 296-306.
- Annamalai, N., Thavasi, R., Vijayalakshmi, S. and Balasubramanian, T., 2011. Extraction, Purification and Characterization of Thermostable, Alkaline Tolerant α -Amylase from *Bacillus cereus*. *Indian J Microbiol*, 51 (4), 424-429.
- Anto, H., Trivedi, U. and Patel, K., 2006. Alpha amylase production by *Bacillus cereus* MTCC 1305 using solid-state fermentation. *Food Technol. Biotechnol.* 44 (2), 241-245.
- Ardhi, A., Sidauruk, A.N., Suraya, N., Pratiwi, N.W. and Pato, U., 2020. Molecular identification of amylase-producing thermophilic bacteria isolated from Bukit Gadang Hot Spring, West Sumatra, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 21(3).
- Arfah, R.A., Ahmad, A., Djide, M.N., Anis, M. and Zakir, M., 2015. Production optimization and characterization of amylase enzyme isolated from termofil bacteria *Bacillus* sp RSAII-1b from Lejja hot spring South Sulawesi. *Am J Biomed Life Sci*, 3, 115-119.
- Arifeen, S., Jamil, J., Sarwar, A., Ullah, N., Nelofer, R., Aziz, T., Alharbi, M., Alshammari, A., Alasmari, A. and Albekairi, T.H., 2024. Biosynthesis and Optimization of Amylase from *Bacillus* sp. Isolated from Soil Samples Using Agroindustrial Waste as Substrate. *Applied Ecology & Environmental Research*, 22(4).
- Arslan, S., 2017. Türkiye'nin Farklı Yörelerinden Toplanan Beyaz Peynir Örneklerinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Ashita, D., Gupta, J. and Khanna, S., 2000. Enhanced production, purification and characterization of novel cellulase-poor thermostable, alkali tolerant xylanase from *Bacillus circulans* AB 16. *Proc. Biochem.* 35, 849-856.
- Ashraf, H., Iqbal, J. and Qadeer, M.A., 2003. Production of alpha amylase by *Bacillus licheniformis* using an economical medium. *Bioresource Technology*, 87(1), 57-61.
- Atomi, H., 2005. Recent progress towards the application of hyperthermophiles and their enzymes. *Current Opinion in Chemical Biology*, 9 (2), 166-173.
- Bajaj, B.K., and Wani, M.A., 2011. Enhanced phytase production from *Nocardia* sp. MB 36 using agro-residues as substrates: Potential application for animal feed production. *Engineering in Life Sciences*, 11 (6), 620-628.
- Baltacı, M.Ö., 2015. Erzurum mezbahalarından toplanan işkembe örneklerinden selüloolitik bakterilerin izolasyonu, identifikasyonu ve moleküler karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

- Bamigboye, C.O., Okonji, R.E., Oluremi, I.O. and James, V., 2022. Stain removing, juice-clarifying, and starch-liquefying potentials of amylase from *Pleurotus tuberregium* in submerged fermentation system. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 20 (1).
- Barrow G.H. and Feltham R.K.A., 1993. *Cowan and steel's manual for identification of medical bacteria*. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press.
- Baysal, Z., Uyar, F. and Aytekin, Ç., 2003. Solid state fermentation for production of α -amylase by a thermotolerant *Bacillus subtilis* from hot-spring water. *Process Biochemistry*, 38 (12), 1665-1668.
- Berg, J., Tymoczko, J. and Stryer, L., 2007. *Biochemistry*. W.H. Freeman and Bernfield, P., 1955. Amylase, alpha and beta. *Methods Enzymol*, 1 (540), 149-158.
- Bernfield, P., 1955. Assay methods for amylases, alpha and beta. *Methods Enzymol*, 1, 149-150.
- Bertoldo, C. and Antranikian, G., 2002. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. *Current opinion in chemical biology*, 6(2), 151-160.
- Bradford, M.M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Brock TD., 1978. *Thermophilic microorganisms and life at high temperatures*. Springer-Verlag, New York.
- Bruinenberg, P.M., Hulst, A.C., Faber, A. and Voogd, R.H., 1996. A process for surface sizing or coating of paper. European patent application, 690, A1.
- Bruins, M.E., Janssen, A.E. M. and Boom, R.M., 2001. Thermozyms and Their Applications: A Review of Recent Literature and Patents. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 90 (2), 155-186.
- Buléon, A., Colonna, P., Planchot, V. and Ball, S., 1998. Starch granules: Structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 23 (2), 85-112.
- Calderon, M., Loiseau, G. and Guyot, J.P., 2003. Fermentation by *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 of different combinations of carbohydrates occurring naturally in cereals: Consequences on growth energetics and α -amylase production. *International Journal of Food Microbiology*, 80 (2), 161-169.
- Carrín, M.E., Ceci, L.N. and Lozano, J.E., 2004. Characterization of starch in apple juice and its degradation by amylases. *Food Chemistry*, 87 (2), 173-178.
- Cava, F., Hidalgo, A. and Berenguer, J., 2009. *Thermus thermophilus* as biological model. *Extremophiles*, 13 (2), 213-231.
- Cerna, K. and Neustupa, J., 2010. The pH-related morphological variations of two acidophilic species of desmidiaceae (*Viridiplantae*) isolated from a lowland peat bog, Czech Republic. *Aquat. Ecol.* 44: 409-419.
- Chang, C.J., Lee, C.C., Chan, Y.T., Trudeau, D., Wu, M.H., Tsai, C.H., Yu, S.M., Ho, T.D., Wang, A.H.J., Hsiao, C.D., Arnold, F.H. and Chao, Y.C., 2016. Exploring the Mechanism Responsible for Cellulase Thermostability by Structure-Guided Recombination. *Plos One*, 11(3), e0147485.
- Chen, W.M., Chang, J.S., Chiu, C.H., Chang, S.C., Chen, W.C. and Jiang, C.M., 2005. *Caldimonas taiwanensis* sp. nov., a amylase producing bacterium isolated from a hot spring. *Systematic and Applied Microbiology*, 28 (5), 415-420.

- Cherry, H., Hossain, T. and Anwar, M., 2004. Extracellular glucoamylase from the isolate *Aspergillus fumigatus*. Pakistan Journal of Biological Science, 7 (11), 1988-1992.
- Chi, Z., Chi, Z., Liu, G., Wang, F., Ju, L. and Zhang, T., 2009. Saccharomycopsis fibuligera and its applications in biotechnology. Biotechnology Advances, 27 (4), 423-431.
- Chiba, S., 1988. Handbook of Amylases and Related Enzymes. (by the Amylase Research Society of Japan, Ed.) Pergamon Press, Oxford, 104-116.
- Choi, J.M., Han, S.S. and Kim, H.S., 2015. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. Biotechnology Advances, 33 (7), 1443-1454.
- Chuard, C. and Reller, L.B., 1998.. Bile-esculin test for presumptive identification of enterococci and streptococci: effects of bile concentration, inoculation technique, and incubation time. Journal of clinical microbiology, 36(4), 1135-1136.
- Copeland, R.A., 2000a. Chapter 2: Chemical Bonds And Reactions In Biochemistry. Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis, Wiley, USA, 11-38.
- Copeland, R.A., 2000b. Chapter 6: Chemical Mechanisms In Enzyme Catalysis" Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis, Wiley, USA, 155-191.
- Couto, S.R. and Sanromán, M.Á., 2006. Application of solid-state fermentation to food industry-A review. Journal of Food Engineering, 76 (3), 291-302.
- Creighton, T. E., 1984. Proteins. Freeman. Oxford University Press, USA.
- Daniel, R. M., Danson, M. J., Eisenthal, R., Lee, C. K. and Peterson, M. E., 2008. The effect of temperature on enzyme activity: new insights and their implications. Extremophiles, 12, 51-59.
- Danson, M.J.,and Hough, D.W., 1998. Structure, function and stability of enzymes from the Archaea. Trends in microbiology, 6(8), 307-314.
- Das, R. and Gerstein, M., 2000. The stability of thermophilic proteins: a study based on comprehensive genome comparison. Functional & Integrative Genomics, 1(1), 76-88.
- De Moraes, L.M.P., Filho, S.A. and Ulhoa, C.J., 1999. Purification and some properties of an α -amylase glucoamylase fusion protein from Saccharomyces cerevisiae. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 15(5), 561-564.
- Debnath, T., Kujur, R.R.A., Mitra, R., and Das, S.K., 2019. Diversity of microbes in hot springs and their sustainable use. Microbial Diversity in Ecosystem Sustainability and Biotechnological Applications: Volume 1. Microbial Diversity in Normal & Extreme Environments, 159-186.
- Deljou, A., and Arezi, I., 2016. Production of thermostable extracellular α -amylase by a moderate thermophilic *Bacillus licheniformis* isolated from Qinarje Hot Spring (Ardebil prov. of Iran). Periodicum biologorum, 118(4).
- Denisenko, Y.A., Gusakov, A.V., Rozhkova, A.M., Osipov, D.O., Zorov, I.N., Matys, V.Y., Uporov I.V. and Sinitsyn, A.P., 2017. Site-directed mutagenesis of GH10 xylanase A from *Penicillium canescens* for determining factors affecting the enzyme thermostability. International Journal of Biological Macromolecules, 104, 665-671.
- Dey G., Palit S., Banerjee R. and Maiti B.R., 2002. Purification and characterization of maltooligosaccharide-forming amylase from *Bacillus circulans* GRS 313. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 28, 193-200.

- Dey, T.B. and Banerjee, R., 2014. Application of decolourized and partially purified polygalacturonase and α -amylase in apple juice clarification. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(1), 97-104.
- Dhillon, A., Gupta, J.K. and Khanna, S., 2000. Enhanced production, purification and characterisation of a novel cellulase-poor thermostable, alkalitolerant xylanase from *Bacillus circulans* AB 16. *Process Biochemistry*, 35(8), 849-856.
- Dutta, N., Biswas, S. and Saha, M.K., 2017. Nano-magnesium aided activity enhancement and biophysical characterization of a psychrophilic α -amylase immobilized on graphene oxide nanosupport. *Journal of bioscience and bioengineering*, 124(1), 15-22.
- Elamary, R. and Salem, W.M., 2020. Optimizing and purifying extracellular amylase from soil bacteria to inhibit clinical biofilm-forming bacteria. *PeerJ*, 8 e10288.
- El-Fallal, A., Abou, M., El-Sayed, A. and Omar, N., 2012. Starch and Microbial α -Amylases: From Concepts to Biotechnological Applications. *Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology*, Ed: Chuan-Fa Chang. InTech Publisher, 569 p,
- Elleuche, S., Schäfers, C., Blank, S., Schröder, C. and Antranikian, G., 2015. Exploration of extremophiles for high temperature biotechnological processes. *Current Opinion in Microbiology*, 25, 113-119.
- El-Sayed, A.K., Abou-Dobara, M.I., El-Fallal, A.A. and Omar, N.F., 2019. Heterologous expression, purification, immobilization and characterization of recombinant α -amylase AmyLa from *Laceyella* sp. DS3. *International Journal of Biological Macromolecules*, 132, 1274-1281.
- El-Sayed, A.K., Abou-Dobara, M.I., El-Fallal, A.A. and Omar, N.F., 2017. Gene sequence, modeling, and enzymatic characterization of α -amylase AmyLa from the thermophile *Laceyella* sp. DS3. *Starch-Stärke*, 69(5-6), 1600255.
- Feitkenhauer, H., 2003. Anaerobic digestion of desizing wastewater: influence of pretreatment and anionic surfactant on degradation and intermediate accumulation. *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 250-258.
- Fincan, S.A. and Enez, B., 2022. Production of α -Amylase from *Bacillus megaterium* MD-1. *Türk Doğa ve Fen Dergisi*, 11(4), 36-41.
- Fincan, S.A., Enez, B., Özdemir, S. and Bekler, F.M., 2014. Purification and characterization of thermostable α -amylase from thermophilic *Anoxybacillus flavithermus*. *Carbohydrate polymers*, 102, 144-150.
- Fitchmun, M., 2016. Development of an efficient manufacturing process for adenovirus. *Bio-Rad Bulletin*, 6719.
- Fitter, J., 2005. Structural and dynamical features contributing to thermostability in α -amylases. *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences*, 62, 1925-1937.
- Fossi, B.T., Tavea, F. and Ndjouenkeu, R., 2005. Production and partial characterization of a thermostable amylase from ascomycetes yeast strain isolated from starchy soils. *African Journal of Biotechnology*, 4(1), 14-18.
- Francis, F., Sabu, A., Nampoothiri, K.M., Ramachandran, S., Ghosh, S., Szakacs, G. and Pandey, A., 2003. Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of α -amylase by *Aspergillus oryzae*. *Biochemical Engineering Journal*, 15(2), 107-115.
- Fujinami, S. and Fujisawa, M., 2010. Industrial applications of alkaliphiles and their enzymes-past, present and future. *Environmental Technology*, 31(8-9), 845-856.

- Gainvors, A., Karam, N., Lequart, C. and Belarbi, A., 1994. Use of *Saccharomyces cerevisiae* for the clarification of fruit juices. *Biotechnology Letters*, 16, 1329-1334.
- Gavrilov, S.N., Stracke, C., Jensen, K., Menzel, P., Kallnik, V., Slesarev, A., Sokolova, T., Zayulina, K., Bräsen, C., Bonch-Osmolovskaya, E.A., Peng, X., Kublanov, I.V. and Siebers, B., 2016. Isolation and Characterization of the First Xylanolytic Hyperthermophilic Euryarchaeon *Thermococcus* sp. Strain 2319x1 and Its Unusual Multidomain Glycosidase. *Frontiers in Microbiology*, 7, 552.
- Gheyntanchi, E., Heshmati, F., Shargh, B. K., Nowroozi, J. and Movahedzadeh, F., 2010. Study on β -galactosidase enzyme produced by isolated lactobacilli from milk and cheese. *Afr J Microbiol Res*, 4(6), 454-458.
- Goldsmith, M. and Tawfik, D.S., 2012. Directed enzyme evolution: beyond the low-hanging fruit. *Current Opinion in Structural Biology*, 22(4), 406-412.
- Gopinath, S.C.B., Anbu, P., Lakshmipriya, T. and Hilda, A., 2013. Strategies to characterize fungal lipases for applications in medicine and dairy industry. *BioMed research international*, 2013(1), 154549.
- Goyal, N., Gupta, J.K. and Soni, S.K., 2005, A novel raw starch digesting thermostable α -amylase from *Bacillus* sp. I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch, *Enzyme and Microbial Technology*, 37 (7), 723-734.
- Grootegoed, J.A., Lauwers, A.M. and Heinen, W., 1973. Separation and partial purification of extracellular amylase and protease from *Bacillus caldolyticus*. *Archiv fur Mikrobiologie*, 90(3), 223-232.
- Gupta, R. S., Patel, S., Saini, N., and Chen, S. 2020. Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel *Bacillaceae* genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the Subtilis and Cereus clades of species. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70(11), 5753-5798.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K. and Chauhan, B., 2003. Microbial alpha-amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 38(11), 1599-1616.
- Haki, G. and Rakshit, S., 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*, 89(1), 17-34.
- Hameed, U., Price, I., Ke, A., Wilson, D.B. and Mirza, O., 2017. Functional characterization and crystal structure of thermostable amylase from *Thermotoga petrophila*, reveals high thermostability and an unusual form of dimerization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1865(10), 1237-1245.
- Haq, I., Ali, S., Javed, M.M., Hameed, U., Saleem, A., Adnan, F. and Qadeer, M.A., 2010. Production of alpha amylase from a randomly induced mutant strain of *Bacillus Amyloliquefaciens* and its application as a desizer in textile industry. *Pak J Bot*, 42(1), 473-484.
- Harley, J.P., Prescott, L.M., 2002. *Laboratory exercises in microbiology*. McGraw-Hill, New York.
- He, X. and Snyder, M., 2012. A purification strategy for clinical-grade monoclonal antibody using hydrophobic cation exchange chromatography. *Bio-Rad Bulletin*, 6241.
- Hickey, D.A. and Singer, G.A.C., 2004. Genomic and proteomic adaptations to growth at high temperature. *Genome biology*, 5(10), 117.

- Hmidet, N., Ali, N.E., Haddar, A., Kanoun, S., Alya, S. and Nasri, M., 2009. Alkaline proteases and thermostable alpha-amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive. *Biochemical Engineering Journal*, 47, 71-79.
- Homaei, A.A., Sariri, R., Vianello, F. and Stevanato, R., 2013. Enzyme immobilization : an update. *J Chem Biol*, 6, 185-205.
- Hossain, K.M., Khan, U., Rahman, S.M. and Khan, M.S., 2024. Potential antimicrobial and fruit juice clarification activity of amylase enzyme from *Bacillus* strains. *Biotechnology Reports*, 44, e00861.
- Hu, Q., Wu, Q., Jingwei, C., Khalid, A., Li, Y. and Wang, Z., 2022. Fermentation optimization and amylase activity of endophytic *Bacillus velezensis* D1 isolated from corn seeds. *Journal of Applied Microbiology*, 132(5), 3640-3649.
- Hussain, I., Siddique, F., Mahmood, M.S. and Ahmed, S.I., 2013. A review of the microbiological aspect of α -amylase production. *International Journal of Agriculture and Biology*, 15(5), 1029-1034.
- Ibrahim, N.E. and Ma, K., 2017. Industrial Applications of Thermostable Enzymes from Extremophilic Microorganisms. *Current Biochemical Engineering*, 4(2), 75-98.
- Janecek, S. and Balaz, S., 1992. α -Amylases and approaches leading to their enhanced stability. *FEBS Letters*, 304(1), 1-3.
- Janecek, S., Svensson, B. and MacGregor, E.A. 2014. α -Amylase: an enzyme specificity found in various families of glycoside hydrolases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(7), 1149–1170.
- Jegannathan, K.R. and Nielsen, P.H., 2013. Environmental assessment of enzyme use in industrial production-a literature review. *Journal of Cleaner Production*, 42, 228-240.
- Joshi, P.A. and Yadav, A., 2016. Optimization of cultural conditions and partial characterization of alkaline amylase from *Bacillus*. *Int J Res Sci Innov*, 3(8), 71-75.
- Joshi, V.K., Chauhan, S.K. and Lal, B.B., 1991. Extraction of juices from peaches, plums and apricots by pectinolytic treatment. *Journal of food science and technology (Mysore)*, 28(1), 64-65.
- Kademi, A., Ait-Abdelkader, N., Fakhreddine, L. and Baratti, J.C., 2000. Characterization of a new thermostable esterase from the moderate thermophilic bacterium *Bacillus circulans*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 10(4), 395-401.
- Kandra, L., 2003. Alpha-amylases of medical and industrial importance. *Journal of Molecular Structure (Theochem)*, 667, 487-498.
- Kara, H.E., Sinan, S. and Turan, Y., 2011. Purification of beta-glucosidase from olive (*Olea europaea* L.) fruit tissue with specifically designed hydrophobic interaction chromatography and characterization of the purified enzyme. *Journal of Chromatography B*, 879 (19), 15071512.
- Kawasaki, Y., Aoki, M., Makino, Y., Sakai, H., Tsuboi, Y., Ueda, J., Sonoda, K., Watanabe K., Yamamoto S. and Kurosawa, N., 2011. Characterization of moderately thermophilic bacteria isolated from saline hot spring in Japan. *Microbiology Indonesia*, 5(2), 2.
- Kikani, B.A. and Singh, S.P., 2021. Critical Reviews in Biotechnology Amylases from thermophilic bacteria: structure and function relationship. *Critical Reviews in Biotechnology*, 0(0), 1-17.

- Kirk, O., Borchert, T.V. and Fuglsang, C.C., 2002. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), 345-351.
- Klement, Z., Rudolph, K. and Sands, D.C., 1990. *Methods in Phytopathology*. Eds: Z. Klement, K. Rudolph, D. C. Sands. Akademiai Kiado, Budapest, 568 p.
- Kristjansson, J.K., 1989. Thermophilic organisms as sources of thermostable enzymes. *Trends in Biotechnology*, 7(12), 349-353.
- Laemelli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage. *Nature*, 227, 680-685.
- Lebedinsky, A.V., Chernyh, N.A. and Bonch-Osmolovskaya, E.A., 2007. Phylogenetic systematics of microorganisms inhabiting thermal environments. *Biochemistry (Moscow)*, 72, 1299-1312.
- Li, W.F., Zhou, X.X. and Lu, P., 2005. Structural features of thermozymes. *Biotechnology Advances*, 23(4), 271-281.
- Lim, W.J., Park, S.R., An, C.L., Lee, J.Y., Hong, S.Y., Shin, E.C., Kim E.J., Kim J.O., Kim, H. and Yun, H.D., 2003. Cloning and characterization of a thermostable intracellular α -amylase gene from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* MSB8. *Research in Microbiology*, 154, 681-687.
- Lineweaver, H. and Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American chemical society*, 56(3), 658-666.
- Luo, Z., Miao, J., Li, G., Du, Y. and Yu, X., 2017. A Recombinant Highly Thermostable β -Mannanase (ReTMan26) from Thermophilic *Bacillus subtilis* (TBS2) Expressed in *Pichia pastoris* and Its pH and Temperature Stability. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 182(4), 1259-1275.
- Ma, S., Preims, M., Piumi, F., Kappel, L., Seiboth, B., Record, E., Kracher, D. and Ludwig, R., 2017. Molecular and catalytic properties of fungal extracellular cellobiose dehydrogenase produced in prokaryotic and eukaryotic expression systems. *Microbial Cell Factories*, 16(1), 37.
- Matpan Bekler, F., Güven, K. and Gül Güven, R., 2021. Purification and characterization of novel α -amylase from *Anoxybacillus ayderensis* FMB1. *Biocatalysis and Biotransformation*, 39(4), 322-332.
- Mehta, D. and Satyanarayana, T., 2016. Bacterial and Archaeal α -Amylases: Diversity and Amelioration of the Desirable Characteristics for Industrial Applications. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1129.
- Miller, G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.
- Mitidieri, S., Souza Martinelli, A.H., Schrank, A. and Vainstein, M.H., 2006. Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: A comparative study with commercial detergent formulations. *Bioresource Technology*, 97(10), 1217-1224.
- Mostafa, F.A., Wehaidy, H.R., El-Hennawi, H.M., Mahmoud, S.A., Sharaf, S. and Saleh, S.A., 2024. Statistical Optimization of α -Amylase Production from Novel Local Isolated *Bacillus* spp. NRC1 and Its Textile Applications. *Catalysis Letters*, 154(7), 3264-3275.
- Msarah, M.J., Ibrahim, I., Hamid, A.A. and Aqma, W.S., 2020. Optimisation and production of alpha amylase from thermophilic *Bacillus* spp. and its application in food waste biodegradation. *Heliyon*, 6(6).

- Mukherjee, A.K., Borah, M. and Rai, S.K., 2009. To study the influence of different components of fermentable substrates on induction of extracellular α -amylase synthesis by *Bacillus subtilis* DM-03 in solid-state fermentation and exploration of feasibility for inclusion of α -amylase in laundry detergent. *Biochemical Engineering Journal*, 43(2), 149-156.
- Muralikrishna, G. and Nirmala, M., 2005. Cereal α -amylases-an overview, 60, 163-173.
- Najafi, M.F. and Kembhavi, A., 2005. One step purification and characterization of an extracellular α -amylase from marine *Vibrio* sp. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(4), 535-539.
- Narayanasamy, P., 1997. Plant Pathogen Detection and Disease Diagnosis. *Plant Pathogen Detection and Disease Diagnosis*. CRC Press, Boca Raton, 544 p.
- Nevalainen, H. and Peterson, R., 2014. Making recombinant proteins in filamentous fungi- are we expecting too much? *Frontiers in microbiology*, 5, 75.
- Olsen, H.S. and Falholt P., 1998. The role of enzymes in modern detergency. *Journal of Surfactants and Detergents*, 1(4), 555-567.
- Osunde, M., Abiola, O., Philip, S., Adewale, O. and Bakare, M., 2025. Extracellular Thermophilic α -Amylase from *Bacillus Subtilis* Derived from Cassava Waste Water. Available at SSRN 5134155.
- Oyenado, O.A., and Omoruyi, I.M., 2024. Review of amylase production by microorganisms and their industrial application. *Ife Journal of Science*, 26(2), 537-553.
- Ölmez, S., 2017. Nevşehir Kozaklı kaplıcalarından izole edilen termofilik bakterilerin izolasyonu, identifikasyonu, *Bacillus licheniformis* SO7'den α -amilaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Özdemir, S., Okumus, V., Ulutas, M.S., Dundar, A., Akarsubasic, A.T. and Dumontet, S., 2016. Production and characterization of thermostable α -amylase from thermophilic *Anoxybacillus flavithermus* sp. nov. SO-19. *Starch-Stärke*, 68: 1244-1253.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C.R., Soccol, V.T., Singh, D. and Mohan, R., 2000. Advances in Microbial Amylases. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 31, 135-152.
- Pham, V.H.T., Kim, J., Shim, J., Chang, S. and Chung, W., 2022. Purification and Characterization of Strong Simultaneous Enzyme Production of Protease and α -Amylase from an Extremophile-*Bacillus* sp. FW2 and Its Possibility in Food Waste Degradation. *Fermentation*, 8(1).
- Podar, M. and Reysenbach, A., 2006. New opportunities revealed by biotechnological explorations of extremophiles, 250-255.
- Pollo, S.M.J., Zhaxybayeva, O. and Nesbø, C.L., 2015. Insights into thermoadaptation and the evolution of mesophily from the bacterial phylum Thermotogae. *Canadian Journal of Microbiology*, 61(9), 655-670.
- Prakash, O. and Jaiswal, N., 2010. α -Amylase: An Ideal Representative of Thermostable Enzymes. *Appl Biochem Biotechnol*, 160, 2401-2414.
- Priest, F.G., 1977. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriological Reviews*, 41(3), 711-753.
- Priyadarshini, S. and Ray, P., 2019. Exploration of detergent-stable alkaline α -amylase AA7 from *Bacillus* sp strain SP-CH7 isolated from Chilika Lake. *International Journal of Biological Macromolecules*, 140, 825-832.

- Priyadarshini, S., Pradhan, S.K. and Ray, P., 2020. Production, characterization and application of thermostable, alkaline α -amylase (AA11) from *Bacillus cereus* strain SP-CH11 isolated from Chilika Lake. *International Journal of Biological Macromolecules*, 145, 804-812.
- Raddadi, N., Cherif, A., Daffonchio, D., Neifar, M. and Fava, F., 2015. Biotechnological applications of extremophiles, extremozymes and extremolytes. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:7907-7913
- Rao, J.L. and Satyanarayana, T., 2007. Improving production of hyperthermostable and high maltose-forming α -amylase by an extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans* using response surface methodology and its applications. *Bioresource technology*, 98(2), 345-352.
- Ratanakhanokchai, K., Kaneko, J., Kamio, Y. and Izaki, K., 1992. Purification and properties of a maltotetraose- and maltotriose-producing amylase from *Chloroflexus aurantiacus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(8), 2490-2494.
- Raza, S.K., 2011. Effect of pigment volume concentration on the enzyme activity of bioactive coatings. Master of Science in Engineering, Faculty of Technology and Science, Karlstads university p 66
- Rebello, S., Raveendran, S. and Parameswaran, B., 2019. Enzyme Catalysis: A Workforce to Productivity of Textile Industry. *High value fermentation products: human welfare*, 2, 49-65.
- Rehman, A., Saeed, A., Asad, W., Khan, I., Hayat, A., Rehman, M.U., Shah, T.A., Sitotaw, B., Dawoud, T.M. and Bourhia, M., 2023. Eco-friendly textile desizing with indigenously produced amylase from *Bacillus cereus* AS2. *Scientific Reports*, 13(1), 11991.
- Rekadwad, B.N., 2015. Characterization of amylase from industrially important thermophilic microorganism: *Geobacillus thermoleovorans* strain rekadwadsis. *Int. J. Life Sci. Biotechnol. Pharma Res*, 4, 26-30.
- Robinson, P.K., 2015. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in biochemistry*, 59, 1-41.
- Robty, J.F., 2009. Enzymes and Their Action on Strach, Chemistry and Technology, Third Edition, Academic press, Ankara, 237- 292.
- Roe, S., 2001. Protein purification techniques: a practical approach (Vol. 244). OUP Oxford.
- Roy, J.K. and Mukherjee, A.K., 2013. Applications of a high maltose forming, thermo-stable α -amylase from an extremely alkalophilic *Bacillus licheniformis* strain AS08E in food and laundry detergent industries. *Biochem Eng J*, 77, 220.
- Rudenko, S.V., 2010. Erythrocyte morphological states, phases, transitions and trajectories. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1798: 1767-1778.
- Sadeghi, M., Naderi-Manesh, H., Zarrabi, M. and Ranjbar, B., 2006. Effective factors in thermostability of thermophilic proteins. *Biophysical Chemistry*, 119(3), 256-270.
- Sahay, H., Yadav, A.N., Singh, A.K., Singh, S., Kaushik, R. and Saxena, A.K., 2017. Hot springs of Indian Himalayas: potential sources of microbial diversity and thermostable hydrolytic enzymes. *3 Biotech* 7, 118.
- Saini, R., Saini, H.S. and Dahiya, A., 2017. Amylases: Characteristics and industrial applications. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(4), 1865-1871.
- Santos, H. and Costa, M.S., 2002. Minireview Compatible solutes of organisms that live in hot saline environments. *Environmental Microbiology*, 4(9), 501-509.

- Satheesh Kumar, G., Chandra, M.S., Mallaiah, K.V., Sreenivasulu, P. and Choi, Y.L., 2010. Purification and characterization of highly thermostable α -amylase from thermophilic *Alicyclobacillus acidocaldarius*. *Biotechnology and Bioprocess engineering*, 15, 435-440.
- Sawle, L. and Ghosh, K., 2011. How Do Thermophilic Proteins and Proteomes Withstand High Temperature? *Biophysical Journal*, 101, 217-227.
- Saxena, A.K., Yadav, A.N., Rajawat, M., Kaushik, R., Kumar, R., Kumar, M., Prasanna, R. and Shukla, L., 2016. Microbial diversity of extreme regions: an unseen heritage and wealth. *Indian J Plant Genet Resour* 29, 246-248
- Saygılı, H., 1995. *Fitobakteriyoloji*. Bornova-İzmir: Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü.
- Schaeffer, A.B., and Fulton, M., 1933. A simplified method of staining endospores. *Science* 77, 194.
- Seidel, Z.P. and Lee, T., 2020. Enhanced activity of the cellulase enzyme β -Glucosidase upon addition of an azobenzene-based surfactant. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 8 (4), 1751-1761.
- Sharif, S., Shah, A.H., Fariq, A., Jannat, S., Rasheed, S. and Yasmin, A., 2023. Optimization of amylase production using response surface methodology from newly isolated thermophilic bacteria. *Heliyon*, 9(1).
- Sharma, H., Batra, N. and Singh, J., 2022. Purification, characterization and potential detergent industry application of a thermostable α -amylase from *Bacillus licheniformis* RA31. *Indian Journal of Experimental Biology (IJEb)*, 60(05), 331-342.
- Sharma, H.P., Patel, H. and Sugandha., 2017. Enzymatic added extraction and clarification of fruit juices—A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(6), 1215-1227.
- Sharma, N., Ahlawat, Y.K., Mehmood, S., Sharma, A.J., Thakur, P., Malik, A., Sindhu M., Samani M. and Ahlawat, U., 2024. Industrially Significant Extremophiles and Their Unexplored Habitats in Hot Water Springs. *Geomicrobiology Journal*, 42(1), 40-52.
- Sharma, P., Mondal, K., Tamang, S., Kumar, S., Najar, I. N., Das, S., Mondal, K.C. and Thakur, N., 2025. A malto-oligosaccharide forming thermostable acidic α -amylase from *Bacillus stercoris* YSP18 isolated from sediment of Sikkim hot spring: heterologous expression and characterisation. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, 5(1), 185-202.
- Sharma, S., Vaid, S., Bhat, B., Singh, S. and Bajaj, B.K., 2019. Chapter 17. Thermostable Enzymes for Industrial Biotechnology. *Advances in Enzyme Technology*, Editor(s): Ram Sarup Singh, Reeta Rani Singhania, Ashok Pandey, Christian Larroche. Elsevier, 469-495.
- Shiau, R.J., Hung, H.C. and Jeang, C.L., 2003. Improving the Thermostability of Raw-Starch-Digesting Amylase from a *Cytophaga* sp. by Site-Directed Mutagenesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), 2383-2385.
- Shibuya, I., Iimura, Y., Ishikawa, T., Ouchi, K., Yamamoto, T., Morikawa, M. and Nishiya, T., 1986. Isolation and Characterization of Starch-utilizing Mutants of *Escherichia coli*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 50(4), 875-882.
- Shukla, R.J. and Singh, S.P., 2015. Production optimization, purification and characterization of α -amylase from thermophilic *Bacillus licheniformis* TSI-14. *Starch-Stärke*, 67(7-8), 629-639.

- Singh, J., Kaur, L. and McCarthy, O.J., 2007. Factors influencing the physico-chemical , morphological , thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications - A review. Article in Press, 21, 1-22.
- Singh, S., Sharma, S., Kaur, C. and Dutt, D., 2014. Potential of cheap cellulosic residue as carbon source in amylase production by *Aspergillus niger* SH-2 for application in enzymatic desizing at high temperatures. Cellul Chem Technol, 48, 521-527.
- Singh, R.N., Bahuguna, A., Chauhan, P., Sharma, V.K., Kaur, S., Singh, S.K. and Khan, A., 2016. Production, purification and characterization of thermostable α -amylase from soil isolate *Bacillus* sp. strain B-10. Journal of BioScience & Biotechnology, 5(1).
- Sørensen, F.J., Kragh, K.M., Sibbesen, O., Delcour, J., Goesaert, H., Svensson, B., Tahir, T.A., Brufau, J., Perez-Vendrell, A.M., Bellincampi, D., D'Ovidio, R., Camardella, L., Giovane, A., Bonnin, E. and Juge, N., 2004. Potential role of glycosidase inhibitors in industrial biotechnological applications. Biochimica et Biophysica Acta, 1696, 275-287.
- Souza, P.M. and Magalhães, P.D.O., 2010. Application of microbial α -amylase in industry - a review. Brazilian Journal of Microbiology, 41, 850-861.
- Soy, S., Nigam, V.K. and Sharma, S.R. 2021. Enhanced production and biochemical characterization of a thermostable amylase from thermophilic bacterium *Geobacillus icigianus* BITSNS038. Journal of Taibah University for Science, 15(1), 730–745.
- Stetter, K.O., 2006. History of discovery of the first hyperthermophiles. Extremophiles, 10(5), 357-362.
- Stirnemann, G. and Sterpone, F., 2017. Mechanics of Protein Adaptation to High Temperatures. The Journal of Physical Chemistry Letters, 8(23), 5884-5890.
- Sudan, S.K., Kumar, N., Kaur, I. and Sahni, G., 2018. Production, purification and characterization of raw starch hydrolyzing thermostable acidic α -amylase from hot springs, India. International journal of biological macromolecules, 117, 831-839.
- Sundarram, A. and Murthy, P.T.K., 2014. α -Amylase Production and Applications: A Review. Journal of Applied & Environmental Microbiology, 2(4), 166-175.
- Svensson, B., 1994. Protein engineering in the α -amylase family: catalytic mechanism, substrate specificity, and stability. Plant Molecular Biology, 25(2), 141-157.
- Syu M.J. and Chen, Y.H., 1997. A study on the α -amylase fermentation performed by *Bacillus amyloliquefaciens*. Chemical Engineering Journal, 65, 237-247.
- Tamaki, F.K., Souza, D.P., Souza, V.P., Ikegami, C.M., Farah, C.S. and Marana, S.R., 2016. Using the amino acid network to modulate the hydrolytic activity of β -Glycosidases. PLoS One, 11(12).
- Tambekar, D.H., Raut, N.S. and Dhundale, V.R., 2013. Partial characterization and optimization of alkaline amylase production by *Bacillus circulans* from Lonar Lake. Biosci Discovery, 4(2), 202-207.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A. and Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Molecular Biology and Evolution, 30(12), 2725-2729.
- Tarakçioğlu, Y., 1979. An Amylase Producing Maltotriose from *Bacillus subtilis*. Agric. Biol. Chem, 49(4), 1901-1907.
- Taşer, B., 2019. Topraktan izole edilen bakterilerle karides kabuğundan kitin ekstraksiyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

- Telefoncu, A., 1993. Besin Kimyası, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları No:149, İzmir, 216 s.
- Temiz, A., 1996. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. Ed: Ayhan Temiz, Hatiboğlu Yayınevi, Ankara, 278 s.
- Teodoro, C.E.D.S. and Martins, M.L.L., 2000. Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus* sp. Brazilian Journal of Microbiology, 31(4), 298-302.
- Thorat, V., Kirdat, K., Tiwarekar, B., Dhanavade, P., Karodi, P., Shouche, Y., Sathe, S., Lodha, T. and Yadav, A., 2021. Description of *Paenibacillus albicerus* sp. nov. and *Niallia alba* sp. nov., isolated from digestive syrup, Arch Microbiol, 204(2), 127.
- Timilsina, P.M., Pandey, G.R., Shrestha, A., Ojha, M. and Karki, T.B., 2020. Purification and characterization of a noble thermostable algal starch liquefying alpha-amylase from *Aeribacillus pallidus* BTPS-2 isolated from geothermal spring of Nepal. Biotechnology Reports, 28, e00551.
- Tipton, K., 2018. Translocases (EC 7): a new EC class, ExplorEnz: The Primary Source of the IUBMB Enzyme List.
- Toksoy, E., 2006. Optimization of ethanol production from starch by an amylolytic nuclear petite *Saccharomyces cerevisiae* strain. Yeast, 23(12), 849-856.
- Turner, P., Mamo, G. and Karlsson, E.N., 2007. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. Microbial Cell Factories, 6(1), 1-23.
- Ugwuoji, E.T., Nwagu, T.N.T. and Ezeogu, L.I., 2023. Detergent-stable amylase production by *Paenibacillus lactis* strain OPSA3 isolated from soil; optimization by response surface methodology. Biotechnology reports, 39, e00808.
- Ulucay, O., Gormez, A., and Ozic, C., 2022. Identification, characterization and hydrolase producing performance of thermophilic bacteria: geothermal hot springs in the Eastern and Southeastern Anatolia Regions of Turkey. Antonie van Leeuwenhoek, 1-18.
- Vaidya, A., George, R., George, J. J. and SP, S., 2020. Comparative Analysis of thermophilic Alpha-amylase using In Silico approach. Proceedings of the National Conference on Innovations in Biological Sciences (NCIBS).
- Vaillant, F., Millan, A., Dornier, M., Decloux, M. and Reynes, M., 2001. Strategy for economical optimisation of the clarification of pulpy fruit juices using crossflow microfiltration. Journal of Food Engineering, 48(1), 83-90.
- Van Der Maarel, M.J.E.C., Van Der Veen, B., Uitdehaag, J.C.M., Leemhuis, H. and Dijkhuizen, L., 2002. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. Journal of Biotechnology, 94(2), 137-155.
- Vasudha, M., Prashantkumar, C. S., Bellurkar, M., Kaveeshwar, V. and Gayathri, D., 2023. Probiotic potential of β -galactosidase-producing lactic acid bacteria from fermented milk and their molecular characterization. Biomedical reports, 18(3), 23.
- Ventosa, A., Queseda, E., Valera, F.R., Berraquero, F.R., and Cormenzana, A.R., 1982. Numerical Taxonomy of Moderately Halophilic Gram-negative Rods. Journal of Geeneral Microbiology, 128, 1959-1968.
- Vieille, C. and Zeikus, G.J., 2001. Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 65(1), 1-43.

- Visvanathan, R., Houghton, M.J. and Williamson, G., 2020. Maltoheptaoside hydrolysis with chromatographic detection and starch hydrolysis with reducing sugar analysis Comparison of assays allows assessment of the roles of direct α -amylase inhibition and starch complexation. *Food Chemistry*, 343, 128423.
- Wang, S., Jeyaseelan, J., Liu, Y. and Qin, W., 2016. Characterization and optimization of amylase production in WangLB, a high amylase-producing strain of *Bacillus*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 180, 136-151.
- Wang, S., Liang, T. and Yen, Y., 2011. Bioconversion of chitin-containing wastes for the production of enzymes and bioactive materials. 84, 732-742.
- Winn, W.C., 2006. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Lippincott williams & wilkins.
- Yano, J.K. and Poulos, T.L., 2003. New understandings of thermostable and peizostable enzymes. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(4), 360-365.
- Zhang, X., Li, C., Chen, X., Chio, C., Shrestha, S, and Qin, W., 2021. *Bacillus velezensis* identification and recombinant expression, purification, and characterization of its alpha-amylase. *Fermentation*, 7(4), 227.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Behiye TAŞER
Doğum tarihi:	
Doğum Yeri:	
Uyruğu:	
Adres:	
E-mail:	
Eğitim	
Lise:	İskenderun Fatih Anadolu Lisesi / HATAY
Lisans:	Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü
Yüksek lisans:	Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı, Gen Mühendisliği Bilim Dalı
Doktora:	Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı, Mikrobiyoloji Bilim Dalı
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	İyi
Tezden Üretilmiş Yayınlar	