ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nihan ARABACI

COLD AKTİF ALKALİN AMİLAZ ENZİMİ ÜRETEN *BACILLUS* sp. SUŞLARININ İZOLASYONU, ENZİM ÜRETİMİ, KARAKTERİZASYONU VE ENDÜSTRİYEL KULLANIM OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2011

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

COLD AKTİF ALKALİN AMİLAZ ENZİMİ ÜRETEN *BACILLUS* sp. SUŞLARININ İZOLASYONU, ENZİM ÜRETİMİ, KARAKTERİZASYONU VE ENDÜSTRİYEL KULLANIM OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI

Nihan ARABACI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez …/…/… Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/~~Oyçokluğu~~ İle Kabul Edilmiştir.

.....	.....
Prof. Dr. Burhan ARIKAN	Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
DANIŞMAN	ÜYE

.....
Yrd. Doç. Dr. Ashabil AYGAN
ÜYE

Bu tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. İlhami YEĞİNGİL
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FEF2010YL12

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

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

COLD AKTİF ALKALİN AMİLAZ ENZİMİ ÜRETEN *BACILLUS* sp. SUŞLARININ İZOLASYONU, ENZİM ÜRETİMİ, KARAKTERİZASYONU VE ENDÜSTRİYEL KULLANIM OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI

Nihan ARABACI

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Burhan ARIKAN
Yıl: 2011**,** Sayfa**:** 89
Jüri : Prof. Dr. Burhan ARIKAN
Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
Yrd. Doç. Dr. Ashabil AYGAN

Bu çalışmada, Ankara ve Tuz Gölü'nden izole edilen alkalifilik *Bacillus* sp. suşlarından amilaz enzimi izolasyonu ve karakterizasyonu yapılmıştır. Bu amaçla, enzimin optimum aktivite sıcaklığı ve pH'sı, pH stabilitesi, sıcaklık stabilitesi, SDS-PAGE zimogram analizi ve ince tabaka kromatografisi analizi gerçekleştirilmiştir.

Bacillus sp. NCA35 amilaz enziminin moleküler ağırlığı SDS-PAGE zimogram analizinde 205 kDa bulunmuştur. Enzim optimum aktivitesini 25ºC ve pH 8.0'de göstermiştir. Enzim 10-40ºC arasında 30 dakikada aktivitesinin yaklaşık %96'sını korumuştur. Amilaz enzimi 25ºC'de 24 saat süreyle ortalama %53 stabil kalmıştır. Enzimin aktivitesi %3 NaCl'de 60 dakika süre ile %56 korunmuştur. Enzimin aktivitesini %1 β-merkaptoetanol (%103) indüklerken, 5mM $BaCl_2$, EDTA, $CaCl_2$, NaCl, $ZnCl_2$, $MnCl_2$, 3mM PMSF ve 8M üre, sırasıyla, %27, %42, %35, %43, %40 %36, %41 ve %58 inhibe etmiştir. İnce tabaka kromatografisi analizinde, reaksiyon ürünlerinin glikoz, maltoz ve maltoz türevli oligosakkaritler olduğu bulunmuştur.

Bu sonuçlara göre, NCA35 enzimi, soğukta aktif, asido-alkali, termostabil ve pH-stabil özellik göstermektedir. Bu özelliklerinden dolayı NCA35 amilaz enzimi, deterjan, gıda ve içecek endüstrileri ile biyoremediasyon uygulamalarında ve prebiyotik üretiminde kullanılabilme potansiyeline sahiptir.

Anahtar Kelimeler: Alkalin**,** *Bacillus* sp., Cold Aktif Amilaz, Zimogram, Kromatografi

ABSTRACT

M.Sc. THESIS

ISOLATION OF COLD ACTIVE ALKALINE AMYLASE PRODUCING *BACILLUS* sp. STRAINS, ENZYME PRODUCTION, CHARACTERIZATION AND INVESTIGATION OF INDUSTRIAL APPLICATIONS

Nihan ARABACI

DEPARTMENT OF BIOLOGY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF CUKUROVA

Supervisor : Prof. Dr. Burhan ARIKAN
Year: 2011, Pages: 89
Jury : Prof. Dr. Burhan ARIKAN
Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
Assist. Prof. Dr. Ashabil AYGAN

In this study, the amylase enzyme from *Bacillus* sp. strains isolated from Ankara and salt lake was produced and characterized. For this purpose, optimum temperature and pH value, temperature and pH stability, SDS PAGE zymogram analysis and thin layer chramatography analysis of enzyme was investigated.

Molecular weight of the enzyme from *Bacillus* sp. NCA35 was estimated as 205 kDa on SDS-PAGE. The enzyme showed its optimum activity at 25ºC and pH 8.0. The enzyme activity was retained around 96% of the original activity within 30 minutes between 10-40ºC. Enzyme was also stable about %53 at 25ºC for 24 hours. The residual enzyme activity was 56% in the presence of 3% NaCl at 60 min.

As the β-mercaptoethanol stimulated the enzyme activity (103%), $BaCl_2$, EDTA, $CaCl_2$, NaCl, $ZnCl_2$, $MnCl_2$ (5mM), PMSF (3mM) and Urea (8M) inhibited the activity to %27, %42, %35, %43, %40 %36, %41 and %58, respectively. Glucose, maltose and maltose-derived oligosaccharide were determined as hydrolysis products by thin layer chromatography.

According to these results, NCA35 enzyme shows cold active, acido-alkaline, thermostable and pH-stable properties. Therefore, NCA35 cold active amylase enzyme has the potentials to use in detergents, beverage and food industries, bioremediation applications and prebiotic production.

Key Words: Alkaline, *Bacillus* sp., Cold Active Amylase, SDS-PAGE, Zymogram Chromatography

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca, bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Burhan ARIKAN'a çok teşekkür ederim.

Gerek bilimsel gerekse manevi desteğiyle bana her zaman yardımcı olan hocam Sayın Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ'e çok teşekkür ederim.

Çukurova Üniversitesi'nde yüksek lisans eğitimime başladığım günden beri bitmeyen neşeleriyle bana her zaman manevi destek sağlayan ve deneysel çalışmalarım esnasında emeği geçen, Moleküler Biyoloji Laboratuvarı'nda bulunan Yüksek Lisans ve Doktora öğrencisi değerli çalışma arkadaşlarıma sevgilerimi sunarım.

Bütün hayatım boyunca mutlu olmam için her çabayı sarfeden, en iyi şartlarda eğitim öğretim görmem için maddi ve manevi destekleriyle yanımda olan, benden sevgi, ilgi ve hoşgörülerini esirgemeyen canım annem Ayşegül ARABACI'ya ve canım babam Muharrem ARABACI'ya, biricik kardeşim Vehbican ARABACI'ya sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT II
TEŞEKKÜR III
İÇİNDEKİLER IV
ÇİZELGELER DİZİNİ VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ X
SİMGELER VE KISALTMALAR XII
1. GİRİŞ 1
1.1. *Bacillus* Cinsi 8
1.2. Nişasta 9
1.3. Amilazlar 11
1.4. Amilazların Bazı Uygulama Alanları 13
1.5. Elektroforez 16
1.5.1. Doğal (Native) Jel Elektroforezi 17
1.5.2. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi 18
1.6. Kromatografi 18
1.7. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) 19
1.8. Araştırmanın Amacı 20
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 21
3. MATERYAL VE METOD 25
3.1. Materyal 25
3.1.1. Bakteri İzolasyonu ve Teşhisinde Kullanılan Besiyerleri 25
3.1.1.1. N1Agar 25
3.1.1.2. M9 Nişasta Agar 25
3.1.2. Kullanılan Çözeltiler 26
3.1.2.1. NaOH 26
3.1.2.2. Etanol 26
3.1.2.3. Lügol 26
3.1.2.4. Sodyum Fosfat Tamponu (0.1M, pH 7.0) 27

3.1.2.5. Sodyum Fosfat Tamponu 27
3.1.2.6. Glisin-NaOH Tamponu 28
3.1.2.7. Borax-NaOH Tamponu 28
3.1.2.8. Dinitro Salisilik Asit (DNS) 29
3.1.2.9. İyodin Solüsyonu 29
3.1.3. SDS-PAGE İşleminde Kullanılan Solüsyonlar 29
3.1.3.1. Solüsyon A (Akrilamid Solüsyonu) 29
3.1.3.2. Solüsyon B(4X) 30
3.1.3.3. Solüsyon C(4X) 30
3.1.3.4. Amonyum Persülfat (AMPS) (%10) 30
3.1.3.5. Örnek Yükleme Tamponu (5X) 30
3.1.3.6. Elektroforez Tamponu 30
3.1.3.7. Jel boyama Solüsyonu (Staining) 30
3.1.3.8. Jelden Boyayı Geri Alma Solüsyonu (Destaining) 31
3.1.3.9. SDS-PAGE Zimogram Analizlerinde Kullanılan Renatürasyon Solüsyonları 31
3.1.4. İnce tabaka Kromatografisi Solüsyonları 31
3.1.4.1. Butanol-Asetik Asit-Distile Su 31
3.1.4.2. %20'lik Sülfirik Asit Çözeltisi (H_2SO_4) 31
3.1.4.3. D-Glikoz Çözeltisi (%4 w/v) 32
3.1.4.3. Maltoz Çözeltisi (%4 w/v) 32
3.2. Metod 32
3.2.1. Bakteri İzolasyonu ve Teşhisi 32
3.2.1.1. Topraktan *Bacillus* sp. Suşlarının İzolasyonu 32
3.2.1.2. Bakteri Teşhisi 33
3.2.2. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi 33
3.2.2.1. Katı Besiyerinde Amilaz Aktivitesinin Belirlenmesi 33
3.2.2.2. Bakterilerin Katı Besiyerinde Ürediği ve Enzim Sentezinin Gerçekleştiği pH Aralığının Saptanması 33
3.2.2.3. *Bacillus* sp. Bakterilerinin Katı Besiyerinde Ürediği ve Enzim Sentezinin Gerçekleştiği Sıcaklık Aralığının

Saptanması 34
3.2.2.4. Sıvı Kültürde Amilaz Enzim Üretimi ve Kısmi Saflaştırma..... 33
3.2.2.5. Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değerinin Saptanması..... 34
3.2.2.6. Enzimin Aktivite Gösterdiği Optimum Sıcaklık Değerinin Saptanması..... 35
3.2.2.7. Enzimin Termal (Sıcaklık) Stabilitesinin Saptanması..... 35
3.2.2.8. Enzimin pH Stabilitesinin Saptanması 36
3.2.2.9. İnhibitör, Şelatör, Metal İyonu, Deterjan ve Okside edici Ajanların Enzim Aktivitesine Etkisi 36
3.2.2.10. NaCl'ün Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi 37
3.2.3. SDS-PAGE Elektroforez Yöntemi İle Moleküler Ağırlık ve Zimogram Analizi 38
3.2.3.1. Ayırıcı Jelin Hazırlanması 38
3.2.3.2. Dengeleme Jel'inin Hazırlanması (%5)..... 38
3.2.3.3. Enzim Örneklerinin SDS-PAGE Jeline Yüklenmesi ve Yürütülmesi 38
3.2.3.4. SDS-PAGE Jelinin Boyanması ve Zimogram Analizleri... 39
3.2.4. İnce Tabaka Kromatogrfisi (TLC) Plakalarının Hazırlanması ve Enzim Substrat Reaksiyonu Sonunda Açığa Çıkan Son Ürünlerin Saptanması..... 39
4. BULGULAR VE TARTIŞMA..... 41
4.1. Topraktan *Bacillus* sp. Suşlarının İzolasyonu ve Tanımlanması 41
4.2. Bakterinin Katı Besiyerinde Ürediği ve Enzim Sentezini Gerçekleştirdiği pH ve Sıcaklık Aralığı Sonuçları 41
4.3. Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Aralığına Ait Bulgular..... 49
4.4. Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Değerlerine Ait Bulgular 51
4.5. Enzimin Termal Stabilitesine Ait Sonuçlar 54

4.6. Enzimin pH Stabilitesine Ait Sonuçlar..... 56
4.7. Farklı NaCl Konsantrasyonlarının Enzim Aktivitesine Etkisi..... 58
4.8. *Bacillus* sp. NCA35 Amilaz Enzimi Aktivitesine İnhibitör, Şelatör, Metal İyonu, Deterjan ve Okside Edici Ajanların Etkisi..... 61
4.9. *Bacillus* sp. NCA35 Amilaz Enziminin SDS-PAGE Zimogram Analizi.. 64
4.10. *Bacillus* sp. NCA35 Amilaz Enziminin İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) Analizi 65
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 69
KAYNAKLAR..... 77
ÖZGEÇMİŞ 89

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 4.1. *Bacillus* sp. NCA35 bakterisinin 2ºC'de ve farklı pH değerlerinde M9 Nişastalı katı besiyerindeki koloni ve aktivite zon çapları..... 42
Çizelge 4.2. *Bacillus* sp. NCA35 bakterisinin 10ºC'de ve farklı pH değerlerinde M9 Nişastalı katı besiyerindeki koloni ve aktivite zon çapları..... 42
Çizelge 4.3. *Bacillus* sp. NCA35 bakterisinin 15ºC'de ve farklı pH değerlerinde M9 Nişastalı katı besiyerindeki koloni ve aktivite zon çapları..... 43
Çizelge 4.4. *Bacillus* sp. NCA35 bakterisinin 20ºC'de ve farklı pH değerlerinde M9 Nişastalı katı besiyerindeki koloni ve aktivite zon çapları..... 44
Çizelge 4.5. *Bacillus* sp. NCA35 bakterisinin 25ºC'de ve farklı pH değerlerinde M9 Nişastalı katı besiyerindeki koloni ve aktivite zon çapları..... 45
Çizelge 4.6. *Bacillus* sp. NCA35 bakterisinin 30ºC'de ve farklı pH değerlerinde M9 Nişastalı katı besiyerindeki koloni ve aktivite zon çapları..... 45
Çizelge 4.7. *Bacillus* sp. NCA35 amilaz enziminin optimum pH değeri..... 49
Çizelge 4.8. *Bacillus* sp. NCA35 amilaz enzimi optimum aktivite sıcaklık değeri..... 51
Çizelge 4.9. *Bacillus* sp. NCA35 amilaz enziminin termal stabilite sonuçları..... 54
Çizelge 4.10. *Bacillus* sp. NCA35 amilaz enziminin pH stabilitesi sonuçları..... 57
Çizelge 4.11. İnhibitör, şelatör, metal iyonları ve deterjanların etkilerine ait sonuçlar..... 59
Çizelge 4.12. Farklı NaCl konsantrasyonlarının amilaz enzimi aktivitesine etkileri..... 62

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1. *Bacillus* sp.'nin ışık ve elektron mikroskobundaki görüntüsü 8
Şekil 1.2. *Bacillus* sp.'nin elektron mikroskobu görüntüsü..... 8
Şekil 4.1. *Bacillus* sp. NCA35 suşunun 2ºC ve pH 9.0, 10.0, 11.0 ve 12.0'de katı besiyerindeki koloni ve aktivite zon çapları 46
Şekil 4.2. *Bacillus* sp. NCA35 suşunun 10ºC ve pH 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 ve 11.0'de katı besiyerindeki koloni ve aktivite zon çapları 47
Şekil 4.3. *Bacillus* sp. NCA35 suşunun 15ºC ve pH 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 ve 11.0'de katı besiyerindeki koloni ve aktivite zon çapları 47
Şekil 4.4. *Bacillus* sp. NCA35 suşunun 20ºC ve pH 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 ve 11.0'de katı besiyerindeki koloni ve aktivite zon çapları 48
Şekil 4.5. *Bacillus* sp. NCA35 suşundan izole edilen enziminin nişastalı agar besiyerinde oluşturduğu aktivite zonu..... 48
Şekil 4.6. *Bacillus* sp. NCA35 amilaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değeri ve aralığı 50
Şekil 4.7. *Bacillus* sp. NCA35 amilaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri ve aralığı..... 52
Şekil 4.8. *Bacillus* sp. NCA35 amilaz enziminin termal stabilite sonuçları 55
Şekil 4.9. *Bacillus* sp. NCA35 amilaz enziminin pH stabilite sonuçları 57
Şekil 4.10. *Bacillus* sp. NCA35 Amilaz Enzimi Üzerine İnhibitör, Şelatör, Metal İyonu, Deterjan ve Okside Edici Ajanların Etkisi..... 60
Şekil 4.11. %3-%30 NaCl konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisi 63
Şekil 4.12. *Bacillus* sp. NCA35 Amilaz Enziminin Molekül Büyüklüğü ve Zimogram Analizi (SDS-PAGE) 64
Şekil 4.13. *Bacillus* sp. NCA35 Amilaz Enziminin İnce Tabaka Kromatografisiyle Son Ürünlerinin Saptanması..... 66

SİMGELER VE KISALTMALAR

AMPS	: Amonyum Persülfat
DNS	: Dinitro Salisilik Asit
EDTA	: Etilen diamino tetra asetik asit
PMSF	: Fenil metil sülfonil florid
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TEMED	: N,N,N,N-Tetrametil etilendiamin
Tris	: 2-Amino-2-Hidroksimetilpropan-1,3-diol
TLC	: Thin Layer Chromatography
rpm	: dakikadaki devir sayısı

1. GİRİŞ

Enzimler, canlı hücrelerde bulunan, kimyasal dönüşümlerin meydana gelmesinde katalizör rolü oynayan kompleks organik moleküllerdir. Biyokimya bilim dalının gelişimiyle, enzimlerin canlı hücrelerde bulunmaları ve etki şekilleri hakkında çok çeşitli bilgiler elde edilmiştir. Bununla birlikte, enzimler sadece canlı hücrelerde aktivite göstermezler. Bunlardan bazıları hücrelerden ayrılabilir ve fonsiyonlarına *in vitro* devam edebilirler. Enzimlerin izolasyon esnasında kendi özel kimyasal dönüşümlerini gerçekleştirmelerini sağlayan bu özellikleri, gıda üretimi, biyoremediasyon ve ilaç gibi birçok farklı endüstriyel alanda kullanımlarının giderek yaygınlaşmasına neden olmuştur. Bu uygulamalar genel olarak enzim teknolojisi şeklinde adlandırılmaktadır (Smith, 2004).

Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle, biyoteknolojinin endüstriyel enzimlerle ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar, daha da önem kazanmaktadır (Gözükara, 2009).

Enzim aktivitesi, enzimin katalitik doğasıyla ilişkilidir. Enzimin katalitik fonksiyonu yalnızca enzimin primer moleküler yapısına değil, aynı zamanda enzim molekülünün karışık katlanmış konfigürasyonuna da bağlıdır. Enzim, reaksiyon esnasında tüketilmeden aktivitesini korur ve reaksiyon, çok yüksek hızlarda gerçekleşir (Smith, 2004). Biyokimyasal reaksiyonlarda görev alan enzimler, reaksiyonun aktivasyon enerjisini artırmaktadır. Enzimlerin reaksiyon ve substrat spesifikliği olmak üzere iki önemli özgünlükleri bulunmaktadır. Enzim reaksiyon spesifikliğinden anlaşılan, substratın birçok değişim reaksiyonu mümkün iken, enzimin substratı bu yollardan sadece birine göre katalize etmesidir. Enzim, rekabete giren substratlar arasında kendi özgül substratını ayırt eder ve yalnızca onunla reaksiyona girer. Her enzim sadece bir substratla reaksiyona girebilir (Tunail, 2009). Enzimler, sadece substratlarına spesifik olup, çok az miktardaki enzim çok fazla miktardaki substratla reaksiyona girebilir (Smith, 2004). Enzimlerin çoğu saf proteindir. Buna karşın, birçok enzim katalitik aktivite için protein yapıya (apoenzim) ek olarak protein olmayan kofaktöre (prostetik grup veya metal iyonları)

gereksinim duyar (Tunail, 2009). Bazı maddeler enzimlerin aktif bölgelerinin tutulması sonucu enzimin deformasyonunu sağlayarak, katalitik aktivitesini düşürebilir veya tamamen durdurabilirler. Bu tür maddelere 'inhibitör' adı verilmektedir (Aehle, 2004).

Enzimler, kendi özelliklerinden dolayı yapısal olarak benzer oldukları kimyasallar arasında seçicilik gösterebilirler. Enzimler çok geniş sıcaklık değerleri (0-100˚C) ve pH (2-14) aralığındaki reaksiyonları katalizleyebilmektedirler. Ayrıca enzimler non-toksik ve geri dönüşümlü olmalarının yanı sıra, mikroorganizmalar tarafından büyük miktarlarda üretilebilmektedirler (Smith, 2004).

Her organizma pek çoğu az miktarda üretilen ve hücresel süreçlerde yer alan çeşitli enzimler üretmektedir. Bazı enzimler, bazı organizmalar tarafından çok daha fazla miktarda üretilir ve üretim sırasında hücre dışına salgılanırlar. Ekzoenzimler denilen bu ekstrasellüler enzimler selüloz, protein ve nişasta gibi çözünmeyen polimerleri parçalama yeteneğindedirler. Yıkım sonucu oluşan ürünler, organizmanın gereksinimlerini karşılamak için hücre içerisine alınırlar (Madigan ve Martinko, 2010).

Enzim teknolojisi; üretim, izolasyon, saflaştırma ile enzimlerin çözünmüş ve immobilize formlarının kullanımını kapsamaktadır. Ticari olarak üretilmiş enzimler, modern toplumun karşı karşıya olduğu gıda üretimi, enerji azlığı ve korunumu, çevrenin verimli hale getirilmesi ve medikal uygulamalardaki problemlerin çözümüne katkıda bulunmaktadır. Enzim teknolojisi temelini biyokimyadan almış olmasına rağmen özellikle mikrobiyoloji alanından yararlanmaktadır. Enzimlerin dünya pazarında 2 milyar doların üzerinde değere sahip olduğu ve önümüzdeki yıllarda pazar payının daha çok artacağı tahmin edilmektedir (Smith, 2004).

Bugüne kadar yaklaşık 2500 farklı enzim tanımlanmış ve bunların ancak %10'u ticari alanda kullanım için kendilerine yer bulmuşlardır. Bu %10 içinde 25 tanesi nişasta sanayi ile deterjan katkı maddesi olarak kullanılmış olup, ticari alanda yararlanılan bütün enzimlerin %80 ini oluşturmaktadırlar (Woodley, 2000).

Bitkisel ve hayvansal enzimlerin endüstriyel ihtiyacı karşılayamaması, bu alandaki ilginin giderek artan bir şekilde mikrobiyal enzimlere yönelmesini sağlamıştır. Mikroorganizmalar, biyokimyasal çeşitlilikleri, ekstrem koşullarda

aktivite gösteren çok farklı enzimler üretmeleri ve genetik manipülasyonlara uygunlukları gibi sebeplerden dolayı mükemmel bir enzim kaynağı olarak değerlendirilmektedir (Rao ve ark, 1998).

Endüstride kullanılan enzimlerin yaklaşık %75'ini hidrolitik enzimler oluşturmaktadır. Karbonhidratları parçalayan enzimlerden amilazlar, enzim piyasasında yaklaşık %25'lik bir paya sahiptir (Sidhu ve ark, 1997; Rao ve ark, 1998).

Kullanılan endüstriyel enzimlerin çoğu hidrolitik özelliktedir (proteolitik, amilolitik ya da lipolitik). Hidrolitik enzimlerin çok farklı alanlarda kullanılabilmelerinin temelinde, aktivite göstermek için kofaktöre ihtiyaç duymamaları yatmaktadır. Bu enzimler fermentasyondan sonra hücre sıvısından rahatlıkla ayrılabilmektedirler. Endüstriyel enzimlerin yaklaşık %50'sini bakteriyel, %50'sini de fungal enzimler oluşturmaktadır (Wim, 2006).

Enzimler, peynir ve ekmek yapımı, ilaç üretimi, deterjan katkı maddesi, alkollü içeceklerin üretimi, meyve sularının yapımı gibi gıda ve sağlık endüstrilerinde kullanılırken, deterjan ve tekstil endüstrisi gibi birçok alanda da yaygın şekilde kullanılmaktadır (Madigan ve Martinko, 2010; Tatar, 2007). Çeşitli endüstri alanlarında kullanılan enzimlerin dağılımları şu şekildedir: Gıda endüstrisinde %41, deterjan endüstrisinde %34, tekstilde %11, deri endüstrisinde %3, kağıt hamuru/kağıt endüstrisinde %1 ve diğer uygulamalarda %6 (Smith, 2004).

Mikrobiyal enzimlerin dünya genelinde yıllık kullanım değerlerine bakıldığı zaman, alkaline proteaz %25, diğer proteazlar %21, amilaz %18, renin %10, tripsin %3, lipaz %3, karbonhidratları parçalayan diğer enzimler (selülaz ve ksilanaz gibi) %10, farmasötik enzimler %10 olacak şekilde bir dağılım göstermektedir (Rao ve ark, 1998).

İlk enzim uygulamalarında kaynak olarak bitkiler ve hayvanlar tercih edilmiştir. Proteazlardan papin papayadan, ficin incirden ve bromelain ananastan elde edilmiştir. Hayvansal organizmalar esteraz, proteaz ve lipaz gibi enzimler için önemli kaynaklardandır. 1950'lerin ortalarına doğru, enzim teknolojisinin de gelişmesiyle mikrobiyal kaynaklı enzimlerin kullanımı gündeme gelmiştir. (Smith, 2004). Enzimler, bakteriler ve funguslar tarafından ticari olarak üretilmektedirler

(Madigan ve Martinko, 2010). Endüstriyel açıdan öneme sahip olan enzimlerin bazı mikroorganizmalar tarafından üretilebilmeleri, mikroorganizmaların da enzim kaynağı olarak kullanılmalarına sebep olmuştur. Enzim üretiminin %90'ı mantar, bakteri ve maya gibi mikroorganizmalardan sağlanmakta, geri kalan %6'sı hayvanlardan, %4'ü ise bitkilerden elde edilmektedir. Endüstriyel alanda kullanılan enzimlerin çoğu ekstrasellüler enzimlerdir (Smith, 2004).

Endüstride kullanılan enzimler bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kaynaklı olmakla birlikte, ağırlıklı olarak mikroorganizmalardan izole edilmektedirler. Bunun nedeni, mikrobiyal kaynaklı enzimlerin katalitik aktivitelerinin yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve daha ucuz olmaları, büyük miktarlarda ve yüksek saflıkta elde edilmeleri gibi avantajlara sahip olmalarıdır. Örneğin, mikrobiyal enzimler ekstrem sıcaklık ve pH değerlerinde çok yüksek düzeyde aktivite gösterirler (Wiseman, 1987; Horikoshi, 1999).

Endüstride faydalı olan ve ticari olarak kullanılan enzimler, bir ürünün üretilmesinde bazı avantajlara sahip olmalıdırlar. Buna göre, bir enzimin herhangi bir endüstri alanında kullanılabilmesi için, maliyet bakımından ucuz olması, çok farklı alanlarda kullanılabilme özelliğine sahip olması ve en önemlisi de enzimin alerjik ya da toksik etkiye sahip olmaması ve güvenilir olması gerekmektedir (Wiseman, 1987; Sarıkaya, 1995).

Bir enzim molekülü genel anlamda globüler yapıda bulunur. Molekül içi veya moleküller arası bağlar ile sekonder ya da tersiyer yapıda tutulur. Proteinlerin bu yapıları sıcaklık ve pH'daki değişmeler ile bozulabilir. Bu yüzden, bir enzimin katalitik aktivitesi pH ve sıcaklığa duyarlıdır (Aehle, 2004). Her enzim maksimum aktivite gösterebilmek için optimum pH ve sıcaklığa gereksinim duymaktadır. Hayvansal enzimlerin sıcaklık optimumu genellikle 37˚C civarındayken, bitkisel enzimlerde optimum sıcaklık 60-70˚C'ye kadar yükselmektedir. Mikrobiyal enzimlerde enzimatik reaksiyon için optimum sıcaklık, genellikle mikroorganizmanın optimum ürediği sıcaklığa bağlıdır. Psikrofilik mikroorganizmaların enzimleri optimum aktivitelerini suyun donma derecesine yakın sıcaklıklarda gösterirken, ekstrem termofillerin enzimleri 100˚C'ye yaklaşan sıcaklıklarda aktivite göstermektedirler. Enzim aktivitesini etkileyen diğer bir faktör,

ortamdaki H^+ iyonu derişimidir. Enzimatik reaksiyon hızının en yüksek değere ulaştığı H^+ iyonu konsantrasyonu enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değeridir. Mikrobiyal enzimlerin optimum pH değeri, mikroorganizmanın alkalofilik veya asidofilik olmalarına göre farklılıklar göstermektedir (Tunail, 2009). Örneğin¸ alkalifilik mikroorganizmalardan elde edilen enzimler aşırı bazik reaksiyon şartlarına sahip uygulamalar için kullanışlı olabilirler. Deterjan üretimi bu duruma örnek olarak gösterilebilir (Burg, 2003).

İnsanlar Dünya üzerinde genelde ılıman iklimlerde yaşadıkları için, çok sıcak ve çok soğuk çevreler ekstrem kabul edilmektedir. Buna karşılık, pek çok mikroorganizma aşırı sıcak ya da soğuk ortamlar, toprak, su, hayvan ve bitkiler gibi yaygın habitatlar ve insanlar tarafından yapılmış yapıların içi ve yüzeyi dahil olmak üzere her yerde yaşamaktadırlar. Bu ortamlar ekstrem çevreler olarak adlandırılırlar. Çoğunlukla prokaryotlardan oluşan, ekstrem şartlarda yaşayabilen organizmalar **ekstremofiller** olarak isimlendirilmektedirler. Ekstremofil organizmalar bu koşullar altında optimum şekilde üremek üzere evrimleşmişlerdir. Ekstremofilik prokaryotlar kaplıcalarda, buzla kaplı göl sularında, kutup bölgelerindeki buzul ve denizlerde, aşırı tuzlu sularda, pH'sı 0-12 aralığındaki toprak ve su gibi çevrelerde üreyebilmektedirler. Ekstremofil organizmalardan, yüksek sıcaklıkta yaşayanlar **hipertermofiller**, düşük sıcaklıkta yaşayanlar **psikrofiller**, yüksek pH'da yaşayanlar **alkalifiller**, düşük pH'da yaşayanlar **asidofiller**, basınçlı ortamda yaşayabilenler **barofiller**, yüksek tuz konsantrasyonuna dayanıklı olanlar ise **halofiller** olarak adlandırılmaktadır (Madigan ve Martinko, 2010).

Mikroorganizmaları sıcaklık ihtiyaçlarına göre dört grup altında toplanmak mümkündür. Düşük sıcaklıkta üreyenler **psikrofiller** (20^oC altında), orta aralıklardaki sıcaklıkta üreyenler **mezofiller** (20-55^oC), yüksek sıcaklıkta üreyenler **termofiller** (55^oC-80°C) ve oldukça yüksek sıcaklıkta üreyenler **hipertermofiller** (80°C üzerinde) şeklinde adlandırılırlar (Madigan ve Martinko, 2010; Gomes ve Steiner, 2004).

Dünya üzerinde ekstrem ortamlarda üreyen çeşitli organizmalar arasında biyokütle, çeşitlilik ve dağılım açısından en çok bulunan organizmalar psikrofillerdir. Ekstrem psikrofiller, Antarktik ve Arktik kutup bölgelerinden, yüksek rakımlı

dağlardan, buzullardan, okyanuslardan elde edilebilmektedirler. Psikrofil organizmalardan izole edilen enzimlerin büyük çoğunluğu cold aktif özellikte olup, organizmanın düşük sıcaklıklara adaptasyonunda rol almaktadırlar (Margesin ve Feller, 2010). Bu organizmalar düşük sıcaklıklarda yaşamak için bir dizi adaptasyon geliştirmişlerdir. Örneğin; psikrofilik enzimler düşük sıcaklıklarda katalizör görevi görebilmektedir. Bu özellik psikrofil organizmalardan elde edilecek enzimlerin deterjan, tekstil ve gıda gibi endüstriyel alanlarda kullanımı, enerji tüketimini azaltmaya yönelik avantajlar sağlamaktadır (Jahandideh ve ark, 2007).

Ekstremofilik enzimler sıcaklık, basınç, pH ve tuzluluk gibi ekstrem şartlarda aktivite gösterebilen ve endüstriyel uygulamalar için büyük öneme sahip enzimlerdir. Mezofilik enzimler, enzim stabilitelerindeki eksikliklerden dolayı endüstriyel enzimlerden istenen zorlu reaksiyon şartları için pek uygun değillerdir. Alkalifilik mikroorganizmalar, alkalifiller ve haloalkalofiller olmak üzere iki ana fizyolojik grupta toplanmaktadırlar. Alkalifil organizmalar, üremek için genellikle 8'in üzerinde pH'ya ihtiyaç duymakla birlikte, pH 9-10 aralığında da optimum üreme göstermektedirler (Aygan, 2008).

Psikrofil organizmalar, 0-20°C aralığında üremekle birlikte, 15°C'de optimum üreme gösterirler. 0˚C'de üreyebilen, buna karşılık 20-25˚C'ler arasındaki sıcaklıklarda optimum üreme gösteren organizmalar **psikrotolerant** olarak adlandırılırlar. Psikrofiller, kutup bölgelerinde ya da buralardaki deniz çökeltileri gibi devamlı soğuk olan çevrelerde bulunmaktadırlar. Psikrotolerant mikroorganizmalar psikrofillerden çok daha fazla yayılım göstermekte olup, ılıman iklimlerdeki toprak ve su örneklerinden, et, süt, süt ürünleri, elma şarabı ve buzdolabında (4˚C) saklanan sebze ve meyvelerden izole edilebilmektedirler (Madigan ve Martinko, 2010).

Psikrotroflar, düşük aktivasyon enerjili ve düşük sıcaklıklarda yüksek aktivite gösteren enzimler sentezlemektedirler (Morita ve ark, 1997; Margesin ve Feller, 2010). Soğuğa adapte mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin en belirgin özelliği, reaksiyonu düşük sıcaklıklarda gerçekleştirebilmek için yüksek katalitik yeterliliğe sahip olmalarıdır (Chessa ve ark, 1999). Bu özellikler cold aktif enzimlere büyük ekonomik değer kazandırmaktadır. Çünkü bu enzimlerin enzimatik reaksiyonları, mezofillerin enzimlerinin katalitik aktivitelerinin önemli derecede

düşüş gösterdiği 0-20°C'lerde gerçekleşebilmektedir. Bu açıdan bakıldığında cold-aktif enzimler birçok endüstriyel uygulama alanının ilgisini çekmiştir. Soğuğa adapte mikroorganizmaların kullanımı, enerji tasarrufunda önemli bir avantaj sağlamaktadır. Deterjan katkı maddesi olarak kullanılıp temizleme işlemlerinin düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilmesi ve bu sayede enerji tasarrufu sağlanması buna örnek olarak verilebilir (Morita ve ark,1997). Bu organizmaların yüksek katalitik aktiviteye sahip olan enzimleri moleküler biyoloji, medikal araştırmalar, endüstriyel gıdalar, besin teknolojileri, deterjanlar, kozmetik gibi uygulama alanlarında çok tercih edilmektedir (Margesin ve Feller, 2010).

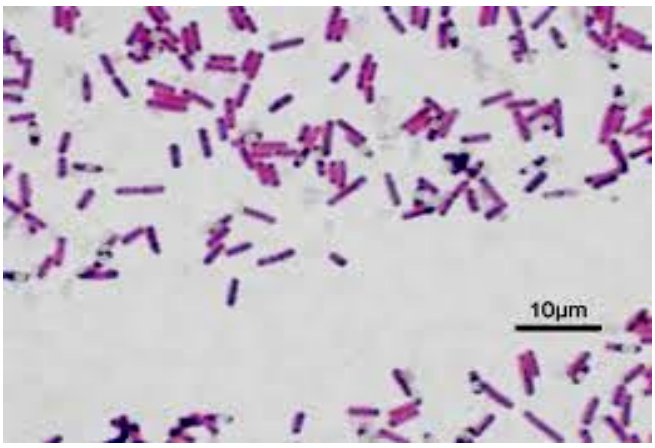
Enzimlerin deterjanlarda kullanımı 1965'lere kadar nispeten düşük olmakla beraber, 1966–1969 yılları arasında önemli oranda artış gerçekleşmiştir. Bununla birlikte deterjan üretiminin yapıldığı fabrikalardaki çalışanlarda bazı alerjik semptomlar görülmüştür. Bu duruma bağlı olarak enzimler deterjanlardan çıkarılmıştır. Fabrikalarda uygun önlemlerin alınmasıyla riskler ortadan kaldırılmış ve enzimler tekrar deterjanlarda kullanılmaya başlanmıştır (Smith, 2004). Endüstriyel açıdan büyük miktarda üretilen mikrobiyal enzimler arasında, özellikle çamaşır deterjanlarında katkı maddesi olarak proteazlar kullanılmaktadır. Günümüzde pek çok çamaşır deterjanı proteazlarla birlikte amilaz, lipaz, redüktaz ve diğer enzimleri de içermektedirler. Bu enzimlerin büyük çoğunluğu ***Bacillus*** türleri başta olmak üzere alkalifilik bakterilerden izole edilmektedirler (Madigan ve Martinko, 2010).

Batı Avrupa'da elbiselerin temizlenmesi için asıl gerekli olanın sıcak suyla (65–70˚C) yıkama olduğu düşünülmektedir. Amerika ve Kanada'da çoğu makine 55˚C'de çalışmaktadır. Bunlara karşın, Japonya'da elbiseler genellikle soğuk suda uzun periyodlarda yıkanmaktadır. Böylelikle, düşük sıcaklıklarda, örneğin 20-30˚C'lerde aktivite gösteren deterjan enzimlerinin kullanımı dünya çapında yaygınlaşmıştır. Deterjan piyasasında proteazlar ön plana çıkmakla birlikte nişasta ve yağ kirliliklerinin giderimi için amilaz ve lipaz enzimlerinin de deterjan katkı maddesi olarak kullanımları her geçen gün artmaktadır (Smith, 2004).

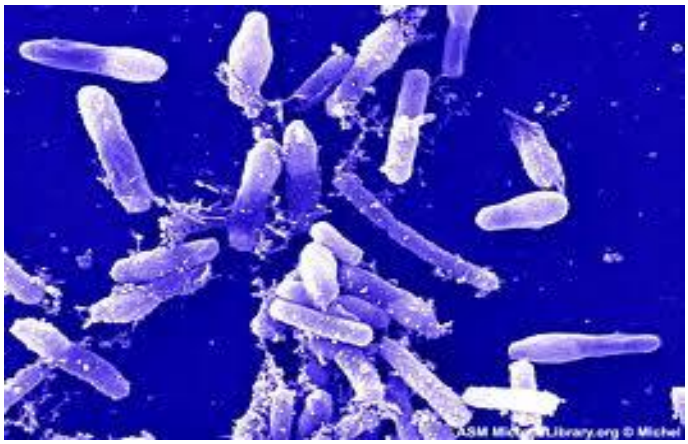
1.1. *Bacillus* Cinsi

Bacillaceae familyasının bir üyesi olan *Bacillus*'lar, çomak şekilli, endospor oluşturan, aerob veya fakültatif aerob, peritrik kamçılı, katalaz pozitif ve gram pozitif bakterilerdir (Madigan ve Martinko, 2010; Breed ve ark, 1957).

Endosporları genellikle silindirik, elipsoidal, oval veya yuvarlaktır. Spor, hücrede sentral, parasentral, subterminal, terminal ya da lateral olarak bulunabilir. Sporun şeklinin ve konumunun farklı olması *Bacillus*'ların tanımlanmasında faydalanılan bir özelliktir (Breed ve ark, 1957).



Şekil 1.1. *Bacillus* sp.'nin ışık mikroskobundaki görüntüsü
http://en.wikipedia.org/wiki/File:Bacillus subtilis Gram.jpg, 27.07.2011



Şekil 1.2. *Bacillus* sp.'nin elektron mikroskobundaki görüntüsü
http://www.frilabo.pt, 27.07.2011

Endospor oluşturan bakteriler toprakta bulundukları için ekolojik olarak birbirleriyle ilişki içindedirler. Endospor oluşturabilme yeteneği, toprak organizmaları için bir avantajdır. Çünkü toprak, besin değeri, sıcaklık ve su aktivitesi bakımından çok çeşitlilik gösteren doğal bir çevredir. Dolayısıyla, uzun süre (belki de milyonlarca yıl) stabil halde kalabilen, ısıya ve kurumaya dayanıklı bu yapılar doğadaki yaşam mücadelesinde, bulunduğu organizmaya avantajlar sağlamaktadır. Endospor oluşturan bakterileri topraktan, besinlerden, toz ve diğer materyallerden izole etmek için örnekler 80˚C'de 10 dakika muamele edilir (Madigan ve Martinko, 2010).

Organizmaları mezofil, termofil, psikrofil, asidofil ve halofil olmak üzere birkaç gruba ayırmak mümkündür.. Bu gruplara dahil olan cinsler yaşamlarını ekstrem çevre koşullarında spor formunda sürdürebilirler (Gerçeker, 1999; Breed ve ark, 1957).

Bacillus türleri çoğunlukla saprofit olup, doğada yaygın olarak toprakta, toz parçacıkları ile bulaşması sonucu suda, bitki, bitki atıkları ve hayvanlarda bulunmaktadırlar. Endüstriyel ve pratik mikrobiyolojide sıklıkla kullanılan *Bacillus* türlerinin çoğu kısa fermentasyon sürelerinde hızlı üreme yeteneğine sahip olmaları, izolasyon ve teşhislerinin kolay olması, ekstrasellüler ürün sentezleme yetenekleri nedeniyle oldukça ilgi çekici endüstriyel organizmalardır.Gram pozitif olan *Bacillus*'lar, ürettikleri proteinleri ekstrasellüler olarak salgılama kapasitesine sahiptirler. Ancak gram negatif bakteriler, enzimlerini protoplazmalarında veya periplazmik boşluklarında biriktirirler. Gram negatif bakterilerdeki bu özellik, üretilen ürünün izolasyonunu güçleştirerek endüstriyel suştan birden fazla kez yararlanılmasını engellemektedir. Ayrıca gram negatif bakteriler, insanlara karşı toksik olan endotoksin üreticisidirler (Schallmey ve ark, 2004). Bu sebeplerden dolayı, endüstriyel enzim üretiminde çoğunlukla gram pozitif bakteriler, özellikle de *Bacillus* türleri tercih edilmektedir.

1.2. Nişasta

Nişasta, yüksek bitkilerde birincil olarak depo edilen bir polimerdir (Wim, 2006). Glikozun depo edilmiş şekli olan nişasta, bitkilerde önemli bir karbonhidrat rezervidir (Amoozegar ve ark, 2003). Fotosentez sonucu bitki yapraklarındaki plastidlerde sentezlenmektedir (Robyt, 1998). Nişasta, birbirine glikozidik bağlarla bağlanmış glikoz birimlerinden oluşmaktadır. Glikozidik bağlar yüksek pH'larda stabil olmakla birlikte çok düşük pH'larda da hidroliz olabilmektedirler. Nişasta, glikoz birimlerinden meydana gelmiş amiloz (%15–30) ve amilopektin (%70–85) olmak üzere iki farklı yapının polimerleşmesiyle oluşmuştur (Maarel ve ark, 2002). Amiloz, α-1,4-glikozidik bağlarla bağlanmış 6000 glukoz ünitesinden oluşan lineer bir polimerdir. Amilopektin, 24–30 glikoz biriminde bir α-1,6 bağlarıyla dallanmalar yaparak ortalama 2 milyon glikoz ünitesinden meydana gelen dallanmış bir polimer olup, doğadaki en büyük moleküllerden biridir (Maarel ve ark, 2002; Aiyer, 2005; Wim, 2006; Souza ve ark, 2010).

Nişasta, polisakkaritler arasında büyük öneme sahip olan bir moleküldür. Bazen bitkilerde yaş ağırlığın %70'ini oluşturur. Genellikle suda çözünmez granül formunda yer alırlar. Granüllerin şekli ve büyüklükleri bitki türlerine göre değişebilir. Suda ısıtıldıklarında, granülleri birarada tutan hidrojen bağları zayıflayarak şişer ve jelatinize olurlar. Ticari olarak, mısır, buğday, sorgum ve pirinç gibi bitkilerin tohumlarından ya da patates gibi bitkilerin yumrularından elde edilirler (Aiyer, 2005; Maarel ve ark, 2002)

Geçmiş yıllarda, maltodekstrin, modifiye nişasta, glukoz ve fruktoz şuruplarının üretiminde nişastanın asitle hidrolizinin yanında, nişastayı parçalayıcı enzimlerin de kullanıldığı görülmüştür. Nişastayı hidroliz eden enzimler bugün dünya enzim üretiminin %30'unu oluşturmaktadır. Nişasta parçalayıcı enzimler nişasta hidrolizinin yanı sıra, çamaşır ve bulaşık deterjanlarında, bayatlamayı önleyici faktör olarak fırıncılıkta ve birçok endüstriyel uygulamada kullanılmaktadır (Maarel ve ark, 2002).

Nişastanın gıda endüstrisi dışında kullanıldığı alanların başında kağıt endüstrisi gelmektedir. Örneğin, bir fotokopi kağıdında kullanılan nişasta %8'e kadar

çıkabilmektedir. Ayrıca, kısmen jelatinize edilmiş nişasta karton imalatında oluklu orta tabakanın dış tabakalara yapıştırılması amacı ile yapıştırıcı olarak kullanılır. Bunların yanı sıra, sıcakla eriyen yapıştırıcıların (Hot-melt glues) yapımı, pul, zarf, kitap ciltleme işlemleri, normal ve suya dayanıklı etiketler, ağaç tutkalı ve sunta imalatı, kağıt keselerde yapıştırıcı ve katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Nişasta bu alanların dışında çocuk bezi imalatında, patlayıcı endüstrisinde bağlama ajanı olarak, otomotiv endüstrisi ve inşaat sektöründe beton blok bağlayıcılarda, yangına dayanıklı duvar blokların imalatında, asbest, kil ve kireç taşı katkı maddesi olarak, kontraplak ve sunta imalatında ve boya dolgu maddesi olarak kullanılmaktadır. Metal endüstrisinde kum kalıpların bir arada tutulması, madencilikte cevher flotasyonu ve sedimentasyonunda, yağlı delik matkapları çamurunda kullanılmaktadır. Bu alanların dışında, kozmetik ve ilaç endüstrisinde, toz pudra yapımında, makyaj malzemelerinde, yüz kremlerinde ve sabun üretiminde kullanılmaktadır. Ayrıca nişasta, çürüyebilen (geri dönüşümlü) plastik filmlerde, kuru pillerde, deri cilalama işlemlerinde de kullanım alanına sahiptir (Aygan, 2008).

1.3. Amilazlar

Amilazlar, “glikozid hidrolaz” olarak da bilinen, endüstriyel açıdan büyük öneme sahip enzimlerdir (Gupta ve ark, 2003). Amilazlar, bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar gibi çeşitli kaynaklardan elde edilebilmektedirler. Genel olarak, mikrobiyal kaynaklı enzimlerden amilazların endüstriyel alanda kullanımı oldukça yaygındır (Pandey ve ark, 2000; Burhan ve ark, 2003). Nişastayı glikoz üniteleri içeren daha küçük polimerlere hidroliz etmektedirler. Amiloz, amilopektin ve glikojeni oluşturan glikoz birimleri arasındaki glikozidik bağları parçalayabilme yeteneğine sahiptirler. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, çeşitli mikroorganizmalardan elde edilen ekstraselüler α-amilazlar kullanılmaktadır. Amilazların üretiminde mikroorganizmaların kullanılmasının en önemli avantajı, ekonomik olarak toplu üretim kapasitesine sahip olmaları ve istenilen özellikteki enzimlerinin manipüle edilmesinin kolay olmasıdır (Gupta ve ark, 2003).

Nişasta parçalayıcı enzimler dört grupta toplanabilir;

1. endoamilazlar
2. ekzoamilazlar
3. dallanmaları hidroliz eden enzimler
4. transferazlar

Endoamilazlar¸ amiloz ya da amilopektin zincirinde oluşan α-1,4-glikozidik bağları hidroliz etmektedirler. α-1,4 bağlarını hidrolize edebilen ve α-1,6 dallanma noktalarını atlayabilen zincir üzerinde rastgele aktivasyon gösterebilen, ekstrasellüler bir enzim olan α-amilaz (EC 3.2.1.1.) en iyi bilinen endoamilazdır (Pandey ve ark, 2000; Kiran ve Chandra, 2008). Bakterilerde ve Arkea grubuna dahil olan birçok mikroorganizmada bulunmaktadır (Pandey ve ark, 2000). Endoamilazlar nişasta molekülünü farklı uzunluklarda düz ya da dallanmış oligosakkarit oluşturacak şekilde rastgele parçalarlar (Gupta ve ark, 2003).

Ekzoamilazlar ise, indirgen olmayan uç kısmından itibaren kısa son ürün oluşturacak şekilde hidroliz gerçekleştirirler (Gupta ve ark, 2003). Ekzoamilazlar, özellikle α-1,4-glikozidik bağlarını hidrolize edebilen fakat α-1,6 dallanma noktalarını geçemeyen ve nişasta zincirini indirgen olmayan ucundan itibaren parçalayan β-amilazları (EC 3.2.1.2.), α-1,4 ve α-1,6 glikozidik bağları parçalayan amiloglikozidaz/glikoamilaz (EC 3.2.1.3) ve özellikle amiloz ve amilopektine etki eden diğer enzimler sayesinde meydana gelmiş kısa zincirli oligosakkaritler üzerindeki α-1,4 bağlanmalarını hidrolize eden α-glukosidazları (EC 3.2.1.20) içermektedir (Pandey ve ark, 2000; Reddy ve ark, 2003; Aiyer, 2005).

Nişasta parçalayıcı enzimlerin üçüncü grubunda, sadece α-1,6 glikozidik bağları hidroliz ederek doğrusal polisakkaritler oluşturan enzimler bulunmaktadır. Bunlar, izoamilaz (EC 3.2.1.68) ve pullulanazlardır (EC 3.2.1.41). İkisi arasındaki en önemli fark, pullulanı hidroliz edebilme kabiliyetleridir. Pullulan, α-1,6 glikozidik bağlarıyla bağlanmış maltotrioz ünitelerinden oluşan bir polisakkarittir (Israildes, 1999). Pullulanazlar, pullulan ve amilopektindeki α-1,6 glikozidik bağları hidroliz ederken, izoamilazlar yalnızca amilopektindeki α-1,6 glikozidik bağlarını hidroliz etmektedirler. Hidroliz sonucunda açığa çıkan ürünler maltoz ve maltotriozdur (Takata ve ark, 1992).

Nişastayı parçalayan enzimlerin dördüncü grubunda, molekülün α-1,4 glikozidik bağlarını ayıran ve glikozidik alıcısına yeni glikozidik bağın oluşumu için donörün fonksiyonel grubunu transfer eden transferazlar bulunmaktadır. Bunlar, amilomaltaz (EC 2.4.1.25) ve siklodekstrin glikosiltransferazlardır (EC 2.4.1.19).

Enzimatik reaksiyonları birbirine benzemekle birlikte, amilomaltazların transglikozilasyon reaksiyonları lineer ürünle sonlanırken, siklodekstrinlerin transglikozilasyon reaksiyonları halkasal bir ürünle sonlanmaktadır. Amilomaltazlar, maltoz kullanan ve glikojen degradasyonu yapan mikroorganizmalarda bulunmaktadır (Takaha ve Smith, 1999). Nişastayı, siklodekstrin şeklinde adlandırılan indirgenmeyen siklik D-glikozil polimerlerine parçalayan enzim siklodekstrin glikosiltransferazdır (EC 2.4.1.19) (Reddy ve ark, 2003; Aiyer, 2005).

α-amilaz (EC 3.2.1.1), glikozidik bağları parçalayarak nişasta, glikojen ve bunun gibi polisakkaritleri hidroliz etmektedir (Wim, 2006). Nişasta molekülündeki α-1,4 bağlarını parçalayarak glikoz, maltoz, maltotrioz ve α-limit dekstrinlerin oluşumunu sağlar. Özellikle α-amilazlar endüstride kullanılan enzimlerin en popüler ve önemli formlarından biridir. α-amilaz enzimi endüstriyel boyutlarda ilk kez 1939 yılında *Bacillus subtilis* suşu kullanılarak Japonya'da üretilmiştir. 1970 yılında *B.subtilis* ve *B.licheniformis* α-amilaz enzimi üretimi için kullanılmıştır (Tatar, 2007). Endüstriyel anlamda en önemli endoamilazlar, *Bacillus*'lardan izole edilen α-amilazlardır. Ticari amilazların çoğu *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. coagulans*, *B. licheniformis* ya da *B. stearothermophilus* gibi bazı *Bacillus* türleri tarafından üretilmektedir (Wim, 2006). Amilaz, karbon döngüsünde gıda, deterjan ve farmasötik gibi biyoteknolojik uygulamalarda çok önemli bir yere sahiptir (Amoozegar ve ark, 2003).

1.4. Amilazların Bazı Uygulama Alanları

α-amilaz, *Bacillus* sp. grubu bakterilerde oldukça yaygın bir şekilde bulunur (Igarashı ve ark, 1998). Endüstriyel uygulamalarda yaygın olarak kullanılan bir enzimdir. Nişastanın şekerleştirilmesi (saccharification) ve sıvılaştırılmasının (liquefaction) yanı sıra, tekstilde vizkoz, stabil nişasta solüsyonlarının

hazırlanmasında ve haşıllama işlemlerinde, bira ve meyve sularında oluşan bulanıklığın berraklaştırılmasında, hayvan yemlerinde sindiriminin kolaylaştırılması ve besinden daha fazla yararlanmada kullanılmaktadır (Maarel ve ark, 2002). Bu enzim ekmek, pasta, bira, peynir gibi gıda endüstrisi ürünlerinde, nişastadan maltoz şuruplarının üretilmesinde, otomatik çamaşır ve bulaşık makinelerinde kullanılan deterjanların üretiminde kullanılmakla birlikte (Igarashı ve ark, 1998), gıdalarda tatlandırıcı ve kaliteyi artırıcı olarak (Anonymous, 1988) ve nişastadan alkol üretiminde yaygın bir kullanım alanı bulunmaktadır (Bailey ve Ollis, 1977).

Amilazlar, ekmek ve unlu mamüllerde daha iyi kabarma, renk ve daha yumuşak ürün elde etmek amacıyla kullanılmaktadır. Amilaz ilavesi ile fermentasyon oranı artmakta, hamurun viskozitesi azalmakta, ürün hacmi ve hamurda şeker miktarı yükseltilerek ekmek kalitesi arttırılmaktadır. Alfa amilazların en büyük pazarı, glukoz ve fruktoz gibi nişastanın parçalanması sonucu açığa çıkan ürünlerin üretim alanıdır. Tatlandırıcı özelliklerinden dolayı alkolsüz içecek endüstrisinde çok büyük oranlarda kullanılırlar. Aynı zamanda alkollü içecek endüstrisinde, alkol fermentasyonu için nişastanın sıvılaştırılması ve şekerleştirilmesi aşamalarında kullanılmaktadırlar.

Nişasta tekstil endüstrisinde haşıllama işleminde kullanılmaktadır. İpliğin kırılmasını önlemek amacı ile sonradan giderimi kolay koruyucu bir tabaka uygulaması yapılır. Bu amaçla tekstil ürünlerinin nişasta ile muamele edilmesine ‘sizing’ (haşıllama), nişastanın uzaklaştırılmasına ise ‘desizing’ (haşıl alma) denir. Haşıllama dokuma esnasında tekstile direnç kazandırır. Dokuma işleminden sonra nişastanın uzaklaştırılmasını takiben yumuşatma ve boyama işlemi başlar. Nişastanın giderilmesi ise genellikle α-amilaz uygulaması ile gerçekleştirilir (Souza ve ark, 2010).

Alfa-amilazların kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde kullanımı, kağıt kaplamasında nişastanın modifikasyonu şeklinde gerçekleştirilir. Tekstilde olduğu gibi, kağıdın nişasta ile kaplanması kağıdı mekanik hasarlara karşı korumaktadır. Aynı zamanda son ürün halindeki kağıdın sertliğini, direncini ve kalitesini de artırmaktadır. Doğal nişastanın viskozitesi kağıt işlemleri için çok yüksektir.

Nişastanın istenilen yoğunluğa ulaşması, amilaz enzimi kullanılarak nişastanın belirli düzeyde hidrolizasyonu sonucu elde edilir (Aygan, 2008).

Amilazların endüstriyel öneminden dolayı, deterjan endüstrisi için alkalin amilaz gibi, endüstriyel uygulamalara uygun özellikte amilaz enzimi üreten yeni bakteri suşlarının izolasyonuna olan ilgi artmıştır (McTigue ve ark, 1995). Alkalifilik mikroorganizmalardan elde edilen enzimler, özellikle aşırı asidik ve aşırı bazik reaksiyon şartlarına sahip uygulamalar için oldukça kullanışlıdırlar. Deterjan üretimi bu duruma örnek olarak gösterilebilir (Burg, 2003).

α-amilazların en önemli uygulamalarından biri deterjanlarda katkı maddesi olarak kullanılmalarıdır (Gerday ve ark, 2000). Deterjan endüstrisinde enzimlerin kullanımı, deterjanların leke giderme gücünü ve çevresel güvenilirliklerini arttırmıştır (Hmidet ve ark, 2009).

Tüketicilerin isteği, çamaşırların ya da bulaşıkların yıkanmasında daha düşük sıcaklıkların kullanılabilmesidir. Düşük sıcaklıklarda, kıyafetlerden ve bulaşıklardan nişasta kalıntılarının uzaklaştırılması çok zor olmaktadır. Ancak alkalin pH'da ve düşük sıcaklıklarda optimal aktivite gösteren α-amilaz enzimi içeren deterjanların kullanımı bu problemin çözümüne yardımcı olmaktadır (Maarel ve ark, 2002).

Son zamanlarda, psikrofil organizmaların enzimleri enerji tüketimini azaltmaya yardımcı olmaları nedeniyle, endüstriyel uygulamalar için ilgi çekici hale gelmiştir. Deterjan, kağıt, gıda gibi sektörlerde düşük sıcaklıkta yüksek aktivite gösteren amilaz, proteaz ve lipaz gibi enzimlerden faydalanılmaktadır. Bu enzimler, düşük sıcaklıklarda etkin olabilen çamaşır deterjanlarının geliştirilmesinde kullanılmıştır. Kağıt endüstrisi de, düşük sıcaklıklarda aktivite gösteren, polimer degredasyonu yapan enzimlerle ilgilenmektedir. Birçok gıda uygulamasında da, düşük sıcaklıklarda aktif olan enzimlerin elverişliliğinden faydalanılmaktadır. Bütün bu uygulamalar için kullanılan soğukta aktif (düşük sıcaklıkta aktivite gösteren) amilaz, proteaz ve lipazlar yüksek düzeyde ticari öneme sahip enzimlerdir (Burg, 2003).

Deterjan uygulamalarında en fazla kullanılan amilaz, nişastadaki α-1,4 glikosidik bağları hidroliz eden α-amilazlardır. Çoğu ticari amilaz, *Bacillus* ya da *Aspergillus* cinslerinden elde edilmektedir (Hmidet ve ark, 2009). Deterjanların

geliştirilmesinde ve verimli hale getirilmesinde enzimler önemli bir faktördür. Düşük sıcaklıkta aktivite gösteren, çamaşır ve bulaşık deterjanlarında kullanılan enzimler yıkama sıcaklıklarını düşürerek yıkama süresinin kısaltılmasına, enerji tasarrufuna ve su tüketiminin azaltılmasına katkıda bulunmaktadırlar (Olsen ve Falholt, 1998; Rodriguez ve ark, 2006; Schafer ve ark, 2007). Bunların yanı sıra, düşük sıcaklıklarda yıkama çamaşırların solmasını, yıpranmasını ve yırtılmalarını engel olmaktadır (Gerday ve ark, 2000).

Amilazlar, normal yıkama koşullarında giderilmesi zor olan nişasta temelli gıda lekelerinin giderilmesini kolaylaştırmaktadır. Deterjanlarda bulunan amilazlar, pasta, meyve, çikolata, bebek maması, barbekü sosu ve salça gibi birçok gıdada bulunan nişasta polimerlerinin glikozidik bağlarının hidrolizini katalizlemektedir (Hmidet ve ark, 2009).

Deterjanlarda enzim uygulamalarının temel avantajı, enzim içermeyen deterjanlara göre daha zararsız olmaları, daha iyi temizleme sağlaması ve ortam koşullarını yumuşatmasıdır. Eski bulaşık deterjanları, hassas çini ve ahşap tabak çanak için uygun olmaması, çok sert, zarar verici ve sağlığa zararlı olması gibi sebeplerden dolayı deterjan endüstrisinin daha etkili solüsyonlar araştırmasını teşvik etmiştir (Gupta ve ark, 2003).

1.5. Elektoforez

İyonlaşabilir gruplara sahip aminoasitler, peptidler, proteinler, nükleotidler ve nükleik asitler gibi biyolojik moleküller sahip oldukları elektrik yüküne bağlı olarak, ayırıcı bir ortamın bulunduğu elektriksel bir alanda anod veya katoda doğru göç ederler. Moleküller aynı yüke sahip olsalar da, molekül ağırlıklarının farklı olması nedeniyle sahip olunan yükün molekül ağırlığına oranı (yük/kütle) farklı olacaktır. Bu farklılıklar nedeniyle, solüsyon içindeki iyonlar elektriksel alana tabi tutulduklarında moleküllerin göçüne yönelik farklılıklar ortaya çıkar (Aygan, 2008).

Moleküllerin elektriksel alandaki göç hareketleri; moleküler ağırlık, moleküler konformasyon, ortamın pH'sı, kullanılan ayırma ortamının por çapı, sıcaklık, elektroforez zamanı, uygulanan akım şiddeti gibi birçok farklı parametreden

etkilenmektedir (Manniatis ve ark, 1982)

Elektriksel alanda sürekli olarak, pozitif yüklü moleküller negatif kutba, negatif yüklü moleküller pozitif kutba doğru göç ederler. Örnekler elektroforezin düzgün gerçekleşmesi için tampon içinde çözülerek hazırlanmalıdır. Ayrıca elektroforezde ayırıcı ortamın mutlaka elektroforez tamponu ile hazırlanması gerekmektedir. pH değişikliği, elektroforezi yapılan molekülün iyonik yükünü değiştirebileceğinden tampon pH'sının stabil tutulması çok önemlidir.

Sıcaklık artışı elektroforez sırasında direncin düşmesine tomponun buharlaşması sonucu iyonik yükün değişmesine neden olmaktadır. Örneğin net elektriksel yükü arttıkça moleküllerin elektroforez ortamında birbirlerinden ayrılmaları da artacaktır. Örnekler aynı molekül büyüklüğüne sahip olsalar bile moleküllerin globüler ya da fibröz oluşu moleküllerin göçünde farklılığa neden olacaktır. Elektroforez işlemi, kullanılan tamponun bileşimi ve iyonik yükünden farklı şekilde etkilenir. Poliakrilamid jel elektroforezi için yaygın olarak kullanılan tampon tris-glisin karışımıdır (Manniatis ve ark, 1982).

Proteinlerin elektroforez uygulamaları farklı amaçlara göre denatüre veya native (doğal) jel elektroforezi olmak üzere iki şekilde gerçekleştirilir. Denatüre jeller, SDS veya üre gibi denatüre edici ajanların jel içerisine karıştırılmasıyla hazırlanırlar. Bu tür uygulama, başta molekül ağırlık belirlenmesi olmak üzere, proteinlerin saflıklarının araştırılması, konsantrasyonlarının tanımlanması ve enzim aktivitelerinin saptanmasına olanak verir (Hames ve Rickwood,1996).

1.5.1. Doğal (Native) Jel Elektroforezi

Doğal jel elektroforezinde kullanılan tamponlar, deterjan ve diğer denatüre edici ajanları içermediğinden işlemler doğal şartlarda gerçekleştirilir. Fazla sayıda protein içeren karışımların birbirinden ayrılmasında, bir protein ya da protein kompleksinin aktivite veya yapısı ile ilgili elektroforetik çalışmalarda, protein saflık kontrolü ve proteinin denatüre olup olmadığının saptanmasında kullanılır. Doğal jel elektroforezi uygulamasında, örneklerin molekül ağırlıkları hakkında kesin bir bilgi edinmek mümkün değildir. Bunun nedeni, molekül büyüklüğünün yanında molekül

şekli ve yükünün de ayrımı etkilemesidir (Wilson ve Goulding, 1986; Hames ve Rickwood, 1996; Temizkan ve Arda, 2008).

1.5.2. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Proteinlerin molekül ağırlıklarını belirlemede en yaygın kullanılan yöntem poliakrilamid jel elektroforezidir. Sodyum dodesil sülfat (SDS) bir anyonik deterjan olup, proteinlere sıkıca bağlanarak proteinlerin denatürasyonunu sağlar. Yaklaşık 1 g proteine 1,4 g SDS bağlanır. Proteinler, birim kütle başına sabit negatif elektriksel yük kazanırlar. SDS protein molekülünde her üç aminoasitlik birime bağlanarak proteinlere homojen negatif bir yük kazandırır. Böylece proteinler yük bakımından eşitlendiği için moleküler ağırlıklarına göre birbirlerinden ayrılmaları geçekleşir (Aygan, 2008). Protein molekülleri negatif yüklü olduğundan SDS-protein kompleksleri elektroforez ortamında anoda doğru göç ederler (Temizkan ve Arda, 2008).

Standart SDS-PAGE uygulamaları dikey elektroforez şeklinde yapılmaktadır. Protein örnekleri genellikle pH'sı 6,8 olan örnek hazırlama tamponu içinde çözülür. Bu tampon denatüran olarak SDS, disülfit bağlarını indirgeyen β-merkaptoetanol, yoğunluk oluşturan gliserol veya sükroz ve bromfenol mavisi içermektedir. Elektroforez uygulamasında kullanılan jel, genellikle dengeleme (stacking) ve ayırma (separating) jeli olarak iki kısımdan oluşur. Her iki jel, içerdikleri akrilamid konsantrasyonları bakımından birbirlerinden farklılık gösterir.

1.6. Kromatografi

Kromatografi, katı veya sıvı bir durağan (stationary) fazın yüzeyine veya içine uygulanmış bir karışımdaki moleküllerin, sıvı veya gaz halindeki bir hareketli faz aracılığıyla hareket ederken birbirlerinden ayrılmaları temeline dayanmaktadır. Bu ayrılmaya yol açan etkenler, moleküllerin tutunma (adsoption), dağılma (partition), iyon değişimi, ilgi (afinite) özellikleri ya da molekül ağırlıklarındaki farklılıklardır. Bu farklılıklar nedeniyle karışımdaki bileşenlerden bazıları durağan

fazda daha uzun süre kalırlar ve kromatografi sistemindeki hareketleri yavaş olur. Diğerleri ise hareketli faza daha çabuk geçer ve sistemden daha hızlı ayrılır (Temizkan ve Arda, 2008).

Kromatografik ayırma işlemleri, cam yada benzer malzemeler üzerine sabitlenmiş silika (Thin Layer Chromatography (TLC)/İnce Tabaka Kromatografisi), uçucu gazlar (Gaz Kromatografisi), kağıt (Kağıt Kromatografisi) ve hidrofilik çözünmez molekülleri içerebilen sıvılar (Likit Kromatografisi) dahil, bir çok destek malzemesi ile gerçekleştirilebilir (Aygan, 2008).

1.7. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)

Kimyasal bileşikleri ayırmak için yaygın olarak kullanılan, çözücü gücü yüksek ve hızlı sonuç verebilen bir kromatografi yöntemidir. İnce tabaka kromatografisinde destek ortamı ince bir silika jel, alumina veya selüloz ile kaplanmış cam, aluminyum ya da plastik bir tabaka olabilir. Örnek genellikle uçucu bir çözücü içerisinde çözülür, destek ortamına çok az miktarda damlatılır ve kurumaya bırakılır. Daha sonra ince tabaka, içinde az miktarda çözücü bulunan bir kaba konur ve çözücünün (sıvı faz) kapiller hareketiyle ayırma işlemi başlar (Temizkan ve Arda, 2008).

Tabakalar ya laboratuvarda hazırlanır ya da kullanıma hazır olarak satın alınır. İnce tabaka kromatografisinde molekülün jeldeki hareketi genellikle aşağıdan yukarıya doğru yükselen yöntem ile gerçekleştirilir. Sistemin çoklu uygulamalara uygun olması ve solvent sistemi ile atmosfer doygunluğunun sağlanabilmesi için kapağının kapalı olması gerekir (Aygan, 2008). Örnekteki moleküllerin renkli olmadığı durumlarda, kromatogram üzerindeki yerleşim yerlerini saptamak için renk meydana getirmek üzere fluoresans, radyoaktivite veya kimyasal madde gibi çeşitli uygulamalar yapılabilir. Renk oluşumu görünür ışık ya da UV altında gözlenebilir. Yürütme işlemi tamamlanmış tabakalar genellikle havada, infrared ışık altında veya fırınlarında kurutulur (Temizkan ve Arda, 2008).

1.8. Araştırmanın Amacı

Çalışmada, soğukta ve alkali koşullarda katalitik aktivite gösteren amilaz enzim üreticisi *Bacillus* sp. suşu izolasyonu gerçekleştirilerek, en iyi üretici suşun seçilmesi ve üretilecek enzimin karakterizasyonu ile enzimin endüstriyel uygulamalardaki kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Chessa ve ark (1999), Antartika deniz suyundan toplam 59 bakteri örneği izole etmiş ve bu örnekleri α-amilaz üretebilme kabiliyetleri açısından analiz etmişlerdir. En yüksek aktivite *Alteromonas* sp. olarak tanımlanan izolatlarda saptanmıştır. İzole edilerek saflaştırılan α-amilaz enziminin moleküler ağırlığı 50.000 Da'dur. Enzim pH 7.5-9.0 aralığında stabilitesini korurken optimum aktivitesini pH 7.5 göstermiştir. Mezofil ve termofil organizmalardan elde edilen α-amilaz enzimleri ile karşılaştırdıklarında soğukta aktif olan enzimlerin düşük sıcaklıklarda yüksek aktivite gösterdiğini, buna karşılık yüksek sıcaklıklarda stabilitenin düşük olduğunu bildirmişlerdir. Psikrofilik α-amilaz, amilolitik aktivitesi için Cl^{-} ve Ca^{+2} iyonlarına gereksinim duymaktadır. Br^{-} iyonu da allosterik efektör olarak oldukça etkilidir. Aminoasit kompozisyonu çeşitli organizmaların α-amilazlarıyla karşılaştırıldığında, Arg ve Pro aminoasitlerini daha az miktarda içerdiği tespit edilmiştir. Bunun, psikrofilik enzimlerin düşük sıcaklıktaki çevresel koşullara adaptasyon sağlamak için kullandıkları bir adaptasyon olabileceği belirtilmiştir.

Lo ve ark (2001), *Bacillus* sp. TS-23 bakterisinin sentezlediği alkalin α-amilaz enzimini rekombinant *Escherichia coli* organizmasında üreterek amonyum sülfat tekniği ile izole edip Sephacryl S-100 ve PBE 94 kromatografileriyle saflaştırmışlardır. Saflaştırılan enzimin moleküler ağırlığı elektroforez analizinde 65 kDa bulunmuştur. Enzimin optimum aktivite sıcaklığı 60°C, pH'sı ise 9.0 bulunmuştur. Enzim aktivitesi Mn^{+2}, Co^{+2} ve Fe^{+2} iyonlarıyla stimule edilmiş ancak Hg^{+2} ve Cu^{+2} iyonlarıyla kuvvetli bir şekilde inhibe olmştur. Enzimin %8 sodyum dodesil sülfat (SDS) varlığında aktif olduğu saptanmıştır. *Bacillus* sp. TS-23 α-amilazının %6 SDS ile 1 saat 30°C'de ön inkübasyona bırakıldığında stabil kaldığı, 60°C'de ise inaktive olduğu belirlenmiştir.

Bernhardsdotter ve ark (2005), soda gölünden alkalifilik amilaz üretme yeteneği olan *Bacillus* sp. L1711 suşunu izole etmişlerdir. pH 10.5 ve 37°C'de üretilen L1711 suşuna ait kültür sıvısı analiz edilmiştir. Suşun ürettiği amilaz enzimi (BAA), QAE kolon kromatografisi ve doğal jel elektroforeziyle kültür supernatantından saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin moleküler ağırlığı SDS-

PAGE elektroforez analizinde 51 kDa bulunmuştur. Enzimin optimum aktivite gösterdiği pH aralığının 9.5-10.0, 40°C'nin altında üstündeki sıcaklıkta 7.0-7.5 olduğu saptanmıştır. BAA enzimi pH 6.0-11.0 aralığındaki pH değerlerinde stabil olmakla beraber 55°C'de aktivitesini tamamen kaybetmektedir. Enzimin termal stabilitesi Ca^{+2} varlığında artmaktadır. Enzim aktivitesi, Ca^{+2}, Zn^{+2}, Mg^{+2}, Mn^{+2}, Ba^{+2} ve Cu^{+2} tarafından güçlü bir şekilde inhibe olurken, Na^{+2}, Co^{+2} ve EDTA (10 mM) varlığında indüklenmiştir.

Zhang ve Zeng (2007a), deniz sedimentlerinden soğuğa adapte olabilen, amilolitik, lipolitik ve proteolitik aktiviteye sahip 17 psikrotrofik bakteri izole etmişlerdir. Bu suşlar, 16S rDNA sekans tanımlamalarına göre, *γ-Proteobakteri* (12 suş) ve gram pozitif bakteri (5 suş) olarak tanımlanmıştır. Amilaz üreten suşların *Pseudomonas, Rhodococcus* ve *Nocardiopsis* cinslerine ait oldukları belirlenmiştir. En yüksek amilolitik aktiviteyi gösteren suşlar *Pseudomonas* 7193 ve 7197'dir. Bakteriler üremeleri ve amilaz enzimi üretmeleri için 15-20°C aralığında inkübe edilmişlerdir. Saflaştırılan amilaz enzimlerinin her ikisi de optimum 40°C'de ve pH 9.0'da aktivite göstermişlerdir. Enzimlerin 5°C'de de orijinal aktivitelerinin %50'si korudukları belirlenmiştir. *Pseudomonas* 7193 ve 7197 suşlarına ait amilaz enzimlerinin SDS-PAGE analizlerinde moleküler ağırlıkları, sırasıyla, 60 ve 50 kDa bulunmuştur.

Zhang ve Zeng (2007b), Antarktik'in Prydz Körfezi'nin derin deniz sedimentlerinden soğuğa adapte olmuş α-amilaz üreten *Actinomycete* suşunu izole etmişlerdir. Bu suş, morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve 16S rRNA analizlerine göre *Nocardiopsis* olarak tanımlanmıştır. Amilaz enzimi saflaştırılarak SDS-PAGE jelinde analiz edildiğinde moleküler ağırlığının yaklaşık 55 kDa olduğu ve tek bir banttan oluştuğu belirlenmiştir.

Araştırmacılar, *Nocardiopsis* sp. 7326 suşundan izole edilen amilaz enziminin optimum aktivite sıcaklığının 35°C olduğunu, 45°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda aktivitesinin önemli ölçüde azaldığını belirtmişlerdir. Enzim optimum aktiviteyi pH 8.0'de gösterirken, pH 5.0-10.0 aralığında stabilitesini korumaktadır. Enzim aktivitesi Ca^{+2}, Mn^{+2}, Mg^{+2}, Cu^{+2} ve Co^{+2} iyonları ile önemli ölçüde indüklenirken, Rb^{+2}, Hg^{+2} ve EDTA ile inhibe olmuştur.

Ueda ve ark (2008), toprak solucanı *Eisenia foetida*'dan elde edilen soğuğa adapte olmuş iki farklı α-amilaz enzimi (AmyI ve AmyII) saflaştırmışlardır. Saflaştırılan enzimlerin moleküler ağırlıkları SDS-PAGE elektroforez analiziyle 60 kDa ölçülmüştür. Enzimler optimum aktivitelerini pH 5.5'de ve 50ºC'de aktivite göstermişlerdir. Bununla birlikte, pH 7.7-9.0 ve 50-60ºC aralıklarında stabilitelerini korumuşlardır. Amy I ve II enzimlerinin her ikisi de 10ºC'de de aktivite göstermişlerdir. Enzim aktivitesinin Cu^{+2}, Fe^{+2} ve Hg^{+2} metal iyonlarıyla inhibe olduğu bulunmuştur.

Syed ve ark (2009), alkali-termotolerant özelliğe sahip *Streptomyces gulbargensis* DAS 131 suşundan üretilen ekstraselüler amilaz enziminin optimizasyon ve karakterizasyonunu yapmışlardır. En yüksek amilaz üretimi %1 nişasta içeren besiyerinde gerçekleşmiştir. Optimum aktivite pH 9.0 ve 45ºC'de elde edilmiştir. SDS-PAGE jel analizinde, enzimin 55 kDa ağırlığında ve monomerik formda olduğu bulunmuştur.

Cotarlet ve ark (2009), Doğu Antartika vejetasyon örneklerinden izole ettikleri *Streptomyces* 4 Alga olarak adlandırılan suşun, soğuğa adapte amilaz ve proteaz üretme yeteneğinde olduğunu bulmuşlardır. Alfa amilaz enziminin 30ºC'de 20-60 dakikalık inkübasyon sonunda aktivitesini yaklaşık %80-90 oranında koruduğu bulunmuştur. Buna karşılık 20ºC'de 20 dakikalık inkübasyondan sonra enzim aktivitesinin azaldığı belirtilmiştir. Beta amilaz enzimi optimum aktivite sıcaklığında 50 dakika inkübe edildiğinde orijinal aktivitenin yaklaşık %80'ini, 20ºC'de 60 dakikalık inkübasyondan sonra ise aktivitenin %60'ını koruduğu belirlenmiştir. Bu enzimlerin, deterjan, farmasötik ve gıda endüstrilerinde geniş uygulama alanlarına sahip olabilecekleri belirtilmiştir.

Fan ve ark (2009), *Micrococcus antarcticus* suşunu soğukta aktif amilaz enzimi üretmek amacıyla 12°C'de 64 saat inkübe etmişlerdir. Enzim optimum aktivitesini 30°C ve pH 6.0'da göstermiştir. Enzim 10-15°C gibi düşük sıcaklıklarda da yüksek aktiviteye sahiptir. Enzim yüksek sıcaklıklara karşı oldukça duyarlıdır. pH 6.0-10.0 aralığında stabilitesinin %70'ini korumuştur. Bu sonuçlar nedeniyle enzim cold-adapted olarak adlandırılmıştır. Enzimin aktivitesi Ca^{+2}, Mn^{+2}, Co^{+2} ve Mg^{+2} ile indüklenirken, Zn^{+2}, Ba^{+2}, Ag^{+}, Cu^{+2}, Al^{+3}, Fe^{+2}, Fe^{+3}, Hg^{+2}, EDTA ve sitrat ile

inhibe olmuştur. Amilaz enzimi, Tween 80, TritonX-100 gibi %0.1'lik non-iyonik surfaktanların inaktivasyonuna karşı direnç göstermiştir.

Reddy ve ark (2009), Midtre Lovenbreen buzulu bölgesinden izole ettikleri 117 bakteri suşunu 16S rRNA gen sekansı analizlerine göre 32 grupta katagorize etmişlerdir. Grupları, üreme sıcaklıklarına (4-37°C), NaCl konsantrasyonlarına (0.1-1M) karşı toleranslarına ve üreme gösterdikleri pH aralıklarına (2-13) göre sınıflandırmışlardır. 32 gruptan 14'ü amilaz, lipaz ve/veya proteaz aktivitesi gösterirken, sadece 1 izolatın 5 ve20°C'de üç enzimi de üretme yeteneğinde olduğu bulunmuştur.

Shafiei ve ark (2010), *Nesterenkonia* sp. F suşundan, izole ettikleri α-amilaz enziminin moleküler ağırlığını SDS-PAGE ve jel filtrasyon kromatografisiyle, sırasıyla, 100 kDa ve 106 kDa bulunmuşlardır. Enzim 0-4 M NaCl konsantrasyonlarında aktivite göstermiştir. Maksimum aktivitesini 0.5 M NaCl konsantrasyonunda göstermekle beraber, 1 ve 4 M aralığında stabilitesini korumuştur. Enzim Fe^{+3}, Cu^{+2}, Zn^{+2} ve Al^{+3} iyonları ile inhibe olurken, Ca^{+2} ile enzimin aktivitesi indüklenmiştir. α-amilaz, EDTA ile inhibe olurken, PMSF ve β-merkaptoetanolden etkilenmemiştir. Enzim %0.5 SDS, %2 Triton X-100, %2 Tween 80 ve %2 Tween 20 kimyasallarına karşı önemli düzeyde direnç göstermiştir.

Lu ve ark (2010), *Pseudoalteromonas arctica* GS230 suşuna ait ParAmy (soğukta aktif amilaz) genini klonlamışlardır. Rekombinant protein SDS-PAGE ile analiz edildiğinde moleküler ağırlığı 55kDa bulunmuştur. Enzimin optimum aktivite sıcaklığı 30°C olup, aktivitesi 40°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda azalmaktadır. ParAmy, 30°C'de pH 7-8.5 aralığında 1 saat süreyle stabil özellik göstermektedir. Enzim Mn^{+2}, K^{+} ve Na^{+} ile aktive olurken, Hg^{+2}, Cu^{+2} ve Fe^{+3} ile inhibe olmaktadır. Araştırmacılar, enzimin cold-stabil ve alkalitolerant özelliği nedeniyle deterjan endüstrisinde kullanılabilme potansiyeline sahip olduğunu bildirmişlerdir.

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Bakteri İzolasyonu ve Teşhisinde Kullanılan Besiyerleri

3.1.1.1. N1 Agar

Doğal ortamdan izole edilen bakteri örneklerinin ilk çoğaltma ve izolasyon sonrası saklama ortamı olarak kullanılmıştır (Anonymous, 1978).

Besiyerinin pH değeri izolasyon koşullarına uygun olarak 9.0'a ayarlanmıştır.

Besiyeri Bileşimi	g/L
Pepton	10
Et özütü	10
Maya	5
Glikoz	1
Agar	15

3.1.1.2. M9 Nişasta Agar

İzole edilen *Bacillus* sp. suşlarının ürettiği amilaz enziminin aktivitesinin saptanması ve enzim üretimi (sıvı besiyeri şeklinde) amacıyla kullanılmıştır (Shibuya ve ark, 1986).

Besiyerinin pH'sı amilaz pozitif suşların seçilmesi için 9.0'a, enzim üretimi için 10.0'a ayarlanmıştır.

Besiyeri Bileşimi	g/L
$Na_2HPO_4.7H_2O$	6
KH_2PO_4	3
NaCl	0.5
NH_4Cl	1
$MgSO_4.7H_2O$	0.24
$CaCl_2.2\ H_2O$	0.24
Pepton	3
Nişasta	10
Agar	15

3.1.2. Kullanılan Çözeltiler

3.1.2.1. NaOH Çözeltisi

Besiyerlerinin pH'sını ayarlamak ve tampon çözeltileri hazırlamak amacıyla 0.2 N ve 2 N NaOH şeklinde hazırlanarak kullanılmıştır.

3.1.2.2. Etanol

Sıvı besiyerlerinde üretilen enzimin presipitasyonu ve kısmi saflaştırılması amacıyla %96'lık etanol kullanılmıştır. Kullanmadan önce -33ºC'de soğutulmuştur.

3.1.2.3. Lügol

Katı besiyerinde amilaz aktivitesinin saptanması amacıyla kullanılmıştır. Belirtilen oranlarda karıştırılarak hazırlanan karışım kullanılmadan önce 20 kat sulandırılmıştır (Çetin, 1968).

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

3.1.2.4. Sodyum-Fosfat Tamponu (0.1 M, pH 7.0)

Çöktürme sonucu elde edilen enzimin çözülerek süspansiyon elde edilmesi için pH'sı 7.0 olan 0.1 M sodyum fosfat tamponu kullanılmıştır.

3.1.2.5. Sodyum-Fosfat Tamponu

Enzimlerin pH 6.0-8.0 arasındaki aktivite düzeylerinin saptanması amacıyla sodyum-fosfat tamponu kullanılmıştır. İstenilen pH değerindeki sodyum fosfat tamponunu hazırlamak için uygun hacimlerde 0.2 M NaH_2PO_4 ve 0.2 M $Na_2HPO_4.7H_2O$ çözeltileriyle distile su karıştırılmıştır (Temizkan ve Arda, 2008).

pH	0.2 M NaH_2PO_4 (27.8 g/L) (mL)	0.2 M Na_2HPO_4 (53.65 g/L) (mL)	Distile su (mL)	Tolam hacim (mL)
6.0	87.7	12.3	100	200
6.5	68.5	31.5	100	200
7.0	39.0	61.0	100	200
7.5	16.0	84.0	100	200
8.0	5.3	94.7	100	200

3.1.2.6. Glisin-NaOH Tamponu

Enzimlerin pH 8.5-10.5 aralığındaki aktivitelerini saptamak için kullanılmıştır.

0.2 M Glisin ile 0.2 M NaOH çözeltisi ve distile su uygun hacimlerde karıştırılarak, istenilen pH değerine sahip tampon elde edilmiştir (Temizkan ve Arda, 2008).

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

3.1.2.7. Borax-NaOH Tamponu

Enzimlerin pH 11.0-13.0 arasındaki aktivitelerini saptamak amacıyla kullanılmıştır.

Tamponu hazırlamak için 0.05 M Boraks (19.05 g/L) çözeltisinden 50 mL alınarak üzerine istenilen pH değeri elde edilinceye kadar (0.2 M NaOH ve yüksek pH değerleri için 2 N NaOH) uygun NaOH çözeltisinden eklenerek son hacim 200 mL olacak şekilde distile su ilave edilmiştir (Temizkan ve Arda, 2008).

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

3.1.2.8. Dinitro Salisilik Asit (DNS)

Amilaz aktivitesi sonunda açığa çıkan indirgen şeker miktarını belirlemek amacıyla kullanılmıştır. 1 g DNS 50 mL distile suda çözüldükten sonra üzerine 30 g Na-K-Tartarat ve 20 mL 2 N NaOH ilave edilerek son hacim 100 mL'ye tamamlanır (Miller, 1951).

3.1.2.9. İyodin Solüsyonu

Zimogram analizinde aktivite bantlarının tespit edilmesi için kullanılan iyodin solüsyonu, 5 g iyot ve 50 g KI'ün 1 L distile suda çözülmesiyle hazırlanır (Burhan ve ark, 2003).

3.1.3. SDS-PAGE İşleminde Kullanılan Solüsyonlar

3.1.3.1. Solüsyon A (Akrilamid Solüsyonu)

29.2 g Akrilamid, 0.8 g Bisakrilamid bir miktar distile suda çözülür ve son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanır. Monomer çözeltisi koyu renkli şişede ve buzdolabında saklanır (Bollag ve ark, 1996).

3.1.3.2. Solüsyon B (4X)

75 mL 2 M Tris-HCl (pH 8.8), 4 mL %10'luk SDS ve 21 mL distile su karışımından oluşur (Bollag ve ark, 1996).

3.1.3.3. Solüsyon C (4X)

50 mL 1 M Tris-HCl (pH 6.8), 4 mL %10'luk SDS, 46 mL distile su karışımından meydana gelir (Bollag ve ark, 1996).

3.1.3.4. Amonyum Persülfat (AMPS) (%10)

0.5 g AMPS 5 mL distile suda çözülerek hazırlanır (Bollag ve ark, 1996).

3.1.3.5. Örnek Yükleme Tamponu (5X)

62.5 mM Tris (pH 6.8), %2 SDS, %5 β-merkaptoetanol, %10 Gliserol ve %0.002 Bromfenol mavisi kullanılarak hazırlanmıştır (Zhang ve ark, 2009).

3.1.3.6. Elektroforez Tamponu

3 g Tris, 14.4 g Glisin ve 1 g SDS bileşikleri bir miktar distile suda çözülür ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlanır (Bollag ve ark, 1996).

3.1.3.7. Jel boyama Solüsyonu (Staining)

1 g Coomassie Brillant Blue R-250, 450 mL metanol içerisinde çözülüp filtre kağıdından süzüldükten sonra karışımın üzerine 100 mL asetik asit ve 450 mL distile su eklenerek hazırlanır (Bollag ve ark, 1996).

3.1.3.8. Jelden Boyayı Geri Alma Solüsyonu (Destaining)

100 mL metanol, 100 mL asetik asit ve 800 mL distile su karışımından oluşur (Bollag ve ark, 1996).

3.1.3.9. SDS-PAGE Zimogram Analizlerinde Kullanılan Renatürasyon Solüsyonları

Solüsyon I: 50 mM Na_2HPO_4, 50 mM NaH_2PO_4 (pH 7.2) ve %40 oranında izopropanol eklenerek hazırlanmıştır (Burhan ve ark, 2003).

Solüsyon II: 50 mM Na_2HPO_4 ile 50 mM NaH_2PO_4 (pH 7.2) kullanılarak hazırlanmıştır (Burhan ve ark, 2003).

Solüsyon III: 50 mM Na_2HPO_4, 50 mM NaH_2PO_4 (pH 7.2), 5 mM β-merkaptoetanol ve 1 mM EDTA'nın bileşiminden oluşmaktadır (Burhan ve ark, 2003).

3.1.4. İnce Tabaka Kromatografisi Solüsyonları

3.1.4.1. Butanol-Asetik Asit-Distile Su

Amilaz enzimine ait reaksiyon ürünlerinin saptanması amacıyla yapılan ince tabaka kromatografisi analizinde geliştirme solüsyonu olarak kullanılmıştır. Butanol-asetik asit-distile su, 3:1:1 (v/v/v) oranında karıştırılarak hazırlanır (Kim ve ark, 1995).

3.1.4.2. %20'lik Sülfirik Asit Çözeltisi (H_2SO_4)

80 mL Etil alkol (%96) içerisine 20 mL H_2SO_4 çözeltisi (v/v) eklenerek hazırlanır (Kim ve ark, 1995).

3.1.4.3. D-Glikoz Çözeltisi (%4 w/v)

İnce tabaka kromatografisinde son ürünlerin tanımlanması amacıyla standart olarak kullanılmıştır.

3.1.4.4. Maltoz Çözeltisi (%4 w/v)

İnce tabaka kromatografisinde son ürünlerin tanımlanması amacıyla standart olarak kullanılmıştır.

3.2. Metod

3.2.1. Bakteri İzolasyonu ve Teşhisi

3.2.1.1. Topraktan *Bacillus* sp. Suşlarının İzolasyonu

Ankara ve Tuz Gölü'nden alınan çeşitli toprak örnekleri, cold aktif alkalofilik *Bacillus* sp. suşlarının izolasyonu için 1'er gram tartılarak pH'sı 9.0 olan 50 mL'lik N1 sıvı besiyerlerine inoküle edilip, 15°C'de 6 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda 80°C'de 10 dakikalık sıcaklık uygulaması gerçekleştirilmiştir (Lennette ve ark, 1985).

Örnekler çalkalamalı inkübatörde 15°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında tek koloni elde etmek amacıyla, pH'sı 9.0 olan N1 agar besiyerine yayma ekim yapılıp, 15°C'de 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra agarda farklı morfolojik görünüme sahip tek düşmüş koloniler çizgi yöntemine göre N1 agar besiyerine ekilip 15°C'de inkübasyona bırakılmıştır. N1 agarda üreyen suşlar sonraki analizler için stok kültür şeklinde saklanmışlardır.

3.2.1.2. Bakteri Teşhisi

Seçilen bakteri örneklerinin teşhisi için gram boyama, spor oluşumu gibi mikroskopik testlerinin yanı sıra katalaz, glikoz gibi biyokimyasal testler yapılmıştır (Ratanakhanokchai ve ark, 1999).

3.2.2. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

3.2.2.1. Katı Besiyerinde Amilaz Aktivitesinin Belirlenmesi

İzole edilerek, morfolojik ve biyokimyasal parametrelere göre tanımlanan *Bacillus* sp. suşları M9 Nişasta agar besiyerine çizgi ekim tekniğiyle ekildikten sonra 15°C'lik etüvde 72 saat inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon tamamlandıktan sonra amilaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla, koloniler iyot buharına tutularak boyama işlemi gerçekleştirilmiştir.

Boyama sonucunda nişastanın parçalanmadığı bölgeler koyu mavi boyanırken, amilaz enzimi üreterek nişastayı hidrolize eden kolonilerin etrafında şeffaf zon oluşumu gözlemlenmiştir. Etrafında hidroliz zonu gözlemlenen koloniler amilaz pozitif, zon oluşturmayanlar ise amilaz negatif olarak değerlendirilmiştir (Hols ve ark, 1994; Burhan ve ark, 2003).

3.2.2.2. *Bacillus* sp. Bakterilerinin Katı Besiyerinde Ürediği ve Enzim Sentezinin Gerçekleştiği pH Aralığının Saptanması

Organizmaların üredikleri ve enzim sentezini gerçekleştirdikleri pH aralığını saptamak amacıyla 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0, 12.0, ve 13.0 pH değerlerine sahip M9 Nişasta agar besiyerlerine amilaz pozitif özellik gösteren suşlardan çizgi ekim yapılmıştır. Örnekler 15ºC'de 72 saat inkübe edildikten sonra üreyebildikleri pH değerleri ve pH aralıkları belirlenmiştir.

Besiyerinin içerisinde substrat olarak nişasta kullanılmış ve agarda üreyen koloniler iyot buharına tutularak enzim üretiminin gerçekleştiği pH aralığı ve pH

değeri koloni ve aktivite zon çapları ölçülerek belirlenmiştir. (Hols ve ark, 1994; Burhan ve ark, 2003; Voget ve ark, 2006).

3.2.2.3. *Bacillus* sp. Bakterilerinin Katı Besiyerinde Ürediği ve Enzim Sentezinin Gerçekleştiği Sıcaklık Aralığının Saptanması

Bakteriler optimum üremenin gerçekleştiği pH değerine sahip M9 Nişasta agar besiyerine çizgi şeklinde ekilerek 2°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C'de 72 saat inkübe edilmiş, üremenin ve enzim sentezinin gerçekleştiği sıcaklık aralığı ve optimum sıcaklık değerleri belirlenmiştir (Voget ve ark, 2006).

3.2.2.4. Sıvı Kültürde Amilaz Enzim Üretimi ve Kısmi Saflaştırma

Amilaz enzim üretimi için seçilen NCA35 suşu pH'sı 10.0 olan M9 sıvı nişasta besiyerine ekilerek 15°C (katı besiyerinde optimum üreme sıcaklığı) ve 240 rpm'de çalkalayıcıda 72 saat inkübe edilmiştir. Kültür +4°C ve 7500 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek süpernatant alınıp temiz bir şişeye aktarılmıştır. Süpernatanta örnek hacminin %70'i oranında soğuk etanol eklenerek enzim presipite edilmiştir.

Presipitasyonun daha güçlü olması için hazırlanan karışım -20°C'de bir gece bekletilmiştir. Örnek +4ºC ve 10.000 rpm'de 20 dakika santrifuj edilip üst faz atılmış, enzim çökeltisi elde edilmiştir. Çöken enzim 0.1M'lık fosfat tamponunda (pH 7.0) sıvılaştırılmıştır. Kısmi saflaştırma sonucu elde edilen enzim çözeltisinden nişastalı katı besiyerine damlatılıp aktivite kontrolü yapılmıştır (Srivastava, 1987; Arikan, 2008).

3.2.2.5. Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değerinin Saptanması

Kısmi saflaştırma yöntemiyle elde edilen enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin saptanması için Na-Fosfat (pH 6.0-8.0), Glisin-NaOH (pH 8.5-10.5) ve Boraks-NaOH (pH 11.0-13.0) tamponları kullanılmıştır (Anonymous, 1917).

Aktivite tayini için, pH 6.0-13.0 aralığında hazırlanan ve içerisinde %1 nişasta bulunan çözeltiler ile aktivite analizi yapılmıştır. Bu amaçla 0.5 mL enzim ve 0.5 mL substrat karıştırılıp enzimin üretildiği sıcaklıkta 60 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda enzim substrat karışımına eşit miktarda DNS ayıracı konulmuş (1 mL enzim+substrat, 1 mL DNS) ve 5 dakika süreyle kaynatma işlemi uygulanmıştır. Soğutma işleminden sonra 550 nm dalga boyunda UV visible spektrofotometre kullanılarak, köre karşı ölçüm yapılmıştır. Kör, eşit hacimde substrat ve DNS karışımından oluşmaktadır.

En yüksek absorbans değerinin elde edildiği pH değeri 100 kabul edilerek diğer pH değerlerinden elde edilen veriler optimum değere göre oranlanıp, relatif enzim aktivitesi saptanmıştır (Gessesse ve Gashe, 1997; Burhan ve ark, 2003).

3.2.2.6. Enzimin Aktivite Gösterdiği Optimum Sıcaklık Değerinin Saptanması

Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerinin belirlenmesi amacıyla optimum aktivitenin elde edildiği pH değerine sahip substrat kullanılarak reaksiyon karışımı hazırlanmış ve 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C ve 40°C sıcaklıklarda 60 dakika inkübe edilmiştir İnkübasyon sonunda, reaksiyon karışımına eşit hacimde DNS çözeltisi eklenerek 5 dakika kaynatma işlemi uygulanmış ve 550 nm dalga boyunda UV visible spektrofotometrede köre karşı ölçüm yapılmıştır.

En yüksek absorbans değerinin elde edildiği sıcaklık değeri 100 kabul edilerek diğer sıcaklık değerlerinden elde edilen veriler optimum değere göre oranlanıp, relatif enzim aktivitesi hesaplanmıştır (Srivastava, 1987; Burhan ve ark, 2003).

3.2.2.7. Enzimin Termal (Sıcaklık) Stabilitesinin Saptanması

Termal stabilitenin saptanması için enzim 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C'lerde 60 dakika ön inkübasyona bırakılmıştır. Ön inkübasyon işlemi uygulanan enzim (0.5 mL) ve optimum aktivite elde edilen substrat (0.5 mL) kullanılarak hazırlanan reaksiyon karışımı optimum aktivite sıcaklığında 60 dakika inkübe

edilmiş, standart aktivite analizi yapılmıştır.

Başlangıç enzim aktivitesinin saptanması için ön işlemden geçmemiş enzim kullanılarak standart aktivite analizi yapılmıştır. Bu analizden elde edilen sonuç 100 kabul edilmiştir. Ön inkübasyon işleminin gerçekleştirildiği her bir sıcaklık değerinden elde edilen sonuç, orjinal aktivite değerine karşı oranlanarak % kalan enzim aktivitesi hesaplanmıştır (Srivastava, 1987; Gessesse ve Gashe, 1997; Mehrotta ve ark, 1999; Burhan ve ark, 2003).

3.2.2.8. Enzimin pH Stabilitesinin Saptanması

Stok enzim çözeltisinden 2 mL alınarak eppendorf tüpüne aktarılmış ve 11.000 dev/dak'da 15 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz atıldıktan sonra tüpte kalan enzim üzerine pH 8.0, 9.0, 10.0, 11.0 ve 12.0 değerlerindeki tampon çözeltilerinden 2'şer mL eklenerek enzim resüspanse edilmiştir. Karışım 25°C'de 24 saat ön inkübasyona bırakılmıştır.

Aktivite analizi için ön inkübasyonu yapılmış enzimden 0.5 mL ve optimum pH'daki tamponda hazırlanmış substrat çözeltisinden 0.5 mL alınarak optimum aktivitenin gerçekleştiği sıcaklıkta (25°C) 60 dakika inkübe edilip, standart aktivite analizi gerçekleştirilmiştir. Başlangıç enzim aktivitesinin saptanması için ön işlemden geçmemiş enzim kullanılarak aktivite analizi yapılmış ve elde edilen sonuç 100 olarak değerlendirilmiştir.

Farklı pH değerlerinde 24 saat ön işlemden geçirilen enzimlerden elde edilen aktivite sonuçları ile orjinal aktivite sonucu karşılaştırılarak her bir pH için kalan relatif enzim aktivitesi bulunmuştur (Coral ve ark, 2002; Burhan ve ark, 2003).

3.2.2.9. İnhibitör, Şelatör, Metal İyonu, Deterjan ve Okside Edici Ajanların Enzim Aktivitesine Etkisi

İnhibitör, şelatör, metal iyonu, deterjan ve okside edici ajan olarak $BaCl_2$, EDTA, $CaCl_2$, NaCl, $ZnCl_2$ ve $MnCl_2$ (her biri 5 mM olacak şekilde), %1 (v/v) Triton-X-100, %1 (w/v) SDS, %1 (v/v) β-Merkaptoetanol, %1 (v/v) H_2O_2, 3 mM

PMSF ve 8 M üre kullanılmıştır.

Enzim kimyasal etkileşimini saptamak için stok enzim çözeltisinden 2 mL alınıp 8.000 dev/dak'da santrifüj edilmiştir. Sıvı faz atıldıktan sonra tüplere 2'şer mL farklı kimyasal maddelerden eklenip süspansiyon hazırlanıp 15°C'de 60 dakika ön inkübasyonu gerçekleştirilmiştir.

Ön inkübasyon işlemi uygulanmış enzim, optimum aktivitenin gerçekleştiği substrat kullanılarak optimum aktivite sıcaklığında 60 dakika inkübasyona bırakılıp standart aktivite analizi yapılmıştır.

Ön işlem uygulanmamış enzim ve optimum aktivitenin gerçekleştiği pH değerine sahip substrat kullanılarak orjinal enzim aktivitesi saptanmıştır. Bu analiz sonunda elde edilen değer 100 olarak kabul edilmiştir. Kimyasallarla yapılan ön işlem uygulaması ve aktivite analizi sonucu elde edilen değerler orjinal aktivite ile karşılaştırılarak kalan enzim aktivitesi bulunmuştur (Arıkan, 2008).

3.2.2.10. NaCl'ün Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Stok enzim örneğinden 2'şer mL alınıp eppendorf tüplerine konularak, 8.000 dev/dakika'da santrifüj edilmiştir. Sıvı faz atılarak her bir tüpe sırasıyla 2 mL %3, %5, %10, %15, %20, %25, %30 konsantrasyonlara sahip NaCl çözeltilerinden eklenmiş ve 25°C'de 60 dakika ön inkübasyona bırakılmıştır.

İşlem görmemiş enzim ve optimum aktivitenin gerçekleştiği substrat optimum aktivite sıcaklığında 60 dakika inkübasyona bırakılıp standart aktivite analizi yapılmıştır.

Aynı anda ön işlem uygulanmamış enzim ve optimum aktivitenin gerçekleştiği pH değerine sahip substrat kullanılarak başlangıç enzim aktivitesi belirlenmiştir. Bu analiz sonucunda elde edilen değer 100 olarak kabul edilmiştir. Kimyasallarla yapılan ön işlem uygulaması ve aktivite analizi sonucu elde edilen değerler orjinal aktivite ile karşılaştırılarak kalan enzim aktivitesi bulunmuştur (Pomares ve ark, 2003; Arıkan, 2008).

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

Enzimin moleküler ağırlık ve zimogram analizi için %10'luk homojen SDS-PAGE jel sistemi kullanılmıştır (Laemmli, 1970).

3.2.3.1. Ayırıcı Jelin Hazırlanması (%10)

Sol A (6.5 mL), Sol B (5 mL), distile su (7.2 mL) ve %3'lük nişasta çözeltisinden 1.3 mL karıştırılmış, moleküler oksijenin uzaklaştırılması için 5 dakika vakum pompası ile degaz işlemi gerçekleştirilmiştir. Degaz işleminden sonra karışıma 20 µL TEMED ve 66 µL AMPS ilave edilmiştir.

Karışım önceden hazırlanmış cam plakalar arasına dökülmüştür. Jelin üst yüzeyi, atmosferik oksijenin difüzyonunu engellemek ve düz bir tabaka elde etmek amacıyla, ince bir su tabakasıyla kapatılmış ve jel oda sıcaklığında 30-60 dakika polimerizasyona bırakılmıştır (Bollag ve Edelstein, 1991; Coral ve ark, 2002; Burhan ve ark, 2003).

3.2.3.2. Dengeleme Jelinin Hazırlanması (%5)

Dengeleme jelinin hazırlanması için 1.5 mL Sol A, 2.25 mL Sol C ve 5.25 mL distile su karıştırılıp degaz işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra karışıma 20 µL AMPS ve 7.5 µL TEMED eklenerek ayırma jelinin üzerine dökülmüştür. Dengeleme jeli döküldükten sonra tarak yerleştirilip oda sıcaklığında 60 dakika polimerizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir (Bollag ve Edelstein, 1991; Coral ve ark, 2002; Burhan ve ark, 2003).

3.2.3.3. Enzim Örneklerinin SDS-PAGE Jeline Yüklenmesi ve Yürütülmesi

Polimerizasyondan sonra jelde oluşan gözlere örnek yükleme tamponuyla karıştırılmış enzim örneğinden 10 µL yüklenmiştir. Analiz edilen örnekteki protein

yapılarının moleküler ağırlıklarının saptanması için gözlerden birine marker protein yüklenmiştir (Sigma SD6H2 moleküler marker'ı kullanılmıştır: 200, 116, 97, 66, 45 ve 29 kDa).

Örnekte bulunan izleme boyası ayırıcı jelin içine girinceye kadar ve ayırıcı jelde 10 mA akım uygulanmıştır. İzleme boyası ayırıcı jelin bitiş noktasına ulaşmadan elektroforez işlemi sonlandırılmıştır (Aygan, 2008; Gözükara, 2009).

3.2.3.4. SDS-PAGE Jelinin Boyanması ve Zimogram Analizleri

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel cam plakalar arasından alınıp marker proteinin yürütüldüğü bölüm jelden kesilerek çıkartılmış ve boyama (staining) çözeltisine konularak 2 saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda, jele bağlanmış fazla boyanın uzaklaştırılması için marker proteinin bulunduğu jel birkaç kez distile sudan geçirildikten sonra 6 saat süreyle jele bağlanmış boyanın geri alınması işlemi gerçekleştirilmiştir (destaining). Şeffaflaşmış jel, bantların daha net görünmesi için %1'lik gliserol çözeltisine konularak inkübe edilmiştir (Aygan, 2008).

Jeldeki aktivite bantlarının saptanması için örneklerin bulunduğu jel parçası renatürasyon işlemlerinden geçirilmiştir. Renatürasyon uygulaması ile jeldeki SDS'nin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Bu amaçla, jel oda sıcaklığında 1 saat solüsyon-I, 1 saat solüsyon-II ve bir gece +4°C'de solüsyon-III'de inkübe edilmiştir. Renatürasyon işleminden sonra, jel iyodin solüsyonuyla boyanarak aktivite bölgeleri belirlenmiştir (Burhan ve ark, 2003).

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

Reaksiyon ürünlerinin saptanması amacıyla Merck firmasından temin edilen TLC Silica Gel 60 F_{254} ince tabaka kromatografi plakaları kullanılmıştır. Hazır plakalar dikey pozisyonda fırına yerleştirilip 110-120°C'de 30-60 dakika aktive edilmiştir (Aygan, 2008)

Aktifleştirilmiş TLC plakaları üzerine, 2 saatlik inkübasyon sonucunda oluşan üründen mikropipet kullanılarak 10µl örnek konulmuştur. Aynı plaka üzerine son ürünün doğruluğunu saptamak amacıyla %4'lük glikoz ve maltoz çözeltilerinin karışımından 5µl eklenmiştir.

Oluşan son ürünlerin birbirinden ayrılabilmesi için hazırlanan cam plaka, örneklerin yüklendiği kenardan itibaren solvent çözeltisine batırılarak (Butanol-Asetik Asit-Distile Su karışımı, 3:1:1) moleküllerin silika jelde göç etmeleri sağlanmıştır. Bu işlem kapalı ortamda 6 saat süreyle gerçekleştirilmiştir.

Kromatografik analizi yapılan ürünlerin görünür hale gelebilmesi için plakanın üzerine etil alkolde hazırlanmış %20'lik H_2SO_4 çözeltisi püskürtülmüştür. Bu uygulamanın hemen ardından cam plakalar 120^oC'lik fırına konulup, yaklaşık 45 dakika inkübasyona bırakılmıştır (Aygan, 2008).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Topraktan *Bacillus* sp. Suşlarının İzolasyonu ve Tanımlanması

Ankara ve Tuz Gölü'nden alınan çeşitli toprak örneklerinden koloni morfolojileri birbirinden farklı olan toplam 50 suş izole edilmiştir. Seçilen suşlardan 5 örnek amilaz pozitif (%10) bulunmuştur. Pozitif olarak değerlendirilen suşlar arasından amilaz aktivitesi en iyi olan NCA35 suşu enzim üretimi ve karakterizasyonu için kullanılmak üzere stok kültür ortamına alınmıştır.

İzolasyonu gerçekleştirilen suşlar, geniş, beyaz renkli ve dalgalı kenarlı koloni morfolojisine sahiptirler. Suşlar gram pozitif, aerob, spor oluşturan, çubuk şekilli ve katalaz pozitif bakterilerdir. Koloni morfolojileri ve diğer özelliklerine göre seçilen suşlar *Bacillus* sp. şeklinde tanımlanmışlardır.

4.2. Bakterinin Katı Besiyerinde Ürediği ve Enzim Sentezini Gerçekleştirdiği pH ve Sıcaklık Aralığı Sonuçları

Enzim üretimi ve karakterizasyonu için seçilen NCA35 suşu 2ºC, 10ºC, 15ºC, 20ºC, 25ºC ve 30ºC sıcaklıklarda, pH 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0 ve 12.0 değerlerine sahip nişastalı M9 agar besiyerlerinde 72 saat inkübe edilmiş, bakterinin koloni çapı ve hidroliz zon çapı ölçülmüştür.

Bakterinin koloni ve zon çaplarının genişliklerine göre enzim üretiminin en iyi olduğu sıcaklık ve pH aralığı belirlenmiştir. Elde edilen bulgular Çizelge 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5 ve 4.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. *Bacillus* sp. NCA35 bakterisinin 2ºC ve farklı pH değerlerinde M9 Nişastalı katı besiyerindeki koloni ve aktivite zon çapları

İnkübasyon Sıcaklığı	İnkübasyon pH	İnkübasyon Süresi	Koloni çapı (mm)	Zon Çapı (mm)	Net Aktivite Zonu (mm)
2ºC	6.0	72 saat	3	35	32
2ºC	7.0	72 saat	3	35	32
2ºC	8.0	72 saat	2	33	31
2ºC	9.0	72 saat	2	40	38
2ºC	10.0	72 saat	3	43	40
2ºC	11.0	72 saat	2	47	45
2ºC	12.0	72 saat	2	45	43

İnkübasyon sıcaklığı olarak 2ºC uygulandığında *Bacillus* sp. NCA35 suşunun koloni çapı pH 6.0, 7.0 ve 10.0'da 3 mm, pH 8.0, 9.0, 11.0 ve 12.0'de 2 mm ölçülmüştür. En geniş net aktivite zon çapı 45 mm ile pH 11.0'de elde edilmiştir. Diğer pH'lardaki net aktivite zon çapı pH 12.0'de 43, pH 10.0'da 40, pH 9.0'da 38 ve pH 8.0'de 31 mm ölçülmüştür. pH 6.0 ve 7.0'de ise, 32 mm ile pH 8.0'e yakın bir değer elde edilmiştir.

Çizelge 4.2. *Bacillus* sp. NCA35 bakterisinin 10ºC ve farklı pH değerlerinde M9 Nişastalı katı besiyerindeki koloni ve aktivite zon çapları

İnkübasyon Sıcaklığı	İnkübasyon pH	İnkübasyon Süresi	Koloni çapı (mm)	Zon Çapı (mm)	Net Aktivite Zonu (mm)
10ºC	6.0	72 saat	4	12	8
10ºC	7.0	72 saat	5	13	8
10ºC	8.0	72 saat	4	33	29
10ºC	9.0	72 saat	4	45	41
10ºC	10.0	72 saat	5	40	35
10ºC	11.0	72 saat	4	41	39
10ºC	12.0	72 saat	2	-	0

İnkübasyon sıcaklığı 10ºC olarak seçildiğinde, *Bacillus* sp. NCA35 suşunun koloni çapı pH 6.0, 8.0, 9.0 ve 11.0'de 4 mm, pH 7.0 ve 10.0'da 5 mm, pH 12'de 2 mm olacak şekilde üreme göstermiştir. Elde edilen net aktivite zon çapları pH değerlerine göre farklılık göstermekte olup, en geniş zon pH 9.0'da 41 mm olarak ölçülmüştür. En yüksek zon çapı pH 9.0'de 45 mm olarak ölçülürken, pH 11'de 39, pH 10.0'da 35, pH 8.0'de 29 mm zon değerine saptanmıştır. pH 6.0 ve 7.0'de 8 mm'lik aynı zon değeri saptanırken, pH 12.0'de enzim sentezi gerçekleşmemiştir. İnkübasyon sıcaklığı 2 ve 10ºC olarak seçildiğinde aktivite zon çapları yüksek sıcaklıklardakilere göre oldukça geniştir. Bu sonuç, organizmanın düşük sıcaklıklarda aktif enzim üreticisi olduğunu göstermektedir.

Reddy ve ark (2009), Midtre Lovenbreen buzulu bölgesinden topladıkları örneklerden izole ettikleri 117 bakteri suşundan bir izolatın 5 ve 20°C'de amilaz, lipaz ve proteaz enzimlerinin üçünü de üretme yeteneğinde olduğunu bildirmişlerdir.

Çizelge 4.3. *Bacillus* sp. NCA35 bakterisinin 15ºC ve farklı pH değerlerinde M9 Nişastalı katı besiyerindeki koloni ve aktivite zon çapları

İnkübasyon Sıcaklığı	İnkübasyon pH	İnkübasyon Süresi	Koloni çapı (mm)	Zon Çapı (mm)	Net Aktivite Zonu (mm)
15ºC	6.0	72 saat	4	17	13
15ºC	7.0	72 saat	4	20	16
15ºC	8.0	72 saat	4	15	11
15ºC	9.0	72 saat	4	16	11
15ºC	10.0	72 saat	4	14	10
15ºC	11.0	72 saat	5	15	10
15ºC	12.0	72 saat	3	11	8

İnkübasyon sıcaklığı 15ºC seçildiğinde, *Bacillus* sp. NCA35 suşunun koloni çapı pH 6.0-10.0 aralığında 4 mm, pH 11.0'de 5 mm ve pH 12.0'de 3 mm ölçülmüştür. Katı besiyerindeki net aktivite zon çapları, sırasıyla, pH 6.0'da 13, pH 7.0'de 16, pH 8.0 ve 9.0'da 11, pH 10.0 ve 11.0'de 10, pH 12.0'de 8 mm ölçülmüştür. Net aktivite zon çapı pH 8.0-11.0 aralığında yaklaşık bir değer gösterirken, pH

12.0'de düşmüştür. Buna karşılık, pH 7.0'de 16 mm ile en yüksek zon elde edilmiştir.

Fan ve ark (2009), *Micrococcus antarcticus* suşundan soğukta aktivite gösteren amilaz enzimi üretmek için suşu 12°C'de 64 saat inkübe etmişlerdir. Zhang ve Zeng (2007a), Deniz sedimentlerinden soğuğa adapte olabilen *Proteobakter* suşundan enzim izolasyonu yapabilmek için organizmayı 15-20°C aralığında inkübe etmişlerdir.

Çizelge 4.4. *Bacillus* sp. NCA35 bakterisinin 20ºC ve farklı pH değerlerinde M9 Nişastalı katı besiyerindeki koloni ve aktivite zon çapları

İnkübasyon Sıcaklığı	İnkübasyon pH	İnkübasyon Süresi	Koloni çapı (mm)	Zon Çapı (mm)	Net Aktivite Zonu (mm)
20ºC	6.0	72 saat	4	15	11
20ºC	7.0	72 saat	5	20	15
20ºC	8.0	72 saat	4	21	17
20ºC	9.0	72 saat	4	21	17
20ºC	10.0	72 saat	3	15	12
20ºC	11.0	72 saat	3	16	13
20ºC	12.0	72 saat	0	0	0

İnkübasyon sıcaklığının 20ºC olduğu analizlerde *Bacillus* sp. NCA35 suşunun koloni çapı pH 6.0, 8.0 ve 9.0'da 4 mm, pH 7.0'de 5 mm, pH 10.0 ve 11.0'de 3 mm ölçülmüştür. pH 12.0'de üreme görülmemiştir. Net aktivite zon çapı pH 6.0'da 11, pH 7.0'de 15, pH 8.0 ve 9.0'da 17, pH 10.0'da 12 ve pH 11.0'de 13 mm ölçülmüştür.

Çizelge 4.5. *Bacillus* sp. NCA35 bakterisinin 25ºC ve farklı pH değerlerinde M9 Nişastalı katı besiyerindeki koloni ve aktivite zon çapları

İnkübasyon Sıcaklığı	İnkübasyon pH	İnkübasyon Süresi	Koloni çapı (mm)	Zon Çapı (mm)	Net Aktivite Zonu (mm)
25ºC	6.0	72 saat	6	24	18
25ºC	7.0	72 saat	6	25	19
25ºC	8.0	72 saat	5	23	18
25ºC	9.0	72 saat	4	25	21
25ºC	10.0	72 saat	4	23	19
25ºC	11.0	72 saat	6	22	16
25ºC	12.0	72 saat	4	20	16

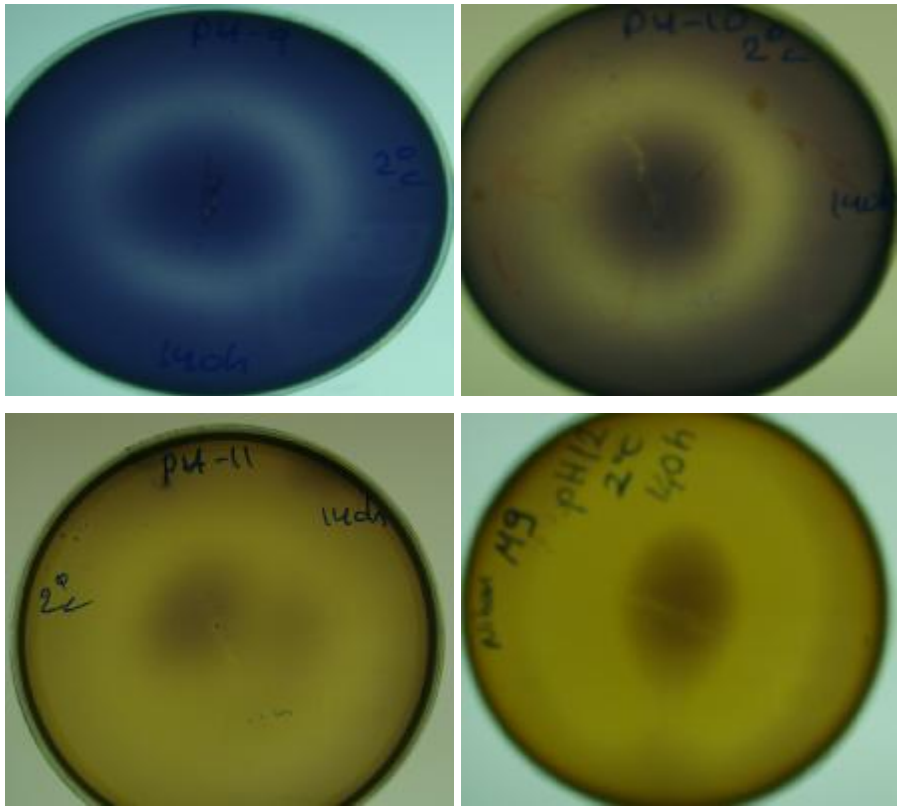
İnkübasyon sıcaklığı 25ºC seçildiği zaman, en geniş koloni çapı 6 mm ile pH 6.0, 7.0 ve 11.0'de saptanırken, pH 9.0, 10.0 ve 12.0'de 4, pH 8.0'de ise 5 mm ölçülmüştür. Net aktivte zon çapları dikkate alındığında en geniş aktivite zonu 21 mm ile pH 9.0'da saptanmıştır. pH 6.0 ve 8.0'de 16, pH 7.0 ve 10.0'da 19 mm, pH 11.0 ve 12.0'de 16 mm genişlikte aktivite zonları ölçülmüştür.

Çizelge 4.6. *Bacillus* sp. NCA35 bakterisinin 30ºC ve farklı pH değerlerinde M9 Nişastalı katı besiyerindeki koloni ve aktivite zon çapları

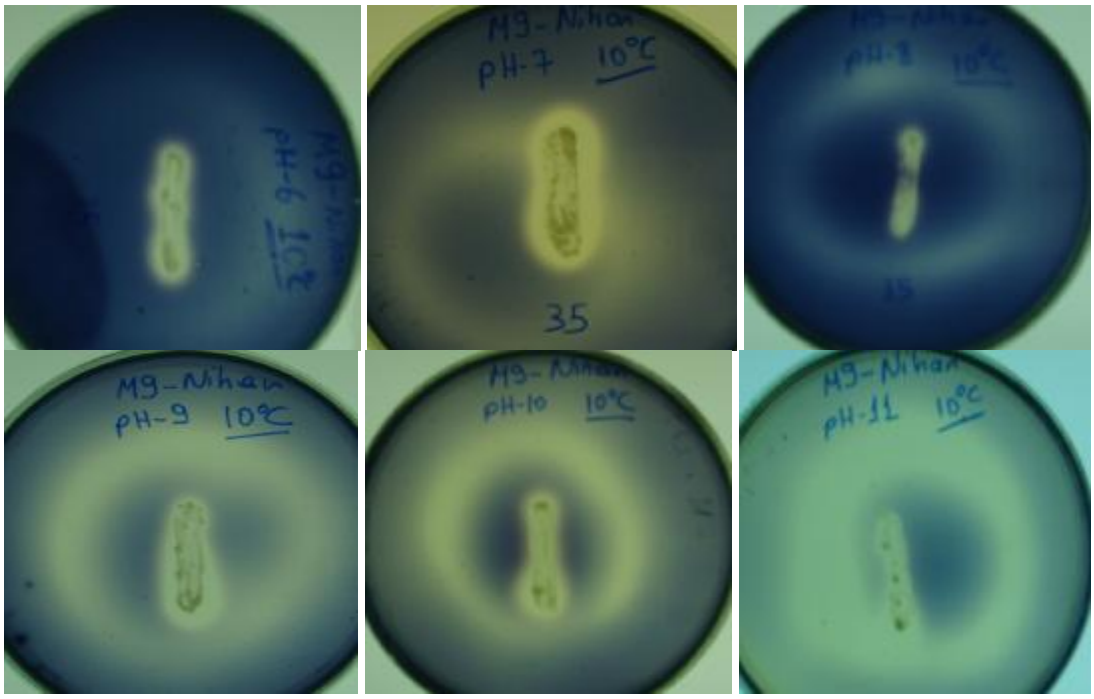
İnkübasyon Sıcaklığı	İnkübasyon pH	İnkübasyon Süresi	Koloni çapı (mm)	Zon Çapı (mm)	Net Aktivite Zonu (mm)
30ºC	6.0	72 saat	6	30	24
30ºC	7.0	72 saat	6	31	25
30ºC	8.0	72 saat	5	26	21
30ºC	9.0	72 saat	5	26	21
30ºC	10.0	72 saat	4	25	21
30ºC	11.0	72 saat	4	24	20
30ºC	12.0	72 saat	5	22	17

Bacillus sp. NCA35 suşu 30ºC'de inkübe edildiği zaman pH 6.0 ve 7.0'de 6, pH 8.0, 9.0 ve 12.0'de 5, pH 10.0 ve 11.0'de ise 4 mm çapa sahip koloni üremesi gerçekleşmiştir. Suşun enzim sentezleme yeteneği incelendiğinde, en geniş net aktivite zonu 25 mm ile pH 7.0'de ölçülmüştür. pH 6.0'da 24 mm, pH 8.0-10.0 aralığında 11.0 mm zon saptanırken, pH 11.0'de 20, pH 12.0'de ise 17 mm genişliğinde aktivite zon çapı elde edilmiştir.

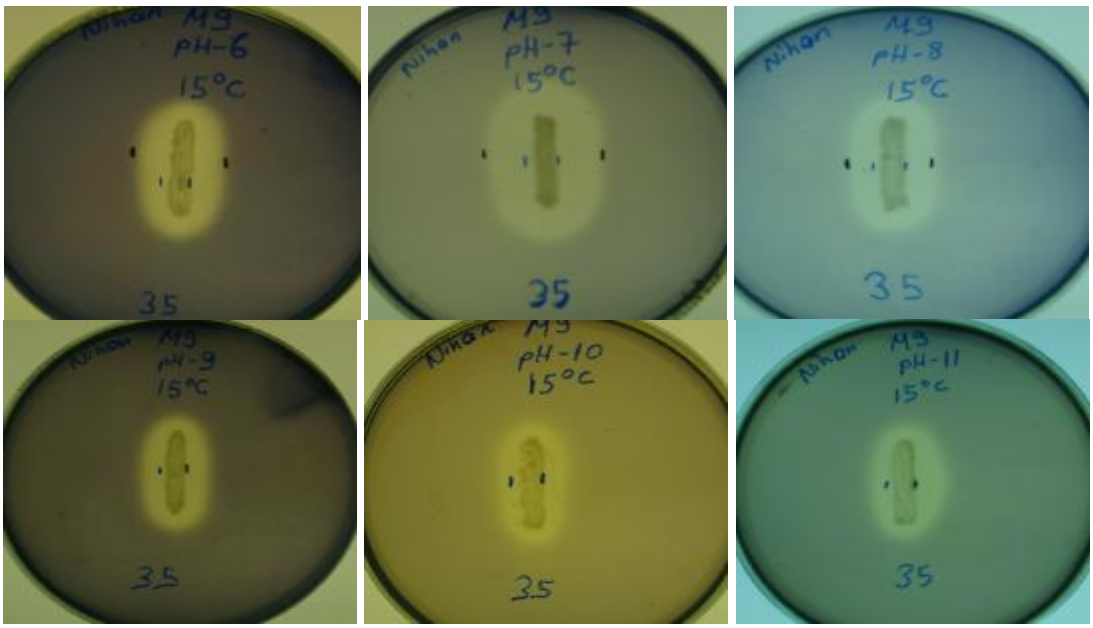
Bacillus sp. NCA35 suşunun farklı sıcaklık ve pH değerlerinde katı besiyerinde oluşturduğu aktivite zonları şekil 4.1, 4.2, 4.3 ve 4.4'te gösterilmiştir.



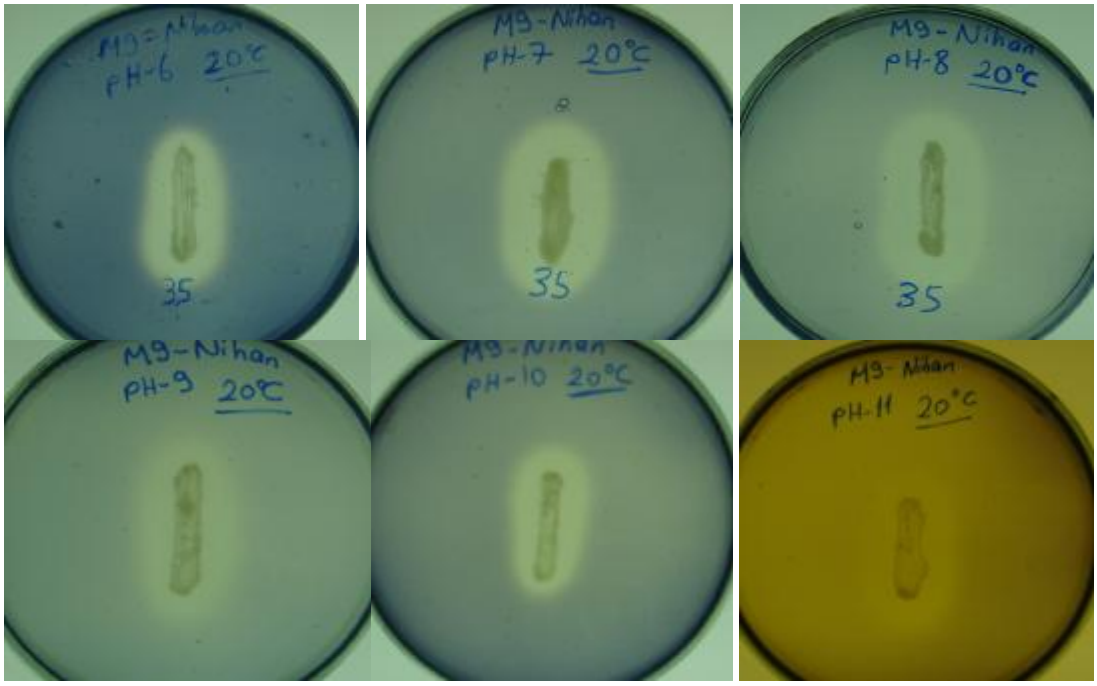
Şekil 4.1. *Bacillus* sp. NCA35 suşunun 2ºC ve pH 9.0, 10.0, 11.0 ve 12.0 de katı besiyerindeki koloni ve aktivite zon çapları



Şekil 4.2. *Bacillus* sp. NCA35 suşunun 10ºC ve pH 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 ve 11.0'de katı besiyerindeki koloni ve aktivite zon çapları

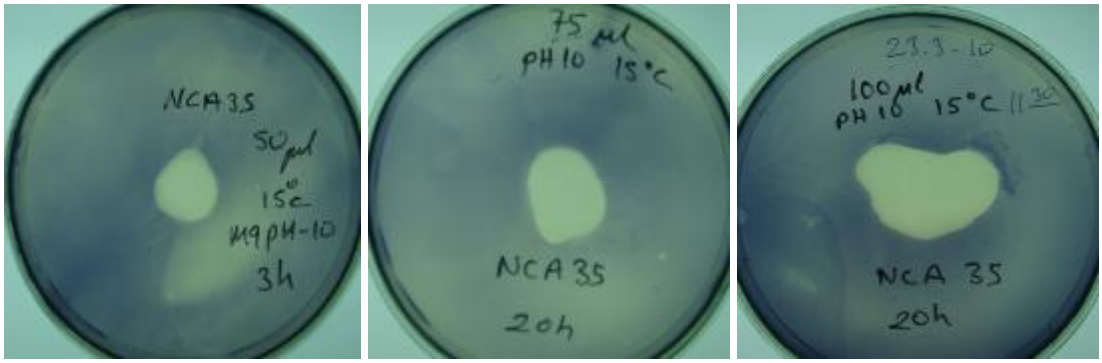


Şekil 4.3. *Bacillus* sp. NCA35 suşunun 15ºC ve pH 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 ve 11.0'de katı besiyerindeki koloni ve aktivite zon çapları



Şekil 4.4. *Bacillus* sp. NCA35 suşunun 20ºC ve pH 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 ve 11.0'de katı besiyerindeki koloni ve aktivite zon çapları

Bacillus sp. NCA35 suşundan elde edilen soğukta aktif alkalin amilaz enziminin katı besiyerindeki aktivite zonunu tespit etmek için enzimden 50, 75 ve 100 µL nişastalı besiyerine damlatılarak 15ºC'de 3 ve 20 saatlik inkübasyonlar gerçekleştirilmiştir. Aktivite zonları şekil 4.5'te gösterilmiştir.



Şekil 4.5. *Bacillus* sp. NCA35 suşundan izole edilen enzimin nişastalı agar besiyerinde oluşturduğu aktivite zonu

4.3. Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Aralığına Ait Bulgular

Bacillus sp. NCA35 suşuna ait amilaz enziminin optimum pH'sını belirlemek için Na-Fosfat tamponu (pH 6.0-8.0), Glisin-NaOH tamponu (pH 8.5-10.0) ve Borax-NaOH tamponu (pH 11.0-13.0) kullanılarak 15°C'de 60 dakika süreyle inkübasyonlar gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar çizelge 4.7 ve şekil 4.6'da verilmiştir.

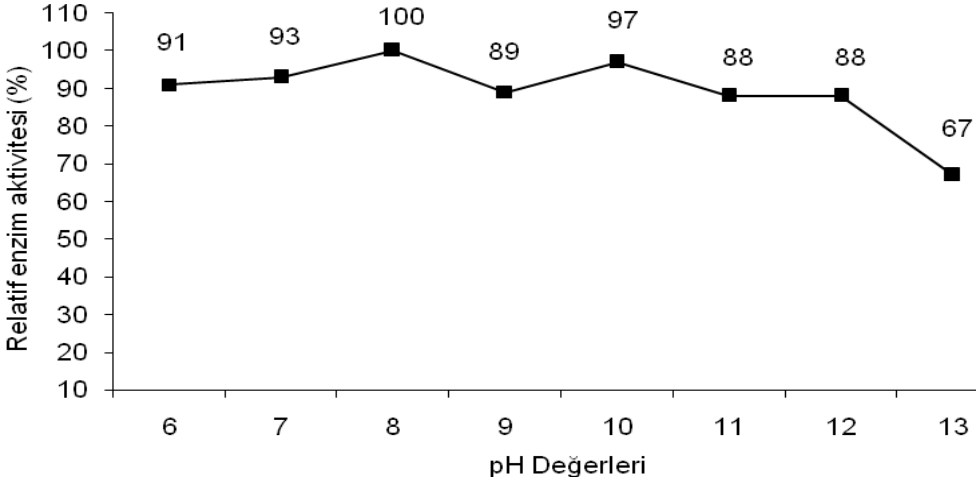
Çizelge 4.7. *Bacillus* sp. NCA35 amilaz enziminin optimum pH değeri

pH	İnk. Sıcaklığı	İnk. Süresi	AB1	AB2	AB0	%Aktivite
6.0	15°C	60 dk	2.02	2.01	2.01	91
7.0	15°C	60 dk	2.10	2.02	2.06	93
8.0	**15°C**	**60 dk**	**2.21**	**2.20**	**2.20**	**100**
9.0	15°C	60 dk	1.87	2.04	1.95	89
10.0	15°C	60 dk	2.06	2.21	2.14	97
11.0	15°C	60 dk	1.92	1.95	1.93	88
12.0	15°C	60 dk	2.00	1.87	1.93	88
13.0	15°C	60 dk	1.47	1.47	1.47	67

Bacillus sp. NCA35 suşundan kısmi saflaştırma yöntemiyle elde edilen amilaz enzimi optimum aktivitesini pH 8.0'de göstermiştir. Bu sonuç, enzimimizin alkali özelliğe sahip olduğunu göstermektedir. Diğer pH'lar incelendiğinde, sırasıyla, pH 6.0'da %91, pH 7.0'de %93, pH 9.0'da %89, pH 10.0'da %97, pH 11.0'de %88, pH 12.0'de %88, pH 13.0'te %67 düzeyinde aktivite elde edilmiştir. Analiz edilen bütün pH'lar dikkate alındığında, enzimin %89 gibi oldukça yüksek bir ortalama aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur.

Enzim aktivitesi pH 8.0-13.0 aralığında yaklaşık %88.2 iken, pH 10.0'da ikinci bir pik oluşumu saptanmıştır (%97). Optimum aktivite pH 8.0'de elde edilmiş olsa da, enzim pH 6.0-8.0 aralığında yaklaşık %92 aktiviteye sahiptir. Bu özelliği ile çok geniş pH aralığında kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir. Enzim ekstrem alkali koşul olan pH 12.0-13.0 değerlerinde ortalama %78 aktivite göstermiştir.

Enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değeri ve aralığı ile ilgili sonuçlar çizelge 4.7 ve şekil 4.6'da gösterilmiştir. Bu değerlerin gösterildiği grafik şu şekildedir;



Şekil 4.6. *Bacillus* sp. NCA35 amilaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değeri ve aralığı

Shafiei ve ark (2010), *Nesterenkonia* sp. suşundan izole ettikleri alfa amilaz enziminin optimum aktivitesini pH 7.5'te gösterdiğini saptamışlardır. Ayrıca enzim pH 6.5'te de %81 aktiviteye sahiptir. Syed ve ark (2009), *Streptomyces gulbargensis* suşu ile gerçekleştirdikleri çalışmada, izole ettikleri amilaz enziminin pH 9.0'da optimum aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir.

McTigue ve ark (1995), *Bacillus* sp. IMD370'ten izole edilen alfa amilaz enziminin, nişastanın hidrolizi için gerekli olan maksimum pH'sının 8.0 olduğunu bulmuşlardır. Amoozegar ve ark (2002), *Halobacillus* sp. MA-2 suşuyla yaptıkları çalışmalarda, izole edilen amilaz enziminin optimum aktivitesini pH 7.5-8.5 aralığında gösterdiğini belirlemişlerdir. Bununla birlikte, enzimin orijinal aktivitesini pH 6.0 ve 10.0'da, sırasıyla, %60 ve %56 kaybettiğini bulmuşlardır.

Zhang ve Zeng (2007b), *Nocardiopsis* sp. 7326'dan izole ettikleri alfa amilaz enziminin aktivite gösterdiği optimum pH'nın 8.0 olduğunu, ayrıca enzimin pH 7.0-9.0 aralığındaki değerlerde %60'tan fazla aktiviteye sahip olduğu bildirmişlerdir. Kiran ve Chandra (2008), alkalitolerant, surfaktan ve deterjan-stabil özelliklere sahip *Bacillus* sp. TSCVKK suşundan elde ettikleri ekstraselüler alfa amilaz enziminin en

yüksek aktivite gösterdiği pH'nın 7.5 olduğunu bulmuşlardır.

Chessa ve ark (1999), Antartika deniz suyundan izole ettikleri *Alteromonas* sp. suşundan elde edilen amilaz enziminin optimum aktivitesini pH 7.5'te gösterdiğini, pH 7.5-9.0 aralığında aktivitenin yüksek düzeyde devam ettiğini belirtmişlerdir. Zhang ve Zeng (2007), Antarktik'in Prydz Körfezi'nin derin deniz sedimentlerinden soğuğa adapte olmuş α-amilaz üreten *Actinomycete* suşunu izole etmişlerdir. Enzim pH 8.0'de optimum aktivite gösterirken, pH 5.0-10.0 aralığında da aktivitesini korumuştur.

Bacillus sp. NCA35 suşundan izole ettiğimiz amilaz enziminin literatürlerde belirtilen soğukta aktif amilaz enzimlerinden daha geniş bir pH aralığında aktif olduğu ve özellikle Zhang ve Zeng (2007b) ile tam bir uyum gösterdiği görülmektedir. Enzim bu özellikleri ile alkali aktif olmakla birlikte asido-alkali (yaklaşık %88.2) özelliğe de sahiptir.

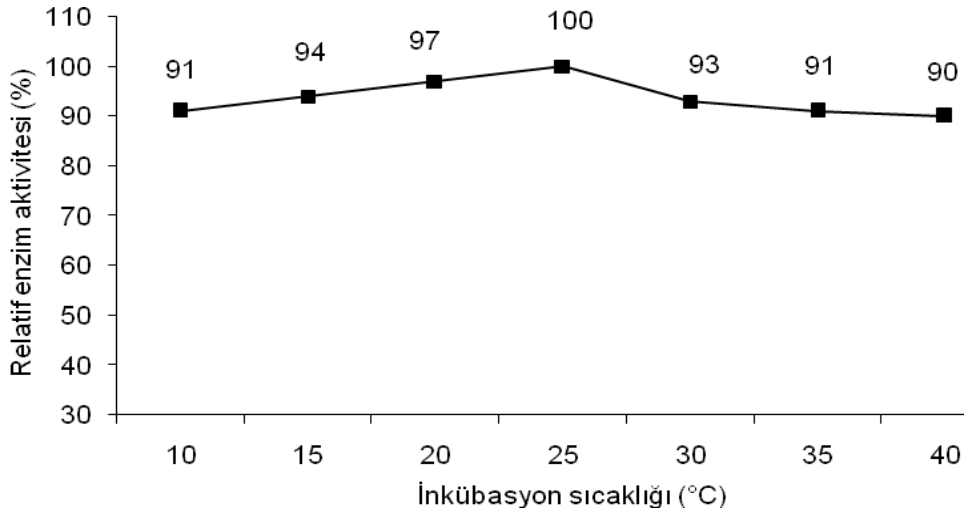
4.4. Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Değerlerine Ait Bulgular

NCA35 enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerini belirlemek için 10, 15, 20, 25, 30, 35 ve 40°C aralığındaki sıcaklık değerlerinde aktivite analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar çizelge 4.8 ve şekil 4.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.8. *Bacillus* sp. NCA35 amilaz enzimi optimum aktivite sıcaklık değeri

sıcaklık	İnk. pH'sı	İnk. Süresi	AB1	AB2	AB0	%Aktivite
10°C	8.0	60 dk	1.86	2.25	2.06	91
15°C	8.0	60 dk	2.06	2.18	2.12	94
20°C	8.0	60 dk	2.24	2.16	2.20	97
25°C	**8.0**	**60 dk**	**2.26**	**2.27**	**2.26**	**100**
30°C	8.0	60 dk	2.04	2.16	2.10	93
35°C	8.0	60 dk	2.04	2.08	2.06	91
40°C	8.0	60 dk	2.01	2.06	2.04	90

Bacillus sp. NCA35 suşundan üretilen amilaz enzimi optimum aktivesini 25°C'de göstermiştir. İnkübasyon gerçekleştirilen sıcaklık değerleri incelendiğinde 10, 15, 20, 30, 35 ve 40°C'lerde, sırasıyla, %91, %94, %97, %93, %91 ve %90 relatif enzim aktivitesi saptanmıştır. Enzimin 10-40°C aralığındaki ortalama aktivitesi yaklaşık %94 olarak hesaplanmıştır. Düşük sıcaklık değerlerinde (10, 15 ve 20°C) ortalama aktivite yaklaşık %94 iken, daha yüksek sıcaklık değerlerinde (30, 35 ve 40°C) ortalama aktivite yaklaşık %91'dir. Bu sonuçlar enzimin soğuk koşullarda daha yüksek katalitik aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Enzimin, alkali koşullar ve düşük sıcaklıklardaki yüksek aktivitesi, özellikle deterjan endüstrisi için oldukça kullanışlı olduğunu ve enerji tasarrufuna büyük katkı sağlayacağını göstermektedir.



Şekil 4.7. *Bacillus* sp. NCA35 amilaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri ve aralığı

Morita ve ark (1997), A201 suşundan elde edilen ekstraselüler amilaz enziminin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerini 30°C bulmuşlardır. Diğer taraftan, A201 suşundan elde edilen amilaz enziminin 20°C'de %80 relatif aktiviteye sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Groudieva ve ark (2004), Spitzbergen'in farklı bölgelerinden izole ettikleri suşlardan saflaştırdıkları amilaz enziminin maksimal aktivitesini 30°C'de gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Shafiei ve ark (2010), *Nesterenkonia* sp. F suşundan izole ettikleri amilaz enziminin maksimum aktivitesini 45°C'de gösterdiğini, ayrıca 15°C gibi düşük sıcaklıklarda da aktivitenin devam ettiğini bildirmişlerdir.

Zhang ve Zeng (2007a), *Pseudomonas* sp. 7193 ve 7197 suşlarından izole ederek saflaştırdıkları amilaz enzimlerinin optimum amilolitik aktivitelerini 40°C'de gösterdiklerini tespit etmişlerdir.

Zhang ve Zeng (2007b), Antarktik'in Prydz Körfezi'nden izole ettikleri *Nocardiopsis* sp. 7326 bakterisinin alfa amilaz enzimi maksimum aktivitesini 35°C'de göstermiştir. Enzim aktivitesinin 45°C'nin üzerindeki sıcaklık değerlerinde düştüğünü saptamışlardır.

Ueda ve ark (2008), *Eisenia foetida* isimli toprak solucanından elde ettikleri soğuğa adapte iki farklı alfa amilaz enziminin (AmyI ve AmyII) maksimum aktivitelerini 50°C'de gösterdiklerini, 10°C gibi düşük sıcaklıklarda da aktiviteye sahip olduklarını bildirmişlerdir.

Cotarlet ve ark (2009), *Streptomyces* 4 Alga'dan elde ettikleri alfa amilaz enziminin optimum aktivite sıcaklığının 30°C olduğunu saptamışlardır. Enzim 10°C'de yaklaşık %50, 20°C'de %54 aktivite göstermiştir. *Streptomyces* 4 Alga tarafından üretilen beta amilaz enziminin en iyi aktiviteyi 30°C'de göstermesinin yanı sıra, enzimin 10°C'de %60, 20°C'de %85 relatif aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur

Lu ve ark (2010), *Pseudoalteromonas arctica* GS230 suşuna ait ParAmy (soğukta aktif amilaz) enzimin optimum aktivite sıcaklığının 30°C olduğunu ve enzim aktivitesinin 40°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda azaldığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar, enzimin cold-stabil ve alkalitolerant özelliği nedeniyle deterjan endüstrisinde kullanılabilir özellikte olduğunu bildirmişlerdir.

Zhang ve Zeng'in (2007b), *Nocardiopsis* sp. 7326'dan izole ettikleri amilaz enzimi optimum aktivitesini 35ºC'de göstermesinin yanı sıra, 0ºC'de de aktivitesinin %38 oranında korunduğunu belirtmişlerdir. Bu özelliği nedeniyle enzim cold-adapted olarak adlandırılmıştır.

Fan ve ark (2009), *Micrococcus antarcticus* suşunun soğukta aktif amilaz enziminin optimum aktivitesini 30°C'de gösterdiğini bulmuşlardır. Enzim 10-15°C

gibi düşük sıcaklıklarda da yüksek aktiviteye sahip olduğundan dolayı 'cold-adapted' olarak adlandırılmıştır.

Literatür verileri ile *Bacillus* sp. NCA35 suşundan izole edilen soğukta aktif amilaz enzimine ait optimum aktivite sıcaklığı değerleri karşılaştırıldığı zaman, sonuçların literatür verilerinden çok daha iyi olduğu belirlenmiştir. Optimum aktivite sıcaklığının 25°C olduğu, 10-25°C aralığında yaklaşık %95.5 relatif aktivite elde edildiği oldukça düşük sıcaklıklarda çok yüksek katalitik aktiviteye sahip olduğu (10°C'de %91, 15°C'de %94) görülmektedir. Bu özellik dikkate alındığı zaman, *Bacillus* sp. NCA35 suşundan izole edilen amilaz enziminin deterjan endüstrisi için standartların ötesinde bir kullanılabilirliğe sahip olduğu görülmektedir.

4.5. Enzimin Termal Stabilitesine Ait Sonuçlar

Bacillus sp. NCA35 amilaz enziminin termal stabilite değerlerini belirlemek amacıyla enzim 60 dakika 10, 15, 20, 25, 30, 35 ve 40°C aralığındaki sıcaklık değerlerinde ön inkübasyona tabi tutulmuştur. Ön inkübasyondan sonra optimum pH'daki (pH 8.0) substrat çözeltisi kullanılarak optimum aktivite sıcaklığında aktivite tayini yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar çizelge 4.9 ve şekil 4.8'de gösterilmiştir.

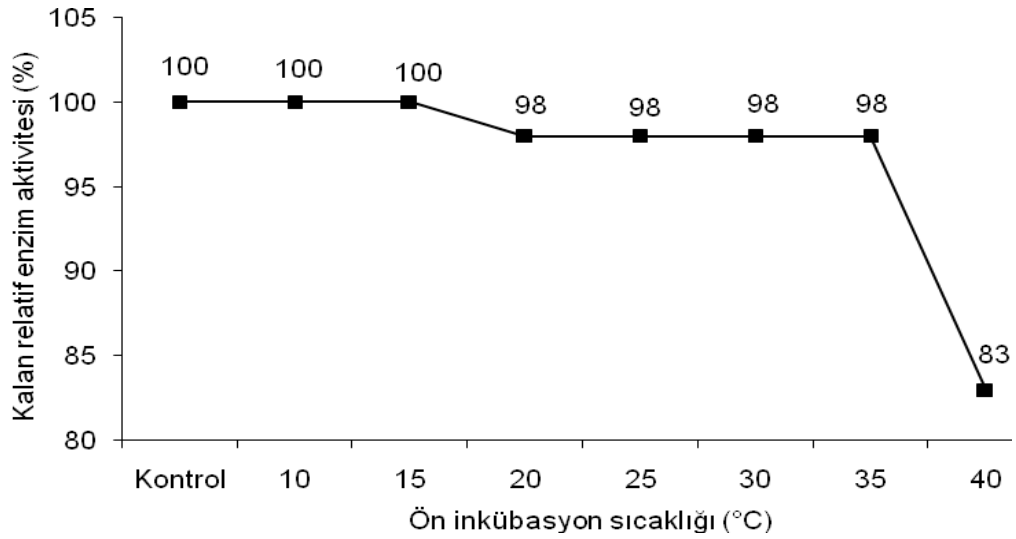
Çizelge 4.9. *Bacillus* sp. NCA35 amilaz enziminin termal stabilite sonuçları

Ön ink. Sıcaklığı	Ön ink. Süresi	İnk. Sıcaklığı	İnk. Süresi	İnk. pH	AB1	AB2	AB0	Kalan aktivite (%)
Kontrol	**-**	**25°C**	**60 dk**	**8**	**2.26**	**2.27**	**2.26**	**100**
10°C	60 dk	25°C	60 dk	8	2.27	2.24	2.25	100
15°C	60 dk	25°C	60 dk	8	2.26	2.25	2.25	100
20°C	60 dk	25°C	60 dk	8	2.23	2.21	2.22	98
25°C	60 dk	25°C	60 dk	8	2.22	2.24	2.23	98
30°C	60 dk	25°C	60 dk	8	2.28	2.17	2.23	98
35°C	60 dk	25°C	60 dk	8	2.23	2.19	2.21	98
40°C	60 dk	25°C	60 dk	8	1.90	1.86	1.88	83

Bacillus sp. NCA35 amilaz enzimi, 25°C'de 60 dakika ön inkübasyondan sonra orjinal aktivitesini %98 oranında korumuştur. Ön inkübasyon sıcaklıkları ayrı ayrı incelendiği zaman, 60 dakikalık ön inkübasyon sonunda 10 ve 15°C'de orjinal aktivitenin %100 korunduğu saptanmıştır. 20, 25, 30 ve 35°C inkübasyon sıcaklıkları uygulandığında kalan aktivite her sıcaklık değerinde %98 bulunmuştur. Sıcaklık 40°C olarak uygulandığında kalan aktivite aniden %83 değerine düşmüştür.

Enzim 10-35ºC aralığında 60 dakikalık ön inkübasyondan sonra orijinal aktivitesini ortalama %99 oranında korumaktadır. Bütün sıcaklıklar dikkate alındığında (10-40ºC) elde edilen kalan aktivite değeri ortalama %96'dır.

Bu sonuçlar, *Bacillus* sp. NCA35 amilaz enziminin termal stabilitesinin son derece yüksek olduğunu göstermektedir. Özellikle 10-35°C aralığında aktivitenin %99 korunması enzimin dayanıklılığının en önemli göstergesidir.



Şekil 4.8. *Bacillus* sp. NCA35 amilaz enziminin termal stabilite sonuçları

Cotarlet ve ark (2009), Doğu Antartika vejetasyon örneklerinden izole ettikleri *Streptomyces* 4 Alga suşuna ait amilaz enziminin 20ºC'de 60 dakikalık inkübasyondan sonra orijinal aktivitesini %60 koruduğunu saptamışlardır.

Zhang ve Zeng (2007b)'in, *Nocardiopsis* sp. 7326'dan izole ettikleri amilaz enziminin 20-45ºC aralığında orijinal aktivitesini %70 oranında koruduğunu belirtmişlerdir. Enzim 15-25ºC'de 60 dakika inkübasyondan sonra aktivitesinin

büyük bir kısmını korurken, 35ºC'de 40 dakikalık inkübasyon uygulandığında aktivitesinin yarısını kaybetmektedir.

Bernhardsdotter ve ark (2005), alkalifilik amilaz üreten *Bacillus* sp. L1711 suşuyla yaptıkları çalışmalarda, bakteriden izole ettikleri amilaz enziminin termal stabilitesini belirlemek amacıyla enzimi 21, 37 ve 55ºC'lerde 1'er saat inkübe etmişlerdir. Enzim 21ºC'de orijinal aktivitesinin %90.7'sini, 37ºC'de %84.3'ünü ve 55ºC'de %1.6'sını korumuştur.

Cotarlet ve ark (2009), *Streptomyces* 4 Alga suşundan izole edilen alfa amilaz enziminin 30ºC'de 60 dakika ön inkübasyona bırakıldığı zaman orjinal aktivitesinin %80 korunduğunu saptamışlardır.

Lu ve ark (2010), *Pseudoalteromonas arctica* GS230'dan aldıkları soğuğa adapte amilaz enzimini 20 ve 30°C'de 90 dakika ön inkübasyona bırakmışlar, orijinal aktivitenin %60 korunduğunu tespit etmişlerdir.

Bacillus sp. NCA35 suşundan izole edilen alkalin amilaz enziminin 60 dakikalık ön inkübasyondan sonra orjinal aktivitesinin ortalama (10-35ºC) %99 korunması, enzimin literatür verilerinden çok daha yüksek bir kararlılığa sahip olduğunu göstermektedir. Aktivitenin 40°C'de aniden %83'e düşmesi cold aktif özellik için karakteristiktir (Zhang ve Zeng, 2007b).

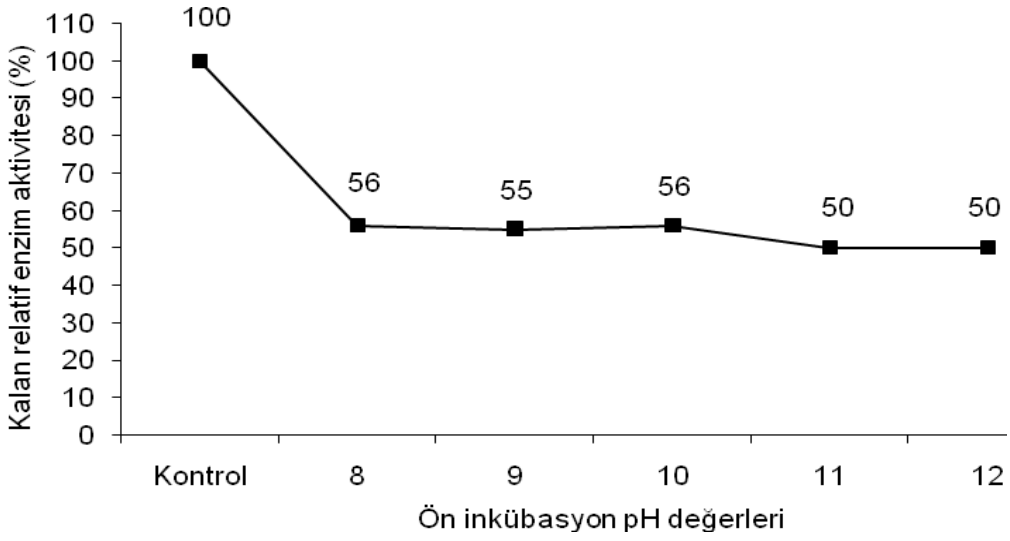
4.6. Enzimin pH Stabilitesine Ait Sonuçlar

Bacillus sp. NCA35 amilaz enzimi pH 8.0–12.0 aralığındaki faklı tampon sistemlerinden oluşan pH çözeltilerinde 25°C'de 24 saat ön inkübasyona bırakılmış ve kalan relatif aktivite değerleri ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar çizelge 4.10 ve şekil 4.9'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.10. *Bacillus* sp. NCA35 amilaz enziminin pH stabilitesi sonuçları

pH	Ön ink. süresi	Ön ink. sıcaklığı	İnk. Süresi	İnk. sıcaklığı	AB1	AB2	AB0	Kalan Aktivite (%)
Kontrol	**-**	**25°C**	**60 dk**	**25°C**	**2.18**	**2.152**	**2.17**	**100**
8	24 saat	25°C	60 dk	25°C	1.24	1.20	1.22	56
9	24 saat	25°C	60 dk	25°C	1.19	1.19	1.19	55
10	24 saat	25°C	60 dk	25°C	1.20	1.22	1.21	56
11	24 saat	25°C	60 dk	25°C	1.09	1.08	1.09	50
12	24 saat	25°C	60 dk	25°C	1.07	1.09	1.08	50

Aktivite ölçümleri sonunda kalan enzim aktivitesinin pH 8.0'de %56, pH 9.0'da %55, pH 10.0'da %56, pH 11.0'de %50, pH 12.0'de %50 olduğu bulunmuştur. Bütün pH değerlerinde kalan enzim aktivite ortalaması %53'tür. En yüksek aktivite %56 ile pH 8.0'de elde edilirken, pH 11.0 ve 12.0'de aktivite %50'dir. Bu sonuçlar, *Bacillus* sp. NCA35 amilaz enziminin 25ºC'de 24 saat süreyle %50'nin üzerinde stabil kaldığını göstermektedir.



Şekil 4.9. *Bacillus* sp. NCA35 amilaz enzimi pH stabilite sonuçları

Kiran ve Chandra (2008), *Bacillus* sp. TSCVKK suşundan kısmi saflaştırmayla izole ettikleri amilaz enzimini pH'sı 6.5-10.5 arasında değişen tamponları kullanarak 4ºC'de 48 saat inkübe etmişler ve enzimin pH 6.0-9.5 aralığında stabil olduğunu bulmuşlardır.

Zhang ve Zeng'in (2007b), *Nocardiopsis* sp. 7326 suşundan izole ettikleri amilaz enzimi 4ºC'deki 24 saatlik inkübasyondan sonra pH 5.0-10.0 aralığında stabil özellik göstermiştir. Enzim pH 7.0-9.0 aralığında orijinal aktivitesini yaklaşık %60 korumuştur.

Lu ve ark (2010), *Pseudoalteromonas arctica* GS230'dan elde ettikleri soğuğa adapte amilaz enziminin pH 7.0-8.5 aralığında yaklaşık %60 stabil olduğunu bulmuşlardır. Araştırmacılar, enzimin bu özellikleri nedeniyle gıda ve deterjan endüstrisinde kullanılabilecek potansiyele sahip olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Shafiei ve ark (2010), *Nesterenkonia* sp. suşundan izole edilen alfa amilaz enzimini pH 4.0-10.0 aralığında 25ºC'de 30 dakika ön inkübasyona bırakmışlardır. pH 6.0-7.5 aralığında stabil olan enzimin orjinal aktivitesi pH 9.0'da %5'e düşmüştür.

Bacillus sp. NCA35 amilaz enzimine ait pH stabilitesi sonuçları literatür verileri ile büyük ölçüde uyum göstermektedir. Enzim 24 saat süreyle pH 8.0-12.0 aralığındaki alkali koşullarda orijinal aktivitesini ortalama %53 koruyarak pH stabil özellik göstermiştir. Bu özelikleri ile, Lu ve ark (2010)'nın belirttiği gibi gıda ve deterjan endüstrisinde kullanılabilecek potansiyele sahip olduğu belirlenmiştir.

4.7. *Bacillus* sp. NCA35 Amilaz Enzimi Aktivitesine İnhibitör, Şelatör, Metal İyonu, Deterjan ve Okside edici Ajanların Etkisi

Bacillus sp. NCA35 amilaz enzimi, inhibitör, şelatör, metal iyonları, deterjan ve okside edici ajanların etkisini saptamak için 30 dakika 15ºC'de ön inkübasyona bırakılmış ve kalan aktivite değerleri hesaplanmıştır. Sonuçlar çizelge 4.11 ve şekil 4.10'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.11. İnhibitör, şelatör, metal iyonları ve deterjanların etkilerine ait sonuçlar

İnhibitör	İnh. kons.	Ön ink. Sıc.	İnk. Sıc.	Ön ink. Sür.	İnk. Sür.	AB1	AB2	AB0	(%) Kalan aktivite
Kontrol	**-**	**-**	**25°C**	**30 dk**	**60 dk**	**2.37**	**2.47**	**2.42**	**100**
$BaCl_2$	5mM	15°C	25°C	30 dk	60 dk	1.77	1.78	1.77	73
EDTA	5mM	15°C	25°C	30 dk	60 dk	1.42	1.41	1.41	58
$CaCl_2$	5mM	15°C	25°C	30 dk	60 dk	1.53	1.60	1.56	65
NaCl	5mM	15°C	25°C	30 dk	60 dk	1.38	1.37	1.37	57
$ZnCl_2$	5mM	15°C	25°C	30 dk	60 dk	1.45	1.45	1.45	60
$MnCl_2$	5mM	15°C	25°C	30 dk	60 dk	1.52	1.58	1.55	64
PMSF	3mM	15°C	25°C	30 dk	60 dk	1.45	1.40	1.42	59
H_2O_2	%1	15°C	25°C	30 dk	60 dk	0.74	0.70	0.72	30
β-Merk.	%1	15°C	25°C	30 dk	60 dk	2.50	2.48	2.49	103
TritonX-100	%1	15°C	25°C	30 dk	60 dk	1.50	1.39	1.44	60
SDS	%1	15°C	25°C	30 dk	60 dk	1.39	1.12	1.25	52
Üre	8M	15°C	25°C	30 dk	60 dk	1.01	1.03	1.02	42

β-Merk.: β-Merkaptoetanol

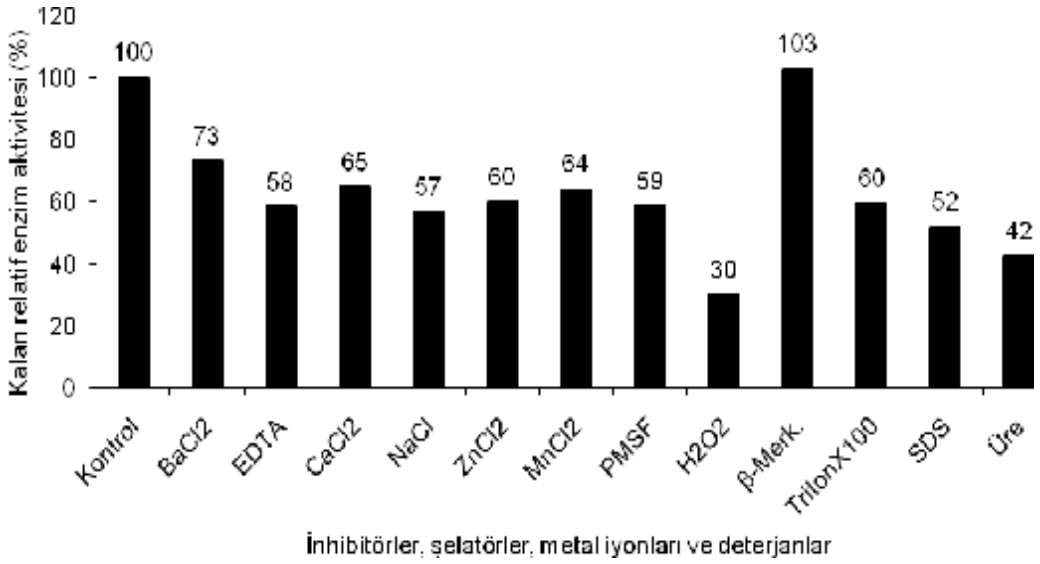
Bacillus sp. NCA35 amilaz enzimi 5 mM konsantrasyonlarındaki $BaCl_2$, EDTA, $CaCl_2$, NaCl, $ZnCl_2$ ve $MnCl_2$ ile 30 dakika inkübe edilmiş ve orjinal enzim aktivitesinin, sırasıyla, %73, %58, %65, %57, %60 ve %64 oranında korunduğunu bulunmuştur. Enzim, 3 mM PMSF'ye %59, 8 M üreye %42 direnç göstermiştir.

Bacillus sp. NCA35 amilaz enzimi %1'lik H_2O_2 bulunan ortamda 30 dakika inkübe edildiğinde orijinal aktivitesinin %30'a düştüğü saptanmıştır.Buna karşılık, %1'lik TritonX-100 ve SDS ile gerçekleştirilen inkübasyon işleminde aktivitenin, sırasıyla, %60 ve %52 oranında korunduğu belirlenmiştir.

Enzimin %1'lik β-Merkaptoetanol ile 15°C'de 30 dakikalık inkübasyonu soncunda aktivitesi %103 ölçülmüştür. β-Merkaptoetanol enzim aktivitesini indüklemiştir.

Bacillus sp. NCA35 amilaz enziminin EDTA (%42) ve PMSF (%41) ile

önemli ölçüde inhibe olması enzimin metal atomu taşıyan serin yapısında olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.10. *Bacillus* sp. NCA35 amilaz enzimi üzerine inhibitör, şelatör, metal iyonu, deterjan ve okside edici ajanların etkisi

Hmidet ve ark (2009), *Bacillus licheniformis* NH1 suşundan izole ettikleri amilaz enzimi ile yaptıkları çalışmalarda, 25°C'de 30 dakika ön inkübasyondan sonra 5 mM EDTA'nın enzimin orijinal aktivitesinin %75'ini inhibe ettiğini bulmuşlardır. 2 mM β-Merkaptoetanol ile aktivitesinin tamamını (%100) korumuştur. Enzim 5mM konsantrasyonlarındaki Ca^{+2}, Zn^{+2} ve Mn^{+2} metal iyonlarına maruz bırakıldığında, sırasıyla, %90, %17, %0 kalan aktiviteye sahiptir. Amilaz enzimi 40°C'de 1 saat %0.5'lik H_2O_2 okside edici ajanıyla inkübe edildiğinde orjinal aktivitesinin %30'unu kaybetmiştir.

Bernharsdotter ve ark (2005), *Bacillus* sp. L1711 suşundan saflaştırdıkları amilaz enziminin, 5mM Ca^{+2}'da %34, 5mM Zn^{+2}'de %30.6 ve 5mM Ba^{+2}'da %60.6 aktivite gösterdiğini bulmuşlardır.

Ghorbel ve ark (2009), *Bacillus cohnii* US147 amilaz enziminin 5mM EDTA'da %78 kalan aktiviteye sahip olduğunu saptamışlardır. Amilaz enzimi 2mM $CaCl_2$'e maruz bırakıldığında %82, 1mM $ZnCl_2$'de %80 kalan aktiviteye sahiptir.

Hmidet ve ark (2008), *Bacillus licheniformis* NH1 suşunun alfa amilaz

enziminin %1 Triton X-100 ile %100, %1 SDS ile %98, 1mM PMSF ile %100, 10mM β-Merkaptoetanol ile %100 ve 15mM EDTA ile %17 aktivite gösterdiğini bulmuşlardır.

Ueda ve ark (2008), *Eisenia foetida'*dan izole ettikleri AmyI ve AmyII amilaz enzimlerini 1mM konsantrasyonlarındaki EDTA ve Ba^{+2}, Ca^{+2}, Zn^{+2}, Mn^{+2} iyonlarıyla inkübasyona bırakmışlardır. Enzimler, Ca^{+2} ve Mn^{+2} ile indüklenmişlerdir. Ba^{+2}, AmyII'nin aktivitesini bir miktar inhibe etmiştir. Zn^{+2} ile muamele sonunda AmyI enziminde %94, AmyII'de ise %64 aktivite bulunmuştur. EDTA ile gerçekleştirilen çalışmalarda AmyI'in aktivitesi %98, AmyII'nin %76 korunmuştur.

Fan ve ark (2009), *Micrococcus antarcticus*'tan elde ettikleri soğuğa adapte amilaz enziminin Zn^{+2}, Ba^{+2}, Ag^{+}, Cu^{+2}, Al^{+3}, Fe^{+2}, Fe^{+3}, Hg^{+2}, EDTA ve sitrat ile inhibe olduğunu tespit etmişlerdir.

Shafiei ve ark (2010), *Nesterenkonia* sp. F suşu amilazını çeşitli metal iyonları ve kimyasal ajanlarla 25°C'de 30 dakika ön inkübasyona bırakmışlardır. 10mM PMSF ve 10mM β-Merkaptoetanol enzim aktivitesini etkilememiştir. 10mM EDTA'nın enzim aktivitesini %41 oranında inhibe etmesi, enzimin metaloenzim özelliğinde olduğunu göstermektedir.

Lu ve ark (2010), *Pseudoalteromonas arctica* GS230'dan elde ettikleri soğuğa adapte amilaz enzimini çeşitli metal iyonları (1 mM) ve surfaktanlarla inkübasyona bırakmışlardır. Enzim Zn^{+2} (%32.29) tarafından güçlü bir şekilde inhibe edilmiştir. SDS (%68.95) ve EDTA (%70.73) enzimi kısmi olarak inhibe etmiştir.

4.8. Farklı NaCl Konsantrasyonlarının Enzim Aktivitesine Etkisi

Bacillus sp. NCA35 amilaz enzimi, 25°C'de 60 dakika süre ile %3, %5, %10, %15, %20, %25 ve %30 konsantrasyonlara sahip NaCl çözeltilerinde ön inkübasyona bırakıldıktan sonra enzimi kalan aktivitesi hesaplanmıştır. Elde edilen veriler çizelge 4.12 ve şekil 4.11'de gösterilmiştir.

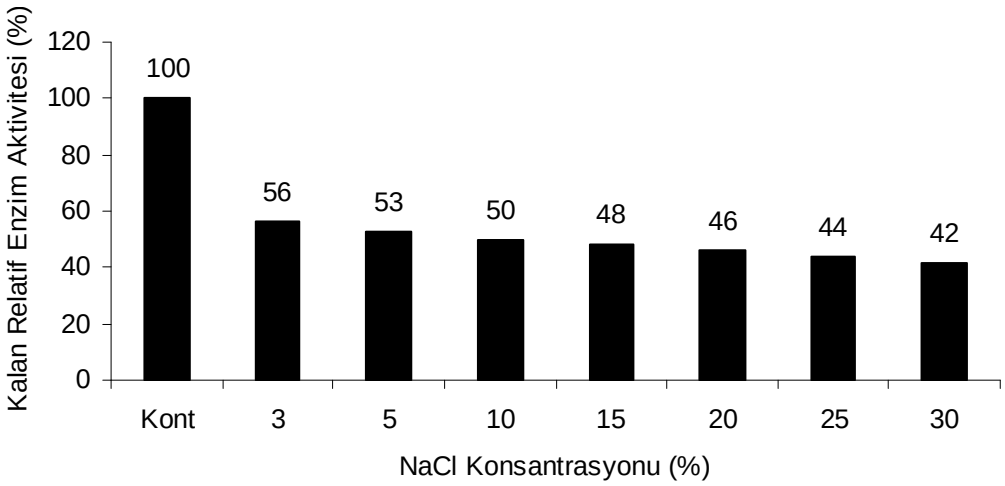
Çizelge 4.12. Farklı NaCl konsantrasyonlarının amilaz enzim aktivitesine etkileri

NaCl Kons. (%)	Ön ink. Süresi	Ön ink. Sıcaklığı	İnk. Süresi	İnk. Sıcaklığı	AB1	AB2	AB0	Kalan aktivite %
Kontrol			**60 dk**	**25°C**	**2.50**	**2.46**	**2.48**	**100.0**
3	60 dk	25°C	60 dk	25°C	1.40	1.36	1.38	56.0
5	60 dk	25°C	60 dk	25°C	1.31	1.31	1.31	53.0
10	60 dk	25°C	60 dk	25°C	1.22	1.27	1.25	50.0
15	60 dk	25°C	60 dk	25°C	1.21	1.20	1.20	48.0
20	60 dk	25°C	60 dk	25°C	1.15	1.13	1.14	46.0
25	60 dk	25°C	60 dk	25°C	1.13	1.05	1.09	44.0
30	60 dk	25°C	60 dk	25°C	1.05	1.03	1.04	42.0

Bacillus sp. NCA35 amilaz enzimi 25ºC'de 60 dakika süre ile %3-30 konsantrasyona sahip NaCl çözeltilerinde ön inkübasyona maruz bırakıldıktan sonra kalan enzim aktivitesi belirlenmiştir.

Bacillus sp. NCA35 amilaz enzimine ait en yüksek kalan aktivite %56 ile %3 NaCl konsantrasyonunda elde edilmiştir. %5, %10, %15, %20, %25 ve %30 NaCl konsantrasyonları incelendiği zaman, sırasıyla, %53, %50, %48, %46, %44 ve %42 kalan enzim aktivitesi elde edilmiştir. Bütün konsantrasyonlar dikkate alındığında (%3-30 NaCl), kalan enzim aktivitesi ortalama %48 bulunmuştur. Enzim %3-10 aralığındaki NaCl konsantrasyonlarında ortalama %53 düzeyinde stabilitesini korumuştur. Buna karşılık, %15-30 aralığındaki NaCl konsantrasyonlarında ortalama aktivite %45 olarak hesaplanmıştır.

Bacillus sp. NCA35 suşundan elde edilen alkalin, soğuk koşullarda aktif amilaz enzimi özellikle %3-10 (2M) NaCl konsantrasyonlarında 60 dakika süreyle stabilitesini %53 korurken, %30 (4M) NaCl'de %42 aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.11. %3-%30 NaCl konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisi

Kiran ve Chandra (2008), NaCl'nin farklı konsantrasyonlarının (%0, 1, 3.5, 5, 10, 15, 20, 25, 30), *Bacillus* sp. TSCVKK suşundan izole ettikleri amilaz enzimi üzerine 48 saatlik etkisini araştırmışlardır. En yüksek aktivite %10 NaCl'de elde edilmiştir.

Pomares ve ark (2003), *Haloferax mediterranei* suşundan izole ettikleri amilaz enziminin 2-4M aralığındaki NaCl konsantrasyonunda aktif ve stabil olduğunu, optimum aktiviteyi 3M konsantrasyonda gösterdiğini bulmuşlardır.

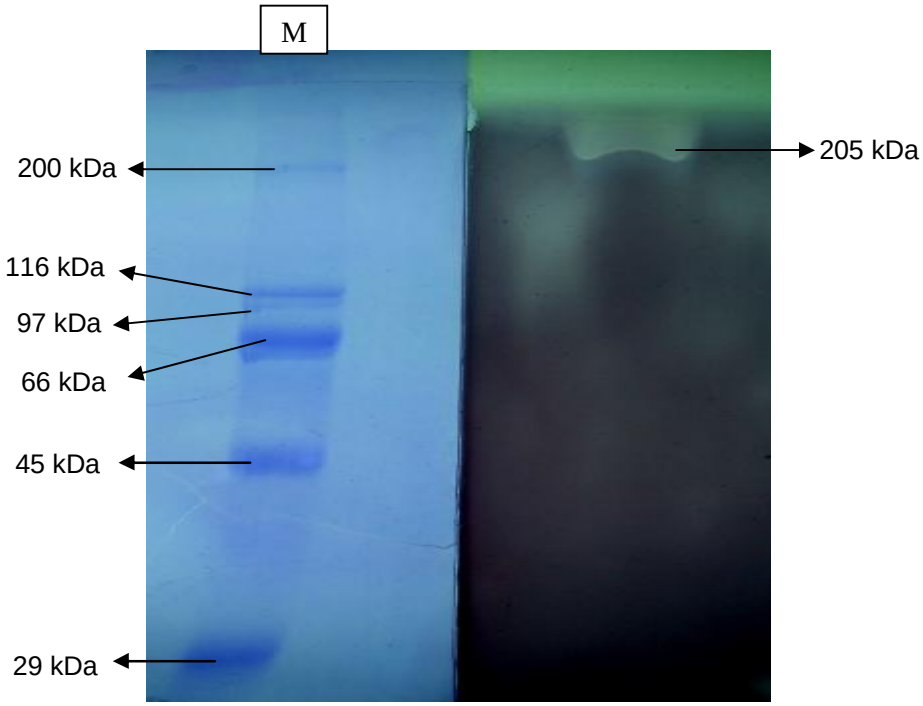
Tatar (2007), SB-28 amilaz enzimini 55ºC'de 60 dakika süreyle %3, %5, %7, %10, %15 ve %20'lik NaCl çözeltileriyle muamele ederek kalan enzim aktivitesini, sırasıyla, %80, %81.3, %84.4, %89, %73 ve %66 bulunmuştur. Enzim %10'luk (2M) NaCl çözeltisinde maksimum kalan aktivite göstermiştir.

Shafiei ve ark (2010), *Nesterenkonia* sp. F suşunun amilaz enziminin 1-4M NaCl konsantrasyonlarında stabil olduğunu belirtmişlerdir. 4M NaCl'de enzimin kalan aktivitesi %59 bulunmuştur.

Bacillus sp. NCA35 suşundan elde edilen amilaz enzimine ait veriler literatür değerleri ile büyük ölçüde uyumludur.

4.9. *Bacillus* sp. NCA35 Amilaz Enziminin SDS-PAGE Zimogram Analizi

Bacillus sp. NCA35 amilaz enzimi %3 nişasta içeren %10'luk SDS-PAGE jelinde yürütülmüş, zimogram analiziyle aktivite bandının varlığı araştırılmıştır. Aktivite bantlarının moleküler ağırlıklarının saptanmasında Sigma SD6H2 (200, 116, 97, 66, 45 ve 29 kDa) marker proteini kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar şekil 4.12 de gösterilmiştir.



Şekil 4.12. *Bacillus* sp. NCA35 Amilaz Enziminin Molekül Büyüklüğü ve Zimogram Analizi (M: marker)

Zimogram analizi sonucunda moleküler ağırlığı yaklaşık 205 kDa olan bir aktivite bandı elde edilmiştir.

Ratanakhanokchai ve ark (1992), *Chloroflexus aurantiacus* J-10-F1 suşundan saflaştırdıkları amilaz enziminin moleküler ağırlığını SDS-PAGE analizi sonucunda 210.000 Da olarak bulmuşlardır.

Ito (1997), *Bacillus* sp. KSM-635 suşundan izole edilen enzimin aktivite tayinlerinde moleküler ağırlıkları 130.000 ve 103.000 Da olan iki protein bandı meydana geldiği saptamıştır.

Burhan ve ark (2003), alkalifilik *Bacillus* sp. ANT-6 suşundan izole ettikleri amilaz enziminin SDS-PAGE analizi sonucunda moleküler ağırlığı 94.500 Da olan bir protein bandı elde etmişlerdir.

Smith ve Zhanley (2005), *Arthrobacter psychrolactophilus* ATCC 700733 suşundan ekstraselüler amilaz enzimi izole etmişlerdir. Enzimin SDS-PAGE zymogram analizi sonunda moleküler ağırlığı 105 kDa ve 26 kDa olan iki bant belirlenmiştir.

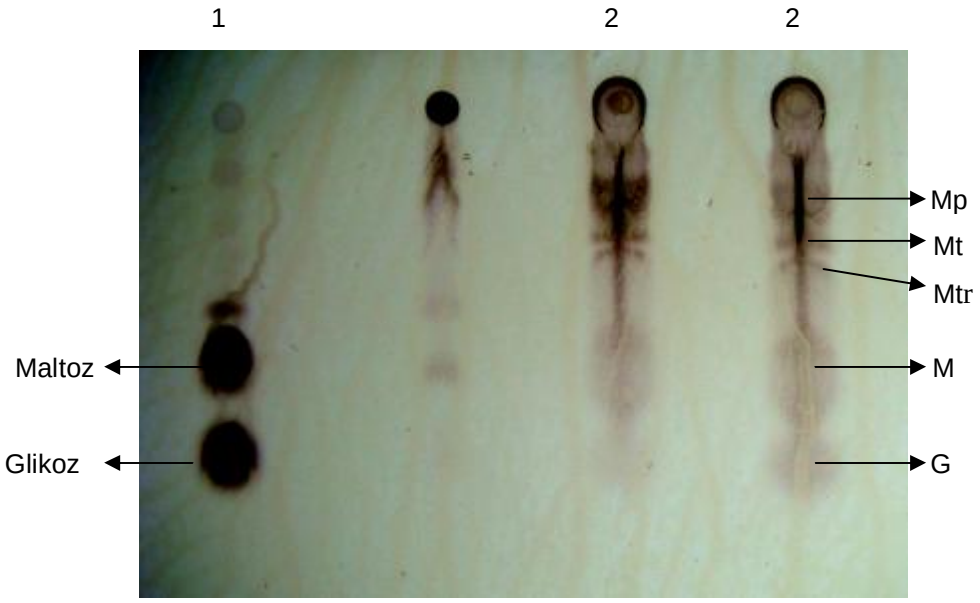
Tatar (2007), SB-28 amilaz enzimini kullanarak %10'luk homojen SDS-PAGE jelinde yaptığı zimogram analiz sonucunda, moleküler ağırlıkları 116.000 ve 97.400 Da olan birbirinden bağımsız iki farklı protein bandı elde etmiştir.

Raya ve ark (2008), *Bacillus brevis* MTCC 7521'den kısmi saflaştırmayla elde ettikleri α-amilaz enziminin SDS-PAGE analizinde %12'lik poliakrilamid jel kullanmışlardır. Kısmi saflaştırılmış amilaz enziminin moleküler ağırlığı 205 kDa olan bir aktivite bandı oluşturduğunu saptamışlardır.

Shafiei ve ark (2010), *Nesterenkonia* sp. F suşunun α-amilazıyla yaptıkları SDS-PAGE zymogram analizinde enzimin 100 kDa ve 106 kDa moleküler ağırlığına sahip olan iki alt birimden oluştuğunu belirlemişlerdir.

4.10. *Bacillus* sp. NCA35 Amilaz Enziminin İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) Analizi

Bacillus sp. NCA35 suşundan izole edilen soğukta aktif alkalin amilaz enzimi optimum pH değerinde hazırlanmış substrat kullanılarak reaksiyona sokulmuş ve reaksiyon ürünü TLC Silica gel 60 F_{254} (Merck) kullanılarak analiz edilmiştir.



Şekil 4.13. Bacillus sp. NCA35 Amilaz Enziminin İnce Tabaka Kromatografisiyle Son Ürünlerinin Saptanması (G; Glikoz, M; Maltoz, Mtr; Maltotrioz, Mt; Maltotetroz, Mp; Maltopentoz. 1. Marker, 2. Enzim Reaksiyon Ürünü)

Bacillus sp. NCA35 suşundan izole edilen enzime ait reaksiyon ürünlerinin ince tabaka kromatografisi analizleri sonunda, enzimin nişasta molekülünü glikoz, maltoz ve diğer maltoz kökenli oligosakkaritlere (maltotrioz, maltotetroz ve maltopentoz) dönüştürdüğü saptanmıştır.

Literatürde, *Bacillus sp.* AB-17 amilaz enziminin nişastayı glikoz, maltoz ve diğer oligosakkaritlere parçaladığı belirlenmiştir (Aygan, 2008). Ayrıca, *Bacillus amyloliquefaciens* ve *E.coli* ekpresyon sonucu elde edilen amilazların nişastayı hidroliz etmeleri sonucu son ürün olarak maltoz, maltotrioz ve maltotetroz gibi oligosakkaritler ile çok az miktarda glikozun oluştuğu bildirilmiştir (Demirkan ve ark, 2005). Bununla birlikte, Morgan ve Pires (1981), *Bacillus licheniformis* bakterisinden üretilen amilaz enziminin nişastayı glikoz ve maltoza dönüştürdüğü belirtmiştir

Ratanakhanokchai ve ark (1992), *Chloroflexus aurantiacus* suşundan elde ettikleri amilazın nişastayı hidroliz etmesi sonucunda son ürün olarak maltotrioz ve maltotetroz gibi oligosakkaritlerin oluştuğunu saptamışlardır.

Liu ve ark (2011), *Wangia* sp. bakterisinden elde ettikleri cold-adapted amilaz enziminin nişastayla reaksiyonu sonucunda açığa çıkan son ürünleri tespit etmek

amacıyla ince tabaka kromatografisi analizleri yapmışlardır. Enzim ve %1'lik nişastanın 10 saat inkübasyonu sonucunda meydana gelen temel hidroliz ürünlerinin maltoz ve glikoz olduğunu tespit etmişlerdir.

Ghang ve ark (2007), *Saccharomyces cerevisiae*'nın α-amilazıyla yaptıkları çalışmalarda, enzimin nişastayla reaksiyonu sonucu meydana gelen son ürünleri ince tabaka kromatografisiyle belirlemişlerdir. α-amilazın, nişastayı maltoz ve maltotrioza parçaladığını saptamışlardır.

Bacillus sp. NCA35 amilaz enzimine ait hidroliz ürünleri literatür bulguları ile uyum içinde olup, enzimin güçlü bir amilolitik etkisi olduğunu göstermektedir. Bu sonuç, enzimin nişastadan prebiyotik üretiminde etkin şekilde kullanılabileceğinin göstergesidir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği, kimyasal katalizörlerin, alerji başta olmak üzere, çeşitli zararları ve ekonomik değerinin yüksek olması nedeniyle, biyoteknolojinin endüstriyel enzimlerle ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar daha çok önem kazanmaktadır (Gözükara, 2009).

Mikroorganizmalar, biyokimyasal çeşitlilikleri ve genetik uygulamaların daha kolay yapılması gibi sebeplerden dolayı iyi birer enzim kaynağı olarak değerlendirilmektedir. Günümüzde endüstride kullanılan enzimlerin yaklaşık %90'ı mikroorganizmalardan üretilmektedir (Rao ve ark, 1998; Wolfgang, 2004).

Endüstrinin birçok alanında kullanılan enzimlerin genellikle mikrobiyal kaynaklı olmasının nedeni, mikroorganizma kökenli enzimlerin, bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, ekstrem koşullarda aktivite gösterebilmeleri ve büyük miktarlarda üretilebilmeleridir. (Aygan, 2008).

Bacillus cinsi tarafından sentezlenen birçok enzim endüstriyel alanda yaygın olarak kullanılmaktadır (Lin ve ark, 1998). *Bacillus* sp. suşları, proteolitik enzimler ve karbohidratazların önemli bir kaynağını oluşturmaktadırlar. Örneğin, α-amilaz enzimi *Bacillus* sp. grubunda oldukça yaygın şekilde bulunur.

Pek çok mikroorganizmanın habitatı, aşırı sıcak ya da aşırı soğuk çevreler, toprak, su, hayvanlar, bitkiler ve insanların oluşturduğu yaşam alanları olmak üzere çok farklı ortamlardır. Çoğunlukla prokaryotlardan oluşan, ekstrem şartlarda yaşayabilen organizmalar ekstremofiller olarak adlandırılmaktadır (Madigan ve Martinko, 2010). Bu organizmaların sentezledikleri ürünler arasında amilaz, pullulanaz, selülaz, ksilanaz, kitinaz, proteaz, esteraz, glikoizomeraz, alkol dehidrojenazlar ve DNA modifiye eden enzimler bulunmaktadır.

Dünya üzerindeki ekstrem ortamlarda üreyen çeşitli organizmalar arasında biyokütle, çeşitlilik ve dağılım açısından en çok bulunanlar psikrofillerdir. Ekstrem psikrofiller, Antarktik ve Arktik kutup bölgelerin, yüksek rakımlı dağlar, buzullar ve

okyanuslardan elde edilebilmektedirler. Psikrofil organizmaların sentezlediği birçok enzim cold aktif özelliktedir. Bu özellik düşük sıcaklıklara karşı fizyolojik adaptasyonda büyük bir avantaj sağlamaktadır (Margesin ve Feller, 2010). Bu organizmalar, düşük sıcaklıklarda yaşamak için bir dizi önemli adaptasyon geliştirmişlerdir. Örneğin; psikrofilik enzimler düşük sıcaklıklarda katalizör görevi görebilmektedir. Bu özellik, enzimlerin deterjan, tekstil ve gıda gibi endüstriyel alanlarda uygulamalarında enerji tüketimini azaltmaya yönelik avantajlar sağlamaktadır (Jahandideh ve ark, 2007).

Literatürde psikrofil bakterilerin optimum 15°C, maksimum 20°C, minimum 0°C veya daha düşük sıcaklıklarda üredikleri bildirilmiştir (Morita ve ark, 1998). Psikrofiller, soğuğa uyumlu mikroorganizmalar olup, düşük sıcaklıklarda yüksek aktivite gösteren enzimler üretmektedirler. Bu enzimler 'cold-aktif' (düşük sıcaklıklarda aktif) olarak tanımlanırlar (Kulakova ve ark, 1999; He ve ark, 2009).

Soğukta aktif olan enzimlerin üç genel özelliği vardır. Bunlar;

1.Sıcaklıkla birlikte enzim aktivitesinin düşük sıcaklığa doğru değişmesi,

2.Spesifik aktivitesinin ve fizyolojik verimin düşük sıcaklıklarda mezofilik koşullara göre daha yüksek olması,

3.Mezofil sıcaklıkta enzimin termal stabilite sınırının hızlı bir şekilde düşmesi (Morita ve ark, 1998; Turus, 2011).

Son zamanlarda cold-adaptif organizmalardan izole edilen enzimlerin önemli ölçüde arttığı görülmektedir. Çoğu Antartika ve arktik mikroorganizmalardan üretilmişlerdir (Zhu ve ark, 2009, Turus, 2011). 0-30°C'de aktivite gösteren cold-aktif enzimlerin spesifik aktivitelerinin mezofilik olanlardan daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Cold-adaptif enzimlerle ilgili mevcut veriler, bu enzimlerin düşük sıcaklıklarda termostabil olduğunu ve yüksek spesifik aktivite gösterdiğini bildirmektedir (Chen ve ark, 2002).

Bir başka çalışma ile cold-aktif ve cold-adaptif enzimlerin sürekli soğuk ortamlardaki organizmalar tarafından üretildiği bildirilmiştir. Antartika buz denizi içinde yaşayan çeşitli cold-aktif enzimleri üreten bakteriler biyoteknolojik uygulamalar için yüksek bir kullanım potansiyele sahiptir (Wang ve ark, 2005; Turus, 2011).

Alkalin selülaz, alkalin proteaz ve alkalin amilaz gibi alkalofilik organizmalardan izole edilen enzimler çeşitli deterjanların formülasyonlarına eklenmişler ve bunlar 'biyolojik deterjanlar' şeklinde tanımlanmışlardır. Dünyada üretilen toplam alkalifilik enzimlerin %30'undan fazlası çamaşır deterjanları içerisine karıştırılmaktadır (Horikoshi, 1996).

Çalışmalarımızda izole edilen organizma koloni morfolojisi ve biyokimyasal testlere göre *Bacillus* sp. NCA35 olarak adlandırılmıştır. Tanımlanan organizma, katı besiyerindeki üremesinin ve enzim sentezinin pH ve sıcaklığa göre değişip değişmediğini saptamak amacıyla analiz edilmiştir.

Çalışmada, ortam sıcaklığı 2ºC ve pH 11.0'de 45 mm net aktivite zonu elde edilmiştir. Bütün pH değerlerinde oldukça geniş aktivite zon çapları ölçülmüştür (37 mm) (Çizelge 4.1). Bu sonuç cold aktif enzimler için karakteristik olup, aktivitenin oldukça yüksek olduğunu göstermektedir (Chen ve ark, 2002).

İnkübasyon sıcaklığı 10ºC ve pH 9.0'da 41 mm zon çapı elde edilmiştir. Özellikle pH 8.0-11.0 aralığında ortalama 36 mm zon çapı elde edilirken, pH 6.0-7.0 aralığında 8 mm zon oluşması, enzimin alkali pH ve düşük sıcaklıkta yüksek katalitik aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir (Çizelge 4.2). Bu sonuç literatür ile tam bir benzerlik göstermektedir (Chen ve ark, 2002).

Bacillus sp. NCA35 suşu 15ºC'de inkübe edildiğinde bütün pH değerlerinde birbirine yakın zon çapları elde edilmiştir. Bununla birlikte en geniş aktivite zonu 16 mm ile pH 7.0'de ölçülmüştür (Çizelge 4.3).

İnkübasyon sıcaklığının 20ºC olarak seçildiği analizlerde en yüksek aktivite zonu pH 8.0 ve 9.0'da 21 mm olarak ölçülmüş, pH 6.0-12.0 aralığında ortalama 18 mm zon elde edilmiştir (Çizelge 4.4.). Enzim üretiminde kullanılmak üzere seçilen suş bütün pH değerlerinin ortalaması alındığı zaman 25ºC de 18 mm, 30ºC de 21 mm zon oluşturmuştur (çizelge 4.5 ve 4.6).

Bacillus sp. AB-17 suşu pH 7.0-12.5 arasında üreme göstermekle birlikte, pH 9.0-10.0 aralığında optimum üreme gerçekleşmiştir. Buna karşılık, pH 7.0-12.0 aralığında enzim sentezi gerçekleşmiştir. Özellikle pH 7.5-10.0 aralığında 14 mm'lik aktivite zon çapına ulaşılırken, optimum sentez 18 mm aktivite zon çapı ile pH 9.5'de gözlenmiştir (Aygan, 2008).

Bacillus sp.AB-17 suşu 4 mm'lik koloni çapı ile 25 ve 37°C arasında optimum üreme gösterirken, sadece 25 ve 37°C'lerde aktivite zonu saptanmıştır. Optimum zon oluşumu ise 17 mm ile 37°C de gerçekleşmiştir (Aygan, 2008)

Bacillus sp. NCA35 suşuna ait amilaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH'8.0'dir. pH 6.0-13.0 aralığında enzimin aktivitesi ortalama %88.2'dir. Optimum aktivite pH 8.0'de elde edilmiş olsa da, enzim pH 6.0-8.0 aralığında yaklaşık %92 aktiviteye sahiptir. Bu sonuçlar, enzimin oldukça geniş bir pH aralığında yüksek düzeyde aktif olduğunu göstermektedir. Bu özellikleri dikkate alındığında, enzimin kullanım alanını deterjandan biyoremediasyona kadar çeşitlendirmek mümkündür (Şekil 4.6).

Literatürdeki amilaz enzimleri incelendiğinde, optimum pH değerlerinin farklılıklar olduğu görülmektedir. Zhang ve Zeng (2007b), Antarktik'in Prydz Körfezi'nden izole ettikleri *Nocardiopsis* sp. 7326'dan izole ettikleri cold aktif alfa amilaz enziminin aktivite gösterdiği optimum pH'nın 8.0, Kiran ve Chandra (2008) 7.5, ve McTigue ve ark (1995) *Bacillus* sp. IMD370'ten izole ettikleri α-amilaz enzimininkinin 8.0 olduğunu bildirmişlerdir. Literatür verileri ile *Bacillus* sp. NCA35 amilaz enziminin aktivite gösterdiği optimum pH'sı büyük benzerlik göstermektedir.

Bacillus sp. NCA35 amilaz enziminin optimum aktive gösterdiği sıcaklık 25°C'dir. Enzim 10°C-25°C aralığında ortalama %95.5 gibi oldukça yüksek bir katalitik aktivite göstermiştir. Enzim aktivitesi 35°C'de %91'e ve 40°C'de %90'e düşmekle birlikte, 10-40°C aralığında ortalama %93 düzeyindedir. *Bacillus* sp. NCA35 amilaz enzimi, Özellikle 10-25°C aralığındaki aktivitesi ile soğukta aktif enzim özelliğine sahiptir (Şekil 4.7).

Cotarlet ve ark (2009), *Streptomyces* 4 Alga'dan elde ettikleri alfa amilaz enziminin optimum aktivite sıcaklığını 30°C bulmuşlardır. Enzim 10°C'de %50.21 aktiviteye sahipken, 20°C'de %53.64 aktivite göstermiştir. Zhang ve Zeng (2007b), Antarktik'in Prydz Körfezi'nden izole ettikleri *Nocardiopsis* sp. 7326 bakterisinin alfa amilaz enziminin maksimum aktivitesini 35°C'de gösterdiğini bildirmişlerdir. Morita ve ark (1997), *Bacillus subtilis* A201 suşuna ait amilaz enziminin optimum aktivitesini 30°C gösterdiğini ve aktivitenin 20°C'de %80 olduğunu belirtmişlerdir.

Çalışmamızda izole edilen amilaz enziminin optimum aktivite sıcaklığının 25°C olmakla birlikte enzimin, 10-20°C aralığında %94 katalitik aktiviteye sahip olması literatür verilerine göre soğukta aktivite yönünden ekstrem avantajlara sahip olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, *Bacillus* sp. NCA35 amilaz enzimi ekstrem soğukta aktif (cold aktif) özellik taşımaktadır.

Bacillus sp. NCA35 amilaz enzimi 60 dakika ön inkübasyon işleminden sonra 10°C-35°C aralığında orjinal aktivitesini %99 oranında koruyarak yüksek düzeyde stabilite göstermiştir. Sıcaklık 40°C'ye yükseltildiğinde ise aktivite hızla düşerek % 83 düzeyine inmiştir (Şekil 4.8). Cotarlet ve ark (2009), Doğu Antartika vejetasyon örneklerinden izole edilen *Streptomyces* 4 Alga suşuna ait soğukta aktif amilaz enziminin 20ºC'de 60 dakika ön inkübasyondan sonra enzimin orjinal aktivitesinin %60'ını koruduğunu bulmuşlardır. Çalışmamızda izole edilen enzim literatür değerlerinden çok yüksek termal kararlılığa sahiptir. Bu da, özellikle 35ºC'ye kadar sıcaklık gerektiren bütün uygulamalarda kullanılabilme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

Bacillus sp. NCA35 amilaz enzimi 24 saat 25°C'de ve farklı pH değerlerinde (pH 8.0-12.0) ön inkübasyona bırakıldığında stabilitesini ortalama %53 korumuştur (Şekil 4.9). Zhang ve Zeng (2007b), *Nocardiopsis* sp. 7326 suşundan izole ettikleri amilaz enziminin 4ºC'deki 24 saatlik inkübasyonundan sonra en yüksek stabilitenin pH 8.0'de gerçekleştiğini, pH 7.0-9.0 aralığında aktivitenin %60 düzeyinde korunduğunu belirtmişlerdir. Çalışmamızda izole edilen enzime ait verilerin literatürlerdekilerle tam bir uyum içinde olduğu görülmektedir.

Bacillus sp. NCA35 amilaz enzimi, 60 dakika süre ile %3, %5, %10, %15, %20, %25 ve %30 NaCl çözeltilerinde ön inkübasyona bırakılmış ve ortalama %48 kalan aktivite değeri elde edilmiştir (Şekil 4.10). Kiran ve Chandra (2008), *Bacillus* sp. TSCVKK suşundan izole ettikleri amilaz enziminin 48 saat süreyle %15'lik NaCl'de inkübe edildiğinde aktivitesinin %77'sini koruduğunu saptamışlardır.

Literatür bilgisindeki ön inkübasyon süresi dikkate alındığında, izole ettiğimiz enzimin farklı NaCl konsantrasyonlarında oldukça stabil olduğu görülmektedir.

Bacillus sp. NCA35 amilaz enzimi, her biri 5mM olan $BaCl_2$, EDTA, $CaCl_2$, NaCl, $ZnCl_2$, $MnCl_2$, 3mM PMSF ve 8M üre ile 15ºC'de 30 dakika ön inkübasyona bırakldıktn sonra enzim aktivitesi ölçülmüş ve enzimin, sırasıyla, %17, %42, %35, %43, %40 %36, %61 ve %58 inhibe olduğu tespit edilmiştir.

Enzim aktivitesi %1'lik H_2O_2 ile %70, %1'lik TritonX-100 ile %40 %1 SDS ile %48 inhibe olurken, %1'lik β-Merkaptoetanol ile yaklaşık %3 artış göstermiştir (Şekil 4.11). Literatür bilgilerinde, değişik araştırmacılar kullandığımız konsantrasyonlardan farklı konsantrasyonlarda çeşitli sonuçlar bulmuşlardır. Hmidet ve ark (2008), *Bacillus licheniformis* NH1 suşuna ait alfa amilaz enziminin 10mM β-Merkaptoetanol ile %100 ve 15mM EDTA ile %17 aktivite gösterdiğini saptamışlardır.

Shafiei ve ark (2010), *Nesterenkonia* sp. F suşunun amilazını çeşitli metal iyonları ve kimyasal ajanlarla 25°C'de 30 dakika ön inkübasyona bırakmışlardır. 10 mM PMSF ve 10 mM β-Merkaptoetanol'ün enzim aktivitesi üzerinde etkisi olmadığını, 10mM EDTA'nın aktiviteyi %41 inhibe ettiğini bulmuşlardır. Fan ve ark (2009), *Micrococcus antarcticus*'tan elde ettikleri soğuğa adapte amilaz enziminin Zn^{+2}, Ba^{+2}, Ag^{+}, Cu^{+2}, Al^{+3}, Fe^{+2}, Fe^{+3}, Hg^{+2}, EDTA ve sitrat ile inhibe olduğunu belirtmişlerdir.

Bernharsdotter ve ark (2005), *Bacillus* sp. L1711 suşundan izole edilen amilaz enziminin 5mM Ca^{+2}'da %34, Zn^{+2}'da %31 ve Ba^{+2}'de %61 aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar, benzer konsantrasyonları kullanan literatür bilgileriyle karşılaştırıldığında, enzimimizin çok daha yüksek stabiliteye sahip olduğu görülmektedir. *Bacillus* sp. NCA35 amilaz enzimi, bu özellikleri ile aktif bölgesinde metal iyonu bulunan serin amino asitlerince zengin bir yapıya sahiptir.

Bacillus sp. NCA35 amilaz enziminin zimogram analizi sonucunda enzime ait bir aktivite bölgesi saptanmış, moleküler ağırlığı 205 kDa olan bir aktivite bandı elde edilmiştir (Şekil 4.12). Farklı araştırıcılar değişik sonuçlar bulmuşlardır. Tatar (2007), 116 ve 97.4 kDa, Ito (1997), 130 ve 103 kDa, Shafiei ve ark (2010), 100 ve 106 kDa, Smith ve Zhanley (2005), 105 ve 26 kDa. Bununla birlikte, Raya ve ark

(2008), *Bacillus brevis* MTCC 7521'den kısmi saflaştırmayla elde ettikleri α-amilaz enziminin %12'lik SDS-PAGE analizinde moleküler ağırlığı 205 kDa olan bir aktivite bandı oluşturduğunu saptamışlardır. Ratanakhanokchai ve ark (1992), saflaştırdıkları amilaz enziminin moleküler ağırlığını SDS-PAGE analizi sonucunda 210 kDa olarak bulmuşlardır. Bu sonuçlar, izole edilen enzimin literatürlerle tam bir uygunluk içinde olduğunu göstermektedir.

Bacillus sp. NCA35 suşundan izole edilen enzime ait reaksiyon ürünlerinin ince tabaka kromatografisi analizleri sonucunda, enzimin nişasta molekülünü glikoz, maltoz ve diğer maltoz kökenli oligosakkaritlere (maltotrioz, maltotetroz ve maltopentoz) dönüştürdüğü saptanmıştır. Morgan ve Pires (1981) ile Demirkan ve ark (2005), *Bacillus subtilis* ve *Bacillus amyloliquefaciens* suşlarından üretilen amilaz enzimlerinin nişastayı glikoz, maltoz, maltotrioz ile maltotetroz gibi oligosakkaritlere dönüştürdüğünü bildirmişlerdir. İzole edilen *Bacillus* sp. NCA35 amlaz enziminin reaksiyon ürünleri literatürler ile tam bir benzerlik göstermektedir.

Çalışmamızda izolasyonu gerçekleştirilen *Bacillus* sp. NCA35 bakterisinden izole edilen amilaz enziminin özellikleri incelendiği zaman;

Enzim optimum katalitik aktivitesini 25°C ve daha düşük sıcaklıklarda (sıcaklık düştükçe stabilitesi artan), optimum aktivitesini de pH 8.0'de göstermekle birlikte, 6.0-12.0 aralığında oldukça yüksek aktiviteye sahiptir. Birçok inhibitör, şelatör, metal iyonları, okside edici ajan ve deterjanlara literatürlerden çok daha yüksek düzeyde dayanıklıdır. Bu özelliklere sahip olan *Bacillus* sp. NCA35 amlaz enzimi, öncelikli olarak deterjan endüstrisi ve prebiyotik üretimi için ideal özelliklere sahiptir.

Sonuç olarak;

1. Enzim deterjan formülasyonlarında değerlendirildiğinde nişasta temelli kirliliklerin gideriminde önemli bir uygulama potansiyeline sahiptir. Bu alandaki uygulama ile, düşük sıcaklıklarda yüksek katalitik aktivite göstermesi ve sıcaklığın düşmesine bağlı olarak aktivite ve stabilitesinin artması sonucu özellikle yıkama sektöründe çok önemli oranlarda enerji tasarrufu sağlanmasına yardımcı olacaktır. Ayrıca enzimimizin deterjanlara eklenmesiyle yıkamanın düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilmesi sonucu ısısal yıpranmanın önlenmesine bağlı olarak giysilerin

kullanım ömrünün uzaması sağlanış olacaktır.

2. Enzim düşük sıcaklık ve geniş bir pH aralığında uzun süre aktivitesini korurken, aynı zamanda birçok metal iyonu, inhibitör, deterjan ve şelatöre karşı önemli düzeyde dirençlidir. Bu özelliği dikkate alındığında, enzimimiz çeşitli kimyasallarla kirlenmiş su ve toprak alanlarının biyoremediasyonunda kullanılabilir.

3. Enzimimizin düşük sıcaklık ve geniş pH aralığında yüksek aktivite özelliğine sahip olması, içecek ve gıda endüstrisi için, özellikle prebiyotik üretiminde, yaygın bir kullanım potansiyeli oluşturmaktadır.

KAYNAKLAR

AEHLE, W., 2004. Enzymes in Industry Production and Application. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, p.484.

AIYER, P.V., 2005. Amylases and their applications. African Journal of Biotechnology, 4: 1525-1529.

AMOOZEGAR, M.A., MALEKZADEH, F., MALIK, K.A., 2003. Production of amylase by newly isolated moderate halophile, *Halobacillus* sp. Strain MA-2. J.of Microbiological Methods, 52:353-359.

ANONYMOUS, 1917. Buffer solutions. Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, p.370-382.

ANONYMOUS, 1978. Microbiologischen Handbook. Mecrk, Darmstad.

ANONYMOUS, 1988. Handbook of amylases and related enzymes. Edited by the amylase research society of Japan. Pergamon press, Oxford.

ARIKAN, B., 2008. Highly Thermostable, Thermophilic, Alkaline, SDS and Chelator Resistant Amylase from a Thermophilic *Bacillus* sp. Isolate A3-15. Bioresource Technology, 99:3071-3076.

AYGAN, A., 2008. Haloalkalofil *Bacillus* sp. İzolasyonu, Amilaz, Selülaz ve Ksilanaz Enzimlerinin Üretimi, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulamalarda Kullanılabilirliği. Ç.Ü. F.B.E. Doktora Tezi.

BAILEY, J.E., OLLIS, D.F., 1977. Biochemical engineering fundamentals: International student Edition, Chapter 1-7, p.39-50.

BERNHARDSDOTTER, E.C.M.J., NG, J.D., GARRIOTT, O.K., PUSEY, M.L., 2005. Enzymatic properties of an alkaline chelator-resistant α-amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. Isolate L1711. Process Biochemistry, 40:2401-2408.

BOLLAG, D.M., EDELSTEIR S.J., 1991. Proteins Metods. Villey-Liss Press, USA, p.180.

BOLLAG, D.M., ROZYCKI, M.D., EDELSTEIN, S.J., 1996. Protein Methods, 2nd Edition, Viley-Liss Press, USA, p.414.

BREED, R.S., MURRAY, E.G.D., SMITH, N.R., 1957. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Waverly Press, Baltimore, p.1094.

BURG, B., 2003. Extremophiles as a source for novel enzymes. Current Opinion in Microbiology, 6:213-128.

BURHAN, A., NİSA, U., GÖKHAN, C., ÖMER, C., ASHABİL, A., OSMAN, G., 2003. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. Isolate ANT-6. Process Biochemistry, 38:1397-1403.

CHEN, X.L., SUN, C.Y., ZHANG, Y.Z., GAO, P.J., 2002. Effects of Different Buffers on the Thermostability and Autolysis of a Cold-Adapted Protease MCP-01. Journal of Protein Chemistry, Volume 21, Number 8, p.523-527.

CHESSA, J.P., FELLER, G., GERDAY, C., 1999. Purification and characterization of the heat-labile α-amylase secreted by the psychrophilic bacterium TAC 240B. Can. J. Microbiol., 45:452-457.

CORAL, G., ARIKAN, B., ÜNALDI, M.N., ve GÜVENMEZ KORKMAZ, H., 2002. Some properties of thermostable xylanase from an *Aspergillus niger* strain. Ann. Microbiol., 52:299-306.

COTARLET, M., NEGOITA, T., BAHRIM, G., STOUGAARD, P., 2009. Cold adapted amylase and protease from new *Streptomyces* 4Alga Antarctic strain. Innovative Romanian Food Biotechnology Vol. 5, p.23-30.

ÇETİN, E.T., 1968. Pratik Mikrobiyoloji, İstanbul Üniversitesi, 2. Baskı, Menteş Matb., İstanbul, s.645.

DEMİRKAN, E.S., MIKAMI, B., ADACHI, M., HIGASA, T., UTSUMI, S., 2005. α-Amylase from *B. amyloliquefaciens*: purification, characterization, raw starch degradation and expression in *E. coli*. Process Biochemistry, Volume 40, Issue 8, p.2629-2636.

FAN, H.X., LIU, Y., LIU, Z.P., 2009. Optimization of fermentation conditions for cold-adapted amylase production by *Micrococcus antarcticus* and its enzymatic properties. Huan Jing Ke Xue/Environmental Science, 30:2473-8.

FRILABO,"*Bacillus* sp.'nin elektron mikroskobundaki görüntüsü", http://www.frilabo.pt, (Erişim tarihi 27 Temmuz 2011

GERÇEKER, D., 1999. *Bacillus*. USTAÇELEBİ, Ş., Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Kitapevi, Ankara, s.411-418.

GERDAY, C., AITTALEB, M., BENTAHIR, M., CHESSA, J.P., CLAVERIE, P., COLLINS, T., D'AMICO, S., DUMONT, J., GARSOUX, G., GEORLETTE, D., HOYOUX, A., LONHIENNE, T., MEUWIS, M.A., FELLER, G., 2000. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. Tibtech., Vol. 18, p.103-107.

GESSESSE, A., GASHE, B.A., 1997. Production of Alkaline Xylanase by an *Bacillus* sp. Isolated from an Alkaline Soda Lake. Journal of Applied Microbiology, 83:402-406.

GHANG, D.M., LI, Y., LIM, M.H., KO, H.M., IM, S.Y., LEE, H.B., BAI, S., 2007. Efficient one-step starch utilization by industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* expressing the glucoamylase and α-amylase genes from *Debaryomyces occidentalis*. Biotechnol Lett., 29:1203-1208.

GHORBEL, R.E., MAKTOUF, S., MASSOUD, E.B., BEJAR, S., CHAABOUNI, S.E., 2009. New Thermostable Amylase from *Bacillus cohnii* US147 with a Broad pH Applicability. Appl. Biochem. Biotechnol., 157:50-60.

GOMES, J., STEINER,W., 2004. The biocatalytic Potential of Extremophiles and Extremozymes. Food Technology and Biotechnology, 42(4):223-235.

GÖZÜKARA, F., 2009. Termofil *Bacillus* sp. Bakterisinden Lichenaz (B-1,3 ve 1,4 Glucanase) Enzimi Üretimi, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Kullanılabirliği. Ç.Ü. F.B.E. Yüksek Lisans Tezi.

GROUDIEVA, T., KAMBOUROVA, M., YUSEF, H., ROYTER, M., GROTE, R., TRINKS, H., ANTRANIKIAN, G., 2004. Diversity and cold-active hydrolytic enzymes of culturable bacteria associated with Arctic sea ice, Spitzbergen**.** Extremophiles, 8:475–488.

GUPTA, R., GIGRAS, P., MOHAPATRA, H., GOSWAMI, V.K., CHAUHAN, B., 2003. Microbial α-amylases: a biotechnological perspective. Process Biochemistry, 38:1599-1616.

HAMES, B.D., RICKWOOD, D., 1996. Gel Electrophoresis of Proteins A Practical Approach. Oxford University Press, Oxford, p.383.

HE, H.L., CHEN, X.L., ZHANG, X.Y., SUN, C.Y., ZOU B.C., ZHANG Y.Z., 2009. Novel Use for the Osmolyte Trimethylamine N-oxide: Retaining the Psychrophilic Characters of Cold-Adapted Protease Deseasing MCP-01 and Simultaneously Improving its Thermostability, Mar. Biotechnol., 11:710-716.

HMIDET, N., BAYOUDH, A., BERRIN, J.G., KANOUN, S., JUGE, N., NASRI, M., 2008. Purification and biochemical characterization of a novel α-amylase from *Bacillus licheniformis* NH1 Cloning, nucleotide sequence and expression of amyN gene in *Escherichia coli*. Process Biochemistry, 43:499-510.

HMIDET, N., ALİ, N.E.H., HADDAR, A., KANOUN, S., ALYA, S.K., NASRI, M., 2009. Alkaline proteases and thermostable α-amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive. Biochemical Engineering Journal, 47:71-79.

HOLS, P., FERAIN, T., GARMYN, D., BERNARD, N., DELCOUR, J., 1994. Use of Expression Secretion Signals and Vector Free Stable Chromosomal Integration In Engineering of *Lactobacillus plantarium* for Alfa Amylase and Levanase Expression. App. And Environ. Microbial., 60(5):1401-1413.

HORIKOSHI, K., 1996. Alkaliphiles from an industrial point of view. FEMS Microbiology Reviews, 18:259-270.

HORIKOSHI, K., 1999. Alkaliphiles: some Applications of Their Products for Biotechnology. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 63:735-750.

HUI, Y.Z., YONG, T., YUN, H.H., TIAN, H.W., 2009. Purification and characterization of the cold-active alkaline protease from marine cold-adaptive *Penicillium chrysogenum* FS010. Mol Biol Rep., 36:2169–2174.

IGARASHI, K., HATADA, Y., HAGIHARA, H., SAEKI, K., TAKAIWA, M., EUMURA, T., ARA, K., OZAKI, K., KAWAI, S., KOBAYASHI, T., ITO, S., 1998. Enzymatic properties of a novel liquefying α-amylase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate and entire nucleotide and amino acid sequences. Appl. Environ. Microb., 64:3382-3389.

ISRAILIDES, C., SMITH, A., SCANLON, B., BARNETT, C., 1999. Pullulan from agro-industrial wastes. Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 16:309–324.

ITO, S., 1997. Alkaline cellulases from alkaliphilic *Bacillus*: Enzymatic properties, genetics and application to detergents. Extremophiles, 1:61-66.

JAHANDIDEH, S., ABDOLMALEKI, P., JAHANDIDEH, M., ASADABADI, E. B., 2007. Sequence and structural parameters enhancing adaptation of proteins to low temperatures. Journal of Theoretical Biology, 246: 159-166.

KIM, T.U., GU, B.G., JEONG, J.Y., BYUN, S.M., SHIN, Y.C., 1995. Purification and Characterization of a Maltotetraose-Forming Alkaline α-Amylase from an Alkalophilic *Bacillus* Strain, GM8901. Applied and Environmental Microbiology, Vol.61, No.8, p.3105–3112.

KIRAN, K.K., CHANDRA, T.S., 2008. Production of surfactant and detergent-stable, halophilic, and alkalitolerant alpha-amylase by a moderately halophilic *Bacillus* sp. Strain TSCVKK. Appl. Microbiol. Biotechnol., 77:1023-1031.

KULAKOVA, L., GALKIN, A., KURIHARA, T., YOSHIMURA, T., ESAKI, N.,1999. Cold-Active Serine Alkaline Protease from the Psychrotrophic Bacterium *Shewanella* Strain Ac10: Gene Cloning and Enzyme Purification and Characterization Applied and Environmental Microbiology, Vol.65, No.2, p.611-617.

LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of the Bacteriophage T4. Nature, 227:680-685.

LEE, S.P., MORIKAWA, M., TAKAGI, M., IMANAKA, T., 1994. Cloning of the *AapT* Gene and Characterization of Its product, α-Amylase-Pullulanase (AapT), from Thermophilic and Alkaliphilic *Bacillus* sp. Strain XAL601. Appl. Environ. Microbiol., 60:3764-3773.

LENNETE, E.H., BALLOWS, A., HAUSLER, J.W.J., SHADOMY, J.H., 1985. Manual of Clinical Microbiology, Vol 4, USA, p.1149.

LIN, L.L., CHYAU, C.C., HSU, W.H., 1998. Production and properties of a raw starch- degrading amylase from the thermophilic and alkalophilic *Bacillus* sp. TS-23. Biotechno. Appl. Biohem., 28:61-68.

LIU, J., ZHANG, Z., LIU, Z., ZHU, H., DANG, H., LU, J., CUI, Z., 2011. Production of Cold-Adapted Amylase by Marine Bacterium *Wangia* sp. C52: Optimization, Modeling, and Partial Characterization. Mar. Biotechnol.

LO, H.F., LIN, L.L., CHEN, H.L., HSU, W.H., CHANG, C.T., 2001. Enzymic properties of a SDS-resistant *Bacillus* sp. TS-23 α-amylase produced by recombinant *Escherichia coli*. Process Biochemistry, 36:743-750.

LU, M., WANG, S., FANG, Y., LI, H., LIU, S., LIU, H., 2010. Cloning, Expression, Purification, and Characterization of Cold-Adapted α-Amylase from *Pseudoalteromonas arctica* GS230 Protein J., 29:591–597.

MAAREL, M.J.E.C., VEEN, B., UITDEHAAG, J.C.M., LEEMHUIS, H., DIJKHUIZEN, L., 2002. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α-amylase family. J. Biotechnol., 94:137–155.

MANNIATIS, T., FRITSCH, E.F., SAMBROOK, J., 1982. Molecular cloning. Cold Spring Harbour Laboratory. New York.

MARGESIN, R., FELLER, G., 2010. Biotechnological applications of psychrophiles. Environmental Technology, vol. 31, 835-844.

McTIGUE, M.A., KELLY, C.T., DOYLE, E.M., FOGARTY, W.M., 1995. The alkaline amylase of the alkalophilic *Bacillus* sp. IMD 370. Enzyme Microb. Technol., 17:570-3.

MEHROTRA, S., PANDEY, P.K., GAUR, R., DARMWAL, N.S., 1999. The prufication of alkaline protease by a *Bacillus* species isolated. Bioresource Technology, 67:201-203.

MILLER, G.L., 1951. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Analytical Chemistry, 426-428.

MORGAN, F.J. and PRIEST, F.G., 1981. Characterization of a thermostable α-amylase from *Bacillus licheniformis* NCIB 6346. Journal of Applied Microbiology, 50:107-114.

MORITA, Y., NAKMURA, T., HASAN, Q., MURAKAMI,Y., YOKOYAMA, K., TAMIYA, E., 1997. Cold-Active Enzymes from Cold-Adapted Bacteria. JAOCS, Vol.74, No.4.

OLSEN, H.S., FALHOLT, P., 1998. The Role of Enzymes in Modern Detergency. Journal of Surfactants and Detergents. Vol.1, No.4, p.555-567.

PANDEY, A., NIGAM, P., SOCCOL, C.R., SOCCOL, V.Y., SINGH, D., MOHAN, R., 2000. Advances in microbial amylases. Biotechnol. Appl. Biochem., 31:135–152.

POMARES, F.P., BAUTISTA, V., FERRER, J., PIRE, C., MARHUENDA-EGAE, F.C., BONETE,M.J., 2003. α-Amylase activity from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*. Extremophiles, 7:299-306.

RAO, M.B., TANKSALE, A.M., GATHE, M.S., DESHPANDE, W., 1998. Molecular and Biotechnological aspect of Microbial proteases. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62(3):597-635.

RATANAKHANOKCHAI, K., KANEKO, J., KAMIO, Y., IZAKI, K., 1992. Purification and Properties of a Maltotetraose- and Maltotriose-Producing Amylase from *Chloroflexus aurantiacus* Applied And Environmental Microbiology, Vol.58, No.8, p.2490-2494.

RATANAKHANOKCHAI, K., KYU, K.L., TANTICHAROEN, M., 1999. Purification and Properties of a Xylan-Binding Endoxylanase from Alkaliphilic *Bacillus* sp. Strain K-1. Appl. Environ. Microbiol., 65:694-697.

RAYA, R.C., KARA, S., NAYAKA, S., SWAIN, MR, 2008. Extracellular α-Amylase Production by *Bacillus brevis* MTCC 7521. Food Biotechnology. 22:234–246.

REDDY, N.S., NIMMAGADDA, A., RAO, K.R.S.S., 2003. An overview of the microbial α-amylase family. African Journal of Biotechnology, 2(12):645-648.

REDDY, P.V.V., RAO, S.S.S.N., PRATIBHA, M.S., SAILAJA, B., KAVYA, B., MANORAMA, R.R., SINGH, S.M., SRINIVAS, T.N.R., SHIVAJI, S., 2009. Bacterial diversity and bioprospecting for cold-active enzymes from culturable bacteria associated with sediment from a melt water stream of Midtre Lovenbreen glacier, an Arctic glacier. Research in Microbiology, 160:538-546.

ROBYT, J.F., 1998. Essentials of Carbohydrate Chemistry. Springer, New York, 403p.

RODRIGUEZ, V.B., ALAMEDA, E.J., GALLEGOS, J.F.M., REQUENA, A.R., LOPEZ, A.I.G., 2006. Thermal deactivation of a commercial α-amylase from *Bacillus licheniformis* used in detergents. Biochemical Engineering Journal, 27:299–304.

SARIKAYA, E., 1995. α-amilaz Üreten Bazı *Bacillus* Suşlarının Gelişme Parametreleri, Enzim Özellik ve Üretim Koşullarının Optimizasyonu. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi.

SCHALLMEY, M., SINGH, A., WARD, O.P., 2004. Developments in the Use of *Bacillus* Species for Industrial Production. Canadian Journal of Microbiology, 50:1-17.

SCHÄFER,·T., BORCHERT, T.W., NIELSEN, V.S., SKAGERLIND, P., GIBSON, K., WENGER, K., HATZACK, F., NILSSON, L.D., SALMON, S., PEDERSEN, S., HELDT-HANSEN, H.P., POULSEN, P.B., LUND, H., OXENBØLL, K.M., WU, G.F., PEDERSEN, H.H., XU, H., 2007. Industrial Enzymes. Adv. Biochem. Engin/Biotechnol., 105:59–131.

SHAFIEI, M., ZIAEE, A.A., AMOOZEGAR, M.A., 2010. Purification and biochemical characterization of a novel SDS and surfactant stable, raw starch digesting, and halophilic α-amilaz from moderately halophilic bacterium, *Nesterenkonia* sp. Strain F. Process Biochemistry, 45:694-699.

SHIBUYA, I., IIMURA, Y., ISHIKAWA, T., OUCKI, K., MATSUYAMA, A., YAMAMOTO, T., 1986. Isolation and characterization of starch utilizing mutants of *Escherichia coli*. Agric.Biol.Chem., 50:875-882.

SIDHU, G.S., SHARMA, P., CHAKRABARTI, T., GUPTA, J.K., 1997. Strain improvement for the production of a thermostable α-amylase. Enzyme. Microb. Technol., 21:525-530.

SMITH, J.E., 2004. Biotechnology. Cambridge University Press, New York, p.271.

SMITH, M.R., ZHANLEY, C.J., 2005. Production of amylase by *Arthrobacter psychrolactophilus*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 32:277–283.

SOUZA. P.M., MAGALHAES, P.O., 2010. Application of Microbial α-Amylase in Industry-A Review. Brazilian Journal of Microbiology, 41:850-861.

SRIVASTAVA, R.A.K., 1987. Purification and chemical characterization of thermostable amylase produced by *Bacillus stearothermophilus*. Enzyme. Microb. Technol., 9:749-754.

SYED, D.G., AGASAR, D., PANDEY, A., 2009. Production and partial purification of α-amylase from a novel isolate *Streptomyces gulbargensis*. J Ind Microbiol Biotechnol, 36:189-194.

TAKAHA, T., SMITH, S.M., 1999. The functions of 4-α-glucanotransferases and their use for the production of cyclic glucans. Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 16:257–280.

TAKATA, H., KURIKI, T., OKADA, S., TAKESADA, Y., IIZUKA, M., IMANAKA, T., 1992. Action of neopullulanase. Neopullulanase catalyzes both hydrolysis and transglycosylation at alpha-(1,4) and alpha-(1,6) glucosidic linkages. J. Biol. Chem., 267:18447–18452.

TARAKÇIOĞLU, Y., 1979. An amylase producing maltotriose from *Bacillus subtilis*. Agric. Biol. Chem., 49:1091-1097.

TATAR, S., 2007. Termofil Moderately Halofilik *Bacillus* sp. Suşlarından Amilaz Enzimi Üretimi ve Endüstriyel Kullanım Olanaklarının Araştırılması. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi.

TEMİZKAN, G. ve ARDA, N., 2008. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Nobel Tıp Kitabevi, 3.Baskı, İstanbul, s.345.

TUNAİL, N., 2009. Mikrobiyoloji. Pelin Ofset, Ankara, s.448.

TURUS, N., 2011. Alkali Soğukta Aktif Proteaz Üreticisi *Bacillus* Sp. Suşlarının İzolasyonu, Enzim Üretimi, Karakterizasyonu ve Enzimin Biyoteknolojik Kullanım Olanakları. Ç.Ü.F.B.E. Yüksek Lisans Tezi.

UEDA, M., ASANO, T., NAKAZAWA, M., MIYATAKE, K., INOUYE, K., 2008. Purification and characterization of novel raw-starch-digesting and cold-adapted α-amylase from *Eisenia foetida*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, 150:125-130.

WANG, Q.F., MIAO, J.L., HOU, Y.H., DING, Y., WANG, G.D., and LI, G.Y., 2005. Purification and Characterization of an Extracellular Cold-Active Serine Protease from the Psychrophilic Bacterium *Colwellia* sp. NJ341. Biotechnology Letters, Volume 27, Number 16, p.1195-1198.

WIKIPEDIA, "*Bacillus* sp.'nin ışık mikroskobundaki görüntüsü", http://en.wikipedia.org/wiki/File:Bacillus subtilis Gram.jpg, (Erişim tarihi: 27 Temmuz 2011)

WILSON, K., GOULDING, K.H., 1986. A Biologist's Guide to Principles and Techniques of Practical Biochemistry. Edward Arnold, London, p.396.

WIM, J. Q., 2006. Bacterial Enzymes (M. DWORKIN editör). The Prokaryotes: Symbiotic associations, biotechnology, applied microbiology, Third Edition, Springer Science and Business Media Inc., New York, p.777-796.

WISEMAN, A., 1987. Handbook of enzyme biotechnology. The application of enzymes in industry. Second Edition. Chapter 3, p.274-373.

WOLFGANG, A., 2004. Enzymes in industry: Production and applications. WILEY-VCH Verlag GmbH&Co. KgaA, Weinheim.

WOODLEY, J.M., 2000. Advances in Enzyme Technology-UK Contributions. (Th. scheperi editör). Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, s.94-107.

VOGET, S., STEELE, H.L., STREIT, W.R., 2006. Characterization of metagenome-derived halotolerant cellulase. J. Biotechnol., 126:26-36.

ZEMAN, N.W., McCREA, J.M., 1985. Alpha-amylase Production Using a Recombinant DNA Organism. Cereal Foods World, 30:777-780.

ZHANG, B., SUN, Z.W., JIANG, D.D., NIU,T.G., 2009. Isolation and puification of alkaline keratinase from *Bacillus* sp. 50-3. African Journal of Biotechnology, 8(11):2598-2603.

ZHANG, J.W., ZENG, R.Y., 2007a. Psychrotrophic amylolytic bacteria from deep sea sediment of Prydz Bay, Antarctic: diversity and characterization of amylases. World J. Microbial Biotechnol., 23:1551-1557.

ZHANG, J.W., ZENG, R.Y, 2007b. Purification and Characterization of a Cold-Adapted α-Amylase Produced by *Nocardiopsis* sp. 7326 Isolated from Prydz Bay, Antarctic. Marine Biotechnology. Volume 10:75-82.

ZHU, H.Y., TIAN, Y., HOU, Y.H., WANG, T.H., 2009. Purification and characterization of the cold-active alkaline protease from marine cold-adaptive *Penicillium chrysogenum* FS010. Molecular Biology Reports, Volume 36, Number 8, 2169-2174.

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Sinop'ta doğdu. İlköğretim ve lise öğrenimini farklı illerde tamamladıktan sonra 2004 yılında başladığı Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2008 yılında mezun olarak lisans eğitimini tamamladı. 2008 yılında Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı. 2009 yılında Çukurova Üniversitesi'nde Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı.