ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI *BACILLUS* İZOLATLARININ SİKLODEKSTRİN GLUKANOTRANSFERAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Dilek CEYLAN

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2009

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Prof. Dr. Sedat DÖNMEZ danışmanlığında, Dilek CEYLAN tarafından hazırlanan bu çalışma 27/01/2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy çokluğu ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda **"Bazı *Bacillus* İzolatlarının Siklodekstrin Glukanotransferaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu"** konulu **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Sedat DÖNMEZ
Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği, A.B.D

Jüri Üyeleri :

Başkan :

Üye :

Üye :

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Orhan ATAKOL

Enstitü Müdür

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAZI *BACILLUS* İZOLATLARININ SİKLODEKSTRİN GLUKANOTRANSFERAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Dilek CEYLAN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Sedat DÖNMEZ

Bu çalışmada, topraktan izole edilen bir *Bacillus* izolatı ve *Bacillus macerans* ATCC 8244 suşunun siklodekstrin glukanotransferaz (SGTaz) enzim aktiviteleri kıyaslanmıştır. Bakterilerin çoğalmaları ile ilgili çalışmalarda, *Bacillus macerans* ATCC 8244 suşu ve K izolatının logaritmik çoğalmalarını sırası ile inkübasyonun 48. ve 25. saatinde tamamladıkları anlaşılmıştır. Çoğalma sırasında oluşan en yüksek SGTaz aktivitesinin *Bacillus macerans* ATCC 8244 suşunda çoğalmanın 65. saatinde 0.100 U/ml, K izolatında ise 48. saatinde 0.048 U/ml olduğu belirlenmiştir. Enzimlerin optimum sıcaklık ve pH değeri her iki bakteri içinde 60°C ve pH 6 olarak bulunmuştur. 90°C'de 1 saat inkübasyondan sonra *Bacillus macerans* ATCC 8244 enzim aktivitesinin % 36'sını ve K izolatının ise % 53'nü kaybettiği belirlenmiştir. *Bacillus macerans* ATCC 8244 en yüksek SGTaz aktivitesini karbon kaynağı olarak mısır nişastası, azot kaynağı olarak NH_4NO_3 içeren besiyerinde, K izolatı ise karbon kaynağı olarak patates nişastası, azot kaynağı olarak $(NH_4)_2SO_4$ içeren besiyerinde gösterdiği anlaşılmıştır. Üretim besiyerinin santrifüjlenmesiyle elde edilen kaba enzim sıvısına 10 mM Hg^{+2} iyonu ilavesi ile SGTaz aktivitesinin *Bacillus macerans* ATCC 8244 suşu ve K izolatında sırası ile % 90 ve % 94 oranında azaldığı belirlenmiştir. Yapılan enzim saflaştırma çalışmalarında, her iki bakteri örneğinin SGTaz enzimi ortama ilave edilen % 55-80 oranındaki amonyum sülfat ile çöktürülmüş ve daha sonra uygulanan diyaliz işlemi ile *Bacillus macerans* ATCC 8244 SGTaz enzimin % 26.56, K izolatının SGTaz enziminin ise % 28.24 verim ile saflaştırılabildiği belirlenmiştir.

Ocak 2009, 55 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Bacillus*, siklodekstrin glukanotransferaz , enzim aktivitesi

ABSTRACT

Master Thesis

PURIFICATION AND CHARACTERISATION OF CYCLODEXTRIN GLUCANOTRANSFERASE FROM SOME *BACILLUS* ISOLATES

Dilek CEYLAN

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Sedat DÖNMEZ

In this study, cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) activities of *Bacillus macerans* ATCC 8244 and a *Bacillus* isolate (K) isolated from soil were compared. In the studies of proliferation of bacteria, it has been realized that *Bacillus macerans* ATCC 8244 and isolate K have completed their logarithmic growth in 48th and 25th hours of incubation, respectively. The maximum CGTase activities during the growth were established as 0.100 U/ml at 65th hour for *Bacillus macerans* ATCC 8244 and 0.048 U/ml at 48th hour for the isolate K. The optimum temperature and pH values for enzymes have been found as 60°C and pH 6 for both microorganisms. After 1 hour of incubation at 90°C, *Bacillus macerans* ATCC 8244 has lost 36 % of its enzyme activity and isolate K has lost 53 % of its enzyme activity. *Bacillus macerans* ATCC 8244 exhibited maximum CGTase activity in the medium that contains corn starch as the carbon source, NH_4NO_3 as the nitrogen source, while the isolate K exhibited maximum enzyme activity in the medium that contains potato starch and $(NH_4)_2SO_4$. Enzyme activities were decreased 90 % for *Bacillus macerans* ATCC 8244 and 94 % for the isolate K by addition of 10 mM Hg^{+2} ions to the enzyme solution obtained by centrifugation of enzyme production medium. In the studies of purification of enzymes, CGTase from both microorganisms was precipitated by 55-80 % ammonium sulfate and CGTase from *Bacillus macerans* ATCC 8244 was purified with a yield of 26.56 %, CGTase from the isolate K was purified with a yield of 28.24 % by process of dialysis applied after precipitation.

January 2009, 55 pages

Key Words: : *Bacillus,* cyclodextrin glucanotransferase, enzyme activity

TEŞEKKÜR

Tezimin her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyen, yakın ilgi ve desteğini gördüğüm danışman hocam Sayın Prof. Dr. Sedat DÖNMEZ'e (Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi), yardımlarını gördüğüm Sayın Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK'e (Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi), desteklerini gördüğüm doktora öğrencisi Ayşe AVCI'ya, laboratuvarda birlikte çalıştığım tüm arkadaşlarıma ve bugüne kadar attığım her adımda hem maddi hem manevi olarak beni her zaman destekleyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dilek CEYLAN

Ankara, Ocak 2009

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
TEŞEKKÜR ..... **iii**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vi**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **vii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **viii**
1. GİRİŞ **1**
2. KAYNAK ÖZETLERİ **3**
2.1 Siklodekstrin Glukanotransferaz (SGTaz) Enzimi **3**
2.2 Siklodekstrin Glukanotransferaz (SGTaz) Üreten Mikroorganizmalar **4**
2.3 Siklodekstrinler **6**
2.4 Siklodekstrinlerin Endüstriyel Uygulamaları **9**
2.4.1 Kozmetik, kişisel bakım ve temizlik ürünlerinde siklodekstrinlerin kullanımı **11**
2.4.2 Gıda ve aroma maddelerinde siklodekstrinlerin kullanımı **12**
2.4.3 Eczacılıkta siklodekstrinlerin kullanımı **13**
2.4.4 Siklodekstrinlerin diğer kullanım alanları **14**
3. MATERYAL VE YÖNTEM **15**
3.1 Materyal **15**
3.1.1 Kullanılan Mikroorganizmalar **15**
3.2 Yöntem **15**
3.2.1 *Bacillus* suşlarının izolasyonu **15**
3.2.2 Mikroorganizmaların geliştirilmesi ve muhafazası **16**
3.2.3 Bakterilerin enzim sentezini gerçekleştiği pH aralığının ve sıcaklığının belirlenmesi **16**
3.2.4 Enzim üretiminde kullanılan besiyerleri **16**
3.2.5 Mikroorganizma gelişmesinin izlenmesi **17**
3.2.6 Protein tayini **17**
3.2.7 Siklodekstrin glukanotransferaz aktivitesinin belirlenmesi **18**

3.2.8 Farklı karbon kaynaklarının bakteri gelişmesi ve enzim üretimine etkisi.....20
3.2.9 Farklı azot kaynaklarının bakteri gelişmesi ve enzim üretimine etkisi.....20
3.2.10 Bazı mineral tuzların enzim üretimine etkisi.....21
3.2.11 Substrat konsantrasyonun enzim üretimine etkisi.....21
3.2.12 Optimum sıcaklığın ve termal stabilitenin belirlenmesi.....21
3.2.13 Enzimin optimum pH ve pH kararlılığının belirlenmesi.....22
3.2.14 Metal iyonlarının ve inhibitörlerin enzim aktivitesine etkisi.....22
3.2.15 Siklodekstrin glukanotransferaz enzimin saflaştırılması.....22
3.2.15.1 Amonyum sülfat ile çöktürme.....23
3.2.15.2 Diyaliz.....23
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....25
4.1 Siklodekstrin Glukanotransferaz Üreten Bakterilerin İzolasyonu.....25
4.2 Bakterilerin Enzim Sentezini Gerçekleştiği Optimum pH ve Sıcaklığının Belirlenmesi.....26
4.3 Mikroorganizma Gelişmesinin İzlenmesi.....27
4.4 Mikroorganizmaların Enzim Aktiviteleri.....29
4.5 Enzimin Optimum Reaksiyon Sıcaklığı.....32
4.6 Enzimin lsıl Stabilitesi.....33
4.7 Enzimin Optimum pH'sı.....35
4.8 Enzimin pH Stabilitesi.....36
4.9 Farklı Karbon Kaynaklarının Bakteri Gelişmesi ve Enzim Üretimine Etkisi.....37
4.10 Farklı Azot Kaynaklarının Bakteri Gelişmesi ve Enzim Üretimine Etkisi.....40
4.11 Çeşitli Tuzların Enzim Üretimine Etkisi.....41
4.12 Bazı Metal İyonlarının ve İnhibitörlerin Enzim Aktivitesine Etkisi.....43
4.13 Substrat Konsantrasyonun Enzim Üretimine Etkisi.....45
4.14 Siklodekstrin Glukanotransferaz Enzimin Saflaştırılması.....46
5. SONUÇ.....49
KAYNAKLAR.....50
ÖZGEÇMİŞ.....55

SİMGELER DİZİNİ

Å	Angström
C	Karbon
CD	Siklodekstrin
HCI	Hidroklorik Asit
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
kDa	Kilodalton
nm	Nanometre
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SGTaz	Siklodekstrin Glukanotransferaz
U	Ünite
UV	Ultraviyole
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 *Bacillus circulans* 251 SGTaz'ının yapısı 4
Şekil 2.2 β-siklodekstrinin yapısı 6
Şekil 2.3 Siklodekstrinlerin hidrofilik ve hidrofobik yüzeyleri 7
Şekil 2.4 α-, β- ve γ- siklodekstrinlerinin yapısı 8
Şekil 2.5 İnklüzyon kompleks oluşumu 9
Şekil 3.1 Protein standart kurvesi 18
Şekil 3.2 Siklodekstrin standart kurvesi 19
Şekil 4.1 İzole edilen bakterilerin SGTaz aktiviteleri 25
Şekil 4.2 *Bacillus macerans* ATCC 8244 suşunun 37°C'de besiyeri II'deki OD ve pH değişimi 28
Şekil 4.3 K izolatının 37°C'de besiyeri III'deki OD ve pH değişimi 28
Şekil 4.4 *Bacillus macerans* ATCC 8244 suşunun 37°C'de besiyeri II'de inkübasyon sırasındaki OD ve SGTaz aktivite değişimi 30
Şekil 4.5 K izolatının 37°C'de besiyeri III'de inkübasyon sırasındaki OD ve SGTaz aktivite değişimi 31
Şekil 4.6 SGTaz enziminin farklı sıcaklıklardaki oransal aktiviteleri 32
Şekil 4.7 SGTaz enziminin farklı sıcaklıklardaki stabilitesi 34
Şekil 4.8 Bakterilerin farklı pH değerlerindeki oransal aktiviteleri 35
Şekil 4.9 SGTaz'ın pH 4-11 arasındaki aktivite değişimi 37
Şekil 4.10 Bakterilerin farklı konsantrasyonda substrat içeren besiyerlerindeki SGTaz aktiviteleri 45

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Bazı bakteri SGTaz'larının özellikleri 5
Çizelge 2.2 Değişik siklodekstrinlerin özellikleri 8
Çizelge 2.3 Siklodekstrinin kullanım alanları 10
Çizelge 4.1 Bakterilerin farklı sıcaklıklarda besiyeri I'deki SGTaz aktiviteleri 26
Çizelge 4.2 Bakterilerin farklı pH'da besiyeri I'deki SGTaz aktiviteleri 27
Çizelge 4.3 Bakterilerin farklı karbon kaynağı içeren besiyerlerindeki SGTaz aktiviteleri ve optik yoğunlukları 38
Çizelge 4.4 Bakterilerin farklı azot kaynağı içeren besiyerlerindeki SGTaz aktiviteleri ve optik yoğunlukları 40
Çizelge 4.5 Bakterilerin farklı mineral madde içeren besiyerlerindeki SGTaz aktiviteleri 42
Çizelge 4.6 Bakterilerin bazı metal iyonları ve inhibitör madde varlığındaki enzim aktiviteleri 43
Çizelge 4.7 *Bacillus macerans* ATCC 8244 suşunun saflaştırılması aşamalarında elde edilen sonuçlar 47
Çizelge 4.8 K izolatının saflaştırılması aşamalarında elde edilen sonuçlar 47

1. GİRİŞ

Enzimler; yaşayan canlılar tarafından salgılanan protein ve molekül olarak sınıflandırılan katalitik kimyasal yapılardır. Hücre içerisinde meydana gelen binlerce tepkimenin hızını ve özgüllüğünü düzenlerler (Karademir vd. 2002).

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler, günümüzde genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bunun nedeni, mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel ve hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları ve fazla miktarda elde edilebilmeleridir (Wiseman 1987).

Enzim teknolojisi; son yüzyılda ekonomik, etkili ve biyoteknolojik tekniklere olan büyük ihtiyaç nedeni ile önemli bir ilerleme kaydetmiştir. Günümüde, biyoteknoloji sayesinde, yeni tür enzimlerin büyük ölçeklerde ve ekonomik olarak üretilmesi sağlanmıştır. Buna göre, bir enzimin herhangi bir endüstri alanında kullanılabilirliği; maliyet bakımından ucuz olmasını, çok farklı alanlarda kullanılabilme özelliğinde olmasını ve en önemlisi de enzimin alerjik ya da toksik etkiye sahip olmamasını gerektirmektedir (Wiseman 1987).

Siklodekstrin glukanotransferazlar (SGTaz), nişastayı ve diğer 1,4 bağlı α-glukanları parçalayarak indirgen olmayan siklodekstrinleri oluşturan bakteriyel enzimlerdir. SGTaz'lar; siklizasyon (cyclization), birleştirme (coupling) ve disproporsiyonasyon (disproportionation) reaksiyonlarını da katalizleyerek endüstriyel öneme sahip siklodekstrinleri oluştururlar (Tonkova 1998). Siklodekstrinler α-1,4 glikozidit bağlı, glikoz ünitelerinden oluşan siklik maltooligosakkaritlerdir ve 3 tip siklodekstrin bulunmaktadır: α-siklodekstrin, β-siklodekstrin, γ-siklodekstrin. α-, β- ve γ- siklodekstrinleri α-(1,4) bağlı sırasıyla 6, 7 ve 8 glikoz ünitelerinden oluşmuştur, β-siklodekstrin en çok ve en ucuz bulunan, en çok kullanılan siklodekstrindir (Del Valle 2004).

Siklodekstrinler, konuk molekülleri sararak inklüzyon kompleksi (inclusion-complex) oluştururlar. İnklüzyon kompleksleri, konuk molekülleri konakçı kavitesinde hapsederek ya da kilitleyerek konuk moleküllerin fizikokimyasal özelliklerinde önemli değişiklere neden olurlar. Bu özellikler; çözünürlüğün artması, oksidasyon, ısı, ışık ve UV ışık gibi yıkıcı etkilerine karşı konukların stabilizasyonu, süblimasyonun ve uçuculuğun kontrolü, istenmeyen koku ve tatların maskelenerek modifikasyonu, istenmeyen bileşiklerin fiziksel olarak ayrılmasıdır. Bu nedenle siklodekstrinler; gıda, eczacılık, kozmetik, çevre, paketleme, biodönüşüm ve tekstil endüstrisinde kullanılmaktadır (Del Valle 2004).

1986 yılının sonuna kadar, siklodekstrin ve uygulamaları ile ilgili 750 patent yayınlanmıştır. Siklodekstrin üretiminin, 1989 yılında 890 ton, 1995 yılında 5600 ton olduğu bildirilmiştir. Siklodekstrinlerin çeşitli uygulamalarda kullanılmasının artması tüketiminde çarpıcı bir artış göstermektedir. Son 10 yılda Almanya, Macaristan, Japonya, Fransa ve ABD'de siklodekstrin üretimi için tesisler kurulmuştur (Wan 2005).

Endüstriyel öneme sahip siklodekstrinlerin birçok kullanım alanı bulunmakla beraber, kullanımlarını yaygın hale getirmek teknolojik proses koşullarına dayanıklı, verimliliği yüksek ve maliyeti düşük kaynakların belirlenmesiyle mümkün olabilecektir.

Bu çalışma, doğal kaynaklardan izole edilen *Bacillus*'lardan, SGTaz enzimi elde etmek ve enzimin bazı özelliklerini belirlemek amacı ile gerçekleştirilmiştir.

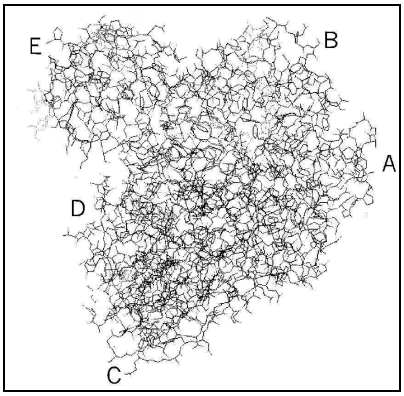
2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Siklodekstrin Glukanotransferaz (SGTaz) Enzimi

Siklodekstrin glukanotransferaz (1,4-α-*D*-glukan: 1,4-α-*D*-glukopiranoziltransferaz, EC 2.4.1.19) nişastayı ve diğer 1,4 bağlı α–glukanları parçalayarak indirgen olmayan siklodekstrinleri oluşturan bakteriyel enzimlerdir (Tonkova 1998, Higuti *et al.* 2004, Sian *et al.* 2005).

Bakteriyel SGTaz'ların çok fonksiyonlu enzimler olduğu, siklizasyon (cyclization), birleştirme (coupling) ve disproporsiyonasyon (disproportionation) reaksiyonlarını katalizleyerek endüstriyel öneme sahip siklodekstrinleri oluşturdukları açıklanmıştır (Tonkova 1998).

SGTaz, glikozil- hidrolazların α-amilaz ailesine (13. aile) bağlı enzimler olduğu, bu ailede yer alan enzimlerin, $(\beta/\alpha)_8$'den oluşan A katalitik bölgesini içerdikleri ve α-bağlama mekanizmasını kullandıkları belirlenmiştir. α-amilaz tipik nişasta hidrolizini katalizlerken, SGTaz'ın üç önemli transglikozilasyon (transglycosylation) reaksiyonunda (siklizasyon, birleştirme, disproporsiyonasyon) görev aldığı ve bunun yanı sıra düşük oranda hidrolitik aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Hem SGTaz'da hem de α-amilazlarda A, B, C olarak bilinen 3 yapısal bölge bulunduğu, SGTaz'ın α-amilazdan farklı olarak D ve E bölgelerini içerdiği anlaşılmıştır. A ve B bölgelerinin katalitik merkezi (aktif bölge) oluşturduğu, C ve E bölgelerinin ise substratı bağladığı, D bölgesinin ise henüz fonksiyonun tam olarak bilinmediği açıklanmıştır (Jemli *et al*. 2008). Şekil 2.1'de *Bacillus circulans* 251 suşu tarafından üretilen SGTaz'ın yapısı A, B, C, D ve E bölgeleri ile birlikte görülmektedir.



Şekil 2.1 *Bacillus circulans* 251 SGTaz'ının yapısı (Qi and Zimmermann 2005)

2.2 Siklodekstrin Glukanotransferaz (SGTaz) Üreten Mikroorganizmalar

Günümüzde SGTaz enzimi daha çok, bakterilerden elde edilmekte ve çoğunlukla hücre dışı enzimi olarak üretilmektedir. SGTaz'ların özelliklerinin bakteriden bakteriye farklılık gösterdiği, enzimin ilk olarak, *Bacillus macerans*'tan üretildiği ve *B. megaterium, B. circulans, B. Stearothermophilus, B. ohbensis, B. Licheniformis, B. cereus, B. firmus, Klebsiella pneumoniae, K. oxytoca, Micrococcus lutens, M. varians, Clostridium* spp., *Thermoanaerobacter* spp., *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes, Anaerobranca gottschalkii* suşlarının SGTaz üreticisi olduğu saptanmıştır (Illias *et al.* 2002, Biwer *et al.* 2002). SGTaz'ların bazı özellikleri Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Bakteriyel SGTaz'ların molekül ağırlıklarının ortalama 75 kDa oldukları, *Bacillus* SGTaz'larının yaklaşık olarak 680 aminoasit residüsü içerdiği, molekül ağırlıklarının 74 kDa olduğu, optimum pH'larının 4.5-7.0, sıcaklıklarının ise 50-85°C arasında olduğu belirlenmiştir (Alcalde *et al.* 2001).

Termostabil SGTaz'ların bazı *Thermoanaerobacter* türlerinden, *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* ve *Anaerobranca gottschalkii* suşlarından üretildiği, *Anaerobranca gottschalkii* SGT'azının geniş bir pH aralığında (4.0-10.5) ve 65°C sıcaklıkta aktif olduğu

saptanmıştır. Nişasta substrat olarak kullanıldığında bu enzimin, α-siklodekstrin ve uzun süre inkübasyondan sonra β ve γ-siklodekstrin oluşturduğu, optimum olarak 100°C'de aktivite gösteren bir SGTaz'ın, yeni izole edilmiş olan *Thermococcus* sp.'den elde edildiği bildirilmiştir (Bertoldo and Antranikian 2002).

Yapılan bir araştırmada, *Bacillus macerans* tarafından üretilen SGTaz enzimi saflaştırılmış ve hücre içi SGTaz'ının moleküler ağırlığı 139.000, hücre dışı SGTaz'ının ise 145.000 olarak belirlenmiştir. Ayrıca enzimin pH 8-10 aralığında stabil olduğu ve 60°C altındaki sıcaklıklarda aktivitesini % 100 koruduğu bildirilmiştir (Tonkova 1998).

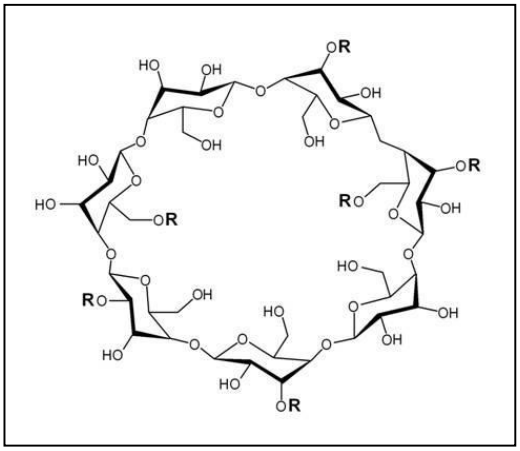
Çizelge 2.1 Bazı bakteri SGTaz'larının özellikleri (Tonkova 1998)

Üretici Mikroorganizma	Optimum pH	Optimum sıcaklık	Oluşan Siklodekstrin
Bacillus macerans ATCC 8514	6.1- 6.2	60	-
Bacillus macerans IFO 3490	5.0-5.7	55	α-CD
Bacillus macerans IAM 1243	-	-	α -CD
Bacillus megaterium No 5	5.0-5.7	55	β-CD
Bacillus circulans var. alkalophilic ATCC 21783	4.5-4.7	45	β-CD
Bacillus sp. AL-6	7.0-10.0	60	γ-CD
Bacillus cereus NCIMB 13123	5.0	40	α-CD
Bacillus sp. INMIA T6 (Termofilik suş)	-	55	α-CD
Bacillus sp. INMIA T42 (Termofilik suş)	39574	55	β-CD
Bacillus sp. INMIA A7/1	6.0	50	β-CD
Bacillus sp. INMIA 1919	4.0	50	α-CD
Bacillus halophilus INMIA 3849	7.0	60-62	β-CD
Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes	4.5-7.0	80-85	β -CD
Bacillus ohbensis sp. nov.C-1400	5.0	55	β -CD

Son 20 yılda, birçok araştırmacının dikkati bakteriyel SGTaz'ların saflaştırılması ve karakterizasyonuna yönelmiş ve bu ilginin en büyük nedeninin siklodekstrinlerin endüstride giderek önem kazanması olduğu bildirilmiştir (Tonkova 1998).

2.3 Siklodekstrinler

Siklodekstrinler; Şekil 2.2'de görüldüğü gibi, altı (α-siklodekstrin), yedi (β-siklodekstrin), sekiz (γ-siklodekstrin) yada daha fazla glikopiranoz ünitelerinden oluşan α-(1,4) bağlı oligosakkaritlerdir. Siklodekstrinler; sikloamilozlar, siklomaltozlar ve Schardinger dekstrinleri olarak da bilinirler (Del Valle, 2004). Bu bileşiklerin, SGTaz enzimi tarafından nişastanın molekül içi transglikozilasyon reaksiyonu ile oluştuğu belirlenmiştir (Stella 1997).

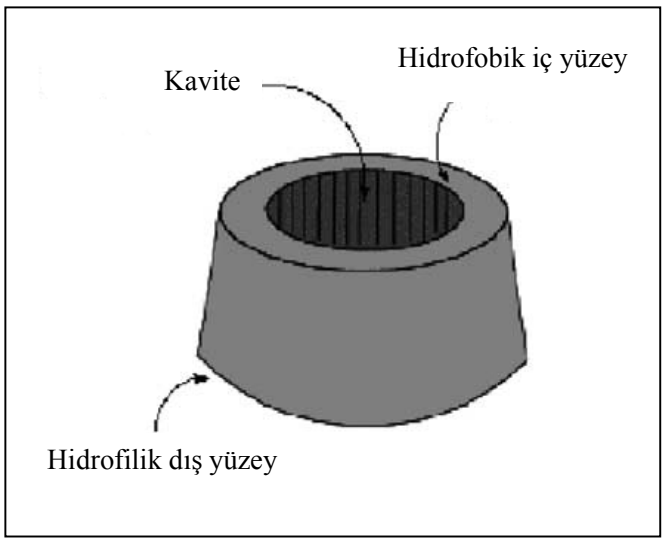


Şekil 2.2 β-siklodekstrinin yapısı (Del Valle 2004)

Siklodekstrinler ilk olarak 1981 yılında, Viller tarafından yapılan çalışmada, *Bacillus amylobacter*'in nişastayı parçalaması sonucu saptanmış ve o yıllarda selülozin olarak adlandırılmıştır (Del Valle 2004).

X ışınları ile yapılan çalışmalarda; siklodekstrinlerin yapılarındaki, sekonder hidroksil gruplarının (C_2 ve C_3), halkanın geniş olan kenarında, primer hidroksil gruplarının ise (C_6) diğer tarafta, apolar C_3 ve C_5 hidrojenleri ve oksijen köprülerinin ise molekülün iç kısmında olduğu belirlenmiştir. Bu yerleşimin bir sonucu olarak suda çözünebilen

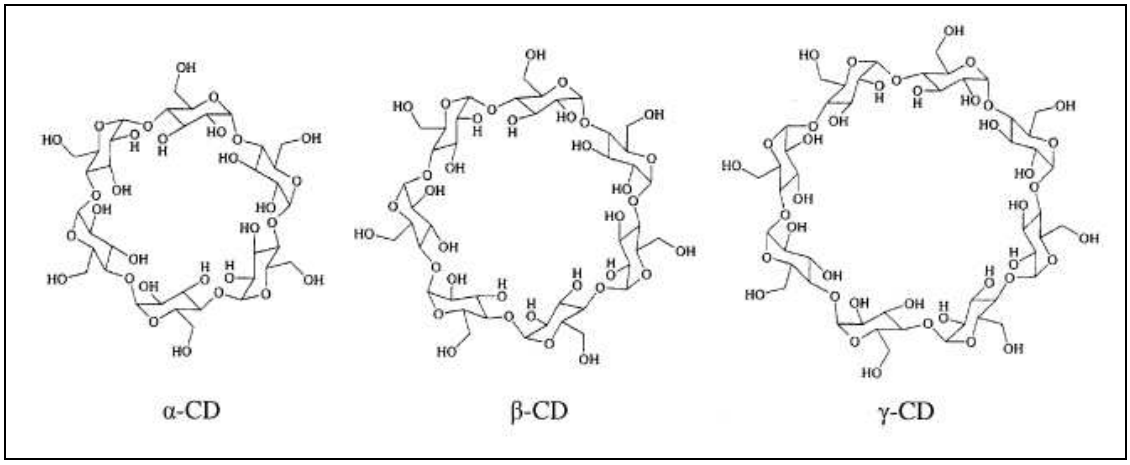
hidrofilik dış kısmın ve hidrofobik apolar iç boşluğun (kavite) (Şekil 2.3) oluşturduğu molekül mikroheterojen çevre olarak tanımlanmıştır (Del Valle 2004).



Şekil 2.3 Siklodekstrinlerin hidrofilik ve hidrofobik yüzeyleri (Del Valle 2004)

Kavitenin, apolar özelliği nedeni ile siklodekstrinlerin birçok hidrofobik konuk bileşikle inklüzyon kompleksleri denilen yapıları meydana oluşturdukları (Del Valle 2004).

Daha önce de belirtildiği gibi, α-siklodekstrin, β-siklodekstrin, γ-siklodekstrin olmak üzere 3 tip siklodekstrin bulunduğu ve bunların sırası ile 6, 7 ve 8 glikoz ünitelerinden oluştuğu (Şekil 2.4) bildirilmiştir (Del Valle 2004). Siklodekstrinlerin bazı özellikleri Çizelge 2.2'de verilmiştir.

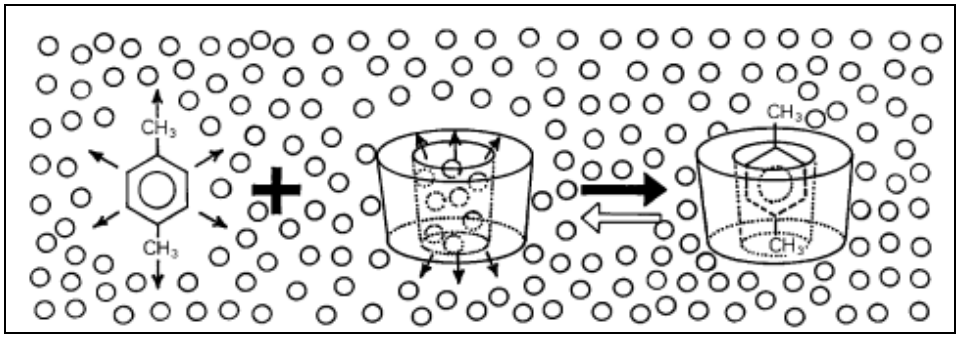


Şekil 2.4 α-, β- ve γ- siklodekstrinlerinin yapısı (Biwer *et al.* 2002)

Çizelge 2.2 Değişik siklodekstrinlerin özellikleri (Del Valle 2004)

Özellik	α-siklodekstrin	β-siklodekstrin	γ-siklodekstrin
Glikoz sayısı	6	7	8
Molekül ağırlığı (g/mol)	972	1135	1297
25°C'de suda çözünürlük	14.5	1.85	23.2
Dış çap (Å)	14.6	15.4	17.5
Kavite çapı (Å)	4.7-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3
Yükseklik (Å)	7.9	7.9	7.9
Kavite hacmi ($Å^3$)	174	262	427

Siklodekstrinlerin, birçok katı, gaz ve sıvı bileşik ile inklüzyon kompleksi (konakçı-konuk) oluşturduğu ve bu inklüzyon komplekste; konuk molekülün konakçı siklodekstrin molekülünün iç kavitesinde (Şekil 2.5) tutulduğu belirlenmiştir. Kompleks oluşumunda konakçı kavitesi ile konuk molekülü boyutsal olarak birbiri ile uyumlu olması gerektiği, siklodekstrin molekülündeki lipofilik kavitenin, boyutsal olarak uyumlu apolar kısımların geçişini sağlayarak inklüzyon kompleksi oluşumu için mikroçevre sağladığı açıklanmıştır (Singh *et al*. 2002).



Şekil 2.5 İnklüzyon kompleks oluşumu (Szejtli 2004)

İnklüzyon komplekslerinde, konuk moleküllerinin konakçı kavitesinde hapsedildiği ya da kilitlenerek konuk moleküllerin fizikokimyasal özelliklerinde önemli değişiklere neden olduğu anlaşılmıştır. Değişen fizikokimyasal özelliklerin ise; çözünürlüğün artması, oksidasyon, ısı, ışık ve UV vb. yıkıcı etkilerine karşı stabilizasyon, süblimasyon ve uçuculuğun kontrolü, istenmeyen koku ve tatların maskelenerek modifikasyonu, istenmeyen bileşiklerin fiziksel olarak ayrılması olduğu saptanmıştır. Bu nedenle siklodekstrinlerin; gıda, eczacılık, kozmetik, çevre, paketleme, biodönüşüm ve tekstil endüstrisinde kullanıldığı belirtilmiştir (Del Valle 2004).

2.4 Siklodekstrinlerin Endüstriyel Uygulamaları

Siklodekstrinler, konuk molekülleri enkapsüle ederek inklüzyon kompleksi oluştururlar ve bu yolla konuk moleküllerin kimyasal ve fiziksel özelliklerini değiştirirler. Bu özellikleri nedeni ile eczacılık, tarım, kosmetik, kimya ve gıda alanlarında (Çizelge 2.3) kullanılırlar (Sian *et al.* 2005). Siklodekstrinlerin bileşikler ile oluşturduğu inklüzyon komplekslerinin sağladığı avantajlar aşağıda verilmiştir (Del Valle 2004):

- Işık veya oksijene duyarlı maddeleri stabilize ederler,
- Konuk moleküllerin kimyasal özelliklerini modifiye ederler,
- Uçucu bileşikleri ile inklüzyon bileşiği oluşturarak uçuculuğu azaltırlar,

- Suda çözünmeyen bileşiklerin çözünürlüğünün arttırırlar,
- Sıvı bileşikleri modifiye ederek toz haline getirilmesini sağlarlar,
- Bazı bileşiklerin mikroorganizmalar tarafından bozulmasının engellerler,
- Kötü koku ve tatların, pigment ve renk maddelerinin maskelenmesini sağlarlar.

Çizelge 2.3 Siklodekstrinin kullanım alanları (Singh *et al*. 2002)

Uygulama alanı	Kullanım	Siklodekstrinin rolü
Eczacılık (Tıp)	Anti-kanser	Çözünürlüğün arttırılması
Eczacılık (Tıp)	Optik	Berrak çözelti
Eczacılık (Tıp)	Oral ilaç	Kötü tat ve koku maskeleme
Doğal ilaçlar	Bileşiminin standardize edilmesi	Etkinin arttırılması
Yapıştırıcı	Katalizör	Sıkı ve hızlı bağ oluşumu
Gıda	Tat bileşeni	Maliyetin düşürülmesi
Yapıştırıcı	Viskozitenin ayarlanması	Akış özelliğinin iyileştirilmesi
Gıda	Emülsifiyer	Raf ömrünü arttırmak
Gıda	Bakterisid	Raf ömrünü arttırmak
Gıda	Lezzet verici	Kullanımın arttırılması
Diş	Diş temizliği	Fırçalama etkinliğinin arttırılması
Diş	Diş temizliği	Anti-plak etki
Deterjan	Parfüm kokusu	Uzun süre kalıcı etki
Deterjan	Kötü kokunun uzaklaştırılması	Daha önce mümkün değildi
Tanı testi	Reaktifin etkinliğinin arttırılması	Daha doğru sonuç

2.4.1 Kozmetik, kişisel bakım ve temizlik ürünlerinde siklodekstrinlerin kullanımı

Siklodekstrinler; kozmetik ürünlerinin hazırlanmasında da kullanılmaktadır. İnklüzyon kompleksleri bileşiminde tutulan hoş kokuların kontrollü salınmasını sağlayarak özellikle parfüm, oda spreyleri ve deterjanlarda kullanıldığı bildirilmiştir (Singh *et al.* 2002).

Bu sektörde kullanılan siklodekstrinlerin sağladığı yararlar; stabilizasyon, koku kontrolü, sıvı bileşenlerin katı forma dönüştürülmesi vb. özelliklerdir. Siklodekstrinlerin en çok diş macunu, cilt kremleri, sıvı ve katı kumaş yumuşatıcıları, kağıt havlular, kağıt mendiller ve koltukaltı koruyucularında kullanıldığı bildirilmiştir (Del Valle 2004).

Talk pudrası gibi bazı bakım ürünlerinde, siklodekstrin ile kompleks oluşturan koku bileşiklerinin buharlaşma ile kaybının önlendiği ve uzun süre depolamada oksidasyona karşı stabil kaldığı açıklanmıştır (Hedges 1998).

Siklodekstrinin konuk molekül ile etkileşimi sonucu oluşan yüksek enerjili bariyer, koku bileşiğin uçuculuğunu azaltır ve böylece kokunun kalıcı olması sağlanır (Prasad *et al.* 1999).

Parçacık çapı 12 mm'den küçük, kuru toz siklodekstrin preperatlarının; çocuk bezi, kadın pedi, kağıt havlu vb. ürünlerde koku kontrolü için kullanıldığı, ayrıca bunların, kötü kokulu merkaptanların uçuculuğunu azaltarak saç bakım ürünlerinde yer aldıkları bildirilmiştir (Woo *et al.* 1999).

Diş macunlarında kullanılan silika bazlı siklodekstrinlerin antimikrobiyel bir madde olan triklosanın kullanılabilirliğini 3 kat arttırdığı açıklanmıştır. Siklodekstrinlerin güneş kremlerinin hazırlanmasında 1:1 oranında (güneş koruyucu/ hidroksipropil β-siklodekstrin) kullanılarak cilt ile UV filtresi arasındaki etkileşimi ve formülasyondaki yan etkileri azalttığı bildirilmiştir (Del Valle 2004).

2.4.2 Gıda ve aroma maddelerinde siklodekstrinlerin kullanımı

Siklodekstrinler gıda formülasyonlarında, aroma bileşiklerinin korunması ve taşınmasında kullanılmaktadırlar. Doğal ve yapay aroma maddelerinin siklodekstrinlerle kompleks oluşturması, aroma bileşiklerinin korunmasında uygulanan geleneksel kapsülleme yöntemine iyi bir alternatif olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca siklodekstrinlerin pasta ve et ürünlerinin tekstürünü geliştirdiği belirtilmiş, gıdalardaki acılığı, kötü koku ve tadı azaltması, uzun süreli depolamalarda aromaların stabilizasyonunu sağladığı bildirilmiştir (Hedges 1998).

Siklodekstrinlerin; donmuş gıdalarda aroma maddelerini kapsülleyerek koruduğu, moleküller bir kapsül olan β-siklodekstrinin, diğer mikro kapsüllere oranla, aroma bileşiklerinin miktarını daha uzun süre muhafaza ettiği bildirilmiştir. Japonya'da 20 yılı aşkın süredir, taze gıdaların kokularının maskelenmesi ve balık yağlarının stabilizasyonu gibi uygulamalarda siklodekstrinler modifiye nişasta olarak kabul edilmiş ve kullanılması sağlanmıştır. Macaristan ve bazı Avrupa ülkelerinde, düşük toksik etkisi nedeniyle γ-siklodekstrinlerin belli uygulamalarda kullanımına izin verildiği açıklanmıştır (Del Valle 2004).

Siklodekstrinlerin aspartam gibi tatlandırıcılarla oluşturduğu komplekslerin tatlılığı arttırdığı ve stabilize ettiği, ayrıca steviosid ve rubusoid gibi doğal tatlandırıcılarda da acılığın giderilmesinde kullanıldığı bilinmektedir. Viski ve bira gibi alkollü içeceklerde siklodekstrinlerin tat zenginleştiricisi olarak kullanımının düşünüldüğü açıklanmıştır (Del Valle 2004).

Turunçgil meyve sularında, limonid (limonin) ve bazı flavonoidlerden (narjinin) kaynaklanan acılığın, önemli bir problem olduğu ve bu bileşiklerin çapraz bağlı siklodekstrin polimerler ile giderilebileceği bildirilmiştir (Del Valle 2004).

Siklodekstrinlerin proses yardımcısı olarak en yaygın kullanım alanlarından biri; süt, tereyağı ve yumurta gibi hayvansal ürünlerden kolestrolün uzaklaştırılmasıdır. Kolestrolün, siklodekstrin ile muamele edilen üründen % 80 oranında ayrılabildiği, mayonez, krema, margarin gibi emülsiyonların α-siklodekstrin ile stabilize edildiği ve β-siklodekstrin ile kolestrolün uzaklaştırılarak düşük kolestrollü süt ürünlerinin elde edildiği bildirilmiştir. Ayrıca, siklodekstrinlerin kullanılarak yağlarda bulunan serbest yağ asitlerinin ayrılabildiği ve böylece yağın kızartma kapasitesinin arttırıldığı belirlenmiştir (Singh *et al.* 2002).

Meyve ve sebze sularında bulunan polifenoloksidaz enzimi, renksiz fenolik bileşikleri renkli bileşiklere dönüştürerek enzimatik kararmaya neden olmaktadır. Siklodekstrinlerin polifenoloksidaz enzimini ya da fenolik bileşikleri ortamdan ayırarak kararmaya engel oldukları belirlenmiştir (Sojo *et al.* 1999).

Siklodekstrinin gıdadaki bir diğer uygulama alanı ise paketleme materyali olarak kullanılmasıdır. Örneğin, plastik film materyallerinde siklodekstrinler kullanılarak, gıdadaki aroma kaybını önlediği, ayrıca antimikrobiyel ajanlarla kompleks oluşturmuş siklodekstrinlerin depolama süresince mikrobiyel bozulmaya engel olduğu açıklanmıştır (Szente and Szejtli 2004).

2.4.3 Eczacılıkta siklodekstrinlerin kullanımı

Siklodekstrinlerin bir diğer kullanım alanı eczacılık ve ilaç endüstrisidir. İlaç aktif maddelerinin bir çoğu suda yeterince çözünmedikleri için organik çözücüler ya da surfaktanlar ile muamele edilirler. Bu geleneksel yöntemlerin bazı dezavantajları vardır, fakat siklodekstinlerin kullanımı ile bu dezavantajların ortadan kaldırıldığı, aktif bileşiklerin stabilizasyonunun sağlandığı ve ilaç moleküllerinin uçuculuğu azaltılarak ilaçların kötü tadı ve kokusunun maskelendiği açıklanmıştır (Del Valle 2004).

Siklodekstrinlerin suda az çözünen bazı maddelerin çözünürlüğünü arttırabildiği, böylece çözünürlüğü artan ilacın dozunun azaltılarak farmakolojik etkisinin artmasına yardımcı

olduğu, uçucu bileşilerin tutulmasını kolaylaştırdığı ve bu özellikten yararlanılarak siklodekstinlerin ilaçların tablet formunun oluşturulmasında kullanıldığı açıklanmıştır (Singh *et al.* 2002).

2.4.4 Siklodekstrinlerin diğer kullanım alanları

Siklodekstrinler; herbisitler, insektisitler, fungusitler, böcek kovucular, feremonlar ve hormonlar gibi birçok tarımsal ilaç ile kompleks oluşturabilmektedir. Siklodekstinlerin tohumlarda nişastayı parçalayan enzimleri inhibe edirek tohumların çimlenmesini geciktirdiği bildirilmiştir (Del Valle 2004).

Kimya endüstrisinde siklodekstrinler; atık suda bulunan toksik maddelerin uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır (Szetjli 1989).

Son yıllarda siklodekstrinler tekstil endüstrisinde de kullanılmaya başlanmıştır. Örneğin; kumaşlara tutuklanan siklodekstrinlerin, ter ve sigara gibi istenmeyen kokuları maskelediği, ayrıca kumaş boyamada kullanılarak boyanın kumaş tarafından alımını arttırdığı ve atık sudaki boya miktarını da azalttığı açıklanmıştır (Singh *et al.* 2002).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Kullanılan Mikroorganizmalar

Bu çalışmada çeşitli toprak ve patates örneklerinden, *Bacillus* cinsine ait 30 bakteri izole edilerek bunların SGTaz aktiviteleri araştırılmıştır. SGTaz aktivitesi en yüksek olan ve K olarak kodlanan *Bacillus* cinsine ait bakteri izolatı çalışmada kullanılmıştır. Ayrıca, SGTaz üretiminde kullanılan *Bacillus macerans* ATCC 8244 suşu ile de çalışılmış ve elde edilen sonuçlar kıyaslanmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 *Bacillus* suşlarının izolasyonu

Çeşitli bölgelerden alınan toprak ve patates örnekleri, 1 g tartılarak 10 ml destile su ile süspansiyon haline getirilmiş ve bu süspansiyon 60°C'de 30 dakika inkübe edilerek sporsuz bakterilerin ölmesi sağlanmıştır (Lennete *et al.* 1985). Daha sonra, süspansiyon çeşitli oranlarda seyreltilerek nutrient-agar besiyerine ekim yapılmış ve 30°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon süresi sonunda besiyeri üzerinde gelişen farklı morfolojik özellikteki 40 adet koloni seçilmiş ve Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'ye (Sneath *et al.* 1986) göre tanımlanmıştır. İzolatların gram reaksiyonu, mikroskobik görüntüsü, spor oluşturup oluşturmadığı saptanmış ve katalaz testi uygulanarak elde edilen sonuçlara göre izolatlar tanımlanmıştır.

3.2.2 Mikroorganizmaların geliştirilmesi ve muhafazası

Bileşiminde; % 1 çözünür nişasta, % 0.5 pepton, % 0.4 maya özütü; % 0.1 K_2HPO_4; % 0.02 $MgSO_4.7H_20$ ve % 0.06 Na_2CO_3 içeren besiyeri (besiyeri I) (Arya and Srivastava 2006), mikroorganizmaları çoğaltmak için kullanılmıştır. Besiyeri tüplere 10 ml olacak şekilde dağıtılıp 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Uygulamada, Na_2CO_3 ayrı olarak sterilize edilmiş ve besiyerine pH değeri 8 olacak şekilde sonradan ilave edilmiştir. Daha sonra, kültürler 10 ml besiyeri içeren tüplere % 10 oranında inoküle edilerek 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Sıvı besiyerinde geliştirilen kültürler her üç günde bir taze besiyerine aktarılarak çalışma süresi boyunca aktif halde 4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.3 Bakterilerin enzim sentezini gerçekleştiği pH aralığının ve sıcaklığının belirlenmesi

Bakterilerin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık değerinin belirlenmesi için, K izolatı ve *Bacillus macerans* ATCC 8244 suşu 35, 36, 37, 38 ve 39^oC'lerde besiyeri I'de sırasıyla 48 ve 65 saat geliştirilmiş ve enzim aktivitelerine bakılmıştır.

Enzim sentezinin gerçekleştiği pH aralığının belirlenmesi için, K izolatı ve *Bacillus macerans* ATCC 8244 suşu, başlangıç pH'ları 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 ve 9.0 olan besiyeri I'de sırasıyla 48 ve 65 saat geliştirilerek enzim aktiviteleri ölçülmüştür.

3.2.4 Enzim üretiminde kullanılan besiyerleri

Optimizasyon çalışmaları sonucu bileşimi verilen besiyeri I, hem K suşu hem *Bacillus macerans* ATCC 8244 suşu için ayrı ayrı modifiye edilmiştir. *Bacillus macerans* ATCC 8244 suşu için; % 2.5 çözünür mısır nişastası, % 0.4 maya özütü, % 0.5 NH_4NO_3, % 0.1 K_2HPO_4, % 0.02 $MgSO_4.7H_2O$, % 0.06 Na_2CO_3 (besiyeri II) ve izole edilen K izolatı için % 1.5 çözünür patates nişastası, % 0.4 maya özütü, % 0.5 $(NH_4)_2SO_4$, % 0.1 K_2HPO_4, % 0.02 $MgSO_4.7H_2O$, % 0.06 Na_2CO_3 (besiyeri III) kullanılmıştır. Besiyerleri 121°C' de

15 dakika sterilize edilmiş, ayrı olarak sterilize edilen Na_2CO_3 besiyerine pH 8 olacak şekilde sonradan ilave edilmiştir.

3.2.5 Mikroorganizma gelişmesinin izlenmesi

Mikroorganizmaların gelişmeleri, pH değerlerinin ve 600 nm dalga boyundaki ışık ile optik yoğunluk (OD) değerlerinin ölçülmesi ile izlenmiştir. Bu amaçla, *Bacillus macerans* ATCC 8244 ve K izolatı 10 ml'lik uygun geliştirme besiyerlerinde 37°C'de sırasıyla 48 ve 24 saat inkübe edilip daha sonra taze kültürlerden 100 ml'lik serum şişelerindeki 50'şer ml'lik geliştirme besiyerlerine % 10 (v/v) oranında aktarılıp, 37°C'de inkübe edilmiştir. *Bacillus macerans* ATCC 8244 suşu besiyeri II de K izolatı ise, III nolu besiyerinde geliştirilmiştir. İnkübasyon süresince serum şişesindeki kültürlerden belirli zaman aralıklarında örnekler alınmış ve bu örneklerin 600 nm dalga boyu ışıktaki OD değerleri spektrofotometrede (Shimadzu UV-1208) taze besiyerine karşı ölçülmüştür. Örneklerin pH değerleri ise pH metre (GP-353 ATC) ile belirlenmiştir. Ölçümlerden elde edilen pH ve OD_{600} değerlerinin zamana karşı grafiği çizilerek mikroorganizmaların gelişme eğrileri oluşturulmuştur.

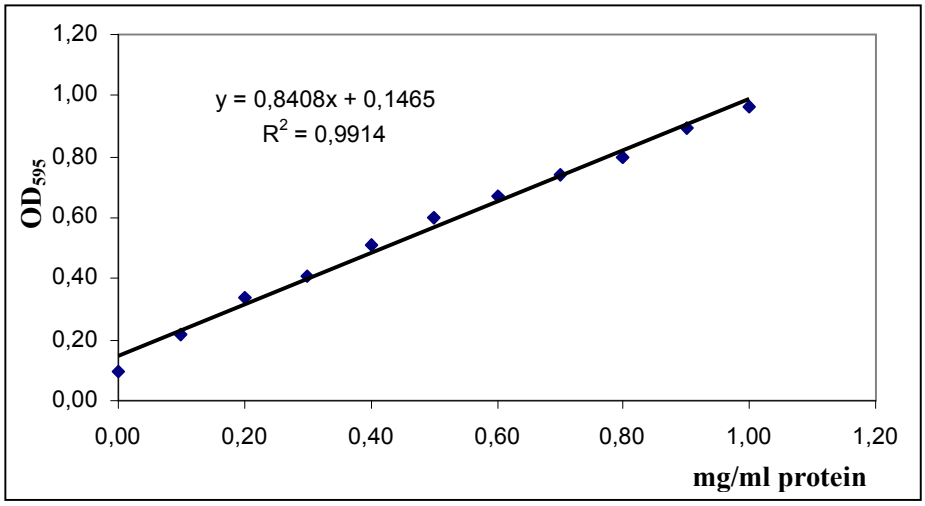
3.2.6 Protein tayini

Gelişen bakteri kültürünün toplam protein miktarı Lowry'ye göre (Lowry *et al.* 1951) saptanmıştır. Kullanılan çözeltiler:

- Lowry A: % 2 Na_2CO_3 ve 0.1 M NaOH
- Lowry B: % 1 $CuSO_4$
- Lowry C: % 2 sodyum potasyum tartarat ($NaKC_4H_4O_6.\ 4H_2O$)
- Lowry stok çözeltisi: 49 ml Lowry A, 0.5 ml Lowry B, 0.5 ml Lowry C'den oluşmaktadır.

- Folin ciocalteu çözeltisi: 2N Folin - Ciocalteau reaktantı kullanımdan hemen önce destile su ile 1:1 oranında seyreltilmiştir.

1 ml Lowry stok çözeltisine 100 µl örnek eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Daha sonra 100 µl folin reaktantı ilave edilerek tekrar oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiş ve sonra 595 nm'de tanığa karşı absorbans ölçülmüştür. Protein standart kurvesinin hazırlanmasında 0-1 mg/ml arasında BSA (Bovine Serum Albumin) içeren standart kurve hazırlanmış (Şekil 3.1) ve protein miktarı bu kurveler yardımıyla mg/ml protein olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.1 Protein standart kurvesi

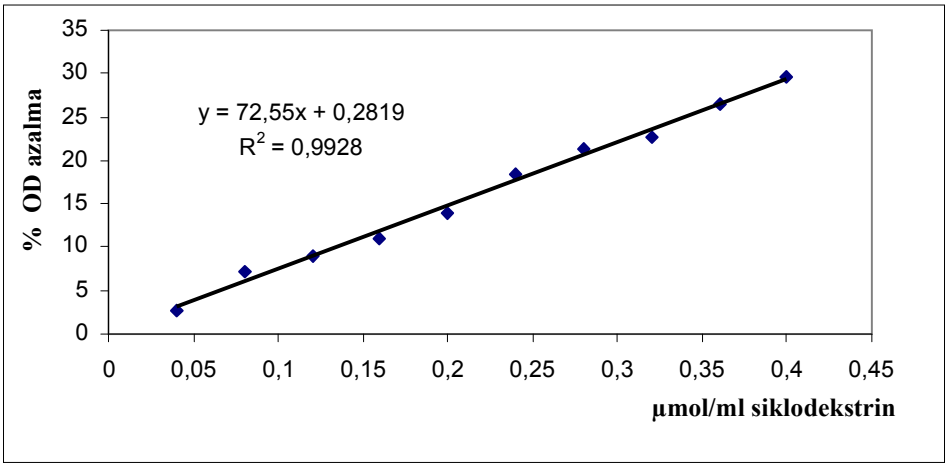
3.2.7 Siklodekstrin glukanotransferaz aktivitesinin belirlenmesi

Belirtilen besiyerlerinde geliştirilen kültürlerden belli sürelerde alınan örnekler 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendikten sonra elde edilen berrak süpernatantta enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Bu amaçla % 1'lik çözünür nişasta stok çözeltisi (50 mM pH 6 sodyum fosfat tamponunda) 121°C'de 5 dakika tutularak hazırlanmıştır. Daha sonra, stok çözeltiden 3 ml

alınarak 50°C'de 5 dakika su banyosunda bekletilmiş ve süre sonunda bu çözeltiye 0.1 ml örnek ilave edilerek, aynı sıcaklıkta 10 dakika daha inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda, reaksiyon 1.5 ml 0.15 M NaOH ilave edilerek durdurulmuş, üzerine 0.5 ml fenolftaleyn çözeltisi [5 mM Na_2CO_3 içinde % 0.02 (w/v) fenolftaleyn] eklenmiş ve oda sıcaklığında 15 dakika bekletildikten sonra, 550 nm'de absorbans değerleri saptanmıştır (Pocsi *et al.* 1998).

Enzim aktivitesi ölçümlerinde, tanık olarak mikroorganizma ile aşılanmamış besiyerinin santrifüj edilmesiyle elde edilen berrak sıvı kullanılmıştır. Enzim aktivitesi, üç paralel olarak ölçülmüş ve elde edilen sonuçların ortalaması alınmıştır.

Enzim aktivitesinin hesaplanması için standart kurvenin (Şekil 3.2) hazırlanmasında reaksiyon ortamına konsantrasyonu 0-0.1 µmol arasında değişen β siklodekstrin ilave edilmiş ve tanık, 50 mM pH 6 sodyum fosfat tamponu ile hazırlanmıştır.



Şekil 3.2 Siklodekstrin standart kurvesi

Belirtilen koşullar altında, 1 ünite enzim aktivitesi, 1 dakikada 1 μmol β siklodekstrin üreten enzim miktarı olarak tanımlanmış ve enzim aktivitesi aşağıdaki gibi hesaplanmıştır (Freitas *et al.* 2004).

$$\text{Enzim aktivitesi (U/ml)} = \frac{\text{Serbestleşen siklodekstrin miktarı (μmol)}}{\text{Örnek miktarı (ml) x inkübasyon süresi (dk)}}$$

3.2.8 Farklı karbon kaynaklarının bakteri gelişmesi ve enzim üretimine etkisi

Bakteri gelişmesi ve SGTaz aktivitesine karbon kaynaklarının etkisini belirlemek için, farklı karbon kaynakları içeren besiyerleri hazırlanmıştır. Bu amaçla besiyeri I'e % 1 oranında nişasta yerine laktoz, galaktoz, ksiloz, dekstroz, maltodekstrin, glikoz, nişasta, mısır nişastası, patates nişastası veya sakaroz ilave edilmiştir. Bakteri örnekleri % 10 oranında inoküle edilerek 37°C'de 48 saat inkübe edilmiş ve bu süre sonunda enzim aktivitesi belirlenmiştir.

Farklı karbon kaynakları içeren besiyerlerinde geliştirilen kültürlerden alınan örneklerin 600 nm dalga boyunda optik yoğunluk değerleri ölçülmüş ve 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendikten sonra elde edilen enzim çözeltisinde SGTaz aktivitesi belirlenmiştir.

3.2.9 Farklı azot kaynaklarının bakteri gelişmesi ve enzim üretimine etkisi

Bu amaçla, besiyeri I'e pepton yerine % 0.5 oranında maya özütü, üre, kazein, tripton, pepton, KNO_3, $(NH_4)_2SO_4$ veya NH_4NO_3 ilave edilerek denemeler yapılmıştır. Bakteriler steril besiyerlerine % 10 oranında inoküle edilmiş ve 37°C'de 48 saat gelişmeye bırakılmıştır.

Farklı azot kaynakları içeren besiyerlerinde geliştirilen kültürlerden alınan örneklerin 600 nm dalga boyunda optik yoğunluk değerleri ölçülmüş ve 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendikten sonra elde edilen berrak kısımda SGTaz aktivitesi belirlenmiştir.

3.2.10 Bazı mineral tuzların enzim üretimine etkisi

Bu amaçla, besiyeri I'de bulunan % 0.02 oranındaki $MgSO_4.7H_2O$ yerine $ZnSO_4$, $FeSO_4$, K_2SO_4, $CaCl_2$, KCl, NaCl, $MnSO_4$, $FeCl_3$, $FeCl_2$, $MgCl_2$ ve $CuSO_4$ ilave edilmiştir. Tuz içermeyen besiyeri kontrol olarak kullanılmış, bakteriler steril besiyerlerine % 10 oranında inoküle edilmiş ve 37°C'de 48 saat gelişmeye bırakılmıştır.
İnkübasyon sonrası alınan örneklerin, 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmesi ile elde edilen süpernatantta SGTaz aktivitesi belirlenmiştir.

3.2.11 Substrat konsantrasyonun enzim üretimine etkisi

Optimum substrat konsantrasyonunu belirlemek amacıyla K izolatı, altı farklı konsantrasyonda patates nişastası içeren (% 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 , 2.5 ve 3.0) besiyerinde 48 saat; *Bacillus macerans* ATCC 8244 suşu ise altı farklı konsantrasyonda mısır nişastası içeren (% 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 ve 2.5) besiyerinde 37°C sıcaklıkta 65 saat inkübe edilmiş ve bu süre sonunda elde edilen süpernatantta enzim aktivitesi belirlenmiştir.

3.2.12 Optimum sıcaklığın ve termal stabilitenin belirlenmesi

Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığı belirlemek için, 30-90°C'ler arasında enzim aktivitesi ölçülmüştür. Bunun için enzim çözeltisi % 1 substrat içeren pH 6 sodyum fosfat tamponu (0.05 M) ile birlikte 30, 40, 50, 60, 70, 80 ve 90°C'lerde 10 dakika inkübe edilmiş ve bu süre sonunda enzim aktivitesi ölçülmüştür. Ölçülen SGTaz aktivitesi sonuçlarına göre enzim için optimum reaksiyon sıcaklığı belirlenmiş ve daha sonra yapılan çalışmalarda bu sıcaklık derecesi kullanılmıştır.

Termal stabilitenin belirlenmesi amacıyla kaba enzim sıvıları % 1 substrat içeren pH 6 sodyum fosfat tamponu (0.05 M) ile birlikte 30, 40, 50, 60, 70, 80 ve 90°C'deki sıcak su banyosunda 1 saat inkübe edilmiş ve bu örneklerin enzim aktiviteleri belirlenmiştir.

3.2.13 Enzimin optimum pH ve pH kararlılığının belirlenmesi

Enzimin optimum reaksiyon pH'sının belirlenmesinde pH 4.0, pH 5.0 değerleri için 0.5 M sodyum asetat; pH 6.0 değeri için 0.5 M sodyum fosfat; pH 7.0, 8.0, 9.0 değerleri için tris-HCI ve pH 10.0 değeri için 0.5 M karbonat-bikarbonat tampon çözeltileri kullanılmıştır. Belirtilen farklı tamponlarda enzim aktivitesi ölçülmüştür. Ayrıca, pH kararlılığının belirlenmesinde pH 11 tamponu olarak glisin-NaOH tampon çözeltisi kullanılmış ve daha önce belirlenmiş optimum reaksiyon sıcaklığı uygulanmıştır. Enzimin pH kararlılığını belirlemek için enzim çözeltisi farklı pH'lardaki tamponlarla 60°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Her bir örnek için kalan oransal aktivite, optimum reaksiyon pH'ında aktivite değerleri 100 kabul edilerek oransal aktivite olarak belirlenmiştir.

3.2.14 Metal iyonlarının ve inhibitörlerin enzim aktivitesine etkisi

Farklı metal iyonlarının SGTaz aktivitesi üzerine olan etkisini belirlemek amacıyla $ZnCI_2$, $MgCI_2$, $CaCI_2$, $CuCI_2$, $FeSO_4$, $MnSO_4$, $CoSO_4$ ve $HgCI_2$ çözeltileri kullanılmıştır. Son konsantrasyonları 4mM ve 10 mM olan bu metal çözeltileri kaba enzim sıvıları ile 30°C sıcaklıkta 30 dakika inkübe edildikten sonra alınan örneklerde aktivite ölçülmüştür. Metal çözeltisi içermeyen kaba enzim sıvısına aynı işlemler uygulanmış ve saptanan aktivite kontrol olarak alınmıştır.

İnhibitörlerin enzim aktivitesine etkisini belirlemede inhibitör olarak son konsantrasyondaki 4 mM ve 10 mM SDS ve EDTA çözeltileri kullanılmıştır. Bu çözeltiler kaba enzim sıvıları ile 30°C sıcaklıkta 30 dakika inkübe edildikten sonra alınan örneklerde aktivite ölçülmüştür.

3.2.15 Siklodekstrin glukanotransferaz enzimin saflaştırılması

SGTaz enziminin saflaştırılması, amonyum sülfatla çöktürme ve diyaliz olmak üzere iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Besiyeri olarak *Bacillus macerans* ATCC 8244 suşu için

besiyeri II, K izolatı için besiyeri III kullanılmıştır. Besiyerleri 100 ml'lik serum şişelerine 50 ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Daha sonra bu besiyerlerine *Bacillus macerans* ATCC 8244 suşu 48, K izolatı için 24 saatlik kültürlerden % 10 oranında aşılama yapılarak 37°C'de geliştirilmiştir. *Bacillus macerans* ATCC 8244 suşu 65, K izolatı 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda, kültürler 5000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant enzim saflaştırılma işlemlerinde kullanılmak üzere alınmış, santrifüj işlemi 2 kez tekrarlanmıştır.

3.2.15.1 Amonyum sülfat ile çöktürme

Besiyerindeki proteinlerin amonyum sülfatla çöktürülmesi için katı amonyum sülfat kullanılmıştır. Santrifüj ile mikroorganizmalardan ayrılan berrak süpernatant 4°C'de, sürekli olarak manyetik karıştırıcıda karıştırılırken üzerine yavaş yavaş katı amonyum sülfat ilave edilerek proteinlerin çökmesi sağlanmış ve bu işlem 6-8 saat içerisinde tamamlanmıştır. Amonyum sülfat oranını belirlemek üzere % 0-85 arasında değişen farklı konsantrasyonlarda amonyum sülfat kullanılarak denemeler yapılmıştır. Çöktürme işleminden sonra, amonyum sülfatlı süpernatant 1 gece 4°C'de bekletilmiş ve daha sonra 4°C'de, 10.000 rpm'de 15 dakika iki kez santrifüjlenerek pelletler kendi hacminin iki katı kadar 0.05 M sodyum fosfat tamponu (pH 6) ile çözündürülmüştür.

3.2.15.2 Diyaliz

Bu aşamada 10.000 MWCO (Molecular Weight Cut Off) diyaliz tüpleri kullanılmıştır. Uygun boyutlarda kesilen diyaliz tüpleri % 2 $NaHCO_3$ ve % 0.05 EDTA içeren çözeltide 10 dakika kaynatılmış, bu süre sonunda demineralize su içine alınarak tekrar 10 dakika kaynatılmış ve bu işlem iki kez tekrarlanmıştır. Soğutulduktan sonra diyaliz tüpleri kontaminasyonun önlenmesi için % 20'lik etil alkol içinde, 4°C'de saklanmıştır (Temizkan ve Arda 2004). Diyaliz tüpü kullanılmadan önce tüplerin içi ve dışı destile su daha sonra 0.05 M fosfat tamponu (pH 6) ile yıkanmıştır.

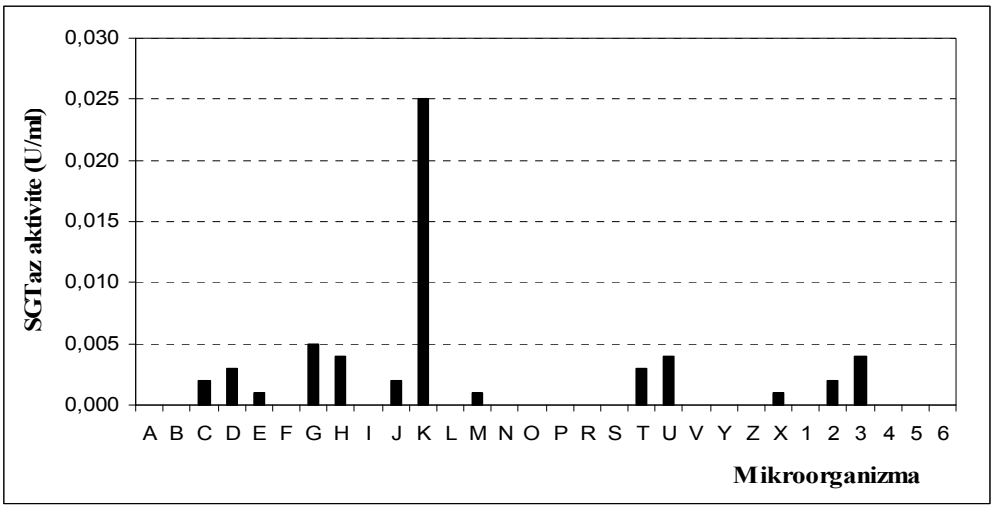
Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu oluşan pelletler kendi hacminin iki katı kadar 0.05 M sodyum fosfat tamponu (pH 6) ile çözündürülerek diyaliz tüpüne alınmış daha sonra tüpün iki ucu iyice bağlanarak ortamdaki amonyum sülfatın uzaklaştırılması amacı ile 0.05 M sodyum fosfat tamponuna karşı 4^{o}C'de 24 saat diyaliz edilmiştir. Tampon diyaliz işlemi boyunca iki kez yenilenmiştir. Diyaliz sonrasında diyaliz tüplerindeki çözeltilerde protein miktarı ve SGTaz aktivitesi ölçülmüştür. İşlemler sonucunda elde edilen protein miktarı ve aktivite değerlerinden yararlanılarak spesifik aktivite, saflaştırma katsayısı ve verim değerleri hesaplanmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1 Siklodekstrin Glukanotransferaz Üreten Bakterilerin İzolasyonu

Bakterilerin izolasyonu amacıyla çeşitli toprak ve patates örnekleri alınmış ve bunlardan toplam 40 adet bakteri izole edilmiştir. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'de (Sneath *et al.* 1986) belirtilen testler kullanılarak gram pozitif, çubuk şeklinde, spor oluşturan ve katalaz pozitif olan 30 adet bakteri *Bacillus* olarak tanımlanmıştır. İzole edilen bakterilerin SGTaz aktiviterli araştırılmış ve elde edilen bulgular grafiklenerek Şekil 4.1'de verilmiştir.

Şekil 4.1'den anlaşıldığı gibi, K izolatında diğer bakterilere göre yüksek oranda aktivite bulunmuş (0.025 U/ml) ve bu nedenle araştırmalarda K izolatı kullanılmıştır.



Şekil 4.1 İzole edilen bakterilerin SGTaz aktiviteleri

Georganta *et al.* (1993) tarafından yapılan bir çalışmada denizden alınan çamur örneklerinden 2000 *Bacillus* kolonisi izole edilmiş ve bunlardan 2 tanesinin SGTaz üreticisi olduğu belirtilmiştir. Higuti *et al.* (2003), tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise, çeşitli

toprak örneklerinden 75 adet SGTaz aktivitesi gösteren bakteri izole edilmiş ve izolatların hepsi *Bacillus firmus* olarak tanımlanmıştır.

4.2 Bakterilerin Enzim Sentezini Gerçekleştiği Optimum pH ve Sıcaklığının Belirlenmesi

Enzim üretimin gerçekleştiği optimum sıcaklığın belirlenmesi için, K izolatı ve *Bacillus macerans* ATCC 8244 suşu 35, 36, 37, 38 ve 39°C'lerde besiyeri I'de geliştirilerek enzim aktivitelerine bakılmış ve sonuçlar Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

Enzim sentezinin gerçekleştiği pH aralığının belirlenmesi için, K izolatı ve *Bacillus macerans* ATCC 8244 suşu, başlangıç pH'ları 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 ve 9.0 olan besiyeri I'de geliştirilerek enzim aktiviteleri ölçülmüş ve sonuçlar Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Bakterilerin farklı sıcaklıklarda besiyeri I'deki SGTaz aktiviteleri

Sıcaklık (^{O}C)	*Bacillus macerans* ATCC 8244 Aktivite (U/ml)	K izolatı Aktivite (U/ml)
35	0.044	0.009
36	0.049	0.013
37	0.054	0.024
38	0.050	0.020
39	0.048	0.019

Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi aktivite değerleri, K izolatı için 35ºC'de 0.009, 36ºC'de 0.013, 37ºC'de 0.024, 38ºC'de 0.020 ve 39ºC'de 0.019 U/ml olarak, *Bacillus macerans* ATCC 8244 suşu için 35ºC'de 0.044, 36ºC'de 0.049, 37ºC'de 0.054, 38ºC'de 0.050 ve 39ºC'de 0.048 U/ml olarak bulunmuştur. Elde edilen bu bulgulara göre en yüksek enzim

aktivitesi her iki bakteride de 37ºC'de gözlenmiş ve bu nedenle çalışmalarda bu sıcaklık değeri uygulanmıştır.

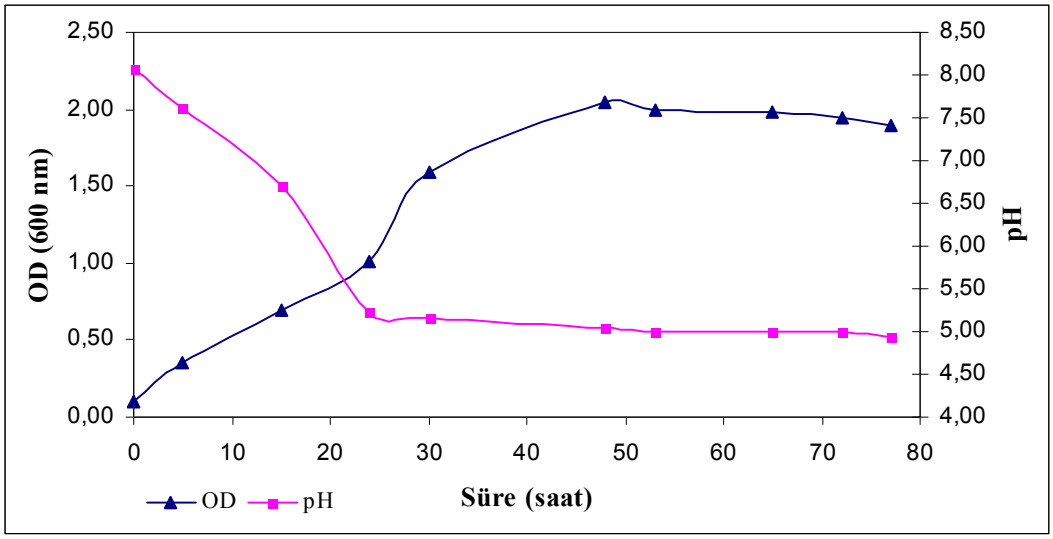
Çizelge 4.2 Bakterilerin farklı pH'da besiyeri I'deki SGTaz aktiviteleri

pH	*Bacillus macerans* ATCC 8244 Aktivite (U/ml)	K izolatı Aktivite (U/ml)
6.0	0.014	0.000
6.5	0.019	0.006
7.0	0.034	0.010
7.5	0.042	0.018
8.0	0.052	0.021
8.5	0.044	0.019
9.0	0.038	0.007

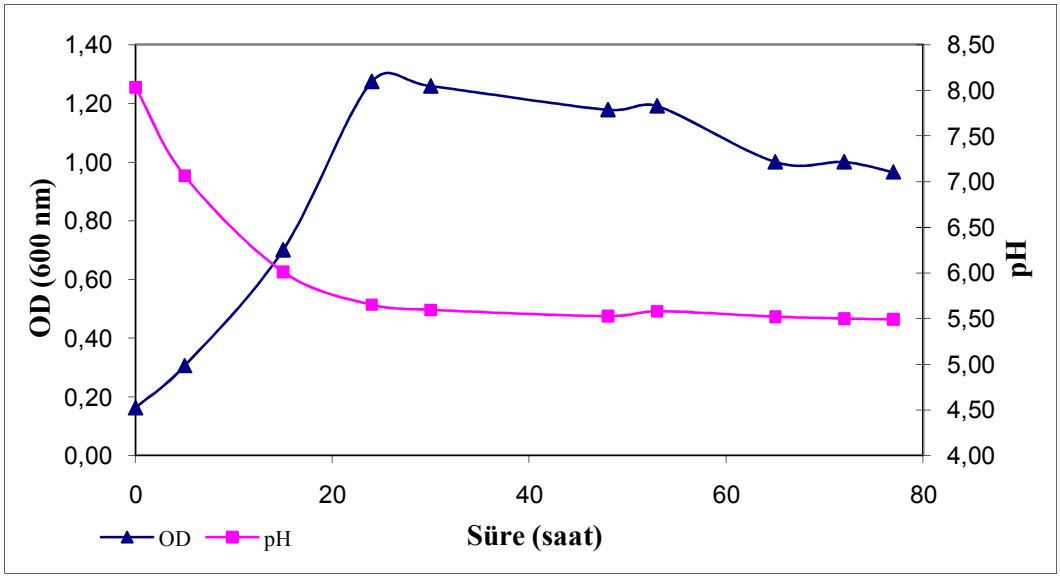
Çizelge 4.2'den anlaşıldığı gibi en yüksek enzim aktivitesi, her iki bakteride de pH 8'de gözlenmiş ve K izolatının ve *Bacillus macerans* ATCC 8244 suşunun enzim aktiviteleri sırasıyla 0.021 ve 0.052 U/ml olarak belirlenmiştir. Bu pH değerinden daha düşük ve yüksek değerlerde enzim üretiminde azalma olduğu saptanmış ve bu nedenle çalışmalarda besiyeri pH'sı 8'e ayarlanmıştır.

4.3 Mikroorganizma Gelişmesinin İzlenmesi

Mikroorganizmaların gelişimlerinin izlenmesi amacı ile *Bacillus macerans* ATCC 8244 besiyeri II'de, K izolatı besiyeri III'de 37°C'de geliştirilmiş ve belirli sürelerde alınan örneklerde 600 nm dalga boyundaki absorbans ile pH değerleri ölçülmüştür. Elde edilen bulgular grafiklenerek mikroorganizmaların gelişme eğrileri Şekil 4.2'de ve Şekil 4.3'de verilmiştir.



Şekil 4.2 *Bacillus macerans* ATCC 8244 suşunun 37°C'de besiyeri II'deki OD ve pH değişimi



Şekil 4.3 K izolatının 37°C'de besiyeri III'deki OD ve pH değişimi

Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'den anlaşıldığı gibi; *Bacillus macerans* ATCC 8244 ve K örnekleri logaritmik gelişimini inkübasyonun yaklaşık sırasıyla 48. ve 25. saatlerinde tamamlamış ve bu süre sonunda durağan devreye geçmiştir. Gelişme sırasındaki pH değişimine bakıldığında her iki kültür de başlangıçta 8 olan pH değerinin mikroorganizma gelişmesine paralel olarak *Bacillus macerans* ATCC 8244 kültüründe 53. saatten sonra 5.0 pH'ya, K kültüründe ise 24. saatten sonra yaklaşık 5.5 pH'ya düştüğü belirlenmiştir.

Bacillus macerans ATCC 8244 suşu, K izolatına göre daha yavaş fakat yoğun bir gelişme göstermiştir. 600 nm'de ölçülen en yüksek OD, *Bacillus macerans* ATCC 8244 için 48. saatte 2.04, K izolatı için ise 24. saatte 1.27 olarak ölçülmüştür. Ayrıca her iki bakteri de besiyeri pH'sını logaritmik evre boyunca hızlı bir şekilde düşürmüş, durağan evre süresince ise pH'daki düşüş yavaşlamıştır.

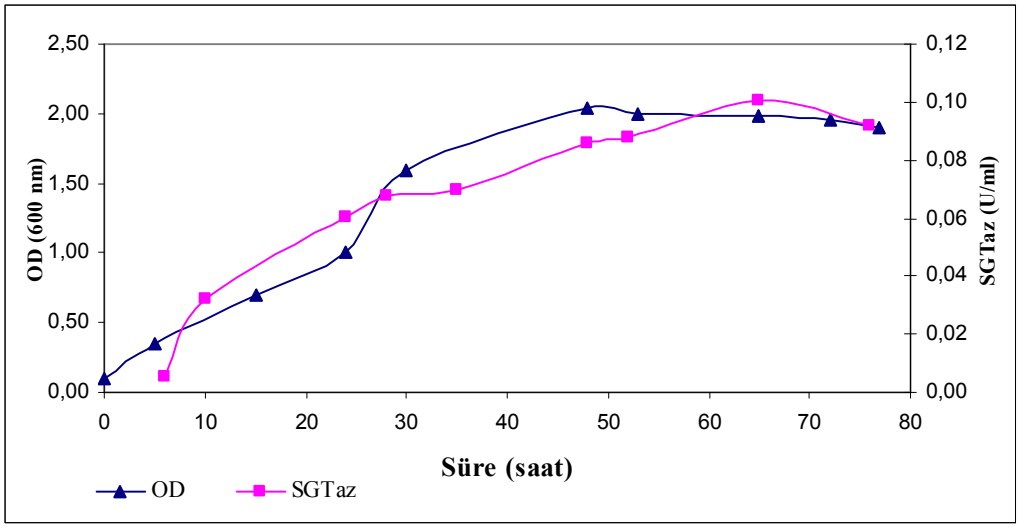
Savergave *et al.* (2008) *Bacillus firmus* ile yaptıkları çalışmada SGTaz üretimi için, başlangıçta 9.2 olan besiyeri pH'sının fermentasyon sonunda 8.2'ye düştüğünü, bakterinin logaritmik gelişimini inkübasyonun yaklaşık 24. saatinde tamamladığını ve bu süre sonunda durağan devreye geçtiğini belirtmişlerdir. Georganta *et al.* (1993) tarafından yapılan bir çalışmada ise, SGTaz üretimi için izole edilen ve *Bacillus subtilis* olarak tanımlanan örneğin logaritmik gelişimini inkübasyonun 40. saatinde tamamladığını ve bu saatteki absorbans değerinin (OD_{660}) 3 olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen OD değerleri literatür bulgularından daha düşük bulunmuştur.

4.4 Mikroorganizmaların Enzim Aktiviteleri

Şekil 4.4 ve 4.5'te, 37^{o}C'de geliştirilen mikroorganizmaların çoğalma ortamlarında saptanan SGTaz aktivitelerinin ve OD_{600} değerlerinin zamanla değişimi görülmektedir.

Şekil 4.4'de görüldüğü gibi logaritmik evrenin ilk saatlerinden durağan evreye kadar *Bacillus macerans* ATCC 8244 suşunun optik yoğunluk ölçümü ile saptanan çoğalmasıyla

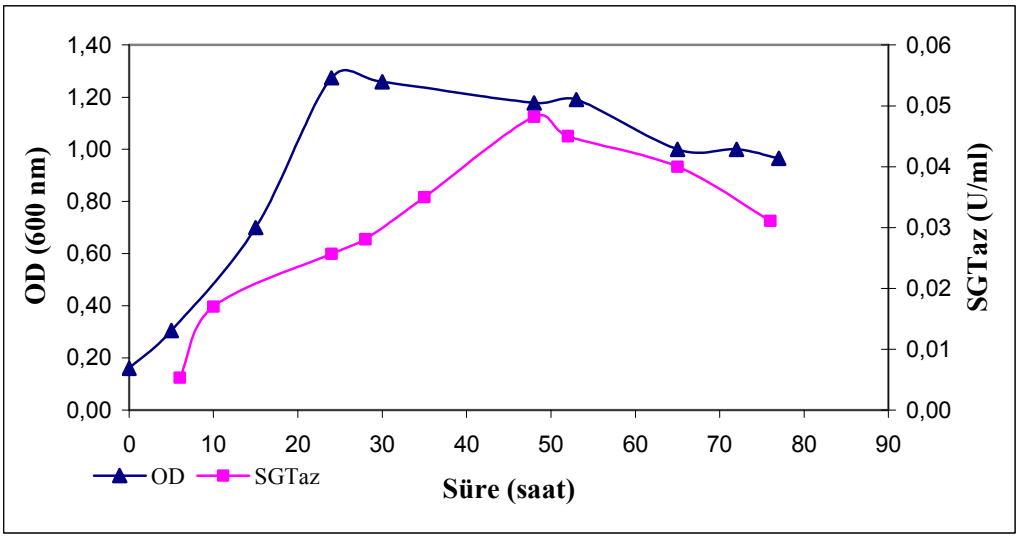
SGTaz aktivitesi paralellik göstermiştir. Ancak, durağan evrede mikroorganizmaların gelişmesi durmuş ve SGTaz aktivitesi artmıştır. Maksimum enzim aktivitesi 65. saatte gerçekleşmiş ve SGTaz aktivitesi 0.100 U/ml, protein miktarı ise 0.321 mg/ml olarak hesaplanmıştır. Bu süreden sonra enzim aktivitesinde düşüş başlamıştır.



Şekil 4.4 *Bacillus macerans* ATCC 8244 suşunun 37°C'de besiyeri II'de inkübasyon sırasındaki OD ve SGTaz aktivite değişimi

K izolatının enzim aktivitesi ise, logaritmik evre süresince artmış, inkübasyonun 48. saatinde en yüksek değere ulaşmış ve enzim aktivitesi 0.048 U/ml, protein miktarı 0.182 mg/ml olarak hesaplanmıştır. 52. saatte, enzim aktivitesi 0.045 U/ml olarak ölçülmüş ve bu aşamadan sonra enzim aktivitesinde düşüş gözlenmiştir.

Elde edilen bu veriler, literatür bulguları ile örtüşmektedir. Örneğin; Georganta *et al*. (1993) tarafından yapılan çalışmada, bir *Bacillus* türü ile SGTaz üretiminin logaritmik faz boyunca artış gösterdiği ve durağan evrede maksimum seviyeye ulaştığı belirtilmiştir.



Şekil 4.5 K izolatının 37°C'de besiyeri III'de inkübasyon sırasındaki OD ve SGTaz aktivite değişimi

Bacillus sp. kullanılarak yapılan bir başka çalışmada ise, en yüksek SGTaz aktivitesine mikroorganizmanın ölüm fazında ulaşılmış ve bu aşamada aktivitenin 19 U/ml olduğu belirtilmiştir (Illias *et al.* 2002). Larsen *et al.* (1998) *Paenibacillus* sp. F8 ile ürettikleri SGTaz aktivitesinin 0.0281 U/ml olduğunu bildirmişlerdir.

Rosso *et al.* (2002) tarafından yapılan bir çalışmada, patatesten izole edilen *Bacillus circulans* DF 9R ile patates nişastasından SGTaz üretilmiş ve maksimum enzim aktivitesine 48. saatte ulaşılmış ve bu aşamada SGTaz aktivitesinin 5.8 U/ml olduğu açıklanmıştır.

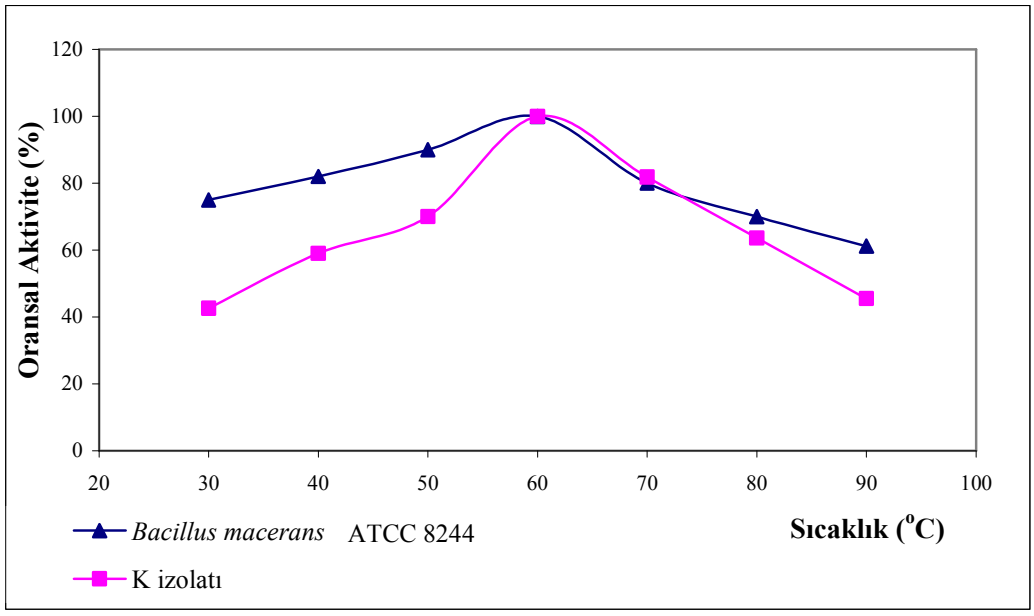
Martins and Hatti-Kaul (2002) yaptıkları çalışmada, *Bacillus agaradhaerens* ile çözünür nişastadan SGTaz üretmişler ve maksimum enzim aktivitesini inkibasyonun 25. saatinde 0.31 U/ml olarak belirlemişler ve ayrıca hücre içi SGTaz aktivitesinin olmadığını açıklamışlardır.

Ayrı bir çalışmada, *Bacillus firmus*'tan üretilen SGTaz'ın maksimum aktivitesinin, inkübasyonun 33. saatinde gerçekleştiği ve 6.8 U/ml olduğu bildirilmiştir (Savergave *et al.* 2008).

Ancak bu çalışmada elde edilen aktivite değerleri literatürdeki değerlerden oldukça düşük bulunmuştur ve bunun aktivite ölçüm yönteminden kaynaklandığı sanılmaktadır.

4.5 Enzimin Optimum Reaksiyon Sıcaklığı

SGTaz'ın optimum reaksiyon sıcaklığının belirlenmesi için enzim çözeltisi, % 1 substrat içeren pH 6 sodyum fosfat tamponu (0.05 M) ile birlikte 30, 40, 50, 60, 70, 80 ve 90°C'lerde 10 dakika inkübe edilmiş ve süre sonunda enzim aktivitesi ölçülmüştür. Elde edilen bulgular Şekil 4.6'da gösterilmiş ve şekildeki oransal aktiviteler en yüksek aktivite % 100 olarak kabul edilerek hesaplanmıştır.



Şekil 4.6 SGTaz enziminin farklı sıcaklıklardaki oransal aktiviteleri

Şekil 4.6'daki bulgulara göre; *Bacillus macerans* ATCC 8244'ün SGTaz aktivitesi 30°C'den yüksek sıcaklıklarda, 60°C'de en yüksek aktivite göstermiş, 70°C'de % 80, 80°C'de ise % 70 aktivite elde edilmiştir. Benzer şekilde, K izolatının SGTaz aktivitesi ise 60°C'ye kadar artmış; 60°C'nin üzeri sıcaklıklarda düşüş gözlenmiş ve 70°C'de % 82, 80°C'de % 64, 90°C' de ise % 45 olarak hesaplanmıştır.

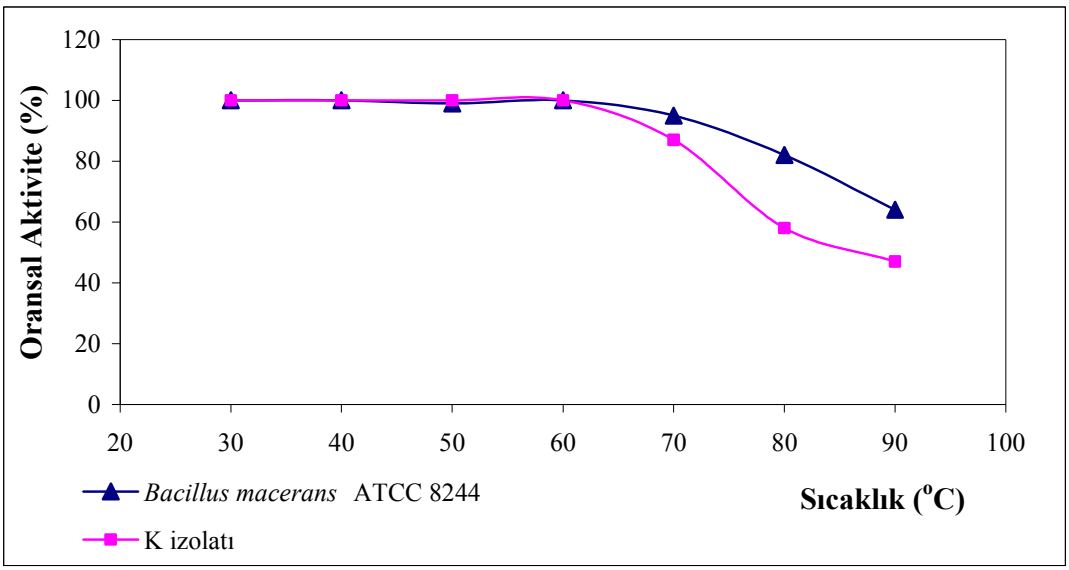
Arya and Srivastava (2006), *Bacillus macerans* ATCC 8244 ile SGTaz üretimi gerçekleştirmişler ve enzimin optimum sıcaklığını 60°C olarak açıklamışlardır. Kim *et al.* (2003) ve Qi *et al.* (2004) ise *Bacillus macerans*'tan SGTaz üretilmişler ve enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerini 60°C olarak bildirmişlerdir. Buna karşın, Georganta *et al.* (1993), SGTaz'ın optimum sıcaklığını *Bacillus* sp. için 40°C *Bacillus subtilis* için 50°C olarak saptamışlardır. Illias *et al.* (2002) yaptıkları çalışmada, *Bacillus* sp. SGTaz enziminin 70°C'de maksimum aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada ise, Wind *et al.* (1995) *Thermoanaerobacter termosulfurigenes* EM1' in SGTaz enzimini kodlayan amyA genini *E. coli* PC1990'ye klonlayarak SGTaz üretimi yapmışlar ve maksimum enzim aktivite sıcaklığını 80-85°C olarak saptamışlardır.

Iyer *et al.* (2003), tarafından yapılan bir başka çalışmada ise, *Bacillus circulans* ATCC 21783 tarafından üretilen SGTaz enzimi silika desteğe immobilize edilmiş ve tutuklanmış enzimin maksimum aktivite sıcaklığının 45°C olduğu belirtilmiştir.

4.6 Enzimin Isıl Stabilitesi

Mikroorganizmaların ürettikleri SGTaz enziminin ısıl stabilitesini belirlemek amacı ile kaba enzim sıvıları % 1 substrat içeren pH 6 sodyum fosfat tamponu ile birlikte 30, 40, 50, 60, 70, 80 ve 90°C'deki sıcak su banyosunda 1 saat inkübe edilmiş, daha sonra alınan örneklerin uygun optimum sıcaklık değerlerinde aktiviteleri ölçülmüş ve bulgular Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Şekil 4.7'deki oransal aktiviteler en yüksek aktivite % 100 olarak kabul edilerek hesaplanmıştır.

Şekil 4.7'de görüldüğü gibi *Bacillus macerans* ATCC 8244 suşunun SGTaz aktivitesinde; değişen sıcaklık ile birlikte büyük değişimler gözlenmemiş, bununla beraber 90°C sıcaklıkta önemli oranda aktivite kaybı gözlenmiştir. K izolatının SGTaz aktivitesi ise, değişen sıcaklık ile birlikte, *Bacillus macerans* ATCC 8244 suşuna oranla daha fazla aktivite kaybetmiş ve 90°C'de aktivite kaybı K izolatı için % 53 iken, *Bacillus macerans* ATCC 8244 için % 36 olmuştur.



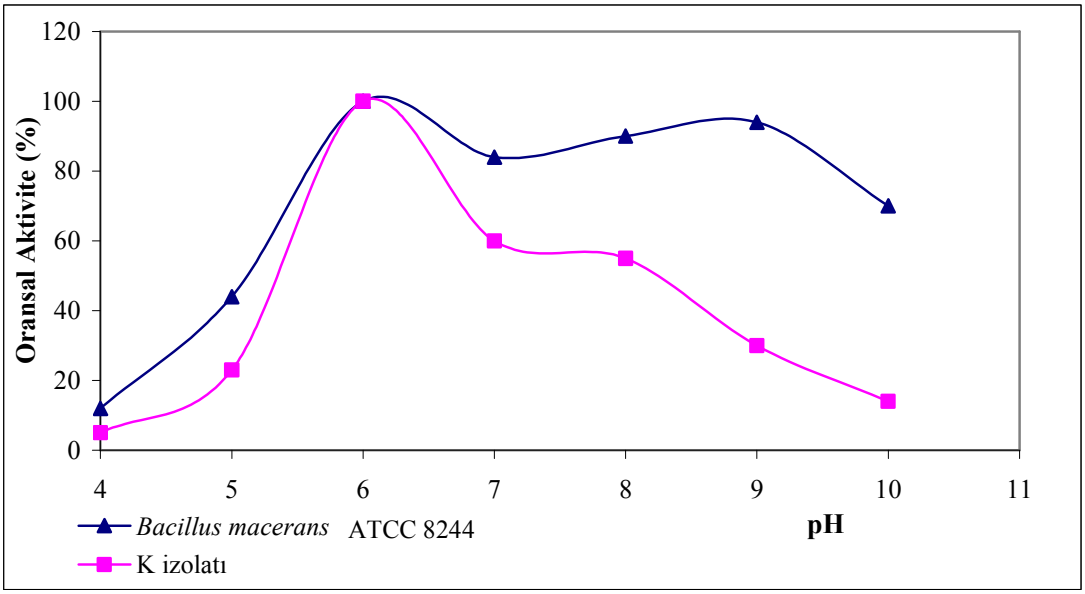
Şekil 4.7 SGTaz enziminin farklı sıcaklıklardaki stabilitesi

Benzer bulgulara başka çalışmalarda da rastlanmış, örneğin Sian *et al.* (2005) tarafından yapılan bir çalışmada, *Bacillus* sp. tarafından üretilen SGTaz enzimi pH 6'da 80°C'de 30 dakika inkübe edilmiş ve süre sonunda aktivitesinin % 86'sını kaybettiği belirtilmiştir.

Cao *et al.* (2005), bir *Bacillus* türü ile yaptıkları çalışmada, SGTaz enziminin alkali tamponda (pH 8.5) aktivitesinin 40-70°C sıcaklık aralığında stabil olduğunu, 70°C'den sonra hızla aktivitesini kaybettiğini ve 80°C'de ise akvitesinin % 86'sını kaybettiğini belirtmişlerdir.

4.7 Enzimin Optimum pH'sı

Farklı pH'lardaki 4 tampon çözelti ile yapılan bu çalışmada mikroorganizmaların SGTaz aktivitelerine pH 4'den pH 10'a kadar 7 farklı pH değerinin etkisi incelenmiş ve elde edilen bulgular Şekil 4.8'de gösterilmiştir. Oransal aktivite grafiği pH 6'daki enzim aktivitesi % 100 kabul edilerek çizilmiştir.



Şekil 4.8 Bakterilerin farklı pH değerlerindeki oransal aktiviteleri

Şekil 4.8'den anlaşıldığı gibi pH 6.0 her iki mikroorganizmanın en yüksek SGTaz aktivitesi gösterdiği pH olmuş, K izolatının SGTaz aktivitesi pH 6'dan sonra çok belirgin bir azalma göstermiş ve bu azalma pH 10'a kadar devam etmiştir. *Bacillus macerans* ATCC 8244 ise pH 7'de pH 6'ya nazaran daha düşük aktivite göstermiş, ama pH 7'den yüksek değerlerde aktivite artmış, bu artış pH 9'da son bulmuştur.

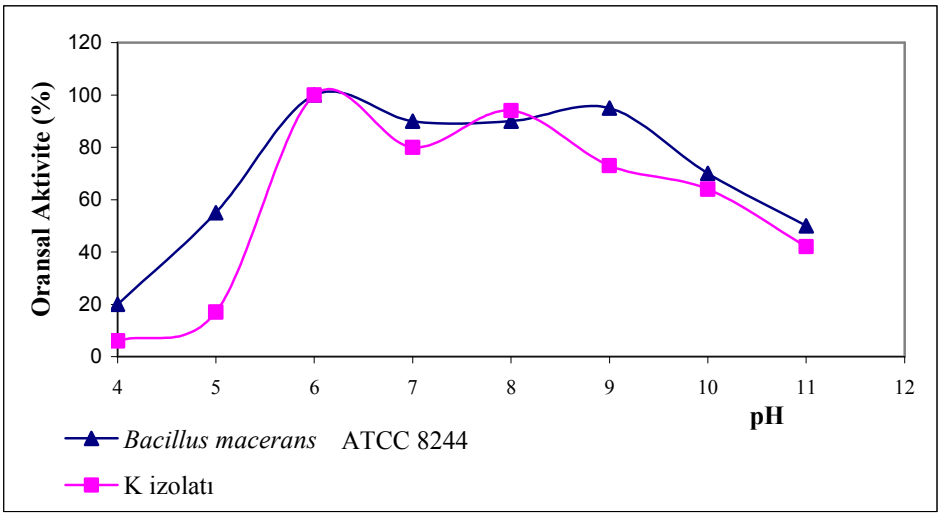
Literatürlerde, bu bulgulara benzer olarak maksimum pH'sı 6 olan pek çok bakteri SGTaz'ının bulunduğu görülmüştür. Örneğin, Georganta *et al.* (1993) *Bacillus subtilis* tarafından üretilen SGTaz enziminin pH 5-9 arasında aktivite gösterdiğini ve maksimum aktivitenin pH 6 saptandığını bildirmişlerdir. Sian *et al.* (2005) ise yaptıkları çalışma ile bir *Bacillus* sp.'nin SGTaz enziminin maksimum aktivite gösterdiği pH değerini 6 olarak bildirmişlerdir.

Wind *et al.* (1995) *Thermoanaerobacter termosulfurigenes* EM1'in SGTaz kodlayan *amyA* genini *E. coli* PC1990'ye klonlayarak SGTaz üretimi yapmışlar ve pH 4.5-7.0 arasında enzim aktivitesinin yüksek olduğunu saptamışlardır.

Arya and Srivastava (2006) yaptıkları bir çalışmada, *Bacillus macerans* ATCC 8244 SGTaz enziminin maksimum aktivite gösterdiği pH değerini 7.5 olarak belirtmişlerdir. Iyer *et al.* (2003) tarafından yapılan bir diğer çalışmada, *Bacillus circulans* ATCC 21783 tarafından üretilen SGTaz enzimi silika desteğe immobilize edilmiş ve bu koşulda enzimin maksimum pH değeri 8.5 olarak bildirilmiştir. Benzer şekilde, Higuti *et al.* (2003) *Bacillus firmus* SGTaz'ını karakterize etmişler ve pH 8.5'de maksimum aktivite gösterdiklerini saptamışlardır.

4.8 Enzimin pH Stabilitesi

Mikroorganizmaların ürettikleri SGTaz enziminin pH stabilitesini belirlemek amacıyla kaba enzim sıvıları pH 4'den pH 10'a kadar değişen tamponlarda 1'er saat bekletilmiş, daha sonra kalan aktivite standart koşullarda ölçülerek bulgular Şekil 4.9'da gösterilmiştir. Oransal aktivite en yüksek aktivite % 100 olarak kabul edilerek hesaplanmıştır.



Şekil 4.9 SGTaz'ın pH 4-11 arasındaki aktivite değişimi

Şekil 4.9'da görüldüğü gibi her iki mikroorganizma en yüksek enzim aktivitesini pH 6'da göstermiş, K izolatı pH 7'de aktivitesinin % 20'sini, pH 9'da % 27'sini ve pH 11'de % 58'ni, *Bacillus macerans* ATCC 8244 ise pH 7'de aktivitesinin % 10'nu, pH 9'da % 5'ni ve pH 11'de % 50'sini kaybetmiştir.

Cao *et al.* (2004) tarafından yapılan bir çalışmada, *Bacillus* sp. tarafından üretilen SGTaz enziminin pH stabilitesi araştırılmış, bu amaçla enzim farklı pH'larda 60°C'de 30 dakika inkübe edilmiş ve pH 6-10 arası enzimin stabil olduğu belirtilmiştir. Martins and Kaul (2002), *Bacillus agaradhaerens* ile yaptıkları çalışmada SGTaz enzimini karakterize etmiş ve pH 5.4-11 arasında enzimin aktivitesini yüksek oranda koruduğunu belirtmişlerdir.

4.9 Farklı Karbon Kaynaklarının Bakteri Gelişmesi ve Enzim Üretimine Etkisi

Farklı karbon kaynaklarının bakteri gelişmesi ve enzim aktivitesi üzerine etkisini araştırmak amacıyla laktoz, galaktoz, ksiloz, dekstroz, maltodekstrin, glikoz, nişasta, mısır nişastası, patates nişastası ve sakaroz içeren besiyerlerinde bakterilerin optik yoğunlukları

ve enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Nişastalı ortamda gelişen bakterilerin SGTaz aktivitesi 100 kabul edilerek, elde edilen bulgular oransal aktivite olarak hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 4.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3 Bakterilerin farklı karbon kaynağı içeren besiyerlerindeki SGTaz aktiviteleri ve optik yoğunlukları

Karbon Kaynağı	*Bacillus macerans* ATCC 8244		K izolatı	
	Gelişme (OD_{600})	Oransal Aktivite (%)	Gelişme (OD_{600})	Oransal Aktivite (%)
Laktoz	0.745	6	0.791	0
Galaktoz	0.686	0	0.888	0
Ksiloz	0.532	21	0.555	27
Dekstroz	0.712	83	0.846	76
Maltodekstrin	0.999	77	0.735	49
Glikoz	0.866	27	1.021	42
Nişasta	1.503	100	0.998	100
Mısır nişastası	2.032	128	1.104	132
Patates nişastası	1.902	123	1.205	141
Sakaroz	0.978	0	0.891	0

Çizelgeden anlaşıldığı gibi; *Bacillus macerans* ATCC 8244, mısır nişastası, patates nişastası ve çözünür nişasta içeren besiyerlerinde, diğerlerine oranla daha yüksek SGTaz aktivitesi göstermiştir. En yüksek oransal enzim aktivitesi mısır ve patates nişastalı besiyerlerinde sırası ile % 128 ve % 123 olarak hesaplanmıştır. Sakaroz içeren besiyerinde ise iyi gelişme olmasına karşın enzim aktivitesi saptanamamıştır. Dekstroz içeren besiyerinde gelişme, maltodekstrin içeren besiyerindekine oranla daha düşük olmuş ancak dekstrozlu besiyerinde oransal aktivite % 83 iken maltodekstrinli besiyerinde % 77' olarak hesaplanmıştır. En düşük gelişmeye ksiloz içeren besiyerinde rastlanmış ve bu koşulda oransal aktivite % 21 olarak hesaplanmıştır.

K izolatı; karbon kaynağı olarak çözünür nişasta, patates nişastası, mısır nişastası, sakaroz, galaktoz ve dekstroz içeren besiyerinde daha hızlı bir gelişme gösterirken, laktoz, maltodekstrin ve ksilozlu ortamlarda daha yavaş bir gelişme göstermiştir. Çözünür nişasta, mısır nişastası ve patates nişastası içeren besiyerlerindeki SGTaz aktivitesi diğer besiyerlerine göre daha yüksek düzeyde olmuş, en yüksek oransal aktivite ve en yüksek gelişme patates nişastalı besiyerinde sırasıyla % 141 ve 1.205 olarak hesaplanmıştır. Her iki bakteri ile yapılan çalışmalarda sakaroz, laktoz ve galaktoz içeren besiyerinde enzim aktivitesine rastlanmamıştır.

Ibrahim *et al.* (2005), bir *Bacillus* türü ile SGTaz üretimi yapmışlar ve çeşitli karbon kaynaklarının enzim üretimine etkisini araştırmışlar, buna göre çözünür nişasta ile SGTaz aktivitesini 16.71 U/ml, mısır nişastası ile ise 15.45 U/ml olarak belirlemişlerdir. Glikoz, fruktoz, laktoz ve ksiloz ile de sırasıyla 10.19, 11.96, 10.56, 11.36 U/ml enzim aktivitesi değerlerine ulaşmışlardır.

Gawande *et al.* (1998) ise *Bacillus firmus* suşundan SGTaz ürettikleri çalışmada enzim aktivitesini besi ortamına karbon kaynağı olarak ilave edilen çözünür nişasta ile 0.33 U/ml, mısır nişastası ile ise 1.05 U/ml olarak saptamışlardır. Aynı bakteri ile yapılan diğer bir çalışmada ise % 2 çözünür nişasta kullanılarak SGTaz aktivitesi 0.195 U/ml olarak bulunmuştur (Higuti *et al.* 2003).

Rosso *et al.* (2002) yaptıkları çalışmada *Bacillus circulans* suşunun SGTaz aktivitesinin cassava nişastası içeren besiyerinde 2.9 U/ml, buğday nişastası içeren besiyerinde 2.0 U/ml, mısır nişastası içeren besiyerinde 2.2 U/ml, patates nişastası içeren besiyerinde 2.4 U/ml olduğunu saptamışlardır. Ayrıca bu besiyerlerindeki gelişim izlenmiş ve optik yoğunlukları (OD_{620}) sırası ile 2.07, 1.37, 1.65 ve 1.64 olarak belirtilmiştir.

Karbon kaynaklarının *Bacillus firmus* suşu tarafından üretilen SGTaz enziminin aktivitesi üzerine etkisini saptamaya yönelik bir başka çalışmada ise, bu suşun glikoz, galaktoz,

laktoz, sükroz, maltoz içeren besiyerinde SGTaz aktivitesine rastlanmamıştır (Higuti *et al.* 2004).

4.10 Farklı Azot Kaynaklarının Bakteri Gelişmesi ve Enzim Üretimine Etkisi

Azot kaynaklarının bakteri gelişmesi ve enzim aktivitesine etkisini belirlemek için, azot kaynağı olarak; tripton, pepton, kazein, üre, amonyum sülfat, amonyum nitrat, potasyum nitrat ve maya özütü kullanılan besiyerlerinde geliştirilen bakterileri kültürlerinin optik yoğunlukları ve SGTaz aktiviteleri ölçülmüştür. Elde edilen bulgular Çizelge 4.4'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.4 Bakterilerin farklı azot kaynağı içeren besiyerlerindeki SGTaz aktiviteleri ve optik yoğunlukları

Azot Kaynağı	Bacillus macerans ATCC 8244		K izolatı	
	Gelişme (OD_{600})	Oransal Aktivite (%)	Gelişme (OD_{600})	Oransal Aktivite (%)
Üre	1.876	60	0.794	24
Kazein	1.754	50	0.879	29
Pepton	1.899	65	1.085	33
Tripton	1.876	76	0.733	44
$(NH_4)_2SO_4$	1.989	94	1.204	100
NH_4NO_3	2.004	100	0.904	73
KNO_3	1.734	64	0.643	13
Maya Özütü	1.576	49	0.865	67

Çizelge 4.4'de görüldüğü gibi, *Bacillus macerans* ATCC 8244 en iyi gelişme ve en yüksek aktiviteyi amonyum nitrat içeren besiyerinde göstermiştir. Maya özütü hariç denenen diğer azot kaynaklarını içeren besiyerlerinde ölçülen absorbans değerleri birbirine çok yakın olmasına karşın aktivite değerleri arasında büyük farklılıklar saptanmış, üre, maya özütü ve kazeinin SGTaz aktivitesini belirgin oranda azalttığı anlaşılmıştır.

Aynı çizelgeden anlaşıldığı gibi, K izolatı en yüksek oransal aktivitesini amonyum sülfat içeren besiyerinde göstermiş, potasyum nitrat, pepton, kazein ve üre izolatın gelişmesini ve enzim aktivitesini azaltmıştır. Maya özütü, amonyum nitrat izolatın gelişmesini olumlu yönde etkilediği gibi bu besiyerlerinde oransal aktivite sırasıyla % 67 ve % 73 olarak hesaplanmıştır.

Benzer şekilde Rosso *et al.* (2002), patatesten izole ettiği *Bacillus circulans* suşunun, fermentasyon besiyerine azot kaynağı olarak NH_4CI, NH_4NO_3, $NH4_2SO_4$ ilave ettiğinde SGTaz aktivitesinin arttığını bildirmiştir. Aynı araştırıcılar, tripton ve mısır ıslatma suyunun bakteri gelişimini arttırmasına karşın SGTaz aktivitesini düşürdüğünü de saptamışlardır.

Bu bilgilere karşın, besiyerine amonyum sülfat ve mısır ıslatma suyu ilavesinin SGTaz üretimini inhibe ettiğini ifade eden araştırmalar da vardır. Örneğin; Thatai *et al.* (1999) tarafından yapılan bir çalışmada besiyerinde amonyum sülfat kullanımının aktiviteyi azalttığı, Fujita *et al.* (1990) tarafından yapılan başka bir araştırmada ise, mısır ıslatma suyu kullanılması durumunda aktiviteye rastlanmadığı belirtilmiştir. Illias *et al.* (2002) ise, *Bacillus* sp. G1 suşunun pepton içeren ortamda yüksek aktivite gösterdiğini ancak üre içeren ortamda SGTaz aktivitesine rastlanmadığını bildirmiştir.

4.11 Çeşitli Tuzların Enzim Üretimine Etkisi

Bu amaçla besiyeri I'e % 0.02 $MgSO_4.7H_20$ yerine $ZnSO_4$, $FeSO_4$, K_2SO_4, $CaCI_2$, KCI, NaCI, $MnSO_4$, $FeCI_3$, $FeCI_2$, $MgCI_2$ ve $CuSO_4$ ilave edilmiştir. Mineral tuz içermeyen besiyeri kontrol olarak kullanılmıştır. Steril besiyerlerine bakteriler % 10 oranında inoküle edilmiş ve 37°C'de 48 saat gelişmeye bırakılmıştır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5'te verilmiştir.

Çizelge 4.5 Bakterilerin farklı mineral madde içeren besiyerlerindeki SGTaz aktiviteleri

Mineral Madde	*Bacillus macerans* ATCC 8244	K izolatı
	Oransal Aktivite (%)	Oransal Aktivite (%)
Kontrol	100	100
$ZnSO_4$	35	20
$FeSO_4$	86	47
K_2SO_4	89	18
$CaCI_2$	59	39
KCI	65	43
NaCI	76	45
$MnSO_4$	45	61
$FeCI_3$	59	53
$FeCI_2$	57	65
$MgCI_2$	93	102
$CuSO_4$	33	29
$MgSO_4$	125	116

Çizelgeden anlaşıldı gibi, besiyerine $MgSO_4$ ilavesi ile *Bacillus macerans* ATCC 8244 suşunun oransal aktivitesinin % 125 yükseldiği belirlenmiş, ancak diğer mineral maddelerin ortama ilavesi ise SGTaz aktivitesinin farklı oranlarda azaldığı anlaşılmıştır. K izolatı, en yüksek aktiviteyi $MgSO_4$ ve $MgCI_2$ içeren besiyerinde göstermiş ve bu besiyerlerindeki oransal aktiviteleri sırasıyla % 116 ve % 102 olarak hesaplanmış, $ZnSO_4$ ve K_2SO_4'ün ilavesi ile oransal aktivitenin % 20 ve % 18'e düştüğü gözlenmiştir. Besiyerine $MgSO_4$ ilavesi her iki bakteride gözlenen enzim aktivitesi artışına kofaktör etkinin neden olduğu düşünülmektedir.

Illias *et al.* (2002) *Bacillus* sp. G1 suşu ile yaptıkları bir çalışmada, besiyerine % 0.02 oranında $MgSO_4$, $MgCI_2$, $FeCI_2$, KCI, $ZnSO_4$, $CuSO_4$ ilave etmişler; en yüksek aktivitenin $MgSO_4$ içeren besiyerinde gözlendiğini; $ZnSO_4$, $CuSO_4$ içeren besiyerinde ise aktiviteye

rastlanmadığını bildirmişlerdir. Bunlara karşın 2mM $CuSO_4$ içeren besiyerinde *Bacillus autolyticus*'un ürettiği SGTaz enziminin % 92 oransal aktivite gösterdiği açıklanmıştır (Tomita *et al.* 1993). Diğer bir çalışmada ise, $ZnCI_2$ ve $CaCI_2$ içeren besiyeri kullanılarak SGTaz üretiminin arttırıldığı rapor edilmiştir (Thatai *et al.* 1999).

4.12 Bazı Metal İyonlarının ve İnhibitörlerin Enzim Aktivitesine Etkisi

Çeşitli metal iyonlarının ve inhibitör bileşiklerin farklı konsantrasyondaki çözeltileri, kaba enzim sıvısına ilave edilerek 30°C sıcaklıkta 30 dakika inkübe edlimiş, sonra alınan örneklerde SGTaz aktiviteleri belirlenmiş ve sonuçlar oransal aktivite olarak Çizelge 4.6'da gösterilmiştir. Kontrol olarak metal çözeltisi içermeyen enzim çözeltisinin aktivitesi % 100 olarak kabul edilmiştir.

Çizelge 4.6 Bakterilerin bazı metal iyonları ve inhibitör madde varlığındaki enzim aktiviteleri

Bileşikler	*Bacillus macerans* ATCC 8244		K izolatı	
	4 mM	10 mM	4 mM	10 mM
	Oransal Aktivite (%)	Oransal Aktivite (%)	Oransal Aktivite (%)	Oransal Aktivite (%)
Kontrol	100	100	100	100
$ZnCI_2$	56	43	66	42
$MgCI_2$	62	57	75	72
$CaCI_2$	90	82	95	89
$CuCI_2$	59	52	42	33
$FeS0_4$	65	58	58	41
$MnSO_4$	62	42	62	32
$CoSO_4$	66	61	61	53
$HgCI_2$	40	10	25	6
SDS	66	42	55	43
EDTA	70	67	60	42

Çizelge 4.6'ya göre, *Bacillus macerans* ATCC 8244 suşunun SGTaz aktivitesinde metal iyonlarının ilavesi ile düşüş gözlenmiş, en çok düşüş % 90 olarak 10 mM son konsantrasyondaki $HgCI_2$ çözeltisi ilavesinde gerçekleşmiştir. 4mM ve 10 mM $CaCI_2$ ilavesi ise başlangıçtaki SGTaz aktivitesinin sırası ile % 90 ve % 82'sini koruduğu kaydedilmiştir. 10 mM SDS ilavesi ile aktivitesinin yarısından fazlasını kaybeden enzimin, 10 mM EDTA varlığında ise kalan aktivite değeri % 67 olarak ölçülmüştür.

K izolatının SGTaz aktivitesi; 10 mM $HgCI_2$, $MnSO_4$ ve $CuCI_2$ varlığında çok fazla düşüş göstermiş ve sırasıyla % 6, % 32, % 33 olarak belirlenmiştir. $CaCI_2$ ilavesi ile enzim aktivitesi yüksek oranda korunmuş ve 4mM $CaCI_2$ ilavesi ile aktivitesi % 95, 10 mM konsantrasyondaki aktivitesi ise % 89 olarak ölçülmüştür. SDS ve EDTA ilavesinin, enzim aktivitesi üzerine inhibitör etki yarattığı gözlenmiş, SDS ve EDTA 10 mM konsantrasyonda kullanıldıklarında enzim aktivitesi sırasıyla % 43 ve % 42 olarak hesaplanmıştır.

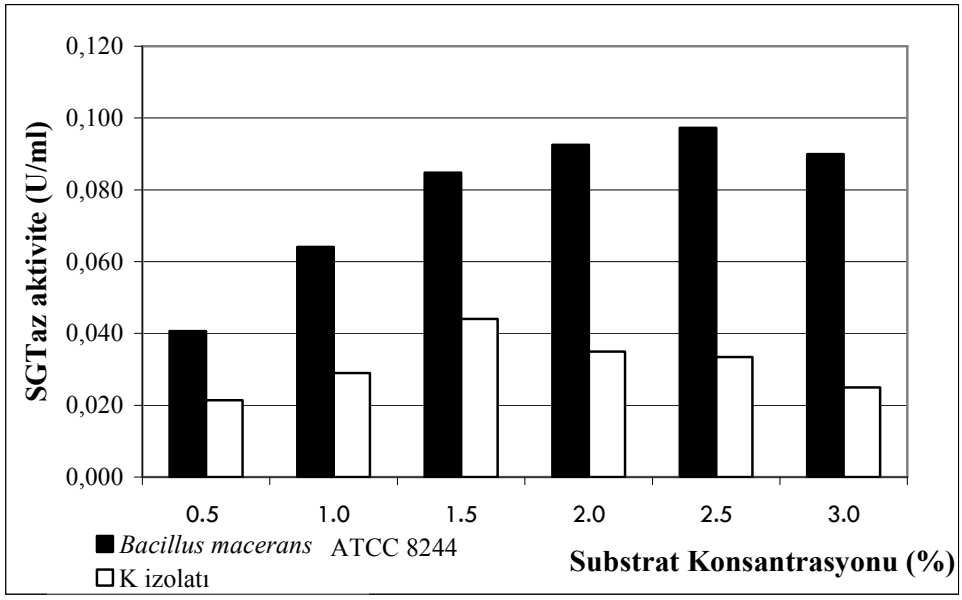
Higuti *et al.* (2003) *Bacillus firmus* ile yaptıkları bir çalışmada; SGTaz enzimini Ca^{+2}, Mg^{+2}, Fe^{+2}, Cu^{+2}, Mn^{+2} ve Zn^{+2} iyonlarının inhibe ettiğini, magnezyumun inhibitör etkisinin kalsiyumdan daha yüksek olduğunu ve en fazla inhibitör etkiyi Cu^{+2} ve Zn^{+2} iyonlarının gösterdiğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada ise, Ca^{+2} iyonu *Bacillus macerans* ATCC 8244 ve K izolatı tarafından üretilen SGTaz enziminin düşük oranda aktivite kaybına neden olmuş, buna karşın, *Paenibacillus* sp. F8 (Larsen *et al.* 1998) ve *Bacillus autolyticus* (Tomita *et al.* 1993) SGTazlarının Ca^{+2} iyonu varlığında aktivitelerini korudukları bildirilmiştir.

Yapılan bir diğer çalışmaya göre; ortama ilave edilen demir ve civa iyonları ile *Bacillus agaradhaerens* SGTaz'ın yüksek oranda aktivitesini kaybettiği belirtilmiştir (Martins and Kaul 2002). Uitdehaag *et al.* (1999) inhibitör etkinin enzimin siklizasyon reaksiyonunda önemli rol oynayan aminoasit rezidülerinin oksidasyonuna bağlı olarak oluştuğunu varsaymıştır.

4.13 Substrat Konsantrasyonun Enzim Üretimine Etkisi

Substrat konsantrasyonunun aktiviteye etkisinin incelendiği çalışmada, bakterilerin altı farklı konsantrasyonda substrat içeren besiyerlerindeki aktivite değerleri saptanmış ve sonuçlar Şekil 4.10'da verilmiştir. *Bacillus macerans* ATCC 8244 suşu için substrat olarak mısır nişastası, K izolatı için patates nişastası kullanılmıştır.



Şekil 4.10 Bakterilerin farklı konsantrasyonda substrat içeren besiyerlerindeki SGTaz aktiviteleri

Bacillus macerans ATCC 8244 suşunun en yüksek aktivitesi % 2.5 substrat konsantrasyonunda 0.097 U/ml olarak saptanmış, K izolatının aktivitesi ise % 1.5 substrat konsantrasyonuna kadar artmış ve bu koşullardaki SGTaz aktivitesi 0.044 U/ml olarak hesaplanmıştır. Subtsrat inhibisyonu *Bacillus macerans* ATCC 8244 suşu için % 3 substrat konsantrasyonunda, K izolatı için ise % 2 substrat konsantrasyonunda görülmektedir.

Freitas *et al.* (2004) tarafından yapılan bir çalışmada *Bacillus alkalophilic* CGII suşu ile SGTaz üretimi yapılmış ve substrat konsantrasyonun enzim üretimine etkisi araştırılmıştır.

Elde edilen bulgulara göre, en yüksek SGTaz aktivitesine % 1.5 nişasta içeren besiyerinde rastlanmıştır.

Pishtiyski *et al.* (2008) tarafından *Bacillus megaterium* ile yapılan bir başka çalışmada ise 30g/L substrat içeren besiyerinde SGTaz aktivitesinin 0.11 U/ml olduğu bildirilmiştir.

4.14 Siklodekstrin Glukanotransferaz Enzimin Saflaştırılması

Enzimin amonyum sülfat ile çöktürülerek ayrılması için kaba enzim sıvılarına ayrı ayrı % 0-20, % 20-30, % 30-40, % 40-45, % 45-50, % 50-55, % 55- 60, % 60-65, % 65-70, % 70-75, % 75-80, % 80-85 aralıklarında katı amonyum sülfat eklenmiştir. Amonyum sülfat çöktürmesinin her aralığında çökeltide ve süpernatantta enzim aktivitesine ve protein miktarına bakılarak uygun amonyum sülfat konsantrasyonu % 55-80 olarak belirlenmiştir. Kullanılan amonyum sülfat ortama yavaş yavaş ilave edilerek çökme gözle de izlenmiş ve işlem sonunda süpernatant 4°C'de bir gece bekletilmiştir.

Amonyum sülfat çöktürmesi ile oluşan pelletler 0.05 M sodyum fosfat tamponu (pH 6) ile çözündürülerek diyaliz tüpüne alınmış, ortamdaki amonyum sülfatın uzaklaştırılması amacı ile 0.05 M sodyum fosfat tamponuna karşı 4^{o}C'de 24 saat diyaliz edilmiştir. Diyaliz sonrasında diyaliz tüplerindeki çözeltilerde protein ve aktivite tayinleri yapılmıştır. İşlemler sonucunda elde edilen protein miktarı ve aktivite değerlerinden yararlanılarak spesifik aktivite, saflaştırma katsayısı ve verim değerleri hesaplanmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.7 ve 4.8'de verilmiştir.

Anlaşıldığı gibi, *Bacillus macerans* ATCC 8244 suşundan elde edilen süpernatanttın toplam aktivitesi 10.20 U iken amonyum sülfat çöktürmesi sonrası 2.71 U, diyaliz sonrası ise 1.40 U, toplam protein miktarları da sırasıyla 32.20, 0.750, 0.735 mg olarak bulunmuştur. Buna göre spesifik aktivite değerleri sırası ile 0.316, 3.613 ve 1.904 U/mg olarak hesaplanmıştır. Verim değerleri ise amonyum sülfat çöktürmesi sonrası % 26.56, diyaliz uygulaması sonrası % 13.72 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.7 *Bacillus macerans* ATCC 8244 suşunun saflaştırılması aşamalarında elde edilen sonuçlar

Saflaştırma Basamağı	Hacim (ml)	Enzim aktivite (U/ml)	Toplam Aktivite (U)	Protein (mg/ml)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Saflaştırma Katsayısı	Verim (%)
Süpernatant	100	0.102	10.20	0.322	32.20	0.316	1	100
%55−%80 $(NH_4)_2SO_4$	5	0.542	2.71	0.150	0.750	3.613	11.43	26.56
Diyaliz Ürünü	3.5	0.400	1.40	0.210	0.735	1.904	6.027	13.72

Çizelge 4.8 K izolatının saflaştırılması aşamalarında elde edilen sonuçlar

Saflaştırma Basamağı	Hacim (ml)	Enzim Aktivite (U/ml)	Toplam Aktivite (U)	Protein (mg/ml)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Saflaştırma Katsayısı	Verim (%)
Süpernatant	100	0.054	5.4	0.182	18.20	0.296	1	100
%55−%80 $(NH_4)_2SO_4$	5	0.305	1.525	0.11	0.55	2.773	9.367	28.24
Diyaliz Ürünü	3.5	0.202	0.707	0.193	0.755	1.047	3.536	13.09

K izolatı ile yapılan çalışmada 100 ml'lik süpernatanttan toplam 5.4 U enzim aktivitesi ve 18.20 mg protein elde edilmiş, amonyum sülfat çöktürmesi sonrası da toplam aktivite 1.525 U, protein miktarı da 0.55 mg olarak bulunmuştur. Diyaliz uygulaması ile enzim aktivitesi 0.707 U'ye düşmüş, ancak protein miktarı ise 0.193 mg'a yükselmiştir. Bu değerlere göre verim; amonyum sülfat çöktürmesi sonrası % 28.24, diyaliz uygulama sonrası ise % 13.09 olarak hesaplanmıştır.

Wind *et al.* (1995) *Themoanaerobium thermosulfurigenes* EM1'in SGTaz genini *E. Coli*'ye klonlayarak yaptıkları çalışmada 3 L' lik fermentörden toplam 324 U enzim aktivitesi ve 130 mg protein elde etmişler, süpernatantı doğrudan affinite kromatografisi ile

saflaştırmışlar ve bunun sonucunda da 225 U enzim aktivitesi ve 2.9 mg protein elde etmişlerdir.

Cao *et al.* (2004) tarafından yapılan araştırmada SGTaz üretimi için *Bacillus* sp. 7-12 ile çalışılmış, 500 ml süpernatanttan toplam $1.01x10^6$ U enzim aktivitesi ve 1675 mg protein elde edilmiş, amonyum sülfat çöktürmesi sonrası da toplam aktivite $5.05x10^5$ U, protein miktarı 320 mg, verim ise % 50 olarak bulunmuştur.

Sian *et al.* (2005) tarafından yapılan bir çalışmada *Bacillus* sp. G1 suşu kullanılarak SGTaz üretimi gerçekleştirilmiş, enzimin saflaştırılması için amonyum sülfat, affinite kromatografisi kullanılmış ve amonyum sülfat çöktürmesi sonrası % 39.57, kromatografi uygulaması sonrası ise % 4.18 verime ulaşılmıştır. Bu yüksek lisans çalışmasında ise amonyum sülfat sonrası elde edilen verim literatürdeki amonyum sülfat çöktürmesi sonrası ulaşılan verim değerinden daha düşük bulunmuştur.

Thiemann *et al.* (2004) tarafından yapılan araştırmada SGTaz üretimi için *Anaerbranca gottschalkii* suşu ile çalışılmış, 16 litre süpernatanttan toplam 273 U enzim aktivitesi ve 14.38 mg protein elde edilmiş, saflaştırma sonrası da toplam aktivite 37 U, protein miktarı 0.12 mg, verim ise % 13.5 olarak bulunmuştur.

Pishtiyski and Zhekova 2006 yılında yaptıkları bir çalışmada, *Bacillus megaterium* suşundan SGTaz üretimi gerçekleştirmişler ve süpernatantı vakum evaporasyonu ile 3 kat konsantre ederek enzim aktivitesini 1.61 U/ml olarak belirlemişlerdir.

5. SONUÇ

Bu çalışmada, *Bacillus macerans* ATCC 8244 suşu ve bazı toprak örneklerinden izole edilen K izolatının, ürettiği SGTaz'ın karakterizasyonu ve saflaştırılması gerçekleştirilmiştir.

Maksimum SGTaz aktivitesi *Bacillus macerans* ATCC 8244 için 65. saatte 0.100 U/ml, K izolatı için 48. saatte 0.048 U/ml olarak bulunmuş ve enzimlerin optimum sıcaklık ve pH değeri her iki bakteri içinde 60°C ve pH 6 olarak belirlenmiştir. *Bacillus macerans* ATCC 8244 maksimum SGTaz aktivitesini karbon kaynağı olarak mısır nişastası, azot kaynağı olarak NH_4NO_3 içeren besiyerinde, K izolatı ise karbon kaynağı olarak patates nişastası, azot kaynağı olarak $(NH_4)_2SO_4$ içeren besiyerinde göstermiştir. *Bacillus macerans* ATCC 8244 ve K izolatı SGTaz'ları, % 55-80 amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz ile sırasıyla % 26.56 ve % 28.24 verimle saflaştırılmıştır.

Bu iki bakterinin ürettiği enzim miktarının düşük düzeylerde olduğu ve besiyerinde yapılacak modifikasyonlarla aktivitenin arttırılabileceği saptanmıştır. Bu nedenle bu çalışmada bulunan sonuçlar daha sonra yapılacak olan benzer çalışmalara kaynak olması nedeniyle önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

Alcalde, M., Plou, F.J., Martin, M.T., Pedersen, S. and Ballesteros, A. 2001. Chemical modification of lysine side chains of cyclodextrin glycosyltransferase from Thermoanaerobacter causes a shift from cyclodextrin glycosyltransferase to alpha-amylase specificity. FEBS Letters, 445 (2-3); 333-7.

Arya, S.K. and Srivastava, S.K. 2006. Kinetics of immobilized cyclodextrin gluconotransferase produced by *Bacillus macerans* ATCC 8244. Enzyme and Microbial Technology, 39; 507-510.

Bertoldo, C. and Antranikian, G. 2002. Starch hidrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. Current Opinion in Chemical Biology, 6; 151-160.

Biwer, A., Antranikian, G. and Heinzle, E. 2002. Enzymatic production of cyclodextrins. Applied Microbiology and Biotechnology, 59; 609-617.

Cao, X., Jin, Z., Chen, F. and Wang, X. 2004. Purification and properties of cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus* sp. 7-12. Journal of Food Biochemistry, 28 (6); 463-475.

Cao, X., Jin, Z., Chen, F. and Wang, X. 2005. A novel cyclodextrin glycosyltransferase from an alkalophilic *Bacillus* species: purification and characterization. Food Research International, 38 (3); 309-314.

Del Walle, E.M.M. 2004. Cyclodextrins and their uses: a review. Process Biochemistry, 39; 1033-1046.

Freitas, T.L., Monti, R. and Contiero, J. 2004. Production of CGTase by a *Bacillus alkalophilic* CGII strain isolated from wastewater of a manioc flour industry. Brazilian Journal of Microbiology, 35; 255-260.

Fujita, Y., Tsubouchi, H., İnagi, Y., Tomita, K., Ozaki, A. and Nakanishi, K. 1990. purification and properties of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus* sp. AL-6. Journal of Fermentation and Bioengineering, 70; 150-154.

Gawande, B.N., Singh, R.K., Chauhan, A.K., Goel, A. and Patkar, A.Y. 1998. Optimization of cyclomaltodextrin glucanotransferase production from *Bacillus firmus*. Enzyme and Microbial Technology, 22; 288-291.

Georganta , G., Kaneko , T., Nakamura , N., Kudo, T. and Horikoshi, K. 1993. İsolation and partial properties of cyclomaltodextrin glucanotransferase-producing alkaliphilic *Bacillus* spp. from a deep-sea mud sample. Starch, 45 (3); 95-99.

Hedges, R.A. 1998. Industrial applications of cyclodextrins. Chemical Reviews, 98; 2035-2044.

Higuti, I., Grande, S. W., Sacco, R. and Nascimento, A.J. 2003. İsolation of alkalophilic CGTase-producing bacteria and characterization of cyclodextrin-glycosyltransferase. Brazilian Archives of Biology and Technology, 46 (2); 183-186.

Higuti, H.I., Silva, P.A., Papp, J., Okiyama, V.M.E., Andrade, E.A., Marcondes, A.A. and Aguinaldo, J.N. 2004. Colorimetric determination of α and β-cyclodextrins and studies on optimization of CGTase production from *B. firmus* using factorial design. Brazilian Archives of Biology and Technology, 47 (6); 837-841.

Ibrahim, H.M., Yusoff, W.M.W., Hamid, A.A., Illias, R.M., Hassan, O. and Omar, O. 2005. Optmization of medium for the production of β-cyclodextrin glucanotransferase using Central Composite Design. Process Biochemistry, 40; 753-758.

Illias, M.D., Fen, T.S., Abdulrashid, N.A., Yusoff, W.M.W., Hamid, A.A., Hassan, O. and Kamaruddin, K. 2002. Cyclodextrin glucanotransferase producing alkalophilic *Bacillus* sp. g1: its cultural condition and partial characterization of the enzyme. Pakistan Journal of Biological Sciences, 5 (6); 688-692.

Iyer, J.L., Shetty, P. and Jagadish, S.P. 2003. Immobilisation of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus circulans* ATCC 21783 on purified seasand. Journal of İndustrial Microbiology and Biotechnology, 30 (1); 47-51.

Jemli, S., Messaoud, E.B., Mabrouk, S.B. and Bejar, S. 2008. The cyclodextrin glycosyltransferase of *Paenibacillus pabuli* us132 strain: Molecular characterization and overproduction of the recombinant enzyme. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 692573.

Karademir A., Akgül, M. ve Tutuş, A. 2002. Kağıt Endüstrisinde Enzim Kullanımına Genel Bir Bakış:Enzimlerin Kabuk Soyma, Liflerin Modifikasyonu, Çözünebilir Kağıt Hamuru ve Selüloz Üretiminde Kullanımı. KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi, 5 (1); 61-71.

Kim, W., Chae, H., Park, C. and Lee, K. 2003. Stability and activity of cross-linking enzyme crystals of cyclodextrin glucanotransferase isolated from *Bacillus macerans*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 26; 287-292.

Larsen, K.L., Duedahl-Olesen, L., Christensen, H.S., Mathiesen, F., Pedersen, L.H. and Zimmermann, W. 1998. Purification and characterisation of cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus* sp. F8. Carbohydrate Research, 310 (3); 211-219.

Lennete, E.H., Balows, A., Hausler, J.W.J.R. and Shadomy, J.H. 1985. Manual of Clinical Microbiology. Vol. 4., 1149p., Amerika.

Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. Journal of Biology and Chemistry, 193; 265-275.

Martins, R.F. and Hatti-Kaul, R. 2002. A new cyclodextrin glycosyltransferase from an alkalophilic *Bacillus agaradhaerens* isolate: purification and characterization. Enzyme and Microbial Technology, 30 (1); 116-124.

Pishtiyski, I. and Zhekova, B. 2006. Effect of different substrates and their preliminary treatment on cyclodextrin. World Journal Of Microbiology and Biotechnology, 22 (2); 109-114.

Pishtiyski, I., Popova, V. and Zhekova, B. 2008. Characterization of cyclodextrin glucanotransferase produced by *Bacillus megaterium*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 144; 263-272.

Pocsi, I., Nogrady, N. and Szentirmai, A. 1998. Assay for simultaneous determination of β-cyclodextrin glycosyltransferase (β-CGTase) and amylase. Starch, 50; 36-38.

Prasad, N., Strauss, D. and Reichart, G. 1999. Cyclodextrins inclusion for food, cosmetics and pharmaceuticals, European Patent 1084625.

Qi, Q., She, X., Endo, T. and Zimmermann, W. 2004. Effect of the reaction temperature on the transglycosylation reactions catalyzed by the cyclodextrin glucanotransferase from Bacillus macerans for the synthesis of large-ring cyclodextrins. Biocatalysts in Synthetic Organic Chemistry, 60 (3); 799-806.

Qi, Q. and Zimmermann, T. 2005. Cyclodextrin glucanotransferase: from gene to applications. Applied Microbiology and Biotechnology, 66; 475-485.

Rosso, M.A., Ferrarotti, S.A., Krymkiewicz, N. and Nudel, B.C. 2002**.** Optimisation of batch culture conditions for cyclodextrin glucanotransferase production from *Bacillus circulans* DF 9R. Microbial Cell Factories, 1 (3).

Savergave, L.S., Dhule, S.S., Jogdand, V.V., Nene, S.N. and Gadre, R.V. 2008. Production and single step purification of cyclodextrin glycosyltransferase from alkalophilic Bacillus firmus by ion exchange chromatography. Biochemical Engineering Journal, 39; 510-515.

Sian, H.K., Said, M., Hassan, O., Kamaruddin, K., Ismail, A.F., Rahman, R.A., Mahmood, N.A.N. and Illias, M.R. 2005. Purification and characterization of cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. G1. Process Biochemistry, 40 (3-4); 1101-1111.

Singh, M., Sharma, R. and Banerjee, U.C. 2002. Biotechnological applications of cyclodextrins. Biotechnology Advances, 20 (5-6); 341-359.

Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E and Holl, J.G. 1986. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2., 1104–1207 p., Baltimore.

Sojo, M.M., Nunez, E., Garcia, F. and Sanchez, A. 1999 . Cyclodextrins as activator and inhibitor of latent banana pulp polyphenol oxidase. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47; 518-523.

Stella, V.J. and Rajewski, R.A. 1997. Cyclodextrins: their future in drug formulation and delivery. Pharmaceutical Research, 14; 556-5567.

Szejtli, J. 1989. Downstream processing using cyclodextrins. Trends in Biotechnology, 7 (7); 170-174.

Szejtli, J. 2004. Past, present, and future of cyclodextrin research. Pure and Applied Chemistry. 76 (10); 1825-1845.

Szente, L. and Szejtli, J. 2004. Cyclodextrin as food ingredients. Food Science and Technology, 15; 137-142.

Temizkan, G. ve Arda, N. 2004. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Nobel Tıp Kitabevleri, 186, İstanbul.

Thatai, A., Kumar, M. and Mukherjee, J.K. 1999. A single step purification process for cyclodextrin glucanotransferase from a *Bacillus* sp. isolated from soil. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 29 (1); 35-47.

Thiemann, V., Dönges, C., Prowe, S.G., Sterner, R. and Antranikian, G. 2004. Characterisation of a thermoalkali-stable cyclodextrin glycosyltransferase from the anaerobic thermoalkaliphilic bacterium *Anaerobranca gottschalkii*. Archives of Microbiology, 182 (2-3); 226-235.

Tomita, K., Kaneda, M., Kawamura, K. and Nakanishi, K. 1993. Purification and properties of a cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus autolyticus* 11149 and selective formation of beta-cyclodextrin. Journal of Fermentation and Bioengineering, 75 (2); 89-92.

Tonkova, A. 1998. Bacterial cyclodextrin glucanotransferase. Enzyme and Microbial Technology, 22; 678-686.

Uitdehaag, J.C.M., Kalk, H.K., Veen, B.A., Dijkhuizen, L. and Dijkstra, B.W. 1999. The cyclization mechanism of cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) as revealed

by a γ-cyclodextrin-CGTase complex at 1.8-Å resolution. The Journal Of Biological Chemistry, 274 (49); 34868-34876.

Wan, S.W.Z. 2005. Production of cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. ts1-1 using fed batch culture. Master thesis. Faculty of Chemical and Natural Resources Engineering University Technology, University of Technology, 190 p., Malaysia.

Wind, R.D., Liebl, W., Buitelaar, R.M., Penninga, D., Spreinat, A., Dijkhuizen, L. and Bahl, H. 1995. Cyclodextrin formation by the thermostable α-amylase of *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1 and reclassification of enzyme as a cyclodextrin glycosyltransferase. Applied and Environmental Microbiology, 61 (4); 1257-1265.

Wiseman, A. 1987. Handbook of Enzymes Biotechnology. Second Edition. Chapter 3. The Application of Enzymes in Industry. 274-373.

Woo R.A.M., Trinh T., Cobb, D.S., Schneiderman E., Wolff, A.M., Rosenbalm E.L., Ward T.E., Chung, A.H. and Reece, S. 1999. Uncomplexed cyclodextrin compositions for odour control, US Patent 5942217.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Dilek CEYLAN
Doğum Yeri : Çine
Doğum Tarihi : 1983
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce
Eğitim Durumu:

Lise : Mehmet Tuncer Anadolu Lisesi, Aydın (1997-2001)
Lisans : Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü (2001-2005)
Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı (Şubat 2006-Şubat 2009)