SMF (SUBMERGED FERMENTATION) YÖNTEMİ İLE TOPRAKTAN İZOLE EDİLEREK TANIMLANAN *Bacillus subtilis*'TEN α-AMİLAZ ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

VEYSİ ORTAKAYA

TEMMUZ 2022

DİYARBAKIR

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SMF (SUBMERGED FERMENTATION) YÖNTEMİ İLE TOPRAKTAN İZOLE EDİLEREK TANIMLANAN *Bacillus subtilis*'TEN α-AMİLAZ ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

VEYSİ ORTAKAYA

DİCLE ÜNİVERSİTESİ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM-ÖĞRETİM VE SINAV
YÖNETMELİĞİNİN BİR PARÇASI OLARAK
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALINDA
DOKTORA TEZİ
OLARAK HAZIRLANMIŞTIR

TEMMUZ 2022

DİYARBAKIR

SMF (SUBMERGED FERMENTATION) YÖNTEMİ İLE TOPRAKTAN İZOLE EDİLEREK TANIMLANAN *Bacillus subtilis*'TEN α-AMİLAZ ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Veysi ORTAKAYA tarafından Dicle Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin bir parçası olarak hazırlanan bu çalışma aşağıda bilgileri yazılı jüri üyeleri tarafından değerlendirilerek **Biyoloji Ana Bilim Dalı**'nda **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Neslihan Dalkılıç _____
Müdür, **Fen Bilimleri Enstitüsü**

Doç. Dr. Sema FİNCAN _____
Danışman, **Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Dicle Üniversitesi**

Sınav Jürisi:

Prof. Dr. Veysel TOLAN**(*)** _____
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Dicle Üniversitesi

Doç. Dr. Sema FİNCAN**(**)** _____
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Dicle Üniversitesi

Prof. Dr. Göksel KIZIL _____
Kimya Bölümü, Dicle Üniversitesi

Prof. Dr. Abdurrahman DÜNDAR _____
Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, MardinArtuklu Üniversitesi

Doç. Dr. Nurullah AKCAN _____
Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Siirt Üniversitesi

ONAY

SavunmaTarihi:18 / 07 / 2022

(*) Sınav Jürisi kısmının birinci satırına Jüri Başkanının bilgilerini yazınız.
(**) Sınav Jürisi kısmının ikinci satırına Tez Danışmanının bilgilerini yazınız.

Anneme ve Babama

Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tez çalışmasında yer alan tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu beyan ederim. Ayrıca, bahse konu bu kural ve ilkelerin gerektirdiği üzere, bu çalışmada özgün olmayan tüm bilimsel içerikleri kurallara uygun biçimde alıntılayıp kaynak gösterdiğimi beyan ederim. Beyanımla çelişen herhangi bir delil bulunduğu takdirde tüm sorumluluğu üstleneceğimi kabul ederim.

Ad, Soyad: Veysi ORTAKAYA

İmza: …….……

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgi ve engin deneyimlerinden faydalandığım, sonsuz sabrı ve toleransı için kıymetli tez danışmanım Doç. Dr. Sema Agüloğlu Fincan'a çalışmalarım esnasındaki olumlu yönlendirmelerinden, vermiş olduğu her türlü destekten, bilgi ve tecrübelerini paylaştığından dolayı kendisine şükran ve saygılarımı sunarım.

Çalışma süresince yakın desteğini gördüğüm, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Dr. Öğrt. Üyesi Barış Enez'e teşekkür ederim.

Tez çalışmamın deneysel kısmında ve tez yazma sürecinde sürekli yanımda olan ve desteklerinden dolayı Dr. A. İsmail Özkan, Dr. Murat Evcil ve Dr. Hüsamettin Aygün'e teşekkür ederim. Biyoloji Anabilim Dalında doktora yapan kıymetli arkadaşım Feysel Çakmak'a, ve her zaman yanımda olan Eşref Özer'e teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde maddi ve manevi büyük katkıları olan anneme ve babama sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR v
İÇİNDEKİLER vi
ŞEKİLLER LİSTESİ x
TABLOLAR LİSTESİ xi
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ xii
ÖZET xiv
ABSTRACT xv
1. GİRİŞ 1
2. KAYNAK ÖZETLERİ 6
2.1 Biyoteknoloji 6
2.2 Enzimler 8
2.2.1 Enzimlerin sınıflandırılması ve isimlendirilmesi 11
2.3 Amilazlar 13
2.3.1 α-Amilazlar 14
2.3.2 β-Amilazlar 14
2.3.3 γ-Amilazlar 15
2.4 α-Amilaz Enziminin Endüstriyel Kullanım Alanları 15
2.5 Mikroorganizma 17
2.5.1 *Bacillus* cinsi ve bazı özellikleri 17
2.6 Enzim Saflaştırma 18
2.7 Santrifüjleme 18
2.8 Amonyum Sülfatla Çöktürme 18
2.9 Diyaliz 18
2.10 Önceki Çalışmalar 18
3. MATERYAL VE METOT 31

3.1 Materyal 31
3.1.1 Kullanılan cihazlar 31
3.1.2 Kullanılan mikroorganizma 31
3.1.3 Bakterinin izolasyonunda ve enzim eldesinde kullanılan besi yerleri ve kimyasal maddeler 31
3.1.4 Karbon kaynakları 32
3.1.5 Kullanılan çözeltiler 32
3.1.6 SDS-PAGE işleminde kullanılan çözeltiler 33
3.2 Metot 35
3.2.1 Bakteri izolasyonu ve teşhisi 35
3.2.2 Enzim eldesi 35
3.2.3 α-Amilazaktivite tayini 36
3.2.4 Protein miktar tayini 36
3.2.5 Nişasta hidroliz testi 36
3.2.6 Gram boyama 36
3.2.7 Üreaz testi 37
3.2.8 Hareket testi 37
3.2.9 Katalaz testi 37
3.2.10 İnkübasyon süresinin mikroorganizma gelişimi üzerinde etkisi 38
3.2.11 Mikroorganizma gelişimi üzerine sıcaklığın etkisi 38
3.2.12 Mikroorganizma gelişimi üzerinepH'nınetkisi 38
3.2.13 İnkübasyon süresinin α-amilaz üretimine etkisi 38
3.2.14 Sıcaklığın α-amilaz üretimine etkisi 39
3.2.15 pH'nın α-amilaz üretimine etkisi 39
3.2.16 Sıcaklığın α-amilaz aktivitesi üzerine etkisi 40
3.2.17 α-amilaz aktivitesi üzerine ph etkisi 40
3.2.18 Enzim üretimi üzerinde karbon kaynaklarının etkisi 41

3.2.19 Enzim üretimi üzerinde azot kaynaklarının etkisi 41
3.2.20 Metal iyonlarınınα-amilaz aktivitesine etkisinin belirlenmesi 41
3.2.21 Deterjanların α-amilaz aktivitesine etkisinin belirlenmesi 42
3.2.22 İnhibitör maddelerin α-amilaz aktivitesine etkisinin belirlenmesi 42
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 43
4.1 Bakteri İzolasyonu ve İdentifikasyonu 43
4.1.1 *Bacillus subtilis*bakterisinin izolasyonu 43
4.1.2 *Bacillus subtilis*bakterisinin identifikasyonu 44
4.2 *Bacillus subtilis* Besi Ortamının Optimize Edilmesi 48
4.2.1 İnkübasyon süresinin mikroorganizma çoğalmasında etkisi 48
4.2.2 Sıcaklık değişiminin mikroorganizma gelişimi üzerineetkisi 50
4.2.3 pH değişikliğinin mikroorganizma gelişimi üzerine etkisi 50
4.3 *Bacillus subtilis*'den Elde Edilen α -Amilaz Optimizasyonu 52
4.3.1 Farklı inkübasyon sürelerinin α-amilaz üretimi üzerine etkisi 52
4.3.2 Sıcaklık değişiminin α-amilaz aktivitesi üzerine etkisi 53
4.3.3 Farklı pH'ların α-amilaz aktivitesi üzerine etkisi 54
4.3.4 Farklı karbon kaynaklarının enzim üretimi üzerine etkisi 55
4.3.5 Farklı azot kaynaklarının enzim üretimi üzerine etkisi 56
4.4 α-Amilazın Saflaştırılması 57
4.5 Bazı Metallerin α-Amilaz Üzerine Etkisi 58
4.6 Farklı Deterjanların Saf Enzim Üzerine Etkisi 59
4.7 İnhibitör Maddelerin α-Amilaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi 60
4.8 pH Stabilitesinin Belirlenmesi 61
4.9 Enzime Ait Sıcaklık Stabilitesinin Belirlenmesi 63
4.10 Substrat Özgüllüğü Ve Kinetik Parametrelerin Hesaplanması 64
4.11 Elektroforez İşlemi 65
4.12 *Bacillus subtilis* α-Amilazına Ait Molekül Ağırlığının Belirlenmesi 65

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 67
KAYNAKLAR 74
ÖZGEÇMİŞ 83

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1 Biyoteknolojinin diğer bilimlerle olan ilişkisi 7
Şekil 2.2 Enzim substrat ilişkisi (OpenStax College, Biology, CC BY 3.0'den uyarlandı.) 11
Şekil 2.3 Alfa amilazın nişastayı hidrolizi 15
Şekil 4.1 *B. subtilis*'e ait koloni görünümü 43
Şekil 4.2 *B. subtilis* A8 bakterisine ait sınıflandırma 44
Şekil 4.3 *Bacillus subtilis*. A8'nin filogenetik ağacı 44
Şekil 4.4 Bacillus subtilis'in nişastalı agarda α-amilaz varlığının tespiti 45
Şekil 4.5 *Bacillus subtilis*'in Gram boyamasına ait mikroskop görüntüsü 46
Şekil 4.6 *Bacillus subtilis*'in üreaz testi sonucu 46
Şekil 4.7 *Bacillus subtilis*'in hareket testi 47
Şekil 4.8 *Bacillus subtilis*'in katalaz testi 48
Şekil 4.9 *Bacillus subtilis*'in hemoliz testi 48
Şekil 4.10 İnkübasyon süresinin mikroorganizma gelişimi üzerinde etkisi 49
Şekil 4.11 Sıcaklığın mikroorganizma gelişimi üzerine etkisi 50
Şekil 4.12 pH değişiminin mikroorganizma çoğalması üzerine etkisi 51
Şekil 4.13 Bakteriyel enzim üretimi üzerine farklı inkübasyon sürelerinin etkisi 53
Şekil 4.14 Enzim aktivitesi üzerine farklı sıcaklıkların etkisi 54
Şekil 4.15 Enzim aktivitesi üzerine farklı pH'ların etkisi 55
Şekil 4.16 Enzim üretimi üzerine farklı karbon kaynaklarının etkisi 56
Şekil 4.17 Enzim üretimi üzerine azot kaynaklarının etkisi 57
Şekil 4.18 Bazı metallerin enzim aktivitesi üzerine etkisi 59
Şekil 4.19 Deterjanların etkisi enzim aktivitesi üzerine 60
Şekil 4.20 Enzime ait pH stabilitesi grafiği 62
Şekil 4.21 Enzime ait sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi 64
Şekil 4.22 Km ve Vmax değerleri 65
Şekil 4.23 SDS-PAGE Sonuçları a)Standart proteinler; 1.Fosforilaz (97 kDa); 2.Bovin serum albumin (66 kDa); 3.Albumin (yumurta) (45 kDa), b) Diyaliz; c) DEAE selüloz kolonu 66

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3.1 Çalışma kapsamında kullanılan cihazlar..... 31
Tablo 3.2 Günlük çalışılacak lugol solüsyonu 33
Tablo 4.1 *Bacillus subtili*s α-amilaz saflaştırma aşamaları..... 58
Tablo 4.2 İnhibitör ajanların α-amilaz aktivitesi üzeriene olan etkisi..... 61

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

Simge	**Açıklama**
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
nm	Nanometre
µmol	Mikromol
U	Ünite
nm	Nanometre
µmol	Mikromol
ºC	Santigrat derece

Kısaltma	**Açıklama**
BSA	Bovin serum albümin
NB	Nutrient Broth
NBA	Nutrient Broth Agar
M	Molarite
EC	Enzim sınıflandırna
g	Gram
mg	Miligram
mM	Milimolar
L	Litre
MA	Molekül ağırlığı
OD	Optik yoğunluk
rpm	Dakikadaki devir sayısı
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
TEMED	N, N, N, N-tetrametiletilendiamin

PMSF	Fenil metil sulfonil florid
3,5 DNS	Dinitro salisilik asit
SDS	Sodyum dodesil sülfat
FCR	Folin reaktifi

ÖZET

SMF (SUBMERGED FERMENTATION) YÖNTEMİ İLE TOPRAKTAN İZOLE EDİLEREK TANIMLANAN *Bacillus subtilis*'TEN α-AMİLAZ ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Ortakaya, Veysi
Doktora, Biyoloji Bölümü
Danışman: Doç. Dr. Sema FİNCAN
Temmuz 2022, 100 sayfa

Çalışmamızda kullanılmak üzere Ergani'de bulunan Makam Dağı'ndan toprak örneği alınmıştır. Alınan toprak örneğinden bakteri izolasyonu gerçekleştirilmiştir.İzole edilmiş mikroorganizma üzerinde bazı biyokimyasal analizleri uygulanmış ve 16S rRNA tanımlanması yapılmıştır. Elde edilen veriler sonucunda, izole edilmiş olan bakterinin *Bacillus subtilis* olduğu belirlenmiştir. SmF tekniği ile üretilen *Bacillus subtilis* izolatına ait α-amilaz üretimi üzerine çeşitli parametrelerin etkisi araştırılarak optimum koşulları belirlenmiştir. Bakteri çoğalmasına ait optimum koşulların süre bakımından 32. saat, sıcaklık bakımından 37°C ve pH bakımından da pH 7.0 olduğu belirlenmiştir. Enzimin maksimum düzeyde üretildiği süre olarak belirlenen 48. saatte bakteri çoğaltma işlemi gerçekleştirilmiştir. Kültüre edilmiş olan bakteriden üst sıvı alınarak α-amilaz aktivite çalışması yapılmıştır. Enzimin aktivite gösterdiği optimum pH'sı 7.0 ve optimum sıcaklık da 37°C olarak belirlenmiştir. Bakteri tarafından kullanılacak azot ve karbon kaynaklarının enzim üretimindeki etkisi incelenmiştir. Elde edilen verilere göre azot kaynaklarını kullanan bakteriden kontrole kıyaslandığında daha düşük amilaz aktivitesi belirlenmiştir. Azot kaynakları arasında amonyum nitrat ve amonyum sulfat eklenmesiyle en yüksek spesifik aktivite gözlenmiştir. Enzim üretimi üzerine karbon kaynaklarının etkisine bakıldığında ise galaktoz değerinin kontrole yakın bir değer gösterdiği ve diğer karbon kaynaklarında ise enzim üretiminin azaldığı görülmüştür. Enzimin optimum koşulları belirlendikten sonra saflaştırma işlemine geçildi. Saflaştırılan amilazın molekül ağırlığı SDS-PAGE ile ~73 kDa olarak tespit edildi. Deterjanların bazılarının, saflaştırılan enzim aktivitesi üzerine etkisini saptamak için 0.005'lik Tween-40, SDS, TritonX-100, Tween-8 ve brij kullanılmıştır. Kullanılan deterjanlardan SDS'nin önemli ölçüde amilaz enzimini inhibe ettiği görüldü. Bazı metallerin, saflaştırılan enzim aktivitesi üzerindeki etkisi incelendiğinde $CaCl_2$'nin aktiviteyi arttırdığı, $MnCl_2$ ve $MgCl_2$ metallerinin eklenmesi sonucunda herhangi bir değişiklik gözlenmediği, $FeCl_2$, $CuCl_2$, $ZnCl_2$ ve $HgCl_2$ metallerinin eklenmesiyle de enzim aktivitesinin önemli ölçüde inhibe edildiği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus subtilis*, İzolasyon, α-amilaz, Saflaştırma, Submerged Fermantasyon (SmF)

ABSTRACT

ISOLATION PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF EXTRACELLULAR α-AMYLASE FROM *Bacillus subtilis* ISOLATED FROM THE SOIL WITH SMF (SUBMERGED FERMENTATION) METHOD

Ortakaya, Veysi
Doctor of Philosophy in Department of Biology
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Sema FİNCAN
July 2022, 100 pages

Soil samples were taken from Makam Mountain in Ergani to be used in our study. Bacteria isolation from the soil sample taken from Makam Mountain was made in the laboratory under sterile conditions. Some biochemical analyzes were performed on the isolated microorganism and 16S rRNA was identified. As a result of the data obtained, it was determined that the isolated bacterium was *Bacillus subtilis*. Optimum conditions were determined by investigating the effect of various parameters on α-amylase production of *Bacillus subtilis* isolate produced by SmF technique. It was determined that the optimum conditions for bacterial growth were 32 hours in terms of time, 37°C in terms of temperature and pH 7.0 in terms of pH. Bacterial replication was carried out at the 48th hour, which was determined as the time during which the enzyme was produced at the maximum level. α-amylase activity study was performed by taking the supernatant from the cultured bacteria. The optimum pH at which the enzyme was active was determined as 7.0 and the optimum temperature was 37°C. The effect of nitrogen and carbon sources to be used by bacteria on enzyme production was investigated. According to the data obtained, lower amylase activity was determined from the bacteria using nitrogen sources compared to the control. Among the nitrogen sources, the highest specific activity was observed with the addition of ammonium nitrate and ammonium sulfate. When the effect of carbon sources on enzyme production was examined, it was seen that the galactose value showed a value close to the control and the enzyme activity decreased in other carbon sources. After the optimum conditions of the enzyme were determined, the purification process was started. The molecular weight of the purified amylase was determined as ~73 kDa by SDS-PAGE.To determine the effect of some detergents on the purified enzyme activity, 0.005 Tween-40, SDS, TritonX-100, Tween-8 and brige were used. It was observed that SDS, one of the detergents used, inhibited the amylase enzyme significantly. When the effect of some metals on the purified enzyme activity was examined, it was determined that $CaCl_2$ increased the activity, no change was observed as a result of the addition of $MnCl_2$ and $MgCl_2$ metals, and the enzyme activity was significantly inhibited by the addition of $FeCl_2$, $CuCl_2$, $ZnCl_2$ and $HgCl_2$ metals.

Keywords: *Bacillus subtilis*, Isolation, α-amylase, Purification, Submerged Fermentation (SmF)

1. GİRİŞ

Canlı sistemlerdeki reaksiyon işlemlerinin katalizörleri, enzimlerdir. Biyokimyasal işlemlerin organizmada canlılık ile uyum içerisinde meydana gelmesini sağlayan küçük bir grup katalitik RNA molekülleri dışında protein yapılı kimyasal moleküllerdir. Enzimlerin, hücre içerisinde metabolik olarak oldukça önemli görevleri olmakla birlikte farklı amaçlarla ekonomik ve günlük hayatımızda da kullanılmaktadır (Kıran vd., 2006). Enzimler, biyoteknolojinin gelişmesiyle birlikte mikroorganizmalar aracılığıyla insanların ihtiyaçları için temin edilen en önemli ürünlerden biridir. Çevresel, gıda ve endüstriyel biyoteknolojisi gibi birçok önemli alanlarda kullanılmaktadırlar (Pandey vd., 1999).

Mikroorganizmaların farklılıkları ile genetik yönlendirmelere uygunluğu gibi nedenlerden dolayı eşsiz bir enzim deposu olarak değerlendirilmektedirler. Endüstriyel enzimin yaklaşık %90'ı, mikrobiyal fermantasyon yöntemiyle elde edilmektedir (Gupta vd., 2003).

Bitki orjinli enzimlerin elde edilmesi işleminde olduğu gibi hayvan orijinli enzimlerin elde edilmesi işleminde de kesimlik amacıyla yetiştirilen hayvanların kontrolünü yapan zirai ve politik kuruluşların uyguladıkları politikalar etkin rol oynamaktadır. Hayvansal dokuların ve hayvanların bir ülkeden diğer ülkeye taşınmasında çoğu ülkede katı kısıtlamaların uygulanmasına neden olan yerli ticari hayvan popülasyonlarının korunmasıdır. Bununla birlikte özellikle viral hastalıkların hayvansal dokular ve hayvanlar yoluyla bir ülkeden başka bir ülkeye yayılması da büyük endişelere yol açmaktadır. Bütün bu nedenlerden dolayı hayvansal ürün ve hayvan ticareti oldukça sınırlandırılmaktadır. Hayvansal ve bitkisel kaynaklı enzimlerin üretilmesi sırasında karşılaşılan bu sorunlar, mikroorganizma kaynaklı enzimlere olan ilginin artmasına yol açmıştır.

Enzim molekülleri genel olarak globüler yapıda bulunmaktadır. Molekül arası ve içi bağlarla sekonder veya tersiyer yapıda tutulurlar. Sıcaklık ve pH daki değişmeler, proteinlerin sahip oldukları bu yapıların bozulmasına neden olur. Bu nedenle, enzimlerin katalitik aktiviteleri sıcaklık ve pH'ya duyarlıdır. Reaksiyona girecek moleküllerin kinetik enerjilerinin yüklenmesi, sıcaklığın yükselmesi ile olur. Böylece

moleküllerin reaksiyon sırasında karşılaşmalarını ve etkileşime girme olasılıklarını artırır.

Biyoteknoloji, bitki, insan ve hayvan hücrelerinin işlevlerini anlama ve değiştirme gayesiyle uygulanan değişik yöntemleri ve işlemleri tanımlamada kullanılmaktadır. Başta mikrobiyoloji olmak üzere sırasıyla protein mühendisliği, moleküler biyoloji, biyokimya, immünoloji, hücre biyolojisi, biyoproses teknolojileri ve enzimoloji gibi çeşitli alanları bünyesinde toplayabilmektedir.

Günümüzde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler günlük ihtiyacımız olan ekmek, bira, bebek gıdaları üretimi, peynir, meyve suyu, alkollü içecekler, süt üretimi, çeşitli deterjan, hijyen maddelerinin üretiminde, tıpta tedavi ve teşhis gibi birçok önemli alanlarda kullanılmaktır (Gupta, 2003). Bununla birlikte kağıt, kimya, biyoyakıt, nişasta, fotoğraf endüstrisi, kauçuk, kontak lens solüsyonlarında, ziraatte, biyolojik savaşa kadar enzimlerin çok geniş kullanım alanı bulunmaktadır. Organik kimyada yapılması çok zor olan birçok reaksiyonun uygun ve spesifik enzimlerle daha kolay bir şekilde gerçekleştirilebilmesi, hücrelerden enzimlerinelde edilerek farklı amaçlarda kullanılabileceği fikrini oluşturmuştur (Adams, 1983).

Wiseman (1987)'e göre enzimlerin çok geniş alanlarda kullanılabilmesinin sebebi; in vitro ortamda aktif kalması, birbirinden değişik alanlarda kullanılabilirlik özelliğine sahip olması, maliyet bakımından ucuz olması vede en önemlisi enzimin toksik ya da alerjik bir etkiye sahip olmamasına bağlıdır.

Ayrıca gerek endüstriyel enzim üretiminde gerekse kullanımında önemli artış gözlenmektedir. Biyoteknolojik işlemlerin gelişmesi sonucunda hayvansal, bitkisel ve mikrobiyal kaynaklı enzimler ucuz ve kontrollü olduğundan hayvansal ve bitkisel kaynaklı enzimlere alternatif olarak kullanılmaya başlanmıştır (Üstünes ve Güvenç, 1985).

Enzim kaynağı bakımından çok önemli bir potansiyele sahip olmalarından dolayı mikrobiyal hücreler, üstünlük sağlarlar. Büyük miktarda üretime imkan verecek yöntemlerle çoğaltılabilirler. Aynı zamanda mikrobiyal hücrelerin bölünme süreleri

çok kısa olmasından dolayı üretim süreçleri oldukça kolay bir şekilde pazarlanabilmektedir (Woodley, 2000). Bugün endüstride bulunan enzimlerin tahmine %90'ı mikrobiyal fermantasyon ile üretilmektedir (Gupta vd., 2003).

Endüstriyel olarak önemli olan birçok kimyasal işlemler basınç ve yüksek sıcaklık gibi ekstrem ortamlarda gerçekleşmesinden dolayı bunlara alternatif olaraksert koşullara dayanabilen enzimlere gereksinim duyulmaktadır (Chibata, 1980). Rekombinant DNA teknolojisi, stratejik bir alan olarak değerlendirilmektedir. Bu teknolojinden faydalanılarak, enzim kullanımı giderek yaygınlaşmış ve üretimi de büyük miktarlara ulaşmıştır (Gessese, 1999).

Bazı gıda ürünleri ve temizlik maddelerine katılan enzimlerin, uzun süre stabilitelerini koruyabilmeleri, deterjanların yapısındaki kimyasal maddelere karşı yapılarını koruyabilmeleri ve yüksek sıcaklığa dayanıklı olması gerekmektedir. Doğal olarak bu özelliklere sahip olmayan enzimler, rekombinant DNA teknolojisi yardımıyla daha dayanıklı halde elde edilmeye çalışılmaktadır (Aehle, 2004).

Endüstride en fazla kullanılan enzimler, nişasta endüstrisinde kullanılmakta olan amilazlardır. Amilazlar, endüstride kullanılan enzimlerin %25'ine denk gelmektedir (Crabb ve Mitchinson, 1997; Nigam ve Singh, 1995; Rao vd., 1998; Sarıkaya ve Gürgün, 2000). Nişasta endüstrisinde nişastanın diğer ürünlere ve glikoza parçalanması sürecinde ve modifikasyonunda termostabil amilolitik enzimlerin (glikoamilaz, amilaz, pullulanaz ve izoamilaz) en çok kullanıldığı alandır. α-Amilaz (EC 3.2.1.1), glikojen ve nişasta moleküllerini hidrolize eden ekstrasellüler bir enzimdir. Bilinen en eski ve önemli enzimler olan amilazlar endüstride bira ve ekmek yapımında, fruktoz ve/veya glukoz şurup üretiminde, nişasta, tekstil, deterjan, eczacılık, kağıt endüstrisi, klinik ve analitik alanlarda geniş çapta kullanılmaktadırlar (Fukara, 2007).

Endüstrideki alanlarda genel olarak mikrobiyal kaynaklı enzimler kullanılnaktadır. Bunun nedeni fermantasyon ortamının da ucuz olması, mikrobiyal kaynaklı enzimlerin hayvansal veya bitkisel kaynaklı enzimlere göre çok daha kolay elde edilebilmesi ve fermantasyon süresinin kısa olmasıdır (Telefoncu, 1997). Mikrobiyal

hücreler, doğrudan doğadan izole edildiği gibi kültür koleksiyonlarından hazır olarak da temin edilebilir (Colton, 1996).

Mikrobiyal amilazların kaynağının üretimi ve optimize edilmesi batık fermantasyon ve katı hal fermantasyonu tarafından incelenmiştir. Batık fermantasyonda orta düzey sentetik kullanılırken katı hal fermentasyonunda çok kalitesiz ucuz substratlar kullanılır.

Bu sentetik kültür ekonomik olmayıp pahalıdır bu yüzden acil bir şekilde ekonomik olarak kullanılabilir sanayiye ve tarıma yerleştirilmelidir. Amilazlar bazı yeni özellikli çeşitli mikrobiyal kaynaklardır. Bu eşsiz özellikler optimumum sıcaklık termo tolerans optimum tuzluluk ve pH optimasını kapsar. Bacillus'tan türeyen bakteri çeşitli amilazlar üretir. Bu amilazların endüstride çeşitli uygulamaları vardır ve son yıllarda kültür ortamının optimizasyonuna odaklanmıştır.

Amilazlar eczacılıkta ekmek hazırlamada, fırıncılık sektöründe kullanılır. Amilazlar deterjan, bira fabrikası, nişasta sıvılaştırma, tekstil, şekerleme, kağıt ve yiyecek gibi çeşitli endüstrilerde kullanılır.

Ülkemizde tahıla dayalı bir beslenmenin yaygın olmasından dolayı kişi başına tüketilen enerjinin %44'lük kısmının ekmekten ve %58'inin de tahıllardan karşılandığı belirtilmiştir. Bu nedenle Bacillus'lardan elde edilen amilazlar, büyük bir önem kazanmaktadır (Ajayi vd., 2006). Başlıca nişasta endüstrisinde kullanılan ve enzim satışlarında en büyük piyasaya sahip olan α-amilaz enziminin ekmekçilikte de kullanımı oldukça iyi bilinmektedir (Gupta vd., 2003). Hamurda mayalanma esnasında ve pişirme başlangıcında meydana gelen değişmeler α-amilaz enzim aktivitesine bağlıdır (Polaina ve MacCabe, 2007). Amilaz enziminin substratı olan nişasta, α-amilazlar ve β-amilazlarla glukoz, maltoz ve maltodekstrinlere hidrolizlenmektedir. Bu ürünlerden biri de kısa moleküllü ilk ürün olandekstrin'dir. Nişastanın glukoza kadar hidrolize edilmesinden önce oluştuğu belirtilmiştir. Dekstrinler çözünürlüğü dayanıklı ve yüksek bir ürün olup, gıdalarda viskoziteyi arttıran dolgu maddesi olarak kullanılan yoğun şurup kıvamında bir maddedir (Keskin, 1982).

Daha önce inek gübresi mikroflorasından izole edilen *Bacillus subtilis* (CM3) tarafından α-amilaz üretimi çalışmaları yapılmıştır. Amilaz üretimi için optimum inkübasyon süresi 36 saat, pH 5.0-9.0 ve sıcaklık 50-70°C. Enzim sekresyonu, test edilen karbon kaynaklarından (patates nişastası, çözünür nişasta, buğday unu, manyok nişastası, fruktoz, glikoz vb.) herhangi birinin varlığında çok benzerdi. Azot kaynağı olarak maya özütü ve amonyum asetat (% 1) diğer azot kaynakları (pepton, malt özü, kazein, asparajin, glisin, sığır özü) ile karşılaştırıldığında daha yüksek verim verirken; amonyum klorür, amonyum sülfat ve üre, enzim aktivitesini inhibe etti. Kültür ortamına Ca^{+2}'nin (10-40 mM) eklenmesi enzim üretiminin daha da iyileşmesine yol açmazken, % 0.02'de sürfaktantların (Tween 40, Tween 20, sodyum lauril sülfat ve Tween 80) eklenmesiyle enzim üretiminde% 2-15 artış ile sonuçlandı. Çalkalanan şişe ve laboratuar fermentör kültürleri arasında enzim veriminde önemli bir değişiklik olmamıştır. Saflaştırılmış enzim, doğal SDS-PAGE'de 18.0 +/- 1 ve 43.0 +/- 1 kDa moleküler kütleli olarak iki biçimdedir (Swain vd., 2006).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Biyoteknoloji

Biyoteknoloji terimi, "biyoloji" ve "teknoloji" kelimelerinin türetilmesiyle ilk olarak Karl Erkey tarafından 1919 yılında kullanılmıştır. Bu oluşumun tanımı "ham maddelerin, biyolojik sistemlerin yardımıyla yeni ürünlere dönüştürüldüğü işlemlerdir" şeklinde yapılmıştır (Farı ve Kralovansky, 2006). Biyoteknoloji; belirli bir amaca hizmet etmek üzere değişikliğe uğratıldığı veya ürün üretildiği, bu işlemler sırasında da biyolojik sistemlerin, canlı organizmaların veya türevlerinin kullanıldığı teknolojik uygulamalar olarak tanımlanmaktadır (Kıymaz ve Tarakçıoğlu, 2004).

Biyoteknoloji tarihsel süreç içerisinde geleneksel evre, ara evre ve modern biyoteknoloji evresi olmak üzere üç evreye ayrılmaktadır (Erçetin, 1999).

I. Geleneksel evre; 1919-1939'lu yılları arasındaki dönemdir. Bu dönemdeki teknoloji ve bilgi bakteri, maya, mantar gibi canlı sistemlerin fermantasyonundan faydalanılarak peynir, ekmek, alkol, yoğurt vb. maddelerin üretilmesinde kullanılmıştır.

II. Ara evre; 1940-1973'li yılları arasındaki dönemdir. Gen yapısında tamamen bir değişiklik yapılmaksızın, mikroorganizmaların endüstrideki kullanım alanlarının çeşitlendirildiği ve bu teknoloji ile enzim, antibiyotik, organik asitler ve protein vb. maddelerin üretimi gerçekleştirildiği dönemdir.

III. Modern biyoteknoloji evresi; 1973 ve sonrasında modern tekniklerin biyolojik sistemlere uyarlanmasıyla ilgili çalışmaları kapsamaktadır. Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak oluşturulan genetiği değiştirilmiş organizma (GDO)'lar, endüstride ve daha birçok alanda yoğun bir biçimde kullanılmaya başlanmıştır.

Biyoteknoloji işlem uygulamaları; enzimoloji biyokimya, mikrobiyoloji, protein mühendisliği, immünoloji, moleküler biyoloji ve hücre biyolojisi teknolojileri gibi farklı alanları kapsar. Sonuç olarak biyoloji, sadece canlıları ve canlıların çevreleriyle ilişkilerini inceleyen olmanın dışında aynı zamanda cansız dünyayı

inceleyen farklı bilim dallarıyla doğrudan ve dolaylı olarak etkileşimde bulunmaktadır. Bu nedenle biyoteknoloji, disiplinler arası karşılıklı ilişki içinde gelişmektedir (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1 Biyoteknolojinin diğer bilimlerle olan ilişkisi

Temel bu bilim, geliştirdiği buluşlarını kısa sürede faydalı ticari ürünlere çevirebilmesi sonucunda kendi özel talebini de oluşturabilir. Bu özelliğiyle de öbür teknolojilerden farklıdır. Mesela, termal su kaynaklarındaki bakterilerden elde edilen, ekstrem sıcaklığa dayanıklı olan bir protein, günümüzde temel bilim ve uygulama çalışmalarında ayrılamaz bir parça olan PCR tekniğinin önemli bir girdisidir (Çaphan, 2011).

Biyoteknolojideki ilerlemeyle beraber endüstriyel enzim kullanım alanı sürekli olarak artış göstermektedir. Endüstriyel ölçekteki üretim için kimyasal katalizörler yerine, istenmeyen yan ürün oluşumunu önemli derecede düşüren, katalitik olarak daha güçlü etkiye sahip olan, ürün tanımlaması yüksek olan, doğa dostu olan, enerji kullanımı bakımından ekonomik olan enzimlerin kullanımı yaygınlaşmıştır. Günümüzde kayıtlı olan 2500'ün üzerinde enzim çeşidinin biliniyor olmasına

rağmen bu enzimlerin yalnızca 150 kadarının ticari bakımdan önemlilik arzetmektedir (Gözükara, 1997).

2.2 Enzimler

Canlıların en temel özellikleri, hayatlarına devam edebilmek için birçok biyokimyasal reaksiyonu tamamlamaları gerekmektedir. Bu reaksiyonların gerçekleşmesini, 'enzim' adı verilen biyolojik katalizörler sağlamaktadır. Enzimler, katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu dışında canlı organizmada oluşan tüm tepkimeleri düzenleyen ve bu tepkimelerin uygun koşullarda gerçekleşmesini sağlayan genellikle protein ana yapıdaki özelleşmiş biyokatalizörlerdir. Enzimlerin çalışma prensipleri de diğer katalizörler gibi reaksiyon hızını arttırmasıdır. Aynı koşullarda, enzimin bulunduğundaki reaksiyon oranı, katalizör bulunmadığı durumdaki reaksiyon oranına göre birkaç veya bir milyon kat (10^6-10^{16}) daha yüksek olabildiği belirtilmiştir (Uludağ, 2000). Enzimlerin yapısındaki aminoasitlerin (AA) sıralanış ve buna bağlı olarak kazandıkları tersiyer (3D) yapı enzimlerin katalitik görevlerini yapabilmelerine olanak sağlayan en önemli etmendir (Onat ve Emerk, 1997).

Enzim teknolojisinde yaşanan gelişmelerle beraber, endüstriyel enzimlerle ilgili yapılan araştırmalar ve geliştirilen yeni yöntemler her geçen gün daha önemli hale gelmiştir. Günümüzde endüstriyel alanlarda kullanılan enzimlerin büyük çoğunluğ mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Mikroorganizmalardan elde edilen enzimler, hayvansal ve bitkisel kaynaklı enzimlere göre daha kolay ve ekonomik yollarla üretilir. Endüstride kullanılan mikroorganizma kaynaklı enzimlerin %25-33' ünü amilaz grubu oluşturmaktadır. Endüstride daha yaygın olarak kullanılan enzimler amilazlar, proteazlar ve lipazlardır.Amilazların ticari olarak elde edilmesi için çoğunlukla Bacillus cinsi bakteriler kullanılmaktadır.

Amilazlar, endüstride yaygın kullanım alanına sahiptir. Bu nedenle amilaz üretimi için daha ekonomik ve çevre dostu yöntemler kullanmak oldukça önemlidir. Son yıllarda amilaz üretimin de sıklıkla kullanılan ve giderek yaygınlaşan yöntemlerden biri de Submerged fermantasyon (SmF) tekniğidir.

Günümüzde mikroorganizmalar, çoğu endüstriyel alanda potansiyel üretici olarak kullanılmaktadır. Endüstriyel enzim üretiminde; büyüme gereksinimleri basit, patojen olmayan, değişik ekstraselüler enzimler sentezleyebilen ve çok miktarda enzim salgılayabilen mikroorganizmalar tercih edilmektedir. Bakteri ve fungus cinsleri uzun yıllardır, başta amilaz olmak üzere çeşitli endüstriyel enzimlerin üretiminde kullanılmaktadır.

Başlangıçta "Enzim" kavramı, sindirim kanalında olduğu gibi bir sıvı veya çözelti içerisinde aktif olduğu şartlarda; buna aksine "Ferment = Maya" kelimesi çoğunlukla hamur mayasındaki gibi hücreye bağımlı olduğu şartlarda kullanılmıştır. Fermentlerin, hücre dışında etki ettiği ortaya çıktıktan sonra iki kavram arasındaki farklılık da ortadan kalkmıştır. İki kavram arasında günümüzde herhangi bir fark olmamasına rağmen mantar, diğer hücreli enzimatik işlevler ve bakteri, etki maddeleri ve mayalanma da ferment olarak kullanıldığı kaydedilmiştir (Smith 2003). Ayrıca enzim, ilk olarak mayalardan elde edildiğinden dolayı kelime anlamı olarak eski Yunanca' da, "mayada bulunan" anlamına gelse de, günümüzde enzimler canlı tüm bitkilerden, hayvanlardan, hücrelerden ve özellikle de mikrobiyal organizmalardan elde edilebilmektedir (Polaina ve MacCabe, 2007).

Enzimler, eski çağlardan beridir peynir yapımı içecek yapımı ve ekmek gibi işlemlerde, varlığı ve görevinin farkına varılmadan kullanılmıştır. Enzim kullanımına ait ilk kanıtlar tarihi Mısır'a kadar gitmektedir. Yakın zamanda ise Doğu ülkelerinde pekçok gıda fermantasyonunda enzim deposu olarak ipliksi mantarlar kullanılmaktadır. Bu, Doğu toplumundan Batıya önemli bir teknolojik kazançtır. Tarihsel süreç boyunca enzimlerin farklı kaynaklardan temin edildiği görülmektedir. Bu kaynaklar sırasıyla endüstriyel anlamda ihtiyacı karşılayabilen mikroorganizma, bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlerdir. Hayvansal ve bitkisel kaynaklı enzimlerin endüstride ki açığı kapatmaması sonucu ilginin giderek artan bir biçimde mikroorganizma kaynaklı enzimlere yönelimine yol açmıştır.

Enzim ihtiyacı her geçen gün artmaktadır. Bu nedenle bitkisel orjinli enzimlere ihtiyaç duyulmaktadır. Artan bu ihtiyacı karşılayabilmesi için gelişim döngüsü, iklim ve toprağın işlenme etkinliği gibi değişik faktörlere bağlıdır. Ayrıca tarımsal

etkinliklerin kontrol edildiği uluslararası ve ulusal politik kuruluşlar tarafından yapılacak çalışmalar, önemli bir etken olarak da görülmektedir (John, 1987).

Enzimlerin katalitik aktivitelerinin en yüksek düzeyde olduğu bir sıcaklık değeri bulunmaktadır. Bu sıcaklık 'optimal sıcaklık' olarak adlandırılmaktadır. Optimal sıcaklık değerinden daha yüksek sıcaklıklarda molekül arasında, içinde veya yapısında bulunan bağların kopması nedeniyle enzimde bozulma başlar. Aynı zamanda 'optimum pH' olarak belirtilen ve enzimlerin en iyi aktivite gösterdiği bir pH aralığı da mevcuttur. Bu, pH'daki değişime bağlı olarak enzimin molekül yapısının etkilenmesinden kaynaklanmaktadır. Enzimler, ekstrem pH'larda elektrostatik etkileşimlerden etkilenmekte ve inaktif olmaktadırlar. Enzimatik işlemleri etkileyen önemli diğer etkenler de substrat ve enzim konsantrasyonu, deterjanlar, inkübasyon süresi, şelatörler, metal iyonları gibi katkı maddeleridir. Bu maddeler enzimlerin çalışmalarını etkilemektedir. Bazı diğer maddeler ise enzimlerin aktif bölgelerine tutunarak enzim deformasyonuna yol açmakta, katalitik aktivitesini düşürebilmekte ve hatta tamamen durdurabilmektedir. Bu tip maddeler, 'inhibitör' olarak adlandırılmaktadır (Aehle, 2004).

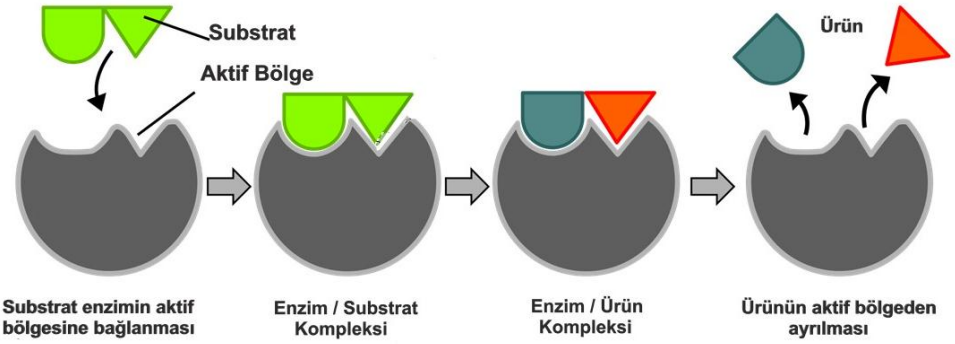
Enzimlerin primer yapısı genomun ilgili genleri belirlenir daha sonra kendi üzerinde katlamalar yaparak aktif hale gelir.

Enzimlerin etki edip değişikliğe uğrattığı maddelere substrat denir. Enzimler, substratı ürünlere veya ürüne dönüştürür. Enzimler, substratlara spesifiktirler. Enzim molekülünün belli bir bölgesi üzerinde, enzimatik reaksiyonların meydana geldiği bir merkez bulunmaktadır. Aktif merkez şeklinde adlandırılan bu bölge, daima bir yarık veya oluk şeklindedir (Şekil 2.2).

Enzimler çok seçici olup özgül reaksiyonlarda katalizör olarak etkigösterirler. Bu özellik, enzim molekülünün sahip olduğu şekilden kaynaklanmaktadır. Substrat-Enzim ilişkisi, 'anahtar-kilit' uyumu ile örnek verilmektedir.

$$E+S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons EP \rightleftharpoons E+P \quad (2.1)$$

E: Enzim
S: Substrat
ES: Enzim-Substrat
EP: Enzim-Ürün
P: Ürün (Product)



Şekil 2.2 Enzim substrat ilişkisi (OpenStax College, Biology, CC BY 3.0'den uyarlandı.)

2.2.1 Enzimlerin sınıflandırılması ve isimlendirilmesi

İlk başlarda enzimlerin isimlendirilmesi, rastgele bir biçimde yapılmıştır. Kristal saf bir formda elde edilen enzim sayılarının artmasıyla birlikte zamanla isimlendirmede büyük bir karmaşıklık ortaya çıkmıştır. Daha sonraları International Union of Pure and Aplied Chemistry (IUPAC) tarafından 1961 yılında oluşturulmuş uluslararası bir komisyon tarafından enzimlerin isimlendirilmesi dikkate alınması gereken kurallar tespit edilmiştir. Bu komisyon her enzim için bir sınıflandırılma numarası (uluslararası bilimsel özetlerde ve dergilerde tereddüte yer vermeyecek şekilde enzimin tanımlanması için), bir de sistematik isim (katalizlenen reaksiyonun tipine uygun) ve tavsiye edilen isim (genellikle yaygın olarak kullanılan ve kısa isim) önermiştir. Enzimlerin sınıflandırılması ve isimlendirilmesinde aşağıda belirtilmiş olan temel esaslar dikkate alınmaktadır.

a) Bütün enzimlerde son takı olarak –az eki bulunur. Eğer birden fazla enzimden oluşan enzim sistemleri söz konusuysa o zaman da"-az sistem"olarak isimlendirilirler (örnek olarak dehidrogenaz sistemi - Pirüvat).

b) Enzimler, özelliklerine göre katalizledikleri reaksiyona bağlı olarak sınıflandırılır ve isimlendirilir. Aynı işlevi gösteren fakat değişik kökenlerden (bitki, hayvan, mikrobiyal) temin edilen enzimler çoğunlukla aynı ismi alırlar.

c) Birbirinden değişik tipteki birçok reaksiyonu katalizleyen enzim, isimlendirme sırasında katalizlediği ilk reaksiyon adımı esas alınarak isim verilir.

Enzimlerin sistematik olarak adlandırılmasında genel olarak; değişikliğe uğratılan substratismi + katalizlenen tepkimenin çeşidi + -az son eki sıralaması kullanılır. Sistematik isimlerinfazla uzun olmasından dolayı çoğu defa geleneksel adlar verilmektedir(Selen 2006).

I. Oksidoreduktazlar: Redoks tepkimelerini katalizleyen oksidoredüktaz enzimlerireduktaz veya dehidrogenaz genel isimleriyle tanınırlar. Hidrojen,elektron veya oksijen alıcısı olması durumunda oksidaz adıyla anılırlar. Örnekler: reduktaz, alkol dehidrogenaz, sitokromaksidaz, glikoz oksidaz, peroksidaz v.b.

II. Transferazlar: Verici (donör) üzerindeki işlevsel gurubu, alıcısı olan bir substrat molekülüne taşınımınısağlayan enzimlerdir. Örnekler: transaminazlar (formil–transferazlar), CoA transferazlar, kinazlar (fosfotransferanazlar) vb.

III. Hidrolazlar: Suyun katıldığı kondenzasyon ve parçalanma reaksiyonlarını gerçekleştiren enzimlerdir. Glikozid, ester, C-N, peptid, C-C, asitanhidridi, P-N veya C-X bağlarının parçalanmasını sağlarlar. Örnekler: fosfatazlar, lipazlar, glikozidazlar, amilazlar, proteazlar (peptidazlar), amidazlar, nükleosidazlar v.b.

IV. Liyazlar:Çift bağa katılma ve çift bağ oluşumunu (hidrolitik olmayan yoldan) reaksiyonlarını gerçekleştirirler. Değişikliğe uğrattıkları substrattan kimyasal bir grubu ya ilave ederler ya da ayırırlar. Önemli örnekler: aldolazlar, dekarboksilazlar, karboksilazlar, dehidratazlar (akonitaz, fumaraz).

V. İzomerazlar: Molekül içi değişiklikleri gerçekleştirirler. Molekülün yapısal veya geometrik çevrilmesini katalizlerler. Bunlar, molekül içerisinde çift bağ oluşumunu,

grup transferini ve oksidoredüksiyonu katalizleyen enzimlerdir (intramolleküler transferazlar, intramoleküler liyazlar).

VI. Ligazlar: Enzim tarafından iki maddenin birleşmesini gerçekleştirirler. Açilaz CoA sentazlar, Piruvat karboksilazlar, aminoasitleri aktive eden enzimler. Her enzimin 4 rakamla tasvir edildiği kod numarası bulunmaktadır. 1inci rakam grup numarasını, 2inci rakam sınıf numarasını, 3üncü rakam alt sınıf numarasını, 4üncü rakam enzim seri numarasına karşılık gelmektedir.
Örneğin; nişasta hidrolizinde kullanılan α-amilaz enzimi 3 (hidrolaz grubunu), 2 (glikoz bileşikleri üzerinde etkili sınıfı), 1 (glikozit hidrolaz grubunu), 1 (alt sınıftaki enzimler arasındaki yerini), 3.2.1.1. rakamları ile tasvir edilmektedir.

2.3 Amilazlar

Amilazın 1811 yılında Kirchoff tarafından buğdayın nişastasını parçalayıcı bir özelliğinin olduğunu tespit etmiştir. Ancak parçalayıcı etmeni amilaz olarak tanımlanamamıştır (Gupta vd., 2003). 1831 yılında Leuch tarafından tükürüğü kullanılarak bu çalışmayla benzer sonucun insan elde edilebileceği bulunmuştur. 1951 yılında Bernfeld ise tükürüğün sahip olduğu bu özelliğe Berzelius tarafından pityalin adının verildiğini, 1833 yılında Persoz ve Payen tarafından malttan nişastayı parçalayan bir maddenin varlığını bulduklarını ve bunu da diastaz olarak adlandırdıklarını belirtmektedir. Günümüzde ise nişastayı parçalayan bütün enzimler amilazlar olarak isimlendirilmektedir (Greenwood vd., 1970).

Amilazlar glikojen ve nişasta gibi polimer molekülleri hidrolizleyerek, glikoz ünitelerinden oluşan dekstrinler ve daha küçük polimerler gibi ürünlere dönüştüren enzimlerdir. Bunlar bitkiler ve hayvanlar tarafından da sentezlenmektedir. Ancak kontrollü koşullarda daha kısa sürede ürünün temin edilmesinden dolayı biyoteknolojik olarak temel kaynağının mikroorganizmalar olduğu belirtilmiştir (Chakraborty vd., 2011).

Amilazlar endüstriyel enzimlerdir ve temel olarak nişasta işletme endüstrisinde kullanılır. Bu enzimlerin nişasta hidrolizinde ve şurup üretiminde çeşitli kullanımı

vardır. Bunlar 1-4 bağlantı olan glikoz birimleri ve maltotrise oluşumunu ve maltoz ve glikoz olarak ayırır.

Son yılların enzimatik nişasta hidrolizi etkili bir şekilde kimyasal metotlarda yerini aldı. Amilazlar muz, mango, narenciye ve papaya gibi bitkilerin işlemesini kapsayan geniş bir kullanıma sahiptir. Bulaşık yıkamada, çamaşırda, yiyecek fermantasyonunda, kagıt ve tekstil sanayisinde kullanılır. Bu enzimler Actinomycetes ve bakteriyi kapsayan çeşitli kaynaklardan elde edilir. Bu enzimler arasında mikrobiyal kaynak geniş kullanılabilirlik ve esnekliğinden dolayı diğer kaynaklardan daha çok tercih edilir.

2.3.1 α-Amilazlar

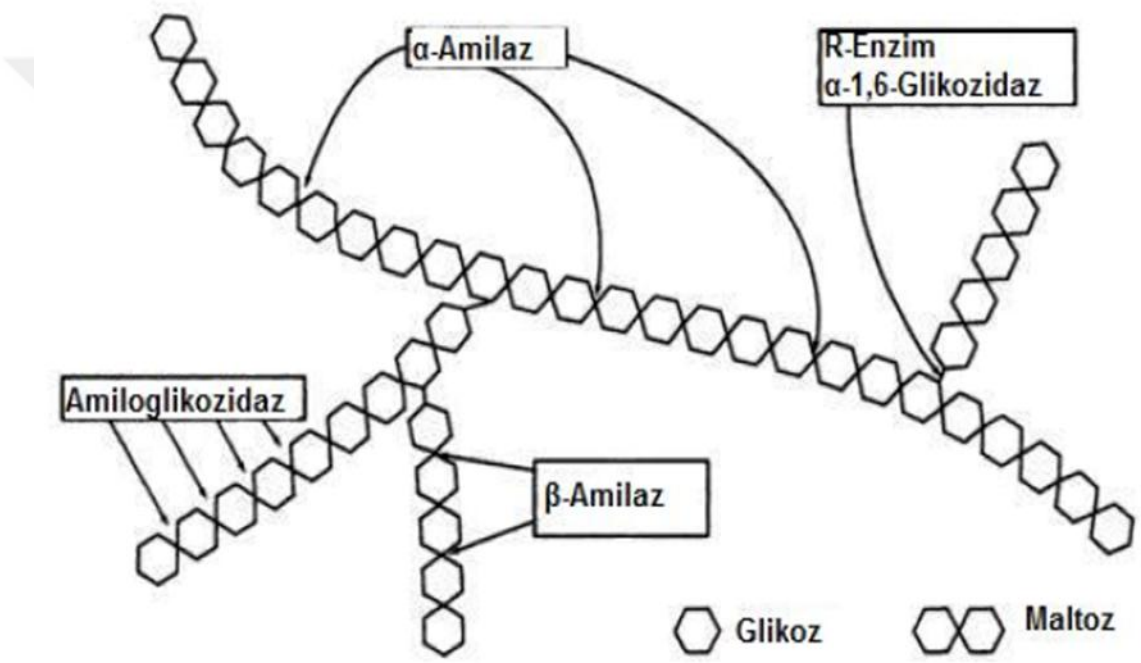
Bu amilaz çeşidi, E.C.3.2.1.1 olarak sınıflandırılmaktadır. Nişasta molekülünde bulunan amilaz zincirinin α-1,4 bağları üzerine rasgele etki ederek son ürün olarak 9/10'u maltoz ve 1/10'u glukoz olan bir karışım oluşturmaktadır. α- Amilazlar 1,6 glikozidik bağa etki etmemektedir. Amilopektin hidrolizi sonucunda maltoza ve glukoza ek olarak dekstrinler de oluşmaktadır (Agüloğlu, 1996). En az dört glukoz içeren bu dekstrinler, orijinal yapının 1,6 glikoz bağlarını da içermektedirler. Belirli bir sayıda glukoz ünitesi kalması sonucunda dallanma noktasına amilazlar etki edememektedir. Bundan dolayı bu dekstrinlere sınır dekstrin (limit dekstrin) adı verilmektedir. Nişastanın enzimatik hidrolizi sonunda oluşan ürünler α-optik konformasyonu göstermektedir. Bu nedenle bu tip enzimlere α-amilazlar olarak tanımlanmaktadırlar. Ayrıca bu enzimler nişastanın iç kısımlarında bulunan α-1,4 bağlarını etkilediklerinden dolayı endoenzimler olarak ifade edilmektedir (Ray vd., 2008).

2.3.2 β-Amilazlar

Bu amilaz çeşidi, E.C.3.2.1.2 olarak sınıflandırılmaktadır. Nişasta moIekülünün indirgen olmayan ucunda arka arkaya gelen maltoz birimlerini uzaklaştıran enzimlerdir.α-1,6 bağlarına etki etmediklerinden dolayı bu bağlarla karşılaşınca dururlar. Sınır dekstrinler hidroliz sonucu açığa çıkan ürünler β-optik konformasyonu gösterdiklerinden dolayı bu enzimlere de β-amilazlar adı verildiği belirtilmiştir (Gomes vd., 2003).

2.3.3 γ-Amilazlar

Bu amilaz çeşidi, E.C.3.2.1.3 olarak sınıflandırılmaktadır. γ-Amilazlar amilopektin ve amiloz moleküllerini redükte olmayan uçlarından keserek maltoz, glukoz, oligomaltoz ve maltotrioz oluşumuna neden oldukları belirtilmiştir. Aynı zamanda bazı γ-amilazlar, amilopektin moleküllerinin 1,6 α-glikozidik bağlarını da hidroliz edebilmektedir (Hsieh vd., 2008).



Şekil 2.3 Alfa amilazın nişastayı hidrolizi

2.4 α-Amilaz Enziminin Endüstriyel Kullanım Alanları

Amilazlar, biyoteknolojik önemi olan çeşitli alanlarda kullanılmaktalardır (Aygan, 2008). Günümüzde amilazlar, unlu mamüllerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle unlu mamullerde ve ekmekte daha yumuşak, daha iyi kabarma ürün ve renk elde etmek için kullanılmaktadır. Amilaz eklenmesi sonucu hamur akışkanlığı azaltmakta, fermantasyon oranında artış olmakta, hamurda bulunan şeker miktarı ve ürünün hacmi artırılarak ekmek kalitesi de arttırılmaktadır. Ayrıca son zamanlarda ürünlerin raf ömürlerini arttırıcı olarak da değerlendirilmektedirler. α-Amilazların

sahip oldukları en büyük Pazar fruktoz ve glukoz gibi nişastanın parçalanmasıyla ortaya çıkan ürünlerin üretiminin yapıldığı sektörlerdir. Tatlandırıcı özelliğe sahip olmalarından dolayı alkolsüz içecek sektöründe çok büyük oranlarda kullanılmaktadırlar. Aynı zamanda alkoI fermantasyonu için nişastanın şekerleştirilmesi ve sıvılaştırılması için içecek endüstrisinde de kullanılmaktadır.

Tekstil endüstrisinde, haşıllama işlemi içinnişasta kullanılmaktadır. İpliğin kırılmasını önlemek ve daha sonradan uzaklaştırılması kolay olan koruyucu bir tabaka olarak uygulaması yapılmaktadır. Bu amaçla nişastanın uzaklaştırılması işlemine "desizing" (haşıllama) ve uygulanması işlemine de 'sizing' denilmektedir. Haşıllama işlemiyle dokuma sırasında tekstil ürünlerine dayanıklılık kazandırır. Dokuma işleminin ardından nişastanın uzaklaştırılması sonrası boyama ve yumuşatma işlemleri başlar. Nişastanın giderilmesi işlemi ise genellikle α-amilaz uygulanarak gerçekleştirilir.

α-Amilazların kağıt hamurunda ve endüstrisinde kullanımı, kağıt kaplamasındaki nişasta modifikasyonu sayesinde olmaktadır. Tekstil endüstrisinde olduğu gibi kağıdın nişastayla kaplanması işlemiyle kağıdın mekanik olan hasarlara karşı koruması sağlanmaktadır. Aynı zamanda son ürün olan kağıdın kalitesini, direncini ve dayanıklığını da arttırmaktadır. Kağıt işlemleri için doğal nişastanın viskozitesi çok yüksektir. Amilaz enzimi kullanılarak nişastanın belirli düzeyde hidrolizasyonu sonucunda nişastanın belirlenen yoğunluğa ulaşması sağlanır.

Deterjan endüstrisinde, nişasta kaynaklı kirlilik partiküllerinin ortamdan uzaklaştırılması amacıyla α-amilaz deterjanlara katkı maddesi şeklinde eklenmektedir. Amilaz, özellikle sıvı deterjanların %90'ından fazlasında bulunmaktadır. Son yıllarda bulaşık makinelerine özgü üretilen deterjanların bileşimine her geçen gün daha fazla amilaz ilave edilmeye başlanmıştır. Enzimsiz deterjanlarla karşılaştırıldığında deterjanlarda eklenen enzimlerin en büyük avantajının ortam koşullarını yumuşatması ve daha iyi temizleme sağlaması olduğu belirtilmiştir.

2.5 Mikroorganizma

2.5.1 *Bacillus* cinsi ve bazı özellikleri

Endüstriyel alanlarda kullanılmakta olan enzimlerin büyük bir kısmı mikroorganizma kaynaklıdır. Mikroorganizma kökenli enzimlerin çoğu önemli araştıma konularını oluşturmuş. Dünyanın çeşitli yerlerinde endüstri ve sanayi alanlarında kullanılmaya ve üretilmeye başlanmıştır. Endüstriyel alanda kullanılan enzimlerin çoğunluğu Bacillus suşları tarafından üretilmektedir (Agüloğlu-Fincan vd., 2021; Agüloğlu-Fincan ve Enez, 2014; Ortakaya vd., 2017; Özdemir vd., 2018; Rezzukoğlu vd., 2018). *Bacillus* suşları çomak şeklinde, endospor oluşturan, doğada hemen her yerde bulunan ve patojen olmayan Gram pozitif bakterilerdir. Çeşitli endüstriyel enzimleri üretmeleri ve patojen olmamaları sayesinde gen klonlama çalışmalarında önemli bir kullanıma sahip olan Bacillus suşları, ekstrasellüler enzimleri salgılamaktadırlar. Bacillus'lar tarafından salgılanan başlıca enzimler arasında β-amilaz, α-amilaz, alkalin fosfataz, ksilanaz, glukoz izomeraz, β-glukanaz (sellülaz), nötral proteaz, pullulanaz ve β-laktamaz sayılabilmektedir. Bu mikroorganizmaların enzim üretme yetenekleri, patojen ve toksik olmamasına göre de seçilmektedirler (Boyce ve Walsh, 2007).

Bacillus cinsi bakteriler bitkisel ürünler üzerinde, hayvan dışkılarında ve toprakta yaygın olarak bulunmaktadırlar. Bu bakterilerin çoğu patojen olmamaları, izolasyonunun ve teşhisinin basit olması, hızlı büyüme oranıyla fermentasyon süresinin kısa ve güvenli olması, sentezledikleri ürünleri ekstrasellüler ortama salma kapasiteleri gibi birçok özelliklerinden dolayı ilgi çekici endüstriyel mikroorganizmalardır. Özellikle *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* ve *Bacillus subtilis* çok önemli α-amilaz kaynaklarıdır. Sahip oldukları enzimleri termostabil olup nişastanın jelatinizasyon işleminde kullanılmaktadır (Uhling, 1998).

Bacillus cinsi, Bacillaceae familyasına ait bir üyedir. Vejatatif formları düz,hemen hemen düze yakın veya çomak şekillidir. Tek endospora sahip, çoğu olumsuz ortam koşullarında çok dirençli, gram-pozitif, açık havada spor oluşturması engellenemeyen, aerobik, peritrik kamçılı veya fakültatif anaerob olan bir bakteridir (Özçelik, 1995). Türlerin hemen hepsi ısıya dayanıklı spor üretme yeteneğindedir.

Bacillus cinsi bakteriler tek veya çok sayıda uç uca eklenmiş halde uzun zincirler meydana getirebilirler. Hücrede bulunan sporun yeri ve şekli, *Bacillus sp*. türlerinde karakteristik bir özellik göstermektedir. Bu cinsin endosporları genellik olarak elipsoidal, oval, silindirik ya da yuvarlaktır (Lennete vd., 1985).

2.6 Enzim Saflaştırma

Saf olarak elde edilmek istenen enzimin üretildiği ortamdan dışarı çıkarılması gerekmektedir. Bu işlem enzimin elde edildiği her birortam için farklı yöntemlerle yapılabilir. Örneğin, bir bakteriden hücre dışına salgılanan bir protein saflaştırmak isteniyor ise santrifüjleme yöntemi, hücre içinde bulunan bir protein saflaştırılmak isteniyor ise sonikasyon yöntemini kullanmak gerekirken, bitki dokularından elde etmek için ezme metodu kullanılır (Sinan, 2011).

2.7 Santrifüjleme

Farklı aşamalarda uygulanabilen bir işlemdir. Birinci adımdan sonra büyük partiküllerin ve hücre organellerinin uzaklaştırılması amacıyla kullanılabilir. Bunun yanı sıra santrifüjleme işlemi, amonyum sülfatIa çöktürme işleminden sonra da yapılmaktadır.

2.8 Amonyum Sülfatla Çöktürme

Belirli bir doygunluk derecesine göre ortama eklenen amonyum sülfatın farklı molekül ağırlığında olan proteinlere bağlanarak çökmesini sağlar. Çöktürme uygulamasında istenilen aralık bulunduğunda diğer proteinler ortamdan uzaklaştırılmış olur.

2.9 Diyaliz

Ortamda bulunan ve istenmeyen küçük parçacıkları uzaklaştırmak için yapılan bir işlemdir.

2.10 Önceki Çalışmalar

Agüloğlu Fincanvd., (2021); *Bacillus licheniformis* SO-B3 olarak adlandırılan yeni bir termotolerant bakteriyi Şırnak ili Meyremderesi kaplıcası çamurundan izole

ederek en yüksek enzim üretim koşullarının 35°C, 36.saat ve pH 7.0 olarak belirlemişlerdir. Termostabil α-amilaz %70'lik amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-Selüloz iyon değişim kromatografisi ve diyaliz ile %30 verimle 51 kat saflaştırarak enzimin 70°C'de K_m ve V_{max} değerlerinin sırasıyla 0.004 mM ve 3.07 μmol min^{-1}, ve moleküler ağırlığını 74 kDa olarak hesaplamışlardır.

Priyadarshini ve Ray (2019), Chilika Gülü sedimentin izole ettikleri ve yüksek alkali (pH 11.0) ortamda α-amilaz üreten CH7 suşu ile yaptıkları çalışmada % 1 nişasta içeren agar petri kaplarında 15 mm'den büyük alan etkili olduğunu belirmişler.Enzim aktivitesinin Co^{2+}, Na^{+} and Ca^{2+}ile artığını ve EDTA, SDS, toz deterjan ve sıvı deterjanlara karşı stabil olduğunu belirtmişler. SDS-PAGE yaparak elde ettikleri enzimin moleküler ağırlığını 55 kDa olarak bulmuşlar.

Rakaz vd., (2021), güney Omdurman Toti Adası'ndan topladıkları toprak örneklerinden elde ettikleri numuneleri nişasta hidrolizi için analiz etmişler.İzole ettikleri birkaç bakteri arasından *Bacillus cereus* ve *Bacillus licheniformis* aktif α-amilaz üreticileri olarak tanımlamışlar. Her iki bakteri de nişasta-agar plakaları üzerinde büyütüldüklerinde 20 mm'lik geniş bir amilaz aktif alanı göstermişler. Biyokimyasal karakterizasyon kullanılarak ve 16S-rDNA'larının dizilenmesiyle tanımlamışlar. *Bacillus cereus* ve *Bacillus licheniformis*'in amilaz aktivitesinin pH 8.0 ve sırasıyla 45 °C ve 65 °C olarak optimize edildi. Üretilen her iki bakterinin de alkalofilik ve termofilik olduğunu belirtmişlerdir.

Dash vd., (2015), hücre dışı amilaz üreten yeni izole ettikleri bakteri suşunu 16S rDNA gen dizileri temelinde oluşturulan filogenetik ağaç yardımıyla *Bacillus subtilis* BI19 olarak tanımlayıp çeşitli fermantasyon koşullarının amilaz üretimine etkisi araştırmışlar. Yaptıkları çalışmada karbon kaynağı olarak kullandıkları pirinç unu, nişasta ve mısır ununun amilaz üretiminin uyarıcısı olarak bulunmuştur ve en çok ucuz doğal karbon kaynağı olan pirinç ununun %1,25 konsantrayyonda amilaz üretimini indüklediği belirtmişlerdir. Organik ve inorganik azot kaynakları etkisine baktıklarında peptone ve yeast ekstraktın enzim üretimini artırdığını belirtmişler. En yüksek enzim üretim koşullarının 37 °C, 24.saat ve pH 8.0 olarak belirlemişlerdir.

Aladejana vd., (2020), yaptıkları çalışmada, bozulan yam yumrularından izole ettikleri bakteriyi moleküler karakterizasyon ve 16 s rRNA dizi analizi yaparak *Bacillus subtilis* Y25 olarak tanımlamışlar. α-amilaz üretimi üzerindeki pH, sıcaklık, karbon ve azot kaynakları gibi bazı kültürel ve beslenme faktörlerinin etkisini incelemişler. Maksimum amilaz üretimi karbon kaynağı olarak kullandıkları nişasta ve peptonda 45 °C, 36. Saat ve pH 8.0 de gözlemlemişler. Amilazı, CM Sepharose CL-6B iyon değiştirme kromatografisiyle saflaştırarak enzimin Km ve Vmax kinetik parametrelerinin yanı sıra pH, sıcaklık, metal iyonları ve etilendiamintetra asetik asidin (EDTA) enzimin aktivitesi üzerine çalışılmıştır. Spesifik aktivite kısmı saflaştırılmış enzimin aktivitesinin 3.80 katı ile 15.21 ünite/mg protein olduğu belirlemişler. Saflaştırılmış enzimin moleküler ağırlığının 58.0 kDa olduğu belirlemişler. Vmax ve Km *Bacillus subtilis* Y25 a-amilazı için çözünür nişasta ile elde edilen değerlerini sırasıyla 314.10 ± 23.30 ünite/mg ve 53,98 ± 12,03 mg/ml. Saf enzim pH 8.0. ve 60 °C sıcaklıkta optimum aktivite göstermekler beraber metal iyonu etkisi incelemesinde 20 mM konsantrasyonda, Ca^{2+}enzim üzerinde hiçbir etkigöstermezken, aynı konsantrasyonda Na^{+} ve Mg^{2+} ve EDTA'nın enzimi inhibe ettiğini belirtmişler.

Ortakaya ve Agüloğlu Fincan (2019), Ergani Makam Dağı'ndan adıkları toprak numunesinden *Bacillus simplex*'in izolasyonu, tanımlanması ve optimizasyonunu gerçekleştirerek endüstriyel alanda önemli olan α-amilaz üretme yeteneğini araştırmışlardır. Bakterinin pH 7.0'de, 37 ^{o}C ve 32.saatte maksimum üreme gösterdiğini tespit etmişlerdir. Amilaz üretimi için optimum koşulları 48. saat, 37 ^{o}C ve pH 7.0 olarak belirlemişlerdir.

Arabacı ve Arıkan (2018), çalışmalarında topak örneklerinden soğuk aktif alkali amilaz üreticisi *Bacillus subtilis* N8 izole etmişlerdir. Bu bakteriden elde ettikleri enzimin 25 °C'de ve pH 8.0'da en yüksek aktiviteyi gösterdiğini ve alkali ortamda (pH 8.0-12.0) oldukça stabil olduğunu bulmuşlardır. SDS-PAGE yapılarak enzimin moleküler ağırlığı 205 kDa olarak bulmuşlar. β-merkaptoetanol (%103) varlığında amilaz aktivitesi artarken; H_2O_2, Mn^{2+}, Ba $^{2+}$, Ca^{2+}, Na^{+}, Zn^{2+}ve Triton X-100, aktiviteyi hafifçe inhibe ettiğini belirtmişler.

Vester vd., (2015), işlevsel metagonmik yaklaşımla tanımladıkları soğuk aktiv Amy_{13C6} ile yaptıkları çalışmada enzimin optimum çalışma sıcaklığını 10-15 °C aralığında ve optimum pH'sının ise 8.0-9.0 olduğunu belirtmişler. Çeşitli metallerin AmyI3C6 aktivitesi üzerindeki etkisi incelediklerinde $CaCl_2$' ün enzim aktivitesini önemli ölçüde artırdığını $ZnCl_2$ ve $CuCl_2$enzin aktivitesini inhibe ettiğini belirtmişler. SDS-PAGE yapılarak enzimin moleküler ağırlığı 56.07 kDa olarak bulmuşlar.

Du vd., (2018), yaptıkları bir çalışmada *Bacillus amyloliquefaciens* BH072' den elde ettikleri α-amilazın optimizasyonunu ve saflaştırma işlemini gerçekleştirmişler. Saflaştırmış oldukları α-amilazın moleküler ağırlığını Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) yaparak 68 kDa olarak bulmuşlar. Km ve Vmax kinetik parametrelerini sırasıyla 4.27±0.21mg/mL ve 987.34±23.34U/mg bulmuşlar. Saflaştırdıkları α-amilazın, pH 7.0 ve 60 °C'de maksimum aktivite gösterdiğini ve Ca^{+2}'dan etkilenmediğini, sürfaktan varlığında oldukça stabil olduğunu ve PMSF'nin amilaz aktivitesi üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını, β-mercaptoethanol'un aktiviteyi artırdığını ve EDTA tarından güçlü bir şekilde inhibe ediliğini belirtmişler.

Sani vd., (2014), *Bacillus subtillis'*i topraktan izole ederek bu bakteriden elde ettikleri α-amilazı kısmı saflaştırmak ve karakterize etmeyi amaçladıkları çalışmada kısmi saflaştırdıkları α-amilazın spesifik aktivitesinin 33.5 kat artığını belirtmişler. Elde ettikleri α-amilazın pH 5.0 – 9.0 arasında aktivite gösterdiğini ancak optimum değerinin pH 6.0 olduğunu ve enzimin optimum sıcaklık değerinin 60 °C olarak belirlemişlerdir.

Lal vd., (2016), SmF (Submerged Fermentation) yöntemi kullanarak *Bacillus licheniformis* JAR-26 dan amilaz üretimi için organik ve inorganik azot kaynaklarının farklı konsantrasyonlarının etkisini araştırmayı amaçlayan çalışmada; organik azot kaynağı olarak peptone, tryptone, soytone, et ektraktı, malt ektraktı ve yeast ektraktı (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 % w/v) ve inorganik azot kaynağı olarak $NaNO_3$, KNO_3, $(NH_4)_2SO_4$, NH_4Cl ve $(NH_4)_2HPO_4$ (0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5% w/V) kulanmışlar. Yapılan çalışmada organik azot kaynaklarının inorganik azot

kaynaklarına göre daha iyi amilaz üretimini teşvik ettiği ve organik kaynaklar arasında malt ektraktının hem en iyi amilaz üretimini (4.427 U/ml) hemde bakterinin gelişmesini (OD 1.766) en iyi desteklediğini ve en az amilaz üretimini soytone'unun desteklediğini belirtmişler.

Ortakaya vd., (2017), *Bacillus simplex*'den izole ettikleri α-amilazın optimum sıcaklığını 37 °C, pH'sını ise 7.0 olarak belirlemişler, kısmi saflaştırma yaptıkları enzimin stabilitesine ve deterjan ile metal etkisine bakmışlardır.

Shukla vd., (2015), izole ettileri suşu 16S rDNA gen dizilimi ile *Bacillus licheniformis* TSI-14 olarak tanımlayarak bu suştan maksimum α-amilaz üretiminin iki günlük inkübasyondan sonra pH 7.0 ve 50 °C'de gerçekleştirdiğini belitmişler. Saflaştırılmış oldukları α-amilazın moleküler ağırlığını SDS-PAGE yaparak 31 kDa olarak ve 70 °C'de ve pH 7.0'de en iyi katalitik etki ve stabilite göstermiş.Bazı metal iyonları etkisine baktıklarında Mg^{+2} aktiviteyi artırırken diğer metal iyonlarının kısmen inhibe ettiğini, HgCl (10.50 mM) konsantrasyonda güçlü bir şekildeinhibe ettiğini tespit etmişler. Metal iyonlarının inhibisyon sıralamasına baktıklarında Mg^{+2} < Na^{+}< K^{+} < Fe^{+3} < Ca^{+2} < Hg^{+2}şeklinde olduğunu belirtmişler. Üre ve beta-merkaptoetanol inhibitörleri kısmi inhibisyon gösterirken şelatör EDTA tamamen inhibe etmiş.

Vijayalakshmi vd., (2012), Sütleğen bitki kökü etrafında bulunan topraktanizole ettikleri hücre dışı α-amilaz sentezleyen bakteri suşu ile çalışmışlar. 16S rRNA dizi sekansı kullanarak çizilen filogenetik ağaca göre *Bacillus subtilis* KC3 olarak tanımlanmıştır. Optimizasyon için besi yerindeki farklı azot ve karbon kaynakları, farklı substrat konsantrasyonları, sıcaklık, pH, inkübasyon süresi ve metal tuzlarının etkisi gibi parametreler incelemişler. En çok enzim üretimini%2 substrat (nişasta) içeren kültür ortamında pH 7.0, 40 °C sıcaklık ve 2 günlük inkübasyon sonunda elde edilmiştir. Enzimin optimal aktivitesi pH 6.5'da ve 50 °C'degerçekleşmiştir. Farklı metal iyonlarının (Cu^{+2}, Mg^{+2}, Zn^{+2},Fe^{+2}, Ca^{+2}) amilazın aktivitesi üzerine etkisi incelenmiş ve %0.1 Ca^{+2}'un enzim üretimini indüklediğini (28.83 U/ml), buna karşın diğer metal iyonlarının enzim üretimini azaltarak inhibitörik etki gösterdiği bulunmuştur.

Agüloğlu Fincan ve Enez, (2014), *Geobacillus stearothermophilus*'tan ekstraselüler α-amilaz enziminin izolasyonu, saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışmalarında termostabil α-amilaz enzimini saflaştırarak maksimumum aktivitesini PH 7.0 ve 55 °C'de gerçekleştirdiğini saptamışlardır.

Agüloğlu Fincan vd., (2014), *Anoxybacillus flavithermus* alfa-amilazını %70 $(NH_4)_2SO_4$ ve iyon değiştirici kromatografisi uygulayarak %65.8 ürün ve 5.2 saflaştırma katsayısı ile saflaştırarak enzim karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir.

Abdel-Fattah vd., (2013), *Bacillus licheniformis* AI20 izolatı tarafından Üretilen termostabil α-Amilazın üüretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu üzerine araştırma yapmışlar, izole ettileri suşu 16S rDNA gen dizilimi ile *Bacillus licheniformis* AI20 olarak tanımlayarak bu suştan maksimum α-amilaz üretiminin iki günlük inkübasyondan sonra pH 7.0 ve 45 °C'de olduğunu belitmişler.

Al-Johani vd., (2017), izole ettikleri bakteri suşunu16S rDNA gen dizilimi ile *Bacillus subtilis* tanımlayarak bu suştan maksimum α-amilaz üretimi için besiyerine azot kaynağı olarak 10 g/L pepton ve % 0.5 nişasta eklendiğinde bu suştan maksimum α-amilaz üretiminin iki günlük inkübasyondan sonra pH 8.5 ve 45 °C'de gerçekleştirdiğini belitmişler.

Niyonzima ve More (2014), yaptıkları çalışmada *Bacillus flexus* XJU-1 suşundan SmF yöntemi ile optimum seviyede alkali amilaz üretimi gerçekleştirilmiştir.Amilazı indüklemek için 0,005 oranında nişasta, kültür ortamına eklenmiştir. Maksimum enzim üretiminin 0,015 oranında çözünme özellikli nişasta eklenmesiyle, sıcaklığın 37°C vepH 11,0 olarak modifiye edilen bir fermantasyon ortamında gerçekleştirildiği belirtilmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen veriler doğrultusunda amilazın optimum inkübasyon süresinin 24.saatte olduğukaydedilmiştir. Çalışmada amilazın (29,63 U/ml) 1,27 kat daha yüksek miktarda üretildiği bildirilmiştir.

Amid ve Manap (2014), tarafından yapılan çalışmadaejder meyvesi kabuğundan amilaz saflaştırmak için iyon değişim kromatografisi, jel filtrasyonu ve amonyum

sülfat çöktürmesi kullanılarak %72,1kazanım ile 234,2 kat saflaştırıldığı kaydedilmiştir. Saflaştırmış oldukları α-amilazın moleküler ağırlığını Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile 42.1 kDa olarak bulmuşlar. Enzimin geniş pH aralığında aktif olduğu (pH 3.0 - 11.0)ancak en iyi derecede stabil ve aktif olduğupH'sının 5.0 olduğu belirtilmiştir.Enzimin Km değeri 2,7 mg/ml ve Vmax değeri 34,30 U/dk./mg olarak tespit edilmiştir. Saflaştırdıkları amilazın, Ca^{+2} gerektirmediği ve oksitleyici maddeler ve yüzey aktif maddeler açısından aşırı stabil olduğunu belirtilmişler. Güçlü bir şelatlama ajanı olan Etilen Diamin Tetra Asetik Asit'in (EDTA) amilazın stabilitesinde önemli bir etkiye sahip olmadığı belirtilmiştir.

Bano vd., (2011), tarafından yapılan çalışmada, *Bacillus subtilis* KIBGE HAS suşuna ait α-amilazı amonyum sülfat çöktürmesi, ultrafiltrasyon ve jel filtrasyon kromatografisiyle %96.3 saflıkta elde edip spesifik aktivitesini 13011 U/mg olduğunu belirtmişler. Enzimin SDS-PAGE ile moleküler ağırlığını 56 kDa olduğunu veoptimum aktivitesini pH 7.5'te ve 50 ºC'degösterdiğini belirtmişlerdir.

Enez, (2011), tarafından *Geobacillus stearothermophilus* üzerindeki çalışmasında ekstraselüler α-amilaz enziminin izolasyon, saflaştırılma ve karakterizasyon yapılmıştır. α-amilaz enziminin izolasyonu sonucunda maksimumum aktiviteyi pH 7.0 ve 55°C'de olduğunu tespit etmiştir.

Rezzukoğlu, (2011), *Lactococcus sp.*PS-2A'nın α-amilaz aktivitesi üzerindeki çalışmasında pH 7.0'de, optimum 20. saatte (1847 U/mg)ve LB besiyerinde 35°C gerçekleştirdiğini belirtmiştir.

Femi-Ola ve Olowe, (2011), tarafından yapılan çalışmada *Bacillus subtilis* BS5 bakterisini izole edilmiş, izole ettikleri bakteri için en iyi üreme koşullarını 35 C 18 saat ve 120 rpm olduğunu belirtmişler.α-amilazı iyon değişim kromatografisi ve jel filtrosyon kromatografi ile saflaştırılmasını gerçekleştirilmiştir. Amialzaın molekül ağırlığını 63 kDa, optimum pH'yı 6.0, optimum sıcaklığı da 50°C olarak belirlenmiştir.Ağır metallerin ve kimyasal maddelerin enzim aktivitesi

üzerindekietkisine baktıklarında Ca^{2+} ve Na^{+}amilaz aktivitesini artırdığını; EDTA ve $HgCl_2$amilaz aktivitesini inhibe ettiğni belirtmişler.

Vidyalakshmi vd., (2009), Submermeged Fermantasyonla (SmF) *Bacillussp.*'den maksimum enzim üretiminin 10 saatlik inkübasyonda pH 7.0'de ve 35°C'de olduğunu belirtmişler.

Agüloğlu Fincan, (2008), tarafından yapılmış olan çalışma kapsamında sıcak su kaynağından *Bacillus subtilis* elde edilmiş ve α-amilaz karakterizasyonu çalışması yapılmıştır. Enzime ait optimum pH 7.0 veoptimum sıcaklık 65°C olarak belirlenmiştir. Artan EDTA ve glukoz konsantrasyon oranlarının enzim inhibisyonuna neden olduğu ve Ca^{+2}'ninde enzim aktifliğini arttırdığı bildirilmiştir.

Ray vd., (2008), tarafından alfa amilazların gıda işleme endüstrilerinde pişirme, bira ve damıtım gibi çeşitli uygulamaları bulunduğu kaydedilmiştir. Bu nedenle tuğla toprağında bulunan ve izole edilmiş *Bacillus brevis* MTCC 7521 suşukullanılarak Ca^{+2} bağımsız α-amilaz üretimi çalışmaları yapılmıştır. Optimum pH 6.0, sıcaklık 50°C ve inkübasyon süresinin de 36.saat olduğu tespit edilmiştir. Saflaştırılmış enzimin molekül ağırlığını, doğal SDS-PAGE'de 205 kDa olarak bulmuşlar.

Swain vd., (2006), inek mikroflorasından izole edilen *Bacillus subtilis* (CM3) tarafından α-amilaz üretimi çalışmaları yapılmıştır. Amilaz üretimi için optimum inkübasyon süresi 36 saat, pH 5.0-9.0 aralığında veoptimum sıcaklık değerinin 50-70°C gibi geniş bir aralık olduğunu bellirtmişler. Enzim sekresyonu, test edilen karbon kaynaklarından (patates nişastası, çözünür nişasta, buğday unu, manyok nişastası, fruktoz, glikoz vb.) herhangi birinin varlığında çok benzerdi. En iyi enzim üretimi %1 oranında nişasta içeren besiyerinde olduğunu belirtmişler. Azot kaynağı olarak maya özütü ve amonyum asetat (% 1) diğer azot kaynakları (pepton, malt özü, kazein, asparajin, glisin, sığır özü) ile karşılaştırıldığında daha yüksek verim verirken; amonyum klorür, amonyum sülfat ve üre, enzim aktivitesini inhibe etmiş. Kültür ortamına Ca^{+2}'nin (10-40 mM) eklenmesi enzim üretiminin daha da iyileşmesine yol açmazken, % 0.02'de sürfaktantların (Tween 40, Tween 20, sodyum lauril sülfat ve Tween 80) eklenmesiyle enzim üretiminde% 2-15 artış ile sonuçlandı.

Çalkalanan şişe ve laboratuar fermentör kültürleri arasında enzim veriminde önemli bir değişiklik olmamıştır.Saflaştırılmış enzim, doğal SDS-PAGE'de 18.0 +/- 1 ve 43.0 +/- 1 kDa moleküler kütleli olarak iki biçimdedir.

Konsula vd., (2004), eksraselüler α-amilaz üreten *Bacillus subtilis*'I taze koyun sütünden izole etmişler. İzole ettikleri *Bacillus subtilis*'ten salgılanan ekstraselüler α-amilazın etkisiyle nişastaların hidrolizi üzerine yaptıkları çalışmada; maksimum enzim üretiminin düşük oranda nişasta içeren besi yerinde 36 saatlik inkübasyonda (120 rpm) 40 ^{o}C' de ve pH 7.0'de olduğunu bellirtmişler.

Aguilar vd., (2000), tarafından yapılan çalışma kapsamında *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010'dan üretilip hücre dışına salgılanan α-amilaz karakterizasyonu ve saflaştırılması yapılmıştır. Enzime aitoptimum pH'sı 5.5, optimum sıcaklığı 55°C vemoleküler ağırlığı 135 kDa olarak olarak belirlenmiştir. Enzimin pH 5.0 ile pH 6.0'da iyi derecede stabile olduğunu, 55°C de 60 dakika inkübasyonda bekletildiğinde aktivitesini kaybettiği belirtilmiştir. Ağır metallerin, enzim aktivitesi üzerine etkisini araştırmışlar ve Hg^{+2}, Fe^{+3} ileAl^{+3}(10 mM) iyonlarının ortamda olmasın durumunda enzim aktivitesinin neredeyse kaybolduğunu belirtmişlerdir.

Roy vd., (2012), toprak örneğinden izole ettikleri ve 16s rRNA sekans analizine dayanarak *Bacillus subtilis* AS-S01 olarak tanımladıkları suştan elde ettikleri α-amilazın en iyi aktiviteyi 55 ^{o}C ve pH 9.0 göstediğini belirtmişler.

Kumari vd., (2013) hücre dışı asidofilik α-amilazın saflaştırması ve karakterizasyonu hakkında yaptıkları çalışmada; sebze ve hububat pazarından toplanan toprak örneğinden izole edilen *Bacillus cereus* MTCC 10205'den elde edilen amilaz amonyum sülfat çökeltmesi, jel filtrasyon kromatografisi, Sephadex G-100 ve iyon değişim kromatografisi ile saflaştırmışlar. Saflaştırmış oldukları α-amilazın moleküler ağırlığını Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile 55 kDa tek band şeklinde bulmuşlar. Saflaştırılan enzimin optimum sıcaklık değerini 55 °C ve pH optimum değerini ise 5.5 bulmuşlar.

Hasemi vd., (2013), Bu araştırmada Submerged fermantasyon (SmF) yöntemiyle *Bacillus* sp KR-8104'nin farklı sıcaklıklarda α-amilazın üretimi üzerine çalışılmıştır. Sıcaklıkğın ve pH'nın amilaz aktivitesi üzerindeki etkisine baktıkları bu çalımada 45 °C'ye kadar enzim üretiminin olduğu ancak en iyi enzim üretiminin37 °C'de ve pH 3.8 kaydedilmiştir.

Božić vd., (2011), yaptıkları çalışmalarında *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a'dan α-amilaz üretimi ve saf üretilmesini araştırmışlardır. En yüksek enzim üretiminin 37 °C de ve 24.saatte eldeedildiğini belirtmişler. α-Amilazı 6 kez ve % 38 verimle saflaştırmışlardır. Saf enzimin optimum sıcaklığını ise 90°C, optimum pH'sını 6.5 ve SDS-PAGE ile molekül ağırlığını 31 kDa olarak tespit etmişlerdir. $CaCl_2$ortamda olduğunda saf enzimin 70 °C de 6 saat süren inkübasyonda aktivitesinin %45'ini kaybettiğini fakat %55'inikoruduğunu belirlemişlerdir. Hg^{+2} iyonunun enzim aktivitesini tamamen durdururken, Co^{+2}, Ni^{+2}veCa^{+2}'ın enzimin aktivitesini çok az oranda arttırdığını tespit etmişlerdir.

Ataallahivd., (2021), *Bacillus subtilis*'den elde ettikleri amilazın saflığını, aktivitesini ve stabilitesini artırmak için aseton çöktürme ve iyon değişim kromatografisi ile saflaştırmışlar ve saflaştırma katsayısının 48 olduğunu belirtmişler. SDS-PAGE yaparak saflaştırdıkları enzimin molekül ağırlığını 50 kDa olarak bulmuşlar.

Bhatt vd., (2020), 16S rRNA gen dizilimi ile *Bacillus velezensis* KB 2216 olarak tanımladıkları suştan amilaz üretiminin log fazında başlağının ve maksimum üretime durgun fazda ulaşltığını kaydetmişler. Maksimum amilaz aktivitesi 2.78 U/ml ile 72. saatte olduğunu ve 80. Saatten sonra enzim yoğunluğunun ve aktivitesinin kademeli olarak azaldığını belitmişler.%30-80 amonyum sülfat çöktörmesi ve jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak %31.35 verimle elde ettikleri enzimin spesifik aktivitesini 4230.32 U/mg olduğunu belirtmişler. Saflaştırdıkları enzimin üç alt birimden oluştuğunu ve alt birimlerin molekül ağırlığını SDS-PAGE ile 62, 64 ve 66 (195kDa) kDa olarak tespit etmişlerdir. Saf enzimin optimum pH'sının ve sıcaklığının sırasıla pH 5.5 ve 55 °C olduğunu, metal iyonu etkisine baktıklarında Ag^{2+}, Hg^{2+} and Cd^{2+} (1 mM) tarfından güçlü bir şekilde inhibe edildiğini.

Lakshmi vd., (2020) palmiye şarabından izole ettikleri 46 suştan 12 tanesinin amilaz aktivitesi gösterdiğini belirtmişler. Bu 12 suştan Petri kabı üzerinde maksimum nişasta hidroliz bölgesini gösteren izolat PWI-4'ü morfolojik, biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle *Bacillus* Q-164 olarak tanımlamışlar. İzole ettikleri izolat 37 °C pH 7.0 da 24 saat inküsbsyonda maksimum üreme gerçekleştirmiş. *Bacillus*Q-164 tarafından üretilen amilaz, amonyum sülfat çökeltmesi ve ardından jel filtre kullanılarak saflaştırılmış. *Bacillus* Q-164'ten saflaştırdıkları amilazı SDS-PAGE yaparak molekül ağırlığını 45 kDa olarak belirlemişlerdir.

Rathi vd., (2022), *Bacillus subtilis* MB6 üzerinde yaptıkları çalışmada üç temel parametrenin (pH, sıcaklık ve inkübasyon süresi) a-amilaz üretimine olan etkisini araştırmışlar. Araştırma sonucunda en yüksek a-amilaz üretiminin 42 °C de, pH 9.0'da ve 48.Saatte gerçekleştiğini bellirtmişler.

Malhotra vd., (2000), aşırı termofil özellik gösteren *Bacillus thermooleovarans* izolatından termostabilite için Ca^{+2}'a gereksinim duymayan amilaz enzimi izolasyonunu ve elde edilen amilaz karakterizasyonunu gerçekleştirmiştir.

Fitter vd., (2001), tarafından termofilik ve mezofilik amilazların yapısal farklılıklarının aktiviteye etkisi üzerine yaptıkları çalışmada, termofilik proteinlerin mezofilik proteinlere göre daha yüksek yapısal esneklik gösterdiğini ve bunu termofilik enzimin yüksek termostabiliteye sahip olmasının sorumlusu olarak kabul etmişlerdir.

Deutch, (2002), tuza toleransı bulunan *Bacillus dipsosauri*'den kazandıkları amilazın en uygun 60°C ve pH 6.5 aktivite gösterdiğini ve yüksek tuz konsantrasyonlarında da iyi bir aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir.

Burhan vd., (2003), *Bacillus sp.* Ant-6' dan elde edilen amilazın optimum aktivitesinin 80°C'de ve pH 10.5 gösterdiğini bulmuşlardır. Aynı zamanda alkali, termostabil ve şelator dirençli bu enzimin nişasta, tekstil ve deterjan endüstrisi için uygun bir potansiyele sahip olduğunu ortaya koymuşlardır.

Najafi vd., (2005), yapılan çalışmada topraktan izole ederek tespit ettikleri *Bacillus subtilis* AX20'den ekstraselüler α-amilaz enzimini elde etmiş ve saflaştırılmasını gerçekleştirmişlerdir. Enzim üretiminin optimum olduğu sıcaklığı 37°C olarak tespit etmişlerdir. Saflaştırılan enzimin % 24.2 kazanım ile elde edildiğini ve spesifik aktivitenin 4133U/mg olduğunu belirtmişlerdir. Saflaştırdıkları α-amilazın optimum pH'sını 6.0, optimum sıcaklığını 55°C olarak bılmuşlardır. Enzim aktivitesi üzerine kimyasalların ve ağır metallerin nasıl etki ettiklerini araştırdıklarında, Cu^{+2}, Ag^{+2} ve Hg^{+2} tarafından inhibe edildiğini, EDTA'nın aktivitesini etkilenmediğini belirlemişlerdir.

Noman vd., (2006), tarafından yapılan çalışmada *Pachyrhizus erosus L*'den α-amilazı saflaştırmışlardır. Saf hale getirilen enzimden % 22.8 kazanımla elde edildiğini ve saflaştırma kat sayısının 110 olduğunu belirtmişlerdir. Enzime ait optimum sıcaklığın 37°C ve pH'nında 7.3 olduğu tespit edilmiştir. Saf hadeki enzimin molekül ağırlığının 40 kDa olduğunu belirtmişlerdir. Cu^{+2}, Fe^{+2} ve Zn^{+2} iyonlarının aktiviteyi yüksek derecede inhibe ettiğini Cd^{+2}, Hg^{+} ve Li^{+2} iyonlarının orta derecede etkilediğini, K^{+}, Mg^{+2} ve Ag^{+}iyonlarının ise aktivite üzerinde daha az etki gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Hirasawa vd., (2006), *Bacillus agaradhaerens* suşundan endoglukanaz enzimi izole etmişler, farklı pH ve sıcaklık'larda enzim aktivitesine ait çalışmalar yaparak, NaCl ile enzim aktivitesinin arttığını tespit etmişlerdir. NaCl'ün enzim aktivitesini yükseltici yöndeki etkisinin pH 6.5 - 7.0 arasında ve 60°C'de, altı kat daha yüksek olduğunu ortaya koymuşlardır.

Zhang ve Zeng (2008), elde ettikleri amilaz enziminin optimum pH değerini 8.0 olarak bulmalarının yanı sıra enzim pH 5.0- 10.0 aralığında da aktivitesini korumuştur.

Liu vd., (2008), *Bacillus sp. YX-1*'den α-amilazın üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyona yönelik çalışmalar yapmışlardır. Enzimin optimum sıcaklığını 40–50°C, enzimin pH 5.0'te en iyi aktivite gösterdiğini, pH 4.5 ile 11.0 arasında stabil

olduğunu tespit etmişlerdir. Saflaştırılan enzime ait molekül ağırlığını 56 kDa olarak hesaplamışlardır.

Shafiei vd., (2010), *Nesterenkonia sp. F* izolatından salgılanan amilazı saflaştırarak biyokimyasal karakterizasyonunu yapmışlar. Enzimin optimum sıcaklığını 45°C ve optimum pH'sını 7.5 ve molekül ağırlığını tahmini olarak 100-106 kDa olarak tespit etmişlerdir. Fe^{+3}, Zn^{+2}, Al^{+3} ve Cu^{+2} iyonlarının amilaz aktivitesini durdurduğunu, Ca^{+2} ile enzim aktivitesinin arttırıldığını bellirlemişlerdir. EDTA'nın enzim üzerine inhibisyon etkisinin olduğunu tespit etmişlerdir. Tween 20, Tween 80, %0.2Triton X-100 ve %0.5 SDS deterjanlarına karşı oldukça stabil olduğunu bulmuşlardır.

Wang vd., (2011), tarafından *Chryseobacterium taeanense* TKU001'den elde ettikleri stabil ve alkali amilazın karakterizasyonu ve saflaştırılması yapılmıştır. Saf α-amilazın molekül ağırlığını 46 kDa veya 47 kDa olduğu SDS PAGE elektroforezi ile belirlemişlerdir. Enzime ait optimum pH'sının 9.0, optimum sıcaklığının 50°C, sıcaklık stabilitesinin ise 60°C'de daha düşük sıcaklıklarda ve pH stabilitesinin 6.0–11.0 arasında olduğunu belirtmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

Çalışma kapsamında çeşitli cihazlar, mikroorganizmanın çoğalması için optimum koşulların hazırlanması ve deneyin uygulanabilmesi için çeşitli kimyasal maddeler kullanılmıştır.

3.1.1 Kullanılan cihazlar

Tablo 3.1 Çalışma kapsamında kullanılan cihazlar

Cihaz	Marka
Güvenlik kabini (steril)	Telstar AV-100
Spektrofotometre	Shimadzu, UV Mini 1240
Shaker	Memmert
Santrifüj (Soğutmalı)	Sigma 2K-15
Karıştırıcı	VWR International

3.1.2 Kullanılan mikroorganizma

Bu çalışmada Ergani Makam Dağı'ndan toplanan toprak örneğinden izole edilen *Bacillus subtilis* bakterisi kullanılmıştır.

3.1.3 Bakterinin izolasyonunda ve enzim eldesinde kullanılan besi yerleri ve kimyasal maddeler

3.1.3.1 Besi yerleri

Nutrient Agar (NA) ve Nutrient Broth (NB) katı formda Merck'ten temin edilmiştir. Toprak örneğinden bakteri izolasyonu yapmak, izole edilen bakteri stok kültürünün saklanması ve bakterinin ürettiği α-amilaz aktivitesinin saptanması ve üretilmesi amacıyla kullanılmıştır. Kültür ortamının pH'sı bakterinin izolasyon koşullarına uygun olarak pH 7.0'ye dengelenmiştir. Hazırlanan kültür ortamı otoklavda 121 ^{0} C'de ve 20 dakika steril edilmiştir.

3.1.3.2 Sıvı besi yeri

8 gram Nutrient Broth (NB), distile su ile 1000ml'ye tamamlandıktan sonra otoklavda 121 °C'de ve 20 dakika steril edilmiştir.

3.1.3.3 Katı besi yeri

20 gram Nutrient Agar (NA), distile su ile 1000 ml'ye tamamlandıktan sonra otoklavda 121 °C'de ve 20 dakika steril edilmiştir.

3.1.4 Karbon kaynakları

Karbon kaynağı olarak; nişaşta, sukroz, maltoz, laktoz, galaktoz, fruktoz, gulukoz kullanılmıştır.

3.1.4.1 Azot kaynakları

Üre, sodium nitrat, maya özütü, amonyum sülfat, amonyum nitrat, amonyum klorür, Merck'ten; tripton Sigma'dan; pepton Oxoid'den ve et özütü Acumedia'dan; temin edilmiştir.

3.1.4.2 Deterjanlar

Tween 80 ve Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Merck'ten; TritonX-100, ve brij, Sigma'dan temin edilmiştir.

3.1.4.3 Diğer maddeler

Sodyum-Potasyum Tartarat tetrahidrat(Na-K-Tartarat), Phenylmethysulfonylfluoride (PMSF)Fluka Bichemica; β- Mercaptoethanol Merck; Folin reaktifi (FCR), Dithiothreirol (DTT), Dinitro salisilik asit (DNS) Sigma; Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) Merck'tenticari olarak temin edilmiştir. $HgCl_2$, $CuCl_2$, $CaCl_2$Merck; $MgCl_2$ Kimetsan; $ZnCl_2$ Lachema; $MnCl_2$ve $FeCl_2$ Sigma'dan ticari olaraktemin edilmiştir.

3.1.5 Kullanılan çözeltiler

3.1.5.1 Tamponlar

- 0.1 M Sitrik Asit: pH 6.0, pH 5.0 ve pH 4.0
- 0.1 M. Tris- HCI: pH 9.0, pH 8.0 ve pH 7.0
- 0.1 M Karbonat / Bikarbonat: pH 11.0, pH 10.0

-0.1 M Fosfat tamponu pH 8.0 tamponları hazırlanmıştır.

-0.05 M Tris Asetat Tamponu pH 7.0 (0.1 M NaCl içerikli) hazırlanmıştır.

-Diyaliz Tamponu; 6 gr KH_2PO_4, 14 gr K_2HPO_4, 100 mM $MgSO_4.7H_2O$, 1 gr $C_6\ H_5\ Na_3\ O_7\ .2\ H_2\ O$ (Sodyum Sitrat) l lt saf suda çözülerek hazırlanmıştır.

3.1.5.2 Lugol çalışma solüsyonu

Gram boyama ve katı besiyerinde amilaz aktivitesi yaparken kullanıldı. Koyu renkli bir şişede karıştırılır, günlük çalışma solüsyonu hazırlanır.

Tablo 3.2 Günlük çalışılacak lugol solüsyonu

Potasyum iyodür (KI)	1.5 g
İyot (I)	3.5 G
Distile su	50 ml

3.1.6 SDS-PAGE işleminde kullanılan çözeltiler

Ayırıcı ve yığma jel hazırlanırken kullanılan bir çözeltiler olup elektroforez Laemmli metoduna göre yapıldı (Laemmli, 1970).

3.1.6.1 Çözelti A

0.8 g Bisakrilamid ve 30 g Akrilamid az miktarda distile suda iyice çözüldükten sonra son hacim balon jojede distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. Hazırlanan çözelti koyu renkli cam şişede ve 4 ºC saklandı.

3.1.6.2 Çözelti B

1.5 M Tris-HCl pH 8.8 çözeltisi hazırlamak için 18.2 g Tris-base 80 ml saf suda çözüldü, pH 8.8'e ayarlandıktan sonra son hacim hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı. Filtre edilip 0.4 g SDS ilave edilerek 4 ºC'de saklandı.

3.1.6.3 Çözelti C

0.5 M Tris. HCl pH 6,8 çözeltisi hazırlamak için 6 g Tris-base 80 ml saf suda çözüldü, pH 6.8'e ayarlandıktan sonra son hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı. Filtre edilip 0.4 g SDS ilave edilerek 4 ºC'de saklandı.

3.1.6.4 Amonyum persülfat (AMPS) (%10)

Poliakrilamid jellin polimerizasyonsürecini başlatıcı ajan olarak kullanılır. 1 g Amonyum Persülfat (AMPS) 10 ml distile su eklenerek hazırlanır. %10'luk Amonyum Persülfat (AMPS) her kullanımdan önce taze hazırlanmalıdır.

3.1.6.5 N, N, N', N'-Tetrametiletilendiamin (TEMED)

Poliakrilamid jelin polimerizasyon reaksiyonunda katalizör olarak rol oynamaktadır.

3.1.6.6 Elektroforez tamponu

3 g Tris, 14.4 g Glisin ve 0.1 g SDS 1 litre distile su içinde çözülerek hazırlanmıştır .

3.1.6.7 Jel boyama çözeltisi

Jeldeki protein bantlarının görünür hale gelmesi amacıyla hazırlanan çözeltidir. 1 g Coomassie Brillant Blue R-250, 800 ml metil alkol içerisinde çözülüp filtre edildikten sonra karışımın üzerine 140 mlasetik asit ilave edilip son hacim 2 litreye tamamlandı.

3.1.6.8 Boya çıkarma çözeltisi

860 ml metil alkol ile 140 ml asetik asit karıştırılarak hacim 2 litreye tamamlandı.

3.2 Metot

3.2.1 Bakteri izolasyonu ve teşhisi

Bu aşamada bakteri izolasyonu ve teşhisine yönelik çalışmalar yapılmıştır.

3.2.1.1 Bakteri izolasyonu ve üretimi

Bacillus sp. izolasyonu için çeşitli ortamlardan alınan toprak örnekleri birer gram tartım yapılarak 10 ml steril distile su ile süspansiyon haline getirilerek 37 ºC'de 30 dakika inkübe edildi. Üst kısımdan alınan 2 ml'lik örnek pH'sı 7.0 olan 25 ml'lik Nutrient Broth (NB) sıvı besi yerlerine inoküle edilip, 37 ^{0} C ve 120 devir/dk 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra saf koloni elde etmek için örneklerden sulandırma serileri yapılmıştır (10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}). Örneklerin seri sulandırmalarından sonra pH'sı 7.0 olan Nutrient Agar (NA) besi yerlerine yayma yöntemiyle ekim yapılmıştır ve 37 ^{0} C'de gecelik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra Bacillus cinsine ait karakteristik ve morfolojik görünüme sahip olan koloniler çizgi ekim yöntemiyle Nutrient Agar (NA) besi yerlerine ekilip, 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Nutrient Agar (NA) besi ortamında çoğalan örnekler stok kültür şeklinde saklanmışlardır.

3.2.1.2 Bakteri teşhisi

Bacillus sp. koloni morfolojisine sahip olan suş alınarak α-amilaz aktivitesine sahip olup olmadığı işaretlenmiştir. α-amilaz üretme yeteneğinde olan bakterinin teşhisi için Nişasta hidroliz testi, katalaz testi, gram boyama, hareket testi ve üreaz testi gibi biyokimyasal testler yapılmıştır. Gram pozitif, hareketli, üreaz pozitif ve katalaz aktivitesine sahip olan α-amilaz üreticisi suşun 16S ribozomal RNA analizi ile moleküler tanımlaması Ref-Gen (METU Technocity/Ankara) tarafından yapılmış ve suşun filogenetik ağacı çizilmiştir.

3.2.2 Enzim eldesi

Enzim aktivite deneylerinde, Nutrient Broth (NB) besiyerinde 48 saat inkübe edilmiş bakteri kültürü10 dakika 10.000 rpm'de santrifüj edildikten sonra elde edilen üst sıvı kullanılmıştır.

3.2.3 α-Amilazaktivite tayini

Bernfeld yöntemi uygulanarak α-Amilaz aktivite tayini belirlenmiştir (Bernfeld, 1955). Bu yöntemde enzim içeren üst sıvıdan100 µl ile 0.1 M pH 7.0 Tris-HCl tamponu içerisinde çözünmüş % 0.005'lik nişasta çözeltisinden 200 µl karıştırılarak 30 dakika 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda reaksiyonun durdurulması için 3,5 DNS (3,5 dinitro salisilik asit)'den400 µl ilave edildikten sonra kaynar su banyosunda 5 dakika bekletildi. DNS, sıcak ortamda şekerlerin indirgen uçlarıyla tepkimeye girmesi sonucunda hem reaksiyonu durdurmakta hem de renk oluşumunu sağlamaktadır. Son olarak 3 ml saf su ile seyreltme yapıldıktan sonra spektrofotometrede 489 nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır.

3.2.4 Protein miktar tayini

Enzim çözeltilerinin içerdiği protein miktarı Lowry yöntemi izlenerek belirlendi (Lowry, 1951). Çalışma tüplerine 5 ml alkalin çözeltisi konuldu daha sonra üzerine 50 µl enzim ve 450 µl saf su eklendi. Test tüpleri40 ºC'de 15 dakika sıcak su banyosunda bekletildikten sonra üzerine bire bir (1:1) oranında distile suyla seyreltilmiş 500 µl Folin Reaktifi (FCR, Sigma) eklenerek 30 dakika karanlıkta bekletildikten sonra 660 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapıldı.

3.2.5 Nişasta hidroliz testi

Bu testin amacı bir polisakkarid olan nişastanın bazı mikroorganizmaların üretip hücre dışına verdikleri ekstraselüler α-amilaz tarafından parçalanıp parçalanmadığını belirlemek amacıyla yapılır. Bunun için petri kaplarına %3'lük nişastalı Nutrient Broth Agar (NB) hazırlandı ve taze katı besiyerlerinde çoğaltılan bakteri kültüründen alınan bakteri ekimi yapıldı. Bakterinin en iyi geliştiği sıcaklıkta 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda petri kaplarında bulunan agarın üzerine iyot çözelti dökülerek reaksiyon 3-5 dakika içinde değerlendirildi. Pozitif sonuçlarda, koloni etrafında şeffaf renksiz bir halka oluşurken, negatif sonuçlarda ise koloni etrafında şeffaf renksiz halka oluşmayıp besiyeri mavi-mor renge boyanır.

3.2.6 Gram boyama

Gram boyama bakteri tür teşhisi amacıyla yapılmıştır. Bakterileri hücre duvarlarının fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre iki gruba ayırmak için kullanılan yöntemdir.

Bu yöntemde lam üzerine 1 damla kadarsu konulduktan sonra öze yardımıyla bakteri yayılır ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılır. Alevden geçirilerek bakterilerin fiziksel tespiti yapılır. Preparatın üzerine kristal viyole çözeltisi konulur ve 1 dakika bekletildikten sonra yıkanır. Sonra Lügol-iyot çözeltisinde 1 dakika bekletilir ve yıkanır. Daha sonra %96'lık etanol ile deklore edilir ve su ile yıkanır. Daha sonra safranin ile 30 saniye boyanır ve tekrar su ile yıkanır. Lamlar kurutmaya bırakılır lamlar kuruduktan sonra immersiyon objektifinde (x100) incelenir. Gram pozitif bakteriler mavi- mor ve Gram negatif bakteriler ise kırmızı- pembe boyanırlar.

3.2.7 Üreaz testi

Bu test mikroorganizmaların üreyi hidroliz eden üreaz enzimini üretip üretmediklerini tespit etmek için yapılır. Üreaz testi bakterilerin cins ve tür tayininde kullanılır. Taze kültüre edilmiş bakteriden ekim yapılarak optimum sıcaklıkta gecelik inkübasyona bırakıldı ve renk değişimi olup olmadığı gözlemlendi. Kültür ortamında rengin pembeye dönüşmesi durumunda üreaz pozitif, renk değişiminin gözlemlenmemesi durumunda üreaz negatif olarak değerlendirildi.

3.2.8 Hareket testi

Mikrorganizmaların hareket yeteneklerinin olup olmadığını belirlemek için yapılan testir. Bu test için; % 0.4 şeffaf yarı katı agarlı besiyeri, içinde kapiler tüplerin bulundugu deney tüplerine konuldu.İzolatların gecelik kültürlerinden tek koloni öze yardımıyla alınarak kapiler tüp içerisine ekim yapıldı ve suş için optimum sıcaklıkta 24 saat inkübasyona bırakıldı. Besiyerinin inokülasyon hattı boyunca üreme var ancak sağa sola doğru yayılma ve dallanma yoksa mikroorganizma hareketsiz kabul edilir, fakat inokülasyon hattından etrafa doğru agarın içine dogru bir yayılma gözlenmesi durumunda hareketli olarak kabul edilir.

3.2.9 Katalaz testi

Bu test, mikroorganizmaların katalaz enzimini üretip üretmediklerinitespit etmek amacıyla yapılır. Katalaz testi için 37 °C gecelik bakteri kültürü kullanılmıştır. Katalaz enzimi Hidrojen peroksiti (H_2O_2) parçalayan bir enzimdir. Hidrojen peroksitin %3' lük çözeltisinden bir damla üreme oluşan yüzeye damlatılır ve gaz

kabarcıklarının çıkıp çıkmadığı kontrol edilir. Gaz kabarcıklarının çıkması halinde pozitif, çıkmaması halinde negatif olduğunu kabul edilir.

3.2.10 İnkübasyon süresinin mikroorganizma gelişimi üzerinde etkisi

Mikroorganizma gelişimi üzerine inkübasyon süresinin etkisi belirlemek için, pH 7.0'ye ayarlanan Nutrient Broth (NB) besi yerinde2 ml bakteri ekimi yapılarak 37 ºC'de 0–96 saatleri arasında 4 gün boyunca 4 saat aralıklarla örnek alınarak 460 nm'de spektrofotometrede absorbans ölçümleri yapıldı.

3.2.11 Mikroorganizma gelişimi üzerine sıcaklığın etkisi

Mikroorganizma gelişimi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek için, pH 7.0'ye ayarlanan Nutrient Broth (NB) besi yerine 2 ml bakteri ekimi yapılarak ve 15-20-25-30-35-40-45-50-55-60 ºC'de optimum üreme zamanında, 120 rpm'de çalkalamalı su banyosunda inkübasyona bırakıldı ve 460 nm'de spektrofotometrede absorbans ölçümleri yapıldı.

3.2.12 Mikroorganizma gelişimi üzerinepH'nınetkisi

Mikroorganizma gelişimi üzerine pH'nın etkisini belirlemek için, Nutrient Broth (NB) besi yeri pH 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5,10.0, 10.5 ve 11.0 olacak şekilde ayarlanarak steril edildi ve 2 ml bakteri aktarımı yapılarak en iyi ürediği üreme sıcaklığında ve üreme zamanında 120 devir/dk'da çalkalamalı su banyosunda inkübasyona bırakıldı ve 460 nm'de spektrofotometrede absorbans ölçümleri yapıldı.

3.2.13 İnkübasyon süresinin α-amilaz üretimine etkisi

α-Amilaz üretme yeteneğine sahip *Bacillus subtilis*'in ürettiği ve enzim sentezini gerçekleştirdiği optimum inkübasyon süresini belirlemek amacıyla *Bacillus subtilis* sıvı besi yerine inoküle edildi. *Bacillus subtilis* sıvı besi yerinde 12 saat (gecelik) ön inkübasyona bırakıldı. 12 saatlik taze kültür OD 460'de ölçülerek bakteri yoğunluğu belirlendi. Hazırlanan gecelik kültürden 2 ml alınarak içerisinde dörtte bir aranında besiyeri yeri bulunan 100 ml'lik erlenlere aktarıldı. Hazırlanan kültür ortamı *Bacillus subtilis'*in izolasyon sıcaklığında (37 ^{o}C) ve 120 devir/dk.'de 96 saat inkübe edildi. Bakteri ekim işleminden itibaren 0., 4., 8., 12., 16., 20., ... ve 96. saatlerde sıvı

kültürlerden örnek alındı. Alınan örnekler 10000 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüj edilerek bakteriler uzaklaştırıldı. Elde edilen süpernatantlar ileα-amilaz aktivite tayini yapıldı. Aktivite tayini sonunda suşun ürettiği ve enzim üretiminin gerçekleştirdiği optimum inkübasyon süresi belirlenmiştir.

3.2.14 Sıcaklığın α-amilaz üretimine etkisi

*Bacillus subtilis'in*besi yerinde ürediği, α-amilaz üretimini gerçekleştirdiği optimum sıcaklık aralığının belirlenmesi amacıyla *Bacillus subtilis* sıvı besi yerinde incelenmiştir. α-amilazüreten *Bacillus subtilis* pH'sı 7.0 ve NB sıvı besi yerinde 12 saatlik gecelik ön inkübasyona bırakılmıştır. Bir gecelik taze kültürün bakteri yoğunluğunu saptamak amacıyla OD 460 nm'de okundu. Enzimin üretildiği sıcaklık aralığının belirlenmesi amacıyla tespit edilen optimum pH'da ayrı ayrı hazırlanan NB sıvı besi yerine 2 ml inoküle edilmiştir. İnokülasyonu yapılan örnekler 15,20,25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 ve 60^{o}C'lerde ve 120 rpm'de, en iyi üreme süresinde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda her sıcaklık değerindeki kültürden örnek alınıp 1000 devir/dk.'de 10 dakika santrifüj edildi bu işlem sonucu elde edilen süpernatantlar ileα-amilaz aktivite ölçümü yapılıp α-amilaz üretiminin gerçekleştiği en iyi sıcaklık değeri belirlendi.

3.2.15 pH'nın α-amilaz üretimine etkisi

*Bacillus subtilis'in*besi yerinde ürediği, α-amilaz üretimini gerçekleştirdiği pH aralığının saptanması amacıyla *Bacillus subtilis* sıvı besi yerinde incelenmiştir. α-amilaz üreten bakteri pH'sı 7.0 ve NB sıvı besi yerinde 12 saatlik süreyle gecelik ön inkübasyona bırakılmıştır. Bir gecelik taze kültür OD 460 nm'de okunarak bakteri yoğunluğu saptanmıştır. Enzim sentezinin gerçekleştiği pH aralığının tespiti için, α-amilaz üreten *Bacillus subtilis* pH 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5,10.0, 10.5 ve 11.0 olan NB sıvı besi yerine 2 ml oranında inoküle edilmiştir. Suş, izolasyon sıcaklığında (37^{o}C), 120 rpm'de ve en iyi inkübasyon süresinde üremeye bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda her pH değerindeki örnek 10000 devir/dk.'da 10 dakika süreyle santrifüj edilerek bakterilersıvı ortamdan uzaklaştırılmıştır. Elde edilen bakterilerin uzaklaştırılmasıyla elde edilen süpernatantlar ile standart α-amilaz aktivite tayini yapılmış ve enzim sentezinin gerçekleştiği optimum pH değeri tespit edilmiştir.

3.2.16 Sıcaklığın α-amilaz aktivitesi üzerine etkisi

Enziminen iyi aktif olduğu sıcaklık değerinin belirlenmesi için 0.2 ml enzim ve optimum pH değerinde olan 0.4 ml substratlı tampon içeren reaksiyon karışımı 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 ve 60 °C sıcaklıklarda 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda reaksiyon karışımına 0,4 ml DNS ayıracı eklenerek karışım 5 dakika kaynatıldı. Üzerine 3 ml saf su eklendikten sonra 489 nm dalga boyunda Ultraviyole ve görünür ışık (UV-Vis) absorpsiyon spektrofotometrisi kullanılarak köre karşı ölçüm yapıldı ve absorbans değerleri elde edildi. En iyi sıcaklık değerinin belirlenmesi için rölatif (geriye kalan) enzim aktivitesi hesaplandı. Bunun için en yüksek absorbans değerinin elde edildiği sıcaklık absorbans değeri 100 kabul edilerek diğer sıcaklılardan elde edilen absorbanslar optimum değere göre oranlanıp rölatif (geriye kalan) enzim aktivitesi belirlenmiştir.

3.2.17 α-amilaz aktivitesi üzerine ph etkisi

Optimum pH değerinin saptanması için 0.1 M Sitrik asit / Sadyum Sitrat (pH 3.0, 4.0, 5.0), 0.1 M Tris-HCl (pH 6.0, 7.0, 8.0, 9.0) ve 0.1 M bikarbonat/karbonat (pH 10.0, 11.0) düzenleyicileri kullanılmıştır. Enzimin optimum pH değerlerinin belirlenmesi için farklı pH değerlerinde hazırlanan, içerisinde % 0,5oranında nişasta bulunan substrat çözeltileri hazırlanarak aktivite ölçümü yapıldı. Reaksiyon için 0.2 mlüst sıvı (süpernatant) ve 0.5 ml substratlı pH tamponu karıştırılıp enzimin elde edildiği sıcaklıkta 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda reaksiyon karışımına 0,4 ml DNS ayıracı eklenerek karışım 5 dakika kaynatıldı. Üzerine 3 ml saf su eklendikten sonra 489 nm, dalga boyunda Ultraviyole ve görünür ışık (UV-Vis) absorpsiyon spektrofotometrisi kullanılarak köre karşı ölçüm yapıldı ve absorbans değerleri elde edildi. En iyi pH değerinin belirlenmesi için rölatif (geriye kalan) enzim aktivitesi hesaplandı. Bunun için en yüksek absorbans değerinin elde edildiği sıcaklık absorbans değeri 100 kabul edilerek diğer sıcaklılardan elde edilen absorbanslar optimum değere göre oranlanıp rölatif (geriye kalan) enzim aktivitesi belirlenmiştir.

3.2.18 Enzim üretimi üzerinde karbon kaynaklarının etkisi

Bacillus subtilis'in gelişimi ve amilaz sentezi üzerine karbon kaynaklarının etkisini incelemek için önceden bellirlenen en uygun koşullarakültür ortamına ticari olarak satın alınan ve yüksek saflıktaki karbon kaynakları %1 oranında ilave edildi. Karbon kaynağı olarak gulukoz, galaktoz, laktoz, sukroz, maltoz, nişaşta ve fruktoz kullanıldı. Kontrol için karbon kaynağı içermeyen Nutrient Broth (NB) kültür ortamı kullanıldı. *Bacillus subtilis*suşu optimum şartlarda 37 ºC de, 120 devir/dk'da 48 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon boyunca α-amilazın aktivitesi ve protein miktarı belirlendi.

3.2.19 Enzim üretimi üzerinde azot kaynaklarının etkisi

Bacillus subtilis'in gelişimi ve amilaz sentezi üzerine azot kaynaklarının etkisini incelemek için önceden bellirlenen en uygun koşullara kültür ortamına ticari olarak satın alınan ve yüksek saflıktaki azot kaynakları %1 oranında ilave edildi. Azot kaynağı olarak pepton, sodium nitrat, amonyum nitrat, ammonium klorid, ammonyun sülfat,tripton, et özütü ve üre kullanıldı. Kontrol için azot kaynağı içermeyen Nutrient Broth (NB) kültür ortamı kullanıldı. *Bacillus subtilis*suşu optimum şartlarda 37 ºC de, 120 devir/dk'da 48 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon boyunca α-amilazın aktivitesi ve protein miktarı belirlendi.

3.2.20 Metal iyonlarınınα-amilaz aktivitesine etkisinin belirlenmesi

Çeşitli metal iyonlarının α-amilaz aktivitesine etkisini belirlenmesi amacıyla 1.5 mM konsantrasyonda hazırlanan çözeltiler ile α-amilaz karıştırılarak süspansiyonlar hazırlanmıştır. α-amilaz 37°C, 30 dakika süreyle ön inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Metal iyonu olarak $CaCl_2$, $MgCl_2$, $CuCl_2$, $ZnCl_2$, $FeCl_2$, $MnCl_2$ ve $HgCl_2$ (1.5mM) kullanılmıştır. Metal iyonları ile işlem görmüş α-amilazın aktivitesi belirlemek için optimum pH tamponuyla hazırlanmış 0.4 ml substratlı çözelti ile 0.2 ml metal iyonları ile işlem görmüş α-amilaz karıştırılmış ve optimum aktivite sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında aktivite ölçümleri yapılmıştır. Metal iyonu ile işlem görmüş enzim aktivitesinin saptanması için metal iyonu ile işlemden geçmemiş enzim aktivitesi 100 olarak kabul edilmiştir. Ön işlem uygulaması yapılan örneklerden elde edilen değerler metal iyonu ile işlem görmemiş

enzim aktivitesi aktivite ile karşılaştırılarak geriye kalan (rölatif) enzim aktivitesi hesaplanmıştır.

3.2.21 Deterjanların α-amilaz aktivitesine etkisinin belirlenmesi

Çeşitli deterjanların α-amilaz aktivitesine etkisini belirlenmesi amacıyla %1 konsantrasyonda hazırlanan çözeltiler ile α-amilaz karıştırılarak süspansiyonlar hazırlandı. α-Amilaz37 °C, 30 dakika süreyle ön inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Deterjan olarak SDS, brij, tritonX-100 ve tween 80kullanıldı. Deterjan ile işlem görmüş α-amilazın aktivitesi belirlemek için optimum pH tamponuyla hazırlanmış 0.4 ml substratlı çözelti ile 0.2 ml metal iyonları ile işlem görmüş α-amilaz karıştırılmış ve optimum aktivite sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında aktivite analizleri yapıldı. Deterjan ile işlem görmüş enzim aktivitesinin saptanması için deterjan ile işlemden geçmemiş enzim aktivitesi 100 olarak kabul edildi. Ön işlem uygulaması yapılan örneklerden elde edilen değerler deterjan ile işlem görmemiş enzim aktivitesi ile karşılaştırılarak geriye kalan (rölatif) enzim aktivitesi hesaplanmıştır.

3.2.22 İnhibitör maddelerin α-amilaz aktivitesine etkisinin belirlenmesi

Çeşitli inhibötör maddelerin α-amilaz aktivitesine etkisini belirlenmesi amacıyla 1 mM, 5 mM ve 10 mM konsantrasyonda hazırlanan çözeltiler ile α-amilaz karıştırılarak süspansiyonlar hazırlanmıştır. α -amilaz 37 °C, 30 dakika süreyle ön inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnhibitör madde olarak PMSF (1 mM, 5 mM ve 10 mM), β-Merkaptoehtanol (1 mM, 5 mM ve 10 mM), DTT (1 mM, 5 mM ve 10 mM), EDTA (1 mM, 5 mM ve 10 mM) ve Etanol 1 mM, 5 mM ve 10 mM) kullanıldı. İnhibitör madde ile işlem görmüş α-amilaz 0.2 ml alınarak 0.4 ml substratlı optimum pH tamponu üzerine eklenerek optimum aktivite sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda aktivite ölçümleri yapıldı. İnhibitör madde ile işlem görmüş enzim aktivitesinin saptanması için inhibitör madde ile işlemden geçmemiş enzim aktivitesi 100 olarak kabul edildi. Ön işlem uygulaması yapılan örneklerden elde edilen değerler inhibitör madde ile işlem görmemiş enzim aktivitesi aktivite ile karşılaştırılarak geriye kalan (rölatif) enzim aktivitesi hesaplanmıştır.

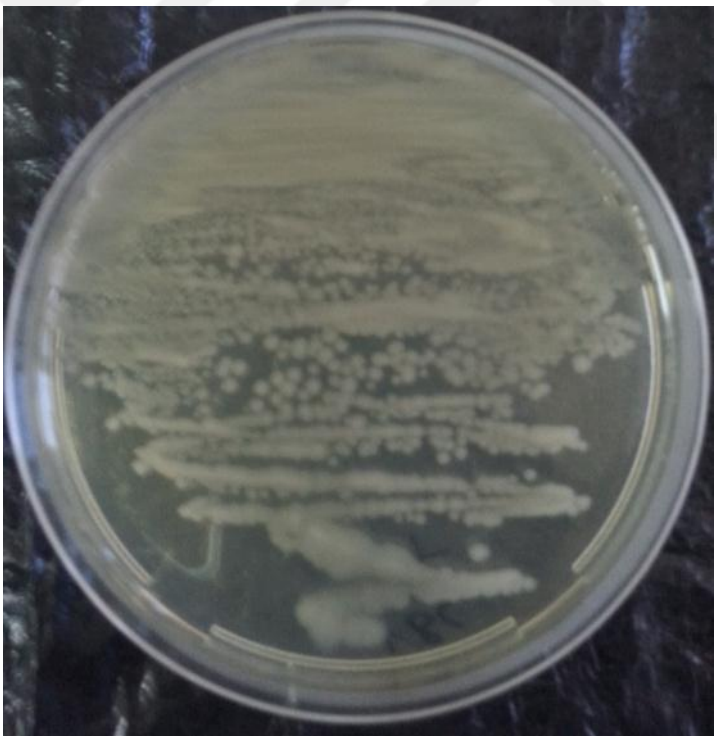
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Bakteri İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Çalışma sonucunda elde edilen veriler doğrultusunda bakteri izolasyonu yapılmış ve çeşitli aşamalardan sonra da identifikasyonu yapılmıştır.

4.1.1 *Bacillus subtilis*bakterisinin izolasyonu

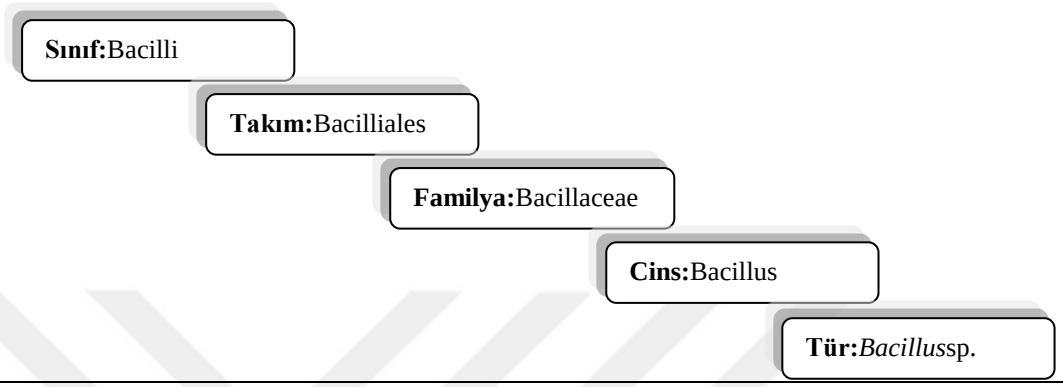
İzole etmek istedigimiz *Bacillus sp*. süspansiyonu 37 °C sıcaklıkta 30 dakika inkübe edildi.Üst taraftan2 ml hacminde örnek alınarak Nutrienth Broth (NB) besiyerine pH 7.0' de ekimiyapıldıktan sonra çalkalamalı su banyosunda 2 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Daha sonra petri kabında katı besiyerlerine yayma metoduyla ekimleri yapılarak 37 °C sıcaklıkta bir gecelik inkübasyona bırakılmıştır. Şekil 4.1'de görüldüğü gibi Nutrient Agar'da üreyen ve koloni morfolojisi *Bacillus sp.*'ye benzeyen suş seçildi.



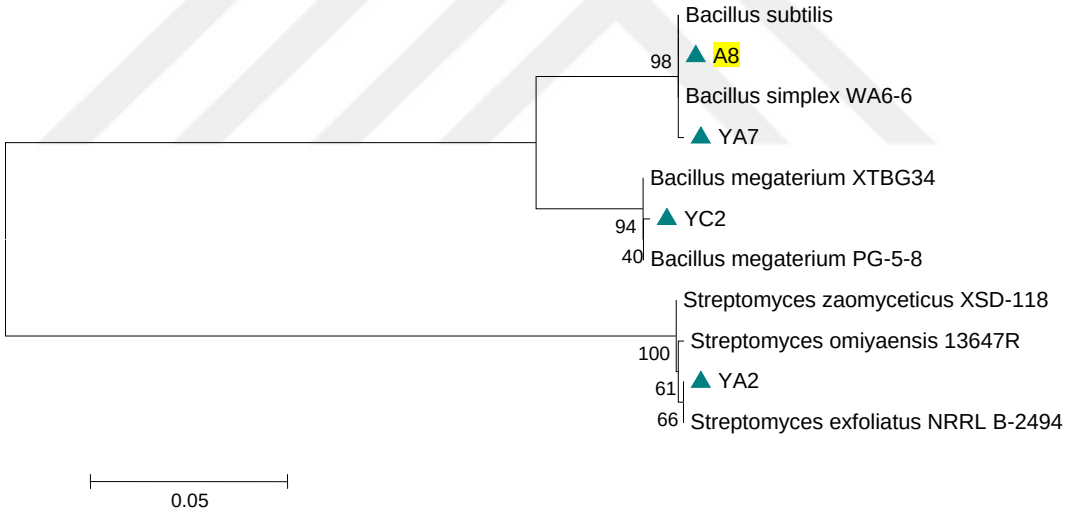
Şekil 4.1 *B. subtilis*'e ait koloni görünümü

4.1.2 *Bacillus subtilis*bakterisinin identifikasyonu

Bakteri suşunun tanımlanması, 16S rRNA analiziyle Ref-Gen (METU Technocity/Ankara) tarafından yapılmıştır.Şekil 4.2 ve 4.3'te sırasıyla *B. subtilis* A8 bakterisine ait sınıflandırma ve filogenetik ağaç olarak görünümü gösterilmiştir.



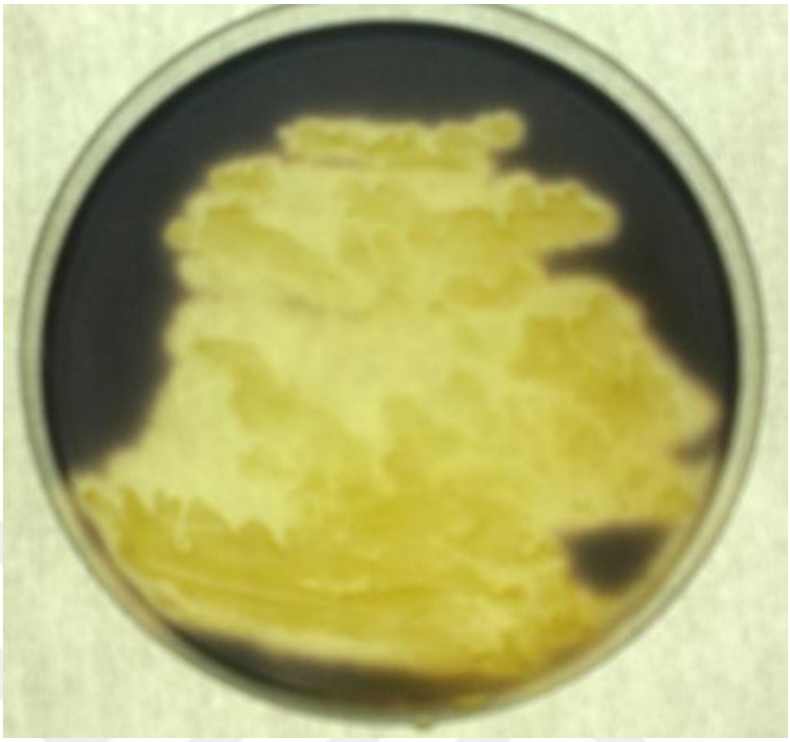
Şekil 4.2 *B. subtilis* A8 bakterisine ait sınıflandırma



Şekil 4.3 *Bacillus subtilis*. A8'nin filogenetik ağacı

4.1.2.1 Nişasta hidrolizi testi

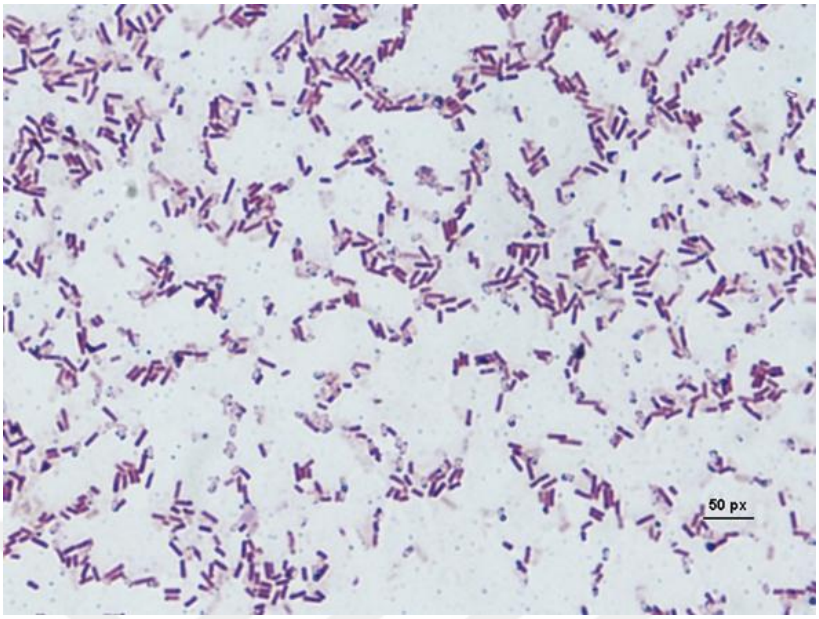
Bu test, polisakkarid olan nişastanın mikroorganizmalar tarafından sentezlenen ekstrasellüler α-amilaz tarafından hidrolizasyonunu ortaya koymak amacı ile yapılır. Aynı zamanda bu test bakteri cins ve türlerinin belirlenmesinde kullanılır. Şekil 4.4'te *Bacillus subtilis*'in %3 nişastalı agarda tanımlamaya yönelik biyokimyasal test sonucu gösterilmiştir.



Şekil 4.4 Bacillus subtilis'in nişastalı agarda α-amilaz varlığının tespiti

4.1.2.2 Gram boyama testi

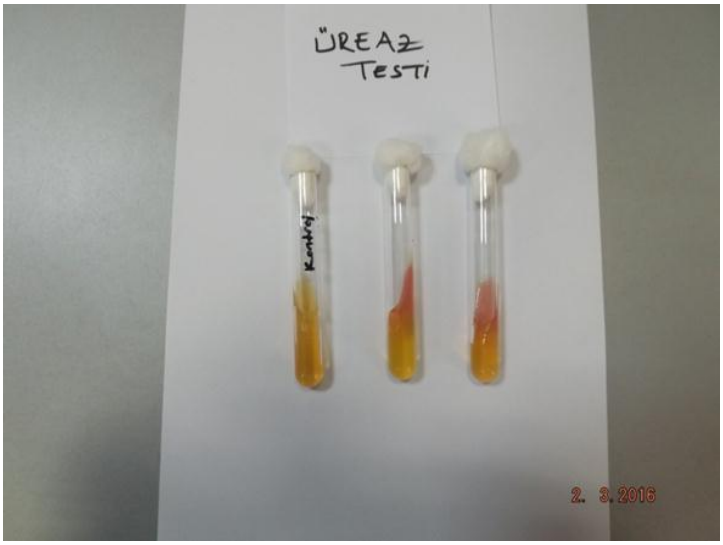
Gram boyama işlemi yapıldıktan sonra mikroskop incelemesinde bakterilerin mor veya mavi renkte gözlemlenmesi halinde Gram-pozitif, pembe renkte gözlemlenmesi halinde ise bakteriler Gram-negatif olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen izolatın Gram pozitif ve basil şeklinde olduğu belirlendi. Şekil 4.5'te *Bacillus subtilis*'e ait Gram boyama sonucu görülmektedir.



Şekil 4.5 *Bacillus subtilis*'in Gram boyamasına ait mikroskop görüntüsü

4.1.2.3 Üreaz testi

Şekil 4.6'da *Bacillus subtilis* bakterisi üzerinde uygulanan üreaz testine ait sonuçlar görülmektedir. Şekilde de gözlendiği gibi üreaz testi, pozitif sonuç vermiştir.

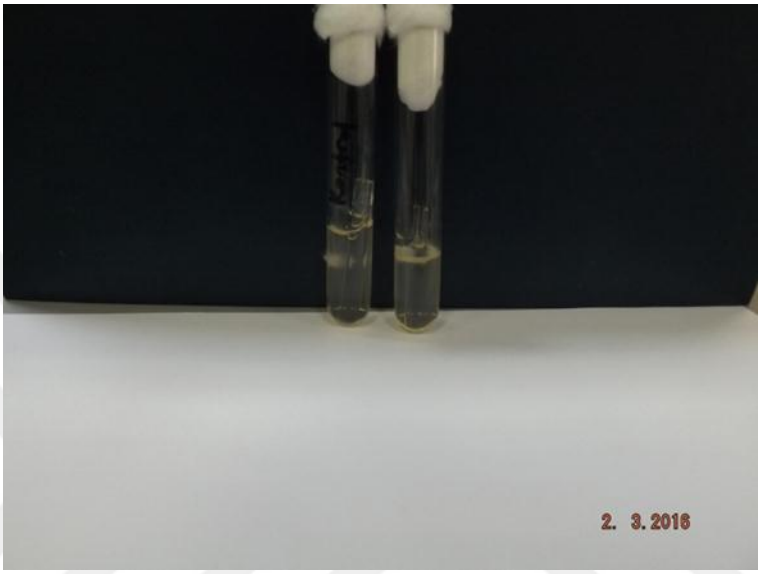


Şekil 4.6 *Bacillus subtilis*'in üreaz testi sonucu

4.1.2.4 Hareket (Mobilite) testi

Mikrorganizmaların sahip oldukları hareket yeteneklerinin belirlemesinde bu test kullanılmaktadır. Bakterilere ait bir gecelik taze kültürlerinden steril demir öze

yardımıyla tek koloni alındıktan sonracam test tüpü içerisine daldırılarak ekim yapılmış ve suş için optimum sıcaklık derecesinde 1 gün süresince inkübasyona bırakılmıştır. Şekil 4.7'de görüldüğü gibi *Bacillus subtilis*'in hareket testi ekim noktasından çevreyeve agarın içerisine dogru bir yayılma gözlenmiştir. Bu yayılma sonucunda bu bakterinin hareketli olduğu kabul edilmiştir.



Şekil 4.7 *Bacillus subtilis*'in hareket testi

4.1.2.5 Katalaz testi

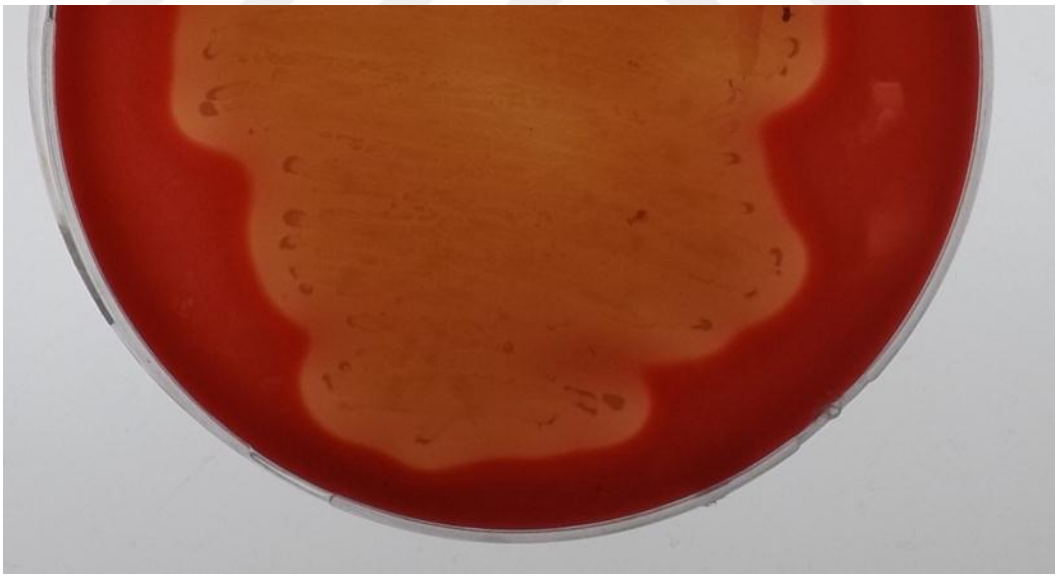
Bakterinin sahip olduğu katalaz reaksiyonunu belirleyebilmek amacıyla bu test yapılmıştır. Şekil 4.8'de görüldüğü gibi katı besiyerine ekildikten sonra oluşan saf bakteri kolonisi üzerine taze hazırlanmış %3'lük H_2O_2 çözeltisinden 1 ml ilave edilir. Gaz çıkışı gözlenirse katalaz pozitif, gaz çıkışı gözlenmez ise katalaz negatif demektir. Kullandığımız bakteri kültürü üzerine taze hazırlanmış %3'lük H_2O_2 ilave edildiğinde gaz çıkışı gözlendiğinden *Bacillus subtilis* bakterisi katalaz pozitif olarak değerlendirildi.



Şekil 4.8 *Bacillus subtilis*'in katalaz testi

4.1.2.6 Hemoliz

Şekil 4.9'da görüldüğü gibi kanlı katı besiyerine ekildikten sonra oluşan kolonilerin çoğalması sonucunda etraflarında meydana gelen daha açık renkli alana bakılarak bakterinin hemoliz yeteneğinde olduğu tespit edildi.



Şekil 4.9 *Bacillus subtilis*'in hemoliz testi

4.2 *Bacillus subtilis* Besi Ortamının Optimize Edilmesi

4.2.1 İnkübasyon süresinin mikroorganizma çoğalmasında etkisi

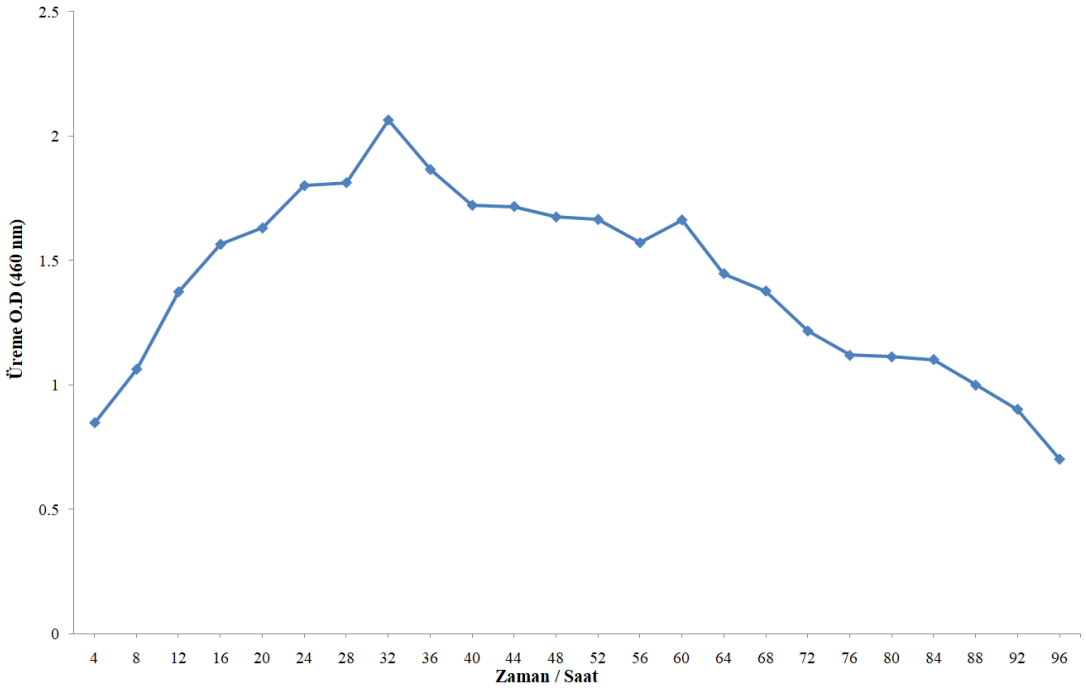
Mikroorganizma gelişimi üzerine inkübasyon süresinin etkisini belirlemek için, Nutrient Broth (NB) besiyerine (pH 7.0) 2 ml inoküle edilmiştir. Mikroorganizmanın inkübasyonu 37 ^{o}C'de 120 rpm hızda 4 gün süreyle çalkalamalı su banyosunda

gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonrasındaki 0-96 saatlik süre arasında her 4 saatte bir kültürden numune alınarak OD 460 'de spektrofotometrik olarak üreme değeri belirlenmiştir. Alınan örnekler 1000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edildikten sonraçöken bakteriler ile üst sıvı birbirinden ayrılmış ve enzim kaynağı olarak kullanılan süpernatantlar elde edilmiştir.

Alınan örneklerde yapılan ölçümler sonrasında bakterinin 32. Saatte kadar çoğalmasının arttığı ancak 32. saatten sonra çoğalmasında düşüş meydana geldiği tespit edilmiştir. Şekil 4.10'da görüldüğü gibi *Bacillus subtilis*'in optimum üreme zamanı 32. saat olarak belirlendi.

Ancak Simair vd. (2017), yaptıkları çalışmada sıcaklık, pH, çalkalama hızı ve inkübasyon süresini optimize ettikleri *Bacillus sp.* BCC 01-50 bakteri suşunu 150 rpm'de ve 50 °C'de üretmişlerdir. Bu suşun optimum ürediği ve α-amilaz sentezlediği inkübasyon süresinin 60.saat olduğunu belirlemişlerdir.

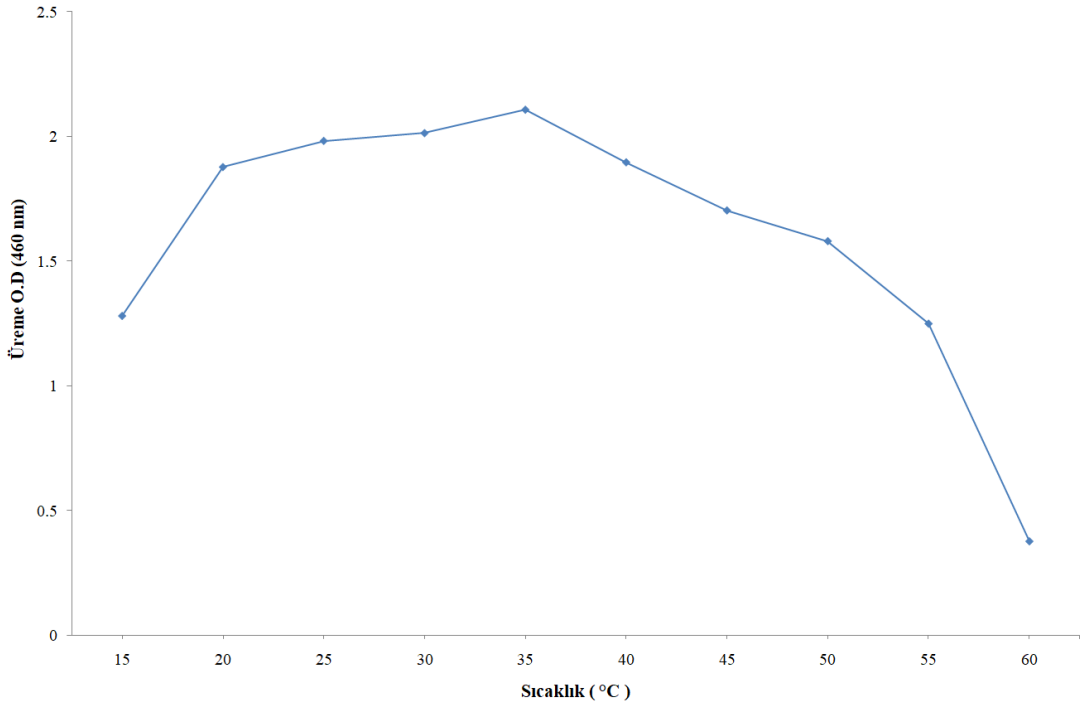
Wang vd. (2016), yaptıkları çalışmada *Bacillus sp.* WangLB suşunun optimal çoğalma gösterdiği inkübasyon süresini 48.saat olarak bulmuşlardır.



Şekil 4.10 İnkübasyon süresinin mikroorganizma gelişimi üzerinde etkisi

4.2.2 Sıcaklık değişiminin mikroorganizma gelişimi üzerineetkisi

α-Amilaz kaynağı olarak seçilen *Bacillus subtilis*'in en iyi α-amilaz ürettiği sıcaklık değerinin saptanması için 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, ve 60, °C'lerde üretim çalışmaları yapılmıştır. Üretim için Nutrient Broth (NB) sıvı üreme ortamı kullanılarak, mikroorganizmanın en iyi ürediği sürede, 120 rpm çalkalamalı su banyosunda kültür elde edilmiştir. Çeşitli sıcaklıklardaki çoğalma işlemi sonunda kültüre ait çoğalma değerleri spektrofotometrik ölçümlerle belirlenirken, kültüre ait kalan kısımları santrifüj ile 1000 devir/dk'da bakteriler çöktürülerek elde edilen üst sıvı elde edilmiş ve enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Elde edilen veriler, Şekil 4.10'da gösterilmiştir. Şekil 4.11'de, *Bacillus subtilis*'in sıcaklık artışına bağlı çoğalma grafiği görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi *Bacillus subtilis*'in 15 - 60 ^{o}C sıcaklıkları arasında ürediği tespit edilmiş ancak optimum üreme sıcaklığının 35 ^{o}C olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.11 Sıcaklığın mikroorganizma gelişimi üzerine etkisi

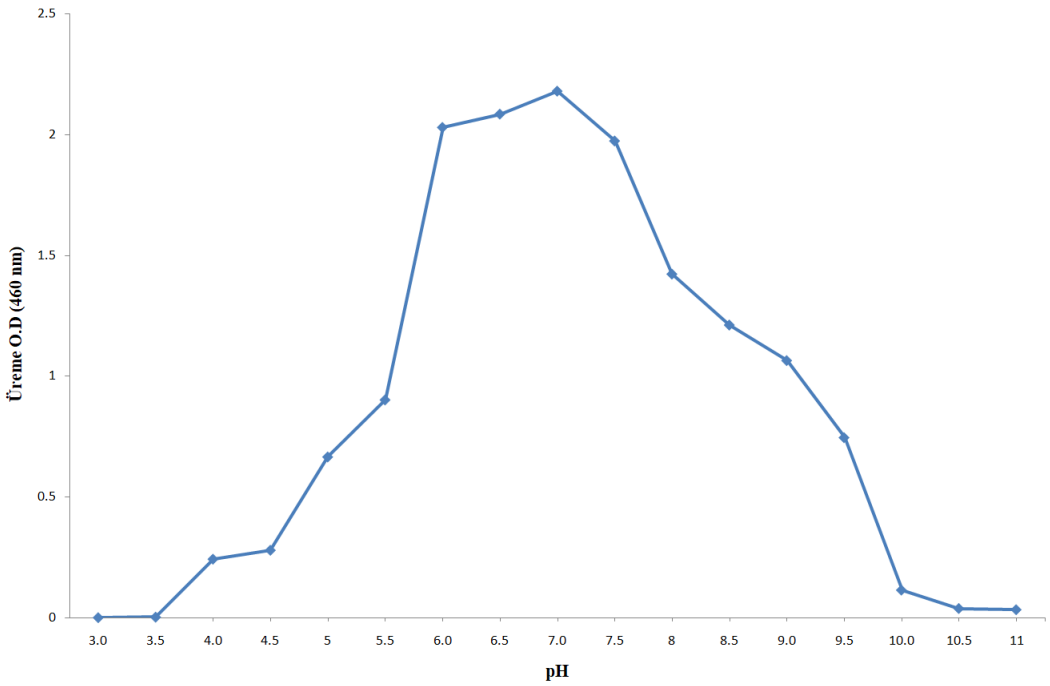
4.2.3 pH değişikliğinin mikroorganizma gelişimi üzerine etkisi

α-amilaz üreticisi *Bacillus subtilis* pH'sı 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0, 10.5 ve 11.0 olan Nutrienth Broth (NB) sıvı besi

ortamlarında, 37 °C sıcaklık ve 120 rpm hızda çalkalamalı su banyosunda inkübe edilmiştir. Bakteri suşu, kendisine ait olan inkübasyon süresi boyunca inkübe edilmiştir. Üreme gerçekleştikten sonra santrifüj işlemi yapılmış, süpernatant elde edilmiş ve süpernatant enzim kaynağı olarak kullanılmışlardır. Süpernatant kullanılması sonucunda standart α-amilaz ve aktivitesi tayini yapılıp enzim sentezinin gerçekleştiği optimum pH değerleri belirlenmiştir.

Şekil 4.12'de görüldüğü gibi *Bacillus subtilis*'in 3.0-10.0 pH aralıklarında çoğaldığı ancak en yüksek çoğalmayı pH 7.0'da gerçekleştirdiği belirlenmiştir. *Bacillus subtilis*'in optimum çoğaldığı ve α-amilaz sentezlediği pH değeri olarak 7.0 bulunmuştur.

Vijayaraghavan vd. (2015), Bacillus cereus suşu ile yaptıkları çalışma sonucunda bakterinin optimum çoğalmasını ve enzim üretimini pH 7.0'de gerçekleştirdiğini belirlemişlerdir.



Şekil 4.12 pH değişiminin mikroorganizma çoğalması üzerine etkisi

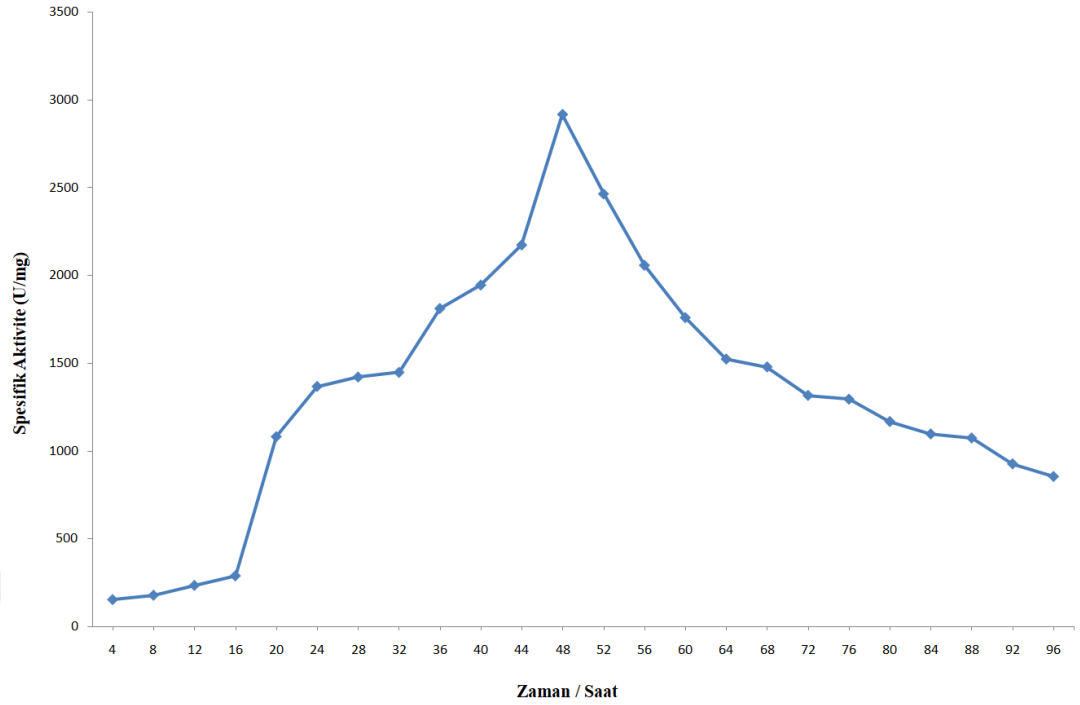
4.3 *Bacillus subtilis*'den Elde Edilen α -Amilaz Optimizasyonu

4.3.1 Farklı inkübasyon sürelerinin α-amilaz üretimi üzerine etkisi

Ön inkübasyon sonrası NB besiyerine 2 ml ekim yapılmıştır. Bakterinin inkübasyonu 37 ^{o}C'de 120 rpm'de 96 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. İnokülasyonları takiben 4'er saat aralıklara sahip periyotlardan oluşan 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, ……..72, 84, 88, 92 ve 96.inkübasyon sürelerinde sıvı kültürlerden alınan örneklere ait OD 460'da üreme değerleri belirlenmiştir. Aynı saat dilimlerinde örnekler alınarak1000 rpm hızda 10 dakika boyunca santrifüj yapılmış, bakteriler sıvı ortamdan uzaklaştırılmış ve santrifüj sonrasında enzim kaynağı olarak kullanılan süpernatantlar elde edilmiştir. α-amilazın bulunduğu süpernatantlar kullanılarak standart aktivite tayinleri uygulanmış, optimum bakteriyel çoğalmanın gözlendiği ve enzim üretiminin yapıldığı saatler tespit edilmiştir. Yapılan hesaplamalar sonucunda elde edilen veriler Şekil 4.13'te gösterilmiştir.

Paul vd. (2017), yaptıkları çalışmada *Bacillus* sp. MB6 suşunun optimum bakteriyel çoğalmasının ve enzim üretiminin 48. saatte gerçekleştiğini belirlemişlerdir.

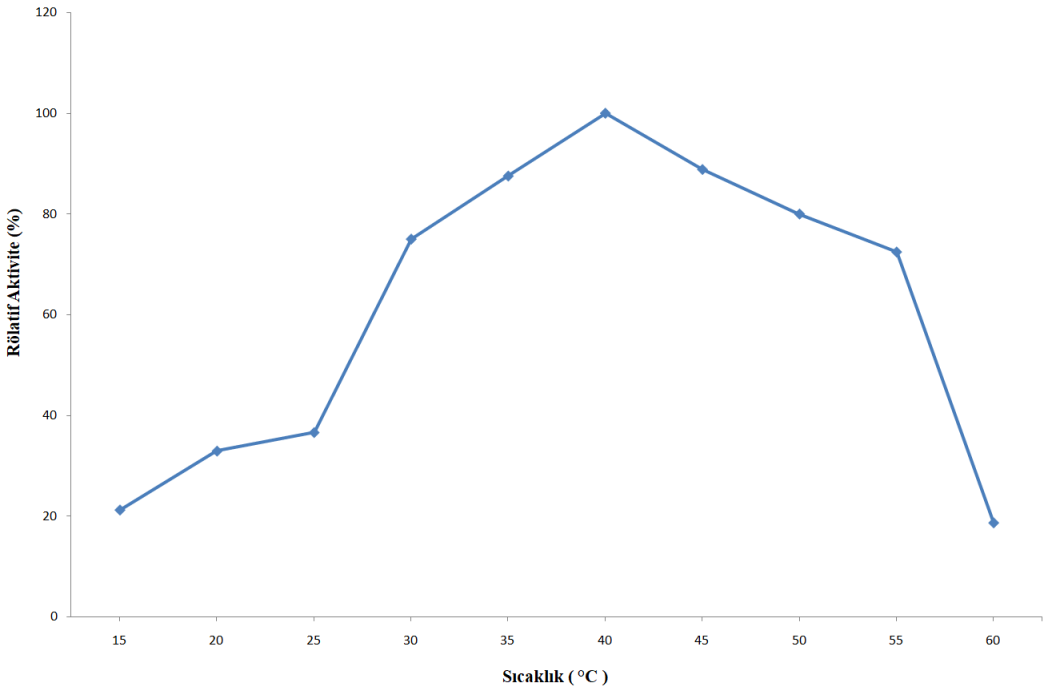
Wang vd. (2016), *Bacillus* sp. WangLB bakteri suşunun optimal çoğalmayı gösterdiği ve α-amilaz üretimini gerçekleştirdiği inkübasyon süresinin 48. saat olduğunu belirtmişlerdir.



Şekil 4.13 Bakteriyel enzim üretimi üzerine farklı inkübasyon sürelerinin etkisi

4.3.2 Sıcaklık değişiminin α-amilaz aktivitesi üzerine etkisi

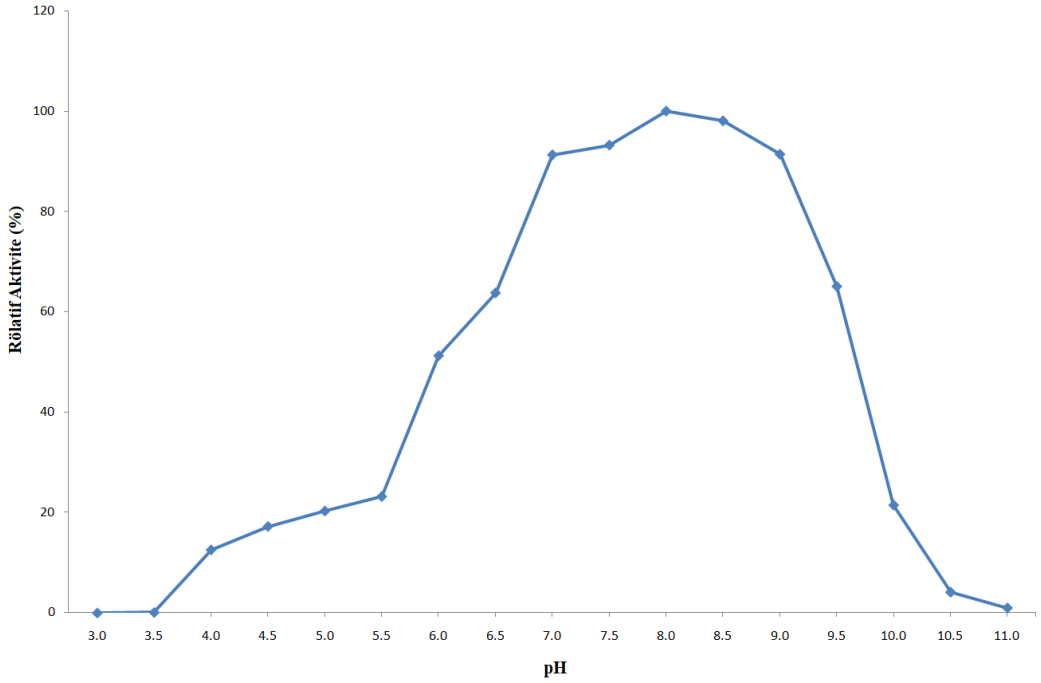
α-Amilazın aktivite gösterdiğii sıcaklık değerinin belirlenmesi amacıyla bakteri pH 7.0 olan Nutrient Broth (NB) besi yerine optimum inkübasyon süresi olan 48. saatte ve optimum sıcaklığı olan 37 ^{o}C sıcaklıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 ve 60 °C sıcaklıkta enzimin optimum aktivite gösterdiği pH'da hazırlanmış olan substratlı tampon ile 30 dakika süreyle tepkime gerçekleştirilmiştir. Bernfeld yöntemine göre α-amilaz aktivitesi ölçümi yapılarak elde edilen bulgular Şekil 4.13'te gösterilmiştir.Şekil 4.14'te görüldüğü gibi *Bacillus subtilis*'e ait olan α-amilaz ın 40°C sıcaklıkta optimum aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Enzimin, 15-60°C sıcaklıkları aralığında ortalama olarak %65 oranında aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. 30-60°C sıcaklıkları aralığında ortalama olarak %87.4 oranında aktivite elde edilirken, 60 °C'den daha yüksek sıcaklıklarda ise rölatif aktivitede yüksek oranda azalma gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.14 Enzim aktivitesi üzerine farklı sıcaklıkların etkisi

4.3.3 Farklı pH'ların α-amilaz aktivitesi üzerine etkisi

α-Amilazın optimum aktivite gösterdiği pH değerinin belirlenmesi amacıyla 100 mM Sitrik asit / Sadyum Sitrat (pH 3.0 - 5.0), 100mM Tris-HCl (pH 6.0 - 9.0) ve bikarbonat/karbonat 100mM (pH 10.0 - 11.0) tamponları hazırlanarak kullanılmıştır. Reaksiyon karışımları, 30 dakika boyunca enzimin üretildiği sıcaklıkta inkübasyona bırakıldı daha sonra standart aktivite tayini test edilmiştir.Test sonucu elde edilen veriler, Şekil 4.15'te gösterilmiştir.

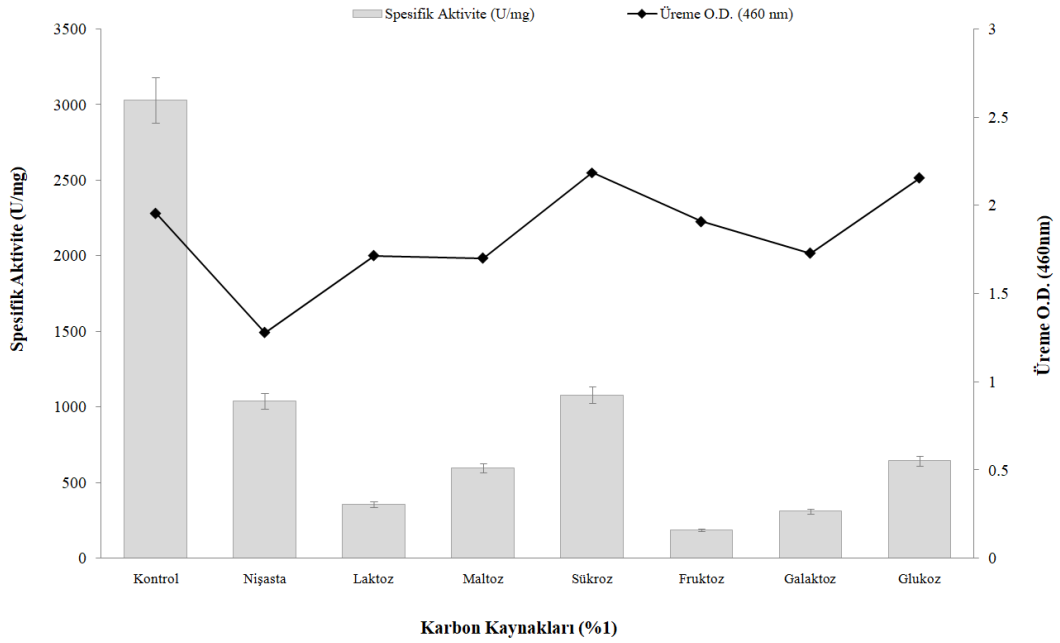


Şekil 4.15 Enzim aktivitesi üzerine farklı pH'ların etkisi

Şekil 4.15'te görüldüğü gibi enzimin pH 10.5 ilepH 4.0 arasında aktivite gösterdiği belirlenmiştir. pH 5.0 ve üzerindeki pH'larda enzim aktivitesinde artış gözlenirken pH 8.0 ve üzerindeki pH'larda ise düşüş görülmüştür.

4.3.4 Farklı karbon kaynaklarının enzim üretimi üzerine etkisi

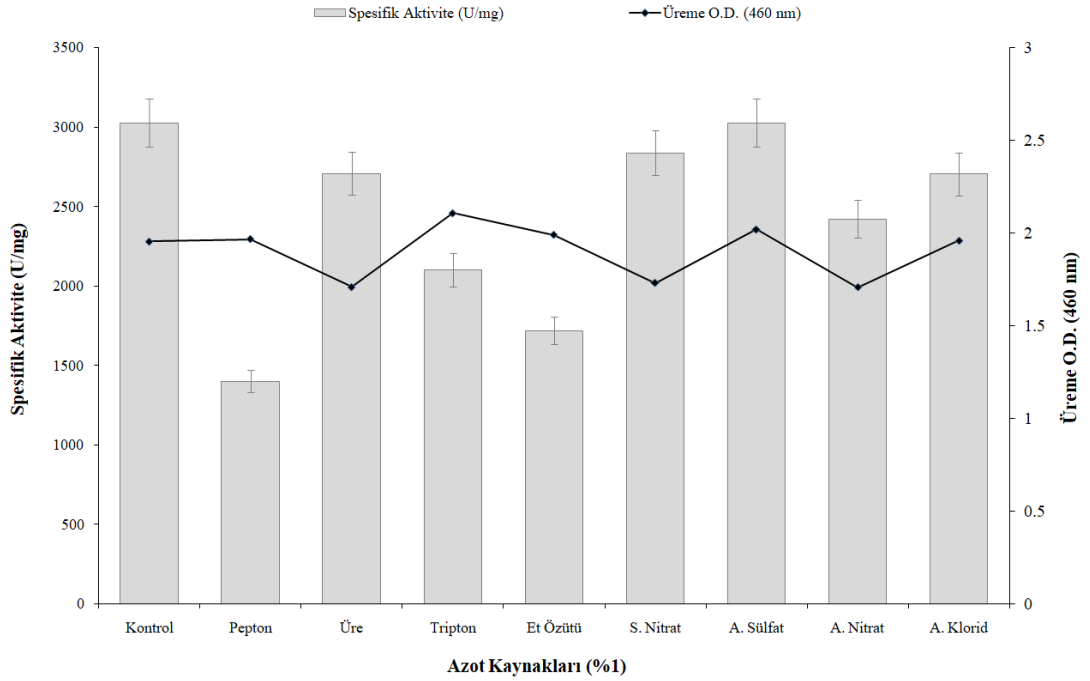
Enzim üretimi üzerine farklı karbon kaynaklarının etkisini incelemek için önceden bellirlenen en uygun koşullardaki enzim, ticari olarak satın alınan ve %1 oranında yüksek saflıkta olan karbon kaynakları kültür ortamında kullanılan besiyerine ilave edilmiştir. Glukoz, galaktoz, laktoz, sükroz, maltoz, nişaşta ve fruktoz kullanıldı. Kontrol grubu olarak da ekstra karbon kaynağı bulunmayan kültür ortamı kullanılmıştır. *Bacillus subtilis* suşu optimum şartlarda 37 ºC de, 120 devir/dakikada 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresince α-amilaz ın aktivitesi ve protein miktarı belirlendi. Elde edilen verilere göre karbon kaynağı içeren kültür ortamı karbon kaynağı içermeyen kültür ortamı ile kıyaslandığında daha düşük α-amilaz aktivitesi belirlenmiştir. karbon kaynakları arasında nişasta eklenmesiyle (1037,601 U/mg) ve sukroz eklenmesiyle (1078,152 U/mg) spesifik aktivite gözlenmiştir (Şekil 4.16) Bakteri çoğalması için, karbon kaynakları ile kontrol sonuçları şekil 4.15'te gösterilmiştir.



Şekil 4.16 Enzim üretimi üzerine farklı karbon kaynaklarının etkisi

4.3.5 Farklı azot kaynaklarının enzim üretimi üzerine etkisi

Bakteri üretimi ve enzim aktivitesine azot kaynaklarının nasıl etkilediğini incelemek için önceden bellirlenen en uygun koşullardaki enzim ticari olarak satın alınan ve yüksek saflıktaki azot kaynaklarından %1 oranında hazırlanarak kültür ortamına ilave edilmiştir. Sodyum nitrat, pepton, amonyum nitrat, amonyum klorit, amonyum sülfat, tripton, üre kullanılmıştır. Azot kaynağı içermeyen kültür ortamı da kontrol grubu olarak kullanılmıştır. *Bacillus subtilis* suşu optimum şartlarda 37 ºC sıcaklıkta, 120 devir/dakikada 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresince α-amilazın aktivite aktivite ölçümü yapılarak ve protein miktarı belirlendi. Elde edilen verilere göre azot kaynağı içeren kültür ortamı azot kaynağı içermeyen kültür ortamı ile kıyaslandığında daha düşük α-amilaz aktivitesi belirlenmiştir. Azot kaynakları arasında sodyum nitrat (2837,4246 U/mg) ve amonyum sulfat (3026,711 U/mg) eklenmesiyle en yüksek spesifik aktivite gözlenmiştir (Şekil 4.17)



Şekil 4.17 Enzim üretimi üzerine azot kaynaklarının etkisi

4.4 α-Amilazın Saflaştırılması

Bacillus subtilis α-amilazının optimum koşulları belirlendikten sonra enzim saflaştırma işlemine geçilmiş, önce optimum koşullarda üretilen bakteri kültürü santrifüj edilerek üst sıvı elde edilmiştir. Toplanan üst sıvı üzerine %70'lik doygunluk seviyesinde olacak şekilde $(NH4)_2SO_4$ amonyum sülfat ilavesi yapılmış, elde edilen karışım 10.000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Sanrifüj işlemi sonucunda elde edilen çökelti 100mM Tris-HCl pH 7.0 tamponunda çözüldükten sonra diyaliz membranına aktarılmış ve bir gece boyunca diyalizlenmiştir.

Diyaliz edilen ham özüt DEAE-sellüloz DE–32 kolonuna verilmiştir. Saflaştırma işleminin her basamağından α-amilaz aktivitesi ve protein miktar tayiniiçin örnekler ayrılmış ve testler yapılmıştır.

Çalışmamızda *Bacillus subtilis*'ten amilaz üretimi için en uygun koşullar belirlendikten sonra saflaştırma işlemi yapıldı. Enzim %9 verimle 49 kat saflaştırılarak elde edildi (Tablo 4.1).α-Amilazın yüksek saflıkta ve yüksek verimde elde edilmesi, endüstriyel uygulamalarda kullanılabilir özellikte olduğunu göstermektedir.

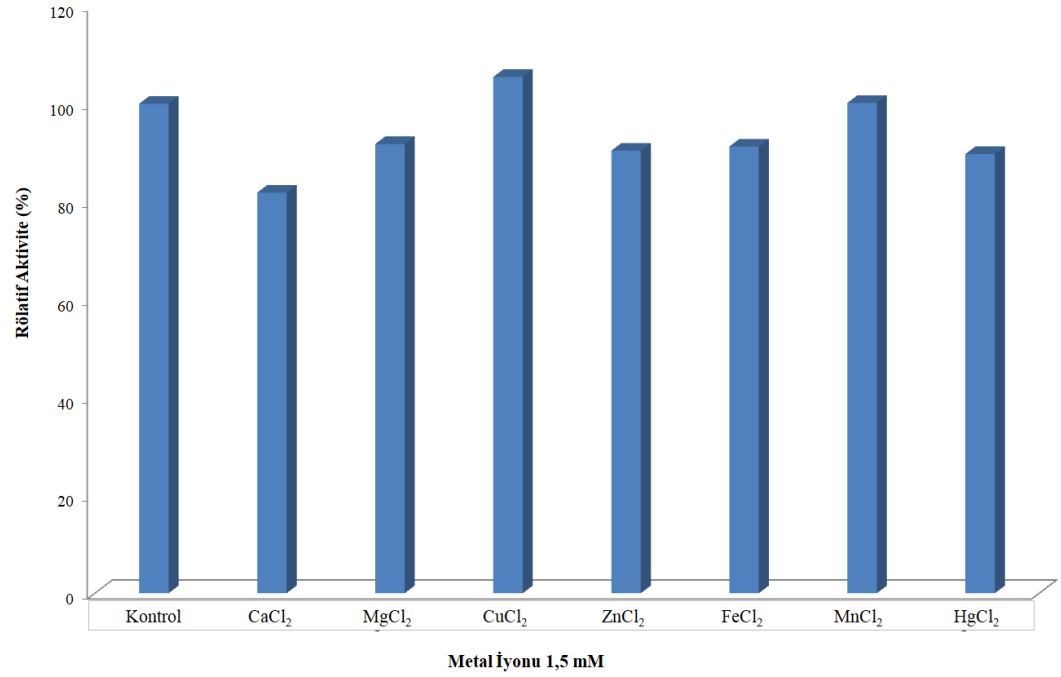
Tablo 4.1 *Bacillus subtilis* α-amilaz saflaştırma aşamaları

	Aktivite(U)	SA U/mg	Total aktivite	Total protein	Verim (%)	Saflaştırma Katsayısı
Supernatant	2364	6624	991220	1,4964	100	1
Amonyum Sülfat çöktürmesi& Diyaliz	3680	18734	184701	9,859	19	3
Sephadex (G100)	3008	54488	94453	1,733	10	8
DEAE selüloz	3545	325566	88978	0,219	9	49

4.5 Bazı Metallerin α-Amilaz Üzerine Etkisi

Toplam hacim içerisinde 1.5 mM konsantrasyona sahip olacak biçimde metal çözeltisinden ilave edildikten sonra 30 dakika boyunca inkübasyona bırakılmış ve daha sonra da α-amilaz aktivitesi test edilmiştir.

Enzim aktivitesi, $CaCl_2$'nin uygulandığı konsantrasyonda korunmuş olduğundan dolayı önemli derecede inhibisyon olayı gerçekleşmemiştir. Enzim, 1.5 mM $CaCl_2$ konsantrasyonunda sahip olduğu aktivitesini %82 oranında korumuş olup α-amilaz ın Ca^{+2} bağımlı bir enzim olmadığını göstermektedir. $MnCl_2$ enzim aktivitesini etkilememekle birlikte azz oranda aktiviteyi artırmıştır. Enzim $HgCl_2$, $ZnCl_2$,$FeCl_2$, $MgCl_2$ konsantrasyonlarda sırasıyla %89, %90, %91, ve %91 aktivite göstermiştir. $CuCl_2$ konsantrasyonu da enzim %105 aktivite göstermiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18 Bazı metallerin enzim aktivitesi üzerine etkisi

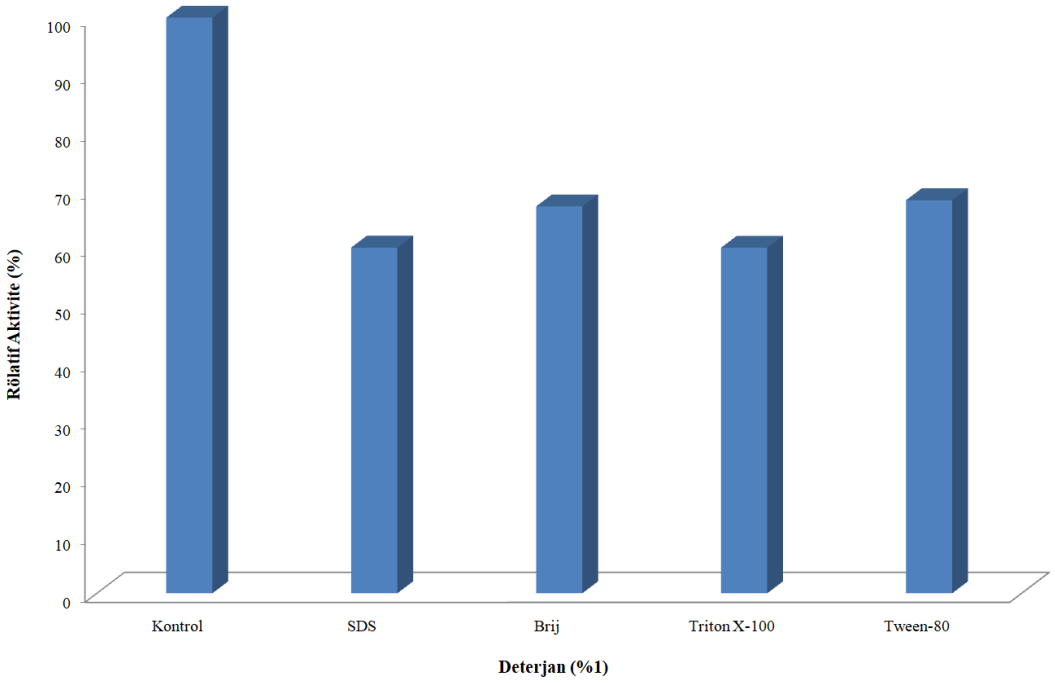
4.6 Farklı Deterjanların Saf Enzim Üzerine Etkisi

Deterjanların, enzimaktivitesi üzerine etkilerini belirlemek için Tween 80, SDS, brij ve Triton X-100 kullanılmıştır. Elde edilen değerler şekil 4.19'da gösterilmiştir. α-Amilaza %1 SDS ve %1 TritonX-100'ün ile muamele edildiğinde aktivitesinin %60'ını korumuştur. α-Amilazın SDS ve Triton-x 100'e karşı önemli seviyede dirençli olması bu enzimin deterjan bileşiminde kullanılma uygunluğuna sahip olduğunun göstergesidir.

SDS ve TritonX-100 deterjanları kullanıldığında enzimin %60 oranında aktivite gösterdiği, brij'nin ortama eklenmesiyle %67, Tween-80'nin ortama eklenmesiyle %68 oranında aktivitenin gösterdiği tespit edilmiştir.

Deterjan endüstrisinde kullanılan enzimlerin yıkama işlemi esnasında etkili olabilmesi için deterjan bileşiminde yaygın olarak kullanılan oksitleyici ve sürfaktan bileşiklere karşı uyumlu, kararlı ve stabil olmaları gerektiği kaydedilmiştir (Maalej vd., 2013). *Bacillus subtilis*'ten elde edilen α-amilaz ın deterjan varlığında oldukça

stabil olduğunuve deterjan sektöründe kullanılabilir uygunlukta olduğunu düşünmekteyiz.



Şekil 4.19 Deterjanların etkisi enzim aktivitesi üzerine

4.7 İnhibitör Maddelerin α-Amilaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Çeşitli inhibitör maddelerin α-amilaz aktivitesine etkisini belirlenmesi amacıyla 0,001 M, 0,005 M ve 0,01 M konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltiler ile α-amilaz karıştırılarak süspansiyonlar hazırlanmıştır. A-amilaz 37 °C, 30 dakika süreyle ön inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnhibitör madde olarak PMSF (0,001 M, 0,005 M ve 0,01 M), β-Merkaptoehtanol (0,001 M, 0,005 M ve 0,01 M), DTT (0,001 M, 0,005 M ve 0,01 M), EDTA (0,001 M, 0,005 M ve 0,01 M) ve Etanol (0,001 M, 0,005 M ve 0,01 M) kullanıldı. İnhibitör madde ile işlem görmüş α-amilazdan 0.2 mL alındıktan sonra 0.4 mL substrat içeren optimum pH tamponu ile karıştırılmış ve optimum aktivite sıcaklığında 30 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işlemi sonrasında aktivite analiz çalışmaları yapılmıştır. Başlangıçtaki enzim aktivitesinin tespit edilebilmesi için metal iyonu ile işlemuygulanmamış enzimler 100 olarak kabul edilmiştir. Ön işlem uygulamasından sonra örneklerden elde edilen veriler, orjinal aktiviteyle karşılaştırıldıktan sonra kalan enzim aktivitesi hesaplanmıştır.

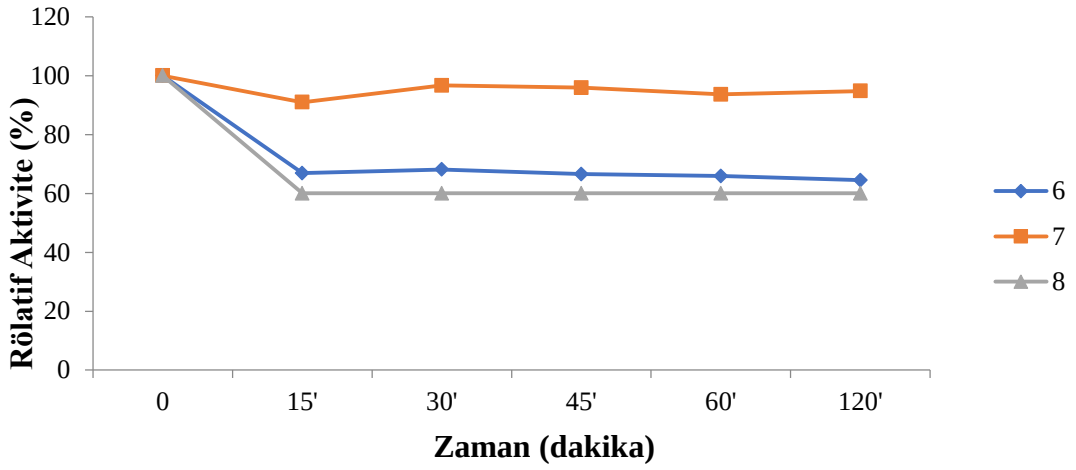
Tablo 4.2 İnhibitör ajanların α-amilaz aktivitesi üzeriene olan etkisi

İnhibitör Madde	Rölatif Aktivite (%) (1 mM)	Rölatif Aktivite (%) (0.5 mM)	Rölatif Aktivite (%) (10 mM)
Kontrol	100.00	100.00	100.00
PMSF	99.49	96.36	64.62
DTT	100.12	94.37	92.67
EDTA	94.55	90.55	86.25
β-Merkaptoehtanol	74.07	74.36	71.05
Etanol	99.20	98.91	94.62

Elde edilen sonuçlara göre inhibitor madde konsantrasyonundaki artışabağlı olarak enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon derecesinin de arttığı tespit edilmiştir.Geriye kalan enzim miktarları 0,001 M'lık DTT, PMSF, EDTA, Etanol ve βmercaptoethanol'de sırasıyla %100, %99, %94, %99 ve %74 olarak belirlenmiştir. 0,01 M'lık PMSF, EDTA, β-mercaptoethanol, DTT ve Etanol sırasıyla %23, %11, %61, %41ve %65'lik etkilerinin olduğu gözlemlenmiştir (Tablo 4.2).

4.8 pH Stabilitesinin Belirlenmesi

α-Amilaz'ın pH stabilitesinin belirlenmesi amacıyla pH 6.0, 7.0 ve 8.0'de hazırlanan substrat içermeyen pH tamponlarıyla 120 dakika boyunca 37 °C sıcaklıkta ön inkübasyon uygulanmıştır. Ön işlem görmüş enzimlere ait kalan aktivite değerlerinin tespit edilmesi için optimum pH içerisinde hazırlanmış olan substrat kullanılarak optimum sıcaklık ortamında 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Şekil 4.20'de görüldüğü gibielde edilen stabilite değerleri gösterilmiştir. Enzimin pH 6.0, 7.0 ve 8.0'de oldukça stabil olduğu görüldü.



Şekil 4.20 Enzime ait pH stabilitesi grafiği

Literatür verileri incelendiğinde elde edilen enzimlerin pH stabilitelerinin çeşitlilik gösterdiği görülmüştür.

Aygan vd. (2014), topraktan izole etmiş oldukları *B. subtilis* A10 bakteri suşundan saflaştırmış oldukları α-amilazın pH dayanıklılığını belirlemek için α-amilazı 15 ve 30 dakikalık periyotlarla, 45 °C sıcaklıkta, pH=4.0-11.0 aralığına sahip pH tamponlarında ön işleme tabi tutmuşlar. En yüksek dayanıklılık değerini 15 dakikalık ön işlemsonrasında pH=7.0-10.0 aralığındaki ortamda %84.9 oranı olarak ölçülmüştür. Enzim, 30 dakikalık ön inkübasyon sonrasında orjinal aktivitesinin yarısından fazlasını koruduğu kaydedilmişir. Her iki ön işlem boyunca da kalan maksimal aktivite değerleri pH 8.0 ve 9.0 ortamlarında ölçüldüğü belirtilmiştir.

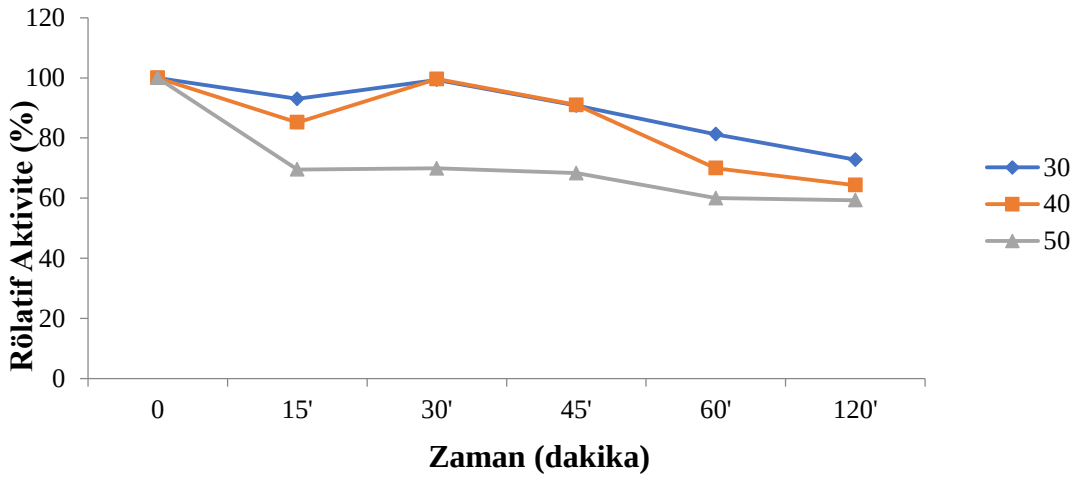
Emtenani vd. (2015), *B. subtilis* DR8806 bakteri suşunun ürettiği ekstraselüler Amy8803 amilazı, pH=2.0-10.0 aralığındaki ortamlarda 60 dakika boyunca ön işlemetabi tutmuşlar. Aktivite tayini sonucunda *B. subtilis* DR8806 α-amilazın pH 4.0-9.0 aralığındaki ortamlarda yaklaşık olarak %80 oranından daha fazla rölatif aktiviteye gösterdiği ve stabilitesinin oldukça yüksek oranda korunduğunu tespiti kaydedilmiştir. Enzim, pH 4.0-7.0 aralığındaki ortamlarda amilolitik aktivitesinin %100'ünü koruduğu, pH 3.0'te %77'sini ve pH 9.0'da %81'ini koruduğu ifade edilmiştir.

4.9 Enzime Ait Sıcaklık Stabilitesinin Belirlenmesi

Amilazın termal (sıcaklık) stabilitelerinin belirlenmesi için 30, 40 ve 50°C sıcaklıktakiortamlarda 120 dakika boyuncaön inkübasyona bırakılmıştır. Ön inkübasyon sonrasında enzimin optimum sıcaklığında ve optimum pH tamponlarında test edilen standart aktivite tayinine ait veriler, Şekil 4.21'de gösterilmiştir.

Bacillus subtilis'ten elde edilen amilazın 30-50°C sıcaklıkları aralığında başlangıçtaki aktivitesinin ortalama %90 oranında korunduğu belirlenmiştir (Şekil 4.20). Enzimin optimum aktiviteyesahip olduğu sıcaklık 35 °C olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte, enzim analizi yapılan sıcaklıklarda aktivitesini oldukça yüksek oranlarda koruduğu bulunmuştur. Bu bulgular, enzimin stabil karakterde olduğunu göstermektedir. Amilaza ait bu sıcaklık dayanıklılık bulguları farklı literatürlerdeki bulgularla uyumluluk göstermiştir. Enzimin 30°C, 40°C ve 50°C'de 120 dakika stabil olduğu belirlendi (Şekil 4.21).

Kalpana ve Pandian (2014), *B. subtilis* S8–18 bakteri suşundan elde ettikleri α-amilazın sıcaklık stabilitesini belirlemek amacıyla α-amilazı 40 °C -100 °C aralıklarındaki sıcaklık değerlerinde 10 dakika ve 60 dakika boyunca farklı sıcaklık değerlerinde işlem uygulamak üzere inkübasyona bırakmışlardır. *Bacillus subtilis* S8–18 α-amilaz 10 dakikalık inkübasyon süresi sonunda 70 °C sıcaklığa kadar ortalama %61, 60 dakikalık inkübasyon süresi sonucunda 50 °C sıcaklığa kadar ortalama %71 oranında stabilitesini koruduğu kaydedilmiştir.



Şekil 4.21 Enzime ait sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi

4.10 Substrat Özgüllüğü Ve Kinetik Parametrelerin Hesaplanması

Çalışmamızda *Bacillus subtilis* 'ten elde edilen α-amilaz'ın Km ve Vmax değerlerinin tespiti için %0.1 M, %0.2 M, %0.3 M, %0.4 M, %0.5 M, %0.6 M, %0.7 M oranlarındaçözünebilir nişastalar hazırlanmıştır. Farklı oranlarda hazırlanan buçözeltiler enzimin etki ettiği madde (substrat) olarak kulanılarak Lineweaver–Burk plot yöntemine ile Km ve Vmax değerleri hesaplanmıştır (Şekil 4.22). Şekilde görüldüğü gibi Lineweaver–Burk plot sonuçlarına bakılarak α-amilazınVmax ve Km değerleri sırasıyla 0,417 µmol/dakika ve 0,143 mMolarak tespit edilmiştir.

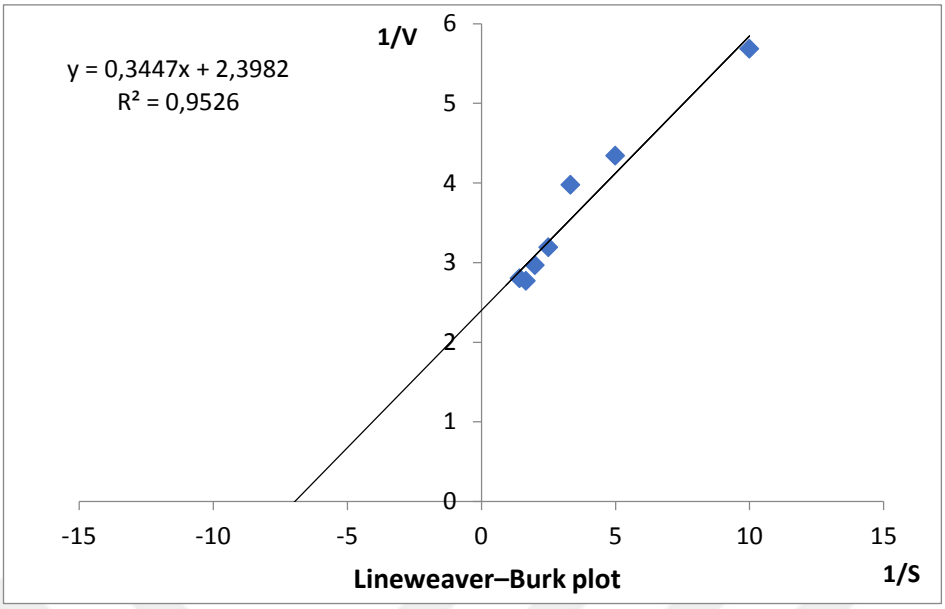
$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}} * \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}} \quad (4.1)$$

$$Y = ax + b$$

$$Y = \frac{1}{V_0}$$

$$a = \frac{K_m}{V_{max}}$$

$$b = \frac{1}{V_{max}}$$



Şekil 4.22 Km ve Vmax değerleri

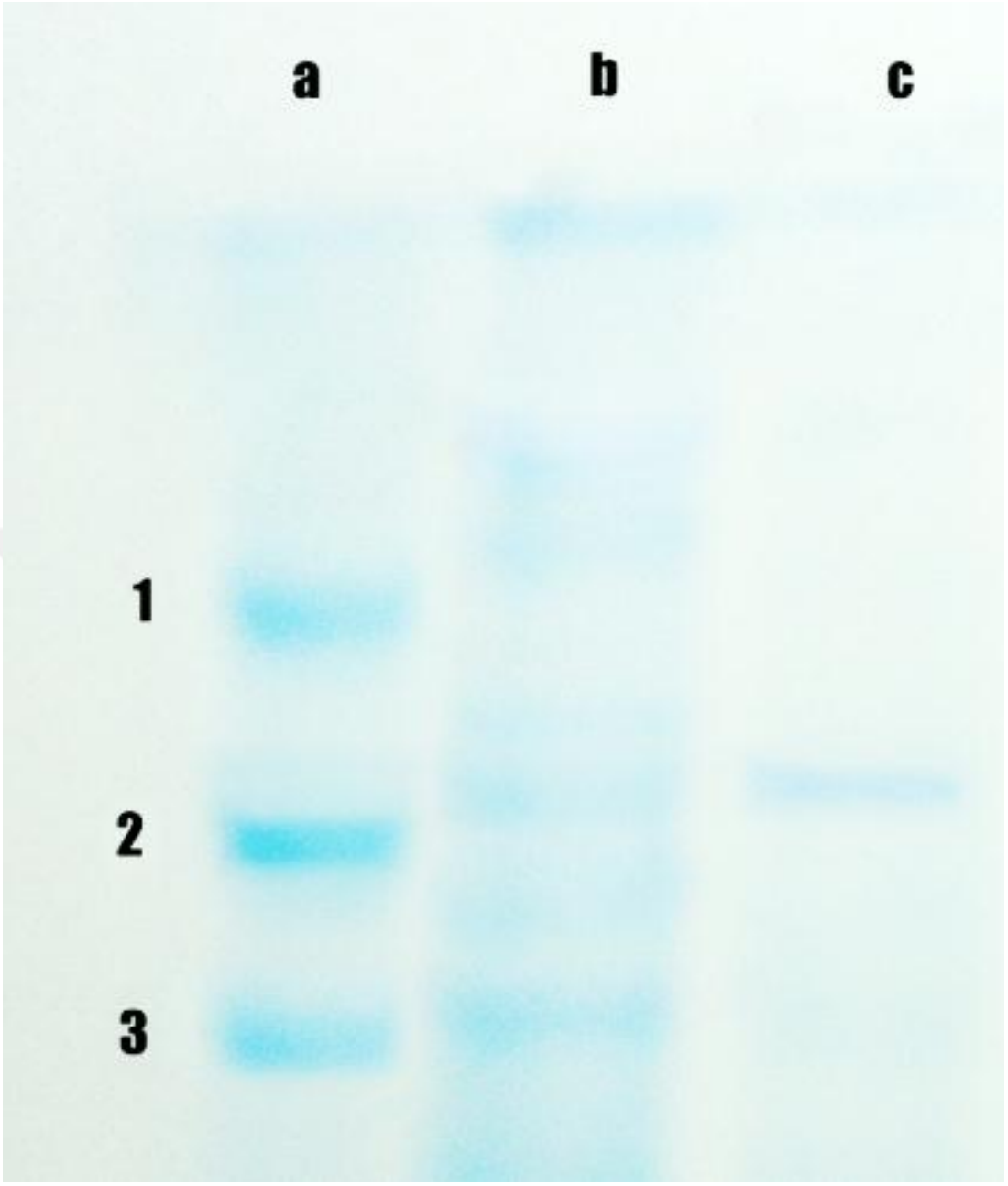
4.11 Elektroforez İşlemi

SDS-PAGE elektroforez işlemi ile α-amilazın molekül ağırlığı tespit edildi. Protein çöktürme adımları sonrası saf olarak elde edilen α-amilaz tekrar süspansiyon haline getirilerek molekül ağırlığını belirlemek için örnekler SDS-PAGE jel elektroforezine yüklendi. SDS-PAGE, %5 yükleme jeli ve %10 ayırma jeli ile gerçekleştirildi. SDS-PAGE için sırasıyla standart proteinler (BSA (Bovin serum albümin), fosforilaz, karbonik anhidraz ve albumin (yumurta) içeren protein karışımı), diyaliz veDEAE selüloz kolonu saflaştırma basamaklarından elde edilen örnekler yüklenerek elektroforez uygulaması yapılmıştır.

4.12 *Bacillus subtilis* α-Amilazına Ait Molekül Ağırlığının Belirlenmesi

Enzime ait molekül ağırlığının belirlenebilmesi için SDS-PAGE işleminden sonra jel üzerinde bulunan her bir proteine ait band için Rf değerleri hesaplanmıştır. Her bir standart proteine ait molekül ağırlığı, hesaplanan Rf değerlerine karşı grafiği çizildi. Bu grafik yardımıyla *Bacillus subtilis* α-amilaza ait molekül ağırlığı ~**73** kDa olarak bulunmuştur.

$$\mathrm{Rf} = \frac{\text{Proteinin Jel Üzerinde Aldığı Yol}}{\text{İz Boyanın Jel Üzerinde Aldığı Yol}} \tag{4.2}$$



Şekil 4.23 SDS-PAGE Sonuçları a)Standart proteinler; 1.Fosforilaz (97 kDa); 2.Bovin serum albumin (66 kDa); 3.Albumin (yumurta) (45 kDa), b) Diyaliz; c) DEAE selüloz kolonu

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Enzimler, biyoteknolojinin gelişmesiyle birlikte mikroorganizmalar aracılığıyla insanların ihtiyaçları için temin edilen en önemli ürünlerden biridir. Çevresel, gıda ve endüstriyel biyoteknoloji gibi birçok önemli alanlarda kullanılmaktadır (Pandey vd., 1999).

Mikroorganizmalar arasında doğada en geniş alana sahip olan bazı Bacillus türleri ve alt türleri, enzim eldesinde kullanılmaktadır (Wolfgang 2007). 1970'lerden sonra α-amilazların endüstrideki uygulamalarında, *Bacillus stearothermophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* ve *B. subtilis* türleri kullanılmaktadır (Sajedi vd., 2005).

Ergani Makan Dağı'ndan topraktan izole edilen *Bacillus subtilis*'in üremesi üzerine yapılan çalışmalarda inkübasyon süresi, inkübasyon pH'sı ve inkübasyon sıcaklığının etkileri araştırılmıştır. Bakteride optimum çoğalma süresi 32 saat, pH'sı 7.0 ve sıcaklığı da 37°C olarak tespit edilmiştir.

Ortamın sıcaklığı mikroorganizmaların üremelerine büyük ölçüde etki etmektedir. Mikroorganizmalar genellikle kendi türlerine özel sıcaklık sınırları içinde çoğalabilirler. Bu sınırlar arasında çoğalmanın en iyi olduğu optimal sıcaklık tespit edilebilir. Diğer yandan mikroorganizmaların çoğalmaları için besiyerinin pH' sının optimal sınırları içerisinde olması gerekmektedir (Asgher, 2007).

Rasooli vd., (2008), topraktan izole ettikleri ve *Bacillus licheniformis* Shahed-07 olarak adlandırdıkları basilin enzim üretim koşulları, pH 7.0 ve 50°C'de 26 saatlik kültivasyondan sonra maksimum enzim üretiminin olduğunu belrlemişlerdir.

Singh ve Kumari (2016) yapmış oldukları çalışmada, topraktan izole ettikleri amilolitik bakteri suşu-B3'ün kayda değer miktarda amilaz enzimi ürettiğini belirtmişlerdir. Kültürün büyümesi için optimum pH'ın 7.0 olduğunu, sıcaklığın ise 35 °C olduğunu ve inkübasyon süresinin 48 saat olduğunu belirlemişlerdir.

Sinhg vd., (2016)'nın farklı tarım alanlarından topladıkları toprak örneklerinden α-amilaz üreten B-10 suşu izole etmişler. Mikrobiyolojik ve biyokimyasal testlere dayalı olarak elde etmiş oldukları izolatı *Bacillus sp* B-10. olarak tanımlamışlar. *Bacillus sp* B-10 izolatının en iyi inkübasyon koşullarını 48 saat, pH 7.0 ve 50 °C olarak belirlemişler.

α-Amilazın zamana, pH'ya ve sıcaklığa bağlı üretimi, birçok kişinin enzim üretim yeteneklerini gösteren önceki bulgularla uyumludur. (Ashger vd., 2007; Mishra ve Behera, 2008).

Sıcaklığın α-Amilaz aktivitesi üzerine etkisini tayin etmek için 15 °C ile 60 °C sıcaklıkları arasında 5 °C'lik aralıklarla artan sıcaklıklarda aktivite ölçümleri yapılmış olup, ölçüm değerleri şekil 4.14'te gösterilmiştir. Enzim aktivitesi 15 °C sıcaklıkta en düşük değerde olup, sıcaklığın aşamalı olarak yükseltilmesi sonucunda aktivitede de doğrusal bir şekilde artarak 40 °C'de en yüksek seviyeye ulaşılmıştır.
pH'nın α-amilaz aktivitesi üzerine etkisini tayin etmek için pH 3-11 arasında 0.5 aralıklarla artan pH değerlerinde aktivite ölçümleri yapılmış olup, ölçüm değerleri şekil 4.13'te gösterilmiştir. Enzim pH 4.0-11.0 arasında aktif olup aktivitesi pH 8.0 de en en yüksek seviyeye ulaşılmıştır.

Singh vd., (2016)'nın *Bacillus sp* B-10 izolatınıdan elde ettikleri amilazın üzerine sıcaklığın etkisini araştırmak için (30 -80 C) yaptıkları çalışmada 50 C bulmuşlar. Enzim aktivitesi, inkübasyon süresinin artmasıyla ters orantılı olarak azaldı ve sonunda 60°C'nin üzerindeki sıcaklıkta 2 saatlik inkübasyondan sonra oldukça azaldı. Amilazın aktivite sonuçları, enzimin çeşitli enzim bazlı endüstrilerde uygulanabilirliğini göstermiştir.

Wang vd., (2016), *Bacillus sp*. WangLB bakteri suşundan saflaştırdıkları amilazın optimum aktivitesini pH 9.0'da gösterdiği ve enzimin pH 3.0-10.0 aralığındaki ortamlarda %85 oranından daha fazla aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Sharma ve Satyanarayana, (2013), *Bacillus acidicola* bakteri suşundan elde ettikleri α-amilazın optimum aktivitesini 60°C, pH 4.0 ortamında gösterdiğini belirtmişler.

Abd-Elaziz Am. vd., (2020) baldan izole ettikleri *Bacillus atrophaeus* NRC1 suşu tarafından üretilen α-amilazın maksimum aktivitesi pH 6.0'da 50 °C'de olduğunu belirtmişler.

Du vd., (2018) *Bacillus amyloliquefaciens* BH1'den elde ettikleri a-amilaz aktivitesi için optimum pH ve sıcaklık araştırmasında en yüksek aktiviteyi sırasıyla, pH 7.0 ortamında ve 50 °C sıcaklıkta olduğunu belirtmişlerdir.

Çalışmamızda *Bacillus subtilis*'ten saflaştırdığımız α-amilazın molekül ağırlığı SDS-PAGE ile yaklaşık olarak 73 kDa olarak hesaplanmıştır.

Priyadarshini vd., (2020) Chilika Gölü sedimentinden izole 16S rRNA gen dizi analinie göre *Bacillus cereus* SP-CH11 olarak tanımladıları izolattan elde ettikleri α-amilazın molekül ağırlığı 55 kDa olduğunu belirlemişlerdir.

Lakshmi vd., (2020) *Bacillus* Q-164'ten saflaştırdıkla α-amilazın moleküler ağırlığını SDS-PAGE yaparak 45 kDa olduğunu belirlemişlerdir.

Abd-Elaziz vd., (2020) Çeşitli bal örneklerinden amilolitik aktiviteye sahip farklı bakteri izolatları izole etmişler. 16S rRNA dizi analizine göre *Bacillus atrophaeus* NRC1 olarak adlandırdıkları izatın ürettiği amilazın molekül ağırlığını 61 kDa olduğunu belirlemişlerdir.

Wu vd., (2018) yaptıkları çalışmada *Bacillus lincheniformis* B4-423'ten elde ettikleri α-amilazın molekül ağırlığının 58 kDa olduğunu belirtmişlerdir.

Siddiqui vd., (2017) *Bacillus Licheniformis* RM44'ten saflaştırdıkları termostabil ve şelatöre dirençli α-amilazın molekül ağırlığını 66 kDa olduğunu belirlemişlerdir.

Tiwari vd., (2014), %12.5'lik SDS-PAGE ayırıcı jel ile *Bacillus tequilensis* RG-01 suşundan elde ettikleri α-amilazın moleküler ağırlığını 67 kDa olduğunu belirlemişlerdir.

Paul vd., (2015) nişasta işlevli manyetik nanoparçacıklara afiniteye dayalı fermente et suyundan elde ettikleri bakteriyel α-amilazın molekül ağırlığı 67 kDa olduğunu belirlemişlerdir.

Abdel-Fattah vd., (2013) *Bacillus licheniformis* AI20 tarafından üretilen α-amilazın üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu üzerine yaptıkları çalışmada. a-amilazın tahmini enzim molekül ağırlığını 55 kDa olarak hesaplamışlardır.

Sharma ve Satyanarayana, (2013), *Bacillus acidicola*bakteri suşundan izole ettikleri asidik amilazın moleküler ağırlığını 66 kDa olduğunu belirlemişlerdir.

Tuzlakoglu Özturk vd., (2013), *Bacillus subtilis*'den elde ettikleri amilazın moleküler ağırlığını %12'lik SDS-PAGE jel ile yaklaşık olarak 73 kDa olarak bulmuşlardır.

Bai vd., (2012), *Alicyclobacillus sp.* A4 bakteri suşundan izole ettikleri α-amilazın moleküler ağırlığının 64 kDa olduğunu belirlemişlerdir.

Çalışmamızda *Bacillus subtilis'*ten elde ettiğimiz α-amilazın, Lineweaver–Burk plot ile Vmax ve Km değerleri sırasıyla 0,417 μmol/dakika ve 0,143 mM olarak tespit edilmiştir.

Agüloğlu Fincan vd,. (2021); enzimin K_m ve V_{max} değerlerinin sırasıyla 0.004 mM ve 3.07 μmol min^{-1},

Aladejana vd., (2020), Vmax ve Km *Bacillus subtilis* Y25 a-amilazı için çözünür nişasta ile elde edilen değerlerini sırasıyla 314.10 ± 23.30 ünite/mg ve 53,98 ± 12,03 mg/ml,

Du vd., (2018), yaptıkları bir çalışmada *Bacillus amyloliquefaciens* BH072' den saflaştırmış oldukları α-amilazın Km ve Vmax kinetik parametrelerini sırasıyla 4.27±0.21mg/mL ve 987.34±23.34 U/mg,

Amid ve Manap, (2014), tarafından yapılan çalışmada iyon değişim kromatografisi, jel filtrasyonu ve amonyum sülfat çöktürmesi kullanılarak %72,1 kazanım ile 234,2 kat saflaştırıldığı enzimin Km değeri 2,7 mg/ml ve Vmax değeri 34,30 U/dk./mg olarak tespit edilmiştir.

Çalışmamızda *Bacillus subtilis* tarafından en yüksek enzim üretim sıcaklığı, pH ve zamanı belirlendikten sonra enzimin saflaştırılma işlemlerine geçilmiştir. Belirlenen optimum ortamlarda enzim üretimi yapıldıktan sonra, kültür ortamı enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Saflaştırma adımları 4°C'de soğuk zincir korunarak kültür ortamındaki amilazın saflaştırılma işleminde santrifüjleme, Amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve iyon değişim kromatografisi (DEAE selüloz) uygulanarak yapıldı. Saflaştırma boyunca α-amilaz aktivite tayini Bernfeld metodu izlenerek (Bernfeld, 1955), ve protein miktar tayini Lowry metodu izlenerek yapılmıştır (Lowry, 1951). Daha sonra saflaştırma tablosu oluşturulmuştur. Ham ekstrakta ait saflaştırma katsayısı 1 kabul edilmiş ve diğer fraksiyonların spesifik aktiviteleri ham ekstraktın spesifik aktivitesine oranlanarak saflaştırma katsayıları hesaplanmıştır.Fraksiyonların % verimlerini belirlemek için ham ekstrat verimi 100 olarak kabul edilerek ve fraksiyonların total aktivitesi ham ekstrakt total aktivitesine oranlanarak % verimleri hesaplanmıştır. α-Amilaz %9 verimle ve 49 kez saflaştırılarak elde edilmiştir. α-Amilazın yüksek saflık derecesinde elde edilmesi, endüstriyel uygulamalarda kullanılabilir özellikte olduğunu göstermektedir.

Bazı metallerin,saflaştırılan enzim aktivitesi üzerine etkisini saptamak için kültür ortamına $CuCl_2$, $CaCl_2$, $MgCl_2$, $ZnCl_2$, $MnCl_2$, $HgCl_2$, $FeCl_2$ ve $CoCl_2$ eklenerek yapılan aktivite sonuçlarına göre, $CuCl_2$ (%105) ilavesi ile enzim aktivitesinin arttığı, $MnCl_2$ (%100) ile değişiklik gözlenmediği görüldü. $MgCl_2$ (%92),$FeCl_2$ (%91) $ZnCl_2$ (%90) ve $HgCl_2$ (%90) ile ilavesiyle az miktarda aktivitede azalış gözlenirken meydana geldiği belirlendi.

Tuzlakoglu Ozturk vd., (2013) yaptıkları çalışmada 10 mM konsantrasyonda çeşitli metal iyonları enzimin 50 °C'deki stabilitesi değerlendirmişler. α-Amilazın aktivite $Fe^{2+,}$ Fe^{3+}, Cu^{2+} ve Zn^{2+} iyonları tarafından tamamen inhibe ettiğn. ancak Co^{2+}, Ni^{2+}

ve Mn^{2+} iyonlarının enzim aktivitesini daha az ölçüde inhibe ettiğini tespit etmişlerdir.

Du vd., (2018), 5 ve 50 mM konsantrasyonlarında çeşitli metal iyonlarının saflaştırılmış BH072. Metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerinde farklı etkileri olmuştur. Ca^{2+}, K^{+} ve Ba^{2+} enzim aktivitesini etkilemedi, Mn^{2+} ve Co^{2+} 5 mM'de enzim aktivitesi üzerinde çok az etkiye sahipti konsantrasyon bununla birlikte Hg^{2+} enzim aktivitesini tamamen inhibe ettiğini tespit etmişler.

Cordeiro vd., (2002), yaptıkları çalışmada alfa amilazın Co^{2+}, Cu^{2+} ve Ba^{2+} tarafından güçlü bir şekilde inhibe edildiği, ancak Ca^{2+}, Mg^{2+}, Ni^{2+}, Sr^{2+} ve Mn^{2+} tarafından daha az etkilendiğini belirtmişler.

Bazı inhibitör ajanlarının (EDTA, PMSF, DTT , β-mercaptoethanol ve Etanol) ve deterjanların (SDS, Brij, TritonX-100 ve Tween 80'), saflaştırılan enzim aktivitesi üzerine etkisini saptamak için yapılalan incelemede SDS, brij, TritonX-100 ve Tween 80'in %1 konsantrasyonlarında, enzim aktivitesini sırasıyla, %60, %67, %68, ve %60 oranlarında koruyarak stabil kalmıştır. Çalışma sonuçlarına göre kalan enzim miktarları 1 mM'lık EDTA, PMSF, DTT, β-mercaptoethanol ve Etanol'de sırasıyla %94, %99, %96, %100, %74 ve%99 olarak belirlendi. Konsantrasyon artışına paralel olarak enzim aktivitesi üzerine olan inhibisyon etkilerinin de arttığı tespit edildi. 10 mM'lık EDTA, PMSF, DTT , β-mercaptoethanol ve Etanol sırasıyla %86, %64, %92, %71 ve %94'lik etkisi olduğu gözlemlendi gözlemlendi. Bu değerlere göre amilaz inhibitor maddeler ve deterjanlara karşı oldukça dayanıklı olduğu göstermektedir.

Du vd., (2018), yaptıkları bir çalışmada *Bacillus amyloliquefaciens* BH072' den Saflaştırmış oldukları α-amilazın sürfaktan varlığında oldukça stabil olduğunu ve PMSF'nin amilaz aktivitesi üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını, β-mercaptoethanol'un aktiviteyi artırdığını ve EDTA tarından güçlü bir şekilde inhibe ediliğini belirtmişler.

Siddiqui vd., (2017), Enzim aktivitesinin SDS (%44) ve EDTA (%85) PMSF (%75) tarafından önemli ölçüde inhibe edilmediğini ve stabil olduğunu belirtmişler.

Zhang vd., (2016) amilaz aktivitesi üzerinde çeşitli kimyasal reaktiflerin incelemek için yaptıkları çalışmada amilazın 5 mM PMSF, EDTA, DTT ve SDS ile 30 dakika boyunca inkübe edildikten sonra geriye kalan enzim aktivisinin EDTA (% 6), SDS (%22), DTT (%42) ve PMSF (%21) tarafından güçlü bir şekilde inhibe edildiğini belirtmişler.

Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler doğrultusunda *Bacillus subtilis*'in sentezleyip besiyeri (hücre dışına) ortamına verdiği amilazın sahip olduğu karakteristik özellikleri ile ekonomik olarak değerlendirilmesi ve endüstriyel alanda kullanılması önerilmektedir. Saflaştırılan enzimin ilaç sanayisindeki kullanılabilirliği araştırılabilir. Elde edilen saf amilazın üç boyutlu yapısının aydınlatılması ve amino asit sekanslarının belirlenmesi gerektiği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Abd-Elaziz, A., M., vd., (2020). Production of a novel α-amylase by *Bacillus atrophaeus* NRC1 isolated from honey: Purification and characterization. *International journal of biological macromolecules*, 148, 292-301.

Abdel-Fattah, Y., R., vd., (2013). Production, purification, and characterization of thermostable α-amylase produced by *Bacillus licheniformis* isolate AI20. *Journal of Chemistry*, 2013.

Adams, M. W. (1983). Enzymes and proteins from organisms that grow near above 100 degrees.C. *Annual Review of Microbiology*, 47, 627-658.

Aehle, W. (2004). *Enzymes in industry production and applications*. Wiley-VCH, Weinheim, 28, 335-340.

Aguilar, G., vd., (2000). Purification and characterization of an extracellular α-amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010T, an amylolytic lactic acid bacterium. *Enzyme and Microbial Technology*, 27 (6), 406-413.

Agüloğlu Fincan, S., vd., (2021). Purification and characterization of thermostable α-amylase produced from *Bacillus licheniformis* So-B3 and its potential in hydrolyzing raw starch. *Life Sciences*, Volume 264, 118639.

Agüloğlu Fincan, S., vd., (2014). Purification and characterization of thermostable α-amylase from thermophilic *Anoxybacillus flavithermus*. *Carbohydrate Polymers*, 102, 144– 150.

Agüloğlu Fincan, S., vd., (2011). Purification and characterization of a thermostable α-amylase from *Geobacillus stearothermophilus*. *Current Opinion in Biotechnology*, (22), S83.

Agüloğlu Fincan, S., ve Enez, B. (2014). Production, purification, and characterization of thermostable α-amylase from thermophilic *Geobacillus stearothermophilus*. *Starch-Starke*, 66, 182–189.

Agüloğlu, S., vd., (2000). The Effects of Amino Acids on Production and Transport of α-Amylase through Bacterial Membranes. *Starch-Starke*, 52, 290-295.

Ajayi, A. O. ve Fagade, O. E. (2006). Growth pattern and structural nature of amylases produced by some Bacillus species in starchy substrates. *African Journal of Biotechnology*, 5(5), 440-444.

Aladejana, O., M., vd., (2020). Production, purification and characterization of thermostable alpha amylase from *Bacillus subtilis* Y25 isolated from decaying yam (Dioscorea rotundata) tuber. *Notulae Scientia Biologicae*, 12 (1), 154-171.

Al-Johani, N., B., vd., (2017). Optimization of alkaline α-amylase production by thermophilic *Bacillus subtilis*. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 14 (1), 288-301.

Amid, M. ve Abd Manap, M. Y. (2014). Purification and characterisation of a novel amylase enzyme from red pitaya (Hylocereus polyrhizus) peel. *Food chemistry*, 165, 412-418.

Arabacı, N. ve Arıkan, B. (2018). Isolation and characterization of a cold-active, alkaline, detergent stable α-amylase from a novel bacterium *Bacillus subtilis* N8. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 48(5), 419-426.

Asgher, M., vd., (2007). A thermostable α-amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *Journal of food engineering*, 79 (3), 950-955.

Ataallahi, E., vd., (2021). A simple 2-step purification process of α-amylase from *Bacillus subtilis*: Optimization by response surface methodology. *International Journal of Biological Macromolecules, 192*, 64-71.

Aygan, A., vd., (2008). Highly thermostable and alkaline α-amylase from a halotolerant-alkaliphilic *Bacillus sp*. AB68. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 547-553.

Aygan, A., vd., (2014). Production and characterization of alkaliphilic alpha-amylase from *Bacillus subtilis* A10 isolated from soils of Kahramanmaras, Turkey. *African Journal of Microbiology Research*, 8 (21), 2168-2173.

Bahçeci, H. (2004). *Tuz Gölü Bakteri İzolatlarının Yağ Asidi Metil Ester Analizi Ve Hücre Dışı Enzimlerinin Karakterizasyonu*. (Yayınlanmamış Yüksek Lisans tezi). Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Bai, Y., vd., (2012). Identification of an acidic α-amylase from Alicyclobacillus sp. A4 and assessment of its application in the starch industry. *Food Chemistry, 131* (4), 1473-1478.

Bano, S., vd., (2011). Purification and characterization of novel α-amylase from *Bacillus subtilis* KIBGE HAS. *Aaps Pharmscitech, 12* (1), 255-261.

Bernfeld, P. (1955). Enzymes carbohydrate metabolism. *ln Methods ln Enzymology*. Academic Press, 17, 149-158.

Bhatt, K., vd., (2020). Molecular analysis of *Bacillus velezensis* KB 2216, purification and biochemical characterization of alpha-amylase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 3332-3339.

Boyce, A. ve Walsh, G. (2007). Purification and characterisation of an acid phosphatase with phytase activity from Mucor hiemalis Wehmer. *Journal of Biotechnology*, 132(1), 82-87.

Bozic, N., vd., (2011). Production and properties of the highly efficient raw starch digesting a-amylase from a *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a. *Biochemical Engineering Journal*, 53 (2), 203-209.

Burhan, A., vd., (2003). Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus sp.* isolate ANT-6. *Process Biochemistry*, 38 (10), 1397-1403.

Çaphan, A. İ. (2011). *Biyoteknoloji ve biyoinformatik*. http://biyoinformatik.wordpress.com.tr. (Erişim Tarihi: 10 Kasım 2019).

Çetin, E. T. (1968). *Pratik Mikrobiyoloji*. 2.baskı, İstanbul, 645.

Chakraborty, S., vd., (2011). Characterization and stability studies on surfactant, detergent and oxidant stable α-amylase from marine haloalkaliphilic Saccharopolyspora sp. A9. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68 (1), 52-58.

Chibata, I. (1980). *In food process engineering*, Ed: Linko, P. & Larinkari, J., Applied Science Publishers, London, 1-19.

Colton, C. K. (1996). *In molecular biology and biotechnology fourth edition: Trends biotecnology*, Ed: Walker, J. M. and Rapley, R., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 454.

Cordeiro, C., A., M., vd., (2002). Production and properties of alpha-amylase from thermophilic *Bacillus sp*. *Brazilian Journal of Microbiology, 33*, 57-61.

Crabb, W. D. ve Mitchinson, C. (1997). Enzymes involved in the processing of starch to sugars. *Trends in Biotechnology*, 15, 349-352.

Dash, B., K., vd., (2015). Molecular identification of a newly isolated *Bacillus subtilis* BI19 and optimization of production conditions for enhanced production of extracellular amylase. *BioMed Research International*, 2015.

Deutch, C. E. (2002). Characterization of a salt-tolerant extracellular a-amylase from *Bacillus dipsosauri*. *Letters in applied microbiology*, 35(1), 78-84.

Du, R., vd., (2018). Optimization and partial characterization of ca-independent α-amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* BH1. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 48 (8), 768-774.

Du, R., vd., (2018). Purification and characterization of novel thermostable and Ca-independent α-amylase produced by *Bacillus amyloliquefaciens BH072*. *International journal of biological macromolecules*, 115, 1151-1156.

Emtenani, S., vd., (2015). Gene cloning and characterization of a thermostable organic-tolerant α-amylase from *Bacillus subtilis* DR8806. *International journal of biological macromolecules*, 72, 290–298.

Erçetin, Ş. Ş. (1999). *Biyoteknoloji İle Değişen Dünya Düzeni ve Eğitimi-1*. Uygulama Eğitim Yönetimi, 18, 169-180.

Farı, M. G. ve Kralovansky, U. P. (2006). The Founding Father of Biotechnology: Karoly (Karl) Ereky. *International Journal of Horticultural Science*. 12(1), 9-12.

Femi-Ola, T. O. ve Olowe, B. M. (2011). Characterization of alpha amylase from *Bacillus subtilis* BS5 isolated from Amitermes evuncifer Silvestri. *Research Journal of Microbiology*, 6(2), 140.

Fitter, J., vd., (2001). Activity and stability of a thermostable α-amylase compared to its mesophilic homologue: mechanisms of thermal adaptation. *Biochemistry*, 40 (35), 10723-10731.

Fukara, G. (2007). Determination of the specifications of the amylases of some extremely thermophilic bacteria.

Gessese, A. (1999). Purification and characterization of two raw-starch-digesting thermostable α-amylase from a thermophilic *Bacillus*. *Enzyme microbial technology*, 25, 433-438.

Giunchedi, L., vd., (1982). Beet necrotic yellow vein virus transmission by Polymyxa betae Keskin zoospores. *Phytopathologia Mediterranea*, 21 (1), 5–7.

Gomes, I., vd., (2003). Highly thermostable amylase and pullulanase of the extreme thermophilic eubacterium *Rhodothermus marinus*: production and partial characterization. *Bioresource technology*, 90 (2), 207-214.

Gözükara, E. M. (1997). *Enzimler.Biyokimya*. Nobel Tıp Kitapevleri, 572-573. İstanbul.

Gupta, R., vd., (2003). Microbial α-amylases: a biotechnological perspective, *Process Biochemistry*, 11, 1599-1616.

Hashemi, M., vd., (2013). Comparison of submerged and solid state fermentation systems effects on the catalytic activity of Bacillus sp. KR-8104 α-amylase at different pH and temperatures. *Industrial Crops and Products*, *43*, 661-667.

Hirasawa, K., vd., (2006). Salt-activated endoglucanase of a strain of alkaliphilic *Bacillus agaradhaerens*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 89 (2), 211-219.

Hsieh, M., S., vd., (2008). Purification and characterization of the amylase from a small abalone Haliotis sieboldii. *Fisheries science*, 74 (2), 425-432.

John, F. K. (1987). *Enzyme Technology* (H.J.Rehm ve G.Reed editör). Biotechnology. New York, 7, 37-62.

Kalpana, B. J. ve Pandian, S. K. (2014). Halotolerant, acid-alkali stable, chelator resistant and raw starch digesting α-amylase from a marine bacterium *Bacillus subtilis* S8-18. *Journal of basic microbiology*, 54(8), 802–811.

Kara, H., E., vd., (2011). Purification of beta-glucosidase from olive (Olea europaea L.) fruit tissue with specifically designed hydrophobic interaction chromatography and characterization of the purified enzyme. *Journal of Chromatography B*, 879 (19), 1507-1512.

Keskin, H. (1982). *Besin Kimyası*. Cilt II. Fatih yayınevi, İstanbul. 558.

Kıran, Ö. E. ve Çömlekçioğlu Dostbil, U. N. (2006). Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Endüstrideki Kullanım Alanları. *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9(1).

Kıymaz, T. ve Tarakçıoğlu, M. (2004). Biyoteknoloji Alanındaki Gelişmelerin Yansımaları ve Türkiye'nin Politika Seçenekleri. *Planlama Dergisi*, Özel Sayı, DPT'nin Kuruluşunun 42.Yılı, 235-242.

Konsula, Z. ve Liakopoulou-Kyriakides, M. (2004). Hydrolysis of starches by the action of an α-amylase from *Bacillus subtilis*. *Process biochemistry*, *39*(11), 1745-1749.

Kumari, N., vd., (2013). Purification and characterization of extracellular acidophilic α-amylase from *Bacillus cereus* MTCC 10205 isolated from soil. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 7 (48), 5440-5448.

Lakshmi, S., S., vd., (2020). Statistical optimization of amylase production and its purification from a palm wine isolate Bacillus sp., Q-164. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *29*, 101820.

Lal, N., vd., (2016). Optimization of nitrogen source (s) for the growth and amylase production from *Bacillus licheniformis* JAR-26 under submerged fermentation. *Indian Journal of Biology*, *3* (2).

Lennette, E., H., vd., (1985). *Manual of clinical microbiology*. Vol.4, U.S.A., 1149.

Liu, W., C., vd., (1970). Isolation, characterization, and structure of rabelomycin, a new antibiotic. *The Journal of Antibiotics*, 23 (9), 437-441.

Liu., X. D. ve Xu, Y. (2008). A novel raw starch digesting α-amylase from a newly isolated *Bacillus sp.* YX-1: purification and characterization. *Bioresource Technology*, 99(10), 4315-4320.

Lowry, O., H., vd., (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265- 275.

Malhotra, R., vd., (2000). Production and partial characterization of thermostable and calcium-independent α-amylase of an extreme thermophile Bacillus thermooleovorans NP54. *Letters in Applied Microbiology*, *31* (5), 378-384.

Mishra, S. ve Behera, N. (2008). Amylase activity of a starch degrading bacteria isolated from soil receiving kitchen wastes. *African journal of Biotechnology*, *7*(18).

Najafi, M., F., vd., (2005). Purification and characterization of an extracellular α-amylase from *Bacillus subtilis* AX20. *Protein expression and purification*, 41 (2), 349-354.

Nigam, P. ve Singh, D. (1995). Enzyme and microbial systems involved in starch processing. *Enzyme and Microbial Technology*, *17*(9), 770-778.

Niyonzima, F. N. ve More, S. S. (2014). Concomitant production of detergent compatible enzymes by *Bacillus flexus* XJU-1. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45, 903-910.

Noman, A., S., M., vd., (2006). Purification and some properties of α-amylase from post-harvest Pachyrhizus erosus L. tuber. *Food Chemistry*, 99 (3), 444-449.

Ortakaya, V., vd., (2017). α-Amylase from *Bacillus simplex* production, characterization and partial purification. *Fresenius Environmental Bulletin*, 26 (7), 4446-4455.

Ortakaya, V. ve Agüloğlu Fincan, S. (2019). SmF yöntemiyle topraktan izole edilen *Bacillus subtilis'* den amilaz üretimi. *Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma*, 12(3), 57-64.

Özcelik, T., vd., (1995). An unusual presentation: primary tuberculosis of the middle ear cleft. *Tubercle and Lung Disease*, 76 (2), 178-179.

Özdemir, S., vd., (2018). A Novel Raw Starch Hydrolyzing Thermostable α-Amylase Produced by Newly Isolated *Bacillus mojavensis* SO-10: Purification, Characterization and Usage in Starch Industries. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 61.

Pandey, A., vd., (1999). The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology and applied biochemistry*, 29 (2), 119-131.

Paul, T., vd., (2015). A simple one pot purification of bacterial amylase from fermented broth based on affinity toward starch-functionalized magnetic nanoparticle. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, *45* (6), 501-514.

Polaina, J. ve MacCabe, A. P. (2007). *Endüstriyel enzimler* (s. 531-547). Hollanda: Springer.

Priyadarshini, S. ve Ray, P. (2019). Exploration of detergent-stable alkaline α-amylase AA7 from *Bacillus* sp strain SP-CH7 isolated from Chilika Lake. *International journal of biological macromolecules*, *140*, 825-832.

Priyadarshini, S., vd., (2020). Production, characterization and application of thermostable, alkaline α-amylase (AA11) from Bacillus cereus strain SP-

CH11 isolated from Chilika Lake. *International Journal of Biological Macromolecules*, *145*, 804-812.

Rakaz, M., A., vd., (2021). Isolation, Extraction, Purification, and Molecular Characterization for Thermostable α-Amylase from Locally Isolated Bacillus Species in Sudan. *Biochemistry Research International*, *2021*.

Rao, M., B., vd., (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 597-635.

Rasooli, I., vd., (2008). A thermostable α-amylase producing natural variant of Bacillus spp. isolated from soil in Iran. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, *3* (3), 591-596.

Rathi, A., vd., (2022). Valorization of Rice Milled By-Products (Rice Husk and De-Oiled Rice Bran) into α-Amylase with its Process Optimization, Partial Purification and Kinetic Study. *Process Biochemistry*.

Ray, R., C., vd., (2008). Extracellular α-amylase production by *Bacillus brevis* MTCC 7521. *Food Biotechnology*, *22* (3), 234-246.

Roy, J., K., vd., (2012). Characterization and application of a detergent-stable alkaline α-amylase from *Bacillus subtilis* strain AS-S01a. *International journal of biological macromolecules*, *50* (1), 219-229.

Sajedi, R., H., vd., (2005). A Ca-independent α-amylase that is active and stable at low pH from *Bacillus sp.* KR-8104. *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 666-671.

Sani, I., vd., (2014). Isolation, partial purification and characterization of α-amylase from Bacillus subtilis. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, *4*, 49-54.

Sarikaya, E. ve Gürgün, V. (2000). Increase of the\alpha-amylase yield by Some BacillusStrains. *Turkish Journal of Biology*, 24(2), 299-308.

Shafiei, M., vd., (2010). Purification and biochemical characterization of a novel SDS and surfactant stable, raw starch digesting, and halophilic α-amylase from a moderately halophilic bacterium, Nesterenkonia sp. strain F. *Process Biochemistry*, 45 (5), 694-699.

Sharma, A. ve Satyanarayana, T. (2013). Structural and biochemical features of acidic α-amylase of *Bacillus acidicola*. *International journal of biological macromolecules*, 61, 416-423.

Shukla, R. J. ve Singh, S. P. (2015). Production optimization, purification and characterization of α-amylase from thermophilic *Bacillus licheniformis* TSI-14. *Starch-Stärke*, *67*(7-8), 629-639.

Siddiqui, A., vd., (2017). Single step purification of novel thermostable and chelator resistant amylase from *Bacillus licheniformis* RM44 by affinity

chromatography. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 16 (3), 1141.

Singh, P. ve Kumari, P. (2016). Isolation and characterization of amylase producing *Bacillus spp*. from selected soil sample. *International Journal of Research in Biosciences*, 5(2), 24-29.

Singh, R., N., vd., (2016). Production, purification and characterization of thermostable α-amylase from soil isolate *Bacillus* sp. strain B-10. *Journal of BioScience & Biotechnology*, 5(1), 37-43.

Swain, M., R., vd., (2006). Partial characterization and optimization of production of extracellular α-amylase from *Bacillus subtilis* isolated from culturable cow dung microflora. *Polish Journal of Microbiology*, 55, 289-296.

Telefoncu, A. (1997). *Enzimlerin Endüstriyel Uygulamaları*. Marmara Araştırma Merkezi Lisans Üstü Yaz Okulu (E.M.T.U) 21-27 Eylül, Aydın. 1, 5-8.

Tiwari, S., vd., (2014). Enhanced production and characterization of a solvent stable amylase from solvent tolerant Bacillus tequilensis RG-01: thermostable and surfactant resistant. *The Scientific World Journal*, *2014*.

Tuzlakoglu Ozturk, M., vd., (2013). Ligase-independent cloning of amylase gene from a local *Bacillus subtilis* isolate and biochemical characterization of the purified enzyme. *Applied biochemistry and biotechnology*, 171 (2), 263–278.

Uhlig, H. ve Linsmaier-Bednar, E. M. (1998). *Industrial enzymes and their applications*. New York: Wiley.

Uma Maheswar Rao, J. L. ve Satyanarayana, T. (2003). Enhanced secretion and low temperature stabilization of a hyperthermostable and Ca^{2+}-independent α-amylase of *Geobacillus thermoleovorans* by surfactants. *Letters in applied microbiology*, 36(4), 191-196.

Üstünes, H. ve Güvenç, U. (1985). Bira ve alkol üretiminde kullanılan bazı enzimlerin mikrobiyal yolla eldesi. *Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Dergisi*, 3(1), 85-101.

Vester, J., K., vd., (2015). An exceptionally cold-adapted alpha-amylase from a metagenomic library of a cold and alkaline environment. *Applied microbiology and biotechnology*, 99 (2), 717-727.

Vidyalakshmi, R., vd., (2009). Amylase production on submerged fermentation by *Bacillus sp. World Journal of Chemistry*, 4, 89-91.

Vijayalakshmi, K., vd., (2012). Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* KC3 for amylolytic activity. *International journal of bioscience, biochemistry and bioinformatics*, 2 (5), 336-341.

Vijayaraghavan, P., vd., (2015). Cow dung is an ideal fermentation medium for amylase production in solid-state fermentation by *Bacillus cereus. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 13, 111-117.

Wang, S., L., vd., (2011). Purification and characterization of a novel alkali-stable α-amylase from Chryseobacterium taeanense TKU001, and application in antioxidant and prebiotic. *Process Biochemistry*, 46 (3), 745-750.

Wang, S., vd., (2016). Characterization and Optimization of Amylase Production in WangLB, a High Amylase Producing Strain of *Bacillus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 180, 136-151.

Wang, Y., vd., (2020). A novel trehalosamine isolated from Bacillus amyloliquefaciens and its antibacterial activities. *AMB Express*, 10 (1), 1-7.

Wiseman, A. (1987). *The Aplication of Enzyme in Industry*. Handbook of Enzyme Biotechnology, 3, 275-373.

Wolfgang, A. (2007). *Enzyme in industry: Productions and applications*. Thirdh Completely Revised Edition. Wiley –VCH Pres., 489 pp.

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

Wu, X., vd., (2018). Purification and biochemical characterization of a thermostable and acid-stable alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* B4-423. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 329-337.

Zhang, F., vd., (2016). Purification and characterization of a novel and versatile α-amylase from thermophilic *Anoxybacillus sp*. YIM 342. *Starch-Stärke, 68* (5-6), 446-453.

Zhang, J. W. ve Zeng, R. Y. (2008). Purification and characterization of a cold-adapted α-amylase produced by Nocardiopsis sp. 7326 isolated from Prydz Bay, Antarctic. *Marine Biotechnology*, 10(1), 75-82.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyad, Ad	Ortakaya, Veysi
Web sayfası (Research Gate, Academia, etc.)	

Eğitim Bilgileri

Derece	Kurum	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Dicle üniversitesi	2013
Lisans	Uludağ üniversitesi	2011
Lise	Güler Şevki Özbek Anadolu Lisesi	2006

İş Deneyimi

Dönem (Yıl)	Şirket, Kurum	Görev
2016	Milli Eğitim Bakanlığı	Biyoloji Öğretmeni

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1.

2.

3.

4.

Özel İlgiler

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ BENZERLİK BİLDİRİMİ FORMU

Öğrencinin Adı, Soyadı	Veysi Ortakaya		
Öğrenci No	13801506A		
Ana Bilim Dalı	Biyoloji		
Program Türü	Proje ☐	Yüksek Lisans ☐	Doktora ☒
Tez Danışmanı	Doç. Dr. Sema Fincan		
Tez Başlığı	SmF (Submerged Fermentation) Yöntemi ile Topraktan İzole Edilerek Tanımlanan *Bacillus subtilis*'ten α-Amilaz Üretimi, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu		
RAPOR BİLGİLERİ			
Raporlama Aşaması	Tez Savunma Sınavı Sonrası		
Sayfa Sayısı	100		
Raporlama Tarihi	06.09.2022		
Benzerlik Oranı (%)	21		

Yukarıda bilgileri verilen tez çalışmamın toplam 73 sayfalık kısmına ilişkin, 06/09/2022 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından *TURNİTİN* isimli intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan intihal raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 21 olarak tespit edilmiştir.

Uygulanan filtrelemeler:

☒Başlangıç Bölümleri (Kabul ve Onay sayfası, Teşekkür sayfası, Özet/Abstract) hariç

☒Kaynaklar hariç

☐Alıntılar hariç/dâhil

☐Diğer (Açıklayınız)

Tezimin benzerlik oranı, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü İntihal Raporu Uygulama Esaslarında belirtilen üst sınır benzerlik oranını aşmamaktadır. Benzerlik oranım üst sınır benzerlik oranının altında olsa dahi aksinin tespit edilmesi durumunda her türlü yasal sorumluğu kabul ettiğimi ve hukuki sonuçlarına razı olduğumu bildirir,
gereğini arz ederim.

Öğrencinin Adı, Soyadı: Veysi Ortakaya
Tarih: 09.09.2022
İmza:

Danışman Adı, Soyadı: Doç. Dr. Sema Fincan Tarih: 15.09.2022	İmza:
Ana Bilim Dalı Başkanı Adı, Soyadı: Prof. Dr. Ahmet Kılıç Tarih: 15.09.2022	İmza: