

Araştırma Makalesi

Toprakтан İzole Edilen *Bacillus* Türlerinden  $\alpha$ -Amilazın İzolasyonu ve Karakterizasyonu

Sedat KAYA<sup>1</sup>, Barış ENEZ<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Muş Alparslan Üniversitesi, Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Organik Tarım Bölümü

<sup>2</sup>Bingöl Üniversitesi, Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Veteriner Sağlığı Bölümü, Bingöl/Türkiye

\*Sorumlu yazar: [benez@bingol.edu.tr](mailto:benez@bingol.edu.tr)

Geliş Tarihi: 23.05.2019

Düzeltilme Geliş Tarihi: 26.06.2019

Kabul Tarihi: 01.07.2019

Özet

Toprak mikroflorasının önemli bir kısmı *Bacillus* cinsi bakterilerden oluşur. Bu bakterilerden elde edilen amilazların daha fazla stabilite, yüksek verimlilik ve düşük üretim maliyetine sahip olma gibi özellikleri vardı. Bundan dolayı topraktan izole edilen *Bacillus cereus* WYS01, *Bacillus thuringiensis* VITLW1, *Bacillus thuringiensis* ES2I3P, *Bacillus cereus* TG16 mikroorganizmalardan  $\alpha$ -amilazın izolasyonu ve karakterizasyonunu gerçekleştirilmiştir. Yapılan araştırmada bütün bakterilerin maksimum enzim üretiminin 36. saatte, pH 7.0 ve 40 °C'de olduğu tespit edildi. Mikroorganizmalar arasında spesifik aktivitesi en yüksek olan *Bacillus cereus* WYS01'tur. Enzim aktivitesine sıcaklık ve pH gibi önemli etkisi olan parametrelere bakıldı. *Bacillus thuringiensis* VITLW1, *Bacillus thuringiensis* ES2I3P ve *Bacillus cereus* TG16 bakterilerinin 40 °C de, *Bacillus cereus* WYS01'in ise 60 °C de maksimum aktiviteyi gösterdiği tespit edildi. Bütün mikroorganizmalar en fazla pH7.0 da  $\alpha$ -amilaz aktivitesini gerçekleştirdi. Bu çalışmada endüstriyel ve biyoteknolojik yönden önemi olan amilazın bakteriler tarafından elde edildiği belirlendi.

**Anahtar kelimeler:**  $\alpha$ -Amilaz, *Bacillus*, karakterizasyon, toprak.

Isolation and Characterization of  $\alpha$ -Amylase from *Bacillus* Species Isolated from Soil

Abstract

An important part of the soil microflora is made up of *Bacillus* bacteria. Amylases obtained from these bacteria are known to have greater stability, higher productivity and lower production costs. Therefore, isolation and characterization of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus cereus* WYS01, *Bacillus thuringiensis* VITLW1, *Bacillus thuringiensis* ES2I3P, *Bacillus cereus* TG16 microorganisms isolated from soil was carried out. In the study, the maximum enzyme production of all bacteria was determined to be at pH7.0 and 40 °C at the 36th hour. *Bacillus cereus* WYS01 had the highest specific activity among microorganisms. The parameters which have important effects on the enzyme activity such as temperature and pH were investigated. It was seen that *Bacillus thuringiensis* VITLW1, *Bacillus thuringiensis* ES2I3P and *Bacillus cereus* TG16 bacteria showed maximum activity at 40 °C while this was 60 °C for *Bacillus cereus* WYS01. All microorganisms carried out  $\alpha$ -amylase activity at pH7.0. In this study, it was determined that amylase, which is important for industrial and biotechnological aspects, was obtained by bacteria.

**Key Words:**  $\alpha$ -Amylase, *Bacillus*, characterization, soil.

Giriş

$\alpha$ -Amilazlar (EC 3.2.1.1) ekstraselüler endoenzimler olup, farklı ürünler vermek için nişasta moleküllerini hidrolize ederek onların gıda, tekstil,

kağıt ve katı atıkların biyolojik olarak çevrilmesi gibi çok farklı endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır. Amilazlar bitki, hayvansal ve mikrobiyal kaynaklar tarafından üretilir, ancak endüstride genel olarak

mikrobiyal amilazlara ihtiyaç duyulur. Bunun nedeni mikrobiyal amilazların toplu üretim ve kolay genetik manipülasyon gibi özelliklerinden kaynaklanır (Souza ve Magalhaes, 2010). Mikroorganizmalardan elde edilen  $\alpha$ -amilazların ticari üretimi, dünya enzim pazarının %25-33'ünü temsil eder (Gupta ve ark., 2003; Pandey ve ark., 2000).

Bakterilerden elde edilen amilazların daha fazla stabilize, yüksek verimlilik ve düşük üretim maliyeti olduğu bilinmektedir. Toprak mikroflorasının önemli bir kısmı *Bacillus* cinsi bakterilerdir. *Bacillaceae* familyası içerisinde yer alan *Bacillus* türleri, aerop ve fakültatif anaerop, gram pozitif endosporlu bakterilerdir (Topçal ve ark., 2014). *Bacillus* genusuna ait türlerin çoğu güvenli mikroorganizmalardır. Bu bakteri türleri tarım ve endüstriyel amaçlarda başarılı şekilde kullanılmakta olan pek çok maddeyi sentezleyebilme kabiliyetine sahiptirler. *Bacillus* cinsi mikroorganizmalar birçok hücre dışı amilazlar dahil enzimlerin ana üreticisidirler. *Bacillus* bakterileri kısa fermentasyon döngüsü, güvenli kullanım, kolay manipülasyon, tutarlılık, stres koşullarında etkili enzim aktivitesi ve çevre dostu özelliklerinden dolayı endüstriyel mikrobiyal enzimlerin en fazla tercih edilenleridir (John ve Elangovan, 2013). *Bacillus* türlerinin amilaz üretimi orta ve diğer fiziksel parametrelerin bileşimine bağlı olarak değiştiği için çok fazla çeşitlilik göstermektedirler. Genel üretim maliyetini etki etmeden amilaz üretimini artırmaya ihtiyaç duyulmaktadır (Pranay ve ark., 2019).

Bu çalışmada, topraktan izole edilen *Bacillus* türleri kullanılmıştır. Kullanılan bakterilerden endüstriyel ve ekonomik değeri yüksek olan  $\alpha$ -amilazın üretim karakterizasyonu gerçekleştirildi.

#### **Materyal ve Yöntem**

##### **Biyolojik Materyal**

Biyolojik materyal olarak daha önce izole edilerek tanımlanan *Bacillus cereus* WYS01, *Bacillus thuringiensis* VITLW1, *Bacillus thuringiensis* ES213P, *Bacillus cereus* TG16 mikroorganizmaları kullanıldı.

##### **Protein Miktar Tayini**

Protein miktar tayini Lowry metoduna göre yapıldı. (Lowry ve ark., 1951).

##### **Enzim Aktivitesi**

$\alpha$ -Amilaz aktivite tayini modifiye DNS metoduna göre gerçekleştirildi (Miller, 1959). Aktivite tayini için optimum şartlarda üretilen bakteri süpernatantları kullanıldı. Süpernatantlar ile %0,5'lik nişasta çözeltisi 40 °C de 30 dakika inkübe edildi.

Daha sonra örneklere 3,5 DNS ilave edilerek 5 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Süre sonunda gerekli işlemler gerçekleştirilerek 489nm'de spektrofotometrik ölçüm yapıldı.

##### **İnkübasyon süresinin $\alpha$ -Amilaz Üretimine Etkisi**

İnkübasyon süresinin  $\alpha$ -amilaz üretimine etkisini belirlemek için 12-72 saat aralığında her 12 saatte bir örnek alındı. Alınan örnekler 10.000 rpm de 10 dk santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi. İşlem sonunda analiz işlemi gerçekleştirildi.

##### **Sıcaklığın $\alpha$ -Amilaz Üretimine Etkisi**

100 ml'lik erlen mayeler de 25 ml NB besi yerleri hazırlanarak her örnekten 1 ml ekim yapıldı. 20-70 °C sıcaklık aralıklarında amilaz üretiminin optimum değerlerin belirlemek için 120 rpm'de çalkalamalı su banyosunda bekletildi ve spektrofotometre de absorbans ölçümleri yapıldı.

##### **pH'nın $\alpha$ -Amilaz Üretimine Etkisi**

Hazırlanan NB (Nutrient Broth) ortamında pH 3.0'ten başlayarak pH 10.0'a kadar farklı pH'lar da enzim üretimi gerçekleştirildi. Belirlenen süre sonunda pH'nın amilaz üretimine etkisini belirlemek için aktivite tayini yapılarak spektrofotometre de absorbans ölçümleri yapıldı.

##### **Enzim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi**

Sıcaklığın aktivite üzerine etkisini belirlemek için uygun optimum şartlarda üretilen bakteri kültürleri santrifüj edilerek elde edilen süpernatantlar kullanıldı. Bunun için 20°C'den 10 °C artan sıcaklık aralıklarıyla 70°C'ye kadar  $\alpha$ -amilaz aktivite tayini yapıldı. Yapılan analiz sonucunda rölatif enzim aktivitesi belirlendi.

##### **Enzim Aktivitesine pH'nın Etkisi**

pH etkisi için; substrat olarak kullandığımız nişasta %0.5'lik olacak şekilde farklı tamponlar içerisinde ayrı ayrı hazırlandı. Daha sonra amilaz aktivite tayini yapılarak rölatif enzim aktivitesi saptandı.

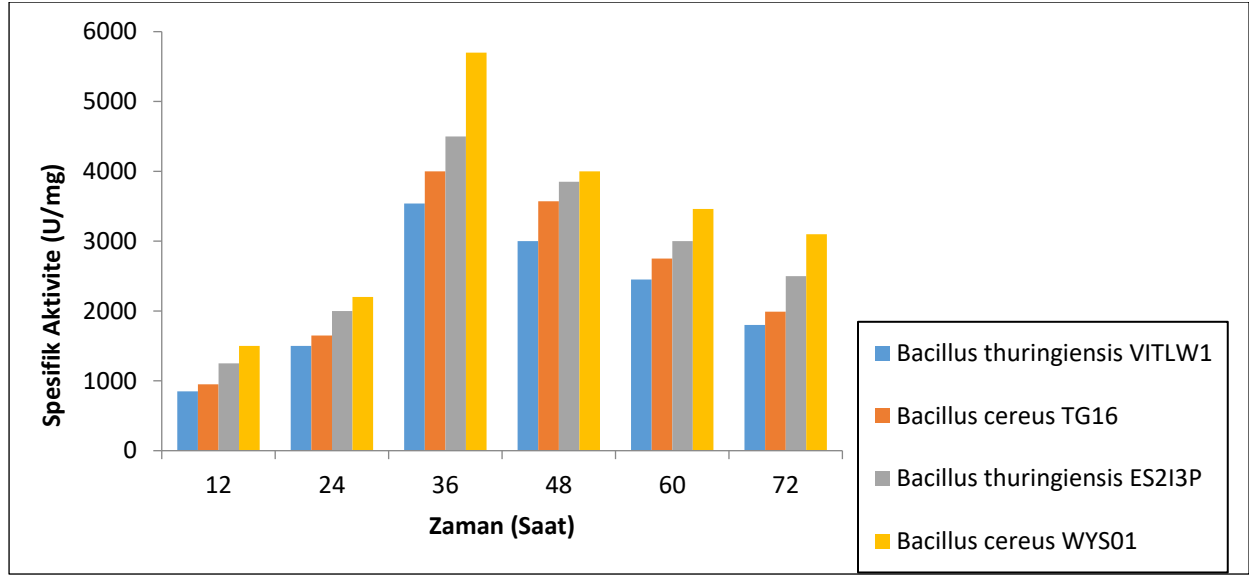
#### **Bulgular ve Tartışma**

##### **İnkübasyon süresinin $\alpha$ -Amilaz Üretimine Etkisi**

İnkübasyon süresinin bakterilerin enzim üretimine etkisini araştırmak için NB besi yerinde 12-72. saatler arasında üretilen bakterilerden her 12. saate bir örnekler alındı. Şekil 1'de görüldüğü gibi bütün bakterilerde 12. saatten itibaren bütün mikroorganizmalar da enzim üretimi arttığı, maksimum  $\alpha$ -amilaz üretilen zamanın ise 36. saat

olduğu belirlendi. Mikroorganizmaların 36.saatte maksimum  $\alpha$ -amilaz üretim sırasına bakıldığında sırasıyla; *Bacillus cereus* WYS01, *Bacillus thuringiensis* ES2I3P, *Bacillus cereus* TG16 ve *Bacillus thuringiensis* VITLW1 olduğu tespit edildi. Asgher ve ark. (2007) *Bacillus subtilis* JS-2004 bakterisinin maksimum enzim üretim zamanını 48. saat olarak belirlediler. Hmidet ve ark. (2008) *Bacillus licheniformis* NH1'i 48

saatte optimum enzim üretimi gerçekleştirmişlerdir. Liu ve Xu (2008) *Bacillus* sp. YX-1 bakterisinde maksimum  $\alpha$ -amilaz üretiminin 44. saatte gerçekleştiğini belirlediler. Saxena ve ark. (2007) *Bacillus* sp. PN5de amilaz üretimini 60. saatte tespit etmişlerdir. Yaptığımız çalışmada ekstraselüler enzim üretim süresinin kısa olması ekonomik ve zaman kazanım açısından önemli bir avantaj olduğu görüldü.



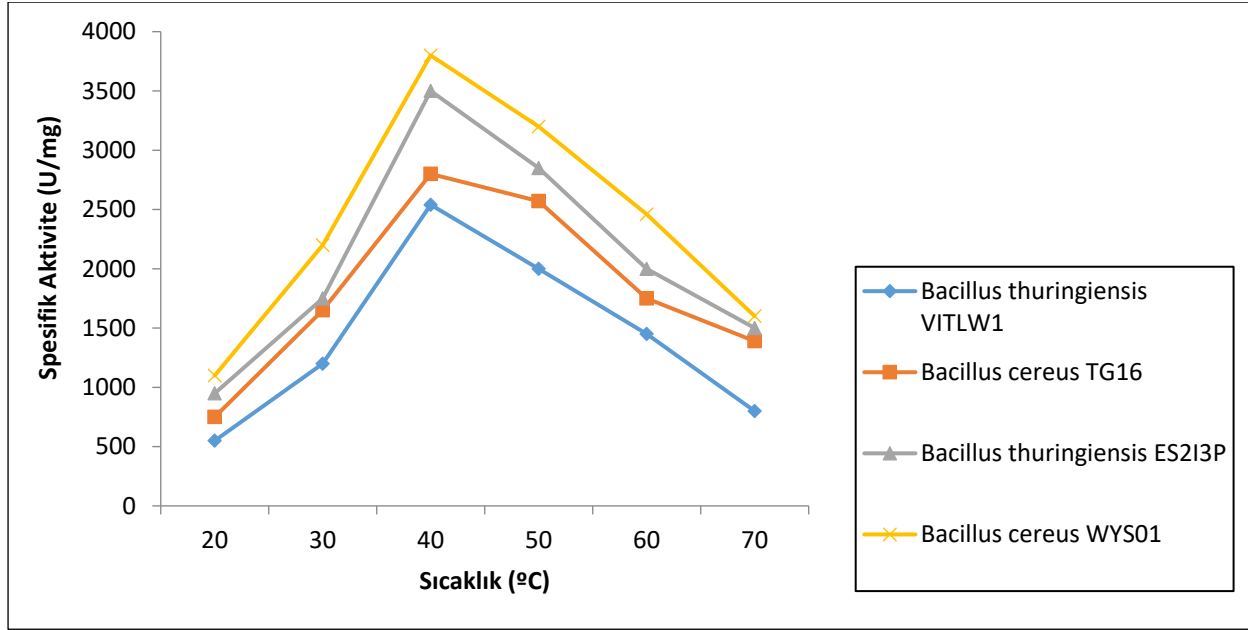
Şekil 1. İnkübasyon süresinin  $\alpha$ -amilaz üretimine etkisi.

#### Sıcaklığın $\alpha$ -Amilaz Üretimine Etkisi

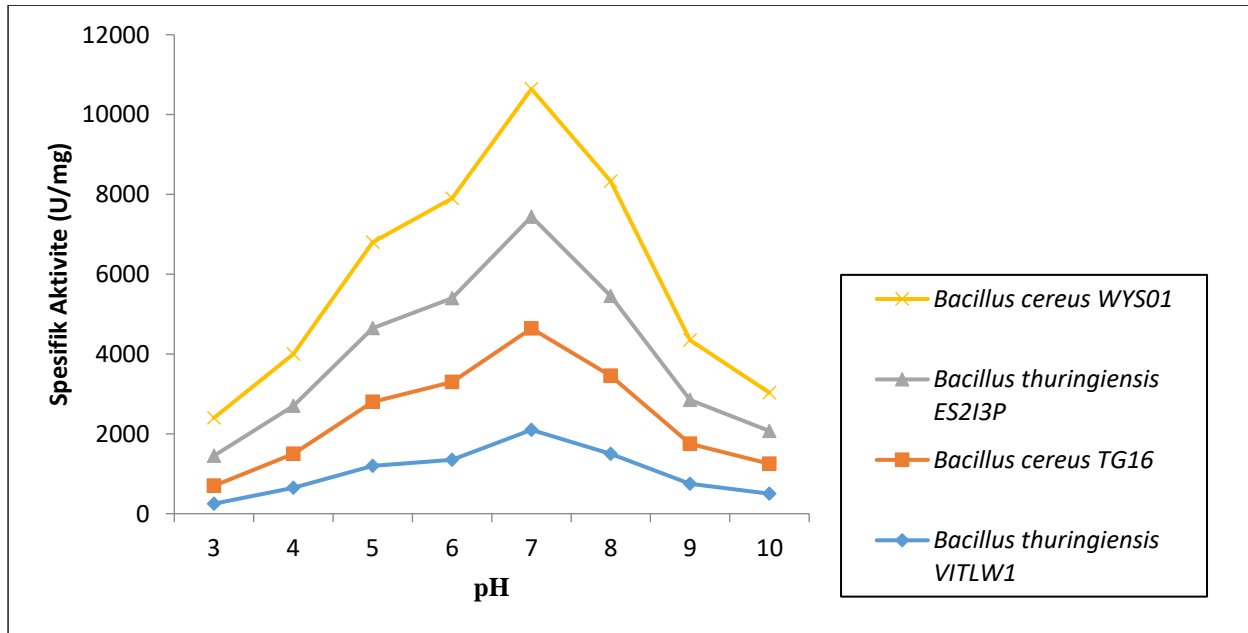
Enzim üretiminde sıcaklığın etkisini araştırmak için NB besi ortamında mikroorganizmalar 20°C'den 70°C'ye kadar inkübe edildi. Yapılan çalışmada mikroorganizmaların 30-60°C arasında enzim ürettikleri belirlendi. Şekil 2 de görüldüğü gibi bakteriler arasında en fazla amilaz ürettiği tespit edilen mikroorganizma *Bacillus cereus* WYS01 olduğu belirlendi. Bütün bakterilerin optimum 40 °C de maksimum üretim gösterdiği ancak artan sıcaklıklarda bakteri üretiminin azaldığı görüldü. Benzer sonuçları *Bacillus* türlerinde diğer araştırmacılar da gözlemler. Ozdemir ve ark. (2018) yaptıkları araştırmada *Bacillus mojavensis* SO-10 bakterisinin en fazla amilaz ürettiği sıcaklığın 35°C olduğunu belirlediler. Hamilton ve ark. (1999) *Bacillus* sp. IMD 435 bakterisinden optimum amilaz üretiminin 40 °C olduğunu tespit etti. Ortakaya ve ark. (2017) topraktan izole ettikleri *Bacillus simplex* bakterisinden maksimum 37 °C de amilaz üretimi gerçekleştirdiler.

#### pH'nin $\alpha$ -Amilaz Üretimine Etkisi

Fiziksel parametreler arasında pH, morfolojik olarak enzim artışını etkileyen önemli bir faktördür. Bundan dolayı  $\alpha$ -amilaz üretimine pH'nın etkisini belirlemek için pH 3-10 arasında uygun ortamda mikroorganizmalar üretilerek örnekler alındı. Analiz sonucunda spesifik aktivitesi en fazla olan bakteri türü *Bacillus cereus* WYS01 (3200 U/mg) tespit edildi. Bütün mikroorganizmalar da artan pH'lara bağlı olarak enzim üretiminin arttığı belirlendi. Şekil 3'te görüldüğü üzere mikroorganizmalar pH6.0-8.0 arasında enzim ürettikleri gözlemlendi. Bütün bakterilerin maksimum amilaz üretimini nötral pHda gerçekleştiği tespit edildi. pH'nın nötral olması gerek nişastanın sıvılaştırılması gerekse gıda endüstrisi gibi önemli alanlarda kullanımı yönünden önem arz etmektedir. Bazı araştırmacılar da yapılan çalışmamıza yakın sonuçlar elde etmişlerdir. Shafiei ve ark. (2010) izole ettikleri mikroorganizmadan maksimum amilaz üretimini pH7.5 olduğunu belirlemişlerdir. Kikani ve Singh (2012) *Anoxybacillus beppuensis* TSSC-1'den elde ettikleri  $\alpha$ -amilaz üretimini en fazla pH7.0 da olduğunu tespit etmişlerdir.



Şekil 2. Sıcaklığın α-amilaz üretimine etkisi.

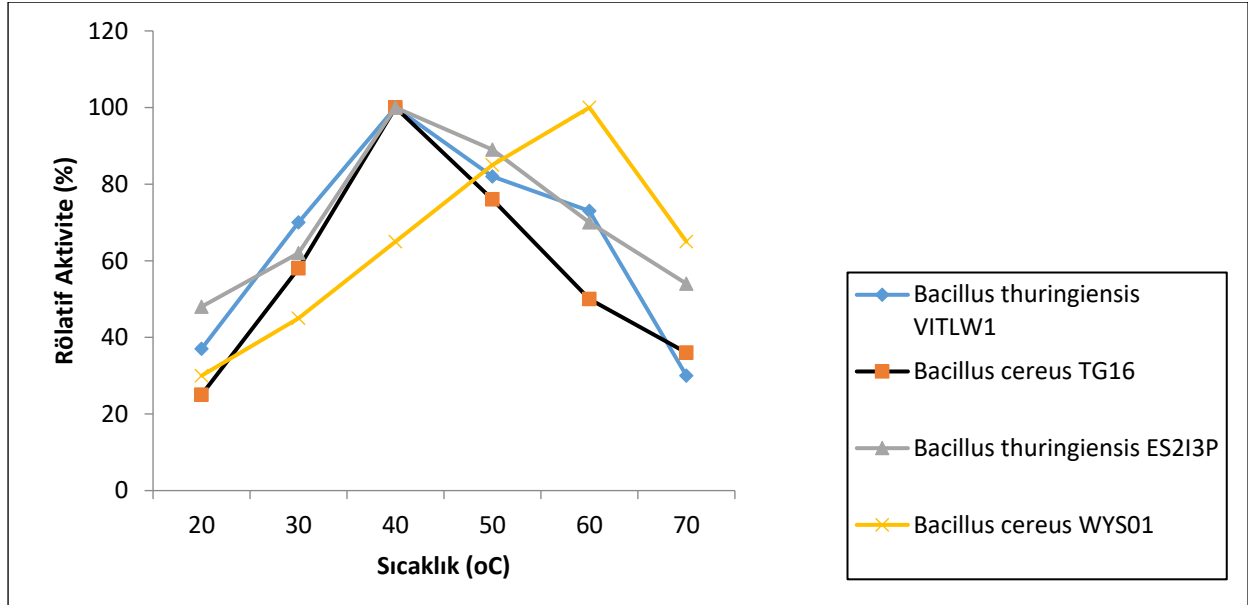


Şekil 3. pH'nın α-amilaz üretimine etkisi.

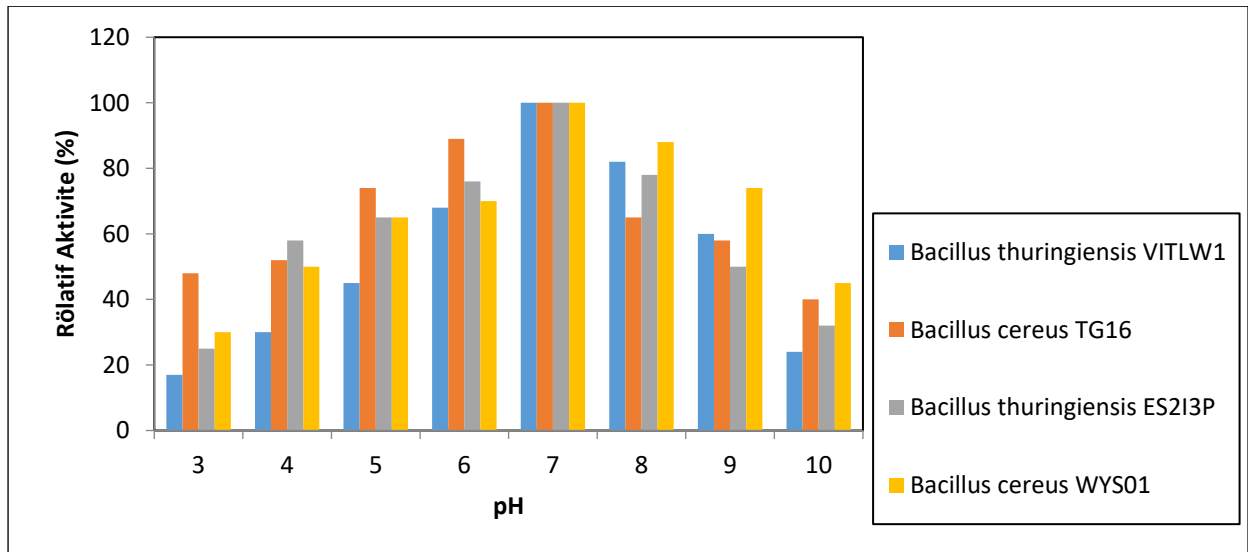
### Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Mikroorganizmalar optimum koşullarda üretilerek, üst sıvıları alındı. Alınan örnekler 20-70 °C sıcaklık aralıklarında substrat ile muamele edilerek inkübe edildi. Şekil 4'te görüldüğü gibi *Bacillus thuringiensis* VITLW1, *Bacillus thuringiensis* ES213P, *Bacillus cereus* TG16 mikroorganizmaların maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık 40°C olduğu belirlendi. Bu mikroorganizmalardan elde edilen amilazların 30-60

°C sıcaklık aralıklarında aktivitelerin olduğu belirlendi. *Bacillus cereus* WYS01 bakterisinin maksimum amilaz aktivite gösterdiği sıcaklık 60°C de olduğu tespit edildi. Bu bakterinin özellikle 40-70 arasında enzim aktivitesinin olduğu görüldü. Najafi ve ark. (2005) izolasyonunu gerçekleştirdikleri *Bacillus subtilis* AX20'nin α-amilazın maksimum sıcaklığının 55°C olduğunu belirlediler.



Şekil 4. Enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi.



Şekil 5. Enzim aktivitesine pH'nın etkisi.

#### Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

$\alpha$ -Amilaz aktivitesi üzerine etkili olan diğer bir parametre pH'dır. pH 3.0-10 aralığında enzim aktivitesine etkisi araştırıldı. Araştırma sonucunda tüm mikroorganizmaların nötral pH'da (pH7.0) maksimum aktivite gösterdiği tespit edildi. Şekil 5 'te görüldüğü üzere bütün bakteriler, pH 6.0-8.0 aralığında aktivite gösterdiği tespit edildi. Bakteriler arasında *Bacillus cereus* WYS01'un en fazla rölatif aktiviteye sahip olduğu tespit edildi. Benzer sonuçları diğer araştırmacılar da bulmuşlardır. Ağuloğlu Fincan ve Enez (2014) çalışmalarında kullandıkları *Geobacillus stearothermophilus* bakterisinin

maksimum amilaz aktivitesi pH7.0 da olduğunu belirtmişlerdir. Ortakaya ve ark. (2017) araştırmalarında kullandıkları *Bacillus simplex* bakterisinin maksimum amilaz aktivitesinin pH7.0 gerçekleştiğini bulmuşlardır.

#### Kaynaklar

Aguloğlu Fincan, S., Enez, B. 2014. Production, purification, and characterization of thermostable  $\alpha$ -amylase from thermophilic *Geobacillus stearothermophilus*. *Starch/Stärke*, 66: 182-189.

- Asgher, M., Asad, M.J., Rahman, S.U., Legge, R.L. 2007. A thermostable  $\alpha$ -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *Journal Food Engineering*, 79: 950-955.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., Chauhan, B. 2003. Microbial - amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 38: 1599-616.
- Hamilton, L.M., Kelly, C.T., Fogarty, W.M. 1999. Production and properties of the raw starch digesting -amylase of *Bacillus* sp. IMD 435. *Process Biochemistry*, 35: 27-31.
- Hmidet, N., Bayouhd, A., Berrin, J.G., Kanoun, S., Juge, N., Nasri, M. 2008. Purification and biochemical characterization of a novel  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* NH1 Cloning, nucleotide sequence and expression of amyN gene in *Escherichia coli*. *Process Biochemistry*, 43: 499-510.
- John, R.J.D., Elangovan, N. 2013. Molecular identification of amylase producing *Bacillus subtilis* and detection of optimal conditions. *Journal of Pharmacy Research*, 6: 426-30.
- Kikani, B.A., Singh, S.P. 2012. The stability and thermo dynamic parameters of a very thermostable and calcium-independent  $\alpha$ -amylase from a newly isolated bacterium, *Anoxybacillus beppuensis* TSSC-1. *Process Biochemistry*, 47: 1791-1798.
- Liu, X. D., Xu, Y. 2008. A novel raw starch digesting  $\alpha$ -amylase from a newly isolated *Bacillus* sp. YX-1: Purification and characterization. *Bioresource Technology*, 99: 4315-4320.
- Lowry, O. H., Roserbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R. 1951. Protein measure ment with folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitro salicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, 31: 426-428.
- Najafi, M. F., Deobagkar. D., Deobagkar, D. 2005. Purification and characterization of an extracellular  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* AX20. *Protein Expression and Purification*, 41: 349-354.
- Ortakaya, V., Aguloglu Fincan, S., Enez, B. 2017.  $\alpha$ -Amylase from *Bacillus simplex* production, characterization and partial purification. *Fresenius Environmental Bulletin*. 26(7): 4446-4455.
- Ozdemir, S, Aguloglu Fincan, S., Karakaya, A., Enez, B. 2018. A novel raw starch hydrolyzing thermostable  $\alpha$ -amylase produced by newly isolated *Bacillus mojavensis* SO-10: Purification, characterization and usage in starch industries. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 61: e18160399.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C.R., Soccol, V.T., Singh, D., Mohan, R. 2000. Advances in microbial amylases. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 31: 135-52.
- Pranay, K., Padmadeo, S. R., Jha, V., Prasad, B. 2019. Screening and identification of amylase producing strains of *Bacillus*. *Journal of Applied Biology Biotechnology*, 1-6 DOI: 10.7324/JABB.2019.70103.
- Saxena, R.K., Dutt, K., Agarwal, L., Nayyar, P. 2007. A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5. *Bioresource Technology*, 98: 260-265.
- Shafiei, M., Ziaee, A.A., Amoozegar, M.A. 2010. Purification and biochemical characterization of a novel SDS and surfactant stable, raw starch digesting and halophilic  $\alpha$ - amylase from a moderately halophilic bacterium *Nesterenkonia* sp strain F. *Process Biochemistry*, 45: 694-699.
- Souza, P.M., Magalhaes, P.O. 2010. Applications of microbial  $\alpha$ -amylase in industry-a review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41: 850-61.
- Topçal, F., Diğrak, M., Gündoğan, R. 2014. Identification of *Bacillus* Species Isolated from Soil and Determination of Bacteriocin Production. *Adiyaman University Journal of Science*, 4(2): 57-67.