

## Sıcaklığa Dirençli $\alpha$ -Amilaz Enzimi Üreten Mezofilik Bakteri İzolasyonu ve Enzimin Kısmi Karakterizasyonu\*

Gültekin ÖZDEMİR<sup>1</sup>, Bahri Devrim ÖZCAN<sup>2\*\*</sup>

<sup>1</sup>Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 80000, Osmaniye

<sup>2</sup>Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü, 01330, Adana

<sup>1</sup><https://orcid.org/0000-0002-4151-5399>

<sup>2</sup><https://orcid.org/0000-0002-9198-656X>

\*\*Sorumlu yazar: bdozcan@gmail.com

\*Bu makale Gültekin ÖZDEMİR'in yüksek lisans tez çalışmasından üretilmiştir.

### Araştırma Makalesi

#### Makale Tarihiçesi:

Geliş tarihi: 11 Kasım 2020

Kabul tarihi: 27 Kasım 2020

Online yayınlanma: 15 Aralık 2020

#### Anahtar Kelimeler:

*Bacillus*

İzolasyon

$\alpha$ -Amilaz

Termal stabilite

Karakterizasyon

### ÖZET

Bu çalışmada, Niğde ili Ulukışla ilçesi Çiftahan bölgesi sınırları içinde bulunan kaplıcadan alınan toprak örneklerinden  $\alpha$ -amilaz aktivitesine sahip *Bacillus* izolasyonu yapılmıştır. İzolat bakterisi, *Bacillus* sp. GA4 olarak isimlendirilmiştir. *Bacillus* sp. GA4 izolatına ait  $\alpha$ -amilaz enziminin optimum pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla 6.0-8.0 ve 50°C olarak bulunmuştur. Enzim 40°C'de 30 dk ön inkübasyon sonrasında aktivitesini tamamen korumuştur. Enzim, 50°C ve 60°C'de 30 dk ön inkübasyon sonrasında ise sırasıyla %21 ve %37'lik aktivite kaybına uğramıştır. MgCl<sub>2</sub> ve FeSO<sub>4</sub> enzim aktivitesini sırasıyla %13 ve %12 seviyelerinde artırırken, CuSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub> ve EDTA sırasıyla %81, %38 ve %33 oranlarında inhibe etmiştir. *Bacillus* sp. GA4  $\alpha$ -amilaz enziminin moleküler ağırlığı SDS-PAGE zimogram analizi ile yaklaşık olarak 55 kDa bulunmuştur. İzolatın CFX, CN, TE, RD, S, Amp ve P antibiyotiklerine hassas, SH antibiyotiğine ise dirençli olduğu gözlenmiştir.

## Isolation of Thermostable $\alpha$ -Amylase Producing Mesophilic Bacterium and Partial Characterization of the Enzyme

### Research Article

#### Article History:

Received: 11 November 2020

Accepted: 27 November 2020

Published online: 15 December 2020

#### Keywords:

*Bacillus*

Isolation

$\alpha$ -Amylase

Thermal stability

Characterization

### ABSTRACT

In this study, *Bacillus* sp. strain exhibiting  $\alpha$ -amylase activity was isolated from the soil sample collected from the thermal spring those located in the borders of Niğde province, Ulukışla subprovince, Ciftahan region. Isolated bacterium was entitled as *Bacillus* sp GA4. Optimum pH and temperature values of the enzyme were found 6.0-8.0 and 50°C, respectively. Enzyme activity was retained totally after pre-incubation within 30 minutes at 40°C. However, enzyme activity was reduced at the rate of 21% and 37% after pre-incubation at 50°C and 60°C, respectively. MgCl<sub>2</sub> and FeSO<sub>4</sub> increased enzyme activity at levels of 13% and 12% whereas CuSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub> and EDTA inhibited 81%, 38% and 33%, respectively. The molecular weight of *Bacillus* sp. GA4  $\alpha$ -amylase was found to be approximately 55 kDa by SDS-PAGE zymogram analysis. The isolate was found to be sensitive to CFX, CN, TE, RD, S, Amp and P while resistant to SH.

**To Cite:** Özdemir G., Özcan BD. Sıcaklığa Dirençli  $\alpha$ -Amilaz Enzimi Üreten Mezofilik Bakteri İzolasyonu ve Enzimin Kısmi Karakterizasyonu Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 2020; 3(2): 75-82.

## 1. Giriş

Enzimler, günümüzde hemen her sanayi kolunda yoğun kullanım alanı bulmuş vazgeçilmez biyomoleküllerdir [1, 2]. Enzimler kimyasal katalizörlerle karşılaştırıldıklarında, daha az oranda zararlı yan ürün meydana getirmeleri ve daha düşük maliyetli ürün imalatı yapmaları nedeniyle ticari kullanımları daha caziptir [3]. Günümüzde kullanılan enzimlerin büyük çoğunluğu mikrobiyal kaynaklardan elde edilmektedir. Mikroorganizma kaynaklı enzimler, bitkisel veya hayvansal kökenli enzimlerle karşılaştırıldığında, biyokimyasal aktivasyon düzeylerinin yüksek olması, zararlı yan ürün oluşturmamaları, daha dayanıklı olmaları, düşük maliyetle fazla miktarda üretilibilmeleri gibi avantajlara sahiptirler [4].

Alfa-amilazlar (endo-1,4- $\alpha$ -D-glukan glukanohidrolaz, E.C.3.2.1.1), bir polisakkarit molekülü olan nişastayı meydana getiren glikoz monomerleri arasındaki  $\alpha$ -1,4 glikozidik bağlarını hidrolize ederek katalizleyen enzimlerdir. Biyoteknolojik olarak kullanılan  $\alpha$ -amilazlar çoğunlukla fungus, maya ve bakteri kaynaklıdır [5]. Enzimin ticari olarak en çok tüketildiği nişasta endüstrisi proseslerinde, pH ve sıcaklık optimal değerleri nedeniyle, bakterilerden elde edilen enzim çeşitleri fungustan elde edilenlere göre daha fazla tercih edilmektedir. *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* var. *sacchariticus*, *B. coagulans*, *Pseudomonas saccharophila* ve *Aspergillus oryzae* kökenli  $\alpha$ -amilazlar yüksek oranda saflaştırılıp kristalize edilen enzimlerdir [6]. Enzimin substrat spesifitesi her tür için farklıdır ancak genel olarak değerlendirildiğinde azdan çoğa doğru; maltotrioz, glikojen, siklodekstrin, amilopektin, amiloz, nişasta olarak sıralanmaktadır. Alfa-amilazların uygulama alanı günümüzde oldukça genişlemiş ve çeşitlenmiş olup, nişastanın sıvılaştırılmasında, ekmekçilikte, tekstil, kâğıt, meyve suyu endüstrisinde ve alkol fermentasyonunda yoğun bir şekilde kullanılmaktadır [7].

Termofil mikroorganizmalardan izole edilen sıcaklığa dirençli  $\alpha$ -amilaz enzimleri, endüstriyel proses esnasında yüksek sıcaklık koşullarına dayanıklı olmaları ve aktivitelerini korumaları sebebiyle büyük bir ticari potansiyele sahiptirler. *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *Myceliophthora thermophila*, *Pyrococcus wosei*, *Pyrococcus furiosus* ve *Thermococcus aggregans* gibi mikrobiyal türler günümüzde yaygın olarak ticari termofilik  $\alpha$ -amilaz üreticisi

mikroorganizmalardır. Sıcaklığa dirençli  $\alpha$ -amilazlar başta bira ve nişastadan şeker üretimi [8], tekstil endüstrisi [9], deterjan endüstrisi [10], çiftlik hayvanlarında sindirimin iyileştirilmesi [11, 12] olmak üzere birçok alanda yaygın bir kullanım alanı bulmuştur.

Bu çalışmada Niğde ili sınırları içerisinde bulunan Çiftehan kaplıcasının sıcak su tahliye noktasından alınan toprak numunesinden sıcaklığa dirençli  $\alpha$ -amilaz enzimi üreten yeni bir mezofilik bakterinin izolasyonu gerçekleştirilmiş ve enzimin kısmi karakterizasyonu yapılmıştır.

## 2. Materyal ve Metot

### 2.1. Bakteriler, Besiyeri ve $\alpha$ -Amilaz Pozitif İzolatların Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan *Bacillus* sp. GA4 bakterisi Niğde ili Ulukışla ilçesi Çiftehan bölgesi sınırları içinde bulunan kaplıcadan, sıcak su tahliyesinin yapıldığı bölgeden alınan toprak numunesinden Lennete ve ark. [13] tarafından verilen protokol uyarınca izole edilmiştir. Bakteri LB (%10 w/v tripton, %5 w/v maya özütü, %10 w/v NaCl, pH 7.5) sıvı besi ortamında 37°C sıcaklığa ayarlanmış inkübatörde orta düzeyde çalkalama hızında üretilmiştir. Katı besiyeri kullanılması gerektiği durumlarda LB besiyerine %1.5 (w/v) oranında agar ilave edilmiştir. İzolatların  $\alpha$ -amilaz aktivitesinin belirlenmesi için bakteriler %0.5 (w/v) oranında çözünür nişasta içeren LB-agar besiyerinde gece boyunca üretildikten sonra, plaklar iyot buharı ile boyanmıştır. Bunun için, petri kaplarının kapaklarına birkaç iyot kristali ezilerek dağıtılmış, bakteri plağı ters çevrilerek kapığın üzerine konmuştur. Oda sıcaklığında birkaç dk beklendikten sonra iyot buharı ile maviye boyanan besiyeri zemininde etrafında beyazımtırak aktivite zonu bulunduran bakteriler  $\alpha$ -amilaz pozitif bakteriler olarak belirlenmiştir.

### 2.2. Enzim Üretimi

*Bacillus* sp. GA4 bakterisi LB besiyerinde 37°C'ye ayarlanmış inkübatörde orta çalkalama hızında (200 rpm) 24 saat süreyle üretilmiştir. Süre sonunda kültür ortamı santrifüj edilerek (Hettich Universal EBA12; 5.000 rpm, 10 dk), bakteri hücreleri çöktürülmüş ve böylece sıvı besi ortamından ayrılmıştır. Bakteriye ait ekstraselüler enzimleri içeren süpernatant kısım (sıvı faz) ise enzim analizleri için kullanılmıştır [14].

### 2.3. Enzimatik Analizler

Alfa-amilaz enzimine ait analizler 1 ml hücre dışı sıvıya (ekstraselüler enzim içermektedir) sodyum-fosfat tamponu (50 mM, pH 6.5; 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 50 mM NaH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> birbiri ile karıştırılarak pH 6.5 olacak şekilde hazırlanır) ile hazırlanmış 1 ml çözünür nişastanın (substrat solüsyonu, %2 (w/v) nişasta) eklenmesi ile belirtilen sıcaklık koşullarında 30 dk inkübe edilerek yapılmıştır. Enzim kontrolü için 1 ml hücre dışı sıvıya 1 ml sodyum-fosfat tamponu, substrat kontrolü için 1 ml substrat solüsyonuna 1 ml sodyum-fosfat tamponu, şahite ise sadece 2 ml sodyum-fosfat tamponu ilave edilmiştir. Şahit hariç diğer tüm örnekler 5 paralel olacak şekilde hazırlanmıştır.

Reaksiyonlar 3 ml 3,5-dinitrosalisilik asit (10 g dinitro salisilik asit, 2 g fenol, 0.5 g NaSO<sub>3</sub>, 200 g sodyum-potasyum tartarat, 500 ml %2'lik NaOH çözeltisi içinde çözülerek saf su ile 1000 ml'ye tamamlanır) eklenerek sonlandırılmış ve numuneler 5 dk süreyle kaynatıldıktan sonra oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Daha sonra şahit örneği ile sıfırlama yapılarak tüm örnekler spektrofotometre (Pharmacia) ile A<sub>540</sub> nm dalga boyunda ölçülmüştür [15]. Enzim+substrat ortalamalarından enzim kontrol ve substrat kontrol ortalamaları çıkarılarak enzimatik aktivite sonucu açığa çıkan glukoz miktarları spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. En yüksek değer 100 olarak kabul edilmiş ve diğer absorbans değerleri relatif olarak hesaplanmıştır. Relatif aktivite değerleri kullanılarak enzime ait ilgili grafikler oluşturulmuştur.

### 2.4. Enzimin Sıcaklık ve pH Optimum Değerlerinin Belirlenmesi

Enzim aktivitesi üzerine sıcaklık ve pH'nın etkisi, enzimlerin substrat ile 40-100°C arasında değişen farklı sıcaklık ve 5.0-11.0 arasında değişen farklı pH koşullarında 30 dk süreyle inkübasyona bırakılması ile ölçülmüştür. pH'nın enzim aktiviteleri üzerine etkisinin araştırılmasında 50 mM sodyum asetat (pH 5.0-6.0), 50 mM sodyum fosfat (pH 6.0-7.0) ve 50 mM tris (pH 7.0-11.0) solüsyonları kullanılmıştır [16]. Substrat solüsyonları (%2 w/v nişasta), her bir pH değeri için hazırlanan solüsyonlar kullanılarak ayrı ayrı olacak şekilde hazırlanmıştır.

### 2.5. Zamana Göre Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Zamana göre enzim aktivitelerinin belirlenmesinde, bakteri inokülasyonunun

başlangıcından itibaren her 24 saatte bir olmak üzere 120 saat boyunca bakteri kültüründen enzim numuneleri alınmış ve yukarıda verilen protokol uyarınca DNS yöntemine göre enzim aktivite seviyeleri belirlenerek relatif aktivite grafiği oluşturulmuştur.

### 2.6. Enzimin Sıcaklık Stabilesinin Belirlenmesi

Hücre dışı sıvılar 40-100°C sıcaklık değerleri arasında her 10°C'de bir 30 dk süreyle ön inkübasyona maruz bırakılmışlardır. Süre sonunda bu numuneler kullanılarak DNS yöntemine göre enzim aktivite değerleri belirlenerek relatif aktivite grafiği oluşturulmuştur.

### 2.7. Bazı Kimyasalların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Enzim örneklerine ayrı ayrı olacak şekilde 5'er mM MgCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, FeSO<sub>4</sub> ve EDTA kimyasalları eklenmiştir. Herhangi bir kimyasal maddenin eklenmediği örnek kontrol grubu olarak hazırlanmıştır. Tüm örneklerde DNS yöntemine göre enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Hiçbir kimyasal maddenin kullanılmadığı örnekteki enzim aktivitesi %100 kabul edilerek diğer örneklerdeki enzim aktiviteleri relatif olarak ortaya çıkarılmıştır.

### 2.8. SDS-PAGE ve Zimogram Analizleri

SDS-PAGE ve SDS-Nişasta-PAGE (zimogram) analizleri sırasıyla Laemmli [17] ve Burhan ve ark. [16]'na göre yapılmıştır. *Bacillus* sp. GA4 bakterisi LB sıvı besi yerinde 37°C'de 48 saat boyunca üretildikten sonra 4950 rpm'de 10 dk süreyle santrifüj edilerek hücreler hasat edilmiştir. Hücre dışı sıvı faza (süpernatant) 1:1 oranında %20 (w/v) TCA ilave edilmiş ve oda sıcaklığında ertesi güne kadar bekletilmiştir. Örnekler 4950 rpm'de 10 dk süreyle santrifüj edilmiş ve denatüre olmuş olan hücre dışı proteinler pelet haline getirilmiştir. Protein peleti oda sıcaklığında kurutulduktan sonra uygun hacimde (100-200 µl) tris solüsyonu (1 M, pH: 8.0) ile çözülmüştür. Protein örneklerinin üzerine 1:2 hacim (v/v) kaynatma solüsyonu (0.25 M Tris-HCL (pH 6.8), %15 w/v SDS, %50 v/v gliserol, %25 v/v β-merkaptoethanol, %0.01 w/v bromophenol blue) ilave edildikten sonra kaynar suda 3 dk süreyle bekletilmiş ve sonrasında agrilamid jelle elektroforez yapılmak üzere yüklenmiştir. Protein örnekleri toplayıcı jelde 25 mA, 60 V, ayırıcı jelde ise 40 mA, 80 V akım uygulanarak yürütülmüştür. Elektroforezden sonra, SDS-PAGE 60 dk süreyle Coomassie blue R 250 boyası (%40 (v/v) metanol,

%10 (v/v) glisyal asetik asit, %50 (v/v) saf su, %0.1 (w/v) Coomassie blue R 250) ile boyanmış, sonrasında boya içermeyen aynı solüsyon ile fazla boyanın uzaklaştırılması sağlanmıştır [16].

SDS-Nişasta-PAGE için ayırıcı jelle 3 ml nişasta solüsyonu (%2 w/v nişasta) ilave edilmiş ve jel karışımına eklenen su miktarı aynı hacimde eksiltiştir. Elektroforez sonrasında  $\alpha$ -amilaz aktivitelerinin zimogram analizi için, jel önce oda sıcaklığında 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.2), isopropanol (20% (v/v)) solüsyonu ile yıkanarak SDS uzaklaştırılmış, sonrasında ise 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.2), 5 mM  $\beta$ -merkaptöetanol ve 1 mM EDTA'dan oluşan solüsyonda +4°C'de gece boyunca bekletilerek enzimlerin renatüre olması sağlanmıştır. Ertesi gün jel 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.2) solüsyonunda 1 saat süreyle inkübe edildikten sonra, bir cam levha üzerine transfer edilerek streç film ile sarılmış ve enzimlerin bulunduğu bölgedeki nişastayı hidrolize etmesi için 37°C'de 4-5 saat süreyle inkübe edilmiştir. Jel, sonrasında iyodin solüsyonunda (%1 (w/v) iyodin, %10 (w/v) KI, %50 (v/v) metanol) 30 dk bekletilerek  $\alpha$ -amilaz aktivitelerinden sorumlu bandın ortaya çıkması sağlanmıştır [16, 18]. Markır proteinler yardımıyla enzimin moleküler ağırlığı hesaplanmıştır.

### 2.9. İzolatın Antibiyogram Testi

İzolat bakteri LB-sıvı besiyerinde gece boyunca uygun çalkalama hızında üretildikten sonra 100  $\mu$ l alınarak LB-agar plağına cam çubukla yayma yöntemiyle ekilmiştir. Farklı antibiyotikler emdirilmiş ticari antibiyotik diskleri (P10: Penicillin, TE30: Tetracycline, SH10: Spectinomycin, CN10: Gentamycin, OFX10: Travid ofloxacin, RD5: Rifampicin, S10: Streptomycin, Amp10: Ampicillin), bakteri yayılmış olan katı besi ortamına belirli aralıklarla sterilize edilmiş bir cımbız yardımıyla yerleştirilmiştir. Plaklar ters çevrilerek 37°C'ye ayarlanmış inkübatörde ertesi güne kadar inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün antibiyotik disklerinin etrafında bakteri kolonilerinin gelişip gelişmediğine bakılarak bakterinin antibiyotik dirençlilik durumu belirlenmiştir.

## 3. Bulgular ve Tartışma

### 3.1. Bulgular

#### 3.1.1. Amilolitik bakterilerin izolasyonu

Niğde ili sınırları içerisinde bulunan Çiftehan Kaplıcası su tahliye noktasından alınan toprak numunesinden  $\alpha$ -amilaz aktivitesine sahip *Bacillus* suşları izole edilmiştir. Alfa-amilaz pozitif izolatlardan aktivite zon çapı dikkate alınarak, 4 numaralı izolat (*Bacillus* sp. GA4) ileri çalışmalar için tercih edilmiştir.

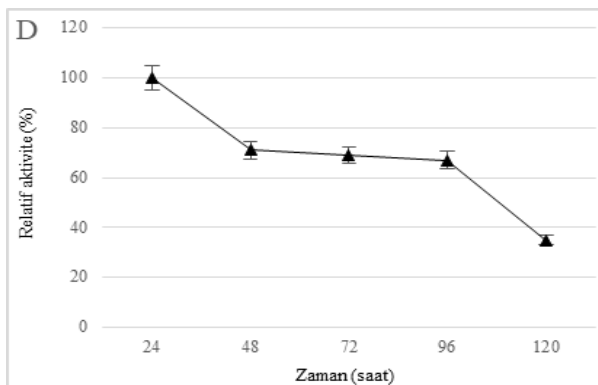
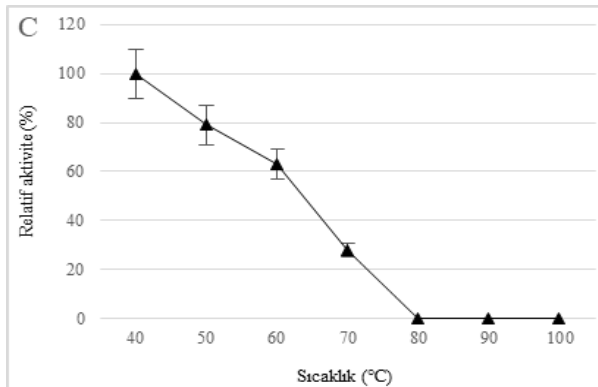
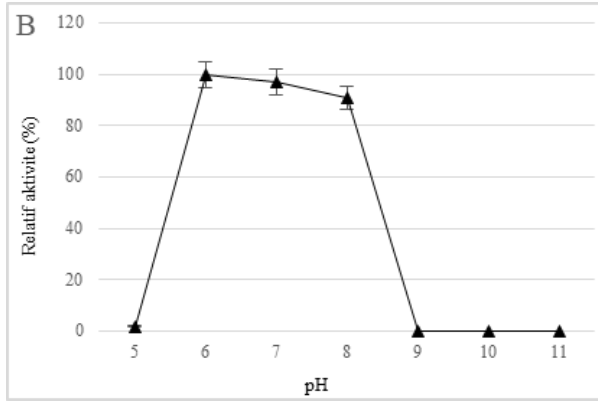
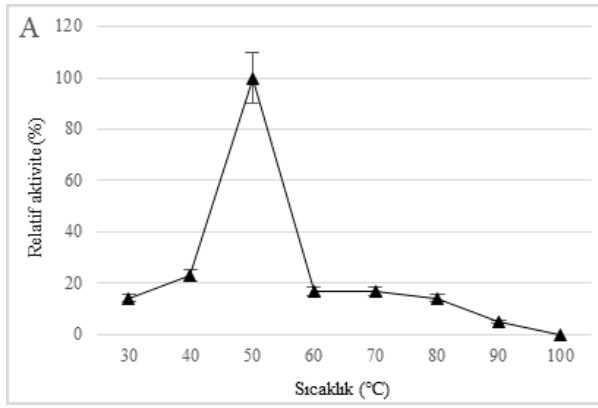
#### 3.1.2. *Bacillus* sp. GA4 $\alpha$ -amilazının bazı enzimatik özellikleri

*Bacillus* sp. GA4  $\alpha$ -amilazının optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri 50°C olarak belirlenmiştir (Şekil 1A). Enzim 30-50°C sıcaklık değerleri arasında %46, 60-90°C sıcaklık değerleri arasında %13, 30-90°C sıcaklık değerleri arasında ise %27 relatif aktivite göstermiştir. Enzim 100°C'de aktivitesinin tamamını kaybetmiştir. Enzimin optimum sıcaklık grafiği incelendiğinde, optimum sıcaklık değeri olan 50°C'den uzaklaştıkça enzim aktivitesinde hızlı düşüşler olduğu gözlenmiştir.

*Bacillus* sp. GA4  $\alpha$ -amilazının optimum aktivite gösterdiği pH değeri 6.0 olarak hesaplanmıştır (Şekil 1B). Enzim 5.0-8.0 pH değerleri arasında %73 relatif aktivite göstermiştir. Enzim pH 8.0'den sonra aktivitesinin tamamını kaybetmiştir. Enzimin optimum pH grafiği incelendiğinde, 6.0-8.0 değerleri arasında oldukça yüksek bir aktivite gösterdiği görülmüştür.

*Bacillus* sp. GA4 izolatına ait  $\alpha$ -amilaz enzimi 40°C'de 30 dk ön inkübasyon sonrasında aktivitesini tamamen korumuştur. Enzimin 50 ve 60°C sıcaklıklarda 30 dk ön inkübasyonu sonrasında sırasıyla %21 ve %37 relatif aktivite kaybı yaşamıştır. Enzim 80°C ve sonraki sıcaklık değerlerinde ön inkübasyonu sonrasında ise aktivitesinin tamamını kaybetmiştir (Şekil 1C).

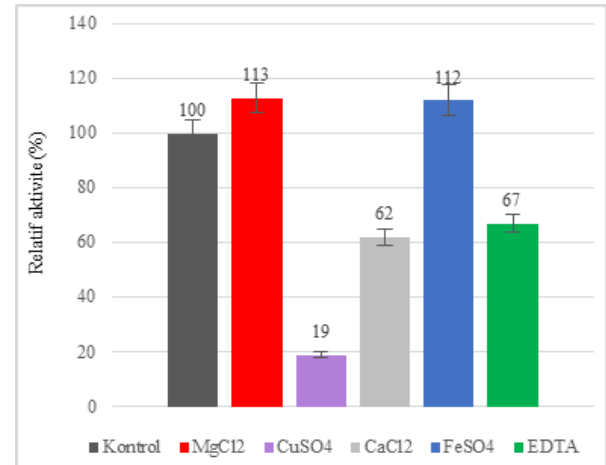
*Bacillus* sp. GA4 relatif olarak en yüksek düzeyde enzim aktivitesini inokülasyondan itibaren 12. saatte göstermiştir (Şekil 1D). Enzimin relatif aktivitesi maksimum aktivite seviyesi olan 12. saatte %100 olarak kabul edildiğinde, enzim aktivitesi 48., 72., 96. ve 120. saatlerde sırasıyla %71, %69, %67 ve %35 düzeylerinde olmuştur.



**Şekil 1.** *Bacillus* sp. GA4 izolatına ait  $\alpha$ -amilaz enziminin optimum sıcaklık (A), optimum pH (B), termal kararlılık (C), zamana (D) göre enzim aktivitesi grafikleri

Her biri 5 mM konsantrasyonunda olan MgCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, FeSO<sub>4</sub> ve EDTA kimyasal

maddelerinin *Bacillus* sp. GA4 izolatına ait  $\alpha$ -amilaz enziminin aktivitesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Hiçbir kimyasal maddenin kullanılmadığı kontrol grubunun enzim aktivite düzeyi %100 olarak kabul edilmiş ve kimyasal maddelerin kullanıldığı grupların enzim aktivite düzeyleri hesaplanarak kontrol grubuna göre relatif aktivite düzeyleri belirlenmiştir. MgCl<sub>2</sub> ve FeSO<sub>4</sub> enzim aktivitesini relatif olarak sırasıyla %13 ve %12 düzeylerinde artırmıştır. Buna karşılık CuSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub> ve EDTA ise enzim aktivitesinde sırasıyla %81, %38 ve %33 oranlarında inhibisyona sebep olmuştur (Şekil 2).



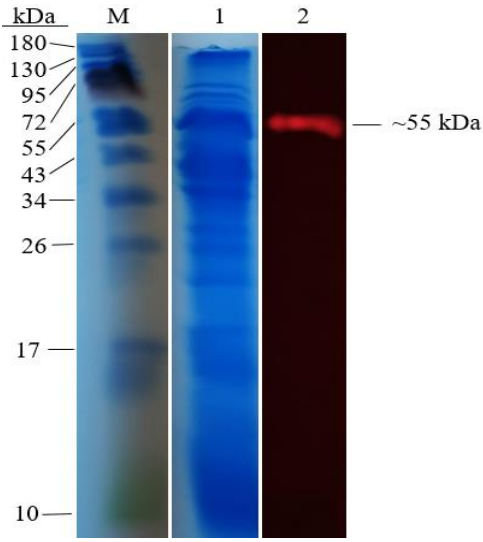
**Şekil 2.** Bazı kimyasal maddelerin *Bacillus* sp. GA4  $\alpha$ -amilaz aktivitesi üzerine etkisi

### 3.1.3. SDS-PAGE ve zımogram analizi

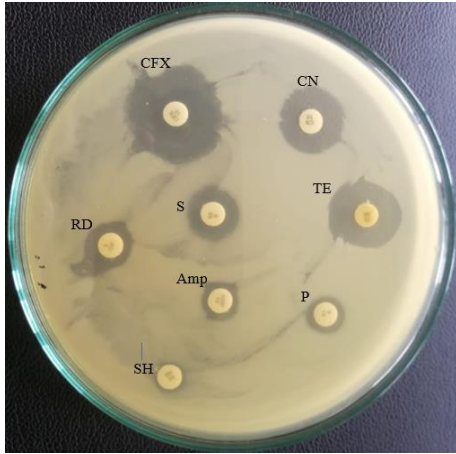
*Bacillus* sp. GA4 bakterisine ait hücre dışı toplam proteinler %12'lik SDS-PAGE'de Coomassie blue boyaması ile gösterilmiştir. Nişasta içeren SDS-PAGE'nin iyot boyaması sonucu *Bacillus* sp. GA4  $\alpha$ -amilaz enziminin moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 55 kDa olarak hesaplanmıştır (Şekil 3).

### 3.1.4. Antibiyogram testi

*Bacillus* sp. GA4 izolatının bazı antibiyotiklerine dirençlilik durumlarını belirlemek için antibiyogram testi yapılmıştır. Antibiyogram sonucunda izolat CFX (26 mm), CN (19 mm) ve TE (20 mm) antibiyotiklerine karşı dirençlilik göstermemiştir. İzolat, RD (10 mm), S (13 mm), Amp (9 mm) ve P (9 mm) antibiyotiklerine ise kısmi dirençli bulunmuştur. Buna karşılık izolat SH antibiyotigine tam dirençli bulunmuştur (Şekil 4).



**Şekil 3.** *Bacillus* sp. GA4 izolatına ait toplam proteinlerin SDS-PAGE'deki görüntüsü (1) ve zimogram analizi (2)



**Şekil 4.** *Bacillus* sp. GA4 izolatının antibiyogram plak görüntüsü (P: Penicillin, TE: Tetracycline, SH: Spectinomycin, CN: Gentamycin, OFX: Travid ofloxacin, RD: Rifampicin, S: Streptomycin, Amp: Ampicillin)

### 3.2. Tartışma

Yapılan bu çalışma ile Niğde ili sınırları içerisinde bulunan Çiftehan Kaplıcası civarından alınan toprak numunesinden  $\alpha$ -amilaz üreten bakterilerin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu bakterilerden GA4 izolatı LB-niştasta-agar plağında iyot boyaması sonucu,  $\alpha$ -amilaz aktivite zon çapı göz önünde bulundurularak ileri çalışmalar için belirlenmiştir. İzolat, bakteri sporunun aerobik ortamda çimlendirmesi sonucu *Bacillus* sp. olarak tanımlanmıştır [19].

Alfa-amilazların oldukça yoğun bir endüstriyel kullanıma sahip olmaları sebebiyle detaylı olarak çalışılmıştır. Mikroorganizmalar içinde özellikle *Bacillus* cinsi bakteriler endospor oluşturmaları, patojen olmamaları ve ürettikleri enzimleri hücre

dışına salgılamalarından dolayı oldukça popüler enzim üretici mikroorganizmalardır [20, 21].

*Bacillus* sp. GA4 bakterisi her ne kadar 55°C'de izole edilmiş olsa da 37°C'ye ayarlanmış inkübatörde daha yüksek üreme gücü göstermiştir. Bu bakımdan bakteri mezofilik olarak tanımlanabilir. Fakat bakteri tarafından üretilen  $\alpha$ -amilaz enzimi optimum aktivitesini 50°C'de göstermiştir. Mezofilik mikroorganizmalarca termostabil enzim üretimi yeni bir bulgu değildir. *B. licheniformis* ve *B. amyloliquefaciens* thermostable  $\alpha$ -amilaz üreten mezofilik bakterilerden bazılarıdır. Bu çalışmada izole edilen *Bacillus* sp. GA4 bakterisinin tür düzeyinde tanımlanması ancak 16S rDNA, Vitec 2 Compact, API 50 testlerinin en az bir tanesinin veya tercihen birkaç tanesinin birden yapılması ile ortaya konulabilir.

Endüstriyel enzim üretiminde termostabil enzimlerin mezofilik mikroorganizmalara ürettirilmesi sıklıkla başvurulan yöntemlerden birisidir. Bunun en önemli sebebi, bakteriyi mezofilik koşullarda (37°C) düşük maliyetle üretmek, daha sonra sıcaklık uygulaması ile mezofilik kökenli enzimleri denatüre ederek thermo-stable enzimi kolaylıkla saflaştırmaktır [22]. Fakat bu daha çok patojen olmayan ve GRAS (Generally Recognized as Safe, Genel Olarak Güvenli) kabul edilen mikroorganizmalara enzim üretiminden sorumlu genin klonlanması şeklinde gerçekleştirilir.

Bu çalışmada izole edilen *Bacillus* sp. GA4 bakterisinin patojenite testi yapılamamıştır. Ayrıca izolat  $\alpha$ -amilaz gibi başka termostabil enzimleri de ürettiği görülmüştür. Dolayısıyla *Bacillus* sp. GA4 izolatının kendisi tarafından termostabil  $\alpha$ -amilaz enziminin üretimi, bu açıdan bakıldığında ticari olarak avantajlı olmayabilir. Bu durumda izolatın genomunda bulunan  $\alpha$ -amilaz geninin mezofilik başka bir endüstriyel suşta klonlanması düşünülebilir. Fakat 50°C'de optimum aktivite gösteren enzimin, bu sıcaklık değerlerinden uzaklaştıkça aktivitesini hızla kaybetmesi endüstriyel kullanımını kısıtlayabilir. Ayrıca GA4  $\alpha$ -amilazı sadece pH 6.0-8.0 değerlerinde aktivite göstermiş, bunun dışında kalan pH değerlerinde ise aktivitesini tamamen kaybetmiştir. Kısıtlı bir pH aralığında aktivite göstermesi ve 70°C'den sonraki sıcaklık değerlerinde ön inkübasyon sonucu aktivitesini tamamen kaybetmesi enzimin endüstriyel kullanımını oldukça sınırlandıracaktır.

CuSO<sub>4</sub> enzimin %81 oranında aktivitesini kaybetmesine sebep olmuştur. Denenen kimyasal maddelerden sadece MgCl<sub>2</sub> ve FeSO<sub>4</sub> kısmi bir

stimülasyon etki göstermiştir. Daha geniş yelpazede kimyasal maddenin enzim üzerindeki aktivitesi incelenebilir ve enzimin ticari kullanımında bu veriler dikkate alınarak daha isabetli yorumlar ortaya konulabilir. Bununla birlikte klonlama ve bölge yönlendirmeli mutagenез teknikleri ile enzim özelliklerinde yüksek sıcaklık koşullarına dirençlilik, geniş pH aralığında yüksek aktivite, metal iyonu tercihinde değişiklikler gibi birtakım iyileştirmeler yapılabilir ve endüstriyel kullanım için daha uygun hale getirilebilir.

Zimogram analizi enzimin moleküler ağırlığına yaklaşık 55 kDa olarak ortaya koymuştur. Bakteriyel  $\alpha$ -amilazların moleküler ağırlıkları 10 ile 210 kDa arasında geniş bir aralığa sahiptir. *B. caldolyticus* 10 kDa [23], *B. subtilis* KIBGE HAS 56 kDa [24], *B. subtilis* BS5 63 kDa [25], *Chloroflexus aurantiacus* 210 kDa [26], *Acyctobacillus acidocaldarius* 160 kDa [27], *B. licheniformis* 31 ve 58 kDa [28], *Lactobacillus manihotivorans* 135 kDa [29], *Bacillus* sp. YX1 56 kDa [30] amilazları bunlardan bazılarıdır. *Bacillus* sp. GA4  $\alpha$ -amilazının moleküler ağırlığı bu aralıkta yer almakla birlikte, rapor edilmiş olan birçok  $\alpha$ -amilaz enzimi ile benzer moleküler ağırlık seviyesine sahip olmuştur.

Sonuç olarak bu çalışma kapsamında sıcaklığa dirençli  $\alpha$ -amilaz enzimi üreten mezofilik *Bacillus* sp. GA4 bakterisi izole edilmiştir. Enzimin kısmi karakterizasyon sonuçları, enzimin bu haliyle endüstriyel kullanım için çok uygun olmadığını göstermektedir. Fakat klonlama, *in vitro* mutagenез gibi moleküler genetik teknikleri ile enzimin özellikleri geliştirilebilir ve endüstriyel kullanıma uygun hale getirilebilir.

## Kaynakça

- [1] Karademir G., Karademir B. Yem katkı maddesi olarak kullanılan biyoteknolojik ürünler, Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi 2003; 43(1): 61-74.
- [2] Nelson DL., Cox MM. Lehninger principles of biochemistry, Chapter 6, W.H. Freeman and Company, 4th Ed. New York, USA: 2004.
- [3] Gümüsel F. Biyoteknoloji, genetik ve sağlık sektörü, Kocaeli Sanayii İçin Teknolojik Uzgörü Ortak Projesi 2002; 73-135.

- [4] Wiseman A. The application of enzymes in industry. In: Horwood, E. (Ed.) Handbook of enzymes biotechnology. Chichester-UK 1987; 274-373.
- [5] Gupta R., Gigras P., Mohapatra H., Goswami VK., Chauhan B. Microbial  $\alpha$ -amylases: A biotechnological perspective, Process Biochemistry 2003; 38(11): 1599-1616.
- [6] Robyt JF. Enzymes and their action on starch. In: BeMiller, J., Whistler, R. (Eds.) Starch, chemistry and technology. Academic Press, New York: 2009; 237-292.
- [7] Whitehurst RJ., Van Oort M. Enzymes in food technology. In: Whitehurst, RJ., Van Oort, M. (Eds.), 2nd Ed. Wiley-Blackwell, Chichester, England: 2009.
- [8] Leveque E., Janecek S., Haye B., Belarbi A. Thermophilic archaeal amyolytic enzymes-catalytic mechanism, substrate specificity and stability, Enzyme and Microbial Technology 2000; 26: 3-14.
- [9] Asgher M., Asad MJ., Rahman SU., Legge RL. A thermostable  $\alpha$ -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. Journal of Food Engineering 2007; 79(3): 950-955.
- [10] Hewitt CJ., Solomons GL. The production of  $\alpha$ -amylase (E.C.3.2.1.1.) by *Bacillus amyloliquefaciens*, in a complex and a totally defined synthetic culture medium. Journal of Industrial Microbiology 1996; 17(2): 96-99.
- [11] Godfrey T., West S. Introduction to industrial enzymology. In: Godfrey, T., West, S. (Eds) New York, USA: Stockton Press 1996.
- [12] Canoğulları S. Etlik piliç karma yemlerinde enzim kullanımı ve kullanım koşulları, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, Türkiye, 1999.
- [13] Lennete EH., Ballows A., Hausler JW Jr., Shadomy JH. Manuel of clinical microbiology, American Society for

- Microbiology, Washington D.C., USA: 1985; 4: 1149.
- [14] Demirhan S. Production, purification, and characterization of  $\alpha$ -amylase by *Bacillus subtilis* and its mutant derivatives, Turkish Journal of Biology 2011; 35: 705-712.
- [15] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, Analytical Chemistry 1959; 426-428.
- [16] Burhan AI., Nisa U., Gokhan C., Omer C., Ashabil A., Osman G. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6, Process Biochemistry 2003; 38(10): 1397-1403.
- [17] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4, Nature 1970; 227: 680-685.
- [18] Saul DJ., Williams LC., Grayling RA., Chamley LW., Love DR., Bergquist PL. *celB*, a gene coding for a bifunctional cellulase from the extreme thermophile "*Caldocellum saccharolyticum*", Applied and Environmental Microbiology 1990; 56(10): 3117-3124.
- [19] Remize F. Spore-forming bacteria, The microbiological quality of food. In: Bevilacqua, A., Corbo, M.R., Sinigaglia, M. (Eds) Elsevier Ltd., Woodhead Publishing, Chennai, India, 2017.
- [20] Harwood CR. *Bacillus subtilis* and its relatives: Molecular biological and industrial workhorses, Elsevier Science Publishers Ltd. UK 1992; 10: 247-256.
- [21] Vehmaanperä J. Development of *Bacillus* strains for industrial enzyme production by gene technology, Academic Dissertation in General Microbiology, PhD Thesis, Helsinki-Finland, 1990.
- [22] Özcan BD. Studies on cloning of thermostable amylase genes, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, Türkiye, 2005.
- [23] Grootegoed JA., Lauwers AM., Heinen W. Separation and partial purification of extracellular amylase and protease from *Bacillus caldolyticus*, Archives of Microbiology 1973; 90: 223.
- [24] Bano S., Qader SAU., Aman A., Syed MN., Azhar A. Purification and characterization of novel  $\alpha$ -Amylase from *Bacillus subtilis* KIBGE HAS, AAPS Pharm Sci Tech 2011; 12(1): 255-261.
- [25] Femi-Ola TO., Olowe BM. Characterization of alpha-amylase from *Bacillus subtilis* BS5 isolated from *Amiteemes evuncifer* Silvestri, Research Journal of Microbiology 2011; 6(2): 140-146.
- [26] Ratanakhanokchai K., Kaneko J., Kamio Y., Izaki K. Purification and properties of a maltotetraose and maltotriose producing amylase from *Chloroflexus aurantiacus*, Applied and Environmental Microbiology 1992; 58: 2490-2494.
- [27] Matzke J., Schwermann B., Baker EP. Acidostable and acidophilic proteins: the example of the  $\alpha$ -amylase from *Alicyclobacillus acidocaldarius*, Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology 1997; 118: 475-479.
- [28] Bozic N., Ruiz J., Lopez-Santin J., Vujcic V. Production and properties of the highly efficient raw starch digesting  $\alpha$ -amylase from a *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a, Biochemical Engineering Journal 2011; 53: 203-209.
- [29] Aguilar GJ., Morlon-Guyot B., Trejo-Aguilar C., Guyot JP. Purification and characterization of an extracellular  $\alpha$ -amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010T an amylolytic lactic acid bacterium, Enzyme and Microbial Technology 2000; 27: 406-413.
- [30] Liu XD., Xu Y. A novel raw starch digesting  $\alpha$ -amylase from a newly isolated *Bacillus* sp. YX-1: Purification and characterization, Bioresource Technology 2008; 99: 4315-4320.