

Bingöl Sıcak Su Kaplıcalarından İzole Edilen Bakterilerin Tanımlanması, Proteaz ve Amilaz Enzimlerinin Karakterizasyonu

Zindar Aslan¹, Fatma Matpan Bekler^{1*}, Kemal Güven¹

¹ Dicle Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Diyarbakır, Türkiye

zindaraslan47@hotmail.com^{id}, *fmatpan@dicle.edu.tr^{id}, kemalg@dicle.edu.tr^{id}

Makale gönderme tarihi: 18.02.2021, Makale kabul tarihi: 08.07.2021

Öz

Bingöl İli Binkap sıcak su kaynaklarından izole edilen bakteriler karakterize edilerek, bunlara ait endüstriyel alanda önem arz eden proteaz ve amilaz gibi enzimleri üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmada su ve toprak örneklerinden iki bakteri suşu izole edildi. Bu bakterilerin çeşitli biyokimyasal testleri ile morfolojik ve fizyolojik analizleri yapıldı. İzole edilen 4NK bakterisinin çubuk şeklinde Gram pozitif olduğu, 5NK bakterisinin de Gram pozitif ve çubuk şeklinde olduğu belirlenmiştir. İzole edilmiş bu iki bakteri için optimum pH değerinin 6.0 olduğu tespit edildi. Optimum üreme sıcaklıkları ise sırasıyla 40 ve 45 °C olarak belirlenmiştir. İzole edilen bakterilerin optimum koşulları belirlendikten sonra bunların ürettikleri enzimlerin optimum koşulları belirlendi. Buna göre 4NK bakterisinin proteaz ve amilaz enzimlerini üretim açısından optimum süreleri sırasıyla 18. saatte (195.80 U mg⁻¹) ve 15. saatte (428.33 U mg⁻¹) olduğu belirlenmiştir. Proteaz ve amilaz enzimlerinin optimum pH'sı 8.0, optimum sıcaklıkları sırasıyla 40-50 °C ve 50-60 °C olarak bulunmuştur. Ayrıca, 5NK bakteri varyetesi için proteaz ve amilaz enzimlerini üretim açısından optimum süresi, proteaz için 260.93 U mg⁻¹ ve amilaz için 380.58 U mg⁻¹ olmak üzere 24. saat olarak belirlenmiştir. Proteaz ve amilaz enzimlerinin optimum pH'ları 8.0, optimum sıcaklıkları 50 °C olarak bulunmuştur. İzolasyonu yapılan 4NK ve 5NK bakterilerinin 16S rRNA dizi analizi yapılmış, buna göre 4NK bakterisinin *Bacillus subtilis* türüne yakın, 5NK bakterisinin ise *Bacillus paralicheniformis* türüne filogenetik olarak yakın olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Amilaz, proteaz, sıcak su kaynakları, enzim, *Bacillus*

Identification of Bacteria from Bingöl Hot Springs and Characterization of Protease and Amylase

Abstract

Bacteria isolated from Binkap hot spring from Bingöl Province were characterised and studies were carried out on their industrially important enzymes such as protease and amylase. In this study, two bacteria were isolated in the water and soil samples. Various morphological, physiological and biochemical tests of these bacteria were applied. It was determined that the isolated 4NK bacteria were Gram positive in the form of rods, and the 5NK bacteria were Gram positive and rod shaped. It was determined that the optimum pH value for both isolated bacteria was 6.0. Optimum growth temperatures for 4NK and 5NK were determined as 40 °C and 45 °C, respectively. After determination of the optimum conditions for the isolated bacteria, the optimum conditions of the enzymes produced were also detected. Accordingly, the optimum production times of protease and amylase enzymes by 4NK bacteria were determined as 18th hour (195.80 U mg⁻¹) and 15th hour (428. U mg⁻¹), respectively. The optimum pH of protease and amylase enzymes were found to be 8.0, while optimum temperatures were as 40-50 °C and 50-60 °C, respectively. The optimum production time of protease and amylase enzymes by 5NK bacteria was determined to be 24 hours with activities of 260.93 U mg⁻¹ for protease and 380.58 U mg⁻¹ for amylase. The optimum pH of protease and amylase enzymes was determined as 8.0 and their optimum temperature as 50 °C. 16S rRNA sequence analysis of isolated 4NK and 5NK bacteria was performed and it was determined 4NK bacteria were close to *Bacillus subtilis* and 5NK bacteria were phylogenetically close to *Bacillus paralicheniformis*.

Keywords: Amylase, protease, enzyme, hot spring, *Bacillus*

GİRİŞ

Mikroorganizmalar, hemen hemen bütün doğal habitatlardan ve diğer pek çok kaynaktan izole edilebilirler. Yaygın olarak toprakta saprofit olarak ve bitki döküntülerinin olduğu yerlerde bulunurlar fakat kutup bölgeleri, sıcak su kaynakları, kaplıcalar, tatlı su, deniz suyu, çöl toprakları da bu cinslerin yaşam alanlarıdır (Maugeri ve ark., 2001; Yılmaz, 2002; Özşahin, 2006). *Bacillus* türleri çeşitli kompleks substratlara karşı aktivite gösteren çok sayıda ve çeşitli hidrolitik enzimler üretmekte ve salgılamaktadırlar. Bu nedenle *Bacillus* cinsindeki organizmalar, endüstriyel alanda α -amilaz, proteaz, glukonaz, glukoz izomeraz ve endonükleaz gibi enzimlerin üretiminde yaygın şekilde kullanılmaktadırlar (Uhlig, 1998).

Bakterilerin salgıladığı ve biyoteknolojik olarak önemi olan enzimlerden biri amilazlardır. Yapılan çalışmalarda ticari olarak ilk kullanılan enzimin amilaz olduğu belirlenmiştir (Gül Güven, 2011). Amilaz enzimi nişastayı moleküllerine parçalayan kuvvetli bir enzimdir. Nişasta molekülünü parçalamasıyla maltoz ve dekstrin molekülleri meydana gelir. Endüstriyel alanda özellikle *Bacillus* cinsi bakteriler tarafından salgılanan amilaz enzimi kullanılır. Bu enzim özellikle gıda endüstrisinde ekmek ve unlu mamullerde kabarma, yumuşak ürün elde etmede, ekmeğin tat ve kalitesini düzeltici etkilerde bulunur. Tekstil endüstrisinde ipliklerin sağlam olması için kullanılır ve kâğıt endüstrisinde kâğıdın nişasta ile kaplanması ile kâğıdı hasarlara karşı korur, kâğıdın sertliğini, direncini ve kalitesini de artırmaktadır. Deterjan endüstrisinde ise; kirliliğin temizlenmesi amacıyla kullanılır. Amilazlar ayrıca tıbbi alanda da ilaç sanayinde kullanılmaktadır (Kandra, 2003).

Proteaz canlılarda bulunması gereken, büyüme ve çoğalma için önemli olan bir enzimdir. Doğada bitkisel, hayvansal ve bakteriyel kökenli olabilir. Bunlar arasında en etkili olanlar bakterilerden elde edilen proteazlardır. Proteazlar optimum pH aralığına göre nötr, alkali ve asidik proteazlar olarak gruplandırılır. Son zamanlarda araştırmacılar bu özelliğinden dolayı endüstriyel alanlarda kullanılmak üzere uygun proteazları üreten mikroorganizmalar üzerinde çalışmaktadır (Özşahin, 2006; Najafi ve Sariri, 2006). *Bacillus* 'lardan elde edilen proteazlar endüstrinin çeşitli alanlarında kullanılmaktadır. Bunlardan alkali proteazlar özellikle deterjan sanayisinde kullanılmaktadır. Ayrıca etlerin

yumuşatılması, lekelerin giderilmesi, DNA teknolojisinde kullanılmaktadır (Özşahin, 2006).

Bu çalışmada, Bingöl sıcak su kaplıcalarından alınan su ve çamur örneğinden bakteri izolasyon işlemi yapıp bakterilerin biyokimyasal, fizyolojik, morfolojik ve genetik özelliklerinin belirlenmesi üzerine çalışılmıştır. Tanımlama sonucunda, bu elde edilen izolatların *Bacillus subtilis* ve *Bacillus paralicheniformis* türüne ait varyeteler olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, amilaz ve proteaz enzimlerinin üretimi ve enzim karakterizasyonu çalışması yapılmıştır.

MATERYAL VE METOT

İzolasyon İşlemi ve Saf Kültür Bakteri Üretimi

Bu çalışmada Bingöl ilinin Iısu beldesinin Binkap kaplıcalarından bakteri izolasyonu yapıldı. Sıcak su kaynağından alınan su ve çamur örneklerinin pH ve sıcaklığı ölçülerek örnekler 50 mL'lik steril şişelerde aseptik ortam koşullarında saklanarak laboratuvar ortamına taşındı. Çamur örneklerinden 10 gr alınarak 90 mL steril su ile karıştırılarak 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 'lik dilüsyonlar yapılarak 80 °C 'de 10 dakika boyunca kaynatıldı. Örneklerle 1 mL alınarak Nutrient Agar (NA)'a aktarıldı ve 55 °C'de 3-6 gün boyunca inkübe edildi. Bu süre de bekletilen mikroorganizmalardan spor oluşturabilenler canlılıklarını korurken, spor oluşturamayanlar canlılıklarını yitirir. Elde edilen karışık kültürlerden farklı morfolojik özelliklere sahip koloniler seçilerek saf kültür elde etmek için NA ortamına aktarıldı ve 55 °C'de gelişen kolonilerin tanımlanmasına yönelik testler yapıldı.

Mikroorganizmaların Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Karakterizasyonu

Elde edilen saf kültürlerdeki kolonilerin şekil, renk, boyut, yüzey ve kenar özellikleri incelendi. Hücre morfolojileri Gram boyama ve spor boyama yapılarak ışık mikroskobu yardımıyla incelendi. Seçilen izolatın biyokimyasal özellikleri katalaz, üreaz aktivitesi, jelatin, nişasta, kazein, kullanımı test edildi. Bütün fizyolojik, biyokimyasal testler ikili olarak üç defa tekrar edildi.

Farklı morfolojik özelliklere sahip izolatlar kodlar verilerek fizyolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla optimum üretim koşulları belirlendi. Mikroorganizmaların gelişimi üzerine inkübasyon süresinin etkisinin araştırılması için elde edilen

Research article/Araştırma Makalesi
 DOI:10.29132/ijpas.882322

suşlardan 1 mL ayrı ayrı alınarak 100 mL Nutrient Broth (NB) sıvı besiyerine inoküle edildi ve 160 rpm'de 55 °C' de çalkalayıcı su banyosunda 3-48 arasında inkübe edildi ve her 3 saatte bir örnek alınarak 600 nm' de spektrofotometrede absorbansları ölçüldü.

Sıcaklığın bakteri üremesine etkisini belirlemek için NB sıvı besiyerine izolatlardan ekim yapılarak farklı sıcaklıklarda (20-55 °C) optimum üreme zamanında çalkalayıcı su banyosunda inkübe edildi. Optimum üreme zamanı sonunda örneklerden 1 mL alınarak 600 nm'de spektrofotometrede absorbansları ölçüldü.

Mikroorganizmaların gelişiminde pH'nın etkisini belirlemek için 100 mL NB sıvı besiyerleri farklı pH'da (4.0-11.0) hazırlanarak izolatlardan 1 mL alınarak ayrı ayrı ekim yapıldı. İzolasyonu yapılan mikroorganizmalar optimum sıcaklıkta ve optimum üreme zamanında 160 rpm' de inkübasyon için çalkalayıcı su banyosunda inkübe edildi. Daha sonra optimum pH'nın tespiti için spektrofotometrede 600 nm'de absorbans ölçümleri yapıldı.

Bakterilerin tanımlanmasında kullanılan diğer bir yöntem olan antibiyotik duyarlılığı disk difüzyon yöntemine göre test edildi. İzole edilen bakteriler NB sıvı besiyerinde kültüre edildi. Gecelik kültürü hazırlanan bakteriler 5 ml steril %0.9 tuz çözeltisi kullanılarak toplandı, spektrofotometre kullanılarak absorbansı 0.5 McFarland bulanıklık standardına ayarlandı. Bakteriler ayrı ayrı NA besiyerine inoküle edildi ve ortam yüzeyinin kuruması için 3-5 dk. bekletildi. Fucidic acid (10 µg), Chloramphenicol (30 µg), Kanamycin (5 µg), Novobiocin (5 µg), Penicillin (2, 10 units), Nystatin (100 units), Gentamicin (10 µg), Streptomycin (10 µg), Tilmecocin (15 µg), Bacitracin (10 unit), Ampicillin (10 µg), Lincomycin (15 µg), Tetracyclin (30 µg), Neomycin (10 µg) antibiyotik diskleri kültür yayılan NA içeren petriyelerinin üzerine belirli aralıklarla bırakıldı 2 gün süreyle inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda antibiyotik disklerinin etrafında oluşan inhibisyon zonları mm olarak ölçülerek antibiyotik duyarlılıkları değerlendirildi. Tüm deneyler üç tekrarlı olacak şekilde yapıldı ve standart sapmalar elde edilen verilerin aritmetik ortalamasından farklarının karelerinin toplamının verilerin eleman sayısının bir eksiğine bölümünün karekökü şeklinde Microsoft Excel kullanılarak hesaplanmıştır.

16S rRNA Gen Dizi Analizi

Bakterilerin 16S rRNA dizi analizi için izole edilen bakterilerin örnekleri Ankara Üniversitesi Gen Araştırma ve Biyoteknoloji Laboratuvarı REFGEN'e gönderilmiştir. Elde edilen diziler bir BLAST arama aracı [NCBI: Biyoteknoloji Ulusal Merkezi (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)] veritabanı kullanılarak karşılaştırıldı. İzole suşunun 16SrRNA dizi çoklu sekans hizalama programı kullanılarak NCBI veritabanından dizi homolojisi gösteren bir referans dizisi ile hizalandı. İzolat 16S rRNA dizi verilerine dayanarak EzTaxon sunucusu (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>; Kim ve ark., 2012) kullanılarak tanımlandı.

α -Amilaz aktivitesi

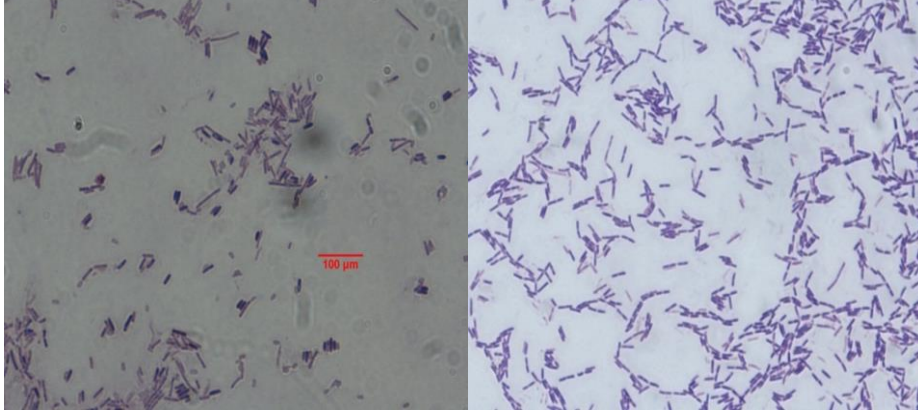
Bakterilerin enzim aktivite tayinlerinin yapılması için NB sıvı besi yeri hazırlandı. Daha önce kültürü hazırlanan bakterilerden öze yardımıyla sıvı besi yerine ekim yapıldı. Bakterilerin optimum üreme süresi ve sıcaklığında 24 saat bekletildikten sonra besiyeri 10 000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant enzim kaynağı olarak kullanıldı. α -Amilaz aktivitesi Bernfeld (1955)'e göre yapıldı. Bu yönteme göre 100 µL enzim kaynağı olarak kullanılan süpernatant ve 200 µL % 0.5'lik nişasta çözeltisi (pH 7.0) 50 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Süre sonunda reaksiyonu durdurmak için, 400 µL 3,5 dinitro salisilik asit (DNS) ilave edilerek 5 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Daha sonra 3 mL distile su ile seyreltme yapılarak spektrofotometre ile 489 nm'de absorbans ölçüldü. α -Amilaz için Ünite Enzim: 1 µmol nişastayı 30 dakikada maltoz birimlerine parçalayan α -amilaz enzim miktarıdır (U mg⁻¹).

Proteaz Aktivitesi

Proteaz aktivitesi Leighton ve ark. (1973) göre yapıldı. Bu yönteme göre 100 µL enzim kaynağı olarak kullanılan süpernatant ve substrat olarak 500 µL azokazein kullanılarak 50 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Süre sonunda reaksiyonu durdurmak için, 2 mL trikloroasetikasit (TCA) ilave edilerek 4 °C'de 15 dakika bekletildi. Daha sonra santrifüj edildi ve süpernatanttan 400 µL süzüntü alındı. Alınan üst sıvının üzerine 800 µL 1,8 M NaOH eklendi ve 420 nm'de absorbansı ölçüldü. Proteaz için Ünite Enzim: 1 µmol azokazeini 30 dakikada aminoasitlerine parçalayan proteaz enzim miktarıdır (U mg⁻¹). Hem

Research article/Araştırma Makalesi
DOI:10.29132/ijpas.882322

α -amilaz hem de proteaz aktivitesinin belirlenmesinde protein miktar tayini Lowry ve ark



Şekil 1a. 4NK'nın gram boyaması 1b. 5NK'nın gram boyaması

(1951) göre yapıldı. Tüm deneyler üç tekrarlı olacak şekilde yapıldı.

Proteaz ve Amilaz Enzimleri Aktivitesine Zamanın Etkisi

100 mL NB sıvı besiyerinden (pH 7.0) her birine 1'er mL bakteri ekimi yapıldı ve 3-48 saat süreyle inkübasyona bırakıldı ve her 3 saatte bir örnek alınarak 10 000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlarda Bernfeld (1955) yöntemine göre α -amilaz aktivite tayini ve Leighton ve ark. (1973) göre proteaz enzimi aktivitesi belirlendi.

Proteaz ve Amilaz Aktivitesine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi

Enzimlerin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini incelemek için NB sıvı besi yerinde optimum üretim sürelerinde üretilen bakteriler santrifüj edilip süpernatant alındı ve farklı sıcaklıklarda (20-60 °C) inkübe edilerek enzim aktiviteleri belirlendi.

Proteaz ve Amilaz Aktivitesine pH' nın Etkisinin İncelenmesi

Proteaz ve amilaz aktivitesine pH'nın etkisini ölçmek için NB sıvı besi yerinde optimum üretim süresinde üretilen bakterilerin santrifüjü sonrasında elde edilen süpernatant alındı. Proteaz ve amilaz aktivitesini belirlemede kullanılan substratlar (sırasıyla azokazein ve nişasta) farklı pH tamponlarında [0.1 M sitrik asit (pH 4.0, 5.0, ve 6.0), 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0, 8.0 ve 9.0) ve 0.1 M

karbonat/bikarbonat (pH 10.0 ve 11.0) hazırlandı. Farklı tamponlarda hazırlanan substratlar kullanılarak enzim aktiviteleri belirlendi.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Bakterilerin İzolasyonu

Bingöl'ün Ilıcalar ilçesinin sıcak su kaynaklarından alınan su örneklerinden bakteri izolasyonu yapılarak elde edilen izolatlar 1NK (normal katıdan), 2NK, 3NK, 4NK ve 5NK ve 6D kodu verilerek gliserol içeren cryotüplerde -80 °C'de muhafaza edildi. Bunlardan en iyi üreme gösteren 4NK ve 5NK suşları morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve 16S rRNA analizlerine göre karakterize edildi. Ülkemizde çok sayıda sıcak su kaynağı bulunmaktadır. Bu çalışma, Bingöl ili Binkap kaplıcası termofilik bakterilerin çeşitliliğinin belirlenmesi açısından önemlidir.

4NK ve 5NK izolatlarının, koloni morfolojisi incelendiğinde yuvarlak, mat ve krem olduğu, ışık mikroskopuyla yapılan hücre morfolojisi incelemelerine göre Gram pozitif, çubuk şeklinde, hareketli ve sporlu olduğu belirlendi (Şekil 1a, Şekil 1b). Sıcak su kaynaklarından bakteri izolasyonu ile ilgili yapılan tanımlamalarda genellikle çubuk şekilli, Gram pozitif, hareketli ve sporlu bakteriler oldukları belirtilmiştir (Kevbrin ve ark., 2005; Poli ve ark., 2006; Derekova ve ark., 2007).

Tablo 1: Morfolojik ve fizyo-biyokimyasal özellikler

	4NK	5NK
Hücre Şekli	Çubuk	Çubuk
Gram Boyama	(+)	(+)
Sıcaklık (°C)	25-55	25-55
pH	5.0-9.0	5.0-10.0
Katalaz Aktivitesi	(+)	(+)
Oksidaz aktivitesi	(+)	(+)
Üreaz Aktivitesi	(+)	(+)
Sitrat az aktivitesi	(+)	(+)
Jelatin Hidrolizi	(+)	(+)
Kazein Hidrolizi	(+)	(+)
Nişasta Hidrolizi	(+)	(+)

(+): pozitif, (-): negatif

Yapılan biyokimyasal testlerin sonuçlarına göre; 4NK ve 5NK suşlarının katalaz aktivitesi, oksidaz, üreaz, sitrat az, jelatin, kazein ve nişasta hidrolizi pozitif olduğu Tablo 1’de görülmektedir.

Tablo 2. 4NK ve 5NK suşlarının antibiyogram sonuçları

Antibiyotik adı	4NK (zon çapı mm)	5NK (zon çapı mm)
Lincomycin (15 µg)	19±1.4	10±2.8
Penicilin (2 unit)	6±2.8	9±1.4
Bacitracin (10 unit)	11.5±0.7	9.5±2.1
Ampicillin (10 µg)	16±1.4	13±1.4
Tilmecosin (15 µg)	20.5±3.5	14.5±0.7
Chloramphenicol (30 µg)	22.5±0.7	12.5±0.7
Kanamycin (5 µg)	13.5±0.7	28±2.8
Streptomycin (10 µg)	15.5±0.7	31±1.4
Novobiocin (5 µg)	11.5±0.7	14±1.4
Gentamicin (10 µg)	14±0.1	28±7.1
Fusidic Asid (10 µg)	17±1.4	13.5±2.1
Tetracycline (10 µg)	16±1.4	26±1.4
Neomycin (10 µg)	11.5±0.7	20±2.8
Penicilin (10 unit)	11.5±0.7	9±1.4
Nystatin (100 µg)	0	11.5±0.7

Bakterilerin Antibiyotiklere Karşı Duyarlılığı

Research article/Araştırma Makalesi
DOI:10.29132/ijpas.882322

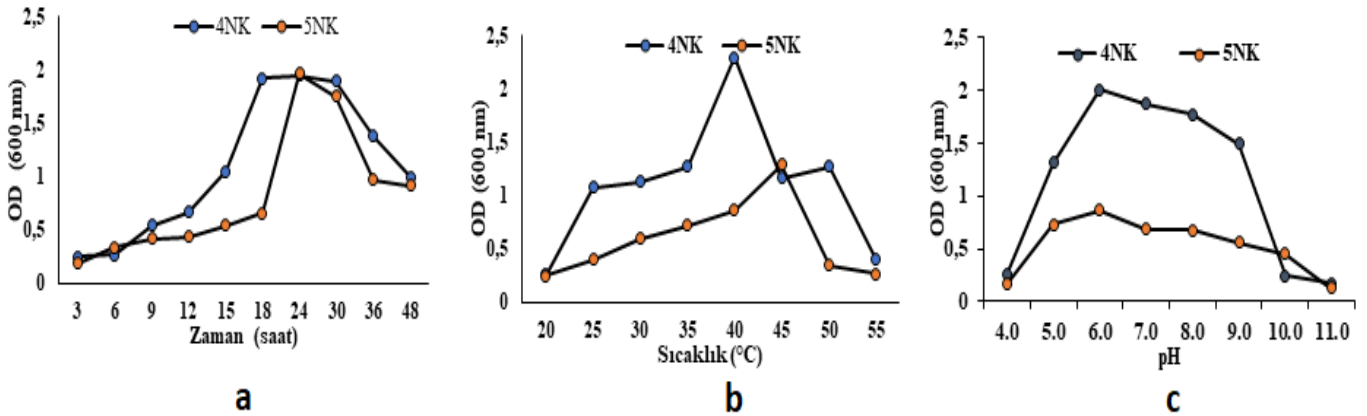
Tablo 2’de elde edilen izolatların antibiyogram sonuçları görülmektedir. İzole edilen 4NK ve 5NK bakterilerinin antibiyogram sonuçlarına göre; 4NK izolatının Lincomycin, Tilmecocin, Chloramphenicol, Ampicilin, Gentamicin, Tetracyclin, Fucidic acid, ve Streptomycin antibiyotiklerine duyarlı olduğu, Bacitracin, Penicilin (10 unit), Neomycin ve Novobiocin antibiyotiklerine yarı duyarlı olduğu, Peniciline (2 unit) karşı az duyarlı olduğu ve Nystatin antibiyotiğine karşı dirençli olduğu belirlenmiştir.

5NK izolatının antibiyogram sonuçlarına göre; Kanamycin, Novobiocin, Gentamicin, Fucidic acid ve Neomycin, antibiyotiklerine duyarlı olduğu, Ampicillin, Tilmecocin, Chloramphenicol, Streptomycin, Tetracyclin ve Nystatin antibiyotiklerine yarı duyarlı olduğu, Lincomycin, Penicillin (2, 10 unit), Bacitracin antibiyotiklerine az duyarlı olduğu belirlenmiştir. Elde ettiğimiz 4NK ve 5NK suşlarının zamana bağlı üreme grafiğine bakıldığında (Şekil 2a) maksimum üremenin 24. saatte elde edildiği görülmektedir. Kısa sürede üreme

göstermeleri zamandan tasarruf sağlanması açısından biyoteknolojik uygulamalar için önemlidir.

Sıcaklığın izole edilen suşlar üzerinde üremelerine etkisine bakıldığında 4NK susu 25-50 °C arasında (optimum 40 °C), 5NK susu 20-55 °C arasında (optimum 45 °C) üreme gösterdiği ve (Şekil 2b). Her iki suşun da ılımlı termofil olduğu görülmektedir. Dunlap ve ark. (2015) izole ettikleri *B. paralicheniformis*’in üreme koşullarını 15–60 °C ve pH 6.0–11.0 (optimum pH 7.0–8.0) olarak belirlemişlerdir. Poli ve ark. (2006) izole ettikleri bakterilerin termofilik olduğunu ve bakterilerin büyüme sıcaklığını ve pH’sını sırasıyla 45-55 °C ve pH 5.0-6.5 olarak bulmuşlardır.

Şekil 2c’de görüldüğü gibi 4NK susu pH 5.0-9.0 arasında (optimum 6.0), 5NK susu pH 5.0-10.0 arasında (optimum 6.0) gelişme göstermektedir (Şekil 2c). Her iki suşun da geniş pH aralığında üreme göstermeleri biyoteknolojik alanlarda avantaj sağlamaktadır.



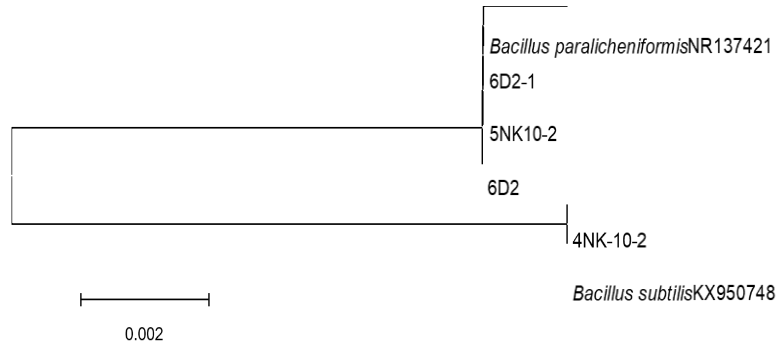
Şekil 2a. 4NK ve 5NK suşlarının zamana bağlı üreme grafiği, 2b. 4NK ve 5NK suşlarının sıcaklığa bağlı üreme grafiği, 2c. 4NK ve 5NK suşlarının pH’ya bağlı üreme grafiği

16S rRNA Dizi Analizi

16S rRNA dizi analizi sonuçlarına göre elde edilen izolatlardan 4NK suşunun *Bacillaceae* familyasına ait *B. subtilis*, 5NK suşunun ise *B. paralicheniformis* türene yakın olduğu belirlenmiştir (Şekil 3). *B. paralicheniformis* Gram (+), fakültatif anaerob, hareketli ve endospor oluşturan *B. licheniformis* ve *B. sonorensis*’e filogenetik olarak yakın olan bir türdür.

B. paralicheniformis biyoteknoloji endüstrisinde enzimler, antibiyotikler, biyokimyasallar ve tüketici ürünleri üretmek için kullanılmaktadır (Rey ve ark., 2004; Dunlap ve ark., 2015; Du ve ark. 2019). Bu çalışmada izole edilen 5NK suşunun *B. paralicheniformis*’e benzerlik göstermesi bu suşun biyoteknolojik alanlarda kullanılma potansiyelini göstermektedir.

Research article/Araştırma Makalesi
DOI:10.29132/ijpas.882322



Şekil 3: 16S rRNA analizine göre filogenetik ağaç

Proteaz ve Amilaz Enzimleri Aktivitesine Zamanın Etkisi

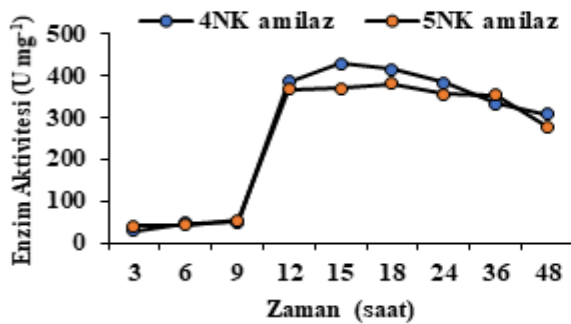
Şekil 4a'da görüldüğü gibi 4NK ve 5NK suşlarının amilaz aktivitesi 9. saatten itibaren hızla artmış 4NK için amilaz aktivitesi 15. saatte (428.33 U mg^{-1}), 5NK için 18. Saatte (380.58 U mg^{-1}) maksimum değere ulaşmış, daha sonra yavaş yavaş azalmıştır.

Şekil 4b'de görüldüğü gibi proteaz aktivitesi 4NK ve 5NK suşları için 3. saatten itibaren yavaş yavaş artmış 4NK için 195.80 U mg^{-1} ve 5NK için 260.93 U mg^{-1} olarak 24. saatte maksimum değere

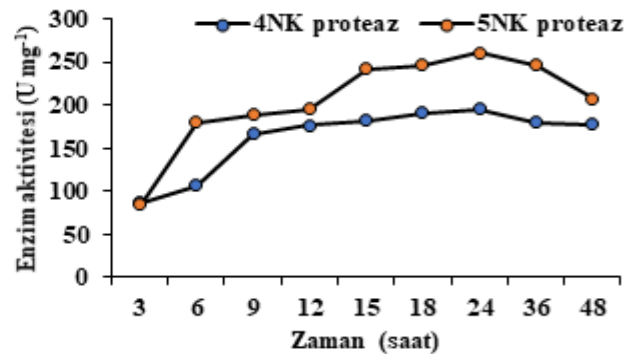
ulaşmıştır. 24. Saatten sonra proteaz aktivitesi azalmaya başlamıştır.

Her iki suş için de hem amilaz hem de proteaz üretimi maksimum üretim gerçekleştikten sonra azalmaktadır. Her iki suş için de amilaz ve proteaz enzimlerinin sentezinin artışı bakteri üreme fazlarından logaritmik fazın sonuna denk geldiği görülmektedir.

Enzim üretiminin, besiyerindeki diğer bileşenlerle etkileşime girmesi, pH'ın değişmesi ve mikroorganizmaya yararlı besinlerin tüketilmesi nedeniyle azaldığı düşünülmektedir (Matpan Bekler ve ark., 2020).



a



b

Şekil 4a. 4NK ve 5NK suşlarının a-Amilaz aktivitesine zamanın etkisi, 4b. 4NK ve 5NK suşlarının proteaz aktivitesine zamanın etkisi

Proteaz ve Amilaz Enzim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi

Şekil 5a'da görüldüğü gibi 4NK ve 5NK suşlarının sıcaklığa bağlı amilaz aktivitesi $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de artmaya başlamış, 4NK suşu için $40\text{-}50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de, 5NK

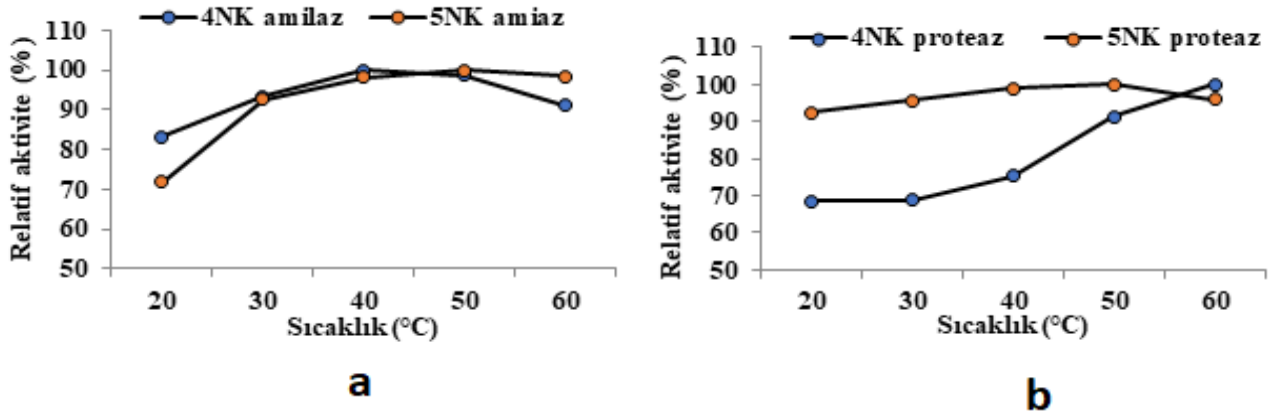
suşu için $50\text{-}60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de optimum değere ulaşmış ve bundan sonra ise azalmaya başlamıştır. Kıran ve Çömlekçioğlu (2003), termofilik *Bacillus* sp. K-12'nin amilaz üretimi üzerinde yaptıkları çalışmada enzimin optimum sıcaklığının $42 \text{ }^{\circ}\text{C}$ olarak bulunmuşlardır. Raul ve ark. (2014), maksimum α -

Research article/Araştırma Makalesi
DOI:10.29132/ijpas.882322

amilaz aktivitesini 40 °C’de, Cordeiro ve ark. (2002) 50 °C’de bulmuşlardır. Sonuçlar incelendiğinde, enzimin özellikle fermantasyon sonucu enzimleri inaktif hale getirmek için yapılan pastörizasyon için gerekli sıcaklıklarda da aktivite gösterebildiğinden (Stamford ve ark., 2001) gıda işleme ve geleneksel

bira üretimi gibi çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılabilecek özellikte olduğu görülmektedir.

Şekil 5b’de görüldüğü gibi proteaz aktivitesi ise 4NK suşunda 30 °C’den itibaren 5NK suşunda 20 °C’de artmaya başlamış, 4NK suşu için 60 °C’de, 5NK suşu için 50 °C’de optimum değere ulaşmıştır.



Şekil 5a. 4NK ve 5NK suşlarının α -Amilaz aktivitesine sıcaklığın etkisi, 5b. 4NK ve 5NK suşlarının proteaz aktivitesine sıcaklığın etkisi

Gupta ve ark. (2002) *Bacillus* türleriyle yaptıkları çalışmada maksimum proteaz aktivitesini 60 °C, Arulmani ve ark. (2007), *B. laterosporus*’dan serin proteaz aktivitesinin optimum sıcaklığını 75 °C, Park ve ark. (2003), *Bacillus* cinsi (*B. subtilis*, *B. aeromonas*, *B. hyrophila*, *B. amyloliquefaciens*) bakterilerinden elde ettiği proteaz aktivitesinin optimum sıcaklığını 40-70 °C, *B. licheniformis* DV3’ten (Matpan Bekler ve ark., 2015a) elde edilen proteazın optimum sıcaklığını 50 °C, *Anoxybacillus* sp. KP1’den (Matpan Bekler ve ark., 2015b) elde edilen proteazın optimum sıcaklığını 50 °C bulmuştur. Bu çalışmadaki iki izolattan elde edilen proteazın maksimum aktivite gösterdiği sıcaklıklar çamaşır deterjanı formülasyonları gibi endüstriyel uygulamalarda kullanmak için avantajlı olabilir.

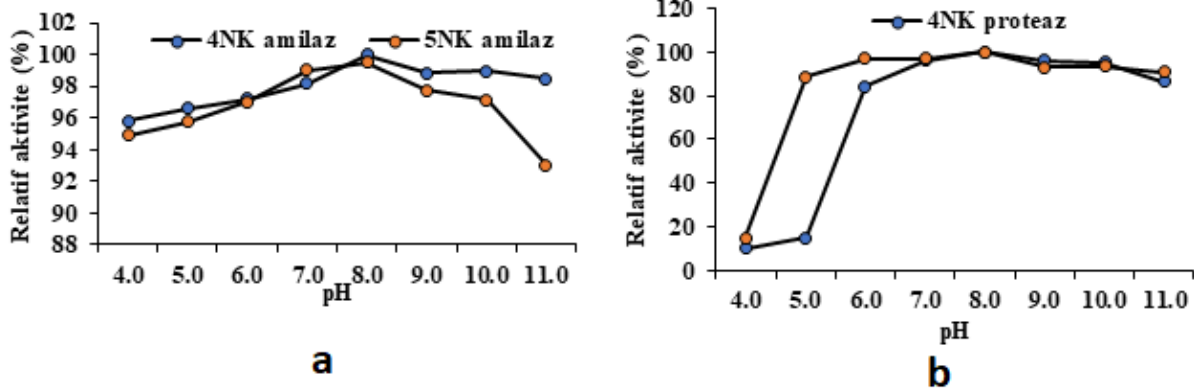
Proteaz ve Amilaz Enzim Aktivitelerine pH’nın Etkisi

Şekil 6a’da görüldüğü gibi 4NK ve 5NK suşlarının amilaz aktivitesi geniş pH (4.0-11.0) aralığında aktivite göstermektedir. 4NK ve 5NK suşları için pH 8.0’de maksimum amilaz aktivitesi elde edilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda, Mamo ve Gessesse

(1999) pH 5.5-9.0, Conderio ve ark. (2002) pH 7.5, Arıkan ve ark. (2003) α -amilazın alkalın pH değerinde (9.5-13.0), Behal ve ark. (2006) pH 7.0-10.0, Liu ve Xu (2008) pH 4.5-11.0 ve Raul ve ark. (2014) pH 7.1, Ahmetoğlu ve ark. (2015) maksimum amilaz aktivitesini pH 7.0’de elde etmişlerdir. Bu iki suştan elde edilen amilazın göstermiş olduğu pH profili, nötraliteye yakın bir pH aralığında gerçekleştirilecek endüstriyel proseslerdeki uygulamalarda kullanılabileceğini göstermektedir.

Şekil 6b’de görüldüğü 4NK ve 5NK suşlarının proteaz aktivitesi ise pH 4.0’ten itibaren artmaya başlamış pH 8.0’de optimum değere ulaşmış daha sonra yavaş yavaş azalmaya başlamıştır. Önceki çalışmalarda *Bacillus stearothermophilus* (Sookkheo ve ark., 2000), *Bacillus mojavensis* (Gupta ve ark., 2002), *B. subtilis*, *B. aeromonas*, *B. hyrophila*, *B. amyloliquefaciens* (Park ve ark., 2003), tarafından sentezlenen proteaz enziminin maksimum aktivitesinin pH 8.0 olduğu belirtilmiştir. Hem 4NK hem de 5NK’den elde edilen proteazın geniş pH’da aktivite göstermesi deterjanlarda, deri işlemede veya daha yüksek pH’da diğer uygulamalarda katkı maddesi olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Research article/Araştırma Makalesi
DOI:10.29132/ijpas.882322



Şekil 6a. 4NK ve 5NK suşlarının α-amilaz aktivitesine pH'nın etkisi, 6b. 4NK ve 5NK suşlarının proteaz aktivitesine pH'nın etkisi

SONUÇ

Sonuç olarak biyoteknolojik açıdan önemli olan enzimler üzerine incelemeler yapılmış bunun sonucunda enzimlerin optimum koşulları belirlenmiştir. Endüstrinin birçok alanında kullanılan amilaz ve proteaz enzimleri üzerine yapılan bu araştırmanın biyoteknolojide kullanılabileceğini göstermektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma FEN.17.008 ve FEN.17.009 nolu projeler ile Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri koordinatörlüğü (DÜBAP) tarafından desteklenmiştir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazar bu çalışmada herhangi bir şekilde çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Ahmetoğlu, N., Matpan Bekler, F., Acer, Ö., Gül Güven, R., Güven, K., 2015. Production purification and characterisation of thermostable metallo protease from newly isolated *Bacillus* sp KG5. *EurAsian Journal of BioSciences*, 9, 1-11.
- Arikan, B., Unaldi, N., Çoral, G., Çolak, Ö., Aygan, A., Gülnaz, O., 2003. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. *Process Biochemistry*, 38, 1397-1403.
- Arulmani M., Aparanjini K., Vasanthi. K., Arumugam P., Arivuchelvi M., Kalaichelvan P. T., 2007. Purification and Partial Characterization of Serine Protease from Thermostable Alkalophilic *Bacillus*

laterosporus-AK1. *World journal of Microbiology Biotechnology*, 23, 475-481.

- Behal, A., Singh, J., Sharma, M.K., Puri, P., Batra N., 2006. Characterization of alkaline α-amylase from *Bacillus* sp. AB 04. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 8, 80-83.
- Bernfeld, P., 1955. Enzymes Carbohydrate Metabolism, *In Methods In Enzymology Academic press*, 17, 149-158.
- Cordeiro, C.A.M., Martins, M.L.L., Luciano, A.B., 2002. Production and Properties of α-Amylase from Thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33, 57-61.
- Derekova, A., Sjøholm, C., Mandeva, R., Kambourova, M., 2007. *Anoxybacillus rupiensis* sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from Rupi Basin (Bulgaria). *Extremophiles*, 11, 577-583.
- Du, Y., Ma, J., Yin, Z., Liu, K., Yao, G., Xu, W., Fan, L., Du, B., Ding, Y., Wang, C., 2019. Comparative genomic analysis of *Bacillus paralicheniformis* MDJK30 with its closely related species reveals an evolutionary relationship between *B. paralicheniformis* and *B. licheniformis*. *BMC Genomics* 20, 283.
- Dunlap, C.A., Kwon, S.W., Rooney, A.P., Kim, S.J., 2015. *Bacillus paralicheniformis* sp. nov., isolated from fermented soybean paste. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65, 3487-92.
- Gupta, R., Beg, Q., Lorenz, P., 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, 15-32.
- Gül Güven, R., 2011. Termofilik Bakteriler ve Biyoteknolojik Açısından Önemli Bazı Enzimleri. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi* TR, 9(1), 1-10.

Research article/Araştırma Makalesi
 DOI:10.29132/ijpas.882322

- Kandra, L., 2003. α -Amylases of Medical and Industrial Importance; *Journal of Molecular Structure(Teochem)*, 666, 487-498.
- Kevbrin, V.V., Lysenko, K.Z.A.M., Wiegel, J., 2005. *Anoxybacillus kamchatkensis* .nov.,a Novel Thermophilic Facultative Aerobic Bacterium with a Broad pH Optimum from The Geyser Valley, Kamchatka. *Extremophiles*, 9, 391-398.
- Kıran, E.Ö., Çömlekçioglu, U., 2003. Zeytin Ilıcası (Kahramanmaraş)'ndan Termofil Alkalifilik Amilolitik *Bacillus sp.* Suşlarının İzolasyonu ve Amilaz Üretme Yetenekleri Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi. *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, 6(2), 41-48.
- Kim, O.S., Cho, Y.J., Lee, K., Yoon, S.H., Kim, M., Na, H., Park, S.C., Jeon, Y.S., Lee, J.H., Yi, H., Won, S., Chun, J., 2012. Introducing EzTaxon: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62, 716-721.
- Leighton, T.J., Doi, R.H., Warren, R.A.J., Kelln, R.A. 1973. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Biology*, 76(1), 103-122.
- Liu XD., Xu, Y., (2008). A novel raw starch digesting α -amylase from a newly isolated *Bacillus sp.* YX-1: Purification and characterization, *Biosource Technology*, 99, 4315-4320.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265- 275.
- Mamo, G., Gessesse, A., 1999. Purification and Characterization of Two Raw-Starch-Digesting Thermostable α -amylases from a Thermophilic *Bacillus*. *Enzyme and Microbial Technology*. 25, 433-438.
- Matpan Bekler, F., Acer, Ö., Güven, K. 2015a. Co Production of Thermostable Calcium Independent Amylase And Alkali Metallo Protease From Newly Isolated *Bacillus licheniformis* Dv3. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 16, 21-30.
- Matpan Bekler, F., Acer Ö., Güven, K., (2015b) Production and purification of novel thermostable alkaline protease from *Anoxybacillus sp.* KP1. *Cellular and Molecular Biology*, 61(4), 118-125.
- Matpan Bekler, F., Güven, K., Gül Güven, R., 2020. Purification and characterization of novel α -amylase from *Anoxybacillus ayderensis* FMB1, *Biocatalysis and Biotransformation*,
- Maugeri, T.L., Gugliandolo, C., Caccamo, D., Stackebrandt, E., 2001. Polyphasic Taxonomic Study of Thermophilic *Bacilli* from Shallow, Marine Vents System. *Applied. Microbiology*, 24, 572-587.
- Najafi, M.F., Sariri, R., 2006. Extraction and Identification of Alkaline Protease Producing Thermophilic Bacteria from Soil. Master Thesis. Ministry of Science and Technology, Faculty of Science, Iran.
- Özşahin, AD., 2006. Kahramanmaraş ili Kağıt Fabrikaları Çevresinden İzolasyonu Yapılan *Bacillus sp.* Suşlarından Elde Edilen Selüloz Enziminin Karakterizasyonu ve Biyoteknolojide Kullanılabilirliğinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.
- Park, I.J., Yoon, J.C., Park, S.J., Kim, E.H., Chp, Y.J., Shin, K.S., 2003. Characterization of the Proteolytic Activity of Bacteria Isolated from a Rotating Biological Contactor. *The Journal of Microbiology*, 41, 73-77.
- Poli, A., Esposito, E., Lama, L., Orlando, P., Niccolaus B., Appolonia, F., Gambacorta, A., Nicolaus, B., 2006. *Anoxybacillus amylolyticus sp. nov.*, a Thermophilic Amylase Producing Bacterium Isolated from Mount Rittmann (Antarctica) *Systematic and Applied Microbiology*. 29, 300-307.
- Raul, D., Biswas, T., Mukhopadhyay, S., Das, S.K., Gupta, S., 2014. Production and Partial Purification of Alpha Amylase from *Bacillus subtilis* (MTCC 121) Using Solid State Fermentation. *Biochemistry Research International* 2014, 568141.
- Rey, M.W., Ramaiya, P., Nelson, B.A., Brody-Karpin, S.D., Zaretsky, E.J., Tang, M., 2004. Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. *Genome Biology*, 5, R77.
- Sookkheo, B., Sinchaikul, S., Phutrakul, S.T.C., 2000. Purification and Characterization of the Highly Thermostable Proteases from *Bacillus stearothermophilus* TLS33. *Protein Expression and Purification*. 20, 142-151.
- Stamford, T., Stamford, N., Coelho, L., Araujo, J., 2001. Production and characterization of a thermostable α -amylase from *Nocardiopsis sp.* endophyte of yam bean, *Biosource Technology*, 76, 137-141.
- Uhlig, H., 1998. Industrial enzymes and their applications. John Wiley&Sons, INC. New York.
- Yılmaz, F. 2002. *Bacillus* Türleri. Bitirme Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Rize Fen Edebiyat Fakültesi Rize.