

**T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MEZOFİLİK BAKTERİLERİN AMİLAZ ÜRETİM POTANSİYELLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Kübra İLKILIÇ**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Emre BİRHANLI**

**OCAK 2023**

**T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MEZOFİLİK BAKTERİLERİN AMİLAZ ÜRETİM POTANSİYELLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Kübra İLKILIÇ  
(36183611029)**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Emre BİRHANLI**

**OCAK 2023**

**İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ**

**MEZOFİLİK BAKTERİLERİN AMİLAZ ÜRETİM POTANSİYELLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Tezi Hazırlayan: Kübra İLKILIÇ  
Yüksek Lisans Tezi**



## TEŞEKKÜR VE ÖNSÖZ

Hayata bakışı, duruşu ve öğrencilerine her zaman şefkat ve ilgi ile yaklaşmasıyla bende kendisi gibi değerli bir bilim insanı olma isteğini uyandıran, yüksek lisans eğitimim boyunca akademik bilgisini ve deneyimlerini benimle paylaşan, motivasyon ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Emre BİRHANLI'ya,

Paylaşımçı ve yardımseverliğiyle değerli vaktini ayırarak çalışmalarına fikir ve önerileriyle katkıda bulunan Sayın Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA'ya,

Tez çalışmalarında kullanılan mezofilik bakteri türlerinin teminini sağlayan Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Ahmet ÇABUK'a

Laboratuvar çalışmalarımnda yardımlarıyla destek olan Biyoloji Bölümü doktora öğrencisi Eray TATLICI'ya,

İyi ya da kötü fark etmeksizin her anımda kendimi kanatlarının altında güvende hissedebildiğim, bana olan inancını bir an bile kaybetmeyen en büyük şansım olan canım babam Tekin İLKILIÇ'a, yeri geldiğinde dostum, her zaman destek kaynağım, bu hayattaki değerli varlığım olan canım annem Yasemin İLKILIÇ'a, varlığı ile beni tamamlayan, her anımda yanımda olup iyi ki benim kardeşim olmuş dediğim biricik kardeşim Zeynep İrem İLKILIÇ'a ve anlayışı ile bana her zaman destek olan canım kardeşim Muhammed Ömer İLKILIÇ'a sonsuz

teşekkür ederim.

## ONUR SÖZÜ

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum “Mezofilik Bakterilerin Amilaz Üretim Potansiyellerinin Araştırılması” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığına ve yararlandığıım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Kübra İLKILIÇ



# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR VE ÖNSÖZ .....	i
ONUR SÖZÜ .....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	viii
ÖZET .....	ix
ABSTRACT .....	x
<b>1.GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1 Biyoteknoloji .....	1
1.1.1 Tıbbi (kırmızı) biyoteknoloji.....	1
1.1.2 Tarımsal (yeşil) biyoteknoloji .....	1
1.1.3 Deniz (mavi) biyoteknolojisi.....	2
1.1.4 Gıda (sarı) biyoteknolojisi.....	2
1.1.5 Çevre (gri) biyoteknolojisi .....	2
1.1.6 Endüstriyel (beyaz) biyoteknoloji .....	2
1.2 Biyoteknolojide Yaygın Olarak Kullanılan Mikroorganizmalar .....	3
1.2.1 Funguslar .....	3
1.2.2 Bakteriler .....	3
1.3 Bakteriyel Enzimler .....	5
1.3.1 Selülaz .....	6
1.3.2 Katalaz.....	7
1.3.3 Lakkaz .....	7
1.3.4 Proteaz .....	8
1.3.5 Lipaz.....	8
1.3.6 Nişasta hidrolizinden sorumlu enzimler.....	9
1.3.6.1 Endoamilazlar .....	10
1.3.6.2 Ekzoamilazlar .....	12
1.3.6.3 Dallanma kırıcı enzimler .....	13
1.3.6.4 Transferazlar .....	13
1.4 Amilaz Üretiminde Arttırılmasında Kullanılan Bazı İndükleyici Maddeler .....	14
1.4.1 Ksiloz .....	14
1.4.2 Glikoz .....	14
1.4.3 Laktoz.....	14
1.4.4 Maltoz.....	15
1.4.5 Sükroz.....	15
1.4.6 Nişasta .....	15
<b>2. LİTERATÜR ÖZETİ.....</b>	<b>17</b>
2.1 Bakteriyel Amilaz Üretiminde Optimizasyonuna Yönelik Çalışmalar .....	17
2.1.1 İnkübasyon sıcaklığının optimizasyonuna yönelik çalışmalar .....	17
2.1.2 Çalkalama hızının optimizasyonuna yönelik çalışmalar .....	18
2.1.3 Ortam pH'sının optimizasyonuna yönelik çalışmalar .....	19
2.1.4 İnkübasyon süresinin optimizasyonuna yönelik çalışmalar .....	20
2.1.5 Pirinç tozunun optimizasyonuna yönelik çalışmalar.....	21
2.1.6 Ham patates optimizasyonuna yönelik çalışmalar .....	21
2.1.7 Çeşitli indükleyici maddelerin optimizasyonuna yönelik çalışmalar.....	22

2.1.8 Çeşitli indükleyici maddelerin karışımlarının optimizasyonuna yönelik çalışmalar .....	23
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM .....</b>	<b>26</b>
3.1 Çalışmada Kullanılan Bakteri Türleri .....	26
3.1.1 Bacillus megaterium A1 .....	26
3.1.2 Bacillus pumilus D3 .....	27
3.2 Bacillus megaterium A1 ve Bacillus pumilus D3'ün Mikroskopik Morfolojileri ve Gram Kimliklerinin Belirlenmesi .....	28
3.3 Sıvı Bakteri Kültürlerinin Hazırlanışı .....	29
3.4 Bacillus megaterium A1 ve Bacillus pumilus D3'ün Optimum Amilaz Üretim Koşullarının ve Amilaz Aktivitesinin Saptanması .....	30
3.5 Bacillus megaterium A1 ve Bacillus pumilus D3'ün Amilaz Üretim Koşullarının Optimizasyonu .....	32
3.5.1 İnkübasyon sıcaklığının amilaz üretimi üzerine etkisinin saptanması .....	32
3.5.2 Çalkalama hızının amilaz üretimi üzerine etkisinin saptanması .....	32
3.5.3 Ortam pH'sının amilaz üretimi üzerine etkisinin saptanması .....	33
3.5.4 İnkübasyon süresinin amilaz üretimi üzerine etkisinin saptanması .....	33
3.6 Çeşitli İndükleyici Maddelerin Amilaz Üretimi Üzerine Etkisinin Saptanması .....	33
3.7 Pirinç Tozu'nun Amilaz Üretimi Üzerine Etkisinin Saptanması .....	33
3.8 Ham Patates Özütü'nün Amilaz Üretimi Üzerine Etkisinin Saptanması .....	34
3.9 Çeşitli İndükleyici Maddelerin Karışımlarının Bacillus megaterium A1 ve Bacillus pumilus D3'ün Amilaz Üretimi Üzerine Etkisi .....	35
3.10 Katı Ortamda Nişasta Hidroliz Testi .....	35
3.11 Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezi Çalışmaları .....	36
<b>4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....</b>	<b>38</b>
4.1 Bacillus megaterium A1 ve Bacillus pumilus D3'ün Mikroskopik Morfolojileri ve Gram Kimliklerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar .....	41
4.2 Bacillus megaterium A1 ve Bacillus pumilus D3'ün Amilaz Üretim Koşullarının Optimize Edilmesine Yönelik Çalışmalar .....	42
4.2.1 İnkübasyon sıcaklığının amilaz üretim verimine etkisinin saptanması .....	42
4.2.2 Çalkalama hızının amilaz üretim verimine etkisinin saptanması .....	44
4.2.3 Ortam pH'sının amilaz üretim verimine etkisinin saptanması .....	45
4.2.4 İnkübasyon süresinin amilaz üretim verimine etkisinin saptanması .....	47
4.3 Çeşitli İndükleyici Maddelerin Amilaz Üretim Verimine Etkisinin Saptanması .....	48
4.3.1 Farklı miktarlarda ksiloz eklenmiş NB ortamlarında amilaz üretimi .....	48
4.3.2 Farklı miktarlarda glikoz eklenmiş NB ortamlarında amilaz üretimi .....	50
4.3.3 Farklı miktarlarda laktoz eklenmiş NB ortamlarında amilaz üretimi .....	51
4.3.4 Farklı miktarlarda maltoz eklenmiş NB ortamlarında amilaz üretimi .....	53
4.4 Farklı Miktarlarda Pirinç Tozu Eklenmiş NB Ortamlarında Amilaz Üretimi .....	54
4.5 Farklı Miktarlarda Ham Patates Özütü Eklenmiş NB Ortamlarında Amilaz Üretimi .....	55
4.6 Çeşitli İndükleyici Maddelerin Karışımlarının B. megaterium A1 ve B. pumilus D3'ün Amilaz Üretimine Etkisi .....	56
4.7 Katı Ortamda Nişasta Hidroliz Testi .....	59
4.8 İndükleyici Karışımlarının Bulunduğu Ortamlarda Üretilen B. megaterium A1 ve B. pumilus D3 Amilazlarının Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezinde Gösterilmesi .....	60
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>61</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>64</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>80</b>

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 : <i>B. megaterium</i> 'un sistematik sınıflandırması .....	27
Çizelge 3.2 : <i>B. pumilus</i> 'un sistematik sınıflandırması.....	28
Çizelge 4.1 : Farklı miktarlarda pirinç tozu eklenmiş NB ortamlarında <i>Bacillus megaterium</i> A1'in amilaz üretimi.....	55
Çizelge 4.2 : Farklı miktarlarda pirinç tozu eklenmiş NB ortamlarında <i>Bacillus pumilus</i> D3'ün amilaz üretimi. ....	55
Çizelge 4.3 : Farklı miktarlarda ham patates özütü eklenmiş NB ortamlarında <i>Bacillus megaterium</i> A1'in amilaz üretimi.....	56
Çizelge 4.4 : Farklı miktarlarda ham patates özütü eklenmiş NB ortamlarında <i>Bacillus pumilus</i> D3'ün amilaz üretimi. ....	56





## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 : Nişasta hidrolizinden sorumlu enzimler ve bu enzimlerin nişastayı hidrolizi sonucu oluşan ürünler (Maarel ve diğ, 2002). .....	9
Şekil 3.1 : <i>Bacillus megaterium</i> A1'in katı kültürü. ....	27
Şekil 3.2 : <i>Bacillus pumilus</i> D3'ün katı kültürü. ....	28
Şekil 3.3 : <i>Bacillus megaterium</i> A1 ve <i>Bacillus pumilus</i> D3 sıvı kültürlerinin hazırlanma aşamaları. ....	29
Şekil 3.4 : <i>Bacillus megaterium</i> A1 ve <i>Bacillus pumilus</i> D3 sıvı kültürlerinin optimum amilaz üretim koşullarının belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalar. ....	30
Şekil 3.5 : <i>Bacillus megaterium</i> A1 ve <i>Bacillus pumilus</i> D3 sıvı kültürlerindeki amilaz aktivitesinin saptanmasına yönelik çalışmalar. ....	31
Şekil 3.6 : Amilaz aktivitesinin hesaplanmasında kullanılan maltoz standart eğrisi. ....	32
Şekil 3.7 : Çeşitli konsantrasyonlarda (%0.1, %0.2 ve %0.3) pirinç tozunun NB ortamlarına ilavesi. ....	34
Şekil 3.8 : Çeşitli konsantrasyonlarda (%0.1, %0.2 ve %0.3) ham patates özütünün NB ortamlarına ilavesi. ....	34
Şekil 3.9 : Katı ortamda nişasta hidrolizini tespit etmek için kullanılan ve 1/2 oranında sulandırılan konsantre iyot çözeltisi. ....	36
Şekil 3.10 : Doğal poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan hazır jel (a) ve örneklerin kuyucuklara yükleme işlemi (b). ....	37
Şekil 4.1 : <i>Bacillus megaterium</i> A1 (a) ve <i>Bacillus pumilus</i> D3'ün (b) mikroskobik morfolojileri (Mikroskobik Büyütme Oranı: 1500x). ....	41
Şekil 4.2 : <i>Bacillus megaterium</i> A1 (a) ve <i>Bacillus pumilus</i> D3'ün (b) mikroskobik morfolojileri ve Gram kimlikleri (Mikroskobik Büyütme Oranı: 1500x). ....	42
Şekil 4.3 : Farklı inkübasyon sıcaklıklarının <i>B. megaterium</i> A1'in amilaz üretimine etkisi. ....	43
Şekil 4.4 : Farklı inkübasyon sıcaklıklarının <i>B. pumilus</i> D3'ün amilaz üretimine etkisi. ..	43
Şekil 4.5 : Farklı çalkalama hızlarının <i>B. megaterium</i> A1'in amilaz üretimine etkisi. ....	44
Şekil 4.6 : Farklı çalkalama hızlarının <i>B. pumilus</i> D3'ün amilaz üretimine etkisi. ....	45
Şekil 4.7 : Farklı ortam pH'larının <i>B. megaterium</i> A1'in amilaz üretimine etkisi. ....	46
Şekil 4.8 : Farklı ortam pH'larının <i>B. pumilus</i> D3'ün amilaz üretimine etkisi. ....	46
Şekil 4.9 : Farklı inkübasyon sürelerinin <i>B. megaterium</i> A1'in amilaz üretimine etkisi. ....	47
Şekil 4.10 : Farklı inkübasyon sürelerinin <i>B. pumilus</i> D3'ün amilaz üretimine etkisi. ....	48
Şekil 4.11 : Farklı miktarlarda ksiloz eklenmiş NB ortamlarında <i>B. megaterium</i> A1'in amilaz üretimi. ....	49
Şekil 4.12 : Farklı miktarlarda ksiloz eklenmiş NB ortamlarında <i>B. pumilus</i> D3'ün amilaz üretimi. ....	49
Şekil 4.13 : Farklı miktarlarda glikoz eklenmiş NB ortamlarında <i>B. megaterium</i> A1'in amilaz üretimi. ....	50
Şekil 4.14 : Farklı miktarlarda glikoz eklenmiş NB ortamlarında <i>B. pumilus</i> D3'ün amilaz üretimi. ....	51
Şekil 4.15 : Farklı miktarlarda laktoz eklenmiş NB ortamlarında <i>B. megaterium</i> A1'in amilaz üretimi. ....	52
Şekil 4.16 : Farklı miktarlarda laktoz eklenmiş NB ortamlarında <i>B. pumilus</i> D3'ün amilaz üretimi. ....	52
Şekil 4.17 : Farklı miktarlarda maltoz eklenmiş NB ortamlarında <i>B. megaterium</i> A1'in amilaz üretimi. ....	53

<b>Şekil 4.18</b> : Farklı miktarlarda maltoz eklenmiş NB ortamlarında <i>B. pumilus</i> D3'ün amilaz üretimi. ....	54
<b>Şekil 4.19</b> : Sırasıyla kör (I) ve %0.3 ksiloz+%0.3 glikoz (II), %0.3 ksiloz+%0.3 laktoz (III), %0.3 ksiloz+%0.3 maltoz (IV) ortamlarında inkübasyonu ve ardından DNS ilavesi sonrası elde edilen <i>B. megaterium</i> A1'in kültür sıvılarının görüntüsü (a), sırasıyla kör (V) ve %0.3 ksiloz+%0.3 glikoz (VI), %0.3 ksiloz+%0.3 laktoz (VII), %0.3 ksiloz+%0.3 maltoz (VIII) ortamlarında inkübasyonu ve ardından DNS ilavesi sonrası elde edilen <i>B. pumilus</i> D3'ün kültür sıvılarının görüntüsü (b).....	57
<b>Şekil 4.20</b> : Çeşitli indükleyici maddelerin karışımlarının <i>B. megaterium</i> A1'in amilaz üretimine etkisi. ....	57
<b>Şekil 4.21</b> : Çeşitli indükleyici maddelerin karışımlarının <i>B. pumilus</i> D3'ün amilaz üretimine etkisi. ....	58
<b>Şekil 4.22</b> : <i>B. megaterium</i> A1, <i>B. pumilus</i> D3 ve <i>E. coli</i> kullanılarak yapılan katı ortamda (NA) nişasta hidroliz testi.....	59
<b>Şekil 4.23</b> : <i>B. megaterium</i> A1 ve <i>B. pumilus</i> D3'ün %0.3 ksiloz+%0.3 glikoz ortamlarından elde edilen kültür sıvılarındaki amilaz enzimlerinin doğal poliakrilamid jel elektroforezinde görüntülenmesi.....	60

## SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>Atm</b>	: Atmosfer
<b><i>B. amyloliquefaciens</i></b>	: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
<b><i>B. cereus</i></b>	: <i>Bacillus cereus</i>
<b><i>B. licheniformis</i></b>	: <i>Bacillus licheniformis</i>
<b><i>B. megaterium</i></b>	: <i>Bacillus megaterium</i>
<b><i>B. pumilus</i></b>	: <i>Bacillus pumilus</i>
<b><i>B. subtilis</i></b>	: <i>Bacillus subtilis</i>
<b>Ca</b>	: Kalsiyum
<b>°C</b>	: Celcius, Sıcaklık Birimi
<b>DNS</b>	: 3,5-Dinitrosalisilik Asit
<b>EC</b>	: Enzim Komisyonu
<b><i>E. coli</i></b>	: <i>Escherichia coli</i>
<b>g</b>	: Gram
<b>g/L</b>	: Gram/Litre
<b>HCl</b>	: Hidroklorik Asit
<b>kDa</b>	: Kilodalton
<b>L</b>	: Litre
<b>mA</b>	: Miliamper
<b>mL</b>	: Mililitre
<b>µm</b>	: Mikrometre
<b>N</b>	: Normal
<b>NA</b>	: Nütrient Agar
<b>NaOH</b>	: Sodyum Hidroksit
<b>NB</b>	: Nütrient Broth
<b>Nm</b>	: Nanometre
<b>pH</b>	: Su İçerisindeki Hidrojen İyonu Derişiminin Eksi Logaritması
<b>rpm</b>	: Dakikada Dönme Hızı
<b>SDS</b>	: Sodyum Dodesil Sülfat
<b>U/L</b>	: Ünite/Litre
<b>U/mL</b>	: Ünite/Mililitre

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### MEZOFİLİK BAKTERİLERİN AMİLAZ ÜRETİM POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI KÜBRA İLKILIÇ

İnönü Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

80+X sayfa

2023

Danışman: Prof. Dr. Emre BİRHANLI

Amilazlar çeşitli ökaryotik ve prokaryotik organizmalar tarafından hücre içi ve hücre dışı formlarda üretilebilen enzimlerdir. Basit ve ekonomik enzim üretme koşullarına ek olarak gerektiğinde manipüle edilebilmelerinden dolayı bakteriler endüstriyel amilaz üretiminde diğer organizmalardan daha avantajlıdır. Buna göre; bu tez çalışmasında iki farklı mezofilik bakteri suşu (*B. megaterium* A1 ve *B. pumilus* D3) öncelikle çeşitli inkübasyon sıcaklıklarında (25-60 °C), çalkalama hızlarında (0-200 rpm), başlangıç pH'larında (pH 4.0-10.0) ve inkübasyon sürelerinde (24, 48 ve 72 saat) inkübe edilmiş ve optimum amilaz üretim koşulları saptanmıştır. Optimizasyon çalışmalarını takiben her iki bakteri suşu da ayrı ayrı %0.1-0.4 oranlarında ksiloz, glikoz, laktoz ve maltoz gibi indükleyicilerin eklendiği sıvı besiyeri ortamlarında optimum koşullarda inkübe edilmiştir. Bu işlemlerin sonucunda hem test edilen indükleyici maddelerin her iki bakteri suşunun amilaz üretimine etkileri hem de enzim üretimini en yüksek oranda arttıran indükleyici miktarları saptanmıştır. Bakteriyel suşların amilaz üretimlerini arttırmak için sıvı besiyeri ortamlarına %0.1-0.3 oranlarında ayrı ayrı pirinç tozu ve ham patates özütü de ilave edilmiş ve bu maddelerin enzim üretimine etkileri araştırılmıştır. Bu tez çalışmalarında optimum konsantrasyonlardaki indükleyici karışımlarının her iki bakteri suşunun amilaz üretimlerine olan etkileri de araştırılmıştır. Ayrıca test edilen her iki bakteri suşunun katı besiyeri ortamlarında amilaz üretilmediğinin belirlenmesi amacıyla katı ortamlarda nişasta hidrolizine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Buna ilaveten; her iki bakteri suşunun en yüksek amilaz üretiminin gerçekleştiği ortamlardan (%0.3 ksiloz+%0.3 glikoz) elde edilen kültür sıvılarının doğal poliakrilamid jel elektroforezinde gerçekleştirilen zimogram analizi sonucunda sentezlenen amilazların jel üzerindeki varlıkları da kanıtlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Amilaz, *Bacillus megaterium* A1, *Bacillus pumilus* D3, İndükleyici, Mezofilik bakteri, Sinerjistik etki

## ABSTRACT

Master Thesis

### INVESTIGATION OF AMYLASE PRODUCTION POTENTIALS OF MESOPHILIC BACTERIA

Kübra İLKILIÇ

Inonu University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

80+X pages

2023

Supervisor: Prof. Dr. Emre BİRHANLI

Amylases are enzymes that can be produced in intracellular and extracellular forms by various eukaryotic and prokaryotic organisms. In addition to the simple and economical enzyme production conditions, bacteria are more advantageous than other organisms in industrial amylase production because they can be manipulated when necessary. According to this; two different strains of mesophilic bacteria (*B. megaterium* A1 and *B. pumilus* D3) were first tested at various incubation temperatures (25-60 °C), shaking speeds (0-200 rpm), initial pH (pH 4.0-10.0) and incubation times (24, 48 and 72 hours) and optimum amylase production conditions were determined in this thesis study. Following the optimization studies, both strains of bacteria were also incubated separately in liquid growth media to which inducers such as xylose, glucose, lactose and maltose were added at the rate of 0.1-0.4% under optimum conditions. As a result of these processes, both the effects of the tested inducer substances on the amylase production of both bacterial strains and the inducer amounts that increased the enzyme production at the highest rate were determined. In order to increase the amylase production of bacterial strains, 0.1-0.3% of rice powder and raw potato extract were also added separately to the liquid growth media and the effects of these substances on enzyme production were investigated. In the studies of this thesis, the effects of inducer mixtures in optimum concentrations on amylase productions of both bacterial strains were also investigated. Furthermore, studies on starch hydrolysis in solid media were carried out in the aim to determine whether both bacterial strains tested produce amylase in solid media. In addition, the presence of the synthesized amylases on the gel was also proven as a result of the zymogram analysis performed in natural polyacrylamide gel electrophoresis of culture fluids obtained from media (0.3% xylose+0.3% glucose) where the highest amylase production of both bacterial strains occurred.

**Keywords:** Amylase, *Bacillus megaterium* A1, *Bacillus pumilus* D3, Inducer, Mesophilic bacterium, Synergistic effect

# 1.GİRİŞ

## 1.1 Biyoteknoloji

Biyoteknoloji çok disiplinli bir bilim dalı olup, oldukça geniş ve dallanmış bir bilim dalı olan Biyoloji'den köken almaktadır. Biyoteknoloji en basit ifadeyle; çeşitli biyolojik sistemlerin (hayvanlar, bitkiler, mikroorganizmalar ve bu organizmaların bileşenleri) mal ve hizmet üretiminde kullanılması şeklinde tanımlanabileceği gibi, ortaya çıkan çeşitli problemlerin çözülmesi ve yararlı ürünlerin üretilmesi amacıyla, çeşitli organizmaların ve bileşenlerinin endüstriyel işlemlerde kullanılması olarak da tanımlanabilir (Birhanlı, 2003; Parawira ve Khosa, 2009; Chekol ve Gebreyohannes, 2018).

Oldukça geniş çalışma alanlarına sahip olan biyoteknolojinin çeşitli uygulama alanları vardır. Buna göre; biyoteknolojinin alt alanları tıbbi (kırmızı) biyoteknoloji, tarımsal (yeşil) biyoteknoloji, deniz (mavi) biyoteknolojisi, gıda (sarı) biyoteknolojisi, çevre (gri) biyoteknolojisi ve ayrıca endüstriyel (beyaz) biyoteknoloji olarak ifade edilebilir (Birhanlı, 2008; Gupta ve diğ, 2017; Martin ve diğ, 2021).

### 1.1.1 Tıbbi (kırmızı) biyoteknoloji

Tıbbi biyoteknoloji; insan sağlığının korunması ve ömür süresinin uzatılması, hastalık tanısı ve tedavisi gibi konuları temel alarak geleneksel ve modern biyoteknolojik uygulamaların kullanılmasını kapsar. Bu bilim alanı spesifik olarak tanı, aşılama, tıp ve gen terapisi olarak temelde dört aşamada uygulanmakta olup, genetik mutasyonların protein ve kökensele geçişini araştırarak bu amaç doğrultusunda ürün ve hizmet geliştirme ve çözüm üretmeyi hedeflemektedir (Özgen ve diğ, 2007; Gül, 2014).

### 1.1.2 Tarımsal (yeşil) biyoteknoloji

Dünyada yaşanmakta olan hızlı nüfus artışı sebebiyle tarım alanlarının tahrip edilmesi ve bu alanların ciddi miktarda azalması sonucu besin yetersizliği problemi gündeme gelmiştir. Çevrede yaşanan bu olumsuz değişiklikler gıda verimi ve ıslah çalışmaları üzerinde yapılan çalışmaların önemini arttırmakta olup, bu çalışmalar da tarım biyoteknolojisinin temelini oluşturmaktadır. Buna göre; bu bilim alanı herbisitlere dayanıklı bitki üretimi,

gıdaların raf ömrünün uzatılması, lezzetli ve doğal aromalı gıda üretimi ve tohumuz sebze-meyve üretimi gibi çeşitli çalışmaları kapsamaktadır. Buna ilaveten, yeşil biyoteknoloji modern bitki üretimine, biyolojik gübre ve biyopestisit eldesine yönelik uygulamaları da kapsamaktadır. (Çelik ve Balık, 2007; Birhanlı 2008)

### **1.1.3 Deniz (mavi) biyoteknolojisi**

Deniz biyoteknolojisi deniz kaynakları ve deniz organizmalarının ürün veya hizmet geliştirmek için kullanılmasına yönelik çalışmaları kapsamaktadır. Buna ek olarak, mavi biyoteknoloji deniz, kara, tatlı su veya bunların bir kombinasyonu gibi herhangi bir kaynak kullanılarak geliştirilen biyoteknolojik bilginin deniz ortamına ve sucul insan faaliyetlerine uygulanmasını da içerir (Collins ve diğ, 2018).

### **1.1.4 Gıda (sarı) biyoteknolojisi**

Gıda biyoteknolojisi gıda güvenliği, gıdaların işlenmesi, muhafazası ve tüketimine yönelik çalışmaları ve uygulamaları içeren bir bilim dalıdır (Karasu ve diğ, 2015). Buna göre sarı biyoteknoloji; gıda arzının güvenliğini ve beslenme kalitesini arttırmak için gıda ürünlerinin yetiştirildiği ortam ile ürünün tüketiciye sunulduğu ortam arasındaki bu zincirin her halkasında uygulama alanına sahiptir (İlter ve Yıldırım, 2021).

### **1.1.5 Çevre (gri) biyoteknolojisi**

Çevre biyoteknolojisi biyoremediasyon, biyofiltrasyon, atık su arıtma, biyobozunma, atık yönetimi ve biyoyakıt üretimi gibi çeşitli çalışma ve uygulama alanlarını kapsayan bir bilim dalıdır. Buna göre; gri biyoteknoloji özetle çevre ve ekosistemlerdeki sorunlara yönelik çalışmaları kapsayan bir bilim dalı olarak da tanımlanabilir. Bu amaç doğrultusunda çevre biyoteknolojisi çeşitli yöntemler, araçlar ve teknikler kullanmak suretiyle çevrenin doğal davranışı ve izlenmesi üzerine araştırmaları ve çevre dostu bir yaşam kültürünün ortaya çıkmasını amaçlar (Tun ve diğ, 2018).

### **1.1.6 Endüstriyel (beyaz) biyoteknoloji**

Fermentasyon biyoteknolojisi ve enzim biyoteknolojisi gibi uygulama alanlarını kapsayan beyaz biyoteknoloji, endüstriyel üretim sürecinde mal ve hizmet üretimi için mikroorganizma veya enzimlerin kullanılmasına yönelik çalışmaları içermektedir (Birhanlı 2003; Ünal ve diğ, 2020). Bu amaç doğrultusunda, endüstriyel açıdan önemli kimyasalların, antibiyotik ve bazı ilaçların, besin ve içeceklerin, enzimlerin üretimi ve

üretimin optimizasyonu konuları beyaz biyoteknolojinin çalışma alanları arasındadır. Buna ilaveten; enzim izolasyonu, saflaştırılması, tutuklanmasına yönelik çalışmalar, kirlilik ve atık yönetimi, enerji, hammadde ve su kullanımının azaltılması, iyi kalitede gıda üretimi, atıklardan yeni malzemeler ve biyoyakıtların üretimi ve kimyasal süreçlere alternatif oluşturmak gibi işlemler de beyaz biyoteknolojinin çalışma alanları arasına girmektedir (Birhanlı 2008; Ünal ve diğ, 2020).

## **1.2 Biyoteknolojide Yaygın Olarak Kullanılan Mikroorganizmalar**

Biyoteknolojinin bütün uygulama alanlarında kullanılan ana biyolojik sistemler mikroorganizmalar olup, bu mikroorganizmalar bakteriler, funguslar, algler, protozoonlar ve virüslerdir. Ancak bu organizmalar içerisinde biyoteknolojik çalışmalarda en çok kullanılan mikroorganizmalar funguslar ve bakterilerdir (Birhanlı, 2003).

### **1.2.1 Funguslar**

Funguslar klorofil içermeyen ökaryotik kemoheterotrofik organizmalar olup, şapkallı funguslar, küfler ve mayalar funguslar içerisine dahildir. Pek çoğu toprakta ve ölü bitkiler üzerinde, bazıları tatlı sularda, az bir kısmı ise denizlerde yaşayan funguslar, organik materyalleri zengin ve faydalı ürünlere dönüştürme yeteneğine sahip son derece önemli organizmalardır (Birhanlı, 2003; Meyer ve diğ, 2020).

Hem eski hem de modern biyoteknolojik süreçlerde kullanım potansiyeli olan funguslar, antibiyotik, alkol, enzim, organik asit, pigment, lipid, glikolipid ve diğer çok sayıda farmasötik maddenin üretiminde kullanılmaktadır (Bennett, 1998; Adrio ve Demain, 2003). Funguslardan elde edilen ikincil metabolitlerden bazıları besleyici değeri yüksek ve insan sağlığına oldukça yararlı ürünlerdir. Ayrıca yüksek oranda B vitamini ve tüm temel aminoasitleri içermesi, protein bakımından zengin olması ve düşük yağ içeriğine sahip olması yönünden funguslar endüstriyel işlemler için de oldukça değerli organizmalardır (Moore ve Chiu, 2001; Adrio ve Demain, 2003; Ghorai ve diğ, 2009; Akkara ve Tosun, 2014).

### **1.2.2 Bakteriler**

Bakteriler prokaryotik hücre yapısına sahip tek hücreli canlılardır. Her canlı organizmada olduğu gibi bakterilerin de hem yaşamlarını sürdürebilmeleri hem de nesillerini devam ettirebilmeleri için beslenmeleri ve bu nedenle de buldukları ortamlardan ihtiyaç



duydıkları besin maddelerini almaları gerekir. Bakterilerin üreme ve gelişimlerinin en uygun olduğu (optimum) koşullar bakterinin cins ve türüne bağlı olarak değişkenlik gösterir. Yapılan çalışmalarda optimum koşulların devam etmediği durumlarda bakterilerin üreme ve gelişimlerinin olumsuz etkilendiği ve zaman içerisinde ölmeye başladıkları saptanmıştır. Isı, radyasyon, yüzey gerilimi, osmotik basınç, nem, oksijen, redoks potansiyeli ve pH gibi çeşitli faktörler bakterilerin üreme ve gelişimlerini önemli oranda etkiler (Carlı ve diğ, 2019).

Bakteriler karbon, azot ve kükürt gibi çeşitli elementlerin doğal döngülerinin tamamlanması açısından son derece önemli organizmalardır. Çok azı hastalık etkeni olan bakteriler mikroorganizmalar içerisinde en çok farklılaşan oldukça önemli mikroorganizmalardır. Son derece hızlı üreyebilmeleri, maruz kaldığında pek çok canlının zarar gördüğü ya da öldüğü kimyasal maddelere karşı adapte olabilmeleri ve bu kimyasal maddeleri yararlı maddelere veya daha az zararlı formlara dönüştürebilmeleri nedeniyle bakteriler, pek çok biyoteknolojik alanda yoğun bir şekilde kullanılabilir. Örneğin; bazı *Lactobacillus* türleri aracılığı ile hazırlanan probiyotik preparatlar endüstriyel gıda üretim sürecinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Uymaz, 2010). Ayrıca bazı bakteriler tarafından üretilen biyofilm de tarım, tıp, gıda, kozmetik ve ambalaj dahil üzere çeşitli endüstriyel alanlarda kullanım potansiyeline sahiptir (Kartal ve diğ, 2021; Rani ve diğ, 2021).

Birçok bakteri üretildikleri ortamdaki besin maddelerinden faydalanmak için çeşitli ekstrasellüler enzimler salgılayabilir (Tolan, 1997). Bakteriyel enzimler ekonomik fizibiliteleri, yüksek verimleri, tutarlılıkları, ürün modifikasyon ve optimizasyon kolaylığı, mevsimsel dalgalanmaların olmaması, düzenli tedarikleri, hızlı büyümeleri, stabilite ve daha yüksek katalitik aktiviteleri nedeniyle sıklıkla tercih edilir. Amilaz, lipaz, selüloz, katalaz, lakkaz ve proteaz gibi enzimler farklı endüstrilerde çokça çalışılan ve tercih edilen bakteriyel enzimlerdendir (Bourbonnais ve Paice, 1990; Gupta ve diğ, 2003; Couto ve Herrera, 2006; Çamur, 2010; Gurung ve diğ, 2013; Naureen ve diğ, 2021; Okpara, 2022). Doğada *Lactobacillus*, *Escherichia*, *Clostridium*, *Listeria*, *Helicobacter*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* ve *Bacillus* gibi farklı özelliklere sahip pek çok bakteri cinsi bulunmaktadır (Gülgör ve Korukluoğlu, 2014; Rani ve diğ, 2021). Bu bakteri cinsleri içerisinde *Bacillus* cinsine ait bakteri türleri geniş yayılım göstermeleri ve kolayca elde edilebilmeleri yönüyle sıklıkla tercih edilen model mikroorganizmalardandır (Ediz ve Beyatlı, 2005).

*Bacillaceae* familyasının üyeleri çubuk şekilli ve endospor oluşturabilen bakterilerden oluşmaktadır. Bu familya gram pozitif, anaerobik ve endospor oluşturan *Clostridium* cinsinin üyeleri ile gram pozitif, aerobik veya fakültatif anaerobik olan ve yine endospor oluşturan *Bacillus* cinsinin üyeleri de dahil çok sayıda farklı bakteri cinsini içeren oldukça geniş bir taksonomik grup (Usta, 2020) olup, genellikle 35-37 °C' de ve pH 7 civarında ürerler (Kalaylı ve Beyatlı, 2003; Ediz ve Beyatlı, 2005).

*Bacillus* türleri oluşturdukları sporeler sayesinde uygun olmayan fiziksel veya kimyasal koşullara ve yüksek ısıya karşı dirençli olup, çöllerden, arktik bölgelere kadar geniş bir yayılım göstermektedir. *Bacillus* cinsinin oluşturduğu endosporlar; oval, silindirik, yuvarlak veya böbrek şeklinde gözlenebilir ve sporelerin hücre içerisindeki konumu ise sentral veya subterminal olabilmektedir. *Bacillus* cinsi çok çeşitli özelliklere sahip (termofil, psikrofil, asidofil, alkalifil, mezofil ve halofil) türleri bünyesinde barındırır.

*Bacillus* cinsinin üyeleri genellikle toprakta ve suda yaşam göstermesine rağmen doğada geniş olarak, süt ve süt ürünlerinden, hava, su ve yiyecek gibi birçok ortamdan elde edilirler (Ediz ve Beyatlı, 2005). Geniş yayılım göstermeleri ve kolayca elde edilebilmeleri yönüyle *Bacillus* cinsi bakteriler çeşitli endüstriyel alanlarda sıklıkla tercih edilmektedir. Buna göre; bu bakteriler, antibiyotik, toksin ve enzim gibi metabolik ürünlerin kullanıldığı endüstriyel alanlar için son derece önemli mikroorganizmalardır. Örneğin, çeşitli *Bacillus* türü bakterilerin ürettiği endüstriyel enzimlerden olan nötral proteazlar süt endüstrisinde, selüloz, lipaz ve amilazlar deterjan endüstrisinde sıklıkla tercih edilir (Ediz ve Beyatlı, 2005)

### **1.3 Bakteriyel Enzimler**

Enzimler 10 kDa ile 2000 kDa arasında değişen moleküler ağırlıklara sahip büyük makromoleküller olup, peptid bağları ile birbirine bağlanmış amino asitlerden oluşmaktadır (Okpara, 2022). Enzimler metabolik reaksiyonların kontrolünü sağlayarak, biyokimyasal reaksiyonların aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyonların daha hızlı bir şekilde gerçekleşmesini sağlayan ve reaksiyondan değişmeden çıkan protein yapılı biyomoleküllerdir (Kıran ve diğ, 2006). Ancak enzimler protein yapıda olduklarından dolayı yüksek sıcaklıklarda denatüre olup, etkinliklerini kaybedebilirler (Bhat, 2000; Tatar, 2007).

Enzimlerin etki ettiği maddeye substrat, reaksiyon tamamlandığında miktarında artış gözlenen ve oluşan yeni maddeye ise ürün denilmektedir (Şahan, 2018). Buna göre enzimler; substratların ürünlere dönüşüm hızını arttıran oldukça spesifik biyomoleküler katalizörler olarak da tanımlanabilir (Okpara, 2022). Enzim substrata etki etmeye dış yüzeyden başlayarak şeklini değiştirir ve böylece ürün açığa çıkar (Şahan, 2018).

Enzimatik işlemlerin genelde çevre dostu olmaları, düşük arıtım maliyetleri, yüksek verim ve işlem güvenliği nedeniyle enzim tabanlı işlemler ve enzimatik hidroliz, kimyasal katalizörlere kıyasla endüstriyel uygulamalarda daha çok tercih edilmektedir (Tripathi ve diğ., 2020). Son otuz yıl içerisinde birçok endüstriyel alanda uygulama alanı bulan enzimler, günümüzde yeni kullanım alanlarının ortaya çıkmasıyla giderek daha da önem kazanmaktadır. Buna göre enzimler; başta gıda, eczacılık, deterjan, tekstil ve kozmetik olmak üzere çok çeşitli endüstriyel alanda yaygın olarak kullanılmaktadır (Jaeger ve diğ., 1994; Pandey ve diğ., 1999; Singh ve diğ., 2016).

Reaksiyonları hızlı ve verimli bir şekilde gerçekleştirme yeteneğine sahip olan bakteriyel enzimler (Niyonzima, 2019); ekonomik, kolay ve yüksek miktarda elde edilebilmeleri, optimizasyon ve modifikasyonlarının kolaylığı, bitki ve hayvanlardan elde edilenlere kıyasla daha kararlı olmaları gibi nedenlerle de çeşitli endüstriyel alanlarda sıklıkla tercih edilir. Bakteriyel enzim üretimi için kullanılan hammadde ve enerjinin oldukça az olması hem bakteriyel enzime dayalı endüstriyel üretim sürecinin çevreye olan olumsuz etkisini hem de maliyeti önemli oranda azaltmaktadır (Vittaladevaram, 2017). Bu durum bakteriyel kaynaklı ticari enzimlere olan ilginin de her geçen gün artmasına ve böylece selülaz, glukoamilaz, katalaz, lakkaz, proteaz, lipaz ve amilaz gibi enzimlerin bakteriyel üretimine ve endüstriyel kullanımına olanak sağlamıştır (Gurung ve diğ., 2013; Singh ve diğ., 2016; Tripathi ve diğ., 2020).

### **1.3.1 Selülaz**

Selülazlar (EC 3.2.1.4) selüloz yıkımını katalize eden bir enzim grubu olup, bu enzimler selülozdaki  $\beta$ -1,4 bağlarını hidrolize ederler. Sebze ve meyve suyu endüstrisinde kullanılan selülazlar, meyve ve sebzelerden gelen ve bulanıklığa sebep olan selüloz ve hemiselülozun hidrolizinde kullanılır. Bu işlem sebze ve meyve sularının berraklaştırılması, stabilizasyonu ve toplam ürün verimini arttırmaktadır (Schülein, 2000; Okpara, 2022). Buna ilaveten bakteriyel selülazlar; kağıt ve kağıt hamuru üretiminde, kağıtların geri dönüşümü ve mürekkepten arındırılmasında, sindirilebilir hayvan yemi eldesinde, toprak

verimliliğinin iyileştirilmesinde ve ayrıca selülozik biyoetanolün geliştirilmesi gibi çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanılmaktadır (Imran ve diğ, 2016; Khoshnevisan ve diğ, 2019; Siqueira ve diğ, 2020).

### **1.3.2 Katalaz**

Katalaz (EC 1.11.1.6) aerobik organizmalarda üretilen bir enzim olup, hidrojen peroksitin su ve oksijene indirgenmesini katalize eden ve hidrojen peroksitin toksik etkilerine karşı hücreyi korumada kritik rol oynayan bir enzimdir (Goyal ve Basak, 2010). Bir katalaz enzim molekülü bir milyondan fazla hidrojen peroksit molekülünü parçalama kapasitesine sahip olduğu için en verimli çalışan enzimlerden biridir (Kaushal ve diğ, 2018).

Bakteriyel katalaz şarap yapım endüstrisinde şaraptan oksijeni uzaklaştırarak şarabın raf ömrünü uzatmak ve ayrıca şaraplardaki alkolü azaltmak için kullanılmaktadır. Ayrıca süt ürünlerinden peroksiti uzaklaştırarak sütün acılaşmasını önleyen katalaz enziminin süt endüstrisinde de kullanım potansiyeli bulunmaktadır (Okpara, 2022).

### **1.3.3 Lakkaz**

Lakkaz enzimi (EC 1.10.3.2) yapısında dört bakır iyonu bulunan çok bakırlı bir polifenol oksidaz olup, çok çeşitli organik ve inorganik substratların (mono-, di- ve polifenoller, aminofenoller, metoksifenoller, aromatik aminler ve askorbat) oksidasyonunu katalizler (Couto ve Herrera, 2006; Çamur, 2010; Birhanlı ve Yeşilada, 2017). Buna göre; lakkaz çok çeşitli substratlara etki edebilen ve çeşitli biyolojik fonksiyonlara sahip bir enzim grubu olarak ifade edilebilir (Bourbonnais ve Paice, 1990; Janusz ve diğ, 2020).

Lakkazlar bazı bitkiler, böcekler, mantar ve bakteri türleri tarafından üretilen enzimlerdir. Son derece geniş bir substrat özgüllüğüne sahip olan lakkazlar çeşitli ksenobiyotiklerin yıkımında, boyar madde içeren atık suların renginin gideriminde, gıda endüstrisinde fırınlama ve içecek işlemede, kağıt hamurundan lignin gideriminde, lakkaz tabanlı biyosensör yapımında, biyoyakıt hücresi geliştirmede, anti-kanser ilaçlarının üretiminde ve ayrıca çeşitli kozmetik ürünlerinin bileşeni olarak da kullanılabilir (Thurston, 1994; Couto ve Herrera, 2006; Mate ve Alcalde, 2015; Pezzella ve diğ, 2015; Birhanlı ve Yeşilada, 2017; Dana ve diğ, 2017; Singh ve Arya, 2019; Ashraf ve diğ, 2020).

#### 1.3.4 Proteaz

Proteazlar [serin proteaz (EC 3.4.21), sistein proteaz (EC 3.4.22), aspartik proteaz (EC 3.4.23) ve metalloproteaz (EC 3.4.24)] endüstriyel enzimlerin en önemli gruplarından biri olup, toplam enzim pazarının yaklaşık %60'ını oluşturmaktadır (Rao ve diğ, 1998; Zeikus ve diğ, 1998; Çaklı, 1999; Souza ve Martins, 2001; Singh ve diğ, 2001). Bu enzimler hidrolazlar ana grubuna dahil olup, proteolitik enzimler olarak da tanımlanabilirler (Daşdemir, 2017). Proteazlar, polipeptitlerin ve proteinlerin peptit birimlerinin amid bağlarını hidrolize eden enzimler olup, proteinler homeostasinin korunmasında önemli roller oynadığından proteazlar fizyolojik süreçlerin hayati düzenleyicileridir (Agbowuro ve diğ, 2018). Katalizledikleri reaksiyona bağlı olarak, proteazlar, tercihen peptit zincirlerinin iç bölgelerindeki peptit bağlarını hidrolize eden endopeptidazlar (proteinazlar) ve aktivitesi proteinlerin amino veya karboksil terminallerine yönelik olan ekzopeptidazlar olarak ikiye ayrılır (Wladyka ve Pustelny, 2008).

Proteaz enzimleri hayvanlar, bakteriler ve mantarlar dahil olmak üzere çeşitli organizmalar tarafından üretilse de hayvan ve mantar proteazlarıyla karşılaştırıldığında bakteriyel proteazlar en önemlisidir (Nascimento ve Martins, 2004; Lindsay ve diğ, 2017). Bakteriyel proteazlar, çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal fonksiyonlara sahip geniş ve çeşitli bir enzim grubunu içerir (Suleman, 2015). Biyokimya endüstrisinde çeşitli bileşiklerin sentezlenmesinde bakteriyel proteazlar büyük önem kazanmış olup, daha büyük bileşiklerin parçalanması için mukozal proteaz üretiminde özellikle *Bacillus* cinsinin üyesi bazı bakteri türleri kullanılmaktadır (Naureen ve diğ, 2021).

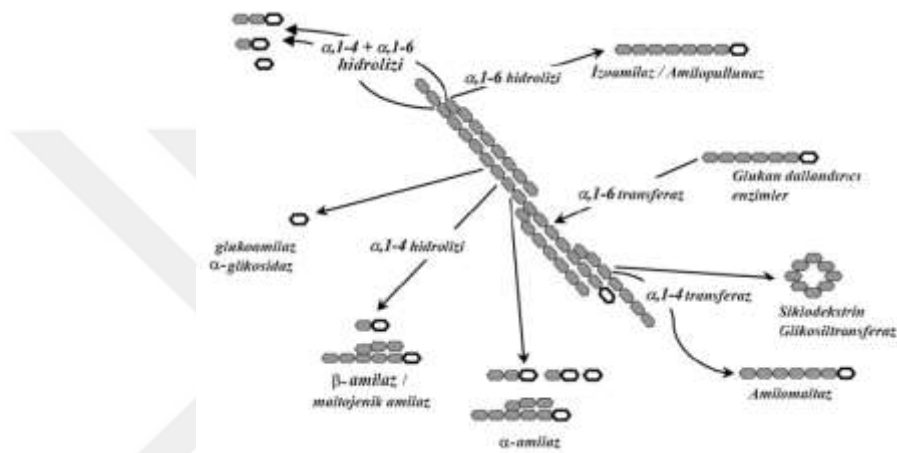
#### 1.3.5 Lipaz

Diğer adı triaçilgliserol hidrolazlar olan lipazlar (EC 3.1.1.3) memeliler, bitkiler, mantarlar ve bakteriler tarafından üretilen ve triaçilgliserollerin gliserol ve yağ asitlerine hidrolizini katalize eden enzimlerdir (Seren, 2013; Melani ve diğ, 2019). Her ne kadar farklı organizmalar tarafından üretimleri olsa da enzim teknolojisinin hızla ilerlemesi sonucu mikrobiyal lipazların endüstriyel düzeyde üretilmeleri ile biyoteknolojik uygulamalarda ve organik kimyada yaygın olarak kullanılan lipaz sınıfını temsil etmektedir (Arpigny ve Jaeger, 1999; Choudhury ve Bhunia, 2015; Javed ve diğ, 2018). Hücre dışına salgılanabilmeleri, genetik manipülasyonlarla üretimlerinin arttırılabilmesi ve diğerlerine kıyasla daha stabil olmalarından dolayı bakteriyel lipazlar çeşitli endüstriyel alanlarda geniş kullanım potansiyeline sahiptir (Nie ve diğ, 2006). Buna göre bu enzimler; gıda, ilaç,

biyoyakıt, deri, kozmetik, deterjan ve kimya endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. (Javed ve diğ, 2018; Melani ve diğ, 2019).

### 1.3.6 Nişasta hidrolizinden sorumlu enzimler

Nişasta'nın yapısında bulunan kimyasal bağları etkileyerek nişastayı hidroliz eden enzimler endoamilazlar, ekzoamilazlar, dallanma kırıcı enzimler ve transferazlar olmak üzere dört grup altında incelenmektedir (Şekil 1.1).



**Şekil 1.1** : Nişasta hidrolizinden sorumlu enzimler ve bu enzimlerin nişastayı hidrolizi sonucu oluşan ürünler (Maarel ve diğ, 2002).

Nişastayı zincir üzerinde rastgele hidrolize eden endoamilazlar nişasta içerisindeki  $\alpha$ -1,4 bağlarını hidrolize ederken, nişastayı indirgen olmayan uca yakın noktalardan hidrolize eden ekzoamilazlar nişastadaki  $\alpha$ -1,4 veya  $\alpha$ -1,6 bağlarını hidrolize etmektedir. Dallanma kırıcı enzimler sadece  $\alpha$ -1,6 bağlarını hidrolize ederek uzun doğrusal ürünler oluştururken, transferazlar ise  $\alpha$ -1,4-glikozidik bağlarını ayırarak yeni bir glikozidik bağ oluşumu için gerekli transferi sağlamaktadır (Baltaş 2012; Batur ve Aygan, 2015; Özbiçen, 2020).

Nişasta hidrolizinden sorumlu başlıca enzimler olan amilazlar, dünya enzim pazarının yaklaşık %25'ine sahip olan endüstriyel enzimlerdendir. Buna göre; amilazlar gıda, deterjan, ilaç, fermentasyon, tekstil ve kağıt gibi çok çeşitli endüstriyel alanlarda kullanım potansiyeline sahip en önemli enzimlerden biridir (Pandey ve diğ, 2000, Rajagopalan ve Krishnan, 2008; Dash ve diğ, 2015).

Amilazlar çeşitli bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar tarafından üretilebilen enzimler olup, istenen özellikte enzim elde edebilmek amacıyla mikroorganizmaların manipüle edilebilirliği ve ayrıca bitki ve hayvan amilazlarına göre mikrobiyal amilazların daha stabil

olmaları ve ekonomik olarak elde edilebilmeleri gibi nedenlerle mikrobiyal amilazlar diğerlerine kıyasla daha geniş bir endüstriyel uygulama alanına sahiptir (De Souza ve Magalhaes, 2010; Aboalvard, 2020; Naureen ve diğ, 2021). Amilazlar nişasta veya oligosakkarit molekülleri üzerine rastgele etki eden ve reaksiyon sonucu dekstrinler ile daha küçük glikoz birimlerinden oluşan polimerlerin oluşumuna neden olan hücre dışı enzimler grubunu ( $\alpha$ -amilaz,  $\beta$ -amilaz ve glukoamilaz) temsil etmektedir (Dash ve diğ, 2015).

### 1.3.6.1 Endoamilazlar

#### Alfa-amilazlar

Endoamilazlar ailesinde bulunan  $\alpha$ -amilazlar (EC 3.2.1.1) hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalarda yaygın olarak bulunan monomerik enzimlerdendir (Machius ve diğ, 1996; Brzozowski ve Davies, 1997; Roberts ve diğ, 2002). Diğer üretici organizmalara kıyasla mikroorganizmaların genetik mühendislik uygulamalarına daha elverişli olması ve gerektiğinde mikroorganizmaların modifiye edilerek zorlu ortam koşullarına dayanıklı ve yüksek verimli  $\alpha$ -amilazlar üretebilmeleri  $\alpha$ -amilaz üreticisi olarak mikroorganizmaları ön plana çıkarmaktadır (Sundarram ve Murthy, 2014).

Alfa-amilaz, endoamilaz ailesine ait  $\alpha$ -1,4-glikozidik bağların hidrolizi yoluyla nişasta ve glikojenin daha kısa oligosakkaritlere dönüşüm reaksiyonunu katalize etmektedir (Selen, 2006). Bu enzimin işlevi sonucu oluşan oligosakkaritler de çeşitli hücrel süreçlerde kullanılabilir (Naureen ve diğ, 2021). Alfa-amilazların moleküler ağırlıkları yaklaşık 10 ile 210 kDa arasında değişmekte olup (Sharma ve Satyanarayana, 2013; Paul, 2016), çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılan bakteriyel amilazlar daha çok *Bacillus* suşlarından elde edilmektedir. (Gupta ve diğ, 2003). Bakteriyel  $\alpha$ -amilazların optimum sıcaklık ve pH değerleri üretici organizmaya göre farklılık gösterebilmektedir. Bu durumda  $\alpha$ -amilazlar optimum aktivite gösterdikleri sıcaklığa göre; termofilik, mezofilik ve soğuk-aktif olmak üzere üç gruba ayrılmakta olup (Chen ve diğ, 2015),  $\alpha$ -amilazların optimum pH değerlerinin de genellikle pH 4 ile pH 7 arasında olduğu tespit edilmiştir (Bush ve diğ, 1989).

Alfa-amilazlar hücre içi ve hücre dışı formlarda bulunabilmekte olup, birçoğu metalloenzim yapısındadır. Bu enzimler yapısal bütünlüklerini, kararlılıklarını ve aktivitelerini korumak için  $\text{Ca}^{2+}$  gibi iyonlara ihtiyaç duymaktadır (Tanaka ve Hoshino, 2002; Xu ve diğ, 2018).  $\text{Ca}^{2+}$ 'nin amilazlara bağlanma ilgisi diğer metal katyonlarından

çok daha yüksek olup, amilazlar 1 ile 10 arasında değişen sayılarda bağlı  $Ca^{2+}$  iyonu içerebilmektedir (Sivaramakrishnan ve diğ., 2006). Alfa-amilazların substrat spesifikliği enzimin elde edildiği kaynağa göre değişkenlik gösterebilmekte olup, bu enzimlerin başlıca substratı nişasta olsa da amiloz, amilopektin, siklodekstrin, glikojen ve maltotrioz gibi maddeler de  $\alpha$ -amilazların etki edebildiği substratlar grubundadır (Aguilar ve diğ., 2000; Keskin, 2015; Güllü, 2020).

Alfa-amilaz ticari olarak kullanılan ilk enzim (Ölmez, 2017) olup, bu enzim gıda endüstrisinde nişastanın sıvılaştırılmasında kullanılmaktadır. Buna göre; nişastanın glikoza hidrolizasyonu sırasında çözünürlüğü yüksek ve şurup kıvamında olan dekstrin oluşmaktadır. Dekstrin gıdaların içerisine hem viskozite artırıcı dolgu maddesi hem de tatlandırıcı olarak katılabilmektedir (Tatar, 2007). Buna ilaveten; mikroorganizmalardan elde edilen  $\alpha$ -amilazlar fırıncılık endüstrisinde ekmeğin rengini, yumuşaklığını, kabarma hacmini ve raf ömrünü arttırmada da kullanılmaktadır (Mojsov, 2012). Alfa-amilazlar meyve suyu endüstrisinde, meyvelerin yapısında bulunan ve bulanıklığa neden olan nişastanın hidrolizasyonu ile berraklaştırma işlemleri için de kullanılmaktadır (Baltaş, 2012; Dehkordi ve Javan, 2012)

Enzimler günümüzde kullanılan hem çamaşır hem de bulaşık deterjanlarının yapısına katılarak deterjanların zor lekeleri çıkarma etkisini arttırmakta ve ayrıca çevre dostu olmalarına da katkıda bulunabilmektedir. Buna göre;  $\alpha$ -amilaz enzimi de patates, et suyu, muhallebi, çikolata gibi nişastalı gıdaların kalıntılarını dekstrinlere ve diğer küçük oligosakkaritlere ayırtırmak için çamaşır ve bulaşık deterjanlarında önemli bir kullanım potansiyeline sahiptir (Dehkordi ve Javan, 2012; Mojsov, 2012; Öztürk, 2013; De Souza ve Magalhaes, 2010; Sundarram ve Murthy 2014).

Alfa-amilaz enziminin tekstil endüstrisinde de önemli bir uygulama potansiyeli bulunmaktadır. Buna göre; dokuma sırasında kullanılan iplerin kopmaya karşı sağlam ve dirençli olmaları ve ayrıca ip üzerinde statik elektrik oluşmasının engellenmesi amacıyla iplerin sıcak nişasta ile kaplanmaları gerekmekte ve bu işleme de haşılama denilmektedir. Nişasta haşılama materyalleri içerisinde ucuz olması, kolayca temin edilebilmesi ve işlem sonrasında kolayca uzaklaştırılabilmesi gibi nedenlerle en çok tercih edilen haşıl materyalidir. Ancak tekstil ürünlerinin dokuma sonrası boyama işlemine girmeden önce nişastanın kumaştan uzaklaştırılması gerekmektedir. Haşıl alma (sökme) adı verilen bu süreçte liflere zarar vermeden nişastayı uzaklaştırdığı için en çok tercih edilen haşıl alma



ajanı olarak  $\alpha$ -amilazlar kullanılmaktadır (Feitkenhauer, 2003; De Souza ve Magalhaes, 2010; Dehkordi ve Javan, 2012; Sundarram ve Murthy, 2014; Patil ve diğ., 2022).

Alfa-amilaz enzimi pankreatik hastalıkların ve kanser tedavisinde indikatör özelliğe sahip bir enzim olup, hiperlipidemia, obezite, sindirim ve diyabet gibi hastalıkların tedavisinde de ilaç olarak kullanılmaktadır (Gurung ve diğ., 2013; Elmarzughi ve diğ., 2014; Ölmez, 2017).

### **1.3.6.2 Ekzoamilazlar**

#### **Beta-amilazlar**

Ekzoamilazlar ailesinde bulunan ve çeşitli mikroorganizmalar tarafından genelde hücre dışı formlarda üretilen  $\beta$ -amilazlar (EC 3.2.1.2) nişastanın yalnızca  $\alpha$ -1,4-glikozidik bağlarını hidrolize eder. Bu enzimler amilozun ve amilopektinin dış glikoz birimlerine karşı aktivite göstererek glikoz, maltoz ve  $\beta$ -dekstrinlerin oluşumunu sağlar ve ayrıca serbest maltoz birimlerinin anomerik konfigürasyonlarını  $\alpha$ 'dan  $\beta$ 'ya çevirebilirler (Higashihara ve Okada, 1974; Hyun ve Zeikus, 1985; Shen ve diğ., 1988; Pandey ve diğ., 2000; Tiwari ve diğ., 2015; Mehta ve Satyanarayana, 2016). Bu enzimler bira ve damıtma endüstrisinde fermentasyonda ve ayrıca yüksek maltoz şuruplarının üretimi için kullanılır (Sundarram ve Murthy, 2014).

#### **Glukoamilazlar (gama-amilazlar)**

Ekzoamilazlar ailesinde bulunan bir diğer enzim de glukoamilazlar (EC 3.2.1.3) olup, hem hücre içi hem de hücre dışı formlarda bulunabilir. Bu enzimler amiloz ve amilopektinin indirgeyici olmayan ucundaki son  $\alpha$ -1,4-glikozidik bağları parçalamaya ek olarak  $\alpha$ -1,6-glikozidik bağları da hidrolize ederek D-glikoz oluşumuna neden olur. Diğer amilaz formlarından farklı olarak,  $\gamma$ -amilazlar genelde asidik ortamlarda verimli olup, optimum pH değerinin pH 3.0 olduğu saptanmıştır (Dowhanick ve diğ., 1990; Gurung ve diğ., 2013; Tiwari ve diğ., 2015; Mehta ve Satyanarayana, 2016). Bu enzimler başta funguslar olmak üzere tüm canlı organizmalarda yaygın olarak bulunur ve gıda endüstrisinde yoğun uygulama potansiyeline sahiptir. Buna göre; bu enzimler fırıncılık endüstrisinde fırınlanmış ürünlerin kalitesini arttırmada ve hamurun bayatlamasını yavaşlatmada, şekerleme endüstrisinde yüksek glikoz ve/veya fruktoz şurubu ve ayrıca alkol üretiminde kullanılabilir (James ve Lee, 1997; Ford, 1999; Michelin ve diğ., 2008; Okpara, 2022).

### 1.3.6.3 Dallanma kırıcı enzimler

#### **Pullulanaz**

Hayvanlar, bitkiler, mantarlar ve bakteriler tarafından üretilebilen (Oğuzhan ve Yangılar, 2013) pullulanazlar (EC 3.2.1.41), glikozit hidrolaz üst ailesine ait enzimlerdir. Gıda, ilaç ve alkollü içecek endüstrilerinde uygulama potansiyeli olan bu enzimler amilopektin, nişasta, dekstrin, pullulan ve diğer oligosakkaritlerdeki dallı zincirin  $\alpha$ -1,6-glikozidik bağlarını ve ayrıca polisakkaritlerin  $\alpha$ -1,4-glikozidik bağları ile  $\alpha$ -1,6-glikozidik bağlarını hidrolize etmektedir. Buna göre; pullulanazlar dallanma giderici enzimler olarak da bilinmekte ve  $\alpha$ -1,6-glikozidik bağına olan ilgisi nedeniyle yüksek glikoz, maltoz, fruktoz şurubu ve nişastadan biyoetanol üretiminde de yoğun olarak kullanılmaktadır (Malakar ve diğ, 2010; Hii ve diğ, 2012; Akassou ve Groleau, 2019; Wang ve diğ, 2019).

#### **İzoamilaz**

Nişasta dönüştürücü enzimlerden olan izoamilaz (EC 3.2.1.68), glikojen, amilopektindeki  $\alpha$ -1,6-glikozidik bağlarını hidrolize eden ve uzun doğrusal polisakkaritler (amiloz ve oligosakkaritler) oluşturan dallanma giderici bir enzimdir (Abe ve diğ, 1999; Maarel ve diğ, 2002; Li ve diğ, 2013; Ferreira ve diğ, 2017).

### 1.3.6.4 Transferazlar

#### **Amilomaltaz**

Amilomaltaz (EC 2.4.1.25), bir  $\alpha$ -1,4-glukandan diğer bir  $\alpha$ -1,4-glukan veya glikoza glukan transferini katalize eden hücre içi bir enzim olup, çeşitli bakterilerde nişasta metabolizmasında görev almaktadır (Terada ve diğ, 1999; Rudeekulthamrong ve Kaulpiboon, 2020; Krusong ve diğ, 2022; Leoni ve diğ, 2022). Buna göre; 4- $\alpha$ -glukanotransferazlar olarak da adlandırılan bu enzimler  $\alpha$ -1,4-glukanların glikozidik bağlarını hidrolize ederler ve daha sonra da transfer işlemini katalize ederler. Amilomaltazlara olan ilgileri ve nişastayı modifiye etme yeteneklerinden dolayı gıda ve ilaç endüstrilerinde geniş uygulama alanlarına sahiptirler (Przylas ve diğ, 2000; Hansen ve diğ, 2008; Leoni ve diğ, 2021).

#### **Siklodekstrin glikoziltransferaz**

Siklodekstrin glikoziltransferaz (EC 2.4.1.19), glikozit hidrolazların  $\alpha$ -amilaz ailesine ait nişasta dönüştürücü hücre dışı ve mikrobiyal bir enzimdir. Bu enzim siklizasyon adı verilen intramoleküler transglikozilasyon reaksiyonu yoluyla nişastadan farklı tipte

siklodekstrinler ( $\alpha$ -,  $\beta$ - ve  $\gamma$ -siklodekstrin) oluşturabilen bir enzim olup, gıda, tarım, ilaç, kozmetik ve kimya endüstrilerinde geniş uygulamalara sahiptir (Veen ve diğ, 2000; Ramli ve diğ, 2010; Avcı ve Dönmez, 2012; Coelho ve diğ, 2016; Rojas ve diğ, 2019; Zhang ve diğ, 2019).

## **1.4 Amilaz Üretiminin Arttırılmasında Kullanılan Bazı İndükleyici Maddeler**

### **1.4.1 Ksiloz**

Odun, saman ve ağaç zambkı gibi maddelerin hemiselüloz yapısı içinde polimer şeklinde bulunan ksiloz, hemiselüloz hidrolizinden elde edilen bir aldopentoz şekeridir (Aytekin, 2006). Hemiselüloz biyokütle içeriğini büyük oranla oluşturan ksiloz, hemiselülozların kuru ağırlığının %23 ile %32'sini oluşturur (Fındık, 2017). Kapalı formülü  $C_5H_{10}O_5$  şeklinde olan ve odun şekeri olarak da adlandırılan ksiloz; mısır koçanı, kepek ve ayrıca kiraz, şeftali, armut ve erik gibi meyvelerin yapısında da bulunmaktadır (Halıcı, 2013; Tarhan, 2017).

### **1.4.2 Glikoz**

Üzüm şekeri, kan şekeri ve dekstroz gibi çeşitli isimlerle adlandırılan glikoz; aldehit grubuna sahip olduğu için aldoheksoz olarak da isimlendirilen ve kapalı formülü  $C_6H_{12}O_6$  olan bir şekerdir. Glikoz; fotosentez ve solunum süreçlerinde enerji rezervi ve metabolik yakıt olarak görev alması nedeniyle canlılar için son derece önemli şekerlerin başında gelir. Renksiz, kokusuz ve kristal halde olan glikoz; suda kolaylıkla çözünen ve canlılarda temel enerji kaynağı olmasının yanı sıra hem disakkaritlerin hem de polisakkaritlerin yapılarında bulunan bir şeker türüdür (Scheepers ve diğ, 2004; Galant ve diğ, 2015; Erboğa, 2016; Tarhan, 2017).

### **1.4.3 Laktoz**

Süt şekeri olarak da tanımlanan ve sütün ana karbonhidratı olan laktoz; sütteki yağsız kuru madde içeriğinin %54'ünü oluşturmaktadır. Disakkarit yapıda olan bu şeker türü glikoz ve galaktoz gibi iki monosakkaritin glikozit bağı ile birleşmesi sonucu meydana gelir ve suda yavaş çözünen bir özelliğe sahiptir (Ersan ve diğ, 2016; Tarhan, 2017; Taner, 2021; Işık, 2022). Kalsiyum, magnezyum ve mangan gibi minerallerin emilimini de kolaylaştıran laktozun endüstriyel üretimi neredeyse 100 yıldan fazla zaman önce başlamış olup, bugün

gıda endüstrisinde kullanımı oldukça yaygın bir şeker türüdür (Tarakçı ve Küçüköner, 2005; Mercan 2022).

#### **1.4.4 Maltoz**

Maltobiyoz ya da malt şekeri olarak da bilinen ve bir karbonhidrat türü olan maltoz, iki glikoz biriminin glikozidik bağ ile bağlandığı doğal bir disakkarit olup,  $\alpha$ -glikozidaz enzimi varlığında da yeniden glikoz birimlerine dönüştürülmektedir. Doğada serbest halde bulunmayan ve oldukça tatlı bir karbonhidrat türü olan maltoz, nişastanın asitlerle veya enzimlerle hidrolizi sonucu oluşmaktadır. Organik bir bileşik olan maltoz filizlenmiş arpada ve çeşitli fermente gıdalarda yaygın olarak bulunmakta olup, endüstriyel uygulamalarda çoğunlukla tatlandırıcı ve dispersiyon maddesi olarak kullanılmaktadır (Shirokane ve diğ., 2000; Yenil ve diğ., 2009; Erboğa, 2016; Yücel, 2017).

#### **1.4.5 Sükroz**

Sükroz çay şekeri veya sakkaroz olarak da adlandırılan ve kapalı formülü  $C_{12}H_{22}O_{11}$  olan bir karbonhidrat türüdür. Bir glikoz ve bir fruktozun glikozidik bağ ile bağlanması sonucu oluşan sükroz bir disakkarit olup, meyve ve sebzelerde en çok bulunan şeker türüdür. Saf sükroz kristalli yapıda, beyaz, kokusuz ve tatlıdır. Sükroz genellikle şeker pancarı ve şeker kamışında ayrıca yeşil bitkilerin yaprak ve gövdelerinde, meyve (şeftali, elma, fıstık), kök ve rizomlarında (tatlı patates, soğan, pancar) olmak üzere doğada yaygın bir şekilde bulunmaktadır (Güldane, 2014; Uçan, 2014; Erboğa, 2016; Tarhan, 2017). Sükroz, gıda endüstrisi başta olmak üzere çeşitli endüstrilerde yaygın olarak tercih edilen bir karbonhidrat türüdür (Güldane, 2014).

#### **1.4.6 Nişasta**

Nişasta fotosentez yoluyla bitkiler tarafından üretilen birçok glikoz molekülünün farklı şekillerde bağlanması ve amiloplastidlerde biriktirilmesi sonucu oluşan ve suda çözünmeyen bir polisakkarittir (Öztürk, 2013; Ölmez, 2017; Güllü, 2020). Bir depo polisakkariti olan nişasta, glikoz moleküllerinin  $\alpha$ -D-(1,4) ve  $\alpha$ -D-(1,6) glikozidik bağlarıyla bağlanması sonucu oluşmaktadır.

Nişastanın iki yapısal ana bileşeni olup, bunlar amilopektin ve amilozdur. Amilopektin, glikoz monomerlerinin  $\alpha$ -D-(1,4) ve  $\alpha$ -D-(1,6) glikozidik bağlarıyla bir araya gelmesi sonucu oluşan dallanmış yapıya büyük bir molekül olup, nişastanın ana bileşenidir. Amiloz ise glikoz monomerlerinin  $\alpha$ -D-(1,4) glikozidik bağlarıyla bir araya gelmesi sonucu oluşan

doğrusal bir polimer olup, nişastanın %15 ile %20'sini oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalarda amilozun iyotla mavi renkte bir kompleks oluşturduğu, amilopektinin ise menekşe renkli bir kompleks meydana getirdiği saptanmıştır (Özlu, 2013; Yalçın ve diğ., 2020).

Pirinç, mısır, tapyoka, buğday ve patates gibi bitkiler önemli nişasta kaynakları olsa da, bunlar dışında birçok bitkinin yapraklarında, tohumlarında, köklerinde ve yumrularında da bol miktarda nişasta depolanmaktadır (Çinçik, 2016). Granüller halinde depolanan nişasta, bitkilerde dormansi (uyku) ve yeniden gelişme dönemlerinde enerji kaynağı olarak kullanılır. Nişasta insan beslenmesinde de temel gıda ve enerji kaynağı olarak kullanılmakta olup, bunun dışında gıda endüstrisinde jelleştirme, kıvam arttırma, yapıştırma, nem tutma ve stabilize etme gibi amaçlarla katkı maddesi olarak da kullanılmaktadır (Öztürk, 2013; Demirkese, 2015; Yaşar, 2017; Özbiçen, 2020).

Hem ucuz hem de doğal bir materyal olması, enzim veya kimyasal modifikasyonlar ile fizikokimyasal özelliklerinin kolayca değiştirilebilmesi nedenleriyle nişasta çok yönlü ve kullanışlı bir polimerdir. Buna göre; nişasta kağıt ve tekstil endüstrileri için de son derece önemli bir organik bileşiktir (Jobling, 2004; Özbiçen, 2020).

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

### 2.1 Bakteriyel Amilaz Üretiminin Optimizasyonuna Yönelik Çalışmalar

Amilazlar çeşitli organizmalar (bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar) tarafından üretilen enzimler olup, diğer amilazlara kıyasla ekonomik olarak üretilibilmeleri ve daha kararlı olmalarından dolayı mikrobiyal amilazlar geniş bir endüstriyel uygulama potansiyeline sahiptir (De Souza ve Magalhaes, 2010; Aboalvard, 2020; Naureen ve diğ., 2021). Bu nedenle birçok araştırmacı hem farklı bakteriyel türlerde amilaz enziminin varlığını saptamaya hem de üretilen amilazların miktarını en üst seviyelere çıkarmaya yönelik çalışmalar yapmaktadır.

#### 2.1.1 İnkübasyon sıcaklığının optimizasyonuna yönelik çalışmalar

Hashemi ve diğ. (2013) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada;  $\alpha$ -amilaz üretimi için *Bacillus* sp. KR-8104 suşu farklı sıcaklık değerlerinde inkübasyona bırakılmıştır. Yapılan sıcaklık optimizasyonu çalışmalarında araştırmacılar 30 ile 45 °C arasındaki sıcaklık değerlerini test etmiş ve çalışmalarda kullanılan suş için optimum inkübasyon sıcaklık değerini de 37 °C olarak saptamışlardır. Buna göre; optimum koşullarda (37 °C, 180 rpm ve 48 saat) elde edilen maksimum amilaz aktivitesi 3824 U/L iken, 30 °C'de saptanan enzim aktivitesi 662 U/L'ye düşmüştür.

*Bacillus amyloliquefaciens subsp. amyloliquefaciens* kullanılarak yapılan bir çalışmada kullanılan bakteri türünün üreme ortamına %1-5 oranlarında tarımsal atıklar eklenmiş ve optimum  $\alpha$ -amilaz üretimi için 28-32 °C inkübasyon sıcaklık değerleri test edilmiştir. Dalga boyu olarak 540 nm'nin kullanıldığı spektrofotometrik absorbans ölçümleri ve enzim aktivite hesaplamaları neticesinde *Bacillus amyloliquefaciens subsp. amyloliquefaciens*'in en yüksek enzim aktivitesinin 33.27 °C'de gerçekleştiği belirlenmiştir. Buna göre; bu sıcaklık değerindeki en yüksek amilaz aktiviteleri süneli buğday ve kırık pirincin kullanıldığı ortamlarda sırasıyla 5.20 ve 4.99 U/mL olarak ifade edilmiştir (Velioğlu ve Çelikyurt, 2016).

Yassin ve diğ. (2021) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, toprak örneklerinden termostabil amilaz üreten toplam 49 bakteri izolatu elde edilmiştir. Yapılan morfolojik ve

biyokimyasal analizler sonucunda izolatların *Bacillus* cinsine ait oldukları saptanmıştır. Araştırmacılar bu çalışmada üç izolatın (M2, M8 ve M13) amilaz üretimi üzerine yoğunlaşmış ve amilaz aktivitesini çözümlü nişastadan indirgeyici şekerin salınımının ölçülmesi yoluyla belirlemişlerdir. Optimum inkübasyon sıcaklığının belirlenmesine yönelik çalışmalarda test edilen üç bakteri izolatı çeşitli sıcaklık değerlerinde (50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ve 100 °C) inkübe edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; üç bakteri izolatının en yüksek amilaz aktivitelerinin gerçekleştiği optimum inkübasyon sıcaklık değerinin 55 °C olduğu tespit edilmiştir. Buna göre; en yüksek amilaz aktivite değerleri M2 izolatı için 0.73 U/mL, M8 izolatı için 0.74 U/mL ve M13 izolatı için de 0.67 U/mL olup, inkübasyon sıcaklığının artmasına bağlı olarak her üç izolatın amilaz aktivitelerinde kademeli azalışlar gerçekleşmiştir.

### **2.1.2 Çalkalama hızının optimizasyonuna yönelik çalışmalar**

Hashemi ve diğ. (2011) yaptıkları çalışmada *Bacillus* sp. KR-8104 suşunun Ca-bağımsız ve düşük pH'larda aktif olan  $\alpha$ -amilaz üretimini araştırmıştır. Buna göre; araştırmacılar farklı inkübasyon sürelerinin (0-72 saat) ve çalkalama hızlarının (140-200 rpm) enzim üretimi üzerine etkilerini test etmiş olup, elde edilen bulgular doğrultusunda optimum inkübasyon süresini 48 saat ve optimum çalkalama hızını ise 180 rpm olarak belirlemişlerdir. Buna göre; araştırmacılar optimum koşullarda yaptıkları inkübasyon sonucunda elde edilen  $\alpha$ -amilaz enziminin en yüksek aktivitesinin 2804 U/L olduğunu rapor etmiştir.

Simair ve diğ. (2017) tarafından yürütülen bir çalışmada fermentasyon koşullarının optimize edilmesine yönelik çalışmalara odaklanılmış ve termofilik bir bakteri türü olan *Bacillus* sp. BCC 01-50'nin  $\alpha$ -amilaz üretimi artırılmaya çalışılmıştır. Bu amaç doğrultusunda; test edilen bakteri suşunun üreme ortamına farklı karbon kaynakları (glikoz, hurma şurubu, şeker kamışı, fruktoz, nişasta, laktoz, galaktoz ve sükroz) eklenmiş ve kullanılan karbon kaynakları arasında şeker kamışının en yüksek  $\alpha$ -amilaz üretimine sebep olduğu bulunmuştur. Buna ilaveten; araştırmacılar üreme ortamına çeşitli organik ve inorganik bileşikler (potasyum nitrat, amonyum klorit, sodyum nitrat, üre, maya özü, tripton, sığır eti özü ve pepton) eklemiş ve bu azot kaynakları arasında en yüksek enzim üretimine neden olan azot kaynağının sığır eti özü olduğunu belirlemişlerdir. Yapılan çalışmada farklı inkübasyon sıcaklıklarının (30-60 °C), başlangıç pH'larının (pH 5.0-11.0), çalkalama hızlarının (20-220 rpm) ve inkübasyon sürelerinin (12-120 saat)  $\alpha$ -amilaz üretimine etkileri de araştırılmış olup, en yüksek enzim aktivitesinin (4500 U/mL) şeker

kamışı kullanılan ortamda 50 °C, pH 8.0, 150 rpm ve 60 saat inkübasyon sonucunda elde edildiği saptanmıştır.

Sıcaklığı 82 °C, pH değeri 6.5 olan bir kaplıcadan izole edilen *B. licheniformis*-AZ2 suşunun kullanıldığı bir çalışmada çeşitli çalkalama hızlarının (50, 100, 150, 200, 250 ve 300 rpm)  $\alpha$ -amilaz üretimi üzerine etkisi araştırılmış olup, yapılan enzim aktivite ölçümleri sonucunda en yüksek enzim aktivitesinin 100 rpm çalkalama hızında  $17.66 \pm 0.87$  U/mL olduğu tespit edilmiştir (Deljou ve diğ, 2018).

### **2.1.3 Ortam pH'sının optimizasyonuna yönelik çalışmalar**

Yeni izole edilmiş *Bacillus pumilus* VITMDS2 suşunun hem batık hem de katı hal fermentasyonu ile  $\alpha$ -amilaz üretiminin gerçekleştirildiği bir çalışmada en yüksek enzim üretiminin gerçekleştirildiği inkübasyon koşulları araştırılmıştır. Bu amaç doğrultusunda farklı inkübasyon süreleri (24-96 saat), inkübasyon sıcaklıkları (20-40 °C) ve ortam pH'ları (6.0-8.0) test edilmiş ve bu koşullar arasındaki optimum şartların 72 saat, 30 °C ve pH 7.0 olduğu tespit edilmiştir. Tespit edilen optimum koşullar altında saptanan en yüksek amilaz aktivite değerinin de 3.9 U/mL olduğu rapor edilmiştir (Mohanasinivasan ve diğ, 2014).

Avcı ve diğ. (2016) tarafından yürütülen bir çalışmada patates yetiştirilen bir alanın toprağından *Bacillus* sp. ZBP10 suşu izole edilmiş ve bu bakteri suşunun derin kültür fermentasyonu ile amilaz üretim çalışmaları yapılmıştır. Buna göre araştırmacılar; çalışılan bakteri suşunun amilaz üretimini arttırabilmek amacıyla çeşitli inkübasyon sıcaklıklarını (30-40 °C), fermentasyon sürelerini (24-72 saat) ve ortam pH'larını (6.0-9.0) test etmiştir. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda en yüksek amilaz üretimi 33 °C inkübasyon sıcaklığında, 48 saat inkübasyon süresinde ve pH 7.0'a ayarlanmış ortamda gerçekleşmiş olup, bu koşullarda elde edilen en yüksek amilaz aktivitesi  $3.57 \pm 0.19$  U/mL olarak saptanmıştır.

Naranchimeg ve diğ. (2019) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada kültür koşullarının (inkübasyon sıcaklığı, ortam pH'sı ve inkübasyon süresi) *Bacillus subtilis* M4 mutant suşunun amilaz üretimi üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu amaç doğrultusunda; farklı inkübasyon sıcaklıkları (20-45 °C), ortam pH'ları (pH 5.0-10.0) ve inkübasyon süreleri (24-120 saat) test edilmiştir. Yapılan enzim aktivite ölçümleri sonucunda; optimum inkübasyon sıcaklığı olarak saptanan 35 °C'deki amilaz aktivitesinin 0.557 U/mL, optimum pH olarak belirlenen ve pH 7.0'a ayarlanmış ortamdaki amilaz aktivitesinin 0.646



U/mL, optimum inkübasyon süresi olarak tespit edilen 72 saatlik inkübasyon sonrası elde edilen amilaz aktivitesinin ise 0.799 U/mL olduğu saptanmıştır.

Farklı coğrafik bölgelere ait toprak örneklerinden izole edilen *Bacillus cereus* ve *Bacillus licheniformis* suşlarının amilaz üretim yeteneklerinin araştırıldığı bir çalışmada test edilen bakteri suşları farklı pH değerlerine (pH 2.0-10.0) sahip ortamlarda inkübe edilmiştir. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda hem *Bacillus licheniformis* hem de *Bacillus cereus* için optimum ortam pH'sının pH 8.0 olduğu saptanmıştır. Araştırmacılar bu ortamdan elde edilen en yüksek amilaz aktivite değerlerinin *Bacillus licheniformis* için 15.959 U/mL, *Bacillus cereus* içinse 247.20 U/mL olduğunu belirtmiştir (Rakaz ve diğ, 2021).

#### **2.1.4 İnkübasyon süresinin optimizasyonuna yönelik çalışmalar**

Mohanasrinivasan ve diğ, 2014 tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada *Bacillus pumilus* VITMDS2 suşunun hem batık hem de katı hal fermentasyonu ile  $\alpha$ -amilaz üretimi araştırılmıştır. Enzim üretiminin artırılması amacıyla araştırmacılar 24, 48, 72 ve 96 saat gibi farklı inkübasyon sürelerini test etmiş ve optimum inkübasyon süresini 72 saat olarak saptamışlardır. Tespit edilen optimum inkübasyon süresinde elde edilen en yüksek amilaz aktivite değerinin de 3.9 U/mL olduğu ifade edilmiştir.

Deniz yosunundan izole edilen *Halomonas meridiana* VITSVRP14 bakteri suşunun kullanıldığı bir çalışmada optimum amilaz üretiminin gerçekleştiği inkübasyon süresini saptamak amacıyla 8, 12, 24, 36 ve 48 saat gibi farklı inkübasyon süreleri test edilmiş olup, optimum inkübasyon süresinin 24 saat olduğu saptanmıştır. Buna göre; *Halomonas meridiana* VITSVRP14 suşunun 24 saat inkübasyonu sonucunda elde edilen en yüksek amilaz aktivitesinin 5.16 U/mL olduğu rapor edilmiştir (Veerakumar ve Manian, 2022).

*B. amyloliquefaciens* ATCC 23350, *B. licheniformis* ATCC 14580 ve *B. megaterium* ATCC 14581'in amilaz üretim yeteneklerinin araştırıldığı bir çalışmada çalışılan bakteri türlerinin en yüksek  $\alpha$ -amilaz üretimini saptamak için farklı inkübasyon süreleri test edilmiştir. Buna göre; kullanılan üç farklı *Bacillus* türünün amilaz üretimlerini arttırmak amacıyla çeşitli inkübasyon süreleri (24-120 saat) test edilmiştir. Yapılan çalışmalardan elde edilen bulgulara göre; *B. amyloliquefaciens* ATCC 23350, *B. licheniformis* ATCC 14580 ve *B. megaterium* ATCC 14581'in en yüksek amilaz aktiviteleri 48 saat inkübasyon süresinde saptanmıştır. Optimum koşulda bu üç bakteri türünün en yüksek amilaz aktiviteleri sırasıyla  $0.465\pm 0.004$  U/mL,  $0.132\pm 0.006$  U/mL ve  $0.028\pm 0.001$  U/mL'dir (Rodrigo ve diğ, 2022).

### 2.1.5 Pirinç tozunun optimizasyonuna yönelik çalışmalar

Farklı bitkisel materyallerin (nişasta, pirinç tozu, buğday tozu ve ragi tozu) iki farklı bakteri suşunun (*Bacillus licheniformis* MTCC 2617 ve *Bacillus licheniformis* MTCC 2618) amilaz üretim yeteneği üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada her iki bakteri suşu da test edilen maddelerle ayrı ayrı 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası elde edilen bulgulara göre; *Bacillus licheniformis* MTCC 2617'nin nişasta, pirinç tozu, buğday tozu ve ragi tozu içeren ortamlardaki en yüksek amilaz aktiviteleri sırasıyla 2.59 U/mL, 2.4 U/mL, 2.23 U/mL ve 0.89 U/mL olarak saptanmıştır. Benzer şekilde *Bacillus licheniformis* MTCC 2618'in aynı ortamlardaki en yüksek amilaz aktiviteleri ise sırasıyla 3.64 U/mL, 2.93 U/mL, 2.67 U/mL ve 2.36 U/mL olarak tespit edilmiştir (Divakaran ve diğ, 2011).

Paul ve diğ. (2020) tarafından yapılan bir çalışmada hem pirinç kepeğinin hem de farklı inkübasyon koşullarının *Bacillus tequilensis* TB5'in  $\alpha$ -amilaz üretim potansiyeli üzerine etkisi araştırılmıştır. Elde edilen deneysel sonuçlara göre; en yüksek  $\alpha$ -amilaz aktivitesinin pH 6.0'ya ayarlanmış pirinç kepeği ortamında 37 °C, 72 saatlik inkübasyon sonrasında 39.736±0.296 U/mL olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar gerçekleştirilen bu çalışma sonucunda pirinç kepeğinin  $\alpha$ -amilaz üretiminde kullanılabilir verimli bir tarımsal atık olduğunu ifade etmiştir.

### 2.1.6 Ham patates optimizasyonuna yönelik çalışmalar

Shukla ve Kar (2006) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada öncelikle fermente buğday kepeği ve muz atıklarından *B. licheniformis* ve *B. subtilis* izole edilmiştir. İzole edilen bakteri türlerinin  $\alpha$ -amilaz üretim yeteneklerini arttırabilmek amacıyla her iki bakteri türü de buğday kepeği ve patates kabuğu içeren ortamlarda ayrı ayrı inkübe edilmiştir. Gerçekleştirilen katı hal fermentasyonu ile elde edilen amilaz enzimlerinin aktivitelerinin saptanması sonucu buğday kepeğine kıyasla patates kabuğunun enzim üretimi açısından daha verimli bir substrat olduğu saptanmıştır. Optimum koşullar altında, *B. licheniformis* suşunun patates kabuğu ve buğday kepeği ortamlarında inkübasyonu sonucu elde edilen  $\alpha$ -amilaz aktiviteleri sırasıyla 270 U/mL ve 175 U/mL'dir. Aynı ortamlarda *B. subtilis*'ten elde edilen amilaz aktiviteleri ise sırasıyla 600 U/mL ve 265 U/mL'dir.

Jadhav ve diğ. (2013), tarafından yapılan bir çalışmada *Bacillus subtilis*, BS9 ve PB1 bakteri suşları %50 patates kabuğu özütü içeren ortamlarda farklı inkübasyon sürelerinde (24, 48 ve 72 saat) inkübe edilmiştir. Yapılan amilaz aktivite ölçümleri sonucunda en

yüksek enzim aktivitesi (0.8 U/mL) *Bacillus subtilis*'in 48 saatlik inkübasyonu sonucu elde edilmiştir.

Deshmukh ve Pande (2022) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada *Bacillus* sp. UEB-S suşunun amilaz üretim potansiyelini arttırmak için ortama farklı oranlarda patates kabuğu ilave edilmiş ve test edilen bakteri suşu bu ortamlarda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası en yüksek amilaz aktivitesinin (9.75 U/mL) 10 g/L konsantrasyonunda patates kabuğu içeren ortamdaki elde edildiği rapor edilmiş olup, 10 g/L' nin üzerinde patates kabuğu içeren ortamlardan elde edilen enzimlerin aktivite ölçümleri sonucunda amilaz aktivitesinde azalış gerçekleştiği tespit edilmiştir.

Amilaz üretici organizma olarak *Bacillus subtilis* BS1934'ün kullanıldığı bir çalışmada; test edilen bakteri suşu elma ve patates kabuğu içeren ortamlara ayrı ayrı inoküle edilmiş ve bu ortamlarda gerçekleştirilen katı hal fermentasyonu sonucu elde edilen amilaz aktiviteleri saptanmıştır. Buna göre; test edilen bakteri suşunun 50 °C'deki 8 günlük inkübasyonu sonunda verimli bir şekilde  $\alpha$ -amilaz ürettiği saptanmıştır. Araştırmacılar test edilen bakteri suşunun elma kabuğu içeren ortamda inkübasyonu sonucu saptanan amilaz aktivitesinin 17468 U/L, patates kabuğu içeren ortamda inkübasyonu sonucu belirlenen amilaz aktivitesinin ise 5229 U/L olduğunu ifade etmiştir (Singh ve diğ., 2022).

### **2.1.7 Çeşitli indükleyici maddelerin optimizasyonuna yönelik çalışmalar**

Hassan ve diğ. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada hem farklı kültür ortamlarının hem de inkübasyon koşulları ve çeşitli azot ile karbon kaynaklarının *Escherichia coli*'nin amilaz üretim yeteneği üzerine etkileri araştırılmıştır. Buna göre araştırmacılar öncelikle sentetik ortam, nutrient broth, yeast ekstrakt broth ve Luria broth gibi çeşitli kültür ortamlarının amilaz üretimi üzerine etkilerini araştırmış ve en yüksek amilaz aktivitesinin (0.812 U/mL) elde edildiği ortamın sentetik ortam olduğunu saptamışlardır. Yapılan çalışmanın bir sonraki aşamasında ise; farklı inkübasyon periyotları (24-96 saat), inkübasyon sıcaklıkları (10-50 °C) ve ortam pH'larının (4-9) amilaz üretimi üzerine etkileri araştırılmış ve en yüksek amilaz üretiminin 48 saatlik inkübasyonda, 30 °C inkübasyon sıcaklığında ve pH 7'de gerçekleştiği saptanmıştır. İnkübasyon koşullarının optimizasyonu üzerine yapılan çalışmalardan sonra farklı azot kaynaklarının (amonyum nitrat, amonyum sülfür, üre, amonyum klorit ve pepton) amilaz üretimi üzerine etkileri test edilmiş ve en yüksek amilaz aktivitesinin (0.767 U/mL) amonyum sülfür içeren ortamda saptandığı rapor edilmiştir. Bu çalışmaların sonrasında da indükleyici olarak farklı karbon

kaynaklarının (sükroz, nişasta, laktoz, fruktoz ve glikoz) amilaz üretimi üzerine etkileri araştırılmış ve en yüksek amilaz aktivitesi nişasta içeren ortamda 0.837 U/mL olarak tespit edilmiştir.

Msarah ve diğ. (2020) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada farklı termofilik *Bacillus* suşlarının  $\alpha$ -amilaz üretim yetenekleri ve optimum inkübasyon şartları araştırılmıştır. Buna göre; çeşitli inkübasyon sıcaklıkları (35-85 °C), ortam pH'ları (pH 3.0-11.0) ve indükleyici madde olarak da çeşitli karbonhidratlar (glikoz, sükroz ve nişasta) test edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; araştırmacılar izole ettikleri *Bacillus* suşları arasında amilaz üretim potansiyeli en yüksek olan suşların *Bacillus licheniformis* HULUB1 ve *Bacillus subtilis* SUNGB2 olduğunu saptamış olup, her iki bakteri suşunun da optimum sıcaklık değeri olarak 65 °C, pH değeri olarak pH 6.0, en yüksek amilaz aktivitesinin elde edildiği karbon kaynağının da nişasta olduğu saptanmıştır. Buna göre; optimum koşullardaki en yüksek  $\alpha$ -amilaz aktivitesi *B. licheniformis* HULUB1 için 18.15 U/mL iken, *B. subtilis* SUNGB2 için de 22.14 U/mL'dir.

KS-1 (*Bacillus subtilis*), RS-1 (*Bacillus licheniformis*) ve KL-2 (*Bacillus cereus*) izolatları kullanılarak yapılan bir çalışmada, test edilen üç bakteri türünün amilaz üretim yeteneklerinin artırılması amacıyla farklı inkübasyon sıcaklıkları (25-55 °C), inkübasyon zamanları (24-96 saat), ortam pH'ları (pH 5.0-8.0) ve indükleyici olarak da karbon ve azot kaynakları (fruktoz, sükroz, nişasta, maya ekstraktı, amonyum nitrat ve sodyum nitrat) test edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda test edilen bakteri türlerinin en yüksek enzim üretimlerinin gerçekleştiği optimum inkübasyon sıcaklıklarının, inkübasyon zamanlarının, ortam pH'larının ve indükleyicilerin değişkenlikler gösterebildiği saptanmıştır. Buna göre; *B. licheniformis*'in en yüksek enzim aktivitesinin (5.67 U/mL) saptandığı inkübasyon koşulları nişasta içeren ortamda 50 °C, 48 saat ve pH 7.0 iken, *B. subtilis*'in en yüksek enzim aktivitesinin (3.61 U/mL) belirlendiği koşullar maya ekstraktı içeren ortamda 50 °C, 48 saat ve pH 7.0'dir. Test edilen diğer bakteri türü olan *B. cereus*'un en yüksek amilaz aktivitesinin (3.89 U/mL) saptandığı koşullar ise nişasta içeren ortamda 50 °C, 48 saat ve pH 7.0 olarak tespit edilmiştir (Bello ve diğ, 2021).

### **2.1.8 Çeşitli indükleyici maddelerin karışımlarının optimizasyonuna yönelik çalışmalar**

Yaraş ve diğ. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada amilaz üretici organizma olarak *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-645, substrat olarak da soya küspesi, buğday kepeği,

peynir altı suyu, mısır proteini kombinasyonları kullanılarak test edilen bakteri suşunun  $\alpha$ -amilaz üretim yeteneği araştırılmıştır. Yapılan çalışmada araştırmacılar 20 g/L soya küspesi+10 g/L mısır proteini, 20 g/L soya küspesi+5 g/L buğday kepeği, 20 g/L soya küspesi+%5 peynir altı suyu içeren ortamların pH değerlerini pH 7.0'a ayarladıktan sonra test edilen bakteri suşunu bu ortamlara inoküle etmiş ve 37 °C, 150 rpm'de inkübe etmiştir. İnkübasyon sonrası elde edilen amilaz aktiviteleri sırasıyla 2540 U/mL, 3018 U/mL ve 2954 U/mL olarak saptanmıştır. Çalışmanın bir başka aşamasında üreme ortamına 20g/L soya küspesi, 5 g/L buğday kepeği, %5 peynir altı suyu, 1g/L pepton, 0.5 g/L maya özütü ve 1g/L diamonyum sülfat eklenmiş ve kullanılan 33 °C, 150 rpm çalkalama hızında 48 saat inkübe edilmiştir. Bu zengin içerikli ortamda yapılan inkübasyon sonrası gerçekleştirilen enzim aktivite ölçümünde 4257 U/mL gibi oldukça yüksek bir enzim aktivitesi elde edilmiş olup, bu durum birden fazla indükleyici maddenin karışımının amilaz üretimine olan sinerjistik etkisini göstermektedir.

Lolasi ve diğ. (2018) tarafından yürütülen bir çalışmada halotolerant bir bakteri olan *Nesterenkonia* sp. F suşunun amilaz üretim kapasitesi araştırılmış ve enzim üretimini arttırmak için öncelikle bakteri suşunun üreme ortamına farklı konsantrasyonlarda (5, 10 ve 20 g/L) nişasta eklenmiş ve bu ortamlardaki en yüksek amilaz aktivitesinin 20 g/L nişasta içeren ortamda 163 U/mL olarak saptandığı rapor edilmiştir. Araştırmacılar test edilen bakteri suşunun amilaz aktivitesini arttırmak amacıyla bakteri üreme ortamına ayrı ayrı iki farklı sürfektan (Tween 20 ve Tween 80) da ilave etmiştir. Elde edilen bulgulara göre; sürfektan içermeyen ortamdaki amilaz aktivitesi 60.8 U/mL iken, Tween 20 ve Tween 80 ilave edilmiş ortamlardaki enzim aktivitelerinin sırasıyla 71.1 U/mL ve 75.9 U/mL olduğu saptanmıştır. Tween 80 ilave edilmiş ortamlardaki amilaz aktivitesi üzerine araştırma yapmışlardır. Bakteriyel amilaz üretim aktivitesinin artırılmasına yönelik yaptıkları çalışmada karbon kaynağı olarak ksiloz ve glikozun sinerjistik etkisini araştırmışlardır. Sinerjistik etkinin katkısı ile en yüksek üretimi daha önceden izole edilmiş olan bakterisinden elde edip, en yüksek amilaz aktivitesini 73.3 U/mL olarak tespit etmişlerdir. Çalışmanın bir diğer aşamasında test edilen bakteri suşunun üreme ortamına ayrı ayrı 5-20 g/L oranında tatlı sorgum nişastası ve ayrıca 0.1 g/L oranında sürfektan (Tween 80) birlikte eklenmiş ve bu ortamların amilaz üretimi üzerine sinerjistik etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre; tüm ortamlardan elde edilen amilazların aktivitelerinde kontrole kıyasla artışlar (sinerjistik etki) gerçekleşmiş olup, en yüksek

amilaz aktivitesi 5 g/L tatlı sorgum nişastası+0.1 g/L Tween 80 içeren ortamda 134.3 U/mL olarak tespit edilmiştir.



### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1 Çalışmada Kullanılan Bakteri Türleri

Bu tez çalışmasında daha önceden izole edilmiş olan mezofilik bakteri türleri olarak *Bacillus megaterium* A1 (Accession Number: KC579390) ve *Bacillus pumilus* D3 (Accession Number: JX860616) kullanılmıştır. Test edilen bu bakteri türlerinin aktivasyonu ve devamlılığını sağlamak amacıyla bakteri türleri 30 günde bir katı besiyeri olan Nutrient Agar (NA) ortamlarına pasajlanmıştır. Bu işlemin ardından ekim yapılan NA plakları 30 °C’de, 24 saat boyunca statik inkübatörde inkübe edildikten sonra elde edilen katı bakteri kültürleri İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Laboratuvarı’nın buzdolabında 4 °C’de stok kültür olarak muhafaza edilmiştir.

##### 3.1.1 *Bacillus megaterium* A1

*Bacillus megaterium* türü ilk olarak Heinrich Anton de Bary tarafından 1884 yılında tanımlanmıştır. *B. megaterium*’un üreme sıcaklığı 3 °C ile 45 °C arasında olsa da optimum üreme sıcaklığı 30 °C’dir. Genellikle toprakta bulunan bu bakterilerin uzunlukları yaklaşık 4.2 µm, çapları ise yaklaşık 1.5-2 µm’dir (Eser, 2021). *Bacillaceae* familyasının bir üyesi olan *B. megaterium* türü bakteriler gram pozitif hücre duvar yapısına sahip olup, küt uçlu ve çubuk şeklinde hücre yapısına sahip bakterilerdir. Aerobik veya fakültatif anaerobik solunum özelliğine sahip olan ve endospor oluşturabilen bu bakteri türü doğada tek tek veya uzun zincirler halinde görülebilmektedir (Grage ve diğ, 2017). Geniş ekolojik yaşam alanlarına sahip ve çeşitli endüstriyel enzimler ( $\alpha$ -amilaz,  $\beta$ -amilaz, glikoz dehidrojenaz, proteaz, steroid hidrolaz, penisilin amidaz) sentezleyebilen ve rekombinant proteinler için konakçı olarak kullanılabilen *B. megaterium* endüstriyel olarak yüksek kullanım potansiyeline sahip bir bakteri türüdür (Vary, 1994; Vary ve diğ, 2007; Korneli ve diğ, 2013; Doğan, 2021).

Buna göre; bu yüksek lisans tez çalışmasında da mezofilik bir bakteri suşu olan *Bacillus megaterium* A1 (Accession Number: KC579390) amilaz üretiminde kullanılmıştır (Şekil 3.1). *B. megaterium* A1’in sınıflandırma basamakları da Çizelge 3.1’deki gibidir.



**Şekil 3.1 :** *Bacillus megaterium* A1'in katı kültürü.

**Çizelge 3.1 :** *B. megaterium*'un sistematik sınıflandırması

Alem:	Bacteria
Filum:	Firmicutes
Sınıf:	Bacilli
Ordo:	Bacillales
Familya:	Bacillaceae
Cins:	<i>Bacillus</i>
Tür:	<i>Bacillus megaterium</i>

(Bilim etiği. (t.y.) Erişim: 21 Ekim 2022, <https://www.arb-silva.de/search/>).

### 3.1.2 *Bacillus pumilus* D3

*Bacillaceae* familyasının bir üyesi olan *Bacillus pumilus* çubuk şekilli, spor oluşturabilen, gram pozitif ve aerobik bir bakteri türü olup, optimum üreme sıcaklığı 30 °C ile 37 °C arasındadır (Usta, 2020). Normal yaşam alanları genelde bazı bitki kökleri veya toprak olsa da endospor oluşturabilme özellikleri sayesinde oligotrofik veya diğer zor ortam koşullarında da hayatta kalabilen *B. pumilus* (Parvathi ve diğ, 2009; Usta, 2020) selüloz, pektinaz, amilaz ve proteaz gibi çok çeşitli endüstriyel enzimler üretebilmektedir (Sivakumar ve diğ, 2017). Buna ilaveten, bu bakteri türünün yem katkı maddesi olarak hayvan yemlerine katıldığı durumlarda faydalı bakteri çoğalmasını uyardığı ve zararlı bakteri üremesini önlediği rapor edilmiştir. Buna göre; bu bakteri türü sayesinde hayvanların büyüme performansının ve immün sistemlerinin de olumlu yönde etkilendiğine yönelik bilgiler bulunmaktadır (Zhang ve diğ, 2020). Test edilen bakteri suşlarına bağlı olarak *Bacillus pumilus*'un optimum gelişim sıcaklığının genellikle 28 °C



ile 37 °C arasında olduğu rapor edilmektedir (Slivinski ve diğ, 2012; Özçelik ve diğ, 2014; Dadaşoğlu, 2016; Bonifer ve diğ, 2019; Kumar ve diğ, 2021). Bu yüksek lisans tez çalışmasında *Bacillus megaterium* A1 (Accession Number: KC579390) suşuna ek olarak diğer bir mezofilik bakteri suşu olan *Bacillus pumilus* D3 (Accession Number: KC579390) de amilaz üretiminde kullanılmıştır (Şekil 3.2). *B. pumilus* D3'ün sınıflandırma basamakları da Çizelge 3.2'deki gibidir.



Şekil 3.2 : *Bacillus pumilus* D3'ün katı kültürü.

Çizelge 3.2 : *B. pumilus*'un sistematik sınıflandırması

Alem:	Bacteria
Filum:	Firmicutes
Sınıf:	Bacilli
Ordo:	Bacillales
Familya:	Bacillaceae
Cins:	<i>Bacillus</i>
Tür:	<i>Bacillus pumilus</i>

(Bilim etiği. (t.y.) Erişim: 21 Ekim 2022, <https://www.arb-silva.de/browser/ssu/138.1/JX860616>).

### 3.2 *Bacillus megaterium* A1 ve *Bacillus pumilus* D3'ün Mikroskopik Morfolojileri ve Gram Kimliklerinin Belirlenmesi

Yapılan yüksek lisans tez çalışmaları kapsamında basit boyama işlemiyle test edilen bakteri türlerinin mikroskopik morfolojileri de belirlenmiştir. Buna göre; her iki bakteri türünün katı kültürlerinden öze ile örnekler alınarak önce lam üzerine yayma ve ardından fiksasyon işlemleri yapılmış daha sonra da bu kültürler metilen mavisi ile 5 dakika

boyunca boyama işlemine maruz bırakılmıştır. Gerekli yıkama ve kurutma işlemlerini takiben hem *Bacillus megaterium* A1 hem de *Bacillus pumilus* D3'ün mikroskopik morfolojileri basit ışık mikroskopunda görüntülenmiştir (Woods ve Walker, 1996; Hamouda ve diğ, 2002; Hubbe ve diğ, 2019; Hira ve diğ, 2020).

Yapılan bir diğer çalışmada da Gram boyama işlemiyle test edilen bakteri türlerinin hem mikroskopik morfolojileri hem de Gram kimlikleri saptanmıştır. Buna göre; her iki bakteri türünün katı kültürlerinden öze ile örnekler alınmış ve önce lam üzerine yayma ardından da fiksasyon işlemleri yapılmıştır. Bu işlemlerin ardından da kültürler sırasıyla kristal viyole (1 dakika), lügol (1 dakika), etil alkol (15 saniye) ve safranin (30 saniye) ile muamele edilmiştir. Gerekli yıkama ve kurutma işlemlerini takiben hem *Bacillus megaterium* A1 hem de *Bacillus pumilus* D3'ün mikroskopik morfolojileri ve Gram kimlikleri basit ışık mikroskopunda görüntülenmiştir (Woods ve Walker, 1996; Rand ve Tillan, 2006; Sharma ve diğ, 2020; Badar ve diğ, 2022).

### 3.3 Sıvı Bakteri Kültürlerinin Hazırlanışı

Sıvı bakteri kültürlerinin hazırlanması amacıyla test edilen mezofilik bakteri türlerinin (*Bacillus megaterium* A1 ve *Bacillus pumilus* D3) Nütrient Agar'da (NA) üretilmiş stok katı kültürlerinden steril eküvyon çubukları ile örnekler alınmış ve steril Nütrient Broth (NB) ortamlarına aseptik koşullarda transfer edilmiştir. Bu işlemlerin ardından 30 °C ve 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış çalkalamalı inkübatörde 24 saat inkübe edilerek her iki bakteri türünün de saf sıvı bakteri kültürleri elde edilmiştir (Şekil 3.3).



**Şekil 3.3 :** *Bacillus megaterium* A1 ve *Bacillus pumilus* D3 sıvı kültürlerinin hazırlanma aşamaları.

### 3.4 *Bacillus megaterium* A1 ve *Bacillus pumilus* D3'ün Optimum Amilaz Üretim Koşullarının ve Amilaz Aktivitesinin Saptanması

Bu yüksek lisans tez çalışmasında Velioğlu ve Çelikyurt (2016) tarafından uygulanan amilaz aktivite tayininin modifiye edilmiş bir şekli kullanılmıştır. Buna göre; test edilen her iki bakteri türünün optimum amilaz üretim koşullarının belirlenmesi amacıyla çalışılan koşullara (sıcaklık, çalkalama, pH ve süre) ait her bir parametre için öncelikle 500 mL hacimli erlenlere 250'şer mL NB içerecek şekilde gerekli tartımlar yapılmış ve üzerlerine distile su eklenerek stok sıvı besiyerleri hazırlanmıştır. Bu işlemlerin ardından hazırlanan stok NB ortamları, her iki bakteri türü için 20'şer mL NB içeren 6'şar tekrarlı toplam 12 adet 100 mL'lik erlenlere pay edilmiştir. Daha sonra bu besiyerleri önce 20 dakika boyunca 121 °C ve 1.5 atm. basınç altında otoklavda steril edilmiş ve ardından da oda koşullarında soğumaya bırakılmıştır. Bu işlemlerin ardından daha önce hazırlanan *Bacillus megaterium* A1 ve *Bacillus pumilus* D3 sıvı kültürlerinden mikropipet ile 200'er µl alınan sıvı kültürler 6'şar tekrarlı NB içeren ortamlara transfer edilerek inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.4).

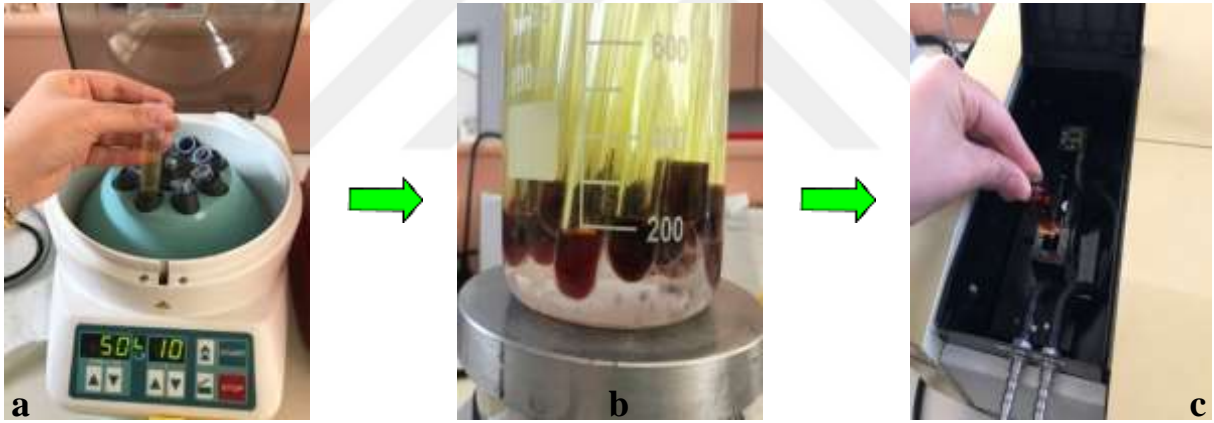


**Şekil 3.4 :** *Bacillus megaterium* A1 ve *Bacillus pumilus* D3 sıvı kültürlerinin optimum amilaz üretim koşullarının belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalar.

Uygulanan inkübasyon süresinin dolmasından sonra inkübatörden çıkarılan örnekler öncelikle plastik tüplere pay edilmiş ve ardından Şekil 3.5a'da görüldüğü gibi bu tüpler 5000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüjlenmiştir (Hettich EBA 20). Bu işlemin ardından hazırlanan her bir cam tüpe hem 0.5'er mL (kontrol grubuna 1'er mL) distile su hem de santrifüjlenen örneklerden alınan 0.5'er mL süpernatantlar pipetlenmiştir. Daha sonra örnek içeren cam tüpler vortekslenmiş (Heidolph Reax Top) ve 30 °C'ye ayarlanmış inkübatörde 3 dakika bekletilmiştir. Gerekli süre boyunca bekletilen örneklerin üzerine 0.5 mL çözünür nişasta çözeltisi eklendikten sonra karışım yeniden vortekslenmiştir. Bu işlemin sonrasında

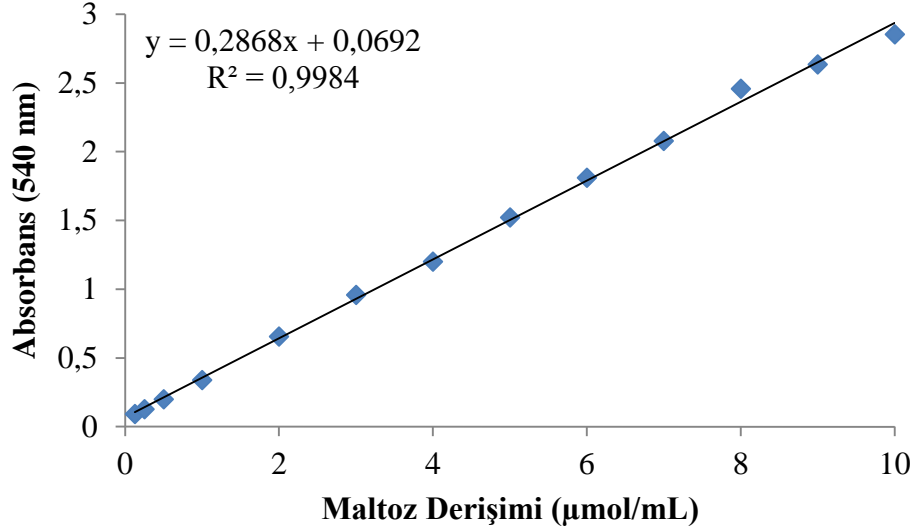
örnekler 30 °C'ye ayarlanmış inkübatörde 60 dakika bekletildikten sonra kontrol grubu da dahil olmak üzere cam tüplere 1'er mL 3,5-Dinitrosalisilik asit (DNS) çözeltisi eklenmiş ve karışım yeniden vortekslenmiştir.

Yapılan bu işlemler sonrası elde edilen karışım 10 dakika boyunca kaynar suda bekletilmiştir (Şekil 3.5b). Bu işlemlerin ardından kaynar su banyosundan çıkarılıp oda koşullarında soğutulan cam tüplere 10'ar mL de distile su eklenerek vortekslenmiştir. Şekil 3.5c'de görüldüğü gibi spektrofotometrik amilaz aktivite ölçümü için hazır hale gelen cam tüplerden alınan 2'şer mL'lik renkli karışımlar plastik spektrofotometre küvetlerine pipetlenmiştir. Daha sonra bu karışımların köre karşı anlık absorbans değerleri 540 nm'ye ayarlanmış UV-Visible spektrofotometrede (Shimadzu UV-1601) saptanmış (Velioglu ve Çelikyurt, 2016) ve elde edilen absorbanslar çizilen maltoz standart eğrisinden yararlanılarak ünite enzim aktivitesine dönüştürülmüştür. Buna göre; 1 dakikada 1 µmol substratı (çözünür nişasta) ürüne dönüştüren enzim (amilaz) miktarı 1 ünite olarak ifade edilmiştir.



**Şekil 3.5 :** *Bacillus megaterium* A1 ve *Bacillus pumilus* D3 sıvı kültürlerindeki amilaz aktivitesinin saptanmasına yönelik çalışmalar.

Tüm deneysel çalışmalar en az 3 tekrarlı olacak şekilde yapılmış olup, yukarıda da ifade edildiği gibi ünite amilaz aktiviteleri çizilen maltoz standart eğrisinden faydalanılarak üretilen formüle ( $x$ :ünite enzim miktarı,  $y$ :absorbans,  $x=(y-0.0692)/0.2868/60\times 1000$ ) göre hesaplanmış ve U/L cinsinden tanımlanmıştır (Şekil 3.6). Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen bakteriyel kültür sıvılarında saptanan amilaz aktivitelerinin (U/L) ortalama değerleri ve standart sapmalarının hesaplanmasında da istatistik paket programı olarak SPSS (SPSS 17.0 Inc., USA) kullanılmıştır.



Şekil 3.6 : Amilaz aktivitesinin hesaplanmasında kullanılan maltoz standart eğrisi.

### 3.5 *Bacillus megaterium* A1 ve *Bacillus pumilus* D3'ün Amilaz Üretim Koşullarının Optimizasyonu

#### 3.5.1 İnkübasyon sıcaklığının amilaz üretimi üzerine etkisinin saptanması

Test edilen bakteri türlerinin optimum amilaz üretim sıcaklığını tespit edebilmek amacıyla her iki bakteri türü de pH 7.0'ye ayarlanmış NB ortamlarında 150 rpm çalkalama hızında, farklı sıcaklık değerlerine (25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 ve 60 °C) ayarlanmış inkübatörlerde 48 saat boyunca ayrı ayrı inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda da Bölüm 3.4'de belirtildiği gibi amilaz aktiviteleri ölçülerek optimum amilaz üretim sıcaklığı belirlenmiştir.

#### 3.5.2 Çalkalama hızının amilaz üretimi üzerine etkisinin saptanması

Çalkalama hızının tez çalışmalarında kullanılan bakteri türlerinin amilaz üretimi üzerine etkisini ve optimum çalkalama hızını belirlemek için her iki bakteri türü de pH 7.0'ye ayarlanmış NB ortamlarında, çeşitli çalkalama hızlarına (0, 50, 100, 150 ve 200 rpm) ve 30 °C'ye ayarlanmış inkübatörlerde 48 saat boyunca ayrı ayrı inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda kültür sıvılarındaki amilaz aktiviteleri yukarıda belirtildiği gibi ölçülmüş ve optimum çalkalama hızı saptanmıştır.

### **3.5.3 Ortam pH'sının amilaz üretimi üzerine etkisinin saptanması**

Tez çalışmalarında test edilen bakteri türlerinin amilaz üretimi üzerine ortam pH'sının etkisini ve optimum ortam pH'sını saptamak üzere her iki bakteri türü de farklı pH değerlerine (pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0) ayarlanmış NB ortamlarında, 150 rpm ve 30 °C'de 48 saat boyunca ayrı ayrı inkübe edilmiştir. NB ortamlarının pH'larını ayarlamak için 0.1N HCl, 0.1N NaOH, 2N HCl ve 2N NaOH kullanılmış olup, inkübasyon sonucunda kültür sıvılarındaki amilaz aktiviteleri daha önce (Bölüm 3.4) belirtildiği gibi ölçülmüş ve optimum pH değeri de tespit edilmiştir.

### **3.5.4 İnkübasyon süresinin amilaz üretimi üzerine etkisinin saptanması**

Bakteriyel amilaz üretimini etkileyen önemli faktörlerden biri de inkübasyon süresi olup, test edilen bakteri türlerinin optimum inkübasyon süresinin amilaz üretim potansiyeli üzerine etkisini belirlemek amacıyla her iki bakteri türü de pH 7.0'ye ayarlanmış NB ortamlarında, 150 rpm ve 30 °C'de ayrı ayrı 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. Farklı inkübasyon süreleri sonucunda elde edilen sıvı kültürlerde üretilen amilaz enzimlerinin aktiviteleri Bölüm 3.4'de ifade edildiği gibi ölçülerek her iki bakteri türü için de optimum inkübasyon süresi belirlenmiştir.

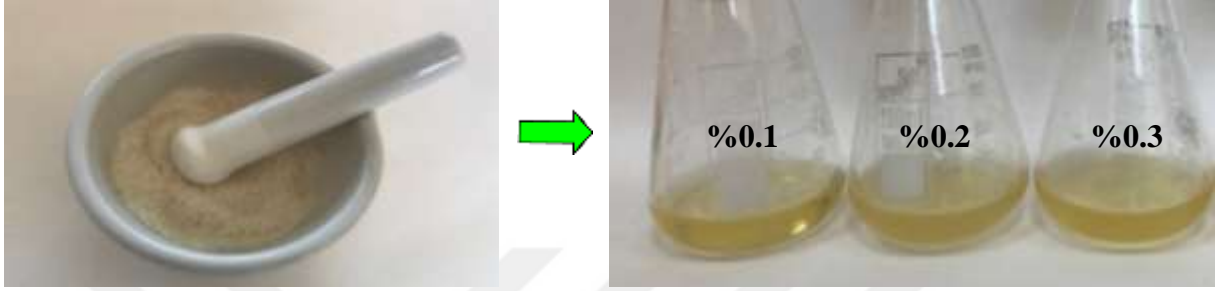
### **3.6 Çeşitli İndükleyici Maddelerin Amilaz Üretimi Üzerine Etkisinin Saptanması**

Amilaz üretim koşullarının optimizasyonu sonrasında test edilen bakteri türlerinin amilaz üretim kapasitelerinin artırılması amacıyla farklı (%0.1, %0.2, %0.3 ve %0.4) konsantrasyonlarda ksiloz, glikoz, laktoz ve maltoz gibi çeşitli indükleyiciler NB ortamlarına ayrı ayrı ilave edilmiştir. Bu işlemlerin sonrasında her iki bakteri türü de bu indükleyicilerin eklendiği ortamlara inoküle edilmiş ve tespit edilen optimum koşullar altında ayrı ayrı olacak şekilde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda da kültür sıvılarındaki amilaz aktiviteleri daha önce belirtildiği gibi saptanmıştır. Yukarıda bahsedilen indükleyici maddelere ilaveten, çalışmalarda sükroz ve çözünen nişasta da test edilmiş ancak her iki bakteri türü için de belirgin bir amilaz üretim artışına neden olmadığından diğer 4 indükleyici madde ile çalışmalara devam edilmiştir.

### **3.7 Pirinç Tozu'nun Amilaz Üretimi Üzerine Etkisinin Saptanması**

Yapılan yüksek lisans tez çalışmalarında pirinç tozunun kullanılan bakteri türlerinin amilaz üretim potansiyelleri üzerine etkisini tespit edebilmek için öncelikle pirinçler bir havan

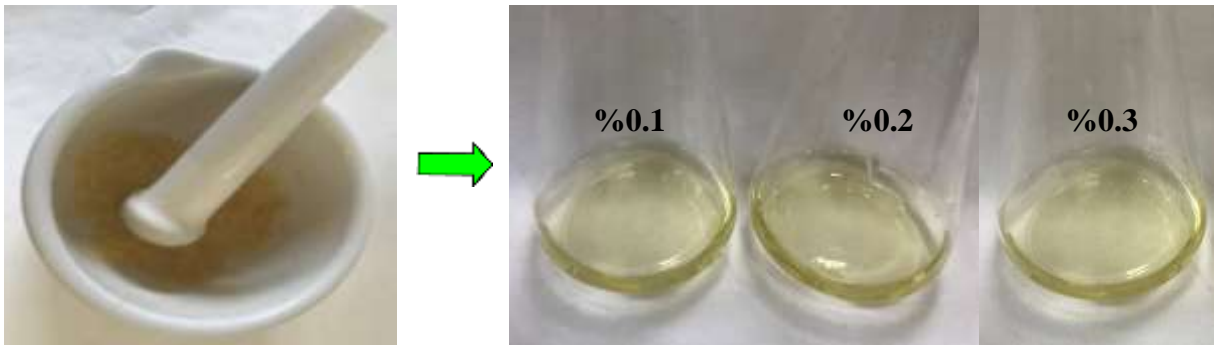
yardımla toz haline getirilmiş ve çeşitli konsantrasyonlarda (%0.1, %0.2 ve %0.3) olacak şekilde NB ortamlarına ilave edilmiş ve ardından da besiyerleri otoklavlanmıştır (Şekil 3.7). Bu işlemlerin sonrasında her iki bakteri türü de farklı konsantrasyonlarda pirinç tozu içeren NB ortamlarına inoküle edilmiş ve tespit edilen optimum koşullar altında ayrı ayrı olacak şekilde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında da kültür sıvılarındaki amilaz aktiviteleri daha önce belirtildiği şekilde ölçülmüştür.



**Şekil 3.7 :** Çeşitli konsantrasyonlarda (%0.1, %0.2 ve %0.3) pirinç tozunun NB ortamlarına ilavesi.

### **3.8 Ham Patates Özütü'nün Amilaz Üretimi Üzerine Etkisinin Saptanması**

Yapılan yüksek lisans tez çalışmalarında çiğ patatesin test edilen bakteri türlerinin amilaz üretim potansiyelleri üzerine etkisini saptayabilmek amacıyla öncelikle patatesin dış kabuğu soyularak uzaklaştırılmış, bıçak yardımıyla küçük parçalar halinde doğranmış, daha sonra da bir havan yardımıyla ezilmiş ve elde edilen ham patates özütü çeşitli konsantrasyonlarda (%0.1, %0.2 ve %0.3) olacak şekilde NB ortamlarına ilave edilmiş ve ardından da besiyerleri otoklavlanmıştır (Şekil 3.8).



**Şekil 3.8 :** Çeşitli konsantrasyonlarda (%0.1, %0.2 ve %0.3) ham patates özütünün NB ortamlarına ilavesi.

Bu işlemlerin sonrasında her iki bakteri türü de farklı konsantrasyonlarda ham patates özütü içeren NB ortamlarına inoküle edilmiş ve önceden belirlenen optimum koşullar

altında ayrı ayrı olacak şekilde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında da elde edilen kültür sıvılarındaki amilaz aktiviteleri daha önce ifade edildiği gibi ölçülmüştür.

### **3.9 Çeşitli İndükleyici Maddelerin Karışımlarının *Bacillus megaterium* A1 ve *Bacillus pumilus* D3'ün Amilaz Üretimi Üzerine Etkisi**

Yüksek lisans tez çalışmaları kapsamında test edilen indükleyicilerin NB ortamına birlikte eklenmesi sonucu elde edilen karışımların *Bacillus megaterium* A1 ve *Bacillus pumilus* D3'ün amilaz üretim kapasiteleri üzerine olumlu bir (sinerjistik) etki oluşturup oluşturmayacağı da araştırılmıştır. Buna göre; daha önce tespit edilen optimum konsantrasyonlarındaki indükleyiciler (%0.3 ksiloz+%0.3 glikoz, %0.3 ksiloz+%0.3 laktöz ve %0.3 ksiloz+%0.3 maltoz) NB ortamlarına ayrı ayrı ilave edilmiş ve her iki bakteri türü de bu ortamlara inoküle edilmiştir. Bu işlemlerin ardından test edilen bakteri türleri önceden belirlenen optimum koşullar altında ayrı ayrı olacak şekilde inkübe edilmiş olup, inkübasyon sonrasında elde edilen kültür sıvılarındaki amilaz aktiviteleri daha önce belirtildiği gibi saptanmıştır.

### **3.10 Katı Ortamda Nişasta Hidroliz Testi**

Yüksek lisans tez çalışmalarında amilaz üreticisi olarak kullanılan *Bacillus megaterium* A1 ve *Bacillus pumilus* D3'ün katı ortamda (NA) ekstrasellüler amilaz üretimini kanıtlamak amacıyla test edilen her iki bakteri türünün ve kontrol grubu olarak da amilaz üretmediği bilinen *Escherichia coli*'nin (Kumar KM ve diğ, 2019) katı kültürlerinden steril eküvyon çubukları ile ayrı ayrı örnekler alınmıştır. Daha sonra bu 3 bakteri türü aseptik koşullarda %0.5 konsantrasyonda çözümlü nişasta (Özdemir ve Özcan, 2020) içeren NA ortamlarına dikey olarak inoküle edilmiştir. İnokülasyon sonrasında *Bacillus megaterium* A1 ve *Bacillus pumilus* D3 30 °C'ye, *Escherichia coli* ise 37 °C'ye ayarlanmış statik inkübatörlerde 24 saat boyunca ayrı ayrı inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası literatürdeki kaynaklardan gerekli değişiklikler yapılarak 2.5 g iyot ve 5 g potasyum iyodür bir erlene tartılıp üzerine 100 mL distile su eklenerek konsantre iyot çözeltisi hazırlanmıştır. Konsantre iyot çözeltisi de 1/2 oranında sulandırıldıktan sonra elde edilen iyot çözeltisi (Şekil 3.9) kültürlerin oluştuğu bölgeler de dahil tüm besiyeri ortamlarına damlatılmıştır (Sevinç, 2010; Usta, 2012; Baygın, 2015). Bu işlemin ardından katı ortamda sentezlenen ekstrasellüler amilaza bağlı olarak oluşabilecek açık renkli bölgeleri gözlemlemek amacıyla *Bacillus megaterium* A1 ve *Bacillus pumilus* D3 kültürleri 30



°C'ye, *Escherichia coli* ise 37 °C'ye ayarlanmış statik inkübatörlerde yeniden 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır.



**Şekil 3.9 :** Katı ortamda nişasta hidrolizini tespit etmek için kullanılan ve 1/2 oranında sulandırılan konsantre iyot çözeltisi.

### 3.11 Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrez Çalışmaları

Doğal poliakrilamid jel elektrofrez çalışmalarında her iki bakteri türü için de en yüksek amilaz aktivitesinin saptandığı %0.3 ksiloz+%0.3 glikoz içeren ortamlardan elde edilen kültür sıvıları kullanılmıştır. Bu kültür sıvıları doğal poliakrilamid jel elektrofrezinde yürütülmeden önce her iki bakteri türüne ait kültür sıvılarından 20'şer mikrolitre örnekler alınarak iki ayrı mikrosantrifüj tüpüne pipetlenmiştir. Daha sonra örnekler üzerine Sodyum dodesil sülfat (SDS) ve 2-merkaptolanol içermeyen 2x konsantrasyonda hazırlanmış doğal örnek tamponlarından da 20'şer mikrolitre eklenmiş ve elde edilen karışım 10 saniye boyunca vortekslenmiştir. Bu işlemlerin ardından ticari olarak satılan Bio-Rad marka %10'luk hazır doğal poliakrilamid jellerinde (Şekil 3.10a) bulunan kuyucuklara 40'ar mikrolitre hacimli kültür sıvısı-doğal örnek tamponu içeren karışımlardan 20'şer mikrolitre pipetlenmiştir. Bu işlemi takiben 40 mA/jel sabit akımda (Birhanlı, 2008) yaklaşık 45 dakika süre ile Bio-Rad elektrofrez sistemi ile kuyucuklara pipetlenen karışımların yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.10b).



**Şekil 3.10 :** Doğal poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan hazır jel (a) ve örneklerin kuyucuklara yükleme işlemi (b).

Yürütme işlemlerinin sonunda oluşan amilaz bantlarını görünür hale getirmek için literatürdeki kaynaklardan gerekli değişiklikler yapılarak jeller öncelikle %0.5 konsantrasyonda hazırlanan çözünür nişasta çözeltisi ile 30 °C ve 50 rpm'e ayarlanmış çalkalamalı inkübatörde 60 dakika boyunca inkübe edilmiştir (Baltaş, 2012; Keskin, 2015). Daha sonra jeller distile su ile yıkanmış ve aktivite boyaması için üzerlerine daha önce katı ortamda nişasta hidrolizini tespit etmek için de kullanılan ve 1/2 oranında sulandırılan iyot çözeltisinden 50'şer mL eklenmiştir. Bu işlemlerin ardından jeller 30 °C ve 50 rpm'e ayarlanmış çalkalamalı inkübatörde 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında jeller distile su ile yıkanp, enzimin bulunduğu bölgede nişasta yıkımına bağlı olarak renk açılması olup olmadığı gözlemlenmiştir.

#### 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Amilazlar farklı organizmalar (bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar) tarafından üretilen son derece önemli enzimlerdir. Gerektiğinde manipüle edilebilmeleri ve ekonomik amilaz üretim koşullarına sahip olmaları nedeniyle mikroorganizmalar diğer amilaz üretebilen organizmalardan daha avantajlı durumdadır. Buna ilaveten; diğer amilazlarla karşılaştırıldıklarında daha kararlı olmaları da birçok endüstriyel uygulamada mikrobiyal amilazların sıkça tercih edilmesine neden olmaktadır (De Souza ve Magalhaes, 2010; Aboalvard, 2020; Naureen ve diğ., 2021). Amilazlar nişasta veya oligosakkarit molekülleri üzerine rastgele etki eden ve reaksiyon sonucunda dekstrinler ile daha küçük glikoz birimlerinden oluşan polimerlerin meydana gelmesine neden olan enzimler grubunu ( $\alpha$ -amilaz,  $\beta$ -amilaz ve glukoamilaz) temsil etmektedir (Dash ve diğ., 2015).

Yapısal bütünlüklerini, kararlılıklarını ve aktivitelerini korumak için  $Ca^{2+}$  gibi iyonlara ihtiyaç duyan  $\alpha$ -amilazların büyük çoğunluğu metalloenzim yapısındadır (Tanaka ve Hoshino, 2002). Substrat spesifikliğı elde edildiğı kaynağı göre değışkenlik gösterebilen  $\alpha$ -amilazların başlıca substratı nişasta olsa da  $\alpha$ -amilazlar; amiloz, amilopektin, siklodekstrin, glikojen ve maltotrioz gibi substratlarla da reaksiyona girebilmektedir (Aguilar ve diğ., 2000; Keskin, 2015; Güllü, 2020). Ticari olarak kullanılan ilk enzim olan  $\alpha$ -amilazlar (Ölmez, 2017) gıda endüstrisinde nişastanın sıvılaştırılmasında (Tatar, 2007), fırıncılık endüstrisinde ekmeğın rengini, yumuşaklığını, kabarma hacmini ve raf ömrünü arttırmada (Mojsov, 2012) ve ayrıca meyve suyu endüstrisinde berraklaştırma işlemlerinde kullanılmaktadır (Baltaş, 2012; Dehkordi ve Javan, 2012). Alfa-amilaz enzimi nişastalı gıda kalıntılarını ayrıştırmak üzere çamaşır ve bulaşık deterjanlarında da önemli bir kullanım potansiyeline sahiptir (Dehkordi ve Javan, 2012; Mojsov, 2012; Öztürk, 2013; De Souza ve Magalhaes, 2010; Sundarram ve Murthy 2014). Buna ilaveten;  $\alpha$ -amilaz enzimi tekstil endüstrisinde haşıl alma ajanı (Feitkenhauer, 2003; De Souza ve Magalhaes, 2010; Dehkordi ve Javan, 2012; Sundarram ve Murthy, 2014; Patil ve diğ., 2022) ve ayrıca obezite, sindirim ve diyabet gibi hastalıkların tedavisinde de ilaç olarak kullanılabilir (Gurung ve diğ., 2013; Elmarzugi ve diğ., 2014; Ölmez, 2017).

Amilozun ve amilopektinin dış glikoz birimlerine etki ederek glikoz, maltoz ve  $\beta$ -dekstrinlerin oluşumunu sağlayan ve ayrıca serbest maltoz birimlerinin anomerik konfigürasyonlarını  $\alpha$ 'dan  $\beta$ 'ya çeviren  $\beta$ -amilazlar (Pandey ve diğ, 2000; Tiwari ve diğ, 2015; Mehta ve Satyanarayana, 2016) bira damıtma, fermentasyon ve yüksek maltoz şuruplarının üretiminde kullanılmaktadır (Sundarram ve Murthy, 2014).

Amiloz ve amilopektinin hem indirgeyici olmayan ucundaki son  $\alpha$ -1,4-glikozidik bağları hem de  $\alpha$ -1,6-glikozidik bağları hidrolize ederek D-glikoz oluşumuna neden olan glukoamilazlar genelde asidik ortamlarda reaksiyon gösterirler (Gurung ve diğ, 2013; Tiwari ve diğ, 2015; Mehta ve Satyanarayana, 2016). Gıda endüstrisinde yoğun uygulama potansiyeline sahip olan glukoamilazlar; fırıncılık endüstrisinde hem ürün kalitesini arttırmada hem de hamurun bayatlamasının yavaşlatılmasında, şekerleme endüstrisinde de yüksek glikoz veya fruktoz şurubu ve ayrıca alkol üretiminde kullanılabilen son derece önemli enzimlerdir (James ve Lee, 1997; Ford, 1999; Michelin ve diğ, 2008; Okpara, 2022).

Bu yüksek lisans tezinde kullanılan bakteri türlerinin amilaz üretimine yönelik çalışmalara başlamadan önce Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda stok kültür olarak muhafaza edilen saf mezofilik bakteri kültürlerinin amilaz üretim yetenekleri araştırılmıştır. Bu çalışmaların ardından çalışmalarda kullanılmak üzere iki farklı bakteri türü seçilmiş ve yapılan Basit ve Gram boyamalarla seçilen her iki bakteri türünün de mikroskobik morfolojileri ve Gram kimlikleri tespit edilmiştir. Buna ilaveten; yapılan ön çalışmalar sonucunda farklı inkübasyon koşullarına ve ortama ilave edilen indükleyici maddelerin varlığına bağlı olarak seçilen bakteri türlerinin amilaz üretim potansiyellerinin farklılıklar gösterdiği saptanmıştır. Bu nedenle test edilen her iki bakteri türü için de farklı inkübasyon sıcaklıkları, çalkalama hızları, pH değerleri ve inkübasyon sürelerinin amilaz üretim verimi üzerine etkileri araştırılarak belirlenen optimum koşullarda *Bacillus megaterium* A1 ve *Bacillus pumilus* D3'ün amilaz üretim yetenekleri arttırılmıştır. Bu çalışmalardan sonra yapılan ön çalışmalarda sıvı besiyeri ortamlarına (NB) ayrı ayrı 6 farklı indükleyici madde (ksiloz, glikoz, laktoz, maltoz, sükroz ve çözünen nişasta) ilave edilmiş ve optimum koşullarda en yüksek indüksiyona sebep olan 4 indükleyici madde (ksiloz, glikoz, laktoz ve maltoz) ile çalışmalara devam edilmiştir. Buna göre; NB ortamlarına ayrı ayrı olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda (%0.1, %0.2, %0.3 ve %0.4) ksiloz, glikoz, laktoz ve maltoz ilave edilerek inoküle edilen bakteri türleri optimum koşullarda inkübe edilmiş ve böylece test edilen bakteriyel türlerin amilaz üretimleri yüksek seviyelere çıkarılmıştır.

Buna ek olarak; test edilen bakteri türlerinin üreme ortamlarına (NB) çeşitli konsantrasyonlarda (%0.1, %0.2 ve %0.3) pirinç tozu ve ham patates özütü de ilave edilmiş ancak nişasta içeren bu iki doğal madde test edilen diğer indükleyici maddelere kıyasla amilaz üretim verimini daha düşük seviyede arttırmıştır.

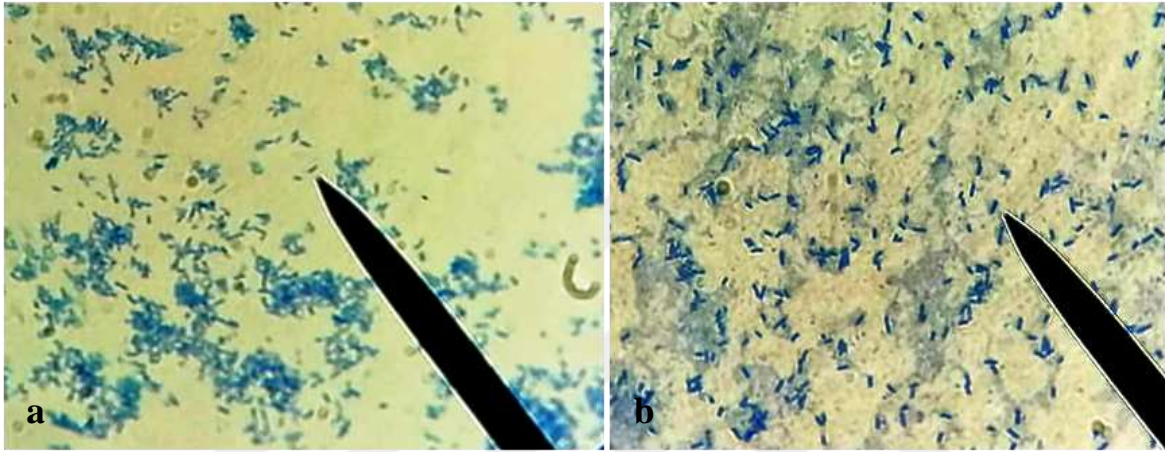
Test edilen bakteri türlerinin amilaz üretim verimlerini daha da arttırmak amacıyla amilaz üretimini belirgin bir şekilde arttıran optimum konsantrasyondaki (%0.3) indükleyiciler (%0.3 ksiloz+%0.3 glikoz, %0.3 ksiloz+%0.3 laktoz ve %0.3 ksiloz+%0.3 maltoz) NB ortamlarına ayrı ayrı eklenmiş ve bu ortamlara inoküle edilen bakteri türleri belirlenen optimum koşullarda inkübe edilmiştir. Yapılan enzim aktivite ölçümleri sonucunda da elde edilen bakteriyel amilaz aktivitelerinin en üst seviyelere çıktığı tespit edilmiştir.

Yapılan spektrofotometrik amilaz aktivite ölçümlerine ilaveten; *Bacillus megaterium* A1 ve *Bacillus pumilus* D3 ve ayrıca kontrol olarak da amilaz üretmeyen *Escherichia coli* %0.5 çözünür nişasta içeren katı ortamlara (NA) dik olarak inoküle edilmiş olup, inkübasyon sonrası da katı kültür ortamlarına 1/2 oranında sulandırılmış konsantre iyot çözeltisi damlatılmıştır. Bu işlemin ardından katı ortamlarda sentezlenen ekstrasellüler amilazlara bağlı olarak oluşabilecek açık renkli bölgeleri gözlemlemek amacıyla bakteri kültürleri statik inkübatörlerde yeniden 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Yapılan gözlemler sonucunda; *Bacillus megaterium* A1 ve *Bacillus pumilus* D3'ün ürettiği ortamda oldukça geniş açık renkli alanlar oluşurken, *Escherichia coli*'nin ürettiği ortamda herhangi bir açık renkli alan oluşmamıştır.

Yapılan tez çalışmalarının sonucunda; elde edilen yüksek aktiviteli amilaz enzimlerinin varlığının jel üzerinde de gösterilmesi amacıyla Doğal poliakrilamid jel elektroforezi yapılmıştır. Buna göre; her iki bakteri türü için de en yüksek amilaz aktivitesinin saptandığı %0.3 ksiloz+%0.3 glikoz içeren ortamlardan elde edilen kültür sıvıları Bölüm 3.11'de ifade edildiği şekilde hazırlanmış ve jeldeki kuyucuklara yüklenerek yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir. Yürütme işlemlerinin sonucunda oluşan amilaz bantlarını görünür hale getirmek için jeller önce %0.5 konsantrasyonda hazırlanan çözünür nişasta çözeltisi ile (Baltaş, 2012; Keskin, 2015) daha sonra da aktivite boyaması için 1/2 oranında sulandırılan konsantre iyot çözeltisi ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında jellerde enzimin bulunduğu bölgede nişasta yıkımına bağlı olarak renk açılması saptanmış olup, bu durum kullanılan her iki bakteri türünün de yüksek aktiviteli amilaz ürettiğinin göstergesidir.

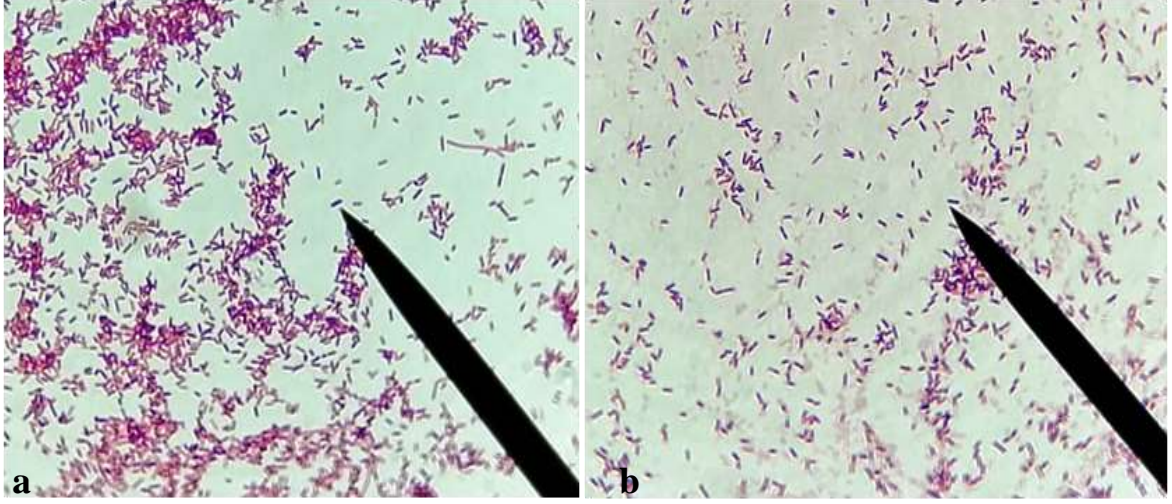
#### 4.1 *Bacillus megaterium* A1 ve *Bacillus pumilus* D3'ün Mikroskopik Morfolojileri ve Gram Kimliklerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar

Yapılan yüksek lisans tez çalışmaları kapsamında öncelikle basit boyama işlemiyle test edilen bakteri türlerinin mikroskopik morfolojileri belirlenmiştir. Yapılan boyama ve mikroskopik incelemeler sonucunda hem *Bacillus megaterium* A1 (Şekil 4.1a) hem de *Bacillus pumilus* D3'ün (Şekil 4.1b) mikroskopik morfolojilerinin çubuk şeklinde olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.1 : *Bacillus megaterium* A1 (a) ve *Bacillus pumilus* D3'ün (b) mikroskopik morfolojileri (Mikroskopik Büyütme Oranı: 1500x).

Yüksek lisans tez çalışmaları kapsamında gerçekleştirilen Gram boyama işlemiyle de test edilen bakteri türlerinin hem mikroskopik morfolojileri hem de Gram kimlikleri saptanmıştır. Yapılan boyama ve mikroskopik incelemeler sonucunda hem *Bacillus megaterium* A1 (Şekil 4.2a) hem de *Bacillus pumilus* D3'ün (Şekil 4.2b) mikroskopik morfolojilerinin çubuk şeklinde olduğu ve her iki bakteri türünün de Gram (+) olduğu belirlenmiştir.

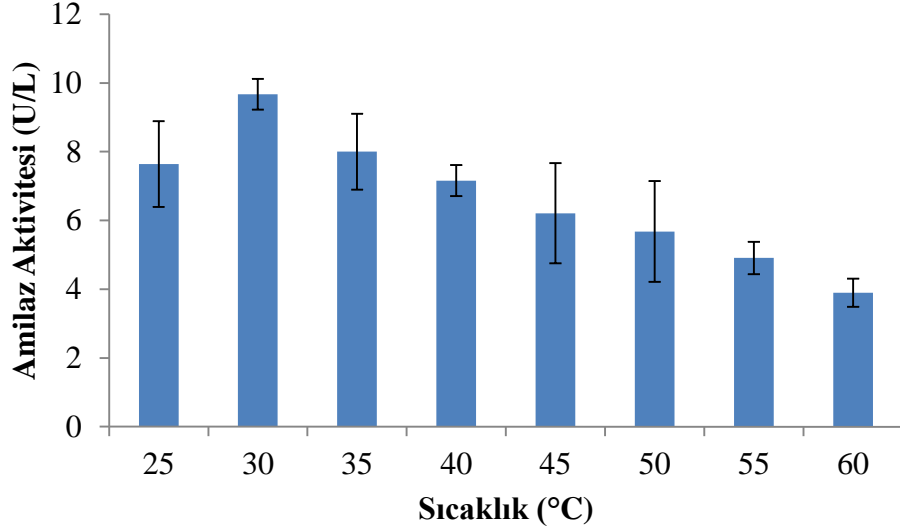


**Şekil 4.2 :** *Bacillus megaterium* A1 (a) ve *Bacillus pumilus* D3'ün (b) mikroskopik morfolojileri ve Gram kimlikleri (Mikroskopik Büyütme Oranı: 1500x).

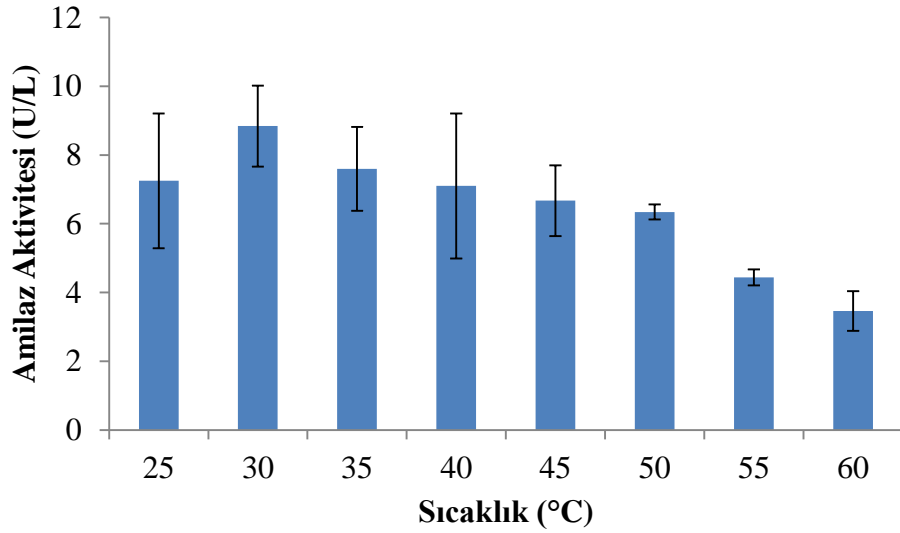
## **4.2 *Bacillus megaterium* A1 ve *Bacillus pumilus* D3'ün Amilaz Üretim Koşullarının Optimize Edilmesine Yönelik Çalışmalar**

### **4.2.1 İnkübasyon sıcaklığının amilaz üretim verimine etkisinin saptanması**

İnkübasyon sıcaklığı hem bakteri gelişimini dolayısıyla enzim üretimini hem de kültür sıvısı içerisinde bulunan enzimin kararlılığını etkileyen önemli bir faktördür (Başkurt, 2012; Özcan ve Çorbacı, 2018; Akcan, 2021). Buna göre; test edilen her iki bakteri türü için de en uygun enzim üretim sıcaklığının belirlenebilmesi amacıyla NB ortamına inoküle edilen bakteri türleri farklı inkübasyon sıcaklıklarında (25-60 °C), 150 rpm çalkalama hızında 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında elde edilen kültür sıvılarındaki amilaz enzimlerinin aktiviteleri spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Yapılan ölçümler sonucunda; her iki bakteri türü için de en yüksek amilaz aktivitesinin saptandığı inkübasyon sıcaklığı 30 °C olarak saptanmıştır. Buna göre; bu inkübasyon sıcaklığında *Bacillus megaterium* A1 için elde edilen en yüksek amilaz aktivitesi 9.67 U/L (Şekil 4.3) iken, *Bacillus pumilus* D3 için saptanan en yüksek amilaz aktivitesi 8.84 U/L'dir (Şekil 4.4). Yapılan ölçümler her iki bakteri türü için de 30 °C inkübasyon sıcaklığının üzerine çıkıldıkça amilaz aktivitesinde kademeli bir düşüş olduğunu göstermektedir (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4).



Şekil 4.3 : Farklı inkübasyon sıcaklıklarının *B. megaterium* A1'in amilaz üretimine etkisi.



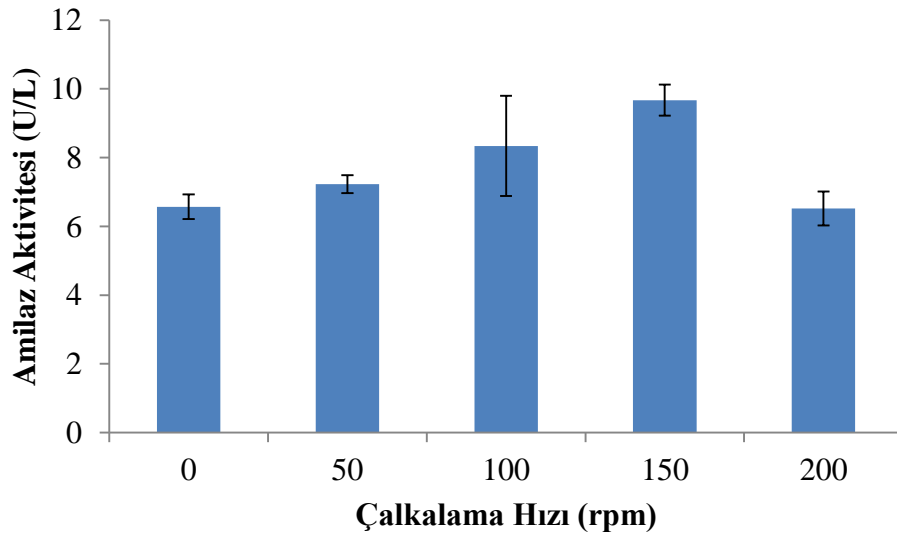
Şekil 4.4 : Farklı inkübasyon sıcaklıklarının *B. pumilus* D3'ün amilaz üretimine etkisi.

İnkübasyon sıcaklığının amilaz üretim verimine etkisinin araştırıldığı benzer bir çalışmada amilaz üretici organizmalar olarak *B. subtilis*, *B. cereus* ve *B. megaterium* kullanılmış ve en yüksek amilaz aktivitesine sahip bakteri türünün *B. megaterium* olduğu rapor edilmiştir. Derin kültür fermentasyonunun kullanıldığı çalışmada optimum inkübasyon sıcaklığının saptanabilmesi amacıyla kullanılan bakteri türleri 25, 37 ve 55 °C gibi çeşitli sıcaklıklar 24 saat inkübe edilmiştir. Yapılan enzim aktivite ölçümlerine göre optimum sıcaklık değerinin 37 °C olduğu ve bu koşullarda *B. megaterium*'un en yüksek amilaz aktivitesinin 17.53 U/mL olduğu saptanmıştır (Viswanathan ve diğ, 2014).

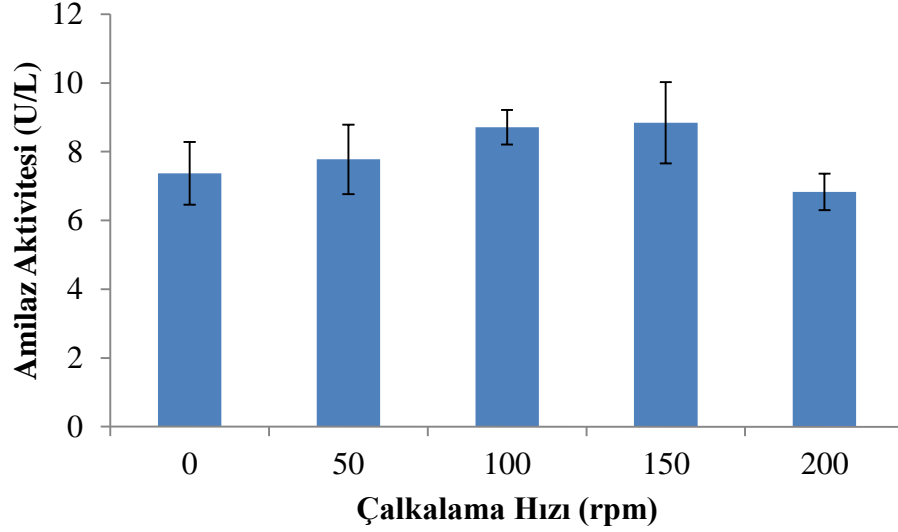


#### 4.2.2 alkalama hızının amilaz üretim verimine etkisinin saptanması

Enzim üretimini etkileyen bir diğ er faktör de çalkalama hızı olup, çalkalama sıvı besiyerinde bulunan oksijenin yeterince çözü nmesi ve ayrıca organizmanın yeterli besin ve oksijene ulaşması açısından son derece önemlidir. Ancak yüksek orandaki çalkalama hızı organizmaya zarar verebileceğ inden çalkalama hızının test edilen organizmaya göre optimize edilmesi gerekmektedir (Birhanlı, 2008; Simair ve diğ., 2017). Buna göre; ç alışmalarda kullanılan her iki bakteri türü için de en uygun çalkalama hızının belirlenmesi için NB ortamına transfer edilen bakteri türleri farklı çalkalama hızlarında (0-200 rpm), 30 °C’de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında her iki bakteri türünün kültür sıvılarındaki amilaz aktiviteleri spektrofotometrik olarak saptanmıştır. Gerçekleştirilen ölçümler sonucunda; iki bakteri türü için de en yüksek amilaz aktivitesinin saptandığı çalkalama hızının 150 rpm olduğ u tespit edilmiştir. Elde edilen aktivite sonuçları her iki bakteri türü için de 150 rpm çalkalama hızına doğru enzim aktivitelerinin kademeli bir şekilde arttığı, 150 rpm’in üzerine çıkıldığında ise enzim aktivitelerinin düştüğ ünü göstermektedir (Ş ekil 4.5 ve Ş ekil 4.6). Buna göre; *B. megaterium* A1 ve *B. pumilus* D3’ün en yüksek amilaz aktiviteleri 150 rpm’de sırasıyla 9.67 U/L (Ş ekil 4.5) ve 8.84 U/L (Ş ekil 4.6) iken, aynı bakteri türleri için saptanan en düşük amilaz aktiviteleri de 200 rpm’de sırasıyla 6.52 U/L (Ş ekil 4.5) ve 6.83 U/L’dir (Ş ekil 4.6).



Ş ekil 4.5 : Farklı alkalama hızlarının *B. megaterium* A1’in amilaz üretimine etkisi.

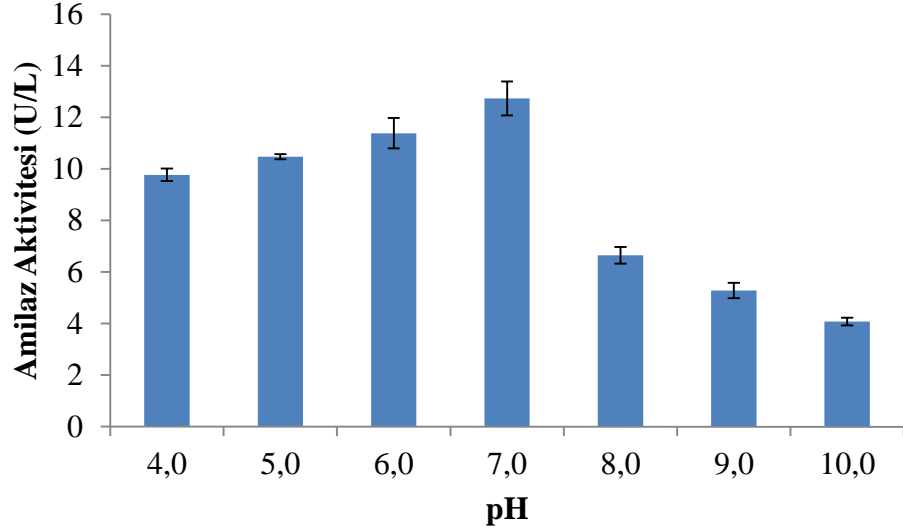


**Şekil 4.6 :** Farklı çalkalama hızlarının *B. pumilus* D3'ün amilaz üretimine etkisi.

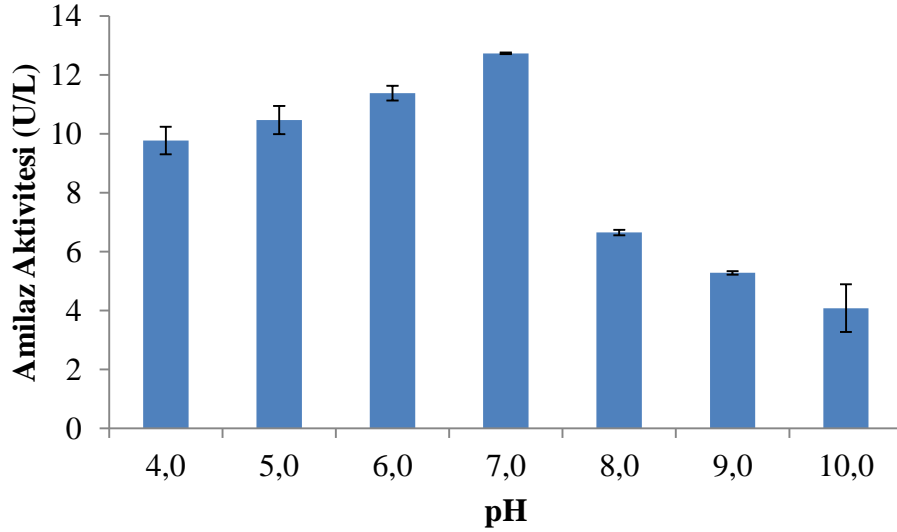
Çeşitli *Bacillus* suşlarının amilaz üretim yeteneklerinin araştırıldığı bir çalışmada farklı çalkalama hızlarının (0-250 rpm) amilaz üretimi üzerine etkisi incelenmiş ve en yüksek  $\alpha$ -amilaz aktivitesi gösteren suşun *Bacillus* sp. M10 olduğu saptanmıştır. Buna göre; *Bacillus* sp. M10'un en yüksek amilaz aktivitesinin (30 U/mL) 37 °C, pH 7.0, 150 rpm ve 48 saatlik inkübasyon sonucunda gerçekleştiği tespit edilmiş (Demirkan ve diğ., 2017) olup, bu sonuçlar mevcut tez çalışmasıyla benzerlikler göstermektedir.

#### 4.2.3 Ortam pH'sının amilaz üretim verimine etkisinin saptanması

Amilaz üretiminde verimi etkileyen önemli faktörlerden biri de ortamın başlangıç pH'sıdır. Bu nedenle her iki bakteri türü ile yapılan enzim üretim çalışmalarında kullanılan sıvı besiyerinin (NB) başlangıç pH'ları Bölüm 3.5.3'de ifade edildiği gibi pH 4.0-10.0'a ayarlanmış ve *B. megaterium* A1 ve *B. pumilus* D3 bu ortamlara inoküle edildikten sonra bakteri türleri 150 rpm ve 30 °C'de 48 saat boyunca ayrı ayrı inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası yapılan enzim aktivite ölçümlerine göre; her iki bakteri türü için de pH 4.0-7.0 arasında enzim aktivitelerinde belirgin bir artış, pH 7.0-10.0 arasında da belirgin bir azalış tespit edilmiştir. Buna göre; hem *B. megaterium* A1 hem de *B. pumilus* D3 en yüksek amilaz aktivitesinin saptandığı NB'ların pH değeri pH 7.0 olup, bu ortamlardan elde edilen amilaz aktiviteleri sırasıyla 11.92 U/L (Şekil 4.7) ve 12.73 U/L'dir (Şekil 4.8). Yukarıda ifade edildiği gibi her iki bakteri için de en düşük amilaz aktiviteleri pH 10.0'a ayarlanmış NB ortamlarında tespit edilmiş olup, bu ortamlardaki amilaz aktiviteleri sırasıyla 7.31 U/L (Şekil 4. 7) ve 4.08 U/L'dir (Şekil 4.8).



Şekil 4.7 : Farklı ortam pH'larının *B. megaterium* A1'in amilaz üretimine etkisi.



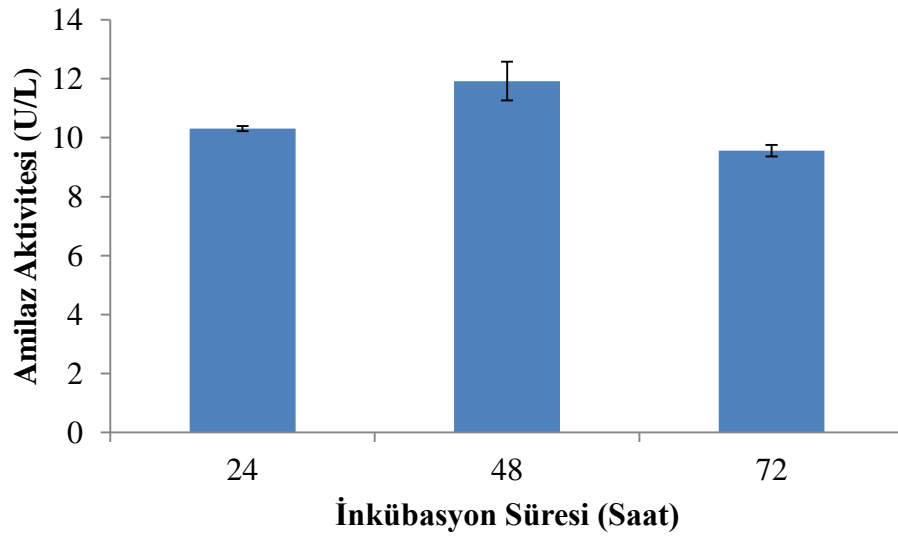
Şekil 4.8 : Farklı ortam pH'larının *B. pumilus* D3'ün amilaz üretimine etkisi.

Arekemase ve diğ. (2020) tarafından batık fermentasyon tekniği kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada topraktan çeşitli bakteri türleri izole edilmiş ve ortam pH'larının bu bakteri izolatlarının amilaz üretimi üzerine etkileri araştırılmıştır. Elde edilen bulgular doğrultusunda en yüksek amilaz aktivitesi gösteren bakteri suşlarının *Enterobacter hormaechei* SR3 ve *Bacillus cereus* MR1 olduğu saptanmıştır. Çeşitli pH'lara (pH 5.0-9.0) sahip ortamların test edildiği çalışmada optimum pH değerleri pH 7.0 ile 8.0 arasında olup, bu koşullardaki en yüksek amilaz aktivitelerinin *Bacillus cereus* MR1

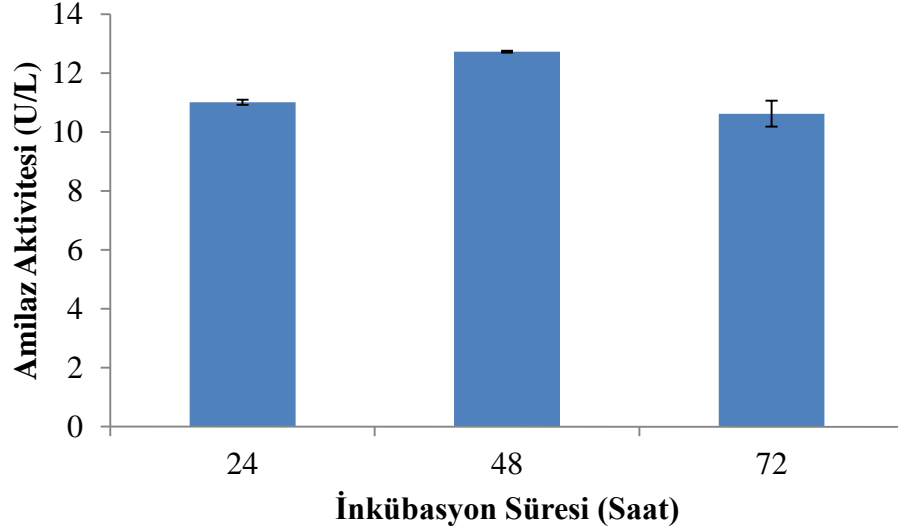
için 2.668 U/mL ve *Enterobacter hormaechei* SR3 için de 2.718 U/mL olduğu belirlenmiştir.

#### 4.2.4 İnkübasyon süresinin amilaz üretim verimine etkisinin saptanması

Tez çalışmalarının bu aşamasında kullanılan bakteri türleri farklı sürelerde (24, 48 ve 72 saat) pH 7.0'a ayarlanmış NB'larda 30 °C, 150 rpm'de ayrı ayrı inkübe edilmiş ve enzim aktivitesi için en uygun olan inkübasyon süresi saptanmıştır. Buna göre; hem *B. megaterium* A1 hem de *B. pumilus* D3 için en yüksek amilaz aktiviteleri 48. saatte belirlenmiş ve bu saatteki amilaz aktiviteleri de sırasıyla 11.92 U/L ve 12.73 U/L olarak saptanmıştır (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10). Çalışmalarda kullanılan her iki bakteri türü için de inkübasyon süresi 48 saatin üzerine çıktığında amilaz aktivitelerinde azalma gerçekleştiği saptandığından inkübasyon süresinin optimizasyonu üzerine yapılan çalışma 72 saatte tamamlanmıştır.



Şekil 4.9 : Farklı inkübasyon sürelerinin *B. megaterium* A1'in amilaz üretimine etkisi.



**Şekil 4.10 :** Farklı inkübasyon sürelerinin *B. pumilus* D3'ün amilaz üretimine etkisi.

İnkübasyon süresinin *Bacillus amyloliquefaciens* bakteri türünün  $\alpha$ -amilaz üretimi üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada farklı inkübasyon süreleri (24-120 saat) test edilmiş ve en yüksek amilaz aktivitesinin (54.73 U/mL) elde edildiği optimum inkübasyon süresinin 72 saat olduğu rapor edilmiştir (Zaghloul ve diğ, 2021).

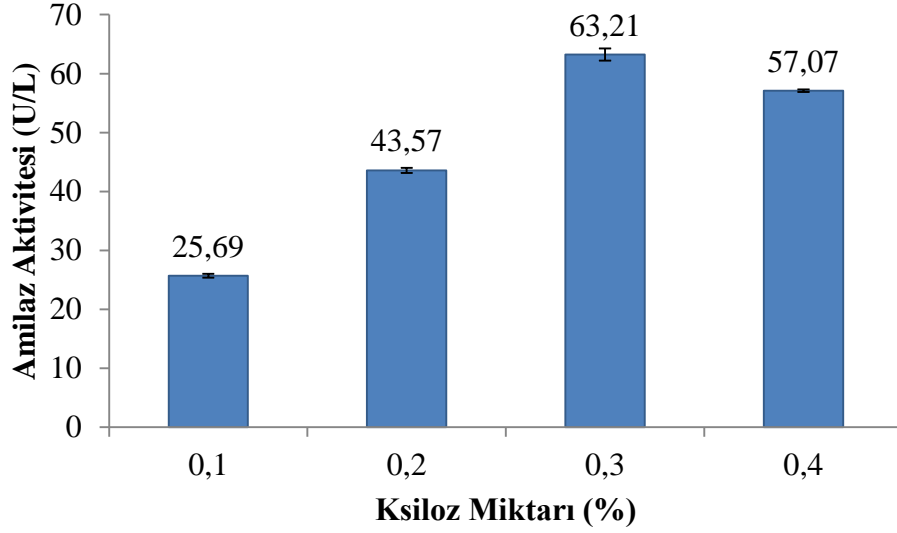
#### 4.3 Çeşitli İndükleyici Maddelerin Amilaz Üretim Verimine Etkisinin Saptanması

##### 4.3.1 Farklı miktarlarda ksiloz eklenmiş NB ortamlarında amilaz üretimi

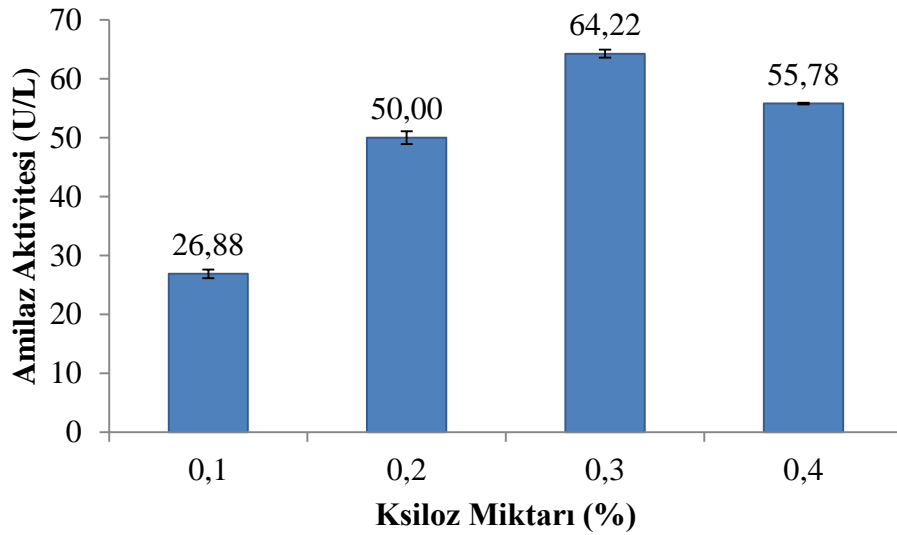
Çalışmalarda kullanılan bakteri türlerinin optimum inkübasyon koşullarının saptanmasına yönelik çalışmalardan sonra amilaz üretiminin daha yüksek seviyelere çıkarılması amacıyla pH'ları 7.0'a ayarlanmış NB ortamlarına çeşitli miktarlarda ayrı ayrı (%0.1, %0.2, %0.3 ve %0.4) ksiloz eklenmiştir. Bu işlemlerin ardından her iki bakteri türü de aseptik koşullarda önce bu ortamlara inoküle edilmiş, daha sonra da 30 °C ve 150 rpm çalkalama hızında 48 saat inkübe edilmiştir.

Yapılan spektrofotometrik amilaz aktivite ölçümleri sonucunda; hem *B. megaterium* A1 hem de *B. pumilus* D3 için en yüksek enzim aktiviteleri %0.3 oranında ksiloz ihtiva eden NB'larda sırasıyla 63.21 U/L (Şekil 4.11) ve 64.22 U/L (Şekil 4.12) olarak belirlenmiştir. Elde edilen amilaz aktiviteleri incelendiğinde; her iki bakteri türü için de en yüksek amilaz aktivitelerinin %0.3 ksiloz ilave edilmiş NB ortamlarında belirlendiği açıkça görülmektedir. Buna göre; %0.3 ksiloz ilave edilmiş NB ortamında *B. megaterium* A1'in

inkübasyonu sonucu kontrole kıyasla amilaz aktivitesinde yaklaşık 5.3 katlık bir artış oluşurken, *B. pumilus* D3 içinse 5 katlık bir artış gerçekleşmiştir.



Şekil 4.11 : Farklı miktarlarda ksiloz eklenmiş NB ortamlarında *B. megaterium* A1'in amilaz üretimi.



Şekil 4.12 : Farklı miktarlarda ksiloz eklenmiş NB ortamlarında *B. pumilus* D3'ün amilaz üretimi.

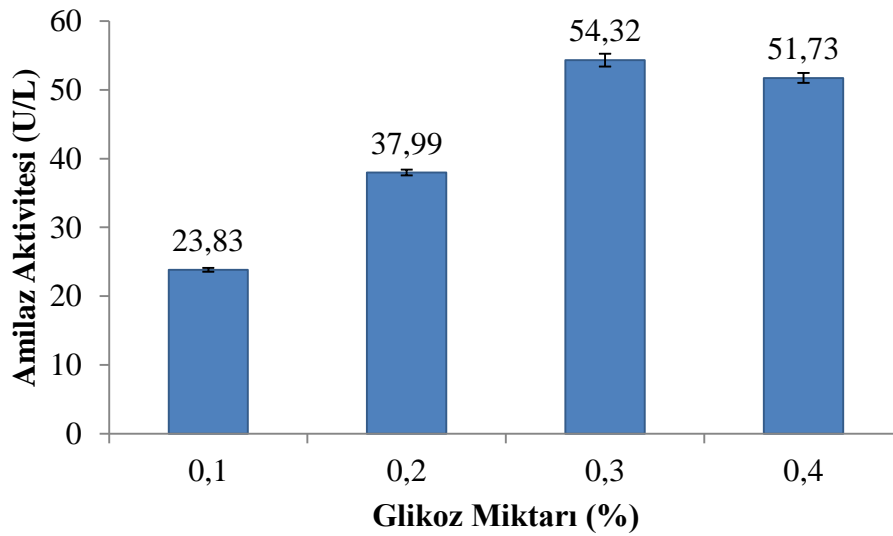
Elmansy ve diğ. (2018) tarafından yürütülen bir çalışmada *Bacillus* sp. NRC22017 suşunun üreme ortamına %2 oranlarında çeşitli karbon kaynakları (nişasta, sükröz, fruktoz, ksiloz ve maltoz) eklenerek test edilen bakteri suşunun amilaz üretim yeteneği arttırılmaya

çalışılmıştır. Elde edilen bulgulara göre; ksiloz içeren ortamdaki amilaz aktivitesi yaklaşık 12 U/mL olup, en yüksek enzim aktivitesi (13.74 U/mL) ise indükleyici olarak maltoz içeren ortamdan elde edilmiştir.

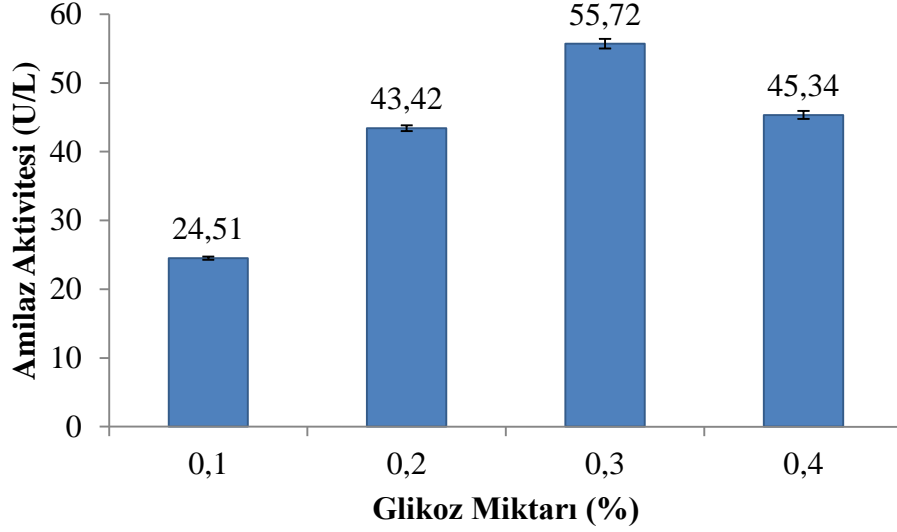
#### 4.3.2 Farklı miktarlarda glikoz eklenmiş NB ortamlarında amilaz üretimi

Amilaz üretiminin artırılması amacıyla NB ortamlarına ilave edilen bir diğer indükleyici madde de glikoz olup, her iki bakteri türünün de çeşitli konsantrasyonlarda (%0.1-0.4) glikoz içeren NB ortamlara inokülasyonu ve ardından da inkübasyonu sonucu amilaz aktivitelerinde kontrole kıyasla ciddi artışlar gerçekleşmiştir.

Yapılan spektrofotometrik enzim aktivite ölçümleri iki bakteri türü için de en yüksek amilaz aktivitesinin %0.3 glikoz ilave edilmiş NB ortamlarında saptandığını göstermektedir. Buna göre; en yüksek enzim aktivitelerinin tespit edildiği NB+%0.3 glikoz ortamlarındaki aktivite değerleri *B. megaterium* A1 için 54.32 U/L iken (Şekil 4.13), *B. pumilus* D3 için 55.72 U/L (Şekil 4.14) olarak bulunmuştur. Bu değerler *B. megaterium* A1'in ve *B. pumilus* D3'ün kontrol grubundan sırasıyla yaklaşık 4.6 kat ve 4.4 kat daha fazladır. Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'ten de görülebildiği gibi her iki bakteri türünün de %0.3'ün üzerinde glikoz içeren NB ortamlara inoküle ve ardından inkübe edilmesi sonucu enzim aktivitelerinde azalışlar olduğu gözlenmektedir. Bu nedenle mevcut çalışma %0.1-0.4 glikoz ilave edilmiş NB ortamları ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.13 : Farklı miktarlarda glikoz eklenmiş NB ortamlarında *B. megaterium* A1'in amilaz üretimi.



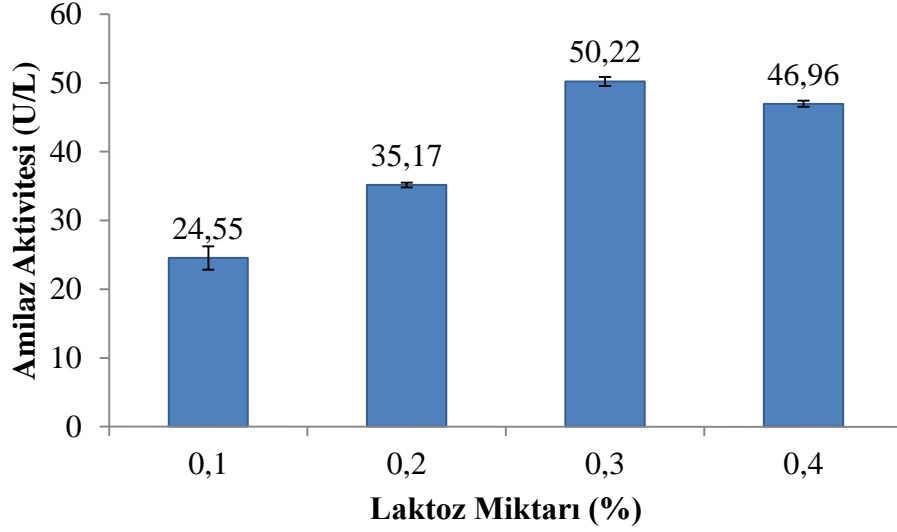
**Şekil 4.14 :** Farklı miktarlarda glikoz eklenmiş NB ortamlarında *B. pumilus* D3'ün amilaz üretimi.

Du ve diğ. (2018) tarafından *Bacillus amyloliquefaciens* BH1 suşu kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada test edilen bakteri suşunun üreme ortamına glikoz, maltoz, fruktoz, sükröz, çözümlü nişasta ve selüloz gibi indükleyici maddeler eklenmiştir. Test edilen bu karbon kaynakları arasında en yüksek  $\alpha$ -amilaz aktivitesi (6.18 U/mL) çözümlü nişasta içeren, ikinci en yüksek enzim aktivitesi (5.34 U/mL) ise glikoz içeren ortamlarda saptanmıştır.

#### 4.3.3 Farklı miktarlarda laktoz eklenmiş NB ortamlarında amilaz üretimi

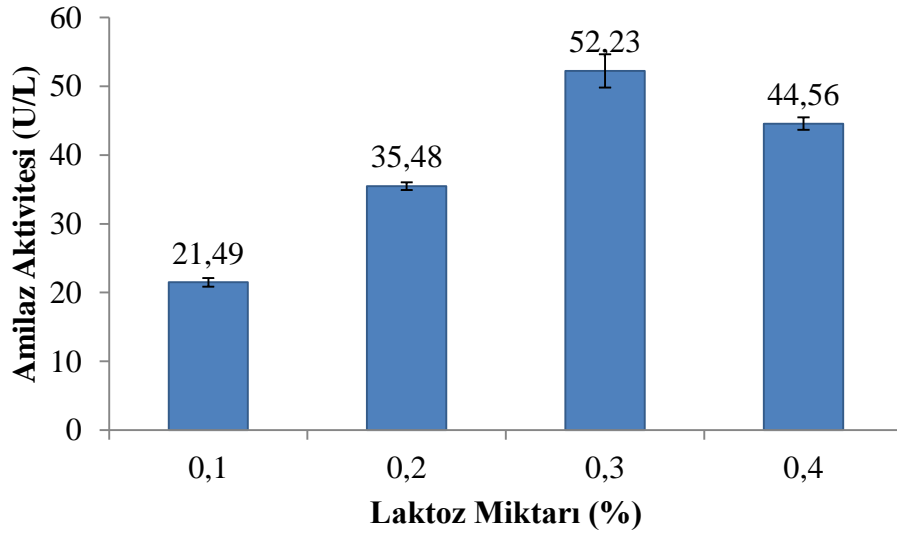
Mevcut tez çalışmasında test edilen diğer indükleyici maddeler (karbonhidratlar) gibi laktoz da literatürde amilaz aktivitesinin artırılması için kullanılan karbonhidratlardandır. Buna göre; çalışılan diğer indükleyici maddeler (ksiloz ve glikoz) ile aynı konsantrasyonlarda (%0.1-0.4) laktoz ayrı ayrı NB ortamlarına ilave edilmiş olup, daha sonra her iki bakteri türü de bu ortamlara inoküle edilmiştir. Bu işlemlerin ardından optimum koşullarda inkübe edilen bakteri türlerinin kültür sıvıları elde edildikten sonra bu ortama sentezlenen amilaz enzimlerinin aktiviteleri belirlenmiştir. Buna göre; Şekil 4.15'te görüldüğü gibi *B. megaterium* A1'in en yüksek amilaz aktivitesi (50.22 U/L) NB +%0.3 laktoz içeren ortamda saptanmıştır. Bu amilaz aktivitesi kontrol grubundan yaklaşık 4.2 kat daha fazladır.





**Şekil 4.15 :** Farklı miktarlarda laktoz eklenmiş NB ortamlarında *B. megaterium* A1'in amilaz üretimi.

Şekil 4.16'da görüldüğü üzere *B. pumilus* D3'ün de en yüksek amilaz aktivitesinin saptandığı ortam %0.3 oranında laktoz ihtiva eden NB olup, bu ortamda saptanan amilaz aktivitesi 52.23 U/L'dir. Bu enzim aktivite değeri kontrol grubundan yaklaşık 4.1 kat daha yüksek olup, bu bakteri türünün NB+%0.4 laktoz ortamındaki amilaz aktivitesi 44.56 U/L olarak belirlendiğinden daha üst laktoz konsantrasyonlarını içeren NB ortamlarında amilaz üretim çalışmaları gerçekleştirilmemiştir.

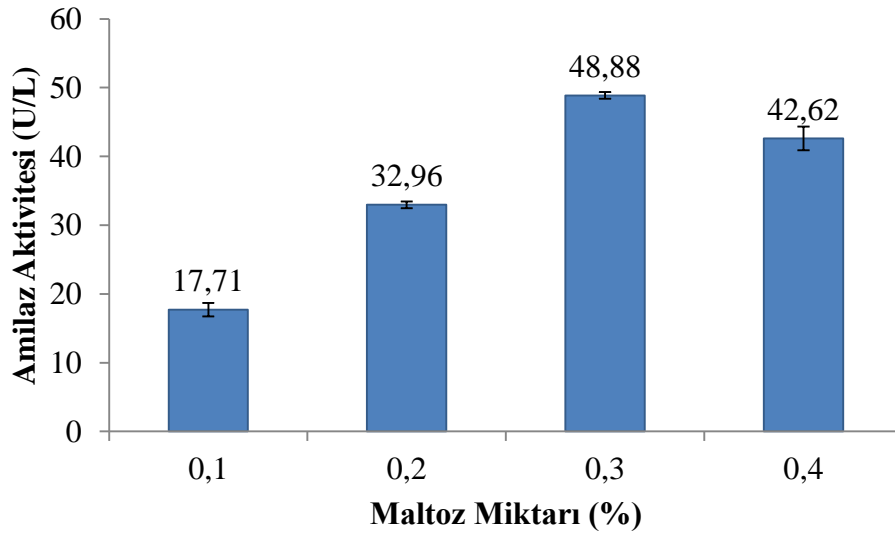


**Şekil 4.16 :** Farklı miktarlarda laktoz eklenmiş NB ortamlarında *B. pumilus* D3'ün amilaz üretimi.

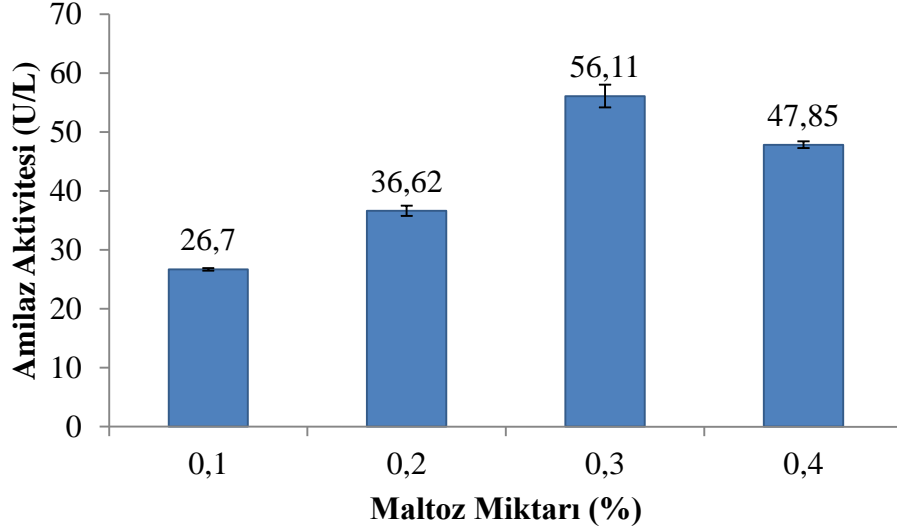
#### 4.3.4 Farklı miktarlarda maltoz eklenmiş NB ortamlarında amilaz üretimi

Amilaz üretiminin artırılmasına yönelik yapılan bu çalışmada da diğer üç indükleyici maddeye (ksiloz, glikoz ve laktoz) benzer şekilde %0.1-%0.4 oranlarında maltoz NB ortamlarına ayrı ayrı ilave edilmiş ve her iki bakteri türü de bu ortamlara önce inoküle edilmiş ardından da tespit edilen optimum koşullarda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucu her iki bakteri türünün de amilaz aktivitelerinde kontrole kıyasla önemli artışlar gerçekleşmiştir.

Gerçekleştirilen enzim aktivite ölçümleri sonucunda iki bakteri türü için de en yüksek enzim aktivitesi %0.3 maltoz içeren NB ortamlarında saptanmıştır. Buna göre; bu ortamlardaki amilaz aktiviteleri *B. megaterium* A1 için 48.88 U/L iken (Şekil 4.17), *B. pumilus* D3 için 56.11 U/L (Şekil 4.18) olarak belirlenmiştir. Bu aktivite değerleri *B. megaterium* A1'in ve *B. pumilus* D3'ün kontrol grubundan sırasıyla 4.1 kat ve 4.4 kat daha yüksektir. Hem Şekil 4.17 hem de Şekil 4.18'te görülebildiği üzere iki bakteri türünün de %0.3'e kadar maltoz içeren NB ortamlarında inkübasyonu sonucu amilaz aktivitelerinde kademeli artışlar, %0.4 maltoz içeren NB ortamlarında ise azalışlar gerçekleşmektedir. Bu nedenle mevcut çalışmada %0.4 maltoz üzerinde herhangi bir maltoz konsantrasyonu test edilmemiştir.



Şekil 4.17 : Farklı miktarlarda maltoz eklenmiş NB ortamlarında *B. megaterium* A1'in amilaz üretimi.



**Şekil 4.18 :** Farklı miktarlarda maltoz eklenmiş NB ortamlarında *B. pumilus* D3'ün amilaz üretimi.

Sharma ve diğ. (2014) tarafından yürütülen bir çalışmada çeşitli bakteri suşları izole edilmiş ve bu bakteri suşları arasından *Bacillus* sp. PM1'in en iyi amilaz üreten bakteri suşu olduğu tespit edilmiştir. Buna göre; *Bacillus* sp. PM1 suşunun üreme ortamına çeşitli indükleyici maddeler (maltoz, buğday kepeği, çözümlü nişasta, pirinç kepeği ve mısır ezmesi) ilave edilmiştir. Elde edilen bulgulara göre; en yüksek amilaz aktivitesinin (1.04 U/mL) çözümlü nişasta içeren ortamda, ikinci en yüksek amilaz aktivitesinin ise maltoz içeren (0.9 U/mL) ve pirinç kepeği (0.9 U/mL) içeren ortamlarda olduğu saptanmıştır.

#### 4.4 Farklı Miktarlarda Pirinç Tozu Eklenmiş NB Ortamlarında Amilaz Üretimi

Bakteriyel amilaz üretiminin artırılmasına yönelik çalışmalar kapsamında test edilen 4 farklı indükleyiciye (ksiloz, glikoz, laktoz ve maltoz) ilaveten farklı miktarlarda (%0.1-0.3) pirinç tozu da NB ortamlarına ayrı ayrı ilave edilmiştir. Bu işlemlerin ardından tez çalışmalarında amilaz üretici organizma olarak kullanılan *B. megaterium* A1 ve *B. pumilus* D3 bu ortamlara ayrı ayrı inoküle edilmiş ve daha sonra da optimum koşullarda inkübe edilmiştir.

Yapılan amilaz aktivite ölçümlerine göre; her iki bakteri türü için de test edilen pirinç tozu miktarlarının ilave edildiği NB ortamlarında belirlenen amilaz aktivitelerinde kontrollere kıyasla herhangi bir indüksiyon gerçekleşmemiştir. Test edilen ortamlardaki amilaz aktivite değerleri birbirine oldukça yakın olup, hem *B. megaterium* A1 hem de *B. pumilus* D3 için en yüksek enzim aktiviteleri %0.2 pirinç tozu içeren ortamlarda sırasıyla 10.51

U/L (Çizelge 4.1) ve 7.48 U/L (Çizelge 4.2) olarak belirlenmiştir. Bu ortamların (NB+%0.2 pirinç tozu) üzerindeki konsantrasyonlarda pirinç tozu ilavesinde enzim aktivitelerinde düşüş saptandığından NB ortamlarına daha üst konsantrasyonda pirinç tozu ilavesi yapılarak çalışmalara devam edilmemiştir.

**Çizelge 4.1 :** Farklı miktarlarda pirinç tozu eklenmiş NB ortamlarında *Bacillus megaterium* A1'in amilaz üretimi.

Pirinç Tozu'nun Miktarı (%)	Amilaz Aktivitesi (U/L)
0.1	10.06±0.27
0.2	10.51±0.61
0.3	9.71±0.81

**Çizelge 4.2 :** Farklı miktarlarda pirinç tozu eklenmiş NB ortamlarında *Bacillus pumilus* D3'ün amilaz üretimi.

Pirinç Tozu'nun Miktarı (%)	Amilaz Aktivitesi (U/L)
0.1	7.00±1.02
0.2	7.48±0.12
0.3	7.06±0.27

#### 4.5 Farklı Miktarlarda Ham Patates Özütü Eklenmiş NB Ortamlarında Amilaz Üretimi

Tez çalışmalarında kullanılan bakteri türlerinin amilaz üretiminin artırılmasına yönelik çalışmalar kapsamında test edilen bir diğer madde de ham patates özütüdür. Buna göre; çeşitli konsantrasyonlarda (%0.1-0.3) ham patates özütleri NB ortamlarına ayrı ayrı eklenmiştir. Bu işlemlerden sonra test edilen her iki bakteri türü de bu ortamlara ayrı ayrı inoküle edilmiş ve ardından da optimum koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. Gerçekleştirilen enzim aktivite ölçümlerine göre; her iki bakteri türü için de kullanılan ham patates özütlerinin farklı miktarlarının eklendiği NB ortamlarında saptanan amilaz aktivitelerinde kontrollere kıyasla herhangi bir artış gerçekleşmediği belirlenmiştir. Pirinç tozuna benzer şekilde farklı miktarlarda ham patates özütü içeren ortamlardaki amilaz aktivite değerleri de birbirine oldukça yakındır. Ancak *B. megaterium* A1 için en yüksek amilaz aktivitesi %0.2 ham patates özütü içeren ortamda 9.81 U/L (Çizelge 4.3), *B. pumilus* D3 içinse en yüksek enzim aktivitesi %0.3 ham patates özütü içeren ortamda 10.97 U/L (Çizelge 4.4) olarak saptanmıştır.

**Çizelge 4.3 :** Farklı miktarlarda ham patates özütü eklenmiş NB ortamlarında *Bacillus megaterium* A1'in amilaz üretimi.

Ham Patates Özütü'nün Miktarı (%)	Amilaz Aktivitesi (U/L)
0.1	9.25±0.76
0.2	9.81±0.10
0.3	9.54±0.39

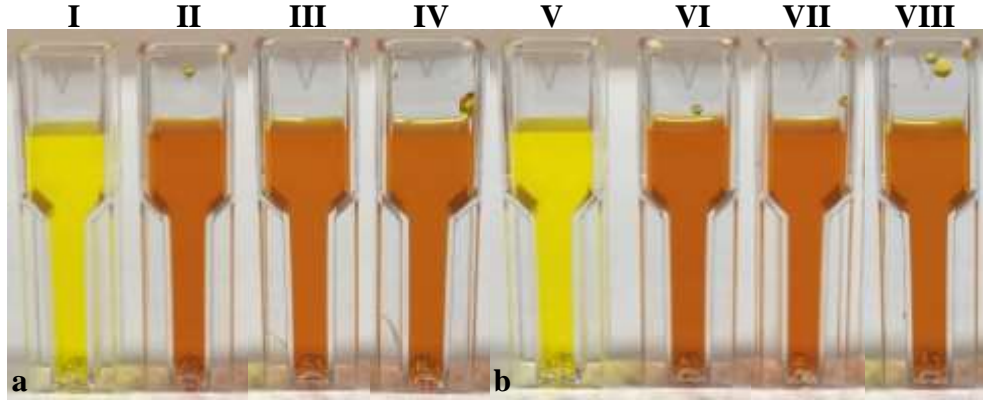
**Çizelge 4.4 :** Farklı miktarlarda ham patates özütü eklenmiş NB ortamlarında *Bacillus pumilus* D3'ün amilaz üretimi.

Ham Patates Özütü'nün Miktarı (%)	Amilaz Aktivitesi (U/L)
0.1	10.58±0.32
0.2	10.93±0.23
0.3	10.97±0.12

AL-awsy ve diğ. (2017) tarafından yürütülen bir çalışmada *Bacillus licheniformis* CT<sub>5</sub>, *Bacillus subtilis* CT<sub>22</sub> ve *Bacillus licheniformis* CT<sub>39</sub>'un amilaz üretim yeteneklerini arttırmak amacıyla üreme ortamlarına %1 oranlarında beş farklı tarım atığı (buğday kepeği, buğday samanı, kırık pirinç, pirinç kabuğu ve patates kabuğu) ayrı ayrı eklenmiştir. Bu ortamlarda gerçekleştirilen inkübasyon sonrası yapılan enzim aktivite ölçümlerine göre; test edilen her üç bakteri suşunun da (*Bacillus licheniformis* CT<sub>5</sub>, *Bacillus subtilis* CT<sub>22</sub> ve *Bacillus licheniformis* CT<sub>39</sub>) en yüksek amilaz aktivitesinin patates kabuğu içeren ortamlarda sırasıyla 59.3 U/mL, 87.2 U/mL ve 51.6 U/mL olduğu rapor edilmiştir.

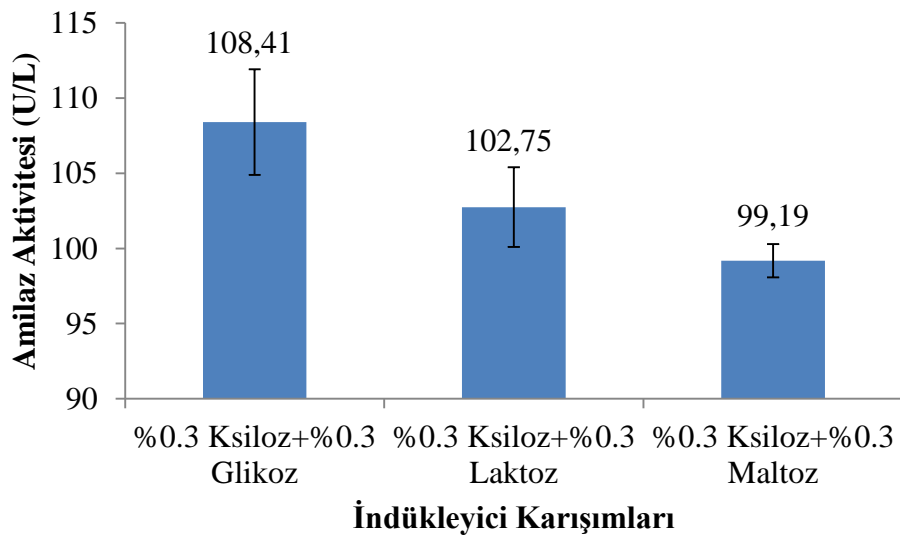
#### **4.6 Çeşitli İndükleyici Maddelerin Karışımlarının *B. megaterium* A1 ve *B. pumilus* D3'ün Amilaz Üretimine Etkisi**

Tez çalışmalarının bu aşamasında da en yüksek amilaz aktivitelerinin elde edilmesine neden olan konsantrasyonlardaki indükleyici maddeler karıştırılarak (%0.3 ksiloz+%0.3 glikoz, %0.3 ksiloz+%0.3 laktoz ve %0.3 ksiloz+%0.3 maltoz) NB ortamlarına ilave edilmiştir. Amilaz üretiminin daha da yüksek seviyelere çıkarılması amacıyla test edilen her iki bakteri de indükleyici maddelerin karışımlarını içeren bu ortamlara ayrı ayrı inoküle edilmiştir. Bu işlemlerin ardından elde edilen kültür sıvılarındaki enzimlerin aktiviteleri Bölüm 3.4'de ifade edildiği gibi çeşitli ön işlemlerin uygulanması ve DNS çözeltilisinin ilavesinden sonra (Şekil 4.19a ve Şekil 4.19b) spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve kontrole kıyasla oldukça yüksek seviyelerde enzim aktiviteleri saptanmıştır.



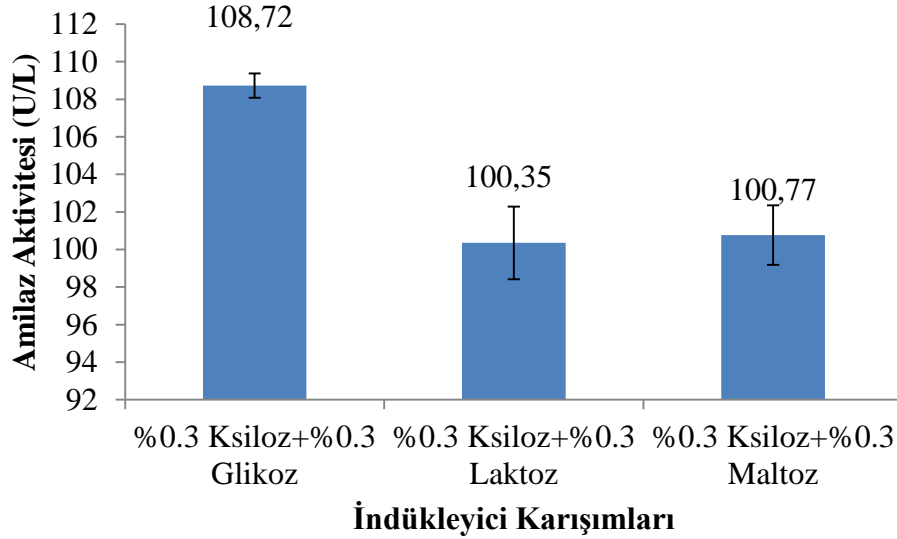
**Şekil 4.19 :** Sırasıyla kör (I) ve %0.3 ksiloz+%0.3 glikoz (II), %0.3 ksiloz+%0.3 laktoz (III), %0.3 ksiloz+%0.3 maltoz (IV) ortamlarında inkübasyonu ve ardından DNS ilavesi sonrası elde edilen *B. megaterium* A1'in kültür sıvılarının görüntüsü (a), sırasıyla kör (V) ve %0.3 ksiloz+%0.3 glikoz (VI), %0.3 ksiloz+%0.3 laktoz (VII), %0.3 ksiloz+%0.3 maltoz (VIII) ortamlarında inkübasyonu ve ardından DNS ilavesi sonrası elde edilen *B. pumilus* D3'ün kültür sıvılarının görüntüsü (b).

İndükleyici karışımlarını içeren ortamlarda her iki bakteri türünün amilaz üretimlerinin son derece yüksek olması test edilen indükleyicilerin birlikte kullanılmalarının amilaz üretiminde sinerjistik etkilere sebep olduğunun bir göstergesidir. Buna göre; Şekil 4.20'den de görülebileceği gibi *Bacillus megaterium* A1 için en yüksek amilaz aktivitesi sırası; %0.3 ksiloz+%0.3 glikoz (108.41 U/L) > %0.3 ksiloz+%0.3 laktoz (102.75 U/L) > %0.3 ksiloz+%0.3 maltoz (99.19 U/L) şeklindedir. Bu enzim aktivite değerleri kontrol grubu ile kıyaslandığında sırasıyla; 9.1, 8.6 ve 8.3 kat daha yüksektir.



**Şekil 4.20 :** Çeşitli indükleyici maddelerin karışımlarının *B. megaterium* A1'in amilaz üretimine etkisi.

Şekil 4.21 incelendiğinde ise; *Bacillus pumilus* D3 için en yüksek enzim aktivitesi sırası; %0.3 ksiloz+%0.3 glikoz (108.72 U/L) > %0.3 ksiloz+%0.3 maltoz (100.77 U/L) > %0.3 ksiloz+%0.3 laktoz (100.35 U/L) şeklindedir. Bu amilaz aktivite değerleri de kontrol grubu ile kıyaslandığında sırasıyla; 8.6, 7.9 ve 7.9 kat daha yüksektir.

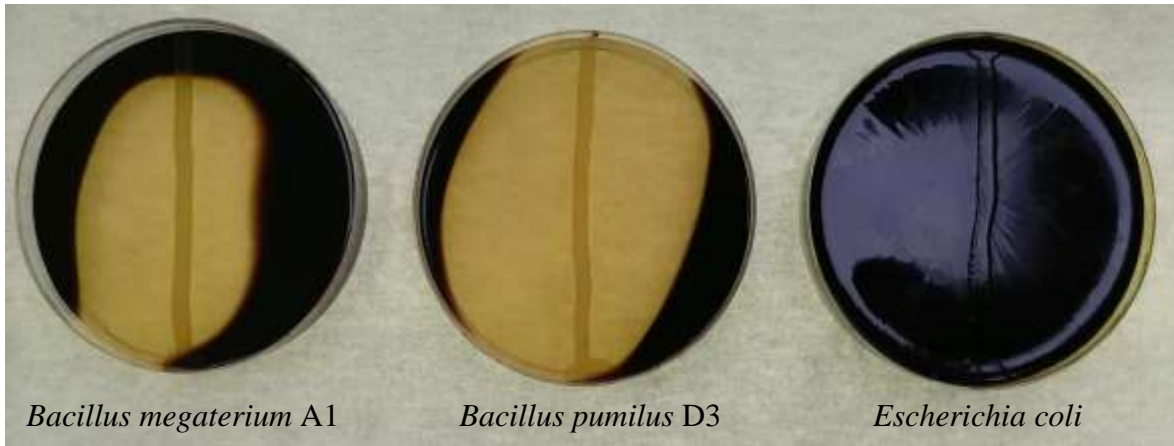


**Şekil 4.21** : Çeşitli indükleyici maddelerin karışımlarının *B. pumilus* D3'ün amilaz üretimine etkisi.

Literatür bilgimize göre bakteriyel amilaz üretiminin artırılması amacıyla çeşitli karbon ve azot kaynaklarının karışımının kullanıldığı sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birinde *B. subtilis*, BS9 ve PB1 bakteri suşlarının amilaz aktivitesini arttırmak amacıyla üreme ortamına %50 patates kabuğu özütü+%50 muz kabuğu özütü eklenmiş ve test edilen organizmalar bu ortamlarda ayrı ayrı 24-72 saat inkübe edilmiştir. Yapılan enzim aktivite ölçümleri sonucunda en yüksek amilaz aktivitesi (1.36 U/mL) 24 saatlik inkübasyon sonunda PB1 suşundan elde edilmiştir. Çalışmanın bir sonraki aşamasında %50 muz kabuğu özütü+%50 pepton ve %50 patates kabuğu özütü+%50 pepton karışımları da test edilmiş ve *B. subtilis*, BS9 ve PB1 bakteri suşları bu ortamlarda 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Gerçekleştirilen inkübasyon sonunda %50 muz kabuğu özütü+%50 pepton ortamındaki en yüksek amilaz aktivitesi (0.66 U/mL) *B. subtilis*'ten, %50 patates kabuğu özütü+%50 pepton ortamındaki en yüksek amilaz aktivitesi ise (0.7 U/mL) BS9 suşundan elde edilmiştir (Jadhav ve diğ, 2013).

#### 4.7 Katı Ortamda Nişasta Hidroliz Testi

Yapılan yüksek lisans tez çalışmalarının bu aşamasında da test edilen bakteri türlerinin katı besiyeri (NA) ortamlarında amilaz sentezleyip sentezlemediğini saptayabilmek amacıyla *B. megaterium* A1, *B. pumilus* D3 ve literatürde (Kumar KM ve diğ, 2019) amilaz sentezlemediği rapor edilen *Escherichia coli* %0.5 çözünür nişasta ilave edilmiş NA ortamlarına steril eküvyon çubuklarıyla ayrı ayrı inoküle edilmiş ve uygun koşullarda (*B. megaterium* A1 ve *B. pumilus* D3 30 °C’de 24 saat, *E. coli* ise 37 °C’de 24 saat) statik olarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası test edilen üç bakteri türünün de ürediği NA ortamlarına tüm yüzey kaplanana kadar Bölüm 3.10’da ifade edilen 1/2 oranında sulandırılmış konsantriyot çözeltisinden damlatılmıştır. Bu işlemlerin sonrasında yine uygun koşullarda yapılan 24 saatlik inkübasyon sonrasında *B. megaterium* A1 ve *B. pumilus* D3 tarafından NA ortamlarına sentezlenen amilaz enzimlerine bağlı olarak nişastanın yıkımı gerçekleşmiştir. Nişastanın ortamdaki uzaklaşması sonucu *B. megaterium* A1 ve *B. pumilus* D3’ün ürediği NA ortamlarında açık renkli bölgeler meydana gelmiştir (Şekil 4.22). Ancak *E. coli*’nin ürediği NA ortamında amilaz sentezlenmemesine bağlı ortamdaki nişasta varlığından dolayı herhangi bir açık renkli alan bulunmamakta ve dolayısıyla tüm NA ortamı koyu renkli görünmeye devam etmektedir (Şekil 4.22).

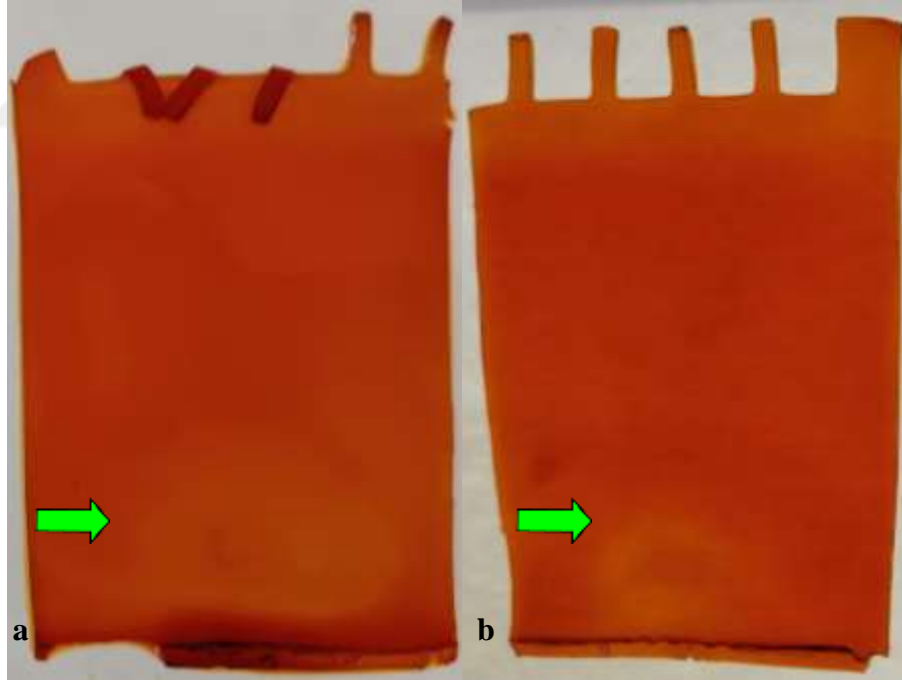


Şekil 4.22 : *B. megaterium* A1, *B. pumilus* D3 ve *E. coli* kullanılarak yapılan katı ortamda (NA) nişasta hidroliz testi.



#### 4.8 İndükleyici Karışımlarının Bulunduğu Ortamlarda Üretilen *B. megaterium* A1 ve *B. pumilus* D3 Amilazlarının Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrezinde Gösterilmesi

Bu çalışmada hem *B. megaterium* A1 hem de *B. pumilus* D3'ün en yüksek amilaz aktivitelerinin saptandığı ortamlardan (%0.3 ksiloz+%0.3 glikoz) elde edilen kültür sıvılarından örnekler alınmış ve Bölüm 3.11' de ifade edildiği şekilde 40 mA/jel sabit akımda (Birhanlı, 2008) yaklaşık 45 dakika süre ile doğal poliakrilamid jel elektrofrezinde yürütülmüştür. Bu işlemlerin ardından jeldeki her iki bakteri türüne ait amilaz bantlarının görünür hale getirilmesi amacıyla jeller önce %0.5 çözünür nişasta çözeltisi ile çalkalamalı inkübatörde 60 dakika boyunca inkübe edilmiş (Baltaş, 2012; Keskin, 2015) ve yıkanmıştır. Daha sonra aktivite boyama için jellerin üzerine 1/2 oranında sulandırılan iyot çözeltisinden eklenmiş ve jeller çalkalamalı inkübatörde 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Yapılan bu işlemler sonucunda; hem *B. megaterium* A1 (Şekil 4.23a) hem de *B. pumilus* D3'ün (Şekil 4.23b) amilaz enzimlerinin bulunduğu bölgelerde nişasta yıkımına bağlı olarak renk açılmaları gözlemlenmiştir.



**Şekil 4.23 :** *B. megaterium* A1 ve *B. pumilus* D3'ün %0.3 ksiloz+%0.3 glikoz ortamlarından elde edilen kültür sıvılarındaki amilaz enzimlerinin doğal poliakrilamid jel elektrofrezinde görüntülenmesi.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Amilazlar çeşitli ökaryot ve prokaryot organizmalar tarafından hücre içi ve hücre dışı formlarda üretilen enzimler olup, çeşitli yöntemler ile ticari önemi olan endüstriyel enzimlerdendir. Gerekli manipülasyonlara açık olmaları, daha basit ve ekonomik enzim üretme koşullarına sahip olmaları gibi nedenlerle diğer amilaz üretici organizmalara kıyasla amilaz üretiminde bakteriler öne çıkmaktadır.

Bu yüksek lisans tez çalışmasında da literatür bilgimize göre amilaz üretimi açısından henüz test edilmemiş iki farklı mezofilik bakteri türüne ait suşların (*B. megaterium* A1 ve *B. pumilus* D3) öncelikle çeşitli inkübasyon koşullarındaki amilaz üretim yetenekleri araştırılmıştır. Bu amaç doğrultusunda test edilen bakteri suşları ilk olarak çeşitli inkübasyon sıcaklıklarında (25-60 °C) inkübe edilerek optimum amilaz üretim sıcaklıkları belirlenmiştir. Bu işlemlerin ardından farklı çalkalama hızlarının (0-200 rpm), çeşitli ortam pH'larının (pH 4.0-10.0) ve son olarak da 24, 48 ve 72 saat gibi farklı inkübasyon sürelerinin test edilen her iki bakteri suşunun amilaz üretimine etkileri araştırılmış ve böylece her iki bakteri suşu için en yüksek amilaz üretim koşulları saptanmıştır. Buna göre; her iki bakteri suşu için de optimum sıcaklık değeri, çalkalama hızı, ortam pH'sı ve inkübasyon süresi sırasıyla 30 °C, 150 rpm, pH 7.0 ve 48 saat olarak tespit edilmiştir.

Optimizasyon çalışmalarını takiben her iki bakteri suşu da çeşitli konsantrasyonlarda (%0.1-0.4) farklı indükleyicilerin (ksiloz, glikoz, laktoz ve maltoz) ilave edildiği NB ortamlarında optimum koşullarda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası yapılan enzim aktivite ölçümleri ile hem amilaz üretimindeki artışlar hem de optimum indükleyici konsantrasyonları (%0.3) saptanmıştır. Her iki bakteri suşunun %0.3 ksiloz, %0.3 glikoz, %0.3 laktoz ve %0.3 maltoz ilave edilmiş NB ortamlarında ayrı ayrı inkübasyonu sonunda amilaz aktivitelerinde belirgin artışlar gerçekleşmiş olup, *B. megaterium* A1 için bu enzim aktiviteleri sırasıyla 63.21 U/L, 54.32 U/L 50.22 U/L ve 48.88 U/L'dir. Aynı ortamlarda ayrı ayrı inkübe edilen *B. pumilus* D3 içinse bu enzim aktiviteleri sırasıyla 64.22 U/L, 55.72 U/L 52.23 U/L ve 56.11 U/L olarak saptanmıştır. Elde edilen bulgular %0.3 indükleyici içeren ortamlarda *B. pumilus* D3'ün amilaz aktivitelerinin *B. megaterium* A1'den biraz daha yüksek olduğunu göstermektedir.

Test edilen her iki bakteri suşunun amilaz üretimlerinin arttırılmasına yönelik yapılan çalışmalar kapsamında NB ortamlarına ayrı ayrı %0.1-%0.3 oranlarında pirinç tozu ve yine aynı konsantrasyonlarda ham patates özütü de ilave edilmiştir. Ancak hem *B. megaterium* A1 hem de *B. pumilus* D3'ün bu ortamlarda ayrı ayrı inkübasyonunun her iki bakterinin amilaz üretiminde de belirgin bir artışa sebep olmadığı saptanmıştır.

Literatür taramalarımıza göre bakteriyel amilaz üretiminin arttırılmasına yönelik sınırlı sayıda çalışmada indükleyici maddeler karışım halinde test edilmiştir. Buna göre tez çalışmasının bir sonraki aşamasında; optimum konsantrasyonlardaki indükleyici karışımları (%0.3 ksiloz+%0.3 glikoz, %0.3 ksiloz+%0.3 laktoz ve %0.3 ksiloz+%0.3 maltoz) NB ortamlarına ayrı ayrı eklenmiş ve her iki bakteri suşu da bu ortamlarda optimum koşullarda inkübe edilmiştir. İnkübasyonlar sonucunda yapılan enzim aktivite ölçümlerine göre; her iki bakteri suşunun da amilaz üretimlerinde çok daha yüksek artışlar saptanmıştır. Buna göre; *B. megaterium* A1'in %0.3 ksiloz+%0.3 glikoz, %0.3 ksiloz+%0.3 laktoz ve %0.3 ksiloz+%0.3 maltoz içeren NB ortamlarında inkübasyonu sonunda elde edilen en yüksek amilaz aktiviteleri sırasıyla 108.41 U/L, 102.75 ve 99.19 U/L'dir. Benzer şekilde *B. pumilus* D3'ün aynı ortamlarda ayrı ayrı inkübasyonu sonrası saptanan en yüksek amilaz aktiviteleri de sırasıyla 108.72 U/L, 100.35 U/L ve 100.77 U/L olarak ölçülmüştür. Elde edilen spektrofotometrik enzim aktivite sonuçları test edilen optimum konsantrasyonlardaki indükleyici karışımlarının amilaz aktivitelerinde sinerjistik etkiler göstererek önemli artışlara neden oldukları yönündedir.

Sıvı besiyeri ortamlarında (NB) hücre dışı amilaz varlığının tespiti ve enzim üretimlerinin arttırılmasından sonra test edilen her iki bakteri türünün katı besiyeri (NA) ortamlarında amilaz üretilmediğinin belirlenmesi amacıyla katı ortamda nişasta hidrolizine yönelik çalışmalar da yapılmıştır. Buna göre; hem *B. megaterium* A1 ve *B. pumilus* D3 hem de kontrol grubu olarak *E. coli* çözümlü nişasta içeren NA ortamlarına inoküle edilmiş ve daha sonra da bu ortamlarda inkübe edilmiştir. Bu işlemlerin ardından kullanılan üç bakteri türünün de 1/2 oranında sulandırılmış konsantre iyot çözeltileriyle muamele edilmeleri sonucunda *E. coli*'nin kültür ortamında amilaz sentezlenmemesinden dolayı açık renkli alan oluşmazken, *B. megaterium* A1 ve *B. pumilus* D3'ün kültür ortamlarında hücre dışı olarak sentezlenen amilazlara bağlı olarak açık renkli alanlar oluştuğu gözlemlenmiştir.

Yüksek lisans tez çalışmalarının son aşamasında; test edilen her iki bakteri türünün de en yüksek amilaz üretiminin gerçekleştiği ortamlardan (%0.3 ksiloz+%0.3 glikoz) elde edilen kültür sıvıları doğal poliakrilamid jel elektroforezinde yürütülmüştür. Bu işlemin

sonrasında her iki bakteri suşuna özgü hücre dışı amilazların yürütüldüğü jel önce çözünür nişasta, ardından da 1/2 oranında sulandırılmış konsantre iyot çözeltisiyle muamele edilmiştir. Bu işlemlerin sonucunda her iki bakteri suşuna ait amilazların jelde bulunduğu bölgelerde nişasta yıkımına bağlı olarak jel üzerinde açık renkli alanlar oluştuğu gözlemlenmiştir. Böylece hem *B. megaterium* A1 hem de *B. pumilus* D3 için gerçekleştirilen zimogram analizi sonucunda hücre dışına sentezlenen amilaz enzimlerinin jel üzerindeki varlıkları da kanıtlanmış olmaktadır.

Sonuç olarak; literatürde bulunan çalışmalar ve bu tez çalışması test edilen organizmanın türü, inkübasyon koşulları, üreme ortamı, karbon ve azot kaynağı gibi faktörlerin değişmesi durumunda elde edilen amilaz aktivitelerinin de değiştiğini göstermektedir. Bu durum yeni izole edilen bakteriler, çeşitli inkübasyon koşulları, üreme ortamları, karbon ve azot kaynakları ve ayrıca indükleyici kombinasyonlarının test edilmesi sonucu oldukça yüksek aktivitelere ve kararlılığa sahip amilaz enzimlerinin elde edilebileceğinin bir göstergesidir. Yapılacak yeni çalışmalar sonucunda elde edilecek yüksek aktiviteli ve kararlı yapıdaki amilaz enzimlerinin kullanılabilirliği endüstriyel alanların sayısında ve çeşidinde de önemli artışlar olabilecektir. Buna göre; yüksek lisans tezi kapsamında *B. megaterium* A1 ve *B. pumilus* D3 kullanılarak gerçekleştirilen bu çalışmalar, ekonomik ve çevre dostu koşullarda kısa sürelerde amilaz üretilebileceğini ve bu enzimlerin üretimlerinin önemli oranlarda arttırılabileceğini göstermektedir.

## KAYNAKLAR

- Abe, I. J., Ushijima, C., & Hizukuri, S.** (1999). Expression of the Isoamylase Gene of *Flavobacterium odoratum* KU in *Escherichia coli* and Identification of Essential Residues of the Enzyme by Site- Directed Mutagenesis, *Applied and Environmental Microbiology*, 65(9), 4163-4170.
- Aboalvard, Y.** (2020). Amilaz Enziminin Çapraz Bağlı Agregatlarının Sentezi ve Karakterizasyonu (Yüksek Lisans Tezi).Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sivas.
- Adrio, J. L. & Demain, A. L.** (2003). Fungal Biotechnology, *International Microbiology*, 6(3), 191-199.
- Agbowuro, A. A., Huston, M. W., Gamble, B. A., & Tyndall, A. D. J.** (2018). Proteases and protease inhibitors in infectious diseases, *Med. Res. Rev.*, 38(4), 1295-1331.
- Aguilar, G., Morlon-Guyot, J., Trejo-Aguilar, B., & Guyot, J. P.** (2000). Purification and characterization of an extracellular  $\alpha$ -amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010T, an amyolytic lactic acid bacterium, *Enzyme and Microbial Technology*, 27(6), 406-413.
- Akassou, M. & Groleau, D.** (2019). Advances and challenges in the production of extracellular thermotolerant pullulanases by wild-type and recombinant microorganisms: a review, *Critical Reviews in Biotechnology*, 39(3), 337-350.
- Akcan, N.** (2021). *Bacillus licheniformis* VO1'den  $\alpha$ -Amilaz Üretimi için Tarımsal Endüstriyel Atıkların ve Fiziksel Faktörlerin İncelenmesi, *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 11 (1), 58-67.
- Akkara, M. & Tosun, H.** (2014). Funguslardan Elde Edilen Endüstriyel Ürünler, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 9(2), 46-53.
- Al-awsy, M., Obiady, A. S., & Obaidi, A. A.** (2017). Production of amylase enzyme from thermophilic bacteria using agricultural wastes as a substrate, *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 11(13), 158-164.
- Arekemase, M. O., Alfa, O. P., Agbabiaka, T. O., Ajide, B. N. T., Aderoboye, O. Y., Orugu, J. O., & Ahmed, T.** (2020). Optimization of Amylase Produced From Bacteria Isolated From Cassava Peel Dumpsite Using Submerged Fermentation, *Science World Journal*, 15 (1), 64-75.
- Arpigny, J. L. & Jaeger, K. E.** (1999). Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties, *Biochemistry Journal*, 343(1), 177-183.
- Ashraf, F., Irfan, M., Shakir, A. H., Ali, S., & Khan, M.** (2020). An Overview of Production and Industrial Exploitation of Bacterial Laccases, *Punjab University Journal of Zoology*, 35(1), 147-156.
- Avcı, A. & Dönmez, S.** (2012). Purification and characterization of a thermostable cyclodextrin glycosyltransferase from *Thermoanaerobacter* sp. P4, *African Journal of Biotechnology*, 11(45), 10407-10415.

- Avcı, A., Adem, D., İnan, İ., Yüksel, S., Şahin, G. K., & Kalkan, Z.** (2016). Production of Amylase by A Novel *Bacillus* sp. ZBP10 in Submerged Fermentation, *Gıda*, 41(3), 131-136.
- Aytekin, G.** (2006). İki Kademeli Tepkime İle Şeker Pancarı Küspesinden Sıvı Özütlemeli Yöntemle Furfural Üretimi İçin En Uygun Sıcaklık Ve Asit Derişiminin Belirlenmesi (Yüksek Lisans Tezi). Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Badar, D. A. R., Carmona, R. L. J., Collantes, C. G. J., Lojo, R. D., Ocampo, B. M. S., Ursua, C. L. R., & Bercede, H. D.** (2022). Staining Capability of Plant Extracts for the Identification of Gram-positive and Gram-negative Bacteria: A Systematic Review, *Asian Journal of Biological and Life Sciences*, 11(2), 276-284.
- Baltaş, N.** (2012). *Anoxybacillus gonensis* Z4 Suşundan Ekstraselüler  $\alpha$ -Amilaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu (Doktora Tezi). Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Başkurt, M.** (2012). Topraktan İzole Edilen *Bacillus* sp. Suşundan  $\alpha$ -Amilaz Üretimini Etkileyen Fiziksel Faktörlerin Araştırılması (Yüksek Lisans Tezi). Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
- Batur, K. L. & Aygan, A.** (2015). Kahramanmaraş Topraklarından İzole Edilen *Bacillus* sp. Tarafından Alfa-Amilaz Üretimi ve Karakterizasyonu, *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi*, 5(2), 68-74.
- Baygın, E.** (2015). Topraktan Fitaz Enzimi Üreten *Bacillus* sp. Suşlarının Taranması ve Besinsel Faktörlerin Fitaz Üretimi Üzerine Etkisi (Yüksek Lisans Tezi). Uluğ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
- Bello, Y. A., Abdulkadir, N., Abubakar, S., & Lawal, A.** (2021). Studies on screening and optimization of amylase enzyme production using bacteria isolated from soil, *Journal of Microbiology & Experimentation*, 9 (6), 196-200.
- Bennett, W. J.** (1998). Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology, *Journal of Biotechnology*, 66(2-3), 101-107.
- Bhat, M. K.** (2000). Cellulases and Related Enzymes in Biotechnology, *Biotechnology Advances*, 18(5), 355-383.
- Bilim etiği.** (t.y.). Erişim: 21 Ekim 2022, <https://www.arb-silva.de/browser/ssu-138.1/JX860616>
- Bilim etiği.** (t.y.). Erişim: 21 Ekim 2022, <https://www.arb-silva.de/search/>
- Birhanlı, E. & Yeşilada, Ö.** (2017). Tekrarlı Kesikli Süreçte *Funalia trogii* ve *Trametes versicolor* ile Lakkaz Enziminin Çeşitli Ortamlarda Üretimi, *Fen Fakültesi Fen Dergisi*, 43(1), 27-40.
- Birhanlı, E.** (2003). Mikroorganizmaların Lakkaz Üretimine Çeşitli Faktörlerin Etkisi (Yüksek Lisans Tezi). İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya.
- Birhanlı, E.** (2008). Tekrarlı Kesikli İşleme Lakkaz Üretimi (Doktora Tezi). İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya.

- Bonifer, S. K., Wen, X., Hasim, S., Phillips, K. E., Dunlap, N. R., Gann, R. E., DeBruyn, M. J., & Reynolds, B. T.** (2019). *Bacillus pumilus* B12 Degrades Polylactic Acid and Degredation is Affected by Changing Nutrient Conditions, *Frontiers in Microbiology*, 10, 1-13.
- Bourbonnais, R. & Paice, M. G.** (1990). Oxidation of non-phenolic Substrates: An Expanded Role for Laccase in Lignin Biodegradation, *FEBS Letters*, 267(1), 99-102.
- Brzozowski, A. M. & Davies, G. J.** (1997). Structure of the *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -amylase complexed with the inhibitor acarbose at 2 resolution, *Biochemistry*, 36(36), 10837-10845.
- Bush, D. S., Sticher, L., Huystee, R., Wagner, D., Jones, R. L.** (1989). The calcium requirement for stability and enzymatic activity of two isoforms of barley aleurone  $\alpha$ -amylase, *The Journal of Biological Chemistry*, 264(32), 19392-19398.
- Carlı, T. K., Diker, S. K., Yardımcı, H., Şen, A., Ülgen, M., Çetin, C., Akan, M., & Sareyyüpoğlu, B.** (2019). Temel Veteriner Mikrobiyoloji ve İmmünoloji, Bakterilerin Genel Özellikleri, *Anadolu Üniversitesi Yayını*, Eskişehir, pp. 1-23.
- Chekol, C. & Gebreyohannes, M.** (2018). Application and Current Trends of Biotechnology: a Brief Review, *Austin Journal of Biotechnology & Bioengineering*, 5(1), 1-7.
- Chen, J., Chen, X., Dai, J., Xie, G., Yan, L., Lu, L., & Chen, J.** (2015). Cloning, enhanced expression and characterization of an  $\alpha$ -amylase gene from a wild strain in *B. subtilis* WB800, *International Journal of Biological Macromolecules*, 80, 200-207.
- Choudhury, P. & Bhunia, B.** (2015). Industrial Application of Lipase: A Review, *Biopharm Journal*, 1(2), 41-47.
- Coelho, A. L. S., Magalhaes, C. V., Marbach, S. A. P., & Cazetta, L. M.** (2016). A new alkalophilic isolate of *Bacillus* as a producer of cyclodextrin glycosyltransferase using cassava flour, *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(1), 120-128.
- Collins, J., Broggiato, A., & Vanagt, T.** (2018). Building Industries at Sea: 'Blue Growth' and the New Maritime Economy, *Blue Biotechnology*, Belgium, pp. 39-71.
- Couto S. R. & Herrera, J. L. T.** (2006). Industrial and Biotechnological Applications of Laccases: A Review, *Biotechnology Advances*, 24(5), 500-513.
- Çaklı, Ş.** (1999). Bazı Su Ürünlerinde Proteolitik Enzim Aktiviteleri, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 23(4), 385-390.
- Çamur, E. A.** (2010). *Trametes versicolor* Tarafından Sentezlenen Biyopolimere Tutuklu Lakkaz Enziminin Bazı Endüstriyel Uygulamalarının Araştırılması (Doktora Tezi). Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Çelik, V. & Balık, D. T.** (2007). Genetiği değiştirilmiş organizmalar (GDO), *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*, 23(1-2), 13-23.

- Çinçik, N. S.** (2016). Determination of Optimum Enzymes Concentrations at Reaction Step of Maltose Syrup Process (Yüksek Lisans Tezi). Gaziantep Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gaziantep.
- Dadaşoğlu, F.** (2016). Yumuşak Çürüklük Etmeni *Bacillus pumilus* İzolatlarına Karşı Çakşır Otu (*Ferula communis*) Uçucu Yağ ve Ekstrelerinin Antibakteriyal Etkisi, *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 6(4), 83-90.
- Dana, M., Khaniki, B. G., Mokhtarieh, A. A., & Davarpanah, J. S.** (2017). Biotechnological and Industrial Applications of Laccase: A Review, *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 4(4), 675-679.
- Dash, K. B., Rahman, M. M., & Sarker, K. P.** (2015). Molecular Identification of a Newly Isolated *Bacillus subtilis* B119 and Optimization of Production Conditions for Enhanced Production of Extracellular Amylase, *BioMed Research International*, 1-9.
- Daşdemir, N. S.** (2017). Müge Çiçeğinin (*Convallaria majalis*) Bazı Biyoaktivitelerinin Belirlenmesi ve Diğer Bazı Çiçeklerle Birlikte Parfüm Tasarımında Kullanılabilirliğinin Araştırılması (Yüksek Lisans Tezi). Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Muğla.
- De Souza, P. M. & Magalhaes, P. D. O. E.** (2010). Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry-A review, *Brazilian Journal of Microbiology*, 41 (4), 850-861.
- Dehkordi, M. M. & Javan, A. F.** (2012). Application of alpha-amylase in biotechnology, *Journal of Biology and Today's World*, 1(1), 39-50.
- Deljou, A., Arezi, I., & Khanahmadi, M.** (2018). Scale-up thermostable  $\alpha$ -amylase production in lab-scale fermenter using rice husk as an elicitor by *Bacillus licheniformis*-AZ2 isolated from Qinarje Hot Spring (Ardebil Prov. Of Iran), *Periodicum Biologorum*, 120(1), 11-21.
- Demirkan, E., Sevgi, T., & Başkurt, M.** (2017). Optimization of Physical Factors Affecting the Production of the  $\alpha$ -Amylase from a Newly Isolated *Bacillus* sp. M10 Strain, *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi*, 7(1), 23-30.
- Demirkesen, H.** (2015). Kara Nohut Nişastasından Enzimatik Yöntemle Elde Edilen Dirençli Nişastanın Fizikokimyasal Ve Fonksiyonel Özellikleri (Yüksek Lisans Tezi). İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Deshmukh, M. & Pande, A.** (2022). Comparative Study for Production of Biofuel from Potato Peel Waste as Feedstock by Different Enzymes, *Enzyme Engineering*, 11(1), 1-6.
- Divakaran, D., Chandran, A., & Chandran, R. P.** (2011). Comparative Study on Production of  $\alpha$ -Amylase From *Bacillus licheniformis* Strains, *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(4), 1394-1404.
- Doğan, B.** (2021). Biyobozunur Plastik Polihidroksialkanoatların *Bacillus megaterium*' da Genetik Mühendisliği Yoluyla Üretimini Artırılması (Yüksek Lisans Tezi). Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Dowhanick, M. T., Russell, I., Scherer, W. S., Stewart, G. G., & Seligy, L. V.** (1990). Expression and Regulation of Glucoamylase from the Yeast *Schwanniomyces castellii*, *Journal of Bacteriology*, 172(5), 2360-2366.



- Du, R., Zhao, F., Qiao, X., Song, Q., Ye, G., Wang, Y., Wang, B., Han, Y., & Zhou, Z.** (2018). Optimization and partial characterization of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* BH1, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 48(8), 768-774.
- Ediz, N. & Beyath, Y.** (2005). *Bacillus* Cinsi Bakteriler Tarafından Biyoplastik Üretimi, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 3(5), 1-22.
- Elmansy, A. E., Asker, S. M., El-Kady, M. E., Hassanein, M. S., & El-Beih, M. F.** (2018). Production and optimization of  $\alpha$ -amylase from thermo-halophilic bacteria isolated from different local marine environments, *Bulletin of the National Research Centre*, 42 (31), 2-9.
- Elmarzughi, A. N., Enshasy, E. A. H., AbdulHamid, M., Hasham, R., Aziz, A., Elsayed, A. E., Othman, Z. N., & Salama, M.** (2014). A Amylase Economic and Application Value, *World Journal of Pharmaceutical Research*, 3(3), 4890-4906.
- Erboğa, A.** (2016). Kocayemiş (*Arbutus unedo* L.) Bitkisi Karbonhidrat ve Fenolik Bileşenleri İle Antioksidan Etkilerinin İncelenmesi (Yüksek Lisans Tezi). Bartın Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bartın.
- Ersan, Y. L., Özcan, T., Bayizit, A. A., & Delikanlı, B.** (2016). Bifidojenik faktör olarak laktoz türevlerinin önemi, *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 30(2), 79-90.
- Eser, S.** (2021). Çeşitli Atık Materyallerden *Bacillus megaterium* Kullanılarak PHB Üretimi, Optimizasyonu ve Karakterizasyonu (Yüksek Lisans Tezi). Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Feitkenhauer, H.** (2003). Anaerobic Digestion of Desizing Wastewater: Influence of Pretreatment and Anionic Surfactant on Degradation and Intermediate Accumulation, *Enzyme and Microbial Technology*, 33(2-3), 250-258.
- Ferreira, J. S., Senning, M., Stettler, F. M., Streb, S., Ast, M., Neuhaus, E. H., Zeeman, C. S., Sonnewald, S., & Sonnewald, U.** (2017). Simultaneous silencing of isoamylases ISA1, ISA2 and ISA3 by multi-target RNAi in potato tubers leads to decreased starch content and an early sprouting phenotype, *Plos One*, 12(7), 1-21.
- Fındık, B. M.** (2017). Ksilozu Fermente Eden Maya Türlerinin İzolasyonu ve İdentifikasyonu (Yüksek Lisans Tezi). Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Ford, C.** (1999). Improving operating performance of glucoamylase by mutagenesis, *Current Opinion in Biotechnology*, 10(4), 353-357.
- Galant, L. A., Kaufman, C. R., & Wilson, D. J.** (2015). Glucose: Detection and Analysis, *Food Chemistry*, 188, 149-160.
- Ghorai, S., Banik, S. P., Verma, D., Chowdhury, S., Mukherjee, S. & Khowala, S.** (2009). Fungal Biotechnology in Food and Feed Processing, *Food Research International*, 42(5-6), 577-587.
- Goyal, M. M. & Anjan, B.** (2010). Human catalase: looking for complete identity, *Protein Cell*, 1(10), 888-897.

- Grage, K., McDermott, P., & Rehm, A. H. B.** (2017). Engineering *Bacillus megaterium* for production of functional intracellular materials, *Microbial Cell Factories*, 16(211), 2-12.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., & Chauhan, B.** (2003). Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective, *Process Biochemistry*, 38(11), 1599-1616.
- Gupta, V., Sengupta, M., Prakash, J., & Tripathy, C. B.** (2017). Basic and Applied Aspects of Biotechnology, An Introduction to Biotechnology, *Springer Science + Business Media*, Singapore, pp. 1-21.
- Gurung, N., Ray, S., Bose, S., & Rai, V.** (2013). A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine and Beyond, *BioMed Research International*, 2013, 1-18.
- Gül, D. Ü.** (2014). Sağlık Alanında Biyoteknolojik Uygulamalar: Kırmızı Biyoteknoloji, *Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 1(1), 66-69.
- Güldane, M.** (2014). Şeker Alkolleri Ve Yeni Nesil Antioksidan Etkili Tatlandırıcıların Bisküvi Kalite Özelliklerine Etkileri (Yüksek Lisans Tezi). Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli.
- Gülgör, G. & Korukluoğlu, M.** (2014). Mikroorganizmalar Arasında Çoğunluk Algılanması (Quorum Sensing), *U.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 28(2), 83-92.
- Güllü, Ş.** (2020). *Pichia pastoris*' te Rekombinant Bakteriyel Alfa Amilaz Üretimi (Yüksek Lisans Tezi). Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Antalya.
- Halıcı, F.** (2013). Önişlem Görmüş Ayçiçeği ve Tütün Saplarından Enzimatik Yöntemle Ksiloz Üretimi (Yüksek Lisans Tezi). Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat.
- Hamouda, T., Shih, Y. A., & Baker, R. J.** (2002). A rapid staining technique for the detection of the initiation of germination of bacterial spores, *Letters in Applied Microbiology*, 34, 86-90.
- Hansen, R. M., Blennow, A., Pedersen, S., Norgaard, L., & Engelsen, B. S.** (2008). Gel texture and chain structure of amylo maltase-modified starches compared to gelatin, *Food Hydrocolloids*, 22(8), 1551-1566.
- Hashemi, M., Mousavi, M. S., Razavi, H. S., & Shojaosadati, A. S.** (2013). Comparison of submerged and solid state fermentation systems effects on the catalytic activity of *Bacillus* sp. KR-8104  $\alpha$ -amylase at different pH and temperatures, *Industrial Crops and Products*, 43, 661-667.
- Hashemi, M., Shojaosadati, A. S., Razavi, H. S., & Mousavi, M. S.** (2011). Evaluation of Ca-independent  $\alpha$ -amylase production by *Bacillus* sp. KR-8104 in submerged and solid state fermentation systems, *Iranian Journal of Biotechnology*, 9(3), 188-196.
- Hassan, A. B., Alsalami, Y. N., & Jebor, A. M.** (2018). Amylase production, purification and characterization from *Escherichia coli*, *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10 (7), 1691-1696.

- Higashihara, M. & Okada, S.** (1974). Studies on  $\beta$ -Amylase of *Bacillus megaterium* Strain No. 32, *Agr. Biol. Chem.*, 38(5), 1023-1029.
- Hii, L. S., Tan, S. J., Ling, C. T., & Ariff, B. A.** (2012). Pullulanase: Role in Starch Hydrolysis and Potential Industrial Applications, *Enzyme Research*, 1-14.
- Hira, J., Uddin, J., Haugland, M. M., & Lentz, S. C.** (2020). From Differential Stains to Next Generation Physiology: Chemical Probes to Visualize Bacterial Cell Structure and Physiology, *Molecules*, 25(21), 2-28.
- Hubbe, A. M., Chandra, P. R., Dogu, D., & Velzen, J. T. S.** (2019). Analytical Staining of Cellulosic Materials: A Review, *BioResources*, 14(3), 7387-7464.
- Hyun, H. H. & Zeikus, G. J.** (1985). General Biochemical Characterization of Thermostable Extracellular  $\beta$ -Amylase from *Clostridium thermosulfurogenes*, *Applied and Environmental Microbiology*, 49(5), 1162-1167.
- Imran, M., Anwar, Z., Irshad, M., Asad, J. M., & Ashfaq, H.** (2016). Cellulase Production from Species of Fungi and Bacteria from Agricultural Wastes and Its Utilization in Industry: A Review, *Advances in Enzyme Research*, 4(2), 44-55.
- Işık, C. D.** (2022). Laktozsuz Olarak Farklı Lezzetlerde Geliştirilen Sütlü Tatlı Ürünün Besin Değerleri, Duyusal Özellikleri Ve Satın Alma Niyeti Açısından Değerlendirilmesi (Yüksek Lisans Tezi). Kocaeli Üniversitesi, Sosyal Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli.
- İlter, O. Ş. & Yıldırım, T.** (2021). Food biotechnology and food safety, *International Journal of Science Letters (IJSL)*, 3(1), 52-64.
- Jadhav, A. S., Kataria, K. P., Bhise, K. K., & Chougule, A. S.** (2013). Amylase Production from Potato and Banana Peel Waste, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2(11), 410-414.
- Jaeger, K. E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., Van Heuvel, M., & Misset, O.** (1994). Bacterial Lipases, *FEMS Microbiology Reviews*, 15(1), 29-63.
- James, A. J. & Lee, H. B.** (1997). Glucoamylases: Microbial Sources, Industrial Applications and Molecular Biology- A Review, *Journal of Food Biochemistry*, 21(6), 1-52.
- Janusz, G., Pawlik, A., Swiderska-Burek, U., Polak, J., Sulej, J., Jarosz-Wilkolazka, A., & Paszczyński, A.** (2020). Laccase Properties, Physiological Functions and Evolution, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 1-25.
- Javed, S., Azeem, F., Hussain, S., Rasul, I., Siddique, H. M., Riaz, M., Afzal, M., Kouser, A., & Nadeem, H.** (2018). Bacterial lipases: A review on purification and characterization, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 132, 23-34.
- Jobling, S.** (2004). Improving starch for food and industrial applications, *Current Opinion in Plant Biology*, 7(2), 210-218.
- Kalaylı, E. & Beyatlı, Y.** (2003). *Bacillus* cinsi bakterilerin antimikrobiyal aktiviteleri, PHB üretimleri ve plazmid DNA' ları, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 1(12), 24-35.

- Karasu, S., Durak, Z. M., & Toker, S. Ö.** (2015). Gıda Biyoteknolojisi ve Biyoproseslerinde Yeni Gelişmeler, *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 2(5), 161-164.
- Kartal, O. M., Ekinci, B. M., & Poyraz, B.** (2021). Biyofilm Yapısı ve Önlenmesi, *Akademik Gıda*, 19(3), 353-363.
- Kaushal, J., Mehandia, S., Singh, G., Raina, A., & Arya, K. S.** (2018). Catalase Enzyme: Application in Bioremediation and Food Industry, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16, 192-199.
- Keskin, Ş.** (2015). Termofilik *Geobacillus sp.* TF14' ten Endüstriyel Öneme Sahip  $\alpha$ -Amilazın Saflaştırılması, İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu (Doktora Tezi). Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Khoshnevisan, K., Poorakbar, E., Baharifar, H., & Barkhi, M.** (2019). Recent Advances of Cellulase Immobilization onto Magnetic Nanoparticles: An Update Review, *Magnetochemistry*, 5(36), 2-22.
- Kıran, E. Ö., Çömlekçiöğlü, U., & Dostbil, N.** (2006). Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Endüstrideki Kullanım Alanları, *KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9(1), 12-19.
- Korneli, C., David, F., Biedendieck, R., Jahn, D., & Wittmann, C.** (2013). Getting the big beast to work – Systems biotechnology of *Bacillus megaterium* for novel high – value proteins, *Journal of Biotechnology*, 163(2), 87-96.
- Krusong, K., Ismail, A., Wangpaiboon, K., Pongsawasdi, P.** (2022). Production of Large-Ring Cyclodextrins by Amylomaltases, *Molecules*, 27(4), 1-15.
- Kumar, A., Singh, S., Mukherjee, A., Rastogi, P. R., & Verma, P. J.** (2021). Salt-tolerant plant growth-promoting *Bacillus pumilus* strain JPVS11 to enhance plant growth attributes of rice and improve soil health under salinity stress, *Microbiological Research*, 242, 2-13.
- Kumar, K. M. A., Chandan, S., & Puttaiah, H. S.** (2019). Potential Antimicrobial and Antioxidant Activity of *Saraca Indica* and *Clerodendrum Paniculatum* from Western Ghats, Shimoga, India, *Environmental Health and Technology*, 1(3), 91-99.
- Leoni, C., Gattulli, R. A. B., Pesole, G., Ceci, R. L., & Volpicella, M.** (2021). Amylomaltases in Extremophilic Microorganisms, *Biomolecules*, 11(9), 1-25.
- Leoni, C., Manzari, C., Tran, H., Golyshin, N. P., Pesole, G., Volpicella, M., & Ceci, R. L.** (2022). Identification of an Amylomaltase from the Halophilic Archaeon *Haloquadratum walsbyi* by Functional Metagenomics: Structural and Functional Insights, *Life*, 12(85), 2-16.
- Li, Y., Zhang, L., Ding, Z., & Shi, G.** (2013). Constitutive expression of a novel isoamylase from *Bacillus lentus* in *Pichia pastoris* for starch processing, *Process Biochemistry*, 48(9), 1303-1310.
- Lindsay, S., Oates, A., & Bourdillon, K.** (2017). The detrimental impact of extracellular bacterial proteases on wound healing, *International Wound Journal*, 14(6), 1237-1247.

- Lolasi, F., Amiri, H., Asadollahi, A. M., & Karimi, K.** (2018). Using sweet sorghum bagasse for production of amylases required for its grain hydrolysis via a biorefinery platform, *Industrial Crops & Products*, 125, 473-481.
- Maarel, M. J. E. C., Veen, B., Uitdehaag, J. C. M., Leemhuis, H., & Dijkhuizen, L.** (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family, *Journal of Biotechnology*, 94(2), 137-155.
- Machius, M., Vertesy, L., Huber, R., & Wiegand, G.** (1996). Carbohydrate and Protein-based Inhibitors of Porcine Pancreatic  $\alpha$ -Amylase: Structure Analysis and Comparison of their Binding Characteristics, *Journal of Molecular Biology*, 260(3), 409-421.
- Malakar, R., Tiwari, A., & Malviya, N. S.** (2010). Pullulanase: A Potential Enzyme For Industrial Application, *International Journal of Biomedical Research*, 1(2), 10-20.
- Martin, K. D., Vicente, O., Beccari, T., Kellermayer, M., Koller, M., Lal, R., Marks, S. R., Marova, I., Mechler, A., Tapaloaga, D., Znidarsic-Plazl, P., & Dundar, M.** (2021). A brief overview of global biotechnology, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 35(1), 5-14.
- Mate, M. D. & Alcalde, M.** (2015). Laccase engineering: From rational design to directed evolution, *Biotechnology Advances*, 33(1), 25-40.
- Mehta, D. & Satyanarayana, T.** (2016). Bacterial and Archaeal  $\alpha$ -Amylases: Diversity and Amelioration of the Desirable Characteristics for Industrial Applications, *Frontiers in Microbiology*, 7, 1-21.
- Melani, B. N., Tambourgi, B. E., & Silveira, E.** (2019). Lipases: From Production to Applications, *Separation & Purification Reviews*, 49(4), 1-16.
- Mercan, O.** (2022). Geleneksel Süt Reçelinin Üretim Tekniğinin Geliştirilmesi (Süt Reçelinde Ür-Ge) (Yüksek Lisans Tezi). Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Çanakkale.
- Meyer, V., Basenko, Y. E., Nenz, P. J., Braus, H. G., Caddick, X. M., Csukai, M., Vries, P. R., Endy, D., Frisvard, C. J., Gunde-Cimerman, N., Haarmann, T., Hadar, Y., Hansen, K., Johnson, I. R., Keller, P. N., Krasevec, N., Mortensen, H. U., Perez, R., Ram, J. F. A., Record, E., Ross, P., Shapaval, V., Steiniger, C., Brink, H., Munster, J., Yarden, O., & Wösten, B. A. H.** (2020). Growing a circular economy with fungal biotechnology: a white paper, *Fungal Biology and Biotechnology*, 7(5), 2-23.
- Michelin, M., Ruller, R., Ward, J. R., Moraes, B. A. L., Jorge, A. J., Terenzi, F. H., & Polizeli, M. T. L. M.** (2008). Purification and Biochemical characterization of a thermostable extracellular glucoamylase produced by the thermotolerant fungus *Paecilomyces variotii*, *J Ind Microbiol Biotechnol*, 35(1), 17-25.
- Mohanasrinivasan, V., Diksha, D., Suganthi, V., Selvarajan, E., & Devi, S. C.** (2014). Process Optimization for Enhanced Production of  $\alpha$ -amylase by submerged (SmF) and Solid State Fermentation (SSF) Using *Bacillus pumilus* VITMDS2, *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 5(2), 1784-1800.

- Mojsov, K.** (2012). Microbial  $\alpha$ -amylases and their industrial applications: a review, *International Journal of Management, IT and Engineering (IJMIE)*, 2(10), 583-609.
- Moore, D. & Chiu, S. W.** (2001). Fungal Products as Food, Bio-Exploitation of Filamentous Fungi, *Fungal Diversity Press*, Hong Kong, pp.233-251.
- Msarah, J. M., Ibrahim, I., Hamid, A. A., & Aqma, S. W.** (2020). Optimisation and production of alpha amylase from thermophilic *Bacillus* spp. and its application in food waste Biodegradation, *Heliyon*, 6(6), 1-9.
- Naranchimeg, B., Altantsetseg, K. H., & Urantulkuur, B.** (2019). Process optimization for amylase production of *Bacillus subtilis* M4 mutant strain, *Mong., J., Agric., Sci.*, 27(2), 9-19.
- Nascimento, A. C. W. & Martins, L. L. M.** (2004). Production and Properties of An Extracellular Protease from Thermophilic *Bacillus* sp, *Brazilian Journal of Microbiology*, 35(1-2), 91-96.
- Naureen, I., Bashir, J. M., Ahmed, W., Hussain, A. S., Naveed, H. M., Ijaz, A., & Nadeem, F.** (2021). A Review on Microbial Enzymes, Synthesis, Biological Role, Current Applications and Future Perspectives, *Scholars Bulletin*, 7(3), 44-48.
- Nie, K., Xie, F., Wang, F., & Tan, T.** (2006). Lipase Catalyzed Methanolysis to Produce Biodiesel: Optimization of the Biodiesel Production, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 43(1-4), 142-147.
- Niyonzima, N. F.** (2019). Production of Microbial Industrial Enzymes, *Acta Scientific Microbiology*, 2(12), 75-89.
- Oğuzhan, P. & Yangılar, F.** (2013). Pullulan: Production and usage in food industry, *African Journal of Food Science and Technology*, 4(3), 57-63.
- Okpara, O. M.** (2022). Microbial Enzymes and Their Applications in Food Industry: A Mini-Review, *Advances in Enzyme Research*, 10(1), 23-47.
- Ölmez, S.** (2017). Nevşehir Kozaklı Kaplıcalarından İzole Edilen Termofilik Bakterilerin İzolasyonu, İdentifikasyonu, *Bacillus licheniformis* SO7' den  $\alpha$ -Amilaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu (Yüksek Lisans Tezi). Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Özbiçen, E.** (2020). Hipersalin Ortamlardan İzole Edilen Mikrofungusların  $\alpha$ -Amilaz Enzimi Açısından Taranması, Üretim Koşullarının Optimizasyonu ve Derin Kültür Fermentör Uygulaması(Yüksek Lisans Tezi). Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Özcan, K. & Çorbacı, C.** (2018). *Streptomyces* sp. Suşlarından Amilolitik Enzim Üretimi, *GUFBED*, 8 (2), 185-191.
- Özçelik, B., Aytar, P., Gedikli, S., Yardımcı, E., Çalışkan, F., & Çabuk, A.** (2014). Production of an alkaline protease using *Bacillus pumilus* D3 without inactivation by SDS, its characterization and purification, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 29 (3), 388-396.
- Özdemir, G. & Özcan, D. B.** (2020). Sıcaklığa Dirençli  $\alpha$ -Amilaz Enzimi Üreten Mezofilik Bakteri İzolasyonu ve Enzimin Kısmi Karakterizasyonu, *OKU Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 3(2), 146-153.

- Özgen, Ö., Emiroğlu, H., Yıldız, M., Taş, S. A., & Puruççuoğlu, E.** (2007). Tüketiciler ve Modern Biyoteknoloji: Model Yaklaşımlar, *Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Yayınları*, 2, Ankara, pp. 5-18.
- Özlu, A.** (2013).  $\alpha$ -Amilaz Enziminin Kitosan ile Hazırlanan Kompozit Taşıyıcılar Üzerine Kovalent Olarak İmmobilizasyonu (Yüksek Lisans Tezi). Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa.
- Öztürk, Ü. H.** (2013). Akasya Ağacı Toprağından İzole Edilen *Bacillus sp.* Tarafından Üretilen Endüstriyel Enzimlerin Araştırılması (Doktora Tezi). Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C. R., Nigam, P., Krieger, N., & Soccol, V. T.** (1999). The Realm of Microbial Lipases in Biotechnology, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 29(2), 119-131.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V. T., Singh, D., & Mohan, R.** (2000). Advances in Microbial Amylases, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 31(2), 135-152.
- Parawira, W. & Khosa, M. E.** (2009). Biotechnology research, development, applications and management in Zimbabwe: Review, *Scientific Research and Essay*, 4(9), 825-841.
- Parvathi, A., Krishna, K., Jose, J., Joseph, N., & Nair, S.** (2009). Biochemical and molecular characterization of *Bacillus pumilus* isolated from coastal environment in Cochin-India, *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(2), 269-275.
- Patil, P. P., Shinde, S. S., Shaikh, I. T., & Trivedi, M. M.** (2022). Properties of Alpha-Amylases & Its Industrial Importance, *World Journal of Pharmaceutical Research*, 11(4), 351-359.
- Paul, D.** (2016). Microorganisms and  $\alpha$ -Amylase: A Concise Review, *Innovare Journal of Sciences*, 4(4), 1-5.
- Paul, S. J., Beliya, E., Tiwari, S., Patel, K., Gupta, N., & Jadhav, K. S.** (2020). Production of biocatalyst  $\alpha$ -amylase from agro-waste 'rice bran' by using *Bacillus tequilensis* TB5 and standardizing its production process, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 26, 2-8.
- Pezzella, C., Guarino, L., & Piscitelli, A.** (2015). How to enjoy laccases, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(5), 923-940.
- Przylas, I., Terada, Y., Fujii, K., Takaha, T., Saenger, W., Strater, N.** (2000). X-ray structure of acarbose bound to amyloamylase from *Thermus aquaticus*, *Eur. J. Biochem.*, 267(23), 6903-6913.
- Rajagopalan, G. & Krishnan, C.** (2008).  $\alpha$ -Amylase production from catabolite derepressed *Bacillus subtilis* KCC103 utilizing sugarcane bagasse hydrolysate., *Bioresource technology*, 99 (8), 3044-3050.
- Rakaz, A. M., Hussien, O. M., & Ibrahim, M. H.** (2021). Isolation, Extraction, Purification and Molecular Characterization for Thermostable  $\alpha$ -Amylase from Locally Isolated *Bacillus* Species in Sudan, *Biochemistry Research International*, 1-8.

- Ramli, N., Abd-Aziz, S., Hassan, A. M., Alitheen, N., & Kamaruddin, K.** (2010). Potential cyclodextrin glycosyltransferase producer from locally isolated bacteria, *African Journal of Biotechnology*, 9 (43), 7317-7321.
- Rand, H. K. & Tillan, M.** (2006). Errors in Interpretation of Gram Stains From Positive Blood Cultures, *Microbiology and Infectious Disease*, 126 (5), 686-690.
- Rani, A., Saini, C. K., Bast, F., Varjani, S., Mehariya, S., Bhatia, K. S., Sharma, N., & Funk, C.** (2021). A Review on Microbial Products and Their Perspective Application as Antimicrobial Agents, *Biomolecules*, 11(12), 2-28.
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V.** (1998). Molecular and Biotechnological Aspect of Microbial Proteases, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 597-635.
- Roberts, S. A., Weichsel, A., Grass, G., Thakali, K., Hazzard, J. T., Tollin, G., Rensing, C., & Montfort, W. R.** (2002). Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(5), 2766-2771.
- Rodrigo, P. W. W., Magamulla, S. L., Thiwanka, S. M., & Yapa, M. S. M. Y.** (2022). Optimization of Growth Conditions to Identify the Superior *Bacillus* Strain Which Produce High Yield of Thermostable Alpha Amylase, *Advances in Enzyme Research*, 10, 1-22.
- Rojas, J. M., Fonseca, A. M., Zanin, M. G., Lafuente, F. R., Giordano, C. L. R., & Tardioli, W. P.** (2019). Preparation of Crosslinked Enzyme Aggregates of a Thermostable Cyclodextrin Glucosyltransferase from *Thermoanaerobacter* sp. Critical Effect of the Crosslinking Agent, *Catalysts*, 9(120), 2-17.
- Rudeekulthamrong, P. & Kaulpiboon, J.** (2020). Optimization of amyloamylase for the synthesis of  $\alpha$ -arbutin derivatives as tyrosinase inhibitors, *Carbohydrate Research*, 494, 2-8.
- Scheepers, A., Joost, G. H., & Schürmann, A.** (2004). The Glucose Transporter Families SGLT and GLUT: Molecular Basis of Normal and Aberrant Function, *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 28(5), 364-371.
- Schüle, M.** (2000). Protein engineering of cellulases, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1543(2), 239-252.
- Selen, V.** (2006). *Bacillus amyloliquefaciens* ile  $\alpha$ -Amilaz Üretimini Katı Substrat Fermantasyonu ile İncelenmesi (Yüksek Lisans Tezi). Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Seren, Ş.** (2013). *Acinetobacter psychrotolerans* Suşlarından İzole Edilen Lipazın Karakterizasyonları (Yüksek Lisans Tezi). Giresun Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Giresun.
- Sevinç, N.** (2010). Türkiye Topraklarından İzole Edilen *Bacillus* sp. Suşlarından Proteaz Üretimi, Kısmi Safılaştırılması ve Karakterizasyonu (Yüksek Lisans Tezi). Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
- Sharma, A. & Satyanarayana, T.** (2013). Microbial acid-stable  $\alpha$ -amylases: characteristics, genetic engineering and applications, *Process Biochemistry*, 48(2), 201-211.



- Sharma, K., Bhutty, S., Khurana, P. M. S., & Kohli, K. U.** (2014). Isolation, Identification and Optimization of Culture Conditions of *Bacillus* sp. Strain PM1 for Alkalo-thermostable Amylase Production, *British Microbiology Research Journal*, 4(4), 369-380.
- Sharma, S., Acharya, J., Banjara, R. M., Ghimire, P., & Singh, A.** (2020). Comparison of acridine orange fluorescent microscopy and gram stain light microscopy for the rapid detection of bacteria in cerebrospinal fluid, *BMC Research Notes*, 13(29), 2-5.
- Shen, J. G., Saha, C. B., Lee, E. Y., Bhatnagar, L., & Zeikus, G. J.** (1988). Purification and characterization of a novel thermostable  $\beta$ -amylase from *Clostridium thermosulphurogenes*, *Biochem. J.*, 254(3), 835-840.
- Shirokane, Y., Ichikawa, K., & Suzuki, M.** (2000). A novel enzymic determination of maltose, *Carbohydrate Research*, 329(3), 699-702.
- Shukla, J. & Kar, R.** (2006). Potato peel as a solid state substrate for thermostable  $\alpha$ -amylase production by thermophilic *Bacillus* isolates, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 22(5), 417-422.
- Simair, A. A., Qureshi, S. A., Khushk, I., Ali, H. C., Lashari, S., Bhutto, A. M., Mangrio, S. G., & Lu, C.** (2017). Production and Partial Characterization of  $\alpha$ -Amylase Enzyme from *Bacillus* sp. BCC 01-50 and Potential Applications, *BioMed Research International*, 1-9.
- Singh, G. & Arya, K. S.** (2019). Utility of laccase in pulp and paper industry: A progressive step towards the green technology, *International Journal of Biological Macromolecules*, 134, 1070-1084.
- Singh, J., Batra, N., & Sobti, C. R.** (2001). Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1, *Process Biochemistry*, 36(8-9), 781-785.
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., & Mehta, K. P.** (2016). Microbial enzymes: industrial progress in 21st century, *3 Biotech*, 6(174), 1-15.
- Singh, R., Langyan, S., Sangwan, S., Gaur, P., Khan, N. F., Yadava, P., Rohatgi, B., Shrivastava, M., Khandelwal, A., Darjee, S., & Sahu, K. P.** (2022). Optimization and production of alpha-amylase using *Bacillus subtilis* from apple peel: Comparison with alternate feedstock, *Food Bioscience*, 49, 1-7.
- Siqueira, W. G. J., Rodrigues, C., Vandenberghe, S. P. L., Woiciechowski, L. A., & Soccol, R. C.** (2020). Current advances in on-site cellulase production and application on lignocellulosic biomass conversion to biofuels: A review, *Biomass and Bioenergy*, 132, 2-12.
- Sivakumar, G., Rangeshwaran, R., Yandigeri, S. M., Mohan, M., Venkatesan, T., Ballal, R. C., Ramanujam, B., Yalashetti, S., Kumari, S., & Verghese, A.** (2017). Characterization and role of gut bacterium *Bacillus pumilus* on nutrition and defense of leafhopper (*Amrasca biguttula biguttula*) of cotton, *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 87(4), 110-115.
- Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K. M., Soccol, C. R., & Pandey, A.** (2006).  $\alpha$ -Amylases from Microbial Sources An Overview on Recent Developments, *Food Technol. Biotechnol.*, 44(2), 173-184.

- Slivinski, T. C., Mallmann, E., Araujo, M. J., Mitchell, A. D., & Krieger, N.** (2012). Production of surfactin by *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 in solid-state fermentation using a medium based on okara with sugarcane bagasse as a bulking agent, *Process Biochemistry*, 47(12), 1848-1855.
- Souza, N. A. & Martins, L. L. M.** (2001). Isolation, Properties and Kinetics of Growth of a Thermophilic *Bacillus*, *Brazilian Journal of Microbiology*, 32(4), 271-275.
- Suleman, L.** (2015). Extracellular Bacterial Proteases in Chronic Wounds: A Potential Therapeutic Target, *Wound Healing Society*, 5(10), 455-463.
- Sundarram, A. & Murthy, T. P. K.** (2014).  $\alpha$ -Amylase Production and Applications: A Review, *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 2(4), 166-175.
- Şahan, M.** (2018). Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) Tohumundan Lipaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu (Yüksek Lisans Tezi). Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya.
- Tanaka, A. & Hoshino, E.** (2002). Calcium-binding parameter of *Bacillus amyloliquefaciens*  $\alpha$ -amylase determined by inactivation kinetics, *Biochemical Journal*, 364(3), 635-639.
- Taner, A. B. F.** (2021).  $\beta$ -Galactosidase Enziminin Kabak Lifi Ve Pirinç Kabuğuna İmmobilizasyonunun Optimizasyonu: Laktoz Hidrolizinin İncelenmesi (Doktora Tezi). Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Tarakçı, Z. & Küçüköner, E.** (2005). Laktoz, Laktoz Türevleri ve Gıda Sanayinde Kullanımı, *Gıda*, 30(4), 261-267.
- Tarhan, K.** (2017). Kombucha Çayı Üretiminde Farklı Substrat Kaynaklarının Kullanımı (Yüksek Lisans Tezi). Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Antalya.
- Tatar, S.** (2007). Termofil Moderately Halofilik *Bacillus* sp. Suşlarından Amilaz Enziminin Üretimi ve Endüstriyel Kullanım Olanaklarının Araştırılması (Yüksek Lisans Tezi). Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Terada, Y., Fujii, K., Takaha, T., & Okada, S.** (1999). *Thermus aquaticus* ATCC 33923 Amylomaltase Gene Cloning and Expression and Enzyme Characterization: Production of Cycloamylose, *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3), 910-915.
- Thurston, C. F.** (1994). The Structure and Function of Fungal Laccases, *Microbiology*, 140(1), 19-26.
- Tiwari, S. P., Srivastava, R., Singh, S. C., Shukla, K., Singh, K. R., Singh, P., Singh, R., Singh, L. N., & Sharma, R.** (2015). Amylases: An Overview With Special Reference to Alpha-Amylase, *Journal of Global Biosciences*, 4(1), 1886-1901.
- Tolan, V.** (1997). Endosülfanın *Bacillus subtilis*' te üreme, plazmit ve  $\alpha$ -amilaz sekresyonu üzerine etkisi (Yüksek Lisans Tezi). Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.

- Tripathi, C. B., Yadav, P., & Sharma, R.** (2020). Microbial Enzymes in Food Industry: Applications, *Journal of Critical Reviews*, 7(9), 1418-1422.
- Tun, P. P., Sah, B. C., & Pradhan, M.** (2018). Environmental Biotechnology: A Review and Implementation Opportunities in Myanmar, *North American Academic Research*, 1(5), 82-99.
- Uçan, U.** (2014). Fruktöz, Trehaloz Ve Sükröz İçeren Tris Bazlı Sulandırıcıya Kolesterol Yüklü Siklodekstrin (CLC) İlavesinin Koç Spermalarının Dondurulabilirlik Ve Çözüm Sonu Spermatolojik Parametreler Üzerine Etkilerinin Araştırılması (Yüksek Lisans Tezi). Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Usta, A.** (2012). Toprakta Antibiyotik Üreten *Bacillus* sp.'lerin Taranması, Antibiyotik Üretimi Üzerine Bazı Parametrelerin Etkisi ve Sporulasyonla İlişkisinin Belirlenmesi (Yüksek Lisans Tezi). Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
- Usta, T.** (2020). *Micrococcus luteus* ve *Bacillus pumilus* Türlerinin Lityum Giderim Kapasitelerinin Belirlenmesi (Yüksek Lisans Tezi). Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Uymaz, B.** (2010). Probiyotikler ve Kullanım Alanları, *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 16(1), 95-104.
- Ünal, A., Aydın, A., Hürkan, K., & Kemeç Hürkan, Y.** (2020). Tarımsal ve Endüstriyel Biyoteknoloji Uygulamaları-Biyoeкономи, Endüstriyel Biyoteknoloji Uygulamaları ve Biyoeкономи, *Iksad Publications*, Ankara, pp. 121-140.
- Vary, S. P.** (1994). Prime time for *Bacillus megaterium*, *Microbiology*, 140(5), 1001-1013.
- Vary, S. P., Biedendieck, R., Fuerch, T., Meinhardt, F., Rohde, M., Deckwer, W. D., & Jahn, D.** (2007). *Bacillus megaterium* from simple soil bacterium to industrial protein production host, *Appl Microbiol Biotechnol*, 76(5), 957-967.
- Veen, A. B., Uitdehaag, M. C. J., Dijkstra, W. B., & Dijkhuizen, L.** (2000). Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity, *Biochimica et Biophysica Acta- Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1543(2), 336-360.
- Veerakumar, S. & Manian, R.** (2022). Agarase, Amylase and Xylanase from *Halomonas meridiana*: A Study on Optimization of Coproduction for Biomass Saccharification, *Fermentation*, 8(10), 2-18.
- Velioğlu, M. H. & Çelikyurt, G.** (2016). Farklı Tarım Artığı Ürünlerden Fungal ve Bakteriyel  $\alpha$ -Amilaz Üretiminin Optimizasyonu, *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 13(1), 12-24.
- Viswanathan, S., Rohini, S., Rajesh, R., & Poomari, K.** (2014). Production and Medium Optimization of Amylase by *Bacillus* spp. Using Submerged Fermentation Method, *World Journal of Chemistry*, 9(1), 1-6.
- Vittaladevaram, V.** (2017). Fermentative Production of Microbial Enzymes and their Applications: Present status and future prospects, *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 5(4), 90-94.

- Wang, X., Nie, Y., & Xu, Y.** (2019). Industrially produced pullulanases with thermostability: Discovery, engineering and heterologous expression, *Bioresource Technology*, 278, 360-371.
- Wladyka, B. & Pustelny, K.** (2008). Regulation of Bacterial Protease Activity, *Cellular & Molecular Biology Letters*, 13(2), 212-229.
- Woods, L. G. & Walker, H. D.** (1996). Detection of Infection or Infectious Agents by Use of Cytologic and Histologic Stains, *Clinical Microbiology Reviews*, 9(3), 382-404.
- Xu, Q., Cao, Y., Li, X., Liu, L., Qin, S., Wang, Y., Cao, Y., Xu, H., & Qiao, D.** (2018). Purification and characterization of a novel intracellular  $\alpha$ -amylase with a wide variety of substrates hydrolysis and transglycosylation activity from *Paenibacillus* sp. SSG-1, *Protein Expression and Purification*, 144, 62-70.
- Yalçın, E., Masatcioğlu, T. M., & Cındık, B.** (2020). Normal, Mumlu (Waxy) ve Yüksek Amilozlu Nişastalar ve Gıdalardaki Fonksiyonel Özellikleri, *Gıda*, 45(6), 1261-1271.
- Yaraş, A., Selen, V., & Özer, D.** (2015). Synergistic Effects of Agro-Industrial Wastes on Alpha Amylase Production by *Bacillus amyloliquefaciens* in Semi Solid Substrate Fermentation, *Pamukkale University Journal of Engineering Sciences*, 21(7), 314-318.
- Yassin, N. S., Jiru, M. T., & Indracanti, M.** (2021). Screening and Characterization of Thermostable Amylase-Producing Bacteria Isolated from Soil Samples of Afdera, Afar Region, and Molecular Detection of Amylase-Coding Gene, *International Journal of Microbiology*, 1-14.
- Yaşar, B.** (2017). Gölevez Nişastasının Yapısal, Fizikokimyasal Ve Jelleşme Özelliklerinin Belirlenmesi (Yüksek Lisans Tezi). Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Yenil, N., Kuzu, S., Ay, K., & Ay, E.** (2009). Monosakkarit birimlerinin O-glikozidik bağlanması; O-disakkarit oluşumları, *C. B. Ü. Fen Bilimleri Dergisi*, 5(1), 59-74.
- Yücel, E.** (2017). Güneş pili uygulamaları için CdS ince filmlerin optik özelliklerinin maltoz katkısıyla geliştirilmesi, *Uludağ Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Dergisi*, 22(2), 1-10.
- Zaghloul, R. W., Foda, A. F. F., Saad, M. M. S., & Elmeihy, M. R.** (2021). Production and Evaluation of Alpha-Amylase Produced From *Bacillus amyloliquefaciens*, *Biochemistry and Microbiology*, 361-372.
- Zeikus, G. J., Vieille, C., & Savchenko, A.** (1998). Thermozyms: biotechnology and structure-function relationships, *Extremophiles*, 2(3), 179-183.
- Zhang, J., Mao, H., Li, M., & Su, E.** (2019). Cyclodextrin glucosyltransferase immobilization on polydopamine-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles in the presence of polyethyleneimine for efficient  $\beta$ -cyclodextrin production, *Biochemical Engineering Journal*, 150, 2-9.
- Zhang, N., Wang, L., & Wei, Y.** (2020). Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus pumilus* on Rumen and Intestine Morphology and Microbiota in Weanling Jintang Black Goat, *Animals*, 10(9), 2-13.

## ÖZGEÇMİŞ

**Ad-Soyad**

: Kübra İLKILIÇ

**Lisans**

: Gümüşhane Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri  
Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, 2018.

