



## Alfa-amilaz Enzimlerini Üreten Termofilik *Bacillus* Suşlarının İzolasyonu ve Enzimlerin Kısmi Karakterizasyonu

Celal Türker<sup>1</sup>, Bahri Devrim Özcan<sup>2\*</sup>

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

<sup>2</sup>Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 80000 Osmaniye

### MAKALE BİLGİSİ

Geliş 21 Ocak 2015  
Kabul 25 Şubat 2015  
Çevrimiçi baskı, ISSN: 2148-127X

#### Anahtar Kelimeler:

Alfa-amilaz  
*Bacillus* sp.  
İzolasyon  
Karakterizasyon  
Termofil

### ÖZET

Bu çalışmada, Erzin sınırları içerisinde bulunan Burnaz Çayı kıyı kesimlerinden toplanan toprak numunelerinden üç adet termofilik *Bacillus* sp. izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bakteriler sırasıyla *Bacillus* sp. CT1, CT2 ve CT3 olarak isimlendirilmişlerdir. Bakterilerce  $\alpha$ -amilaz üretimi CT1 suşu için 60°C, CT2 ve CT3 suşları için ise 80°C'de maksimum düzeye çıkmıştır. CT1  $\alpha$ -amilazı optimum aktivitesini 90°C, CT2 ve CT3  $\alpha$ -amilazları ise 60°C'de göstermişlerdir. Yine CT2  $\alpha$ -amilazı optimum aktivitesini pH 7,0'da, CT1 ve CT3  $\alpha$ -amilazları ise pH 8,0'da göstermişlerdir. CT1, CT2 ve CT3 enzimlerine ait spesifik aktiviteler 55°C'de sırasıyla 317,6; 113,3 ve 362,7 U/mg olarak gerçekleşmiştir. Enzimlerin moleküler ağırlıkları zimogram analizi ile CT1 ve CT3  $\alpha$ -amilazları için 65 kDa, CT2  $\alpha$ -amilazı için ise 38 kDa olarak hesaplanmıştır.

\* Sorumlu Yazar:

E-mail: ozcanbd@hotmail.com

Turkish Journal Of Agriculture - Food Science And Technology, 3(6): 387-393, 2015

## Isolation of Alpha-amylase Producing Thermophilic *Bacillus* Strains and Partial Characterization of the Enzymes

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 21 January 2015  
Accepted 01 February 2015  
Available online, ISSN: 2148-127X

#### Keywords:

Alpha-amylase  
*Bacillus* sp.,  
Isolation  
Characterization  
Thermophil

### ABSTRACT

In the present study, we isolated three thermophilic *Bacillus* strains from the soil samples collected from the coast sediments of the Burnaz Stream located in Erzin. The isolates were entitled as *Bacillus* sp. CT1, CT2, and CT3, respectively. The maximum  $\alpha$ -amylase production was revealed at 60°C for CT1 strain, and at 80°C for CT2 and CT3 strains, respectively. The optimum enzyme activity was observed at 90°C for CT1  $\alpha$ -amylase, whereas at 60°C for CT2 and CT3  $\alpha$ -amylases. On the other hand, optimum pH value for CT2  $\alpha$ -amylase was 7.0, whereas 8.0 for CT1 and CT3  $\alpha$ -amylases. The specific activities of CT1, CT2, and CT3 amylases were 317.6, 113.3 and 362.7 U/mg at 55°C, respectively. The estimated molecular weight of CT1 and CT3  $\alpha$ -amylase was 65 kDa, and for CT2  $\alpha$ -amylase was 38 kDa by zymogram analysis.

\* Corresponding Author:

E-mail: ozcanbd@hotmail.com

## Giriş

Amilazlar nişasta moleküllerini dekstrin ve glikoz ünitelerine hidrolize eden enzimlerdir (Yamashita, 1993; Nielsen ve Borchert, 2000; Asgher ve ark., 2007). Amilazlar endoamilazlar ve ekzoamilazlar olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Endoamilazlar nişasta molekülünün içsel bölgelerden hidrolizini katalizleyerek farklı uzunluklarda düz ve dallanmış oligosakkaritlerin oluşmasını sağlarlar. Buna karşılık ekzoamilazlar nişasta molekülünü uçlardan hidrolize ederek daha kısa son ürünlerin oluşmasını katalizlerler (Yamagata ve Uda, 1993; Bertoldo ve Antranikian, 2002; Haki ve Rakshit, 2003).  $\alpha$ -Amilaz (EC 3.2.1.1;  $\alpha$ -4-glucan glucanohydrolase) bir endo-tip enzim olup, nişasta molekülündeki  $\alpha$ -1,4-glikozidik bağların hidrolizini katalize ederler (Yamagata ve Uda, 1993; Haki ve Rakshit, 2003). Sıcaklığa dirençli  $\alpha$ -amilazlar başta bira ve nişastadan şeker üretimi (Leveque ve ark., 2000), tekstil endüstrisi (Asgher ve ark., 2007), deterjan endüstrisi (Hewitt ve Solomons, 1996), çiftlik hayvanlarında sindirimin iyileştirilmesi (Godfrey ve West, 1996; Canoğulları, 1999) olmak üzere birçok kullanım alanı bulmuştur. Mikroorganizmalar içerisinde başta *Bacillus*'lar, amilazlar gibi endüstriyel önemi olan bazı ekstraselüler enzimlerin üretim kaynağıdır (Priest, 1977; Aygan ve Arikan, 2008). *Bacillus* cinsine ait termofilik bakterilerin yayılımı sıklıkla tartışılmıştır. İzole edilen termofilik bakterilerden sadece birkaçının genotipik ve fenotipik çeşitliliğine göre tam olarak termofilik *Bacillus* sp. suşlarını karakterize ettiği bildirilmiştir (Mora ve ark., 1998).

Aerobik termofilik basiller olan *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* ve *Bacillus thermodenitrificans* yeni bir cins olan *Geobacillus* içerisinde gruplandırılmış ve *Geobacillus subterraneus* ile *Geobacillus uzenensis* olmak üzere iki yeni tür tanımlanmıştır (Nazina ve ark., 2001). Termofilik bakterilerin yaşam alanları, sıcak su kaynakları ve kaplıca gibi doğal ve insan yapımı tüm karasal ve denizel sıcak çevrelerdir. Termofilik organizmalar optimum olarak 50-80°C sıcaklık aralıklarında gelişim gösterirler (Vieille ve Zeikus, 2001).

Nişastayı hidrolize eden birçok *Bacillus* cinsi bakteri bilinmektedir. Bu şekilde nişastayı parçalayan enzimleri üreten *B. stearothermophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. megaterium*, *B. thuringiensis*, *B. coagulans*, *B. globisporus*, *B. alvei* ve *B. macerans* türleri tanımlanmıştır (Claus ve Berkeley, 1986). Bununla birlikte, bu mikroorganizmalar arasında sadece birkaçı sıcaklığa dirençli  $\alpha$ -amilaz üretmektedir.

Bu çalışmada, Hatay ili Erzin ilçesi sınırları içerisinde bulunan Burnaz Çayı kıyı şeridinden alınan toprak numunelerinden üç adet termofilik *Bacillus* sp. izole edilmiş ve bu izolatlarca üretilen  $\alpha$ -amilaz enzimlerinin kısmi karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir.

## Materyal ve Metot

### Bakteriler ve Kültür Koşulları

*Bacillus* sp. CT1, CT2 ve CT3 bakterileri Hatay ili Erzin ilçesi sınırları içerisinde bulunan Burnaz Çayı kıyı kesimlerinden toplanan toprak numunelerinden izole

edilmişlerdir. Bakterilerin izolasyonu Lennete ve ark. (1985)'e göre yapılmıştır. Termofilik *Bacillus* sporlarının çimlendirilmesi LB besiyeri (%10 w/v tripton, %5 w/v maya özütü, %10 w/v NaCl, pH 7,5) kullanılarak 55°C sıcaklık koşullarında yapılmıştır. Katı besiyeri kullanıldığı durumlarda LB besiyerine %1,5 w/v agar ilave edilmiştir.  $\alpha$ -Amilaz aktivitelerinin belirlenmesi için koloniler tek tek steril kürdanlarla alınmış ve %0,5 w/v nişasta içeren LB-agar plaklarına aktararak 55°C'de inkübasyona bırakılmışlardır. Koloni gelişimi tamamlandıktan sonra plakların kapağına iyot kristalleri ezilmiş ve plaklar ters çevrilerek besiyerlerinin iyot buharı ile boyanması sağlanmıştır. Maviye boyanan zeminde etrafında beyazımtırak zon oluşturan koloniler  $\alpha$ -amilaz pozitif koloniler olarak belirlenmiştir.

### Enzim Üretimi

Termofilik *Bacillus* suşları LB besiyerinde 55°C'de 200 rpm çalkalama hızında 24 saat boyunca üretilmişlerdir. Sıvı kültür ortamı santrifüj edilerek (Hettich Universal EBA12; 5.000 rpm, 10 dk), bakterilerin pelet oluşturması sağlanmış, ekstraselüler enzimleri içeren süpernatant kısım (sıvı faz) ise enzim analizleri için kullanılmıştır (Demirkan, 2010).

### Enzimatik Analizler

$\alpha$ -Amilaz analizleri 0,5 mL hücre dışı sıvıya 0,1 M fosfat tampon (pH 6,5) ile hazırlanmış 0,5 mL çözünür nişastanın (%2 (w/v)) eklenmesi ile 55°C'de 30 dk inkübe edilerek yapılmıştır. Reaksiyon 2 mL 3,5-dinitrosalisilik asit eklenerek sonlandırılmış ve numuneler 5 dk süreyle kaynatıldıktan sonra spektrofotometre (Pharmacia) ile A<sub>540</sub> nm dalga boyunda ölçülmüştür (Miller, 1959). Bir enzim ünitesi, 1 dk boyunca 55°C'de substrattan 1  $\mu$ mol glukozu serbest bırakan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

### Enzim Aktiviteleri Üzerine Sıcaklık ve pH'nın Etkisi

Enzim aktiviteleri üzerine sıcaklık ve pH'nın etkisi, enzimlerin substrat ile 40-100°C arasında değişen farklı sıcaklık ve 5,0-9,0 arasında değişen farklı pH koşullarında 30 dk süreyle inkübasyona bırakılması ile ölçülmüştür. pH'nın enzim aktiviteleri üzerine etkisinin araştırılmasında 100 mM sodyum asetat (pH 4,0-6,0), 100 mM sodyum fosfat (pH 6,0-7,0) ve 100 mM tris (pH 7,0-10,0) solüsyonları kullanılmıştır (Burhan ve ark., 2003).

### Zamana Göre Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Zamana göre enzim aktivitelerinin belirlenmesinde, bakteri inokülasyonunun başlangıcından itibaren her 12 saatte bir olmak üzere 84 saat boyunca bakteri kültüründen enzim numuneleri alınmış ve yukarıda verilen protokol uyarınca DNS yöntemine göre enzim aktiviteleri belirlenmiştir.

### SDS-PAGE ve Zimogram Analizleri

SDS-PAGE ve SDS-Nişasta-PAGE (%0,2 (w/v) nişasta) Laemmli (1970) tarafından belirtilen protokole göre %12 (w/v)'lik jel kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elektroferezden sonra, jel bir saat süreyle Coomassie blue R 250 boyası (%40 (v/v) metanol, %10 (v/v) glasiyal asetik asit, %50 (v/v) saf su, %0,1 (w/v) Coomassie blue R 250) ile boyanmış, sonrasında boya içermeyen aynı solüsyon ile fazla boyanın uzaklaştırılması sağlanmıştır (Burhan ve

ark., 2003). SDS-Nişasta-PAGE'de  $\alpha$ -amilaz aktivitelerinin zimogram analizi için, jel önce oda sıcaklığında 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,2), isopropanol (20% (v/v)) solüsyonu ile yıkanarak SDS uzaklaştırılmış, sonrasında ise 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,2), 5 mM  $\beta$ -merkaptoethanol ve 1 mM EDTA'dan oluşan solüsyonda  $+4^\circ\text{C}$ 'de gece boyunca bekletilerek enzimlerin renatüre olması sağlanmıştır. Ertesi gün jel 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,2) solüsyonunda 1 saat süreyle inkübe edildikten sonra, bir cam levha üzerine transfer edilerek streç film ile sarılmış ve enzimlerin bulunduğu bölgedeki nişastayı hidrolize etmesi için  $55^\circ\text{C}$ 'de 4 saat süreyle inkübe edilmiştir. Jel, sonrasında iyodin solüsyonunda (%1 (w/v) iyodin, %10 (w/v) KI, %50 (v/v) metanol) 30 dk bekletilerek  $\alpha$ -amilaz aktivitelerinden sorumlu bantların ortaya çıkması sağlanmıştır (Ikeda ve ark., 1992; Lee ve ark., 1994; Burhan ve ark., 2003). Sıcaklığa dirençli  $\alpha$ -amilaz enzimlerinin moleküler ağırlıkları BioCapt MW yazılım (Vilber Lourmat) ile belirlenmiştir.

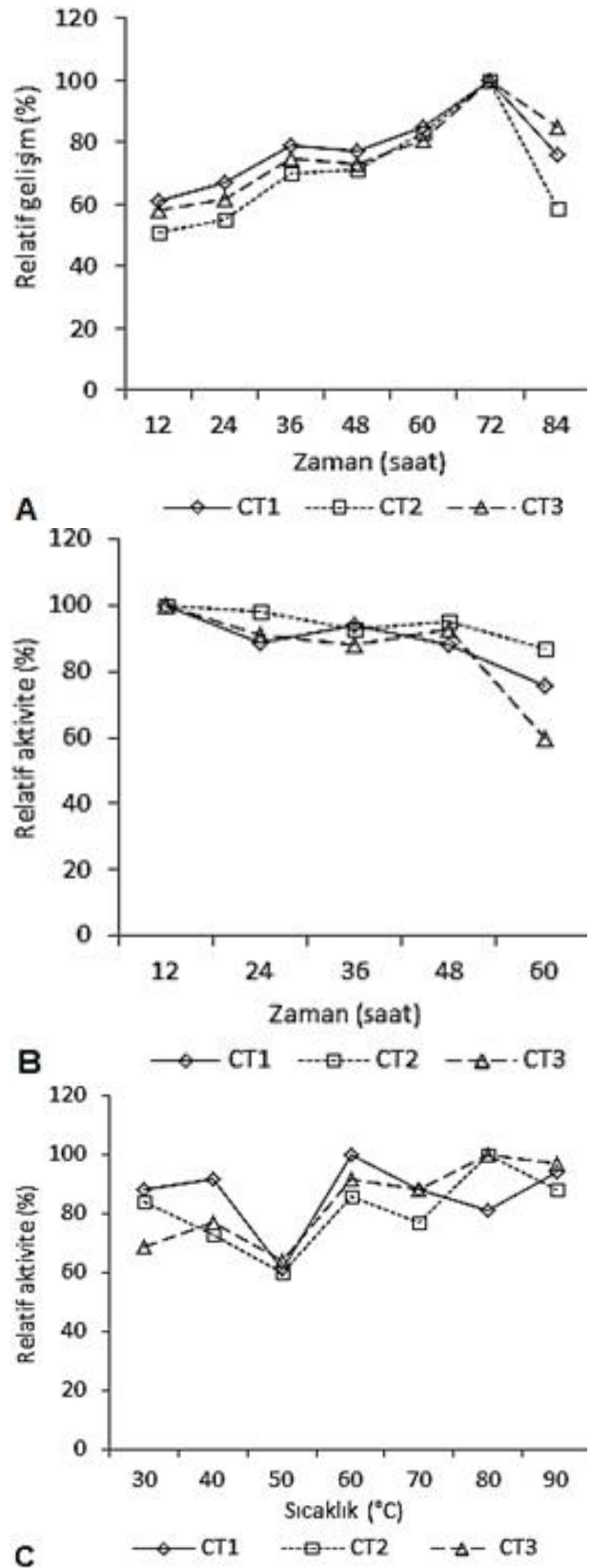
### Bulgular

*Bacillus* sp. CT1, CT2 ve CT3 izolatları gram pozitif, çubuk şeklinde, spor oluşturan ve aerobik mikroorganizmalardır. Her üç izolat da pH 7,5'de ve  $55^\circ\text{C}$ 'de gelişim göstermişlerdir. İzolatlar sıvı kültür ortamında maksimum kütle artışına, inokülasyonun başlangıcından itibaren 72. saatte ulaşmışlardır (Şekil 1A). CT1, CT2 ve CT3 izolatlarının kütle artışı, 12. saatte sırası ile %61, 51 ve 58 olarak gerçekleşmiştir. Her üç bakteride de kütle miktarı 72. saatten sonra düşüşe geçmiştir.

İzolatların üreme periyodunun her 12 saatlik diliminde enzim numunesi alınmış ve her üç izolatın da en yüksek düzeyde  $\alpha$ -amilaz üretimini, üreme periyodunun 12. saatinde gerçekleştiği görülmüştür (Şekil 1B). Üreme periyodunun 60. saatinde ise, CT1, CT2 ve CT3 izolatlarına ait oransal enzim aktiviteleri sırasıyla %76, 87 ve 60 olarak gerçekleşmiştir.

Bakteriler  $30-90^\circ\text{C}$  arasında değişen sıcaklık aralıklarında kültüre alınmış ve her bir sıcaklık değerinde  $\alpha$ -amilaz üretim düzeyleri belirlenmiştir. İzolatlardan *Bacillus* sp. CT1 en yüksek enzim üretimini  $60^\circ\text{C}$ 'de gösterirken, CT2 ve CT3  $80^\circ\text{C}$ 'de göstermiştir (Şekil 1C). Bakterilerin kültüre alındığı  $30-90^\circ\text{C}$  arasında en düşük ve en yüksek relatif enzim üretimleri CT1  $\alpha$ -amilazı için %61-100, CT2 ve CT3  $\alpha$ -amilazları için %60-100 olarak gerçekleşmiştir. Her üç izolat da en düşük düzeyde enzim üretimini  $50^\circ\text{C}$ 'de göstermişlerdir.

Her üç izolat tarafından üretilen  $\alpha$ -amilaz enzimlerinin optimum aktiviteleri için sıcaklık ve pH değerleri belirlenmiştir. CT1  $\alpha$ -amilazı optimum aktivitesini  $90^\circ\text{C}$ 'de gösterirken, CT2 ve CT3  $\alpha$ -amilazları  $60^\circ\text{C}$ 'de göstermişlerdir (Şekil 2A).  $60-90^\circ\text{C}$ 'ler arasındaki ortalama enzim aktiviteleri CT1, CT2 ve CT3  $\alpha$ -amilazları için sırasıyla %79, 90 ve 89 olarak gerçekleşmiştir. Yine CT1  $\alpha$ -amilazı  $100^\circ\text{C}$ 'de aktivitesinin %63'ünü korurken, CT2 ve CT3  $\alpha$ -amilazları %70'ini korumuşlardır.



Şekil 1 *Bacillus* sp. CT1, CT2 ve CT3 izolatlarının zamana göre oransal gelişim grafiği (A), zamana göre enzim üretimi (B) ve kültüre alındığı farklı sıcaklık değerlerinde  $\alpha$ -amilaz üretim düzeyleri (C)

*Bacillus* sp. CT2  $\alpha$ -amilazı optimum aktivitesini pH 7,0'de gösterirken, CT1 ve CT3  $\alpha$ -amilazları pH 8,0'de göstermişlerdir (Şekil 2B). CT1  $\alpha$ -amilazı pH 7,0 ve 9,0 değerlerinde sırasıyla %27 ve %24 oranında aktivite göstermiştir. Aynı pH değerlerinde CT3  $\alpha$ -amilazı da benzer oransal aktivite özellikleri göstermiştir. Bu enzim pH 7,0 ve 9,0 değerinde sırasıyla %25 ve %19 oranında aktivite göstermiştir. CT2  $\alpha$ -amilazı ise CT1 ve CT3  $\alpha$ -amilazlarından farklı olarak daha geniş bir pH aralığında yüksek aktivite oranları sergilemiştir. CT2  $\alpha$ -amilazı pH 6,0; 8,0 ve 9,0 değerlerinde sırasıyla %57, 85 ve 61 oranında aktivite göstermiştir. pH 6,0-9,0 aralığında CT1 ve CT3  $\alpha$ -amilazları ortalama %39 aktivite gösterirken, CT2  $\alpha$ -amilazı aynı pH aralığında ortalama %76 aktivite göstermiştir.

Enzimlere ait spesifik aktivite CT1, CT2 ve CT3  $\alpha$ -amilazları için sırasıyla 317,6; 113,3 ve 362,7 U/mg olarak bulunmuştur. Enzimler bu spesifik aktivite değerlerine substrat olarak nişastanın kullanıldığı durumda ulaşmışlardır.

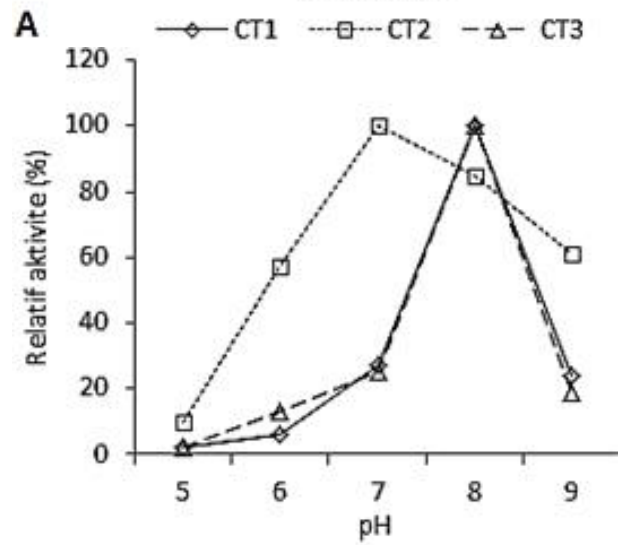
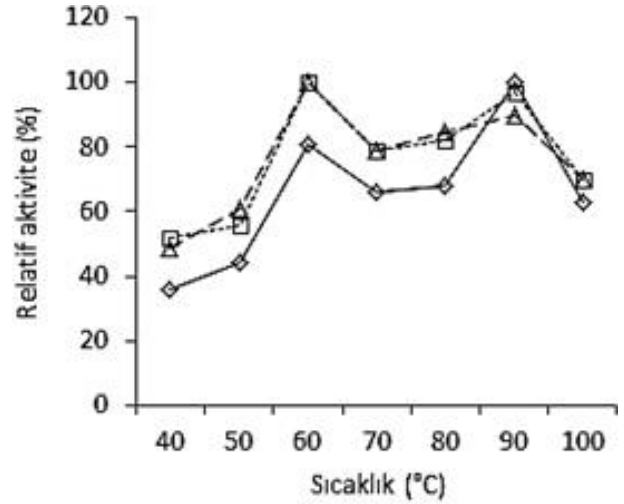
CT1 ve CT3  $\alpha$ -amilazlarının moleküler ağırlığı 65 kDa, CT2  $\alpha$ -amilazının moleküler ağırlığı ise 38 kDa olarak belirlenmiştir (Şekil 3).

### Tartışma

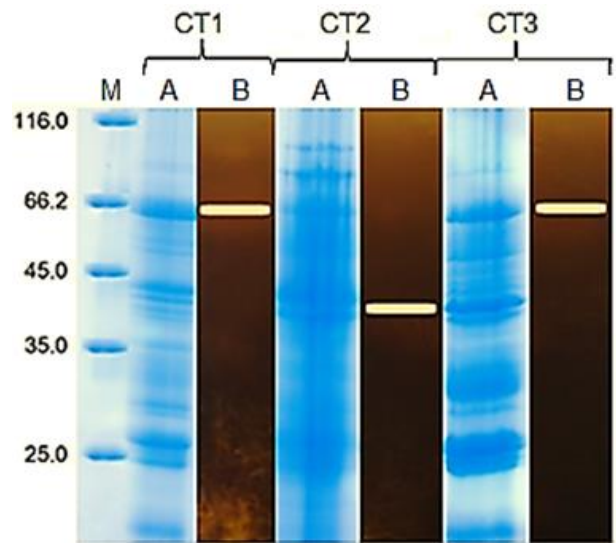
*B. stearothersophilus* ve *B. licheniformis*  $\alpha$ -amilazları iyi düzeyde karakterize edilmiş olup, nişasta sanayinde yoğun şekilde kullanılmaktadır. Amilolitik enzimlerin nişasta sanayinde kullanımında sıcaklığa dirençliliğinin önemli olması, termofilik ve hipertermofilik mikroorganizmalara sıcaklığa dirençli enzimlerin kaynağı olarak önemli bir rol yüklemiştir (Burhan ve ark., 2003).

*Bacillus* sp. CT1, CT2 ve CT3 bakterileri 55°C'de izole edilmişlerdir. Vieille ve Zeikus (2001) termofilik organizmaların optimum olarak 50-80°C'de gelişim gösterdiklerini bildirmiştir. Bu durumda *Bacillus* sp. CT1, CT2 ve CT3 izolatları termofilik olarak tanımlanabilir. Bu izolatlardan CT1 en yüksek  $\alpha$ -amilaz aktivitesini 60°C'de, CT2 ve CT3 ise 80°C'de göstermişlerdir.  $\alpha$ -Amilaz enzimlerinin optimum sıcaklık değerleri ile bu enzimleri üreten mikroorganizmaların gelişim için optimum sıcaklık değerlerinin birbirleri ile benzer özellik gösterdikleri bildirilmiştir (Vihinen ve Mantsala, 1989). Bu çalışmada izole edilen bakterilerin optimum gelişim sıcaklık değerleri ile bu bakterilerce üretilen enzimlerin optimum sıcaklık değerleri bu literatür bildirişi ile benzerlik göstermektedir.

Çalışmada izole edilen bakterilere ait CT1  $\alpha$ -amilazı optimum aktivitesini 90°C'de gösterirken, CT2 ve CT3  $\alpha$ -amilazları 60°C'de göstermişlerdir (Şekil 2A). *B. stearothersophilus*  $\alpha$ -amilazlarının optimum olarak 50-70°C sıcaklıklarda aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Campbell, 1955; Pfueller ve Elliot, 1969; Ogasahara ve ark., 1970; Kim ve ark., 1989). Bununla birlikte *B. stearothersophilus*  $\alpha$ -amilazlarının 90°C sıcaklık değerinde optimum aktivite gösterdiğine dair literatür bildirişleri nadirdir. Lin ve Tsay (1987) izole ettikleri *B. stearothersophilus*  $\alpha$ -amilazının 90°C'de optimum aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. 90°C'de optimum aktivite gösteren enzimler daha ziyade aşırı sıcaklığa dirençli enzimler olarak isimlendirilirler.



Şekil 2  $\alpha$ -Amilaz enzimlerine ait optimum sıcaklık (A) ve pH grafikleri (B)



Şekil 3 İzolatların SDS-PAGE ve zimogram analizi görüntüsü (M: Markır, A: SDS-PAGE'de toplam proteinler, B: Zimogram analizinde iyodin boyaması ile ortaya çıkarılan  $\alpha$ -amilaz aktivite bantları)

Yang ve ark. (2004) yaptıkları bir araştırmada, çalıştıkları ve 90°C sıcaklıkta optimum aktivite gösteren  $\alpha$ -amilaz enzimini aşırı sıcaklığa dirençli olarak tanımlamışlardır. Bu durumda, mevcut çalışmada izole edilen *Bacillus* sp. CT1, CT2 ve CT3 izolatları *B. stearothermophilus* türüne ait suşlar olabilir. Fakat bunu kesin olarak söyleyebilmek için, 50 farklı karbon kaynağını içeren API 50 CHB testi ile teyit edilmesi gerekmektedir (Wind ve ark., 1994). Nişastanın her üç enzim ile hidrolizinde son ürün glikoz olmuştur. Bununla birlikte, nişastanın  $\alpha$ -amilaz enzimlerince hidrolizi sonucunda glikozun tek ürün olduğunu söylemek zordur. Çünkü nişasta molekülünden serbest bırakılan dekstrinler serbest enzimlerce hızlı bir şekilde küçük fragmanlara hidrolize olmalıdır (Mamo ve Gessesse, 1999).

Çalışmada izole edilen her üç bakteriye ait  $\alpha$ -amilaz enzimleri geniş sıcaklık aralıklarında aktivite göstermelerine karşın, aktivite için geniş bir pH aralığına sahip olmamıştır. CT1 ve CT3  $\alpha$ -amilazları optimum aktivitelerini pH 8,0'de göstermişlerdir (Şekil 2B). Fakat her iki enzim de pH 7,0 ve 9,0'da ciddi bir aktivite kaybına uğramışlardır. CT1 ve CT3  $\alpha$ -amilazları pH 7,0'da aktivitelerinin sırasıyla %73 ve %55'ini kaybederken, pH 9,0'da yine sırasıyla aktivitelerinin %76 ve %81'ini kaybetmişlerdir. CT2  $\alpha$ -amilazı ise diğer iki enzime karşılık biraz daha geniş bir pH aralığında yüksek aktivite oranları sergilemiştir. CT2  $\alpha$ -amilazı optimum aktivitesini pH 7,0'da gösterirken, pH 6,0; 8,0 ve 9,0 değerlerinde aktivitesinin sırasıyla %57, 85 ve 61'ini göstermiştir. pH 6,0-9,0 aralığında CT1 ve CT3  $\alpha$ -amilazları ortalama %39 aktivite gösterirken, CT2  $\alpha$ -amilazı bu pH aralıklarında ortalama %76 aktivite göstermiştir.  $\alpha$ -Amilaz enzimlerinin pH optimumları 2,0-12,0 arasında değişiklik göstermektedir (Vihinen ve Mantsala, 1989) ve genellikle 4,0-11,0 pH aralıklarında kararlı olmaktadır (Fogarty ve Kelly, 1979; Khoo ve ark., 1994; Hamilton ve ark., 1999; Reddy ve ark., 2003). Benzer şekilde nötral yada hafif alkali pH değerlerinde optimum aktivite gösteren sıcaklığa dirençli  $\alpha$ -amilaz enzimleri daha önce bildirilmiştir (Rasooli ve ark., 2008; Gaur ve ark., 2012; Oyeleke ve Oduwale, 2009). Enzimlerin geniş bir pH aralığında aktivite göstermeleri arzu edilen bir durumdur. Bu enzimler farklı endüstriyel alanlarda kullanılabilme potansiyeline sahiptirler. Bizim bu çalışmada izole edilen CT1 ve CT3  $\alpha$ -amilazları için bunu söylemek zordur.

CT1, CT2 ve CT3  $\alpha$ -amilazları için spesifik aktivite değerleri sırasıyla 317,6; 113,3 ve 362,7 U/mg olarak hesaplanmıştır. Genellikle  $\alpha$ -amilazların spesifik aktivite değerleri değişkenlik göstermektedir. Mahdavi ve ark. (2010) çalıştıkları *B. cereus*'a ait  $\alpha$ -amilaz enziminin spesifik aktivitesini 50 U/mg olarak hesaplarken, Akcan ve ark., (2011) *B. subtilis* RSKK96 suşuna ait  $\alpha$ -amilaz enziminin spesifik aktivitesini 858,6 U/mg olarak hesaplamışlardır. Bu durumda çalışmamızdaki enzimlere ait spesifik aktivite değerleri normal sınırlar içerisinde görülmektedir. Mutagenesis veya klonlama yöntemleriyle bu değerler artırıldığı takdirde, enzimler endüstriyel kullanım için daha uygun hale getirilebilirler.

Sıcaklığa dirençli CT1 ve CT3  $\alpha$ -amilazlarının moleküler ağırlığı 65 kDa, CT2  $\alpha$ -amilazının moleküler ağırlığı ise 38 kDa olarak hesaplanmıştır. Genellikle  $\alpha$ -amilaz enzimlerinin moleküler ağırlıkları 50-60 kDa

aralığındadır. Bununla birlikte  $\alpha$ -amilazların moleküler ağırlıklarının 10-210 kDa arasında değişebileceği de bildirilmiştir (Gupta ve ark., 2003).  $\alpha$ -Amilaz enzimlerinin moleküler ağırlıkları arasındaki bu varyasyon, organizmalarda bulunan gen farklılıklarının sonucudur (Sidhu ve ark., 1997). *Bacillus* sp. CT1, CT2 ve CT3  $\alpha$ -amilazları ile benzer moleküler ağırlıklara sahip  $\alpha$ -amilazlar daha önce bildirilmiştir. Bu enzimlerden *B. licheniformis* JAR-26 (Jyoti ve ark., 2011), *Bacillus* sp. AB68 (Aygan ve ark., 2008), *B. subtilis* BS5 (Femi-Ola ve Olowe, 2011) ve *B. subtilis* X-23 (Ohdan ve ark., 1999) tarafından üretilen  $\alpha$ -amilazların moleküler ağırlıkları sırasıyla 38, 66, 63 ve 67 kDa olarak bildirilmiştir.

## Sonuç

Bu çalışmada sıcaklığa dirençli  $\alpha$ -amilaz enzimleri üreten üç adet *Bacillus* sp. izole edilerek enzimlerin kısmi karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Her üç enzim de geniş bir sıcaklık aralığında (60-90°C) aktivite göstermelerine karşın, çok dar bir pH aralığında (CT1 ve CT3  $\alpha$ -amilazları için pH 8,0; CT2  $\alpha$ -amilazı için pH 7,0) aktivite göstermişlerdir. Enzimlerin sıcaklığa dirençli olmaları ve hafif alkali özellik göstermeleri endüstriyel kullanım açısından önem taşıyabilir. Bu enzimlerin üretimlerinin moleküler genetik yöntemleriyle artırılarak optimize edilmeleri sonucunda ticari kullanım olanakları araştırılabilir.

## Teşekkür

Bu çalışma Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından OKÜBAP-2013-PT3-0013 nolu proje ile desteklenmiştir.

## Kaynaklar

- Akcan N, Uyar F, Güven A. 2011. Alpha-amylase production by *Bacillus subtilis* RSKK96 in submerged cultivation. Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg., 17 (Suppl A): 17-22.
- Asgher M, Asad MJ, Rahman SU, Legge RL. 2007. A thermostable  $\alpha$ -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. J. Food. Eng., 79: 950-955. DOI:10.1016/j.foodeng.2005.12.053.
- Aygan A, Arıkan B. 2008. A new halo-alkaliphilic, thermostable endoglucanase from moderately halophilic *Bacillus* sp. C14 isolated from Van Soda Lake. Int. J. Agri. Biol., 10: 369-374.
- Aygan A, Arıkan B, Korkmaz H, Dinçer S, Çolak Ö. 2008. Highly thermostable and alkaline  $\alpha$ -amylase from a halotolerant-alkaliphilic *Bacillus* sp. AB68. Braz. J. Microbiol., 39: 1517-8382. DOI: 10.1590/S1517-838220080003000027.
- Bertoldo C, Antranikian G. 2002. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. Curr. Opin. Chem. Biol., 6(2): 151-160. PMID: 12038998.
- Burhan A, Nisa U, Gokhan C, Omer C, Ashabil A, Osman G. 2003. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. Process Biochem., 38: 1397-1403. DOI: 10.1016/S0032-9592(03)00037-2.
- Campbell LL. 1955. Purification and some properties of a  $\alpha$ -amylase from a facultative thermophilic bacteria. Arc. Biochem. Biophys., 54: 154-161.



- Canoğulları S. 1999. Etlik Piliç Karma Yemlerinde Enzim Kullanımı ve Kullanım Koşulları. Doktora Tezi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Zootehni Anabilim Dalı, Adana.
- Claus D, Berkeley RCW. 1986. The Genus *Bacillus*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG. (Eds.). 1<sup>st</sup> Edition, Williams and Wilkins, Baltimore-London, vol. 2, pp. 1105-1139. ISBN: 0-683-04108-8.
- Demirkan E. 2010. Production, purification, and characterization of  $\alpha$ -amylase by *Bacillus subtilis* and its mutant derivatives. Turk. J. Biol., 35: 705-712. DOI: 10.3906/biy-1009-113.
- Femi-Ola TO, Olowe BM. 2011. Characterization of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* BS5 isolated from *amitermes evuncifer silvestris*. Res. J. Microbiol., 6: 140-146. DOI: 10.3923/jm.2011.140.146.
- Fogarty WM, Kelly CT. 1979. Developments in microbial extracellular enzymes. In: Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology, Wiseman A. (Ed.). Vol. 3, John Wiley and Sons, New York, pp: 45-108. ISBN-13: 978-0853121404
- Gaur D, Jain PK, Bajpai V. 2012. Production of extracellular  $\alpha$ -amylase by thermophilic *Bacillus* sp. isolated from arid and semi-arid region of Rajasthan, India. J. Microbiol. Biotech. Res., 2: 675-684.
- Godfrey T, West S. 1996. Introduction to industrial enzymology. Industrial Enzymology, 2<sup>nd</sup> Edition. Godfrey Y, West S. (Eds). Stockton Press, New York, pp. 1-17. ISBN: 0-333-59464-9
- Gupta R, Gigras P, Mohapatra H, Goswami VK, Chauhan B. 2003. Microbial  $\alpha$ -amylases: A biotechnological perspective. Process Biochem., 38(11): 1599-1616. DOI: 10.1016/S0032-9592(03)00053-0.
- Haki GD, Rakshit SK. 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: A review. Bioresour. Technol., 89: 17-34. DOI: 10.1016/S0960-8524(03)00033-6.
- Hamilton LM, Kelly CT, Fogarty WM. 1999. Purification and properties of the raw starch degrading  $\alpha$ -amylase of *Bacillus* sp. IMD 434. Biotechnol. Lett., 21: 111-115. DOI: 0.1023/A:1005413816101.
- Hewitt CJ, Solomons GL. 1996. The production of  $\alpha$ -amylase (E.C.3.2.1.1.) by *Bacillus amyloliquefaciens*, in a complex and a totally defined synthetic culture medium. J. Ind. Microbiol., 17: 96-99. DOI: 10.1007/BF01570050.
- Ikedo T, Yamazaki H, Yamashita K, Shinke R. 1992. The tetracycline inducible expression of  $\alpha$ -amylase in *Bacillus subtilis*. J. Ferment. Bioeng., 74: 58-60. DOI: 10.1016/0922-338X(92)90270-5.
- Jyoti J, Lal N, Lal R, Kaushik A. 2011. Partial purification and characterization of an acidophilic extracellular  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* JAR-26. Int. J. Adv. Biotechnol. Res., 2: 315-320.
- Khoo SL, Amirul AA, Kamaruzaman M, Nazalan N, Azizan MN. 1994. Purification and characterization of  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus flavus*. Folia Microbiol., 39: 392-398. PMID: 772977.
- Kim J, Nanmori T, Shinke R. 1989. Thermostable raw starch digesting amylase from *Bacillus stearothermophilus*. Appl. Environ. Microbiol., 55: 1638-1639. PMID: 16347958.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685. DOI: 10.1038/227680a0.
- Lee SP, Morikawa M, Takagi M, Imanaka T. 1994. Cloning of the aapT gene and characterization of its product,  $\alpha$ -amylase-pullulanase (AapT), from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. strain XAL601. Appl. Environ. Microbiol., 60: 3764-3773. PMID: 7986049.
- Lenete EH, Ballows A, Hausler JW Jr, Shadomy JH. 1985. Manual of Clinical Microbiology, 4<sup>th</sup> Edition, Washington D.C., American Society for Microbiology, pp. 1149.
- Leveque E, Janecek S, Haye B, Belarbi A. 2000. Thermophilic archaeal amylolytic enzymes-catalytic mechanism, substrate specificity and stability. Enzyme. Microb. Technol., 26: 3-14.
- Lin HY, Tsay SS. 1987. Extracellular thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus stearothermophilus* Q8. Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi, 20(4): 327-338.
- Mahdavi A, Sajedi RH, Rassa M, Jafarian V. 2010. Characterization of an  $\alpha$ -amylase with broad temperature activity from an acid-neutralizing *Bacillus cereus* strain. Iran. J. Biotechnol., 8: 103-111.
- Mamo G, Gessesse A. 1999. Purification and characterization of two raw-starch digesting thermostable amylase from a thermophilic *Bacillus*. Enzyme Microb. Technol., 25: 433-438. DOI: 10.1016/S0141-0229(99)00068-X.
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem., 31: 426-428. DOI: 10.1021/ac60147a030.
- Mora D, Fortina MG, Nicastro G, Parini C, Manachini PL. 1998. Genotypic characterization of thermophilic bacilli: A study on new soil isolates and several reference strains. Res. Microbiol., 149: 711-722. PMID: 9921578.
- Nazina TN, Tourova TP, Poltarau AB, Novikova EV, Grigoryan AA, Ivanova AE, Lysenko AM, Petrunyaka VV, Osipov GA, Belyaev SS, Ivanov MV. 2001. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: Descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 51: 433-446. DOI: 10.1099/00207713-51-2-433
- Nielsen JE, Borchert TV. 2000. Protein engineering of bacterial  $\alpha$ -amylases. Biochim. Biophys. Acta, 1543: 253-274. DOI: 10.1016/S0167-4838(00)00240-5.
- Ogasahara K, Imanishi A, Isemura T. 1970. Studies on thermophilic  $\alpha$ -amylases from *Bacillus stearothermophilus*, I. Some general and physicochemical properties of the thermophilic  $\alpha$ -amylase. J. Biochem., 67: 65-75.
- Ohdan K, Kuriki T, Kaneko H, Shimada J, Takada T, Fujimoto Z, Mizuno H, Okada S. 1999. Characteristics of two forms of  $\alpha$ -amylases and structural implication. Appl. Environ. Microbiol., 65: 4652-4658.
- Oyeleke SB, Oduwole AA. 2009. Production of amylase by bacteria isolated from a cassava waste dumpsite in Minna, Niger State, Nigeria. Afr. J. Microbiol. Res., 3(4): 143-146.
- Pfueller SL, Elliott WH. 1969. The extracellular  $\alpha$ -amylase of *Bacillus stearothermophilus*. J. Biol. Chem., 244: 48-54.
- Priest FG. 1977. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. Bacteriol. Rev., 41: 711-753.
- Rasooli I, Astaneh SDA, Borna H, Barchini KA. 2008. A thermostable  $\alpha$ -amylase producing natural variant of *Bacillus* spp. isolated from soil in Iran. Am. J. Agric. Biol. Sci., 3: 591-596. DOI: 10.3844/ajabssp.2008.591.596.
- Reddy NS, Nimmagadda A, Rao KRSS. 2003. An overview of the microbial  $\alpha$ -amylase family. Afr. J. Biotechnol., 2: 645-648.
- Sidhu GS, Sharma P, Chakrabarti T, Gupta JK. 1997. Strain improvement for the production of a thermostable  $\alpha$ -amylase. Enzyme Microb. Technol., 21: 525-530. DOI: 10.1016/S0141-0229(97)00055-0.

- Vieille C, Zeikus GJ. 2001. Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 65: 1-43. DOI: 10.1128/MMBR.65.1.1-43.2001.
- Vihinen M, Mantsala P. 1989. Microbial amyolytic enzymes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 24: 329-418. DOI: 10.3109/10409238909082556.
- Wind RD, Buitelaar RM, Eggink G, Huizing HJ, Dijkhuizen L. 1994. Characterization of a new *Bacillus stearothermophilus* isolate: A highly thermostable  $\alpha$ -amylase producing strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 41: 155-162. DOI: 10.1007/BF00186953.
- Yamagata H, Udaka S. 1993. Starch-processing enzymes produced by recombinant bacteria. In: *Recombinant Microbes for Industrial and Agricultural Applications*, Murooka Y, Imanaka T. (Eds.). Marcel Dekker Inc., New York, pp: 325-340. ISBN: 0-8247-9141-X.
- Yamashita I. 1993. Starch-processing enzymes produced by recombinant yeasts and fungi. In: *Recombinant Microbes for Industrial and Agricultural Applications*, Murooka Y, Imanaka T. (Eds.). Marcel Dekker Inc., New York, pp: 341-357. ISBN: 0-8247-9141-X.
- Yang S-J, Lee H-S, Park C-S, Kim Y-R, Moon T-W, Park K-H. 2004. Enzymatic analysis of an amyolytic enzyme from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* reveals its novel catalytic properties as both an  $\alpha$ -amylase and a cyclodextrin-hydrolyzing enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 5988-5995. DOI: 10.1128/AEM.70.10.5988-5995.2004.