

Zeytinli Ilicası (Kahramanmaraş)'ndan Termofil Alkalifilik Amilolitik *Bacillus sp.* Suşlarının İzolasyonu ve Amilaz Üretme Yetenekleri Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi

Özlem E. KIRAN

Uğur ÇÖMLEKÇİOĞLU

KSÜ, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kahramanmaraş

ÖZET

Bu çalışmada, Zeytinli Ilicası (Kahramanmaraş)'ndan su ve toprak örnekleri alınmış ve bu örneklerden 65 *Bacillus sp.* suşu izole edilmiştir. Bu suşların amilaz enzimi üretme yetenekleri araştırılmış ve buna göre en iyi aktivite gösteren tek bir suş seçilmiştir. İzole edilen *Bacillus sp.* K-12 suşunun termofil, alkali amilaz üretme yeteneği araştırılmıştır. Kültür ortamının pH'sı 9.5, inkübasyon sıcaklığı ise 42 °C olarak belirlenmiştir. Çeşitli azot kaynaklarının bu suşun amilaz enzimi üretme yeteneği üzerine etkisi incelenmiş ve maya özütü içeren kültür ortamında 48. saatte maksimum aktivite tespit edilmiştir. Bunun üzerine mayanın farklı konsantrasyonlarını içeren kültür ortamları 48 saat inkübasyona bırakılmış ve amilaz aktivitesi üzerine etkisi izlenmiştir. Sonuç olarak kültür ortamında % 1.25 oranında maya özütü bulunması amilaz aktivitesini olumlu yönde etkilediği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus sp.*, amilaz, azot, maya özütü

Effects of Nitrogen Sources on Amylase Production Capability of Thermophilic, Alkaliphilic, Amylolytic *Bacillus sp.* Isolated from Zeytinli Hot Spring (Kahramanmaraş)

ABSTRACT

In this study, water and soil samples were collected from Zeytinli Hot Spring (Kahramanmaraş), and 65 *Bacillus sp.* strains were isolated from these samples. Capabilities of amylase production of these strains were examined and one strain was selected. Alkali, thermophile amylase production capability of *Bacillus sp.* K-12 strain was investigated. pH of culture medium and incubation temperature were adjusted to 9.5 and 42 °C, respectively. Effects of various nitrogen sources on production of amylase were investigated and maximum activity was found in the medium containing yeast after 48 hours. According to this result, different concentrations of yeast extract were screened on the activity of amylase for 48 hours. Culture medium, which has % 1.25 yeast extract, has positive effect on amylase activity.

Keywords: *Bacillus sp.*, amylase, nitrogen, yeast extract

GİRİŞ

Endüstriyel alanda kullanılan enzimler bitkisel, hayvansal ve mikroorganizma kökenli olmakla birlikte, ağırlıklı olarak mikroorganizmalardan izole edilmektedirler. Bunun nedeni, mikroorganizma kaynaklı enzimlerin katalitik aktivitelerinin yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları büyük boyutlarda ve yüksek saflıkta elde edilmesi gibi avantajlara

sahip olmasıdır (Wiseman, 1987; Horikoshi, 1996).

Mikrobiyal enzimlerin dünya genelinde yıllık kullanım değerlerine bakıldığı zaman alkalın proteaz %25, diğer proteazlar %21, amilaz %18, rennin %10, tripsin %3, lipaz %3, diğer karbonhidratı parçalayan enzimler %10 şeklinde bir dağılımla karşılaşmaktadır (Rao ve ark., 1998). Parasal olarak yüz milyonlarca dolar şeklinde tanımlanan ekonomik değeri vardır. 1985 yılında yapılan bir değerlendirmede, dünyadaki enzim satışının 450 milyon doları bulduğu belirtilmektedir. Bugün dünyadaki enzim satışında 2-3 kat artış olduğu bilinmektedir.

Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle biyoteknolojinin endüstriyel enzimler ile ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar daha da önem kazanmaktadır. Özellikle son yıllarda stratejik alan şeklinde değerlendirilen rekombinant DNA teknolojisinden yararlanılarak enzim üretimi büyük boyutlara ulaşmış ve kullanımı giderek yaygınlaşmıştır. *Bacillus sp.* suşları proteolitik enzimler ve karbohidrazların önemli bir kaynağını oluşturmaktadır. Örneğin, α -amilaz *Bacillus sp.* grubunda oldukça yaygın bir şekilde bulunur. Bu enzimler ekmek ve pastacılık, bira, peynir gibi gıda endüstrilerinde nişastanın maltoza hidrolize edilmesi, maltoz şuruplarının hazırlanmasında kullanılmaktadır. Diğer taraftan gıdalarda tatlandırıcı ve kaliteyi artırıcı olarak (Anonim, 1988), tekstil endüstrisinde haşıl alma işlemlerinde (Tarakçıoğlu, 1979) ve alkol fermentasyonunda yaygın bir kullanım alanı vardır (Bailey ve ark, 1987). Özellikle termofil alkali amilazlar, pH 9'un üzerinde yüksek düzeyde aktif olup deterjan endüstrisinin en önemli katkı maddesini oluşturmaktadır. Bunların dışında kağıt, deri ve tekstil endüstrisi, kuru temizleme, çeşitli içeceklerin saflaştırılması ve berraklaştırılması, et ürünlerinin işlenmesi ve daha kolay sindirilebilir duruma getirilmesinde nişasta ve selülozlu bileşiklerden çeşitli alkol ürünlerinin üretiminde de yaygın şekilde kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, Zeytinli Ilicası (Kahramanmaraş) çevresindeki toprak ve su örneklerinden termofil, alkali ve amilolitik *Bacillus sp.* suşları izole edilmiştir. İzolasyonu ve tanımlanması yapılan bu suşların amilaz enzimi üretme yetenekleri, enzimin çeşitli pH ve sıcaklık aralıklarındaki aktivitesi test edilmiştir. Çeşitli azot kaynaklarının amilaz üretimi üzerine etkileri incelenmiştir. Bu çalışma ile Kahramanmaraş ilinden izolasyonu ve tanımlanması yapılan *Bacillus sp.* suşlarının ülke endüstrisine (gıda, tekstil, deterjan, kağıt, vs.) katkısı ortaya çıkartılacaktır.

MATERYAL VE METOT

Bacillus sp. suşlarının izolasyonu

Zeytinli Ilicası (Kahramanmaraş) çevresinden su ve toprak örnekleri alınmıştır. Bu örneklerden 1 gr tartılarak 4.5 ml steril distile su ile süspansiyon haline getirilmiştir. İzole edilmek istenen mikroorganizma (*Bacillus sp.*) sporlu bir bakteri olduğu için elde edilen süspansiyon 60 °C'de 30 dakika süre ile inkübe edilmiş (Lennette ve ark., 1985) ve nutrient agar içeren petri kutularına yayma ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petri kutuları 37 °C'de 24 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır

Saf halde *Bacillus sp.* kolonileri elde etmek amacıyla seri sulandırma yapılarak ($10^{-1}, 10^{-2}, \dots$) nutrient agarlı besiyerine yayma şeklinde ekim yapılmış ve 37 °C de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda besiyeri üzerinde

gelişen farklı morfolojik görünüşe sahip koloniler seçilerek amilaz aktivitelerinin araştırılması amacı ile 4 °C de saklanmıştır (Kıran, 2001). İzole edilen bakterilerin tanımlanması Collins ve ark. (1989)'a göre yapılmıştır.

Katı Besiyerinde Amilaz Aktivitesinin Araştırılması

İzole edilen *Bacillus sp.* suşlarında amilaz aktivitesini araştırmak için % 0.5 pepton, % 0.3 maya özütü, % 1 (w/v) çözülebilir nişasta, % 0.3 NaCl, % 0.1 K₂HPO₄ ve % 0.02 MgSO₄.7H₂O, % 1.5 Agar içeren besiyerine (M9-niştastalı agar) yayma tekniği kullanılarak ekim yapılmıştır. Ekim yapılan besiyerleri 37 °C de 72 saat süre ile inkübe edilerek koloni oluşumu sağlanmıştır. Amilaz aktivitesinin belirlenmesi için oluşan koloniler, petri kutusunun kapağına iyot çözeltisi dökülerek, iyot buharına tutulmuştur. Amilaz enzimi üreten kolonilerin çevresinde boyanmayan şeffaf zonlar meydana gelirken, nişastanın hidroliz olmadığı yerler koyu mavi renge boyanmıştır (Hols ve ark., 1994).

Amilaz Enzimi Üzerine pH ve Sıcaklığın Etkisi

Bacillus sp. K-12 suşunun amilaz üretimi üzerine pH'nın etkisi (4.5-11) M9-niştastalı sıvı besiyerinde araştırılmıştır. İnkübasyon sıcaklığının amilaz üretimine etkisini belirlemek amacıyla *Bacillus sp.* aşılana pH 9.5 olan M9-niştastalı sıvı besiyerinde 20, 30, 37, 42, 50 ve 55 °C'lerde 72 saat süre ile inkübasyona bırakılarak enzim aktiviteleri ölçülmüştür. İzole edilen *Bacillus sp.* K-12 suşu sıvı kültür ortamında canlandırılmış ve bu kültürden 0.1 ml alınarak ekim yapılmıştır. Örnekler 42 °C'de 100 rev./dak.'da 72 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültür ortamı Hettich marka soğutmalı santrifüj ile 4 °C'de 6000 rpm'de 20 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve üst sıvı elde edilmiştir (Lin ve ark., 1998). Enzim aktivite tayinlerinde bu üst sıvı (süpernatant) enzim solusyonu olarak kullanılmıştır.

Enzim Aktivitesinin Araştırılması

Amilolitik aktivitenin analiz edildiği karışım, 0.5 ml enzim solusyonu ve 0.5 ml % 2 (w/v) nişasta solusyonu (40 mM potasyum fosfat tamponu, pH 6.0) içermektedir. Reaksiyon 70 °C'de 10 dakika bekletilerek gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonun durdurulması, 1 ml 3,5-dinitrosalisilik asit eklenip, 100 °C'de 5 dakika kaynatılarak gerçekleştirilmiştir. Karışım, Perkin Elmer, Lambda EZ 150 model spektrofotometre ile 540 nm'de okunmuştur (Aira ve ark., 1983). Okunan absorbans değerlerine göre enzimin rölatif aktivitesi hesaplanmıştır.

Aktivite Üzerine Azot Kaynaklarının Etkileri

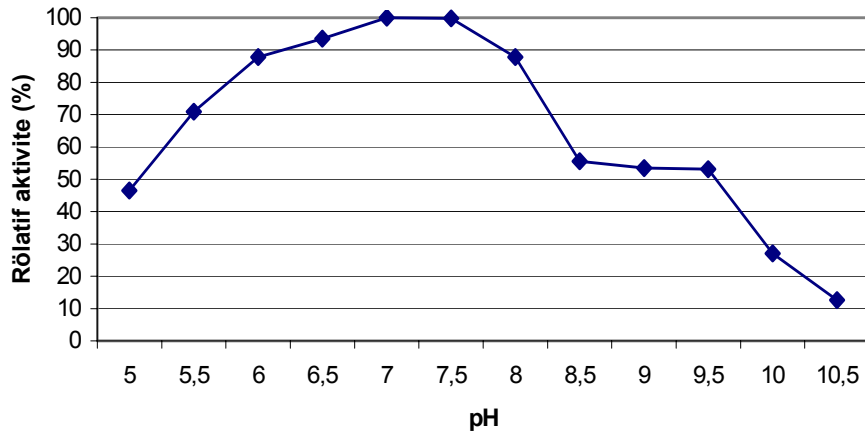
Azot kaynaklarının amilaz aktivitesi üzerine etkisi M9-niştastalı sıvı besiyerinde pepton, maya özütü, et özütü ve amonyum sülfatın % 0.5 oranında ilave edilmesiyle belirlenmiştir (Lin ve ark. 1998). Ayrıca, en iyi amilaz aktivitesinin belirlendiği azot kaynağı M9-niştastalı sıvı besiyerinde % 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5 ve 1.75 oranlarında ilave edilerek 42 °C de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Böylece, belirlenen azot kaynağı konsantrasyonunun rölatif aktivite üzerine etkisi belirlenmiştir

BULGULAR VE TARTIŞMA

Enzim Üretimi Üzerine pH ve Sıcaklığın Etkisi

Zeytinli Ilıcası (Kahramanmaraş) alınan su ve toprak örneklerinden 65 *Bacillus sp.* suşu izole edilmiş ve bu suşların amilaz enzimi üretme yetenekleri araştırılarak farklı pH ve sıcaklıklarda bu suşların gösterdikleri aktivite değerleri incelenerek tek bir suş seçilmiştir. Bu suşa *Bacillus sp* K-12 adı verilmiştir. İzole edilen *Bacillus sp.* K-12 suşu, 20 °C ve 55 °C sıcaklıkları arasında bakteri üremesi ve enzim sentezi gerçekleştirmiştir. Enzim sentezinin gerçekleştirildiği optimum sıcaklık ise 42 °C olarak bulunmuştur. Lin ve ark (1998), *Bacillus sp.* TS-23 suşunun enzim sentezinin 42-60 °C sıcaklıkta ve optimum 55 °C'de meydana geldiğini belirtmişlerdir. Yine, Bajpai ve Bajpai (1987)'de yapmış oldukları çalışmalarda *Bacillus licheniformis* TCRDC-B13 suşu için enzim üretimi ve üreme sıcaklığının 25-50 °C de ve maksimum enzim üretiminin ise 35 °C'de gerçekleştiğini bulmuşlardır.

Bacillus sp. K-12 suşu, pH 4.5-11 arasında üreme göstermiştir. Enzim üretimi ise, pH 5-10.5 'de gözlenmiştir. Enzim üretimi pH 6-8 arasında en üst düzeye ulaşmış, pH 8.5'da amilaz üretiminde bir düşüş meydana gelmiştir. Ancak pH 8.5 ve 9.5 arasında amilaz üretiminin çok az değişiklik gösterdiği dikkati çekmiştir (Şekil 1). İzole edilen *Bacillus sp.* K-12 suşunun salgıladığı amilaz enziminin alkali özelliği araştırıldığı için kültür ortamının pH'sı 9.5'a ayarlanmıştır. Bajpai ve Bajpai (1987), *Bacillus licheniformis* TCRDC-B13 suşunun üremesinin pH 3-11 arasında olup besiyerinin pH'sının artırılması ile üremenin azaldığını, enzim üretiminin pH 5'de başladığını pH 10'a kadar devam ettiğini ve maksimum aktivitenin pH 6-9 arasında olduğunu bulmuşlardır. Bununla beraber Boyer ve Ingle (1972), yaptıkları çalışmada amilaz aktivitesi için optimum pH'yı 9.2 olarak bildirmişlerdir. Yaptığımız bu çalışmada bulunan sonuçlar daha önce yapılan çalışmalarda bulunan sonuçlarla uygunluk göstermektedir.

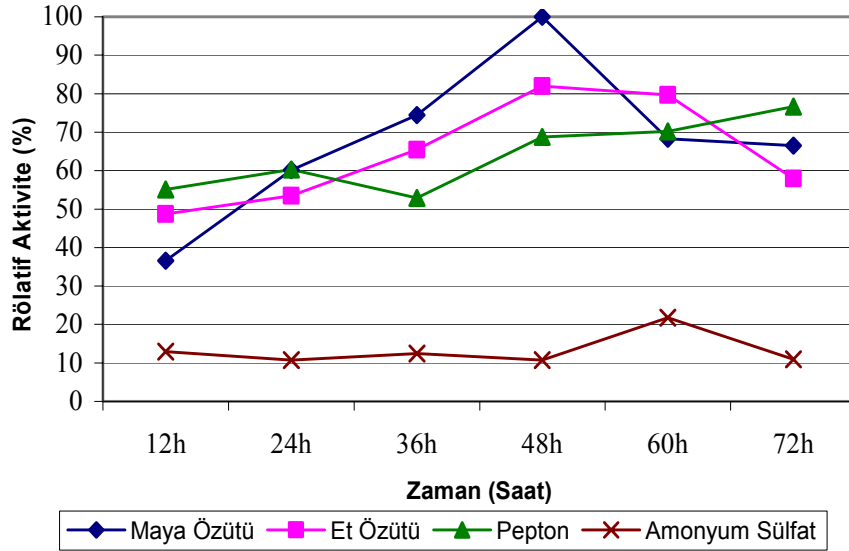


Şekil 1. *Bacillus sp.* K-12 suşundan elde edilen amilaz enziminin rölatif aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.

Enzim Üretimi Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi

Çözünebilen nişasta içeren kültür ortamına çeşitli azot kaynakları eklenerek *Bacillus sp.* K-12 suşunun amilaz üretimi üzerine etkisi incelenmiştir. Orijinal kültür ortamında bulunan % 0.5 pepton çıkarılarak yerine maya özütü, et özütü ve amonyum sülfat eklenmiştir. Farklı azot kaynakları içeren kültürler (pH 9.5), 42 °C'de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır (100 rev/dak). Hazırlanan kültürlerden 12, 24, 36, 48, 60 ve 72. saatlerde alınan örneklerde bulunan enzim aktiveleri spektrofotometrede belirlenmiş, elde edilen bulgular rölatif aktivite olarak değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda en iyi amilaz üretiminin maya özütü içeren kültür ortamında olduğu görülmüştür (Şekil 2).

Maya ve et özütü içeren ortamlarda amilaz üretimi 48 saat içerisinde maksimum düzeye ulaşmış, daha sonra amilaz üretiminde azalma görülmüştür. Pepton içeren ortamda ise, *Bacillus sp.* K-12 suşunun amilaz üretimi 72. saate kadar yükselmiş, ancak maya özütü bulunan ortamda elde edilen verime ulaşamamıştır. Amonyum sülfat içeren ortamda ise, amilaz üretiminin düşük düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Tablo 1'de farklı azot kaynaklarında gelişen *Bacillus sp.* K-12 suşunun amilaz enzimi üretimi üzerine olan etkileri rölatif aktivite olarak verilmiştir.



Şekil 2. *Bacillus sp.* K-12 suşundan elde edilen amilaz enziminin rölatif aktivitesi üzerine farklı azot kaynaklarının etkisi.

Sarıkaya (1995) yapmış olduğu çalışmada, farklı azot kaynakları bulunan ortamda *Bacillus amyloliquefaciens* tarafından 16, 24, 40, 48, 64, 72 ve 88. saatlerde amilaz aktivitesini test etmiştir. Çalışmada en yüksek rölatif aktiviteyi maya özütü içeren ortamda tespit etmiştir. Jin ve ark (1990), *Bacillus amyloliquefaciens* 1 ve 2 suşunun maya özütü içeren ortamda yüksek enzim

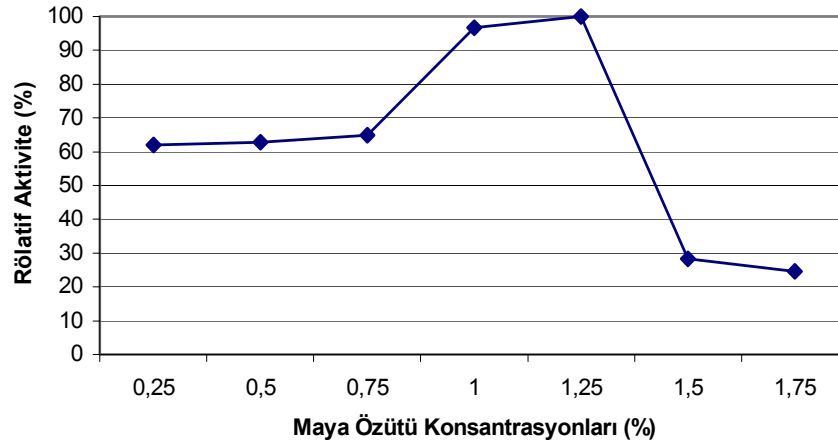
aktivitesi gösterdiğini belirlemiştir. Elde edilen bulgular literatürle uyum içindedir.

Tablo 1. Farklı azot kaynaklarının *Bacillus sp* K-12'nin amilaz aktivitesi üzerine etkisi

Azot Kaynakları	Rölatif Aktivite (%)					
	12h	24h	36h	48h	60h	72h
Maya Özütü	36,56	60,07	74,45	100,00	68,27	66,48
Et Özütü	48,72	53,45	65,40	81,98	79,67	57,95
Pepton	55,05	60,31	52,85	68,73	70,20	76,62
Amonyum Sülfat	12,89	10,75	12,44	10,71	21,73	10,88

Enzim Üretimi Üzerine Farklı Maya Konsantrasyonlarının Etkisi

Amilaz aktivitesi üzerine farklı azot kaynaklarının etkisi araştırılmış ve maya özütü içeren kültür ortamında 48 saat inkübasyondan sonra en iyi amilaz aktivitesi elde edilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda maya özütü içeren (% 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5 ve 1.75) kültür ortamına *Bacillus sp.* K-12 suşu aşlanarak 48 saat inkübasyona bırakılmış ve rölatif aktivite değerleri incelenmiştir. Sonuç olarak % 0.25-0.75 maya özütü içeren ortamda amilaz aktivitesinin rölatif değerlerinde fazla bir değişim olmadığı (61.92- 64.80), % 1.0-1.25 maya özütü içeren kültür ortamında ise amilaz aktivitesinin rölatif değerlerinin (96.75-100) en iyi olduğu tespit edilmiştir. % 1.5 ve % 1.75 maya özütünün bulunduğu kültürde rölatif aktivitede (% 28.24-24.51) azalma gözlenmiştir (Şekil 3).



Şekil 3. *Bacillus sp.* K-12 suşundan elde edilen amilaz enziminin rölatif aktivitesi üzerine farklı maya özütü konsantrasyonlarının etkisi

SONUÇ

Zeytinli Ilicası (Kahramanmaraş) alınan su ve toprak örneklerinden 65 *Bacillus sp.* suşu izole edilerek, bu suşların amilaz enzimi üretme yetenekleri araştırılmıştır. Farklı pH ve sıcaklıklarda bu suşların gösterdikleri aktivite değerleri incelenerek tek bir suş seçilmiş ve bu suşa *Bacillus sp* K-12 adı verilmiştir. Seçilen *Bacillus sp.* K-12 suşu farklı periyotlarda üretilerek (12, 24, 36, 48, 60 ve 72 saat), pH 9.5'da ve 42 °C de amilaz enzimi üretme yeteneği ile bu enzim üzerine pepton, maya, et özütü ve amonyum sülfat gibi farklı azot kaynaklarının etkileri araştırılmıştır. *Bacillus sp.* K-12 suşunda amilaz üretimi için en iyi rölatif aktivite 48 saat sonra maya özütü içeren kültür ortamında bulunmuştur. Bu verilerden yola çıkarak maya özütü konsantrasyonu artırılmış en iyi rölatif aktivitenin %1-1.25 aralığında olduğu elde edilmiştir. İzolasyonu yapılan *Bacillus sp.* K-12 suşunun alkalifilik, termofil amilolitik olduğu bulunmuş olup, bu veriler diğer literatürlerle uyumluluk göstermiştir.

Elde edilen veriler bize üretilmesi son derece kısa zaman alan ve üretim koşulları çok ucuz olan *Bacillus sp.* suşlarının, doğal kaynaklar açısından oldukça zengin bir bölge olan Kahramanmaraş'dan izolasyonlarının yapılarak endüstrinin uygun alanlarına büyük ölçüde katkıda bulunacağını göstermiştir. Bu türlü araştırmaların Kahramanmaraş'da daha da genişletilerek çalışılması ülkenin doğal zenginlikleri ve ekonomisi açısından önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

- Aıra, S., K., Kılal, A., Imanaka, 1983. Cloning and Expression of Thermostable α -Amylase Gene from *Bacillus stearothermophilus* in *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus subtilis*. Applied and Environmental Microbiology, 1059-1065.
- Anonim, 1988. Handbook of Amylases Related Enzymes. Edited by the Amylase Research Society of Japan, Permgan Press Oxford.
- Bailey, J.E., D.F., Ollis, 1987. Biochemical Engineering Fundamentals: International Student Edition, Chapter 1-7, p. 39-50.
- Bajpai, P., K.P., Bajpai, 1987. High- Temperature Alkaline α -Amylase from *Bacillus licheniformis* TCRDC-B13. Biotechnology and Bioengineeria. Vol. 33, 72-78.
- Boyer, F.W., M.B. Ingle, G.D. Mercer, 1972. Starch 31,66.
- Collms, C.H., P.M. Lyne, J.M. Grange, 1989. Microbiological Methods. Butterworths & Co. Ltd., London, pp. 410.
- Hols, P., T. Feram, D. Garmyn, N. Bernard, J. Delcour, 1994. Use of Expression Secretion Signals and Vector Free Stable Chromosomal Integration In Engineering of *Lactobacillus planetarium* for Alfa Amylase and Levanase Expression. App. And Environ. Microbial. 60(5) : 1401-1413.
- Horikoshi, K., 1996. Alkaliphiles-From An Industrial Point of View. FEMS Microbiology Reviews 18. 259-270.
- Jin, F., X. Cheng, Y. Shi, C. Zhang, 1990. Isolation of New Thermophilic Aerobic Bacteria Which Produce Thermostable α -Amylase. J. Gen. Appl. Microbiol. 36, 415-424.

- Kıran, Ö.E., 2001. Doğal Ortamdan İzole Edilen Alkalifilik *Bacillus sp.* Suşlarında α -Amilaz Üretimi, Enzimin pH ve Sıcaklık Stabilitesinin Araştırılması. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Adana. (Yayınlanmamış)
- Lennette, E.H., A. Balows, J.W.Jr Hausler, J.H. Shadomy, 1985. Manual of Clinical Microbiology. Vol. 4 Amerika. 1149p.
- Lin, L.L., C.C. Chyau, W.H. Hsu, 1998. Production and Properties of a Raw-Starch Degrading Amylase from The Thermophilic and Alkaliphilic *Bacillus sp.* TS-23. Biotechnol. Appl. Biochem 28, 61- 68.
- Rao, B.M., M.A. Tanksale, S.M. Ghatge, V.V. Deshpande, 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. Microbiology and Molecular Biology Reviews. P : 597- 635.
- Sarıkaya, E., 1995. α -Amilaz Üreten Bazı *Bacillus* Suşlarının Gelişme Parametreleri, Enzim Özellik Ve Üretim Koşullarının Optimizasyonu. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora tezi 2s.
- Tarakçıoğlu, Y., 1979. An Amylase Producing Maltotiose from *Bacillus subtilis*. Agric. Biol. Chem. 49 (4), 1901-1907.
- Wiseman, A., 1987. Handbook of Enzymes Biotechnology. Second Edition. Chapter 3. The Application of Enzymes in Industry p. 274-373.