



Production and characterization of α -amylase from lactic acid bacteria isolated with whey

İhsan REZZUKOĞLU², Sema AGÜLOĞLU FİNCAN^{*1}, Barış ENEZ³

¹Department of Molecular Biology and Genetics, Faculty of Science, Dicle University, Diyarbakır, Turkey

²Department of Biology, Faculty of Science, Dicle University, Diyarbakır, Turkey

³Veterinary Health Department, Vocational School of Technical Sciences, Bingöl University, Bingöl, Turkey

Abstract

In this study, lactic acid bacteria were isolated from whey, to provide economic and biotechnological benefits. These bacteria which were isolated were described with the aid of morphological, physiological, and biochemical tests and named as PS-2A, PS-3B, PS-3C and PS-4B. And then, by investigating extracellular α -amylase production capabilities of these bacteria, PS-2A bacterium which showed the best activity was selected.

It was found that bacterium PS-2A was round-like, Gram positive, catalase negative, active. For produce the PS-2A; the optimum incubation time as 16th hours, optimum pH as 7.0 and optimum incubation temperature was determined as 35°C. It was found that PS-2A conducted its optimum α -amylase activity at the 20th hour in LB medium performed, and optimum pH and temperature values of α -amylase activity were 7.0 and 35°C, respectively.

In carbon sources; 1% soluble starch was increased the α -amylase production 2 fold. In nitrogen sources; it was determined that with 1% ammonium chlorid the α -amylase production was increased.

Key words: whey, lactic acid bacteria, α -amylase, production, characterization

----- * -----

Peynir altı suyundan izole edilen laktik asit bakterisinden α -amilaz üretimi ve karakterizasyonu

Özet

Bu çalışmada, peynir altı suyundan, ekonomik ve biyoteknolojik olarak fayda sağlamak amacıyla laktik asit bakterileri izole edildi. İzole edilen bakteriler morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler yardımıyla tanımlandı. Bakterilerin ekstraselüler α -amilaz üretme yeteneği araştırıldı. En iyi α -amilaz aktivitesi gösteren *Lactococcus* sp. PS-2A ile çalışmalara devam edildi.

Lactococcus sp. PS-2A bakterisinin kok (yuvarlak) şekilli, Gram pozitif, katalaz negatif, hareketli olduğu belirlendi. Bakteri üremesinin optimum koşulları pH 7.0, 35°C ve 16. saat olarak tespit edildi. *Lactococcus* sp. PS-2A'nın en yüksek α -amilaz aktivitesini; LB besi yerinde, pH 7.0, 35°C ve 20. saatte gösterdiği belirlendi. Karbon kaynaklarında %1'lik çözünebilir nişastanın α -amilaz üretimini iki kat arttırdığı saptandı. Azot kaynaklarından %1'lik amonyum klorür ile α -amilaz üretiminin arttığı tespit edildi.

Anahtar kelimeler: peynir altı suyu, laktik asit bakterisi, α -amilaz, üretim, karakterizasyon

1. Giriş

Laktik asit bakterileri (LAB), karbonhidrat fermentasyonunun temel metaboliti olarak laktik asit üreten ve spor oluşturmeyen Gram pozitif bakterilerin geniş bir grubunu teşkil ederler. LAB, mayalanmış süt ürünleri, ekmek ve tahıllar ve sebzeleri içeren değerli gıdaların üretimiyle ilişkili olarak; insanoğlu için en önemli mikroorganizma gruplarından biridir (Kim ve ark. 2008) (Yücel Şengün 2011) (Souza ve ark 2018). Günümüzde en tipik LAB mensupları; *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* ve *Pediococcus* cinsleridir (Ammor ve ark. 2007)

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +905322678815; Fax.: +905322678815; E-mail: semaagul@dicle.edu.tr

Laktokoklar; fermente edilmiş yiyeceklerin (peynir gibi) imalatında kullanılmalarından dolayı laktik asit bakterilerinin en önemli grubudur. Çoğunlukla üremeleri sırasında asidik koşullar sayesinde oluşmuş proteince zengin ürünlerin hızlı bozulmasını engellemeye yardımcı olurlar. Bakteriyofaj dirençliliği ve bakteriyosin üretme yeteneği gibi özelliklere sahiptirler (Ayad ve ark. 2002). Süt ve peynir endüstrilerinin bir yan ürünü olan peyniraltı suyu süt proteinlerinin yaklaşık %20'sini içeren, peynir üretimi sırasında oluşan bir yan üründür (Yerlikaya ve ark. 2010). Peynir altı suyu veya bileşenleri; tarımsal gübre ve hayvan yemi olarak kullanımının yanı sıra, çeşitli gıda, kozmetik ve eczacılık ürünlerini de içinde barındırmaktadır (Marek ve ark. 2004).

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmekle birlikte bir kısmı da bitkisel ve hayvansal kaynaklardan sağlanmaktadır (Agüloğlu ve ark., 2014) (Gupta ve ark., 2003). α -Amilaz (1,4- α -D-glucanohydrolase; EC 3.2.1.1), bira yapımı, ekmekçilik, tekstil, kağıt ve deterjan gibi çok sayıda endüstriyel işlemlerde kullanılabilen, biyoprotein üretiminde ve nişastanın fermentasyonunda önemli bir yer tutan en önemli endüstriyel enzimlerden biridir (Agüloğlu ve Enez 2014), (Liu ve Xu 2008), (Ortakaya ve ark., 2017).

Çalışmamızda endüstriyel atık su olarak kabul edilen ve yeterince değerlendirilmeyen peynir altı suyundan laktik asit bakterileri izolasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirilerek endüstriyel öneme sahip α -amilaz üretme yetenekleri saptandı. En yüksek α -amilaz üretme yeteneğine sahip süştan elde edilen α -amilazın karakterizasyonu yapılarak, peynir altı suyunun değerlendirilmesi için imkan sağlanması amaçlandı.

2. Materyal ve yöntem

2.1 Biyolojik Materyal

Peynir altı suyu örneklerinden izole edilen *Lactococcus* sp. PS-2A kullanılmıştır.

2.2 Metot

2.2.1 *Lactococcus* sp. PS-2A'nın izolasyonu

Laktik asit bakterisi elde etmek amacıyla 10 ml peynir altı suyu 90 ml steril su içeren erlenlere aktararak 10^{-1} lik süspansiyon hale getirildi ve benzer şekilde ardışık transferler yapılarak 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} 'lik dilüsyonlar sağlandı. Tek koloni elde etmek amacıyla seri sulandırma yapılan örneklerden MRS agar besi yerine yayma ekim yapıldı ve 37°C 'de 1 gece inkübasyona bırakıldı.

Biyokimyasal Testler

Seçilen farklı morfolojik görünüme sahip bakteri örneğini teşhis edebilmek amacı ile biyokimyasal testler yapıldı.

Sıcaklığın Mikroorganizma Gelişimi Üzerine Etkisi

25 ml Luria Broth (LB) sıvı besi yeri hazırlanarak 100 ml'lik erlenmayerde otoklavlandı ve gecelik taze kültürden 1 ml bakteri ekimi yapıldı; 20°C 'den başlayarak 5°C artırılarak 60°C 'ye kadar 120 rpm'de çalkalamalı su banyosunda inkübe edildi.

pH'nin Mikroorganizma Gelişimi Üzerine Etkisi

25 ml LB sıvı besi yerleri pH'ları 4.0-10.0 olacak şekilde ayarlanarak otoklavlandı ve taze kültürden 1 ml ekim yapıldı. Bakterinin optimum sıcaklığında 120 rpm'de çalkalamalı su banyosunda inkübe edildi.

Inkübasyon Süresinin Mikroorganizma Gelişimi Üzerine Etkisi

25 ml LB sıvı besi yerine gecelik taze kültürden 1 ml ekim yapılarak bakterinin optimum pH ve sıcaklığında 120 rpm'de çalkalamalı su banyosunda üretilen 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36 ve 48. saatlerde alınan bakteri örneklerinin 600 nm'de spektrofotometrede absorbansı ölçüldü.

2.2.2 Amilaz Aktivite Tayini

Amilaz aktivitesi tayini Bernfeld'e göre yapıldı. (Bernfeld 1955)

2.2.3 Protein Miktar Tayini

Protein miktarı Lowry yöntemine göre hesaplandı (Lowry 1951).

2.2.4 α -Amilaz Üretimi Üzerine Farklı Parametrelerin Etkisi

Farklı Besi Yerlerinin α -Amilaz Üzerine Etkisi

Farklı besi yerlerinin α -amilaz üretimine etkisini belirlemek amacıyla katı besi yerinde üretilen bakteri suşu farklı besi yerlerine (MRS, NB, LB ve BM) aktarıldı ve 1 gece üretilti.

α -Amilaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Sıcaklığın α -amilaz üretimine etkisini incelemek için 20°C 'den 60°C 'ye kadar 5°C 'lik artan sıcaklık aralıklarında enzim aktivitesi ölçüldü.

α -Amilaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

Substrat olarak kullandığımız nişasta % 0.5'lik olacak şekilde sırasıyla sitrik asit (0.1 M pH 4.0, 5.0 ve 6.0), Tris-HCl (0.1 M pH 7.0, 8.0 ve 9.0) ve glisin/NaOH (0.1 M pH 9.0, 10.0) tamponları içerisinde hazırlandı. Daha sonra optimum sıcaklıkta α -amilaz aktivitesi ölçüldü.

Inkübasyon Süresinin α -Amilaz Üretimine Etkisi

Üretim süresinin α -amilaz üretimine etkisini görmek için üreme ortamının değişik zaman periyotlarında (4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36 ve 48. saat) optimum sıcaklık ve pH'da üretilen bakteri kültüründen elde edilen süpernatant enzim kaynağı olarak kullanılıp Bernfeld yöntemine göre aktivitesi ölçüldü.

α -Amilaz Üretimi Üzerine Karbon ve Azot Kaynaklarının Etkisi

LB besi yerlerinde %1 konsantrasyonda olacak şekilde karbon ve azot kaynakları tek tek ilave edildi, daha sonra bakteri ekimi yapıldı. α -Amilaz üretimi için optimum üretim zamanı, sıcaklık ve pH'da inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda üst sıvılardan α -amilaz aktivite tayini yapıldı..

3. Bulgular

3.1 Bakteri İzolasyonu ve İdentifikasyonu

3.1.1 *Lactococcus sp. PS-2A'nın İzolasyonu*

Laktik asit bakterileri için selektif besi yeri olan Peynir altı suyu kullanılarak laktik asit bakterisi elde etmek amacıyla MRS agara yayma ekim yapılan örneklerden sonra MRS besi yerinde tek tek düşmüş farklı morfolojik görünüme sahip 4 çeşit koloni seçilerek bu koloniler PS-2A, PS-3B, PS-3C ve PS-4B olarak isimlendirildi. Seçilen koloniler NB agar besi yerine çizgi şeklinde ekim yapıldı. Üretilen bakteri kültürlerinin hepsinin; <1 mm, kok şeklinde, düzgün görünümlü, pigment oluşturmeyen kolonilerden oluştuğu tespit edildi. Amilaz varlığı tespit edildikten sonra PS-2A'yı tanımlamaya yönelik biyokimyasal testler yapıldı. Bu izolatlardan yapılan biyokimyasal testlerde nişastalı agarda en iyi amilaz aktivitesine sahip olan izolatın PS-2A olduğu belirlendi.

3.1.2 *Lactococcus sp. PS-2A'nın İdentifikasyonu*

3.1.2.1 *Biyokimyasal Testler:*

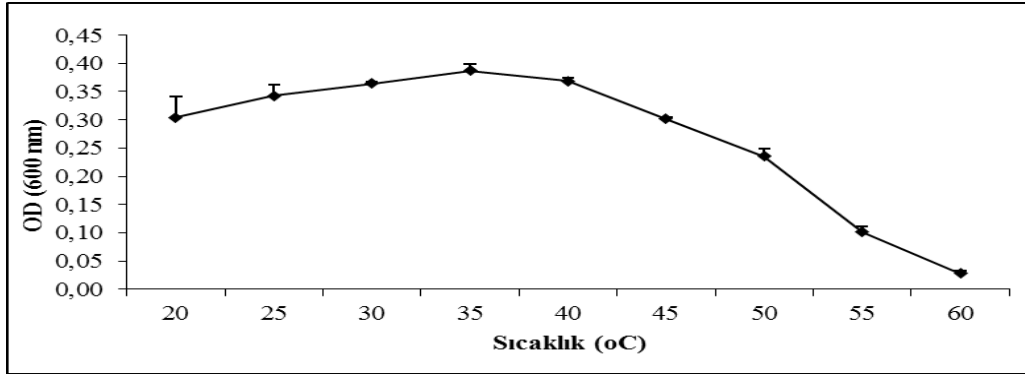
Seçilen PS-2A, PS-3B, PS-3C ve PS-4B bakteri örneklerini teşhis edebilmek amacı ile nişasta, jelatin, katalaz, kazein, üreaz ve lipaz hidrolizi ile hareket, indol, fosfataz, hemoliz gibi biyokimyasal testler yapıldı. Bu bakterilerin birbirleriyle ve laktik asit bakterilerinden Laktokokus ile olan benzerlikleri ve farklılıkları Tablo 1'de verilmektedir. Bu izolatlardan yapılan biyokimyasal testlerde nişastalı agarda en iyi amilaz aktivitesine sahip olan izolatın PS-2A olduğu belirlendi. Daha sonraki çalışma basamaklarında bu izolat kullanıldı.

Tablo 1. Laktik Asit Bakterilerinin, Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri (Kav ve ark. 2008, Çağırğan 2004, Evans ve ark 2006, Ravelo ve ark. 2001, Sharifiyazdi 2010, Vendrel ve ark. 2006, Kubilay ve ark. 2005, Soltani ve ark. 2008) + pozitif sonuç – negatif sonuç ND belirsiz (d) değişken

Özellikleri	PS-2A	PS-3B	PS-3C	PS-4B	<i>Lactococcus</i>
Gram	+	+	+	+	+
Koloni büyüklüğü	< 1 mm	< 1 mm	< 1 mm	< 1 mm	< 1 mm
Koloni morfolojisi	kok	kok	kok	kok	kok
Hareketlilik	-	-	-	-	-
Pigment üretimi	-	-	-	-	-
Katalaz	-	-	-	-	-
Hemoliz	-	+	-	-	+
İndol	+	+	-	+	(d)
Nutrient Agar	+	+	+	+	ND
Fosfataz	+	+	+	+	+
Şeker (Glukoz, laktoz, sukroz)	-	-	-	-	(d)
EMB	+	+	-	+	ND
Caso Agar	+	+	+	+	ND
Nişasta+NB	+	+	+	+	ND
Büyüme					
Sıcaklık aralığı	20-60 °C	20-60 °C	20-60 °C	20-60 °C	10-45°C
pH aralığı	4-10	4-10	4-10	4-10	4.5-9.6
Hidroliz					
Nişasta	+	+	-	+	ND
Kazein	+	+	+	+	ND
Jelatin	-	-	-	-	ND
Aktivite					
Lipaz	+	+	-	+	ND
Üreaz	+	-	-	+	-
α -amilaz	+	+	+	+	ND

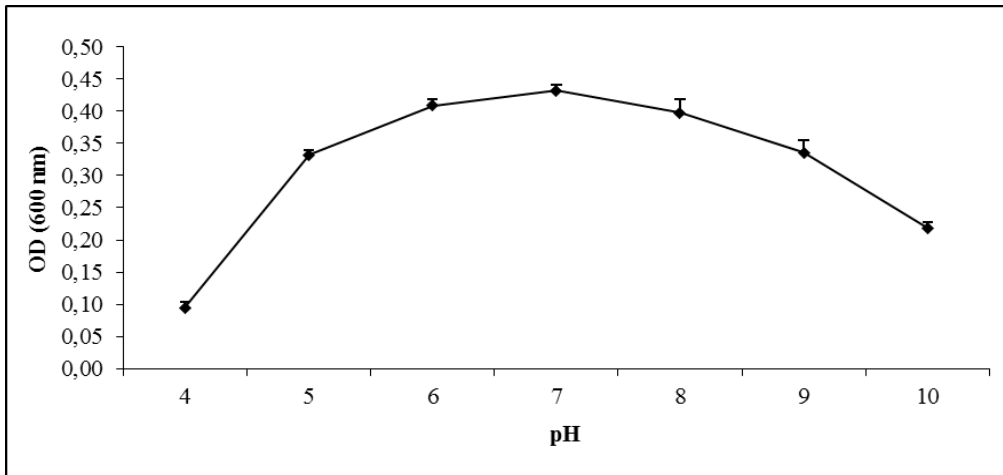
3.2. Sıcaklık, pH ve İnkübasyon Süresinin Mikroorganizma Gelişimi Üzerine Etkisi

Sıcaklığın mikroorganizma gelişimi üzerine etkisini belirlemek için; 20°C'den başlayarak 5°C arttırılarak 60°C'ye kadar üretilen *Lactococcus sp.* PS-2A izolatının her bir sıcaklık için spektrofotometrede 600 nm'de absorbansı ölçüldü. Şekil 1'de görüldüğü gibi *Lactococcus sp.* PS-2A 35°C'de maksimum büyüme elde edildi.



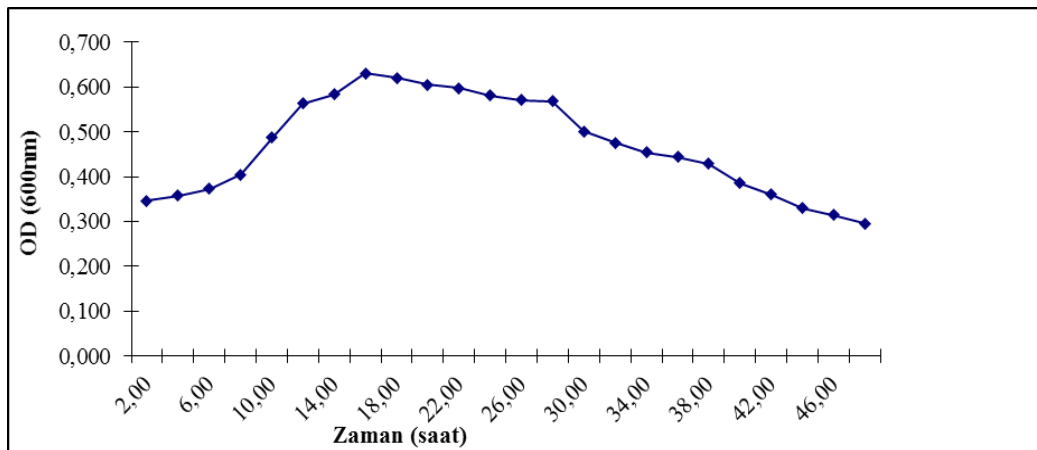
Şekil 1 Mikroorganizma Gelişimi Üzerine Sıcaklık Etkisi

Mikroorganizma gelişimi üzerine pH etkisini belirlemek için, elde edilen *Lactococcus sp.* PS-2A izolatı LB besi ortamında farklı pH'lara sahip besi yerlerindeki bakteri üremesi ölçüldü ve pH 7.0'te maksimum değerde olduğu belirlendi (Şekil 2).



Şekil 2 Mikroorganizma Gelişimi Üzerine pH Etkisi

4- 48. saatlerde üretilen 4. saatten itibaren artarak 16. saatte maksimuma ulaşan ve 36. saatten itibaren de düşüş gösteren bir büyüme grafiğine sahip olduğu görüldü. (Şekil 3)

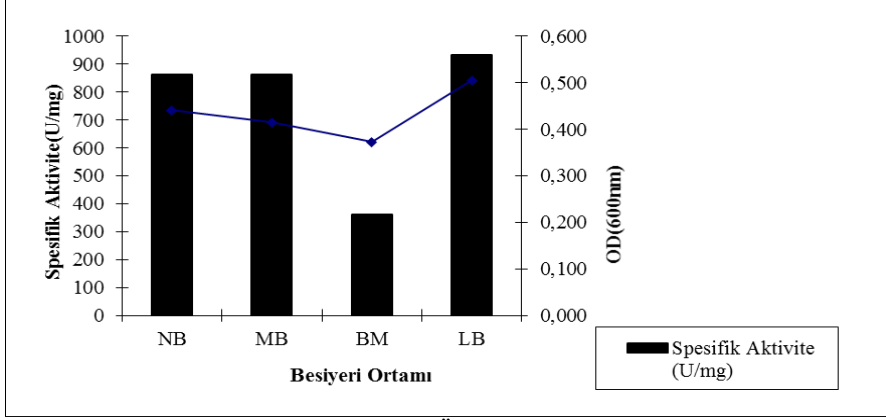


Şekil 3 İnkübasyon Süresinin Mikroorganizma Gelişimi Üzerine Etkisi

3.3 α -Amilaz Üretimine Çeşitli Parametrelerin Etkisi

3.3.1 Farklı Besi Yerlerinin α -Amilaz Üretimine Etkisi

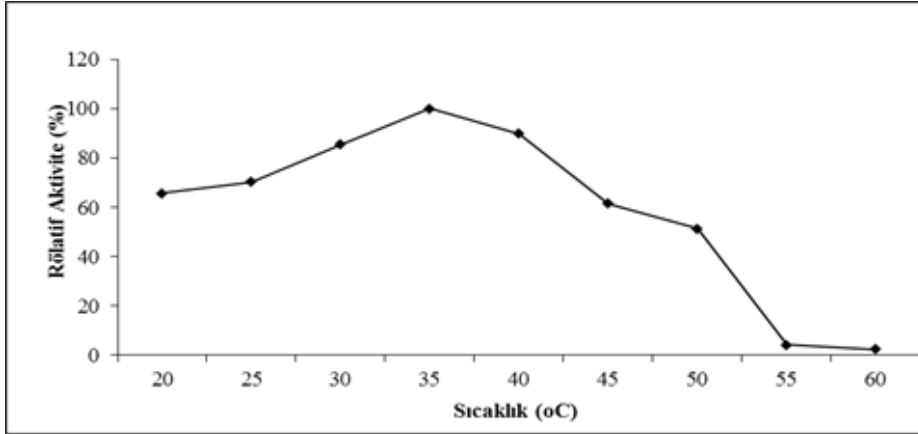
Lactococcus sp. PS-2A'dan en iyi α -amilaz üretimi LB besiyerinde elde edildi. (Şekil 4).



Şekil 4 Farklı Besi Yerlerinin α -Amilaz Üretimine Etkisi

3.3.2 α -Amilaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

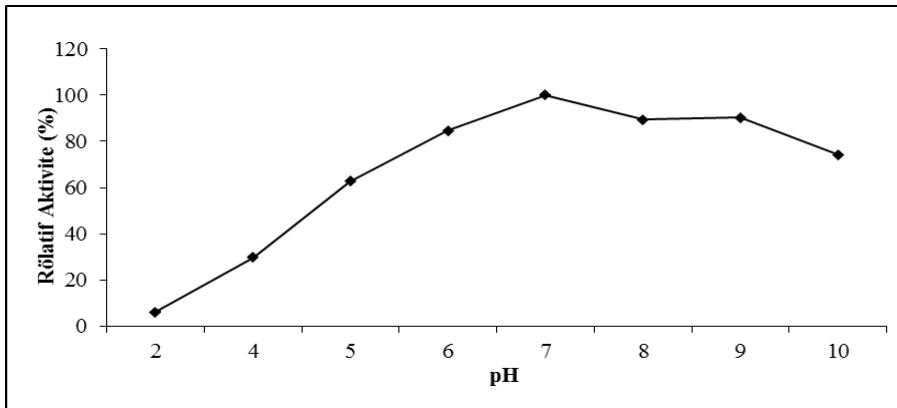
20-60°C aralığında yapılan sıcaklık tespitinde enzimin maksimum üretim gösterdiği sıcaklığın 35°C olduğu belirlendi. (Şekil 5)



Şekil 5 α -Amilaz Üretimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

3.3.3 α -Amilaz Aktivitesi pH'nın Etkisi

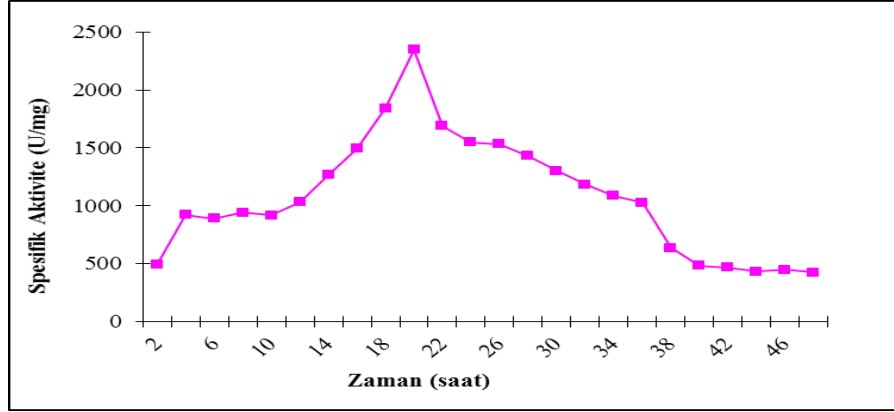
Bakteri optimum koşullarda üretilip pH 4-10.0 aralığında yapılan incelemede α -amilaz aktivitesinin en fazla pH 7.0 de olduğu tespit edildi (Şekil 6)



Şekil 6 α -Amilaz Üretimi Üzerine pH'nın Etkisi

3.3.4 İnkübasyon Süresinin α -Amilaz Üretimine Etkisi

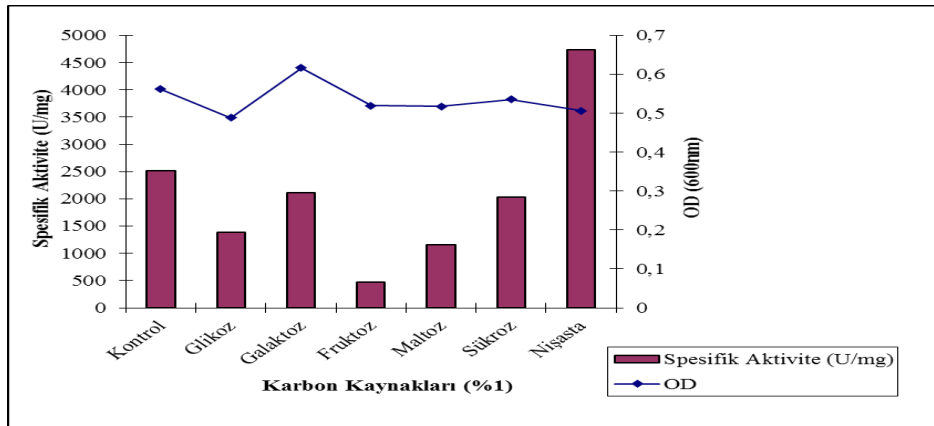
İnkübasyon süresinin α -amilaz üretimi üzerine etkisini incelemek için değişik zaman periyodlarında alınan örneklerde *Lactococcus sp.* PS-2A izolatının 20. saatte en yüksek α -amilaz aktivitesine ulaştığı tespit edildi (Şekil 7).



Şekil 7 İnkübasyon Süresinin α -Amilaz Üretimine Etkisi

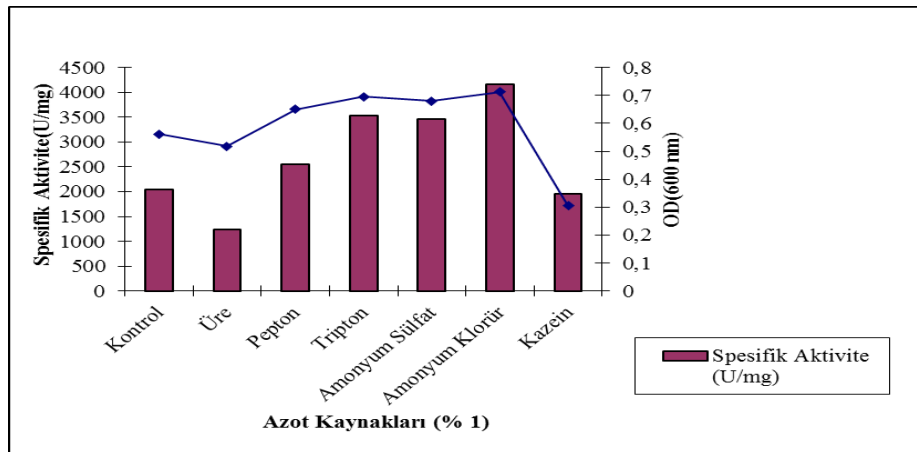
3.3.5 α -Amilaz Üretimi Üzerine Karbon ve Azot Kaynaklarının Etkisi

Çalışılan karbon kaynaklarından %1'lik çözünebilir nişastanın amilaz üretimini 2 kat arttırdığı, galaktoz ve sukrozun eklenmesiyle kontrole yakın değer elde edildiği, glukoz, fruktoz ve maltoz ilavesiyle de enzim üretimindeki azalma Şekil 8'de gösterilmektedir. Çözünebilir nişasta α -amilaz üretimi için en iyi karbon kaynağı olarak belirlendi.



Şekil 8 α -Amilaz Üretimi Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisi

Azot kaynaklarından %1'lik pepton, tripton, amonyum sülfat ve amonyum klorür ile α -amilaz üretiminin kontrole göre arttığı, üre ve kazein ilavesi ile enzim üretiminin azaldığı Şekil 9'da gösterilmektedir. α -Amilaz üretimi için en uygun azot kaynağının amonyum klorür olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 9 α -Amilaz Üretimi Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi

4. Sonuçlar ve tartışma

Peynir altı suyu; süt ürünlerinin yapımı sırasında ortaya çıkan, sıvı atık sayılıp değerlendirilmeden kanalizasyonlara ve akarsulara verildiğinde ciddi çevre ve sağlık problemlerine neden olan, yüksek organik içeriğe sahip bir yan üründür. Aynı zamanda gelişen teknoloji ile insan ve hayvan kullanımı için bir besin kaynağı olarak kullanılabilirdiği ve endüstriyel önemi olan enzimleri üreten mikroorganizmaların üremesi için çok uygun bir ortam olduğu için peynir altı suyu örneklerinden bakteri izolasyonu gerçekleştirildi.

Laktik asit bakterileri için selektif besi yeri olan MRS agarda çoğaltılıp, buradan seçilen PS-2A, PS-3B, PS-3C ve PS-4B'nin morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testleri yapıldı ve <1 mm, kok şeklinde, düzgün görümlü, pigment oluşturmeyen kolonilerden oluştukları tespit edildi. Bu bakteri örneklerinden hazırlanan preparatlardan mikroskop altında Gram boyama özellikleri ve morfolojik özellikleri incelendiğinde Gram pozitif ve kok şeklinde oldukları, laktik asit bakterileri için selektif besi yeri olan MRS agarda üremelerinden ve Gram boyanma özellikleriyle koloni şekillerinden dolayı *Lactococcus* cinsinin özellikleriyle benzerlik gösterdikleri için *Lactococcus* oldukları belirlendi.

Zamfir ve ark. 2006, ham ve fermente edilmiş süt, peynir gibi kaynaklardan topladıkları 110 örnekten laktik asit bakterisi izolasyonu yapmış ve buradan elde ettikleri 599 izolatın Gram boyamasını, katalaz aktivitesini ve morfolojisini test etmişlerdir. İzolatlardan çoğunun *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc spp.*, *Enterococcus spp.* ve *E. saccharominimus* türleri olduklarını tespit etmişlerdir. Adnan ve Tan 2007, keçi sütüyle yapılan tapai ve tempoyak besinlerinden laktik asit bakterisi izolasyonu yapmışlar. 126 suş izole ederek Gram boyama ve katalaz aktivitelerini saptamışlardır. Bu suşlardan yedi tanesini tanımlayıp ikisinin laktobasil, birinin de laktokok olduğunu belirlemişlerdir.

Sengun ve ark. 2009, yoğurt ve buğday unundan yapılan "Tarhana" dan MRS, M17 ve SBM besi yerlerini kullanarak 226 Gram pozitif ve katalaz negatif bakteri izole etmişlerdir. İzolatları fenotipik ve genotipik birçok yöntem kullanarak tanımlamış ve gruplandırmışlardır. Yaptığımız çalışmada; uygun besi ortamında pH 4.0-10.0 arasında pH denemeleri gerçekleştirilerek, optimum üreme pH'sının 7.0 olduğu, 20°C-60°C arasında sıcaklık denemelerinde ise optimum üreme sıcaklığının 35°C olduğu ve 4-48 saat arası inkübasyon sonrası 16. saatte bakterinin optimum üreme gösterdiği belirlendi. Çalışmamız yukarıda belirtilen çalışmalarda *Lactobacillus* ve *Lactococcus*'ların belirtilen optimum üretim sıcaklıklarıyla benzer özellik göstermektedir.

Badis ve ark. 2004, 4 farklı Cezayir ırkı keçilerin sütünden izole ettikleri 725 laktik asit bakterisini karakterize etmişlerdir. 30-45°C inkübasyon sonrasında birinci *Lactococcus* 'ları; Elliker besi yerinde, 30°C'de, 72 saat, aerobik ortamda üretmişlerdir. Sıcaklık, mikroorganizmanın büyümesi ve buna bağlı olarak α -amilaz üretimiyle ilişkilidir. Çoğu araştırmacı tarafından bakterilerde optimum bakteri büyümesi ve α -amilaz üretimi için geniş sıcaklık aralığı (35-80°C) verilmiştir (Asgher 2007). Konsula ve Kyriakides tarafından taze koyun sütünden izole edilen *B.subtilis*'in maksimum ekstrasellüler α -amilaz üretiminin 40°C'de olduğu belirtilmiştir. Elde ettiğimiz *Lactococcus* sp. PS-2A'nın ürettiği ekstrasellüler α -amilaz enziminin optimizasyonu yapılarak, optimum sıcaklık 35°C olarak tespit edilmiştir. Konsula ve Kyriakides 2004, taze koyun sütünden izole ettikleri ılımlı termofilik *Bacillus subtilis* suşundan elde ettikleri ekstrasellüler termostabil α -amilazın nişasta hidrolizine etkisini araştırmışlardır. Maksimum amilaz üretiminin düşük nişasta içeren ortamda ve 40°C'de elde etmişlerdir.

Sanni ve ark. 2002, Nijerya'nın yöresel fermente edilmiş yiyeceklerinden, izole etmiş oldukları *L. plantarum* suşundan elde ettikleri α -amilazın optimum pH 6.0 ve 65°C'de, *L. fermentum* K9 suşu için ise pH 4.0 ve 45°C maksimum aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir. Ekstrasellüler α -amilazların optimum pH'sı 3.0-10.0 arasında değişmektedir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz bakterinin ekstrasellüler α -amilazının nötral koşullarda maksimum aktivite göstermesi endüstriyel işlemlerde kullanılabilir özelliğinin olduğunu göstermektedir. Enzimler modern deterjanların içeriğinde bulunmaktadır. Ticari olarak kullanılan pek çok *Bacillus* suşunda bakteri üretimi ve ekstrasellüler α -amilaz üretimi için optimum pH, 6.0 ve 9.0 arasında verilmektedir (Burhan ve ark. 2003), (Castro ve Bull 1992), (Jin ve Patel 1999). Çalışmamızda da *Lactococcus* sp. PS-2A bakterisi optimum büyümeyi ve maksimum ekstrasellüler α -amilaz üretimini pH 7.0'de gerçekleştirmiştir.

Değerlendirilmeden doğaya bırakılan çok ciddi çevre ve sağlık sorunlarına yol açabilen peynir altı suyundan izole ettiğimiz *Lactococcus* sp. PS-2A'dan optimum koşullar sağlanarak büyük endüstriyel önemi olan α -amilaz kolay ve ekonomik proselerle üretilerek optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Böylece yapılan bu çalışma ile peynir altı suyundan ekonomik ve biyoteknolojik olarak fayda sağlanabileceği ortaya konmuştur. Elde ettiğimiz α -amilaz 35°C'de maksimum aktivite gösterdiği için düşük ısıda yıkama işlemini gerçekleştiren çamaşır makinelerinde kullanılan deterjanların içeriğinde kullanılabilir. Nötral pH'da maksimum aktivite vermesi ise kuru temizlemede kullanılabilir özellikte olduğunu göstermektedir.

Kaynaklar

- Adnan, A. F. M., Tan, G. K. P. (2007). Isolation of lactic acid bacteria from Malaysian foods and assessment of the isolates for industrial potential. *Bioresource Technology*, 98, 1380–1385.
- Agüloğlu, S., Enez, B. (2014). Purification, and characterization of α -amylase from thermophilic *Geobacillus stearothermophilus*. *Starch/Stärke* 66, 182–189

- Agüloğlu Fincan, S., Enez, B. Ozdemir, S., Matman Bekler, F. (2014). Purification and characterization of thermostable α -amylase from thermophilic *Anoxybacillus flavithermus*. *Carbohydrate Polymers*, 102, 144-150.
- Ammor, M. S., Florez, A. B., Mayo, B. (2007). Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology*, 24:559–570.
- Asgher, M., Asad, M. J., Rahma, S.U., Legge, R.L. (2007). A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *Journal of Food Engineering*, 79, 950–955.
- Ayad, E.H.E., Verheul, A., Wouters, J.T.M., Smit, G. (2002). Antimicrobial-producing wild *lactococci* isolated from artisanal and non-dairy origins. *International Dairy Journal*, 12, 145–150.
- Badis, A., Guetarni, D., Boudjema, B. M., Henni, D.E., Kihal, M. (2004). Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiology*, 21, 579–588.
- Bernfeld, P. (1955). *Enzymes Carbohydrate Metabolism*. In *Methods In Enzymology* Academic Press, 17, 149-158.
- Burhan, A., Nisa, U., Gokhan, C., Omer, C., Ashabil, A., & Osman, G. (2003). Enzymatic properties of a novel thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkalophilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. *Process Biochemistry*, 38, 1397–1403.
- Castro, P. M. L., Hayter, P. M., Ison, A. P., Bull, A. T. (1992). Application of statistical design to the optimization of culture medium for recombinant interferon-gamma production by Chinese hamster ovary cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38, 84–90.
- Çağırğan, H. (2004). Biotyping of *Lactococcus garvieae* isolated from Turkey. *Ege University Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, 21, 267–269.
- Evans, J. J., Pasnik, D. J., Klesius, P. H., Al-Ablani, S. (2006). First report of *Streptococcus agalactiae* and *Lactococcus garvieae* from a wild bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 42, 561–569.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., Chauhan, B. (2003). Microbial α -amylase: biotechnological perspective. *Enzyme and Microbial Technology*, 38: 1599–1616.
- Jin, B., Van-Leeuwen, J. H., Patel, B. (1999). Mycelial morphology and fungal protein production from starch processing wastewater in submerged cultures of *Aspergillus oryzae*. *Process Biochemistry*, 34, 335–340.
- Kav, K., Erganiş, O. (2007). Konya bölgesinde bulunan gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) çiftliklerinden *Lactococcus garvieae* izolasyonu, identifikasyonu ve fenotipik özelliklerinin belirlenmesi. *Veterinerlik Bilimleri Dergisi*, 23, 7–17.
- Kim, J., Sunako, M., Ono, H. Murooka, Y., Fukusaki, E., Yamashita, M. (2008). Characterization of gene encoding amylopullulanase from plant-originated lactic acid bacterium, *Lactobacillus plantarum* L137. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106, 449–459.
- Konsula, Z., Liakopoulou-Kyriakides, M. (2004). Hydrolysis of starches by the action of an α -amylase from *Bacillus subtilis*. *Process Biochemistry*, 39, 1745–1749.
- Kubilay, A., Altun, S., Uluköy, G., Diler, Ö. (2005). *Lactococcus garvieae* suşlarının antimikrobiyal duyarlılıklarının belirlenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 1, 39-48.
- Liu, X. D. Xu, Y. (2007). A novel raw starch digesting α -amylase from a newly isolated *Bacillus* sp. YX-1: purification and characterization. *Bioresource Technology*, 99, 4315–4320.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265–275.
- Marek, P., Nair, M. K. M., Hoagland, T., Venkitanarayanan, K. (2004). Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* O157:H7 in pasteurized Cheddar cheese whey. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 1–7.
- Ortakaya, V., Agüloğlu Fincan, S., Enez, B. (2017). α -Amylase from *Bacillus simplex*- production, characterization and partial purification. *Fresenius Environmental Bulletin*, 26, 4446-4455.
- Ravelo, C., B. Magarinos, Romalde, J. L., Toranzo, A. E. (2001). Conventional versus miniaturized systems for the phenotypic characterization of *Lactococcus garvieae* strains. *Bulletin European Association of Fish Pathologists*, 21, 136–144.
- Sanni, A.I., Morlon-Guyot, J., Guyot, J.P. (2002). New efficient amylase-producing strains of *Lactobacillus plantarum* and *L. fermentum* isolated from different Nigerian traditional fermented foods. *International Journal of Food Microbiology*, 72, 53–62.
- Sengun, I. Y., Nielsen D. S., Karapinar M., Jakobsen M. (2009). Identification of lactic acid bacteria isolated from arhana, a traditional Turkish fermented food. *International Journal of Food Microbiology*, 135, 105–111.
- Sharifiyazdi, H., Akhlaghi, M., Tabatabaei, M., Mostafavi Zadeh, S. M. (2010). Isolation and characterization of *Lactococcus garvieae* from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) cultured in Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 11, (4), 33.
- Soltani, M., Nikbakht, G.H., Ebrahimzadeh, H. A., Ahmadzadeh, N. (2008). Epizootic outbreaks of *Lactococcus garvieae* in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran. *Bulletin European Association of Fish Pathologists*, 28, 209–214.
- Souza, B.M. S., Borgonovi, T.F., Casarotti, S. N., Todorov, S. D., Penna, A.L.B. (2018). *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus fermentum* Strains Isolated from Mozzarella Cheese: Probiotic Potential, Safety, Acidifying Kinetic Parameters and Viability under Gastrointestinal Tract Conditions. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9406-y>.
- Vendrell, D., Balcázar, J. L., Ruiz-Zaruela, I., de Blas, I., Gironés, O., Múzquiz, J. L. (2006). *Lactococcus garvieae* in fish: A review. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 29, 177-198.
- Yerlikaya, O., Kınık, Ö., Akbulut, N. (2010). Peyniraltı Suyunun Fonksiyonel Özellikleri ve Peyniraltı Suyu Kullanılarak Üretilen Yeni Nesil Süt Ürünleri. *GIDA*, 35, 289–296.
- Yücel Şengün, İ. (2011). Lactic acid bacteria used in the production of fermented foods. *Biological Diversity and Conservation* 4, 42–53
- Zamfir, M., Vancanneyt, M., Makras, L., Vaningelgem, F., Lefebvre, K., Pot, B., Swings, J., De Vuyst, L. (2006). Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products. *Systematic and Applied Microbiology*, 29, 487–495..

(Received for publication 19 May 2018; The date of publication 15 August 2018)