

Toprak Kökenli *Miksobakteri* İzolatlarından Alfa-Amilaz Enzimi Üretimi ve Saflaştırılması

Melike Baran Ekinci¹  , Aynur Gül Karahan Çakmakçı² 

¹Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Mühendislik-Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Burdur

²Süleyman Demirel Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Isparta

Geliş Tarihi (Received): 20.10.2022, Kabul Tarihi (Accepted): 22.12.2022

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): melikebaran@mehmetakif.edu.tr (M. Baran Ekinci)

☎ 0 248 213 2706 📠 0 248 213 2704

ÖZ

Bu çalışmada farklı il (Antalya, Konya, Isparta) ve ilçelerden (Kulu, Şarkikaraağaç, Atabey) toplanan farklı habitatlara ait 28 toprak örneğinden 19 miksobakteri suşu izole edilmiştir. İzole edilen 19 miksobakteri arasında *Myxococcus* sp KK2'nin en yüksek α -amilaz aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Protein çöktürülmesi ile ilk uygulamada %40, 65 ve 80 amonyum sülfat konsantrasyonları, ikinci uygulamada ise %20, 40 ve 65 konsantrasyonları kullanılarak enzim saflığı artırılmıştır. Diyaliz ve jel filtrasyon yöntemleri kullanılarak ilk uygulamada elde edilen enzimin aktivitesi 883.27 U'ya ulaşırken enzim saflığı 28.35 kat artmıştır. İkinci uygulama ile ise enzim aktivitesi 1754.99 U olarak saptanmış ve enzim saflığı 810.24 kat artmıştır.

Anahtar Kelimeler: Miksobakteriler, *Myxococcus*, Enzim saflaştırma

Alpha-Amylase Production and Purification from Myxobacteria Isolates of Soil Origin

ABSTRACT

In this study, 19 myxobacteria strains were isolated from 28 soil samples in the different habitats. They were collected from different provinces (Antalya, Konya and Isparta) and their districts (Kulu, Şarkikaraağaç and Atabey). Among the 19 myxobacteria isolated, *Myxococcus* sp KK2 was determined to have the highest α -amylase activity. With protein precipitation, enzyme purity was increased by using 40, 65 and 80% ammonium sulfate concentrations in the first application, then 20, 40 and 65% concentrations in the second application. By using dialysis and gel filtration methods, the activity of the enzyme obtained in the first application reached 883.27 U while enzyme purity increased 28.35 times, and enzyme activity was 1754.99 U after the second application while enzyme purity increased 810.24 times.

Keywords: Myxobacteria, *Myxococcus*, Enzyme purification

GİRİŞ

Nişasta dünyada doğal olarak bulunan en yaygın polisakkarit olup mısır, patates, pirinç veya buğdaydan izole edilebilmektedir [1]. Nişasta; biyo-etanol dönüşümü [2], ispirto üretimi [3], tekstil, yapı ve kağıt ürünlerinin dayanıklılığını artırma gibi pek çok ticari alanda kullanılmaktadır [4]. Nişastanın veya nişastadan elde edilen son ürünün istenilen özellikleri kazanabilmesi için

nişastanın parçalanması gerekmektedir. Bu amaçla α -amilaz (EC 3.2.1.1), glukoamilaz (EC 3.2.1.3) ve gliko-n-asetiltransferaz (EC 2.4.1.19) en çok kullanılan enzimlerdir [4]. Alfa-amilaz, nişasta ve diğer polisakkaritlerin iç kısımlarındaki α -1,4 glikosidik bağlarını parçaladığı için bunlara endoamilaz da denir [4]. Alfa-amilaz enzimi gıda endüstrisinde; glukoz ve fruktoz şurubu üretimi [1, 5], fırıncılık ürünleri [6], meyve suyu üretimi ve çeşitli modifikasyon ürünleri gibi pek çok gıda

prosesinde yaygın olarak kullanılmaktadır [7]. Alfa-amilazlar ayrıca deterjan üretiminde [8], gıda atıklarının biyo-degradasyonunda [9] ve eczacılık alanında [10] kullanılmasının yanı sıra, tıp ve gıda sektörü gibi birçok alanda sorun teşkil eden biyofilm yapısının önlenmesinde de anti-biyofilm ajanı olarak dikkat çekmektedir [11,12].

Alfa-amilazlar bitkiler ve hayvanlar tarafından da sentezlenmesine rağmen [13] yüksek gelişim ve proliferasyon yeteneği göz önüne alındığında endüstriyel α -amilaz üretimi için en iyi kaynak mikroorganizmalardır [4]. Mikroorganizmalar içerisinde; *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *A. candidus* gibi bazı funguslar ile *Pseudomonas*, *Saccharophila*, bazı *Clostridium* ve *Bacillus* cinslerine ait türler ve bunların alt türleri gelmektedir. Fungal α -amilazlar, sıcaklığa bakteriyel α -amilazlara göre daha çok duyarlı olduğundan üzerinde çalışılan asıl enzim kaynağını daha çok bakteriyel α -amilazlar oluşturmaktadır [14].

Mikrobakteriler Gram negatif, kayarak hareket eden [15-18], kurumaya dirençli meyvemsi yapı oluşturan çubuk şekilli bakterilerdir [18, 19]. Tüm mikrobakteriler zorunlu aéroptur [20, 21]. Mikrobakteriler, doğada çeşitli toprak katmanı, kompost, çürümüş ağaç ve otçul hayvanların dışkısında bulunmaktadır. Birçoğu geliştikleri ortamlarda renkli pigmentler meydana getirir. Bazı türleri ise selulozun yanı sıra, agar ve kitin gibi kompleks substratları da parçalama yeteneğindedir. Çoğunlukla pH 5-8 arasındaki topraklarda bulunurlar. Kum ve taşlı yüzeylerde de gelişebilirler [16, 17]. Prokaryotlar arasında eşsiz olarak kabul edilen mikrobakteriler, bakterilerin çok ilginç bir grubu olup hayat döngüleri [15, 17, 22] ve ürettikleri ikincil metabolitleri [23] bir hayli dikkat çekmektedir. Mikrobakterilerin iyi birer enzim üreticisi olduğu bilinmesine rağmen α -amilaz üretimleri ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bazı mikrobakteri cinsleri ve *Cystobacter fuscus*, *Stigmatella aurantiaca* türlerinin amilaz ürettiği ile ilgili kaynaklar mevcuttur [24]. Ancak bu konudaki ilk kapsamlı çalışma [25,26] tarafından yapılmış olup *Myxococcus coralloides* D nin α -amilaz enzimi üretimini ve üretilen enzimin özelliklerini incelemişlerdir. Fan ve ark. [35] ise *Archangium* sp. strain AC19'den amilaz üretimden sorumlu geni *E. coli*'ye aktararak elde edilen genetik modifiye enzim ile yeni malto-oligosakkarit üretimi üzerinde çalışmışlardır. Nişasta parçalayıcı bir mikrobakteri suşu olan *Sandaracinus amyolyticus* DSM 53556'nın ise tüm genomu araştırılmıştır [27].

Bu çalışmada Türkiye'deki habitatlardaki varlığı hakkında çok az literatür bilgisi bulunan mikrobakterilerin ülkemizdeki bazı habitatlardaki mevcut durumu araştırılmıştır. Ayrıca izole edilen 19 adet mikrobakteri arasında en yüksek enzim aktivitesine sahip olan izolat olarak belirlenen *Myxococcus* sp KK2'den elde edilen α -amilaz enziminin çeşitli basamaklarda saflaştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Materyal

Bu çalışmada kullanılan mikrobakteriler Antalya, Konya ve Isparta illeri ile Kulu, Şarkikaraağaç ve Atabey ilçelerinden alınan 28 adet toprak örneği materyal olarak kullanılmıştır. Topraklar, yerleşim yerlerinin yanı sıra ormanlık alanlar, çiftlikler ve kümesler gibi özellikle kompost, çürümüş ağaç ve otçul hayvanların (tavşan, tavuk, inek vb.) dışkısının bol olduğu yerlerden rastgele seçilmiştir.

İzolasyon ve Tanımlama

İzolasyon yapmak amacıyla Casitone-Mg⁺⁺ agar, *E. coli* agar, Dunk Pellet agar, Su agar, Modifiye Dunk Pellet agar (MgSO₄.7H₂O, 0.25 g; K₂HPO₄, 0.125 g; Agar, 7.5 g; Sığır gübresi, 5.0 g; Damıtık su, 500 mL) ve Nutrient agar besiyerleri kullanılmıştır [16].

Tanının gerçekleştirilmesi amacıyla seçilen izolatların koloni morfolojisi incelenmiş, Gram reaksiyonu, mikroskopta görünümü, çeşitli antibiyotiklere duyarlılık durumları, bakteriyolitik veya selülitik olma özellikleri, jelatini ve kazitonu hidrolize etme yetenekleri ve Kongo red ile boyanma özellikleri belirlenmiştir [16].

İzolatların Üretimi

İzolatların geliştirilmesi için modifiye CT sıvı besiyeri (Trypticase pepton [BBL], 5 g; çözünebilir nişasta, 10 g; MgSO₄.7H₂O, 1 g; potasyum-fosfat tampon çözeltisi, 1 L ,[0.01 mmol/L pH 6.5]); [25] ve Sarıkaya'nın modifiye besiyeri (pepton, 5 g; çözünebilir nişasta, 10 g;MgSO₄.7H₂O, 1 g; (NH₄)₂SO₄, 4 g, sodyum sitrat, 3 g; damıtık su, 1 L , pH 7) [14] kullanılmıştır. Sıvı besiyerine aşılardan örneklerin inkübe edilmesi amacıyla Gallenkamp (10x40.xx2.C) marka çalkalamalı inkübatör kullanılmıştır. Bakteriler 200 rpm/dakika hızla çalkalanarak 28°C'de 24-36 saat inkübe edilmiştir [26].

Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

Protein tayininde Lowry yöntemi kullanılmıştır [28]. Bu amaçla saf kültürler 28°C'de 24-36 saat inkübe edilerek iki kez aktifleştirildikten sonra 3 mL örnek alınıp, 15 dakika süre ile 0-4°C'de santrifüj (Braun-Biotech) edilmiştir (5000 rpm). Bu işlemle bakteri hücreleri ile enzim içeren kısım birbirinden ayrılmıştır. Enzim aktivitesi tayininde, substrat olarak %1'lik nişasta çözeltisi kullanılmıştır.

Örnek tüpüne 0.5 mL bakteri süpernatantı, kontrol tüpüne ise 0.5 mL enzim üretim besiyeri süpernatantı ilave edilmiştir. Tüpler 25°C'lik su banyosunda 3-4 dakika inkübe edilerek reaksiyon sıcaklığına ulaşması sağlanmıştır. Daha sonra örnek içeren tüpe 25°C'deki nişasta çözeltisinden 0.5 mL ilave edilerek, her iki tüp 3 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda her iki tüpe de 1'er mL 3.5-Dinitro salisilik asit çözeltisi eklenmiş ve 5 dakika kaynatılarak enzimatik reaksiyon durdurulmuştur. Üzerlerine 10 mL saf su

eklenen örneklerin 540 nm de absorbans ölçümleri gerçekleştirilmiştir (Shimadzu UV 1601, Tokyo, Japonya).

Bir birim alfa-amilaz aktivitesi (IU) 25°C'de ve pH 7'de 1 mL enzim çözeltisinin 3 dakika içerisinde %1'lik nişasta çözeltisindeki 1 mg nişastayı hidrolize ederek 1 µmol maltoz açığa çıkmasını gerçekleştiren enzim miktarı olarak tanımlanmıştır [28].

Enzim Saflaştırılması ve Karakterize Edilmesi

Enzim saflaştırma ve izolasyonu için en yüksek α-amilaz aktivitesine sahip olan izolat seçilerek kullanılmıştır. Saflaştırma amacıyla kullanılacak olan enzim çözeltisinin hazırlanması amacıyla izolat 36 saat süre ile geliştirildikten sonra 0-4°C'de 17000 rpm'de santrifüj edilerek ayrılmıştır. Saf enzim çözeltisinin elde edilmesinde üç tekrar yapılmıştır. Enzim çözeltisi önce amonyum sülfatla çöktülerek diyaliz edilmiştir ve en sonunda kolondan geçirilerek saflaştırılmıştır.

Enzim çözeltisi üzerine ilk uygulamada %20, 40, 65 ve 80 doyumluk derişimlerinde, ikinci uygulamada ise %20, 40, 65 doyumluk derişimlerinde amonyum sülfat ilave edilmiştir. Amonyum sülfat toz haline getirilmiş ve 0-4°C'de yavaş yavaş ilave edilerek manyetik karıştırıcı ile çözünmesi sağlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan karışımlar +4°C'de bir gece bekletilmiş ve daha sonra karışımların pH'sı 2 N NaOH ile 7.0'ye ayarlanmıştır. Daha sonra soğutmalı santrifüjde (Sigma) 0-1°C'de 21000 rpm'de 45 dakika santrifüj edilmiştir [26]. Süpernatant ayrılmış ve pelet 50 mL saf su ile süspanse hale getirilmiştir. Bütün çalışmalar çift paralel olarak yapılmıştır. Elde edilen süpernatant ve pelet kısımlarında protein ve enzim aktivite tayinleri yapılmıştır.

Amonyum sülfat çöktürmesi ile elde edilen pelet saf su ile çözündürüldükten sonra 12000 Da ve üstündeki molekül ağırlığındaki maddeleri tutan selüloz diyaliz tüpüne aktarılmıştır. Diyaliz işlemi ile, çözeltiden (NH₄)₂SO₄'ın giderilip giderilmediği doyum baryum klorür (BaCl₂.2H₂O) çözeltisi ile test edilmiştir [14]. Elde edilen diyalizatta protein ve enzim aktivite tayinleri yapılmıştır.

Saflaştırma aşamasında 40 cm uzunluğunda, 2.5 cm çapında Sephacryl S-200 kolon kullanılarak kolon kromatografi yönteminden faydalanılmıştır. Kromatografik sabit faz için ise Sephadex A-25 (Sigma) kolon dolgu maddesi kullanılmıştır [26]. Jel filtrasyon işleminde hareketli faz olarak MgCl₂.6H₂O içeren 0.01 M tris-HCl tamponu (pH 8.0) kullanılmıştır. 1 mL diyalizat örneği kolon yüzeyine homojen şekilde uygulanmıştır. Kolondan çıkan örnekler 3'er mL'lik fraksiyonlar halinde toplanmıştır. Toplanan tüm örneklerin protein ve enzim aktivite tayinleri yapılmıştır. En yüksek aktivitenin saptandığı tüp +4°C'de saklanmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Tüm miksobakteri izolatlarının α-amilaz aktiviteleri belirlenmiştir. Sakkarolitik aktivitenin belirlenmesi için glukoz veya maltoz cinsinden indirgen şekerlerin tayini kullanılmaktadır [14]. İki farklı besiyerinde geliştirilen 19 izolat içinde *Myxococcus sp* KK2 izolatının en yüksek α-amilaz aktivitesine (3.82 U.mg⁻¹) sahip olduğu belirlenmiştir (Tablo 1). Bu nedenle enzim saflaştırma çalışmalarında *Myxococcus sp* KK2 kullanılmıştır.

Tablo 1. Miksobakteri izolatlarının iki farklı besiyerinde α-amilaz üretiminin karşılaştırılması
Table 1. Comparison of α-amylase production of myxobacteria isolates on two different media

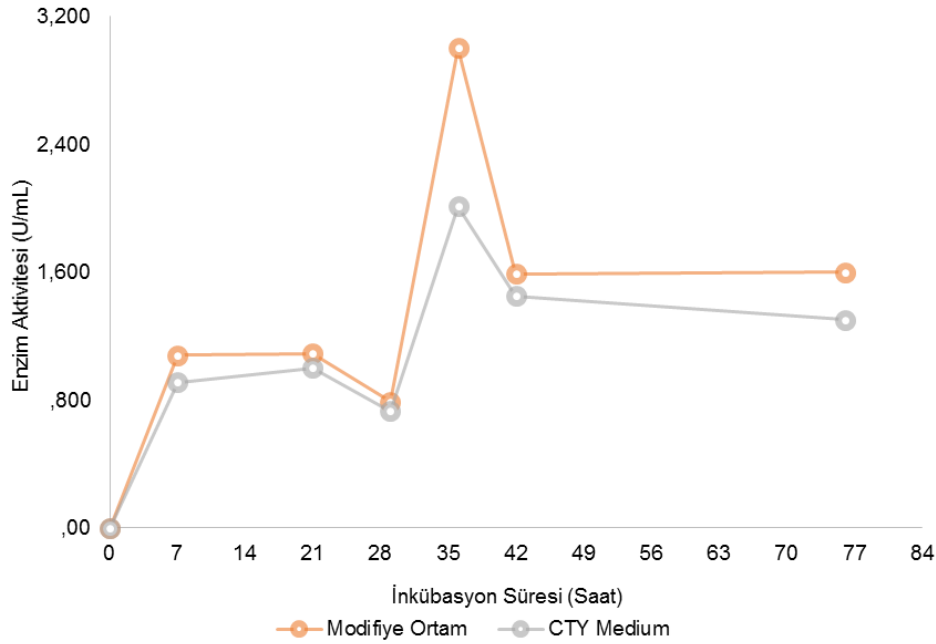
Isolate	Modifiye CT Sıvı Besiyeri (U.mg ⁻¹)	Sarıkaya'nın [14] Modifiye Besiyeri (U.mg ⁻¹)
Ş1	1.55	2.65
Ş2	1.94	2.68
MED1	1.56	2.65
MED2	1.74	2.68
MED3	1.54	2.63
MED4	1.72	2.69
MED5	1.83	1.91
ANT1	1.78	2.39
ANT2	1.82	3.33
UNI1	2.98	3.62
UNI2	1.77	2.49
UNI3	1.79	2.37
KK1	1.81	3.13
KK2	1.34	3.82
KK3	1.34	2.83
KK4	2.02	2.29
KK5	1.56	2.23
KK6	2.01	2.19
KK7	0.12	0.18

Enzim aktivitesinin en yüksek olduğu besiyerini belirlemek amacıyla modifiye CT sıvı besiyeri ve Sarıkaya'nın [14] önerdiği ortamlar kıyaslanmıştır.

Myxococcus sp KK2'nin her 2 besiyerinde 76 saatlik süre sonunda enzim aktiviteleri 7, 21, 29, 36, 42 ve 76. saatlerde sakkarolitik yöntem ile belirlenmiştir (Şekil 1).

Her iki besiyerinde 29 saate kadar yapılan inkübasyon sonuçları ile 42 ve 76. saatlerde yapılan inkübasyon sonuçları arasında enzim aktivitesi açısından her iki besiyerinde farklılık yoktur. Ancak 36. saat sonunda Sarıkaya'nın [14] önerdiği modifiye besiyerinde enzim

aktivitesinin modifiye CTY besiyerinden 2.85 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Enzim aktivitesinde belirlenen bu fazlalık nedeniyle enzim üretim ortamı olarak Sarıkaya'nın [14] modifiye besiyeri kullanılmıştır.



Şekil 1. İki farklı besiyeri ortamında *Myxococcus* sp. KK2'nin α -amilaz üretiminin karşılaştırılması
Figure 1. Comparison of α -amylase production of *Myxococcus* sp. KK2 in two different media

Myxococcus coralloides D'nin α -amilaz aktivitesini belirlemeye yönelik yapılan bir çalışmada da karbon kaynağı olarak nişasta kullanılmıştır ve benzer şekilde 34 saat inkübasyon sonunda en yüksek amilaz aktivitesine ulaşılmıştır. Ancak enzim aktivite tayininde yararlanılan yöntemler arasındaki farklılıklar diğer sonuçlar üzerinde kıyaslama yapmayı güçleştirmektedir [25]. Farklı çalışmalarda ise maksimum enzim aktivitesinin belirlendiği inkübasyon periyotları da farklılık göstermektedir. Farklı *Bacillus* türleri maksimum enzim aktivitesine 40-72 saatte ulaşmaktadır [14]. Siklo dekstrin üretimi için yapılan bir çalışmada kullanılan α -amilaz 24 saatlik inkübasyonda maksimum üretim gerçekleştirirken [29], *Gibberella fujikuroi* ile yapılan bir çalışmada ise 120 saatlik inkübasyon periyodundan sonra maksimum enzim üretimini gerçekleştirmiştir [30].

Elde edilen bilgiler ışığında α -amilazın saflaştırılması amacıyla *Myxococcus* sp. KK2, Sarıkaya'nın [14] modifiye sıvı besiyerinde 28°C'de 200 rpm hızla çalkalanarak 36 saatte üretilmiştir.

Myxococcus sp. KK2'nin ürettiği α -amilazın saflaştırılması amacıyla, amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve Sephadex A-25 jel filtrasyonu işlemleri uygulanmıştır. *Myxococcus* sp. KK2 farklı zamanlarda 2 kez değişik miktarlarda üretilmiştir. Bakteri besiyerinden santrifüjlenerek ayrılmıştır. Süpernatant ilk uygulamada %40, 65 ve 80, ikinci uygulamada ise %20, 40, 65 ve 80 amonyum sülfat doygunluklarına getirilerek amonyum sülfat ile bağlanan enzim santrifüjle çöktürülmüştür.

Her iki uygulama sonucunda da en yüksek aktivitenin %65 amonyum sülfat ile yapılan çöktürme sonucunda sağlandığı saptanmıştır. Enzim çözeltisinden amonyum sülfatı uzaklaştırmak amacıyla diyaliz işlemi yapılmıştır. Diyaliz işleminden sonra enzim çözeltisinin protein içeriği ve enzim aktivitesi tayin edilmiştir. Analiz sonuçlarına göre ilk uygulamada toplam aktivite iki kattan fazla artarken spesifik aktivite 31.55 U.mg⁻¹'den 26.58 U.mg⁻¹'ye azalmıştır. İkinci uygulamada ise hem toplam aktivite hem de spesifik aktivitede de bir miktar artış belirlenmiştir.

Diyaliz işlemi sonucunda elde edilen diyalizat, daha sonra jel filtrasyonu Sephadex A-25 kolonuna uygulanarak enzimin daha fazla saflaştırılmasına çalışılmıştır. Kolon çıktıları toplanarak her bir tüpteki protein miktarları, toplam ve spesifik enzim aktiviteleri saptanmıştır.

İlk uygulamada Sephadex A-25 filtrasyonu sonunda tüm fraksiyonlarda yapılan protein ve enzim aktivite tayinlerine göre enzimin kolondan çıkışı 4. fraksiyonda olmuştur. Saflaştırmanın çeşitli basamaklarında spesifik aktivite ve saflık gittikçe artmıştır. Amonyum sülfat çöktürmesinden sonra enzim, ilk denemede 5.45 kez saflaştırılabildiği halde, diyaliz işlemi sonucunda bu oran 0.85'e düşmüştür. Protein miktarındaki artışın aktivite düşüşünde önemli etkisi bulunmaktadır. Jel filtrasyon işlemi ile toplam aktivite başlangıca göre çok az bir artış gösterdiği halde, enzim proteininin oldukça saf elde edilmesi nedeniyle spesifik aktivite artış göstermiştir. Bu

denemede enzim başlangıca göre 28.35 kat saflaştırılmıştır.

İkinci uygulamada ise enzim saflaştırılma katsayısı 810.24 gibi oldukça yüksek bir değere ulaşmıştır. Ancak bu uygulamada da diyaliz işlemiyle toplam aktivite çok az artarken spesifik aktivite ilk denemenin aksine bir miktar artış göstermiştir. Jel filtrasyonu ile enzim proteini oldukça iyi saflaştırılmış, toplam protein 0.05 µg, spesifik aktivite ise 1754.99 U.mg⁻¹ olarak belirlenmiştir. Başlangıçta 0.193 U.mg⁻¹ olan toplam aktivite de 0.281 U.mg⁻¹'e ulaşmıştır. Bu fraksiyonda spesifik enzim aktivitesinin 18. fraksiyondan daha düşük çıkmıştır ve bu durum protein miktarının yüksek olmasından kaynaklanmaktadır.

Mikrobakterilerin α-amilaz üretimine yönelik sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. *Myxococcus coralloides* D'nin ürettiği α-amilazın özellikleri ve önemini incelediği çalışmada; enzim saflaştırılmasında amonyum sülfat çöktürmesi ve jel filtrasyonu yöntemlerinden yararlanılmıştır. Maksimum enzim aktivitesine %65 amonyum sülfat çöktürmesi ile ulaşılmıştır. Amonyum sülfat çöktürmesinden sonra Sephacyrl S-200 ve DEAE-Sephadex A-25 jel filtrasyonu uygulanmıştır. Uygulanan bu 3 basamaklı işlem sonucunda enzim 262.6 kat saflaştırılarak aktivite 15.3 U.mg⁻¹'den 4016.7 U.mg⁻¹'e yükselmiştir [26]. Çeşitli çalışmalarda uygulanan farklı saflaştırma yöntemleri enzim saflığı üzerinde etkili olmaktadır. Ultrafiltrasyon ve jel filtrasyon uygulamalarını içeren işlemleri ile enzim saflığı daha fazla artırılabilir. Diğer bir çalışmada *B. subtilis* α-amilaz enzimini saflaştırmak için öncelikle %80 amonyum sülfat kullanmış, bunu takiben Sephade G-150 uygulaması yaparak başlangıca göre 53 kez saflık elde etmiştir [31]. *Bacillus amyloliquefaciens* ile yapılan bir sıcaklık uygulama, iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografisi uygulanarak saflık %62 oranında artırılmıştır [32]. Yoshigi vd. ise *Bacillus cereus* NY-14'ten ekstraselüler α-amilaz elde etmiştir. Bu enzim amonyum sülfat çöktürmesi ve Sephade G-100 jel filtrasyonu ile başlangıca göre 1101 kez saflaştırılmıştır [33].

Amilazlar endüstriyel enzimlerin toplan pazar payının %30'unu oluşturmaktadır ve mevcut amilazlar endüstriyel ihtiyaçların hepsine karşılık verememektedir [46]. O yüzden özellikle farklı endüstriyel alanlar için bakterilerden yeni amilaz üretici suşların eldesi ile ilgili çalışmalar devam etmektedir [50].

SONUÇ

Bu çalışmada kullanılan 19 adet mikrobakteri arasından en yüksek enzim aktivitesine sahip suşun *Myxococcus* sp. KK2'den elde edilen α-amilaz enzimi olduğu saptanmıştır. Saflaştırma amacı ile iki uygulama yapılmıştır. İlk uygulamada enzim saflığı başlangıca göre 28.35 kat artarak 883.27 7 U.mg⁻¹'e ulaşırken ve ikinci uygulamada ise 810.24 kat artarak 1754.997 U.mg⁻¹'e ulaşmıştır.

Ülkemizde mikrobakteriler ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmakla beraber, yapılan kaynak araştırmasına göre mikrobakterilerin α-amilaz üretimleri ile ilgili çalışma

mevcut değildir. Bu çalışmada elde edilen veriler ışığında mikrobakterilerin endüstriyel enzim üretimi için önemli bir potansiyel kaynak olduğu görülmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Prof. Dr. Aynur Gül Karahan yürütücülüğünde Süleyman Demirel Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nce 209'nolu "Mikrobakterilerden α-Amilaz Enziminin Ayırımı ve Saflaştırılması" isimli proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Msarah, J.M., Ibrahim, I., Hamid, A.A., Aqma, S. (2020). Optimisation and production of alpha amylase from thermophilic *Bacillus* spp. and its application in food waste biodegradation. *Heliyon*, 6(6), e04183.
- [2] Chohan, N.A., Aruwajoye, G.S., Sewsynker-Suka, Y., Gueguim-Kana, E.B. (2020). Valorisation of potato peel wastes for bioethanol production using simultaneous saccharification and fermentation: Process optimization and kinetic assessment. *Renewable Energy*, 146, 1031-1040.
- [3] Gavahian, M., Chu, R., Ratchaneesiripap, P. (2021). An ultrasound-assisted extraction system to accelerate production of Mhiskey, a rice spirit-based product, inside oak barrel: Total phenolics, color, and energy consumption. *Journal of Food Process Engineering*, 45(6), e13861.
- [4] Xia, W., Zhang, K., Su, L., Wu, J. (2021). Microbial starch debranching enzymes: Developments and applications. *Biotechnology Advances*, 50, 107786.
- [5] Maniglia, C.B., Castanha, N., Le-Bail, P., Augusto, P.E.D. (2021). Starch modification through environmentally friendly alternatives: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(15), 2482-2505.
- [6] Alexa, E., Negrea, M., Cocan, I. (2021). Natural improvers for bakery technology. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 27(4), 392-498.
- [7] Singh, P., Kumar, S. (2019). Microbial Enzyme in Food Biotechnology. *Enzymes in Food Biotechnology: Production, Applications, and Future Prospects*, Chapter 2, Academic Press, United Kingdom.
- [8] Chapman, J., Ismail, A.E., Dinu, C.Z. (2018). Industrial applications of enzymes: recent advances, techniques, and outlooks. *Catalysts*, 8(6), 238.
- [9] Awasti, K.M., Wong, J.W.C., Kumar, S., Awasti, S.K., Wang, K., Wang, M., Ren, X., Zhao, J., Chen, H., Zhang, Z. (2018). Biodegradation of food waste using microbial cultures producing thermostable α-amylase and cellulase under different pH and temperature. *Bioresource Technology (Part B)*, 248, 160-17.
- [10] Paul, J.S., Gupta, N., Beliya, E., Tiwari, S., Jadhav, S.K. (2021). Aspects and recent trends in microbial

- α -amylase: a review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193, 2649-2698.
- [11] Lahiri, D., Moupriya, N., Sarkar., T., Dutta, B., Ray, R.R. (2021). Antibiofilm activity of α -amylase from *Bacillus subtilis* and prediction of the optimized conditions for biofilm removal by Response Surface Methodology (RSM) and Artificial Neural Network (ANN). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, (193), 1853-1872.
- [12] Vaikundamoorthy, R., Rajendran, R., Selvaraju, Moorthy, K., Perumal, S. (2018). Development of thermostable amylase enzyme from *Bacillus cereus* for potential antibiofilm activity. *Bioorganic Chemistry*, 77, 494-506.
- [13] Taylor, A.J., Leach, R.M. (1995). Enzymes in the food industry. Enzymes in the Food processing (Tucker, G.A., Woods, L.F.J.,-eds). 26-41. Chapman and Hall, Glasgow.
- [14] Sarıkaya, E. (1995). α -Amilaz Üreten Bazı *Bacillus* Suşlarının Gelişme Parametreleri, Enzim Özellik ve Üretim Koşullarının Optimizasyonu. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Ankara.
- [15] Bader, C.D., Panter, F., Müller, R. (2021). In depth natural product discovery -Myxobacterial strains that provided multiple secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 39, 107480.
- [16] Buchanan, R.E., Gibbons, N.E. (1974). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Washington, USA.
- [17] Dworkin, M., (1993). Cell Surfaces and Appendages. Myxobacteria II. (Dworkin, M., Kaiser, D.,-eds) 63-84. American Society for Microbiology, Washington, USA.
- [18] Holt, J.G., Krieg, R.N. Peter, H.S., Staley, J. T., Williams, T.S. (1994). Group 16 The Fruiting, Gliding Bacteria: The Myxobacteria. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ed. Williams and Wilkins Baltimore, Maryland USA 515-525.
- [19] Dawid, W. (2000). Biology and global distribution of myxobacteria in soils. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 403-427.
- [20] Reichenbach, H. (1993). Biology of the Myxobacteria: Ecology and Taxonomy. Myxobacteria II. (Dworkin, M., Kaiser, D., eds) 13-63. American Society for Microbiology, Washington, USA.
- [21] Reichenbach, H., Höfle, G. (1989). The Gliding Bacteria: A Treasury of Secondary Metabolites. Bioactive Metabolites from Microorganisms. (M.E. Bushell, U. Grafe Elsevier-eds). Amsterdam, 79-98.
- [22] Madigan, MT., Martinko, J. M., Parker, J. (1997). Biology of Microorganisms. Prentice Hall International Inc., New Jersey, USA.
- [23] Shrivastava, A. Sharma, R. K. (2021). Myxobacteria and their products: current trends and future perspectives in industrial applications. *Folia Microbiologica*, 66, 483-507.
- [24] Far, B.E., Ahmadi, Y., Khosroushahi, A.Y., Dilmaghani, A. (2020). Microbial alpha-amylase production: progress, challenges and perspectives. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 10(3), 350-358.
- [25] Farez-Vidal, M.E., Fernandez-Vivas, A., Arias, J.M., (1992). Production of α -amylase by *Myxococcus coralloides* D. *Journal of Applied Bacteriology*, 73, 148-156.
- [26] Farez-Vidal, M.E., Fernandez-Vivas A., Arias, J.M. (1995). Properties and significance of an α -amylase produced by *Myxococcus coralloides* D. *Journal of Applied Bacteriology*, 78, 14-19.
- [27] Gerhardt, P. (1981). Manual of Methods for General Bacteriology. American Society of Microbiology, Washington, USA.
- [28] Sharma, G., Khatri, I., Subramanian, S. (2016). Complete genome of the starch-degrading myxobacteria *Sandaracinus amylolyticus* DSM 53668. *Genome Biology and Evolution*, 8(8), 2520-2529.
- [29] Hamilton, L.M., Kelly, C.T., Fogarty, W.M. (1999). Cyclodextrins and their interaction with amylolytic enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 561-567.
- [30] Mulimani, V.H., Patil, G.N., Ramalingam (2000.) α -Amylase production by solid state fermentation: a new practical approach to biotechnology courses. *Biochemical Education*, 28, 161-163.
- [31] Takasaki, Y. (1985). An amylase producing maltotriose from *Bacillus subtilis*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49(4), 1091-1097.
- [32] Kochhar, S., Dua, R.D. (1990). Alpha-amylase from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Biotechnology Letters*, 12(5), 393-396.
- [33] Yoshigi, N., Chikano, T., Kamimura, M. (1985). Purification and properties of an amylase from *Bacillus cereus* NY-14. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49(12), 3369-3376.
- [34] Jin, F., Li, Y., Zhong, C., Yu, H. (2001). Thermostable α -amylase and α -galactosidase production from the thermophilic and aerobic *Bacillus* sp. strain. *Process Biochemistry*, 36, 559-564.
- [35] Wang, S. Jeyaseelan, J., Liu, Y. Qin, W. (2016). Characterization and optimization of amylase production in WangLB, a high amylase-producing strain of *Bacillus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 180,136–151.