



**PATATES KABUKLARINDAN İZOLE EDİLEN
PRIESTIA MEGATERIUM SFA İLE AMİLAZ
ÜRETİMİNİN İSTATİSTİKSEL OPTİMİZASYONU,
AMİLAZIN KARAKTERİZASYONU VE DETERJAN
ENDÜSTRİSİ İLE NANOPARTİKÜL SENTEZİNDE
POTANSİYEL UYGULAMALARI**

Fatma AKBAŞ

**Danışman: Doç. Dr. Sümeyra GÜRKÖK
İkinci Tez Danışmanı: Doç. Dr. Murat ÖZDAL**

**Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Ana Bilim Dalı
2024**

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

**PATATES KABUKLARINDAN İZOLE EDİLEN *PRIESTIA MEGATERIUM* SFA İLE
AMİLAZ ÜRETİMİNİN İSTATİSTİKSEL OPTİMİZASYONU, AMİLAZIN
KARAKTERİZASYONU VE DETERJAN ENDÜSTRİSİ İLE NANOPARTİKÜL
SENTEZİNDE POTANSİYEL UYGULAMALARI**

(Statistical Optimization of Amylase Production by *Priestia megaterium* SFA Isolated from
Potato Peels, Characterization of Amylase and Potential Applications in the Detergent
Industry and Nanoparticle Synthesis)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fatma AKBAŞ

Asıl Danışman: Doç. Dr. Sümeyra GÜRKÖK
İkinci Tez Danışmanı: Doç. Dr. Murat ÖZDAL

Erzurum
Ocak, 2024

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Fatma AKBAŞ tarafından hazırlanan “Patates Kabuklarından İzole Edilen *Priestia megaterium* SFA ile Amilaz Üretiminin İstatistiksel Optimizasyonu, Amilazın Karakterizasyonu ve Deterjan Endüstrisi ile Nanopartikül Sentezinde Potansiyel Uygulamaları” başlıklı çalışması 25 / 01 / 2024 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Biyoloji Ana Bilim Dalı, Moleküler Biyoloji Bilim Dalında Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KARADAYI <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Danışman:	Doç. Dr. Sümeyra GÜRKÖK <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Doç. Dr. Murat ÖZDAL <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Dr. Öğr. Üyesi Tuğba ÖZAKTAŞ <i>Van Yüzyüncü Yıl Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Dr. Öğr. Üyesi Burcu E. TEFON ÖZTÜRK <i>Akdeniz Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır

Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../....

tarih ve sayılı kararı.

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Enstitü Müdürü

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi olarak *Doç. Dr. Öğretim Üyesi Sümeyra Gürkök* danışmanlığında sunulan “*Patates Kabuklarından İzole Edilen Priestia megaterium SFA ile Amilaz Üretiminin İstatistiksel Optimizasyonu, Amilazın Karakterizasyonu ve Deterjan Endüstrisi ile Nanopartikül Sentezinde Potansiyel Uygulamaları*” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	0	30
Kuramsal Temeller	9	30
Materyal ve Yöntem	22	35
Araştırma Bulguları	12	20
Tartışma ve Sonuçlar	3	20
Tezin Geneli	14	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'ten büyük olmaması gerekir.

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Fatma AKBAŞ	Doç. Dr. Sümeyra GÜRKÖK
25.1.2024	25.1.2024
İmza:	İmza:

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../.... Tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca, bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, gerek bilimsel gerek manevi destekleriyle yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Sümeyra GÜRKÖK'e hoşgörü ve sabrından dolayı çok teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca desteği ve yardımı ile bana yön gösteren yardımcı danışmanım Sayın Doç. Dr. Murat ÖZDAL'a teşekkür ederim.

Bütün hayatım boyunca maddi ve manevi destekleriyle yanımda olan, benden sevgi, ilgi ve hoşgörülerini esirgemeyen tez sürecinde kaybettiğim babam merhum Veysel AKBAŞ'a, annem Yaşegül AKBAŞ'a, kardeşlerim; Rasim AKBAŞ, Ayşe AKBAŞ, Şeymanur AKBAŞ, M. Furkan AKBAŞ'a ve eşim Yunus Emre AYDIN'a teşekkür ederim.

Ayrıca deney çalışmalarım sürecinde gerekli materyalleri ve laboratuvar imkânlarını sunan Atatürk Üniversitesi Biyoloji Bölümü'ne teşekkürlerimi sunarım.

Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne FYL-2023-12135 numaralı proje ile bu tez çalışmasını desteklediğinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Fatma AKBAŞ

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PATATES KABUKLARINDAN İZOLE EDİLEN *PRIESTIA MEGATERIUM* SFA İLE AMİLAZ ÜRETİMİNİN İSTATİSTİKSEL OPTİMİZASYONU, AMİLAZIN KARAKTERİZASYONU VE DETERJAN ENDÜSTRİSİ İLE NANOPARTİKÜL SENTEZİNDE POTANSİYEL UYGULAMALARI

Fatma AKBAŞ

Danışman: Doç. Dr. Sümeyra GÜRKÖK

İkinci Tez Danışman: Doç. Dr. Murat ÖZDAL

Amaç: Bu tez çalışmasında patates kabuklarından amilaz üreten bakterilerin izolasyonu, en yüksek aktiviteye sahip izolatın tanımlanması, bu izolattan amilaz üretim koşullarının optimizasyonu, üretilen enziminin optimum çalışma koşullarının belirlenmesi ve deterjan endüstrisi ile nanopartikül sentezinde kullanım potansiyelinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Patates kabuklarından izole edilen bakteriler arasından en iyi amilaz üretici izolat seçilmiş, klasik ve moleküler tekniklerle karakterize edilmiştir. Optimum amilaz üretim koşulları Tepki Yüzey Metodu'nun Box-Behnken dizaynı ile belirlenmiştir. Üretilen amilaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklık, pH, çeşitli metal iyonları ve çözücülerin etkisi araştırılmıştır. Amilaz enziminin kumaşlardaki nişasta bazlı lekeleri uzaklaştırılma potansiyelleri yıkama testleriyle incelenmiştir. AgNO₃, CoCl₂, CuSO₄, FeSO₄, MgSO₄, MnSO₄, Na₂SeO₃, NiCl₂ ve ZnSO₄ tuzlarından elde edilen amilaz üretim fermantasyon sıvısı kullanılarak sentezlenen nanopartiküller X ışını kristalografisi (XRD), Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), taramalı elektron mikroskopu (SEM) ve geçirimli elektron mikroskopu (TEM) ile karakterize edilmiştir.

Bulgular: Bakteri izolatları arasından en yüksek amilaz aktivitesi *Priestia megaterium* SFA (GenBank Erişim No: OR415891.1) bakterisinde elde edilmiştir. En yüksek amilaz üretimi 35 °C ve pH 7,0'de, çözünebilir nişasta ve maya özütü varlığında, 3 günlük inkübasyon süresinde elde edilmiştir. Amilaz aktivitesi için optimum sıcaklık 40 °C ve pH 9,0 olarak belirlenmiştir. Amilazın çeşitli metal iyonları, reaktifler, çözücüler ve deterjanlar varlığında kararlı olduğu tespit edilmiştir. Amilaz enziminin kumaş parçalarından nişasta ve çikolata lekelerini çıkardığı görülmüştür. Ayrıca gümüş, selenyum, magnezyum ve bakır nanopartiküllerini sentezleyebilmiştir.

Sonuç: Patates kabukları kullanılarak *P. megaterium* SFA bakterisi ile amilaz üretiminin koşulları istatistiksel olarak optimize edilmiştir. Enzim aktivitesi üzerine çeşitli parametrelerin etkisi belirlenmiştir. Amilaz enziminin deterjan endüstrisinde ve nanopartikül sentezinde kullanım potansiyeline sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Priestia megaterium* SFA, Amilaz, Nişasta, Patates Kabuğu, Deterjan Enzimleri, Nanopartikül Sentezi

Ocak 2024, 116 sayfa

ABSTRACT

MASTER THESIS

STATISTICAL OPTIMIZATION OF AMYLASE PRODUCTION BY *PRIESTIA MEGATERIUM* SFA ISOLATED FROM POTATO PEELS: CHARACTERIZATION OF AMYLASE AND POTENTIAL APPLICATIONS IN THE DETERGENT INDUSTRY AND NANOPARTICLE SYNTHESIS

Fatma AKBAŞ

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Sümeyra GÜRKÖK

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Murat ÖZDAL

Purpose: In this thesis, it was aimed to isolate amylase producing bacteria from potato peels, to identify the isolate with the highest activity, to optimize the amylase production conditions from this isolate, to determine the optimum working conditions of the enzyme, and to investigate its potential for use in the detergent industry and nanoparticle synthesis.

Method: Among the bacteria isolated from potato peels, the best amylase producing isolate was selected and identified by classical and molecular techniques. The optimal conditions for amylase production were determined by the Box-Behnken design of the Response Surface Methodology. The effects of temperature, pH, various metal ions, and solvents on the activity of the enzyme were investigated. The potential of the amylase enzyme to remove starch-based stains from fabrics was investigated by washing tests. Nanoparticles synthesized from AgNO₃, CoCl₂, CuSO₄, FeSO₄, MgSO₄, MnSO₄, Na₂SeO₃, NiCl₂ and ZnSO₄ salts using amylase production fermentation broth were characterized by X-ray crystallography (XRD), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM), and transmission electron microscopy (TEM).

Results: Among the bacterial isolates, the highest amylase activity was obtained with *Priestia megaterium* SFA (GenBank Accession No: OR415891.1). The highest amylase production was obtained at 35 °C, pH 7.0, in the presence of starch and yeast extract, in a 3-day incubation period. The optimum temperature for amylase activity was determined as 40 °C and pH 9.0. The amylase was stable in the presence of various metal ions, reagents, solvents, and detergents. The amylase enzyme was found to be able to remove starch and chocolate stains from fabric pieces. Additionally, it was able to synthesize silver, selenium, magnesium, and copper nanoparticles.

Conclusion: The conditions for amylase production by *P. megaterium* SFA bacteria using potato peels were statistically optimized. The effect of various parameters on the enzyme activity was determined. It was concluded that the amylase enzyme has the potential to be used in the detergent industry and nanoparticle synthesis.

Keywords: *Priestia megaterium* SFA, Amylase, Starch, Potato Peel, Detergent Enzymes, Nanoparticle Synthesis.

January 2024, 116 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
GİRİŞ.....	1
KURAMSAL TEMELLER.....	2
Enzimler	2
Amilazlar.....	2
Nişastayı Hidrolize Eden Enzimler.....	3
Amilazların Sınıflandırılması.....	4
α -Amilazlar (Alfa-amilazlar)	4
β -Amilazlar (Beta-amilazlar)	4
Glukoamilazlar.....	4
α -Glukosidaz	5
Amilaz Kaynakları	5
Bitkisel amilaz üreticileri	5
Hayvansal amilaz üreticileri.....	5
Mikrobiyal amilaz üreticileri.....	5
Amilazların Endüstriyel Kullanım Alanları	5
Deterjan endüstrisi	6
Nişastanın sıvılaştırılması	6
Fruktoz şurubu ve maltoz üretimi	7
Gıda endüstrisinde amilazlar.....	7
Biyoyakıt endüstrisi	8
Tekstilde nişastanın giderimi	8
Kâğıt endüstrisi	8
Nişasta işleme tesislerinde atık suların arıtılması	8
Tıp ve ilaç sektörü.....	8

Nanopartikül sentezi.....	9
Atık Maddelerin Amilaz Üretiminde Değerlendirilmesi	9
Patates Kabukları	11
<i>Priestia megaterium</i>	12
Amilaz Enzimiyle Daha Önce Yapılan Çalışmalar.....	13
Amilaz Üretiminde <i>P. megaterium</i> İlgili Yapılan Çalışmalar	15
MATERYAL VE YÖNTEM	16
Materyal	16
Mikroorganizmalar.....	16
Kullanılan cihazlar	16
Kullanılan kimyasallar	17
Kullanılan çözelti ve tamponların hazırlanışları	17
Kullanılan tamponların hazırlanması	18
SDS-PAGE solüsyonları	18
Kullanılan besiyerleri	19
Yöntem.....	22
Bakterilerin izolasyonu	22
Bakterilerin saflaştırılması ve saklanması.....	22
Amilaz üreten bakterilerin taranması	22
Amilaz üretimi için ön (aşı) kültürün hazırlanması	22
Sıvı ortamda amilaz üretimi	22
Amilaz aktivite tayini	23
Maltoz standart grafiğinin hazırlanması.....	23
Bakterilerin tanılanması	24
Amilaz üretim koşullarının optimizasyonu	27
Enzimin saflaştırılması.....	29
Saflaştırılan amilaz enziminin karakterize edilmesi	30
Amilaz üretiminde patates kabuklarının kullanılması.....	33
Amilaz üretim koşullarının istatistiksel optimizasyonu	34
Enzimin Biyoteknolojik Uygulamaları	36
Amilaz enziminin leke çıkarma potansiyelinin araştırılması	36
Amilaz enzimi ile nanopartikül sentezi ve nanopartiküllerin saflaştırılması	37
ARAŞTIRMA BULGULARI	39
Bakterilerin İzolasyonu	39
Bakteri İzolatlarının Amilaz Aktivitesinin Belirlenmesi	39

Kantitatif Amilaz Aktivite Tayini	39
En İyi Amilolitik Bakteri İzolatının Tanınması	40
Klasik yöntemlerle tanılama	40
Moleküler Yöntemlerle Tanılama	41
<i>P. megaterium</i> SFA'nın Amilaz Üretim Koşullarının Optimizasyonu	42
İnkübasyon süresinin amilaz üretimi üzerine etkisi	42
Optimum inokulum miktarının amilaz üretimine etkisi	43
Başlangıç pH'sının amilaz üretimi üzerine etkisi	43
Sıcaklığın amilaz üretimi üzerine etkisi	44
Azot kaynaklarının amilaz üretimi üzerine etkisi	45
Maya özütünün farklı konsantrasyonlarının belirlenmesi	45
Karbon kaynaklarının enzim üretimi üzerine etkisi	46
Çözünabilir nişastanın farklı konsantrasyonlarının amilaz üretimine etkisi	47
Patates Kabuklarından Amilaz Üretimi	47
Amilaz üretim koşullarının RSM ve BBD ile istatistiksel optimizasyonu	48
<i>P. megaterium</i> SFA Amilazının Saflaştırılması ve Karakterizasyonu	52
Enzim saflaştırılması	52
SDS-PAGE Analizleri ve Amilaz Enziminin Moleküler Kütlesinin Hesaplanması	53
Amilaz Enzim Reaksiyonuna Ait K_m ve V_{max} Kinetik Sabitlerinin Saptanması	54
pH'nın amilaz aktivitesi üzerindeki etkisi	55
Amilaz enziminin pH stabilitesi	55
Sıcaklığın amilaz aktivitesi üzerindeki etkisi	56
Amilaz enziminin sıcaklık stabilitesi	56
Metal iyonlarının amilaz aktivitesi üzerindeki etkisi	57
Çeşitli reaktiflerin amilaz aktivitesi üzerindeki etkisi	58
Çeşitli organik çözücülerin aktivitesi üzerindeki etkisi	58
Ticari deterjanların amilaz aktivitesi üzerindeki etkisi	59
Ticari deterjanların amilaz stabilitesi üzerine etkisi	59
<i>P. megaterium</i> SFA Amilaz Enziminin Biyoteknolojik Uygulamaları	60
Amilaz enziminin leke çıkarıcı etkisinin belirlenmesi	60
Amilaz enzimi ile nanopartikül sentezinin araştırılması	62
Taramalı elektron mikroskobu (SEM)	65
TARTIŞMA VE SONUÇLAR	69
Sonuçlar	80
KAYNAKÇA	81

EKLER	96
EK 1. Maltoz Standart Grafiği	96
EK 2. <i>P. megaterium</i> strain SFA 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (OR415891.1)	97
EK 3. <i>P. megaterium</i> strain SFA izolatının filogenetik ağacı.....	97
EK 4. SDS-PAGE Analizleri	98
ÖZGEÇMİŞ.....	100



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Patates Kabuğu Atıklarının (PPW) Kimyasal Bileşimi	12
Tablo 2. <i>P. megaterium</i> Bilimsel Sınıflandırılması	15
Tablo 3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	16
Tablo 4. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar	17
Tablo 5. PCR Master Mix'in Hazırlanışı	26
Tablo 6. Ayırma Jeli Kompozisyonu (%12,5)	31
Tablo 7. Yığma Jel Kompozisyonu (%7,5)	31
Tablo 8. Yanıt Yüzey Metodolojisinde Bağımsız Değişkenlerin Kodlanmış ve Kodlanmamış Düzeyleri	34
Tablo 9. Yanıt Yüzey Metodolojisi Kullanılarak Üç Değişkenin (PPW, Yeast ve pH) Amilaz Üretiminin Optimizasyonu İçin Box-Behnken Dizaynı ile Deneysel Tasarımı ve Deneysel Yanıtları	35
Tablo 10. Yıkama Solüsyonu Kompozisyonu	36
Tablo 11. Amilolitik B22 İzolatının Özellikleri	42
Tablo 12. Amilaz Üretimi İçin Tahmin Edilen Çoklu Belirleme Regresyon Katsayıları (R^2)	48
Tablo 13. Kodlanmış Değerler Kullanılarak Amilaz Üretimi İçin Varyans Analizi	49
Tablo 14. <i>P. megaterium</i> SFA Amilazının Saflaştırma Aşamaları	53

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Nişastanın kimyasal yapısı.....	3
Şekil 2. Nişastayı hidrolize eden enzimler	4
Şekil 3. Patatesten elde edilen izolatlarla NNA üzerinde 30 °C’de 2 günlük inkübasyon sonucu gözlenen amilolitik zonlar.....	39
Şekil 4. Bakteri izolatlarının sıvı amilaz üretim ortamında 30 °C’de 4 günlük amilaz aktiviteleri.....	40
Şekil 5. <i>P. megaterium</i> SFA’nın sıvı amilaz üretim ortamında 30 °C ve 185 rpm’de 5 günlük inkübasyon süresinde amilaz üretimi	43
Şekil 6. <i>P. megaterium</i> SFA’nın inokulum miktarının amilaz üretimine etkisi.....	43
Şekil 7. Başlangıç pH’sının <i>P. megaterium</i> SFA ile amilaz üretimi üzerine etkisi	44
Şekil 8. Sıcaklığın <i>P. megaterium</i> SFA ile amilaz üretimi üzerine etkisi	44
Şekil 9. Azot kaynaklarının <i>P. megaterium</i> SFA ile amilaz üretimi üzerine etkisi	45
Şekil 10. Maya özütü konsantrasyonlarının <i>P. megaterium</i> SFA amilaz üretimi üzerine etkisi.	46
Şekil 11. Karbon kaynaklarının (%1) <i>P. megaterium</i> SFA’nın amilaz üretimi üzerine etkisi	46
Şekil 12. Çözünebilir nişastanın farklı konsantrasyonlarının <i>P. megaterium</i> SFA ile amilaz üretimi üzerine etkisi.....	47
Şekil 13. Farklı patates kabuğu konsantrasyonlarında <i>P. megaterium</i> SFA izolatının amilaz üretimi	48
Şekil 14. Amilaz üretimi üzerinde (a) PPW ve yeast, (b) yeast ve pH ve (c) PPW ve pH etkisini gösteren yanıt yüzeyi grafikleri	50
Şekil 15. Amilaz üretimi üzerinde (a) PPW ve yeast, (b) yeast ve pH ve (c) PPW ve pH etkisini gösteren kontur grafikleri.....	51
Şekil 16. Maksimum amilaz üretimi için Minitab-Yanıt optimize edici ile tahmin edilen optimum değerler.....	52
Şekil 17. Saflaştırılmış <i>P. megaterium</i> amilaz enziminin SDS-PAGE analizi. M: Precision Plus Protein Unstained Standart (250- 10kD); 1: Saflaştırılmış amilaz örneği.....	53
Şekil 18. <i>P. megaterium</i> SFA amilazının Michaelis-Menten grafiği	54
Şekil 19. <i>P. megaterium</i> SFA amilazının Lineweaver-Burk grafiği	55
Şekil 20. pH’nın <i>P. megaterium</i> SFA amilaz enzim aktivitesine etkisi	55
Şekil 21. <i>P. megaterium</i> SFA amilaz enziminin pH stabilitesi	56
Şekil 22. Sıcaklığın <i>P. megaterium</i> SFA amilaz enzim aktivitesine etkisi	56

Şekil 23. Sıcaklığın <i>P. megaterium</i> amilaz enzim aktivitesine etkisi	57
Şekil 24. Metal iyonlarının <i>P. megaterium</i> SFA amilaz aktivitesine etkisi	58
Şekil 25. Reaktiflerin <i>P. megaterium</i> SFA amilaz aktivitesine etkisi	58
Şekil 26. Organik çözücülerin <i>P. megaterium</i> SFA amilaz aktivitesine etkisi	59
Şekil 27. Ticari deterjanların amilaz aktivitesi üzerine etkisi	59
Şekil 28. Ticari deterjanların amilaz enzim stabilitesi üzerine etkisi.....	60
Şekil 29. <i>P. megaterium</i> 'un farklı yıkama çözeltilerinde mısır lekesi üzerindeki yıkama performansı. 1. Distile su ve tampon; 2. Enzim ve tampon; 3. Enzim, tampon ve çamaşır deterjanı; 4. Enzim, tampon ve sıvı el sabunu; 5. Enzim, tampon ve bulaşık deterjanı; 6. Distile su ve sıvı el sabunu; 7. Distile su ve bulaşık d eterjanı; 8. Distile su ve çamaşır deterjanı.....	61
Şekil 30. <i>P. megaterium</i> 'un 30 °C'de farklı yıkama çözeltilerinde çikolata lekesi üzerindeki yıkama performansı. 1. Distile su ve tampon; 2. Enzim ve tampon; 3. Enzim, tampon ve çamaşır deterjanı; 4. Enzim, tampon ve bulaşık deterjanı; 5. Enzim, tampon ve sıvı el sabunu; 6. Distile su ve çamaşır deterjanı; 7. Distile su ve sıvı el sabunu; 8. Distile su ve bulaşık deterjanı	61
Şekil 31. <i>P. megaterium</i> 'un 60 °C'de farklı yıkama çözeltilerinde çikolata lekesi üzerindeki yıkama performansı. 1. Distile su ve tampon; 2. Enzim ve tampon; 3. Enzim, tampon ve çamaşır deterjanı; 4. Enzim, tampon ve bulaşık deterjanı; 5. Enzim, tampon ve sıvı el sabunu; 6. Distile su ve çamaşır deterjanı; 7. Distile su ve sıvı el sabunu; 8. Distile su ve bulaşık deterjanı	62
Şekil 32. Nişastalı NB ortamında gelişen <i>P. megaterium</i> SFA süpernatantında nanopartikül sentezi sonucu renk değişimleri.....	62
Şekil 33. <i>P. megaterium</i> SFA ile sentezlenen Ag, Cu, Mg ve Se nanopartiküllerinin UV-görünür absorpsiyon spektrumları	63
Şekil 34. <i>P. megaterium</i> SFA ile sentezlenen Ag (a), Cu (b), Mg (c) ve Se (d) nanopartiküllerinin FT-IR spektrumu.....	64
Şekil 35. Bakteri tarafından sentezlenen Ag (a), Cu (b), Mg (c) ve Se (d) nanopartiküllerin XRD analizleri	65
Şekil 36. Bakteri tarafından sentezlenen Ag (a), Cu (b), Mg (c) ve Se (d) nanopartiküllerinin SEM analizleri	66
Şekil 37. Bakteri tarafından sentezlenen Ag (a), Cu (b), Mg (c) ve Se (d) nanopartiküllerinin EDX analizleri	67
Şekil 38. Bakteri tarafından sentezlenen Ag (a), Cu (b), Mg (c) ve Se (d) nanopartiküllerinin TEM analizleri	68

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

%	: Yüzde
°C	: Santigrat Derece
µL	: Mikrolitre
g	: Gram
g/L	: Gram/Litre
K_m	: Enzimin Michealis – Menten Sabiti
L	: Litre
M	: Molar
mg/mL	: Miligram/Mililitre
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
pH	: Power of Hydrogen (Hidrojenin Gücü)
rpm	: Bir dakika içerisindeki devir sayısı (Revolutions Per Minute)
U	: Unite/Enzim Birimi
U/mg	: Unit/miligram-Spesifik Aktivite Birimi
v/v	: Hacim/Hacim
V_{max}	: Enzimin ulaşabileceği maximum hız
w/v	: Ağırlık/ Hacim
µL	: Mikrolitre

Kısaltmalar

CaCl ₂	: Kalsiyum klorür
ZnSO ₄	: Çinko sülfat
MnCl ₂	: Mangan klorür
FeCl ₃	: Demir klorür
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
BaCl ₂	: Baryum klorür
AgNO ₃	: Gümüş nitrat
CdN ₂ O ₄	: Kadmiyum di nitrit
HgCl ₂	: Civa klorür
NiCl ₂	: Nikel klorür
CoCl ₂	: Kobalt klorür
CuSO ₄	: Bakır sülfat
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
DNS	: Dinitrosalisilik asit
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
TSB	: Tryptic soy broth
NA	: Nutrient agar
NNA	: Nişastalı nutrient agar
APS	: Amonyum per sulfat
TEMED	: Tetrametiletilen diamin
dk	: Dakika

GİRİŞ

Enzimler biyokimyasal reaksiyonların gerçekleşmesini sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Görev aldıkları reaksiyonlar ve etki ettikleri substratlar bakımından oldukça spesifik biyomoleküllerdir. Canlı hücreler içerisindeki metabolik görevlerinin dışında gıda, yem, deterjan, tekstil, medikal ve klinik, kağıt, kozmetik ve alkol endüstrisi gibi birçok endüstriyel alanda kullanılmaktadırlar (Koç, 2015).

Mikrobiyal kaynaklı endüstriyel enzimler arasında bulunan proteaz, lipaz, kitinaz, pullunaz, ksilanaz, selüloz, lipaz, laktaz, katalaz ve amilaz gibi enzimler genellikle deterjan, gıda, kağıt, ilaç, tekstil ve deri endüstrilerinde kullanılmaktadır (Kalpana and Pandian, 2014).

Amilazlar, enzim sektöründe proteazlardan sonra en yüksek pazar payına sahip enzimlerdir. Dünya enzim pazarının yaklaşık %30'unu oluşturmakta olup endüstriyel bakımdan önemli enzimler arasındadır (Gupta et al., 2003; Vaidya et al., 2015). Amilaz enzimi, geniş bir endüstriyel kullanım yelpazesi içinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu kullanımlar arasında gıda, medikal, kağıt, tekstil, deterjan ve biyoenerji endüstrileri öne çıkmaktadır (Shad et al., 2023).

Tez çalışmasının amacı; endüstriyel alanlarda önemi giderek artan amilaz enziminin iyi bir mikrobiyal kaynakla verimli ve ekonomik üretimi ile üretilen enzimin biyoteknolojik uygulama alanlarının araştırılmasıdır. Bu amaç doğrultusunda, ilk olarak patates kabuklarından amilaz üreten bakterilerin izolasyonu hedeflenmiştir. İzole edilen amilolitik bakteriler arasından en iyi amilaz üreticisinin seçilmesi ve yine patates kabukları substrat olarak kullanılarak amilaz enziminin üretimi hedeflenmiştir. Hem atıkların değerlendirilmesi hem de maliyet açısından daha ucuza amilaz enzimi elde edilmesi hedeflenmiştir. Çalışmanın bir başka amacı da elde edilen enzimin karakterize edilen özelliklerine bağlı olarak biyoteknolojik kullanım alanlarının araştırılmasıdır. İlk olarak deterjan endüstrisinde kullanımına yönelik kumaşlardaki çikolata ve nişasta bazlı lekelerin uzaklaştırılmasına uygunluğu ve daha sonra nanopartikül sentezlemede potansiyelinin araştırılması hedeflenmiştir.

KURAMSAL TEMELLER

Enzimler

Enzimler, hücrelerdeki biyokimyasal reaksiyonları katalize eden, çoğunlukla protein yapıda biyomoleküllerdir. Yüksek özgülükleri, ekonomik olmaları ve çevre dostu olmalarından dolayı endüstriyel olarak uzun süredir kullanılmaktadırlar.

Enzimler bitki, hayvan ve mikroorganizmalardan elde edilebilse de endüstriyel enzim üretiminde genellikle mikrobiyal kaynaklar tercih edilir. Mikroorganizmaların tercih edilme sebepleri; mikroorganizmaların yüzey alanlarının hacimlerine göre daha geniş olması, çeşitli tepkimeleri katalizleme yeteneklerinin olması, farklı ortamlara kolaylıkla adapte olmaları, ekonomik olmaları, tarama işlemlerinin çok daha kolay ve aktivitelerinin yüksek olması, kısa sürede sonuç alınması, fazla miktarda ve yüksek saflıkta üretilibilmeleri, alerjik ve toksik olmamalarıdır (Horikoshi, 1999; Baltaş, 2012).

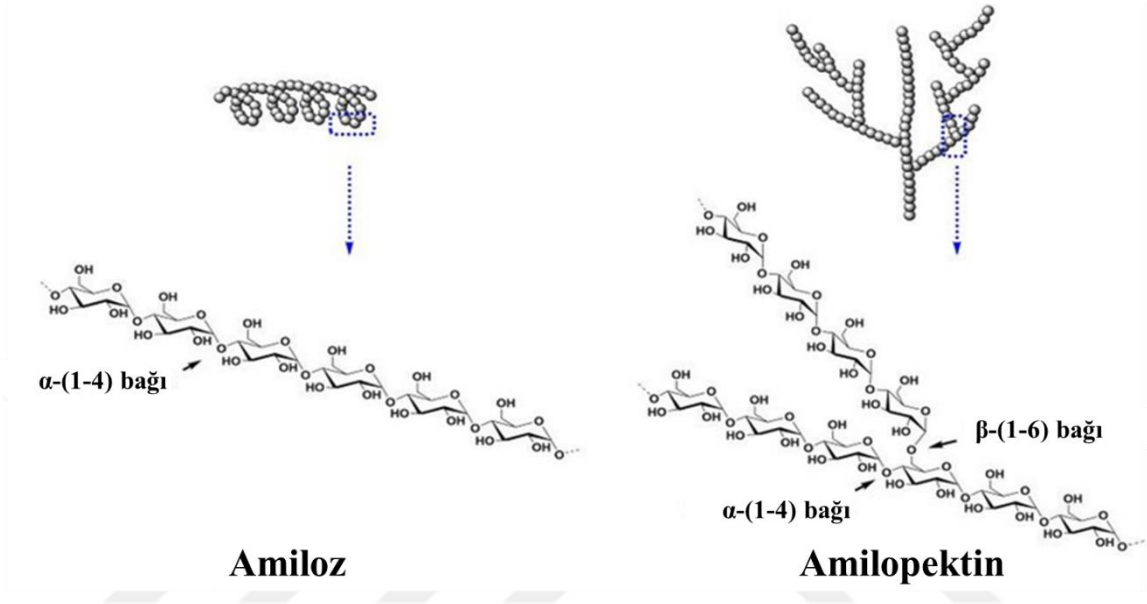
Enzimler katalizledikleri tepkimelere göre Enzim Komisyonu tarafından altı gruba ayrılmaktadır (Boyce and Tipton, 2001).

1. Oksidoredüktazlar: Yükseltgenme (oksidasyon) ve indirgenme (redüksiyon) tepkimelerini katalizleyen enzimlerdir.
2. Transferazlar: İki molekül arasındaki atomların veya atom gruplarının transferini katalizleyen enzimlerdir.
3. Hidrolazlar: Hidroliz reaksiyonlarını katalize eden enzimlerdir.
4. Liyazlar: Hidroliz veya oksidasyon dışında bir yöntemle substrattan bir grubu uzaklaştıran reaksiyonu katalize eden enzimlerdir.
5. İzomerazlar: İzomerizasyon tepkimelerini katalizler. Substratında bir veya daha fazla grubun yeniden düzenlenmesine neden olan enzim grubudur.
6. Ligazlar: Adenozin trifosfat (ATP)'nin yıkımı ile yeni bir bağın sentezlenme reaksiyonlarını katalize eden enzimlerdir.

Amilazlar

Hidrolazlar sınıfında olan amilazlar; glikojen ve nişasta moleküllerini hidrolize ederek sonucunda glukoz ünitelerinden oluşan küçük polimerleri, dekstrinler ve limit dekstrinlerini oluştururlar (Naidu and Saranraj, 2013).

Nişasta α -1,4 ve α -1,6 glukozidik bağlarıyla bağlanmış yüksek molekül ağırlıklarına sahip olan amiloz ve amilopektin denilen α -D-glukoz birimlerinden oluşmaktadır. Amiloz döz zincir halinde bulunup nişasta ağırlığının %17-34'ünü oluştururken; amilopektin dallanmış bir yapıya sahip olup nişasta ağırlığının %70-90'ını oluşturur. Nişasta, insan vücutundaki temel besin bileşenlerinden biri olup bitkilerde polisakkarit şeklinde depolanmasını sağlar. Dolayısıyla amilazlar çeşitli gıdaların enzimatik işlemlerinde kullanılır (Souza and Magalhães, 2010).

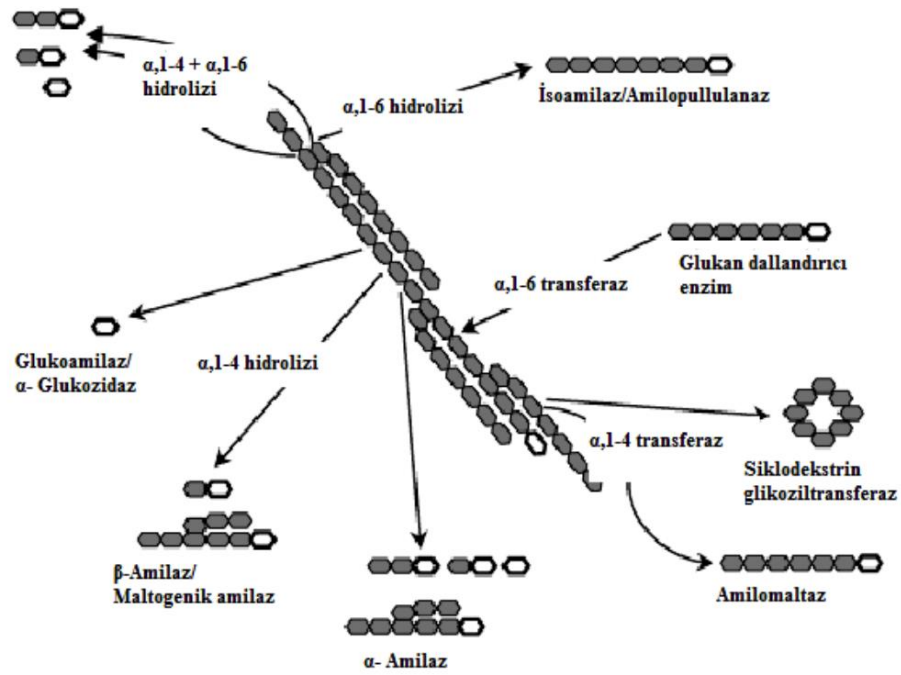


şekil 1. Nişastanın kimyasal yapısı (Fan and Picchioni, 2020'den Türkçeleştirilmiştir).

Nişastayı Hidrolize Eden Enzimler

Nişastanın enzimatik hidrolizinde endoamilazlar, ekzoamilazlar, dallanmış yapıları hidrolizleyen enzimler ve transferazlar olmak üzere dört çeşit enzim rol almaktadır (Pandey et al., 2000; Sivaramakrishnan et al., 2006).

- 1- **Endoamilazlar:** Amiloz ve amilopektinin iç kısmında bulunan α -1,4 glukozidik bağlarını hidrolizleyen enzimlerdir.
- 2- **Ekzoamilazlar:** Amiloz ve amilopektinin dış kısmında bulunan α -1,4 ve α -1,6 bağlarını hidrolizleyerek glukoz birimlerinin oluşumunda görev alan enzimlerdir.
- 3- **Transferazlar:** Verici moleküllerin α -1,4 glukozidik bağlarını hidrolize eden yeni glukozidik bir bağ oluşumuyla alıcı moleküllere aktararak nişastanın dönüşümünü gerçekteştiren enzimlerdir.
- 4- **Dallanmış yapıları hidrolize edenler:** Amilopektin ve benzer polimerlerde bulunan α -1,6 glukozidik bağlarını hidrolizleyen enzimlerdir.



Şekil 2. Nişastayı hidrolize eden enzimler (Van der Maarel et al., 2002’den Türkçeleştirilmiştir)

Amilazların Sınıflandırılması

α-Amilazlar (Alfa-amilazlar)

Nişasta molekülündeki amiloz zincirini oluşturan α -1,4 bağlarını rastgele parçalar, oluşan bu kısa zincirler tekrar enzime maruz kalır ve son ürün olarak glukoz ve maltozdan oluşan bir karışım meydana getirirler (Al-Bedak et al., 2022).

β-Amilazlar (Beta-amilazlar)

Ardışık maltoz birimlerini zincirlerin indirgeyici olmayan uçlarından uzaklaştırmak için polisakkaritlerdeki α -1,4 glukozidik bağların hidrolizini katalizlerler. Bir seferde iki glukoz birimini uzaklaştırarak glukoz-glukoz bağlarını kırar ve böylece maltoz üretirler (Al-Bedak et al., 2022).

Glukoamilazlar

Nişasta molekülünün indirgeyici olmayan uçlarından glukoz birimlerini uzaklaştıran bir ekzoenzimdir. Diğer amilazlardan farklı olarak glukoamilazlar, nişastadaki hem α -1,4 hem de α -1,6 bağlarını hidroliz edebilir. Ancak; α -1,4 bağlarının hidrolizi α -1,6 bağlarının hidrolizine oranla 600 kat daha hızlıdır (Al-Bedak et al., 2022).

α -Glukosidaz

Amiloz ve amilopektinin kısa zincirli oligosakkaritlere parçalanmasıyla salınan α -1,4 bağlarını hidrolize ederek serbest glikoz birimlerini oluştururlar (Al-Bedak et al., 2022).

Amilaz Kaynakları

Endüstriyel alanda sıkça tercih edilen mikrobiyal amilaz üreticileri olsa da bitkisel ve hayvansal kökenli amilaz üreticileri bulunmaktadır (Ban et al ., 2023).

Bitkisel amilaz üreticileri

Bitkisel kaynaklı amilazlarda toksik olmama yönü dikkate alındığından yenilebilir bitkiler tercih edilmektedir. Arpa tohumlarında bulunan nişasta içeriğini maltoza dönüştürerek maya tarafından fermantasyonun başlamasını sağlayan malt amilazı bitkisel kökenli en önemli amilaz üreticisidir. Bu enzimin endüstriyel kullanım alanı, özellikle bira ve içki üretimi gibi fermente içeceklerin üretiminde yaygındır (Tatar, 2007).

Hayvansal amilaz üreticileri

Hayvansal amilaz enzimi, hayvanlarda doğal olarak bulunan tavuk yumurtası beyazı, pankreas, domuz midesi ve geniş getiren hayvanların karın kısmından elde edilir. Endüstriyel olarak yiyecek üretiminde ve sindirim problemini gidermek amacıyla ilaç sektöründe kullanılabildiği gibi pek çok ticari alanda da kullanımı mevcuttur (Tatar, 2007).

Mikrobiyal amilaz üreticileri

Mikrobiyal kaynaklı amilazlar bakteri, mantar, fungus gibi mikroorganizmalar tarafından doğal olarak üretilir. Toksik olmaması, ekonomik olması ve kısa sürede elde edilebilir oluşundan dolayı endüstride sıkça tercih edilen mikrobiyal enzimler α -amilaz, glikoamilaz, proteaz ve glikoizomeraz enzimleridir (Baltaş, 2012). Bakteriyel amilazlar kullanım amacına göre asidofilik, alkalofilik ve termofilik bakterilerden elde edilebilmektedir (Rehman and Saeed, 2015). Bakteriler tarafından üretilen amilazlar genellikle *Bacillus spp.* (*B. subtilis*, *B. mesentericus*, *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *B. vulgaris*, *B. megaterium*, *B. cereus*) bakterileri tarafından üretilmiştir. Amilaz üreticisi mantar türlerine örnek olarak *Aspergillus* cinsinden *A. oryzae*, *A. awamori*, *A. kawachii*, *A. fumigatus*, *A. flavus* ve *A. niger* verilebilir (Farooq et al., 2021).

Amilazların Endüstriyel Kullanım Alanları

Endüstriyel enzim piyasası 7 milyar dolarlık bir değere sahip ve yıllık %4 büyüme oranıyla hızlı bir büyüme göstermektedir (Zhu et al., 2023). Amilazlar katalizledikleri

reaksiyonlar sayesinde endüstriyel uygulama alanları açısından enzim piyasasının büyük kısmını oluşturmaktadır. Gıda endüstrisinde nişastanın sıvılaştırılmasında, yüksek fruktoz içeren şurup ve maltoz imalatında, oligosakkarit karışımlarının imalatında, fırıncılık ve çikolata endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Wang et al., 2020; Farooq et al., 2021). Tekstil endüstrisinde nişasta haşıl maddesinin tekstilden çıkarılmasında (haşıl sökme) ve sıvılaştırmada kullanılır (Mojsov et al., 2012). Biyo-enerji endüstrisinde nişastanın doğrudan etanole fermentasyonunda ve biyoyakıt üretiminde kullanılır (Arya et al., 2022). Bunlar dışında kağıt endüstrisi, deterjan endüstrisi ve medikal endüstri gibi bazı endüstri kolları amilaz enziminin endüstriyel kullanım alanları arasında sayılabilir (Gurkok, 2019; Farooq et al., 2021; Shad et al., 2023).

Deterjan endüstrisi

Önemli endüstriyel alanlardan biri olan deterjan sektörü uzun yıllardır deterjan formülasyonunu geliştirmek ve yıkama performansını artırmak amacıyla çeşitli enzimleri kullanmaktadır. Proteazlar, lipazlar ve selülozlar gibi amilazlar da deterjan endüstrisinde sıklıkla kullanılan enzimlerdir (Gurkok, 2019; Hemşinli, 2022; Yılmaz, 2023; Hemsinli and Gurkok, 2024). Deterjan endüstrisinde en çok tercih edilen proteazlar kan, yumurta, ter ve çim lekeleri gibi protein kaynaklı lekeleri gidermede kullanılırken (Tekin, 2020; Hemsinli and Gurkok, 2024), lipazlar özellikle pamuklu ve polyester karışimli kumaşlardan yağ lekelerinin çıkarılmasında kullanılmaktadır (Kalkan, 2017; Gurkok and Ozdal, 2021). α -Amilazlar deterjan sektöründe büyük bir öneme sahip olup endüstride proteazlardan sonra en çok tercih edilen enzimlerdir. Deterjan formülasyonlarında pirinç, makarna, sos, patates, mısır, çikolata, bebek maması gibi nişasta bazlı lekeleri çıkarmak için kullanılır (Gurkok, 2019; Sharma et al., 2022). Düşük sıcaklıklarda gösterdiği aktiviteden dolayı 1975'ten beri temizlik piyasasındaki sıvı deterjanların %90'ında amilaz enzimi bulunmaktadır. Genellikle mikrobiyal kaynaklı olup çoğunlukla *Bacillus* ve *Aspergillus* 'tan elde edilir (Gupta et al., 2003; Vaidya et al, 2015).

Nişastanın sıvılaştırılması

Nişastanın sıvılaştırılma işleminde enzimler kullanılmaktadır. Enzimler nişasta moleküllerine direkt etki edemez. Enzimatik katalizler sadece jelatinleştirilmiş nişastayı etkilemektedir. Jelatinleşme işlemi sıcaklık, zaman ve molekül boyutuna bağlı olmaktadır. Çözeltilerdeki sıcaklık arttığında nişasta granüllerinin yapısı değişip suyla şişer ve patlar. Sonucunda nişasta jeli oluşur (Brandam et al., 2003). Amiloz ve amilopektin yapısında bulunan α -1,4 bağlarının kırılması ile jelatinleştirilmiş nişasta glukoz, maltoz ve dekstrinlere hızlı bir

şekilde parçalanır. Jelatinleşme sonrasında viskozite artmaktadır. Nişastayı sıvılaştırmak ve viskoziteyi azaltmak için α -amilaz enzimleri kullanılmaktadır (Saini et al., 2017).

Fruktoz şurubu ve maltoz üretimi

Nişasta içeren bitkilerin doğrudan besin kaynağı olarak kullanılmasının yanısıra, kimyasal veya enzimatik olarak nişasta hidrolizatları, glukoz şurupları, fruktoz, nişasta veya nişasta gibi çeşitli farklı ürünlere dönüştürülür (De Baere, 1999). Yüksek fruktoz bulunduran şuruplar, glukoz izomeraz enziminin glukozu hidrolize etmesiyle oluşur. Hidroliz işlemlerinde sırasıyla nişastanın sıvılaştırılması, sakkarifikasyon ve izomerizasyon basamakları gerçekleşir ve glukozlar oluşur (Parker et al., 2010). Nişastanın sıvılaştırılmasında bakteriyel α -amilaz enzimi kullanılırken sakkarifikasyon işlemlerinde fungal α -amilazlar kullanılmaktadır (Goyal et al., 2005).

Nişastanın hidrolizlenmesi ile oluşan maltozlar şeker şurubunun en önemli bileşenini oluşturan disakkaritlerdir. Higroskopik olmamasından dolayı gıdalarda tatlandırıcı olarak kullanılır (Saini et al., 2017).

Gıda endüstrisinde amilazlar

Gıda endüstrisinde amilazlar, nişasta ve karbonhidrat içeren ürünlerin işlenmesinde önemli yere sahiptir. Fırıncılıkta, ekmek ve hamur işleri üretiminde, amilaz mayalanma sürecini hızlandırarak hamurun kabarmasını ve gevşemesini sağlar. Böylece ekmek bayatlamasını önler (Tiwari et al., 2015). Şeker imalatında, amilazlar nişastayı glukozla dönüştürerek şeker üretimini gerçekleştirir. Şekerlemelerin ve tatlıların yapımında, nişasta bazlı şeker ürünlerinin dokusunu ve kıvamını iyileştirir (Gupta et al., 2003). Meyve suyu üretim aşamasında oluşan bulanıklığı giderir (Li et al., 2005). Bira ve alkollü içeceklerin üretiminde, amilaz malttaki nişastayı parçalayarak mayanın fermantasyon için kullanabileceği glukozla dönüştürür (Chen et al., 2023). Nişasta ürünlerinin işlenmesinde, amilaz nişastayı glukoz ve maltoza dönüştürerek bazı ürünlerin tat özelliklerini iyileştirir. Süt bazlı ürünlerin işlenmesinde de kullanılan amilazlar özellikle bazı süt tatlandırıcıları ve yoğurt üretiminde etkilidir. Ayrıca, amilaz enziminin etkisiyle serbest kalan maltodekstrinler, buz kristallerinin oluşumunu yavaşlatarak dondurma ve diğer dondurulmuş gıdaların daha uzun süre taze kalmasını sağlar. Konserve ve hazır gıda ürünlerinin üretim işlemlerinde nişasta ve karbonhidrat içeriklerini işlemek için de amilaz kullanılır (Demirkan et al., 2005; Tatar, 2007; Baltaş, 2012; Hussain et al., 2013).

Biyoyakıt endüstrisi

Dünyada en yaygın biyoyakıt olan etanol nişastalı ve lignoselülozik substratlardan üretilmektedir. Tahıl, patates ve küspe gibi nişastalı maddeler, etanol üretimi için fermente edilebilir hammadde üretmek amacıyla α -amilaz ile muamele edilmektedir (Escaramboni et al., 2018). Nişasta molekülleri mikroorganizma veya α -amilaz tarafından şekere dönüştürülür. *Saccharomyces cerevisiae* mayası, şekeri fermantasyon yoluyla etanole dönüştürür (Mojsov 2012). Nişastalı maddeler, kolaylıkla temin edilebilir oluşu ve ekonomik yönden ucuz olmaları sebebiyle etanol üretiminde substrat olarak sıklıkla tercih edilir (Elyasi Far et al., 2020).

Tekstilde nişastanın giderimi

Nişasta macunu, tekstil sektöründe dokuma işlemi sırasında ipliğe dayanıklılık kazandırmak ve sürtünmeden kaynaklanan iplik kaybını önlemek amacıyla kullanılır. Kumaşın pürüzsüz hale getirilmesi için nişasta tabakası, amilaz enzimi kullanılarak kaldırılır. α -Amilazlar, tekstil endüstrisinde haşıl sökme ve boyama öncesinde nişastanın çıkarılması için kullanılır (Al-Amri et al., 2022).

Kâğıt endüstrisi

Kâğıt endüstrisinde nişastayla kaplı kağıtlar α -amilazlar ile hidroliz edilerek nişasta uzaklaştırılır (Saini et al., 2017). Kaplama proseslerinde kullanılan nişasta, kağıdın yüzeyini yumuşak hale getirerek kağıt yüzeyinin dayanıklılığını artırır. Dolayısıyla, kağıdın yazım kalitesi daha iyi hale gelir. Nişasta viskozitesi bu işlemler esnasında çok yüksek olduğundan mikrobiyal amilazlar kullanılmaktadır (Souza and Magalhães, 2010; Hussain et al., 2013).

Nişasta işleme tesislerinde atık suların arıtılması

Gıda işleme tesislerinin çıkardığı atıklar yüksek oranda nişasta kirliliğine sahiptir. Mikrobiyal amilazlar, gıda işleme sonucu oluşan atık suyun biyoteknolojik arıtımında kullanılır (Aiyer, 2005).

Tıp ve ilaç sektörü

α -Amilazlar, bazı hastalıkların (diabetes mellitus, diş çürümesi, hiperlipidemi vb.) tedavi ilaçlarının geliştirilmesinde bir hedef olarak kullanılır (da Silva et al., 2013). Ayrıca, insan serumu ve idrarındaki α -amilaz aktivitesinin ölçümü pankreatik hastalıkların teşhisinde uygulanan bir yöntemdir (Tran et al., 2014).

Nanopartikül sentezi

Nanoteknoloji, tıp, diş hekimliği, ilaç salınım sistemleri, eczacılık gibi birçok biyomedikal uygulamalar ile çevre ve mühendislik alanlarında yaygın olarak kullanılan gelişmiş bir teknoloji dalıdır. Nanopartiküller (1-100 nm boyutunda), nanoteknolojinin temel yapı taşları olarak görülmektedir. Gümüş, altın, çinko gibi metallerin kullanılmasıyla hazırlanan metalik nanopartiküller geniş kullanım alanına sahiptir. Özellikle gümüş nanopartiküller, göstermiş oldukları antimikrobiyal aktiviteleri nedeniyle sağlık uygulamalarında en çok tercih edilen nanopartiküllerden biridir (Ozdal and Gurkok, 2022a).

Nanopartiküller doğal olarak oluşabilir veya farklı fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler kullanılarak sentezlenebilirler. İlk iki yöntem tehlikeli ve toksik kimyasalların kullanımı, düşük verimlilik ve yüksek sıcaklık-enerji tüketimi gibi dezavantajlara sahiptir (Ozdal and Gurkok, 2022b). Bu nedenle çevre dostu üretim tekniklerine ihtiyaç duyulmaktadır. Yeşil sentez çevre dostu ve biyouyumlu nanopartiküllerin elde edilmesini sağlayan hızlı ve düşük maliyetli bir yöntemdir. Genellikle funguslar, bakteriler, algler ve bitkiler yeşil sentezde kullanılırlar (Ozdal and Gurkok, 2022b). Bitkilerin içerdiği fitokimyasallar da yeşil sentez ile daha kararlı, ekonomik ve geniş uygulama alanına sahip nanopartiküllerin elde edilmesine olanak sağlamaktadır. Bal, polen, propolis ve arı sütü gibi fitokimyasallarca zengin arı ürünleri de yeşil sentez ile nanopartikül elde edilmesine olanak sağlamaktadır (Keskin et al., 2022).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, bazı enzimler kullanılarak da nanopartikül sentezlenebileceği gösterilmiştir. Verma et al. (2022) yaptıkları çalışmada α -amilaz enzimini kullanarak gümüş nanopartikülünün sentezlenebildiğini belirtmiştir. Çalışmalarında ticari saf amilaz enzimini kullanarak gümüş nitratı indirgeyerek kararlı gümüş nanopartikülleri sentezlemişlerdir (Verma et al., 2022).

Farklı bir çalışmada, *A. oryzae* α -amilazı kullanılarak TiO_2 nanopartiküllerinin biyosentezi rapor edilmiştir (Ahmad et al., 2015). Başka bir çalışmada ise alkalifilik bakteri olan *Bacillus horikoshii* AJM-A1 tarafından gümüş nanopartiküllerinin sentezlenebildiği ve dirençli biyofilmlere karşı potansiyel uygulama için α -amilaz ile konjuge edilebileceği gösterilmiştir (Abeleda et al., 2020).

Atık Maddelerin Amilaz Üretiminde Değerlendirilmesi

Küresel nüfustaki artış, gıda arzına olan talebin yanı sıra düzenli olarak büyük miktarda gıda atığı üreten gıda üretim endüstrilerinin de önemli ölçüde artmasına neden olmuştur. Tarımsal endüstriyel atıklar, eski çağlardan bu yana tüm dünyada büyük ilgi görmüş, bu tür atıklar genellikle çöpe atılmakta veya yakılmakta ve insan sağlığı ve çevre için tehdit

oluşturmaktadır. Bu durum her zaman ciddi bir endişe kaynağı olmuştur. Bununla birlikte, gıda atıkları karmaşık karbonhidrat, protein, lipid, vitamin, mineral ve liflerin önemli bir kaynağıdır. Dolayısıyla biyoyakıt, enzim, biyoaktif bileşik, biyolojik olarak parçalanabilen plastik üretimi gibi çeşitli endüstriyel amaçlara yönelik hammaddelerin imalatına yardımcı olur. Bu nedenle gıda atıklarının çevre sorunlarını azaltacak katma değerli ürünlere dönüştürülmesi gerekmektedir (Naik et al., 2023).

Substrat olarak %1,5 nar kabuğunun kullanıldığı bir çalışmada *A. terreus* SS_RS-NE suşu tarafından 5 günlük inkübasyon süresinde 30 °C sıcaklıkta ve pH 6,0'da 339 U/mL verimle amilaz enzimi aktivitesi gözlemlenmiştir. Üretilen ham enzim %80 amonyum sülfatla kısmen saflaştırılmış ve ardından diyaliz uygulanmıştır. Enzim aktivitesi, amonyum sülfat çökeltme ve diyaliz kullanılarak sırasıyla 1246 U/mL ve 2411 U/mL olmuştur (Ahmed et al., 2020).

Patates kabuğu atıklarının (PPW) yönetimi sorunu, Avrupa'daki patates endüstrilerinde önemli endişelere neden olmakta, dolayısıyla entegre, çevre dostu bir çözümün belirlenmesi ihtiyacını ortaya koymaktadır. Patates kabuğu, patates işleme tesislerinden kaynaklanan sıfır değerli bir atıktır (Arapoglou et al., 2010).

Patates atıklarının hidrolize edilmesinin araştırıldığı bir çalışmada anaerobik sindirim süreci yoluyla patates kabuklarından biyogaz üretiminin artırılması amaçlanmıştır. Araştırmada, *Rhizopus stolonifer* mantarı tarafından patates atıklarında amilaz üretimi için optimal koşullarının 30 °C sıcaklıkta, 6,0 pH'da, 3 g/L maya özütü konsantrasyonu ve 2 mL inokulum konsantrasyonu ile 8 gün inkübasyon süresi olduğu rapor edilmiştir (Almuhayawi et al., 2023).

Anto et al. (2006) substrat olarak buğday kepeği ve pirinç gevreği üretim atıklarını kullanarak *B. cereus* MTCC 1305 tarafından katı hal fermantasyonu altında α -amilaz üretimini araştırmışlardır. En yüksek enzim üretiminin buğday kepeğinde 94 U/g aktiveyle olduğunu gözlemlenmişlerdir. Üretim parametrelerinde inokulum konsantrasyonunun %10 ve substrat:nem oranını 1:1 olarak optimize etmişlerdir. Ekledikleri farklı karbon kaynakları arasında, glukoz 122 U/g enzim üretimi göstermiştir. Optimum α -amilaz enzim aktivitesi 55 °C ve pH 5'te gözlenmiştir. 75 °C'de enzim, 55 °C'ye kıyasla %90 aktivite göstermiştir.

A. niger suşu ile çay atıklarının kullanıldığı bir çalışmada glukoamilaz üretiminin 30 °C'de 96. saatte gerçekleştiği bildirilmiştir. Yine bu çalışmada kullanılan farklı karbon kaynakları arasında en iyi glukoamilaz aktivitesinin sakkarozda olduğu ve farklı azot kaynaklarından da malt ekstresinin yüksek aktiviteye neden olduğu belirtilmiştir (Selvakumar et al., 1998).

B. licheniformis DM-03 ile yapılan bir çalışmada patates kabuğundan 72 saatlik inkübasyon sonunda alkalın α -amilaz enzimi üretilmiştir (Mukherjee et al., 2009).

Saha ve Mazumdar (2019), amilaz enzim üretimi için Kuzey Üniversitesi yakınlarında atık ve yerel pazardan topladıkları patates kabuğu, şeker kamışı küspesi, limon türevi olan mosambi kabuğu, portakal kabuğu, mısır kepeği, muz kabuğu, hindistan cevizi kabuğu, su sümbülü, buğday kepeği ve pirinç kepeği gibi tarımsal kalıntıları karbon kaynağı olarak kullanmıştır. *B. cereus* amy3 izolatının kullanıldığı çalışmada en yüksek aktivite 3122 IU/mL ile %1,75 mosambi kabuğunda görülmüştür. Optimum pH 7,0 olarak belirlenmiş ve optimum inkübasyon sıcaklığı 37 °C olarak kaydedilmiştir. İnkübasyon süresi 48. saatte belirlenmiş ve inokulum konsantrasyonunun %3 olduğu bildirilmiştir.

Al-awsy et al. (2017) yaptıkları bir çalışmada amilaz üretimini arttırmak amacıyla *B. licheniformis* CT5, *B. subtilis* CT22 ve *B. licheniformis* CT39 suşlarının besi ortamlarına %1 oranında buğday kepeği, kırık pirinç, buğday samanı, patates kabuğu ve pirinç kabuğu eklemişlerdir. Her üç bakterinin de en yüksek amilaz üretim aktivitesinin patates kabuğu varlığında olduğunu belirterek amilaz aktivitelerinin *B. licheniformis* CT5'in 59.3 U/mL, *B. subtilis* CT22'nin 87.2 U/mL ve *B. licheniformis* CT39'un 51.6 U/mL olduğunu bildirmişlerdir.

Patates Kabukları

Patates mahsulü, dünyanın en büyük üçüncü mahsulüdür ve gelişmekte olan ülkelerde hayati bir besleyici gıda kaynağı olarak kabul edilmektedir. Son zamanlarda, patates endüstrisinin büyüyen gelişimi, patates üretimindeki küresel artışa bağlanmaktadır ve sonuç olarak dünya çapında gıda güvenliğini garanti etmektedir. Yani, patateslerin işlenmesi sırasında büyük miktarlarda patates kabuğu atıkları oluşurken, patates ağırlığının yaklaşık %8'i atık madde olarak üretilmektedir. Dünya çapında yılda yaklaşık 370 milyon ton patates kabuğu atığının ortaya çıktığı bildirilmiştir ve patates endüstrilerinden kaynaklanan bu atıklardaki artış, ciddi çevre ve bertaraf sorunlarına yol açmaktadır (Almuhayawi et al., 2023).

Tablo 1. Patates Kabuğu Atıklarının (PPW) Kimyasal Bileşimi (Rodríguez-Martínez et al., 2023)

Bileşen	İçerik (g/100 g kuru PPW)
Glukan	4,42 ± 1,32
Nişasta	46,18 ± 0,44
Ksilan	5,72 ± 0,10
Arabinan	0,87 ± 0,10
Asetil grupları	0,33 ± 0,02
Lignin	3,12 ± 0,45
Üronik asitler	2,21 ± 0,23
Protein	10,88 ± 0,16
Kül	7,02 ± 0,09
Ekstraktlar	6,67 ± 0,24
Nem	1,14 ± 0,31

Priestia megaterium

P. megaterium, Gram-pozitif bir bakteri türüdür. Önceden *B. megaterium* olarak bilinen bu bakteri 1884 yılında De Bary tarafından keşfedilmiştir (De Bary, 1884). $2.5 \times 10 \mu\text{m}$ 'ye kadar olan büyük boyutuyla “megaterium” kelime anlamıyla “büyük canavar” demektir (Vary et al., 2007).

Gupta et al. 2020 yılında *Bacillus* türlerinin evrimsel ilişkilerini ve sınıflandırmasını netleştirmek amacıyla, 300'den fazla *Bacillus* genomu üzerinde kapsamlı bir filogenetik ve karşılaştırmalı analiz gerçekleştirmiştir. Birden fazla genom ölçeğinde filogenetik ağaçları yeniden oluşturarak *Bacillus* türlerinin farklı monofiletik kladlarını tanımlamış ve genomların protein dizileri üzerinde detaylı analizler yaparak her bir tanımlanan kladın özgü Conserved Signature Indels'leri (CSI) belirlemişlerdir. Yeniden oluşturulan ağaçlarda, çoğu *Bacillus* türünün sürekli olarak 17 yeni belirgin klad oluşturduğunu göstermişlerdir. Yaptıkları çalışmada güçlü filogenetik ve moleküler kanıtlara dayanarak, bu 17 *Bacillus* türü kladının yeni cinsler olarak tanınması gerektiğini önermişlerdir. Bu türlerden biri olan *Megaterium* türüne *Priestia* cins isminin verilmesini önermişlerdir. Geçerli olarak yayınlanmış adlara sahip *Bacillus* türleri *B. megaterium*, *B. abyssalis*, *B. aryabhatai*, *B. endophyticus*, *B. filamentosus*, *B. flexus* ve *B. koreensis*'tir.

Liu et al., (2023), yaptığı bir çalışmada *P. megaterium* P-NA14 ve *P. megaterium* D-HT207 sırasıyla patates yumrusu ve dendrobium (orkide) sapından izole edilmiştir. Her iki

suşun antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmış ve *P. megaterium* P-NA14'ün dendrobium patojeni üzerinde daha güçlü bir inhibisyon etkisi sergilerken, *P. megaterium* D-HT207'nin patatesin patojeni üzerinde daha güçlü bir inhibisyon etkisi sergilediğini göstermiştir.

Amilaz Enzimiyle Daha Önce Yapılan Çalışmalar

Enzim üretiminde farklı mikroorganizmalar kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır (Ivanova et al., 2001). Bu mikroorganizmalardan *B. megaterium*, *B. thuringiensis*, *B. licheniformis*, *B. alvei*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. circulans*, *B. macerans*, *B. stearothermophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. globisporus* ve *B. coagulans* bakteri izolatlarının nişasta parçalayabilen enzimlerin üretilmesinde etkili olduğu bildirilmiştir (Claus and Berkeley, 1986).

Chhajed et al. (2023), yer fıstığı tarlası topraklarından izole ettikleri bakterinin *Bacillus* sp. olduğunu doğrulamış ve amilaz üretiminde pH, sıcaklık, inkübasyon süresi ve karbon kaynakları gibi çeşitli üretim parametrelerinin etkilerini test etmişlerdir. Karbon kaynağı olarak glukoz, azot kaynağı olarak maya ekstraktını kullanmışlardır. Optimum inkübasyonu 48 saat olarak tespit etmişlerdir. Amilaz üretimi için en uygun ortamın 39 °C sıcaklıkta ve 6,5 pH değerinde olduğunu bildirmişlerdir.

Almuhayawi et al. (2023), atık patates kabuklarından amilaz üretimi için yaptıkları çalışmada *R. stolonifer* mantar türü ile çalışıp maksimum enzim üretiminin 30 °C'de 62,65 U/mg protein olduğunu kaydetmişlerdir. Kültür ortamının pH değerinin 4,0 ile 6,0 arasında artmasıyla amilaz veriminin arttığını bildirmişlerdir. En yüksek amilaz üretimi olan 64,50 U/mg protein için optimum periyoda inkübasyonun 8. gününde ulaşılmıştır. Azot kaynağı olarak maya ekstraktının en yüksek amilaz üretimine sahip en iyi substrat (66,70 U/mg protein) olduğunu gözlemlemişlerdir. Maya ekstraktının *R. stolonifer* tarafından amilaz üretimi üzerindeki etkisi araştırılmış optimum konsantrasyonunun 79,15 U/mg aktivite ile 3 g/L olduğunu belirtmişlerdir. En yüksek amilaz üretimi (91.17 U/mg) 2 mL'lik inokulum kullanıldığında elde edildiğini rapor etmişlerdir.

Niyomukiza et al. (2022), *B. subtilis* W3SFR5 ile yaptıkları çalışmada amilaz enzimini 30-50 °C ve pH 6-9 arasında üretmişlerdir. Kısmen saflaştırılmış *B. subtilis* W3SFR5 amilazının moleküler ağırlığını 65 kDa ve maksimum özgül aktivitesini 216.02 U mg-L olarak bulduklarını bildirmişlerdir. Enzimin optimum sıcaklığını 60 °C, pH değerini ise 9,0 olarak belirlemişlerdir. W3SFR5 amilazını, 50-70 °C sıcaklıkta ve pH 7,0-9,0 aralığında aktif olarak stabil bulmuşlardır. Ayrıca, 5 mM Fe²⁺ W3SFR5 amilaz aktivitesini artırdığını belirtmişlerdir. Enzim aktivitesinin Tween 20 varlığında %4,9 artış gösterirken Tween 80 varlığında %26 oranında arttığını gözlemlemişlerdir. EDTA ve SDS varlığında ise amilaz aktivitesinde düşüş

olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca saf hale getirilen enzimin, ticari olarak bulunan çamaşır deterjanlarıyla uyumlu olup olmadığını göstermek için incelemişlerdir. W3SFR5 amilazının, ticari sıvı deterjanların tümüne karşı mükemmel stabilite gösterdiğini ve 37 °C’de 30 dakika inkübasyon sonrasında aktivitesinin %90’dan fazlasını koruduğunu bildirmişlerdir.

Naramchimeg et al. (2019), *B. subtilis* M4 suşundan amilaz enziminin üretimi üzerine inkübasyon süresi, inkübasyon sıcaklığı ve ortam pH’sının etkileri belirlenmiştir. Bakterinin optimum inkübasyon sıcaklığı 35 °C’de tespit edilirken enzimin aktivite değeri 0,557 U/mL olarak bulunmuştur. Optimum pH değerinin 7,0 olduğu belirlenmiş ve aktivite değeri 0,646 U/mL olarak kaydedilmiştir. Bakterinin optimum inkübasyon süresi 72 saat olarak belirlenmiş ve enzim aktivite değerinin 0,799 U/mL olduğu tespit edilmiştir.

Padmavathi et al. (2018), yaptığı bir çalışmada lor, süt ve sığır kolostrumundan elde ettikleri probiyotik laktik asit bakterilerinden amilaz üretimi gerçekleştirmişler ve bu enzimi kısmen saflaştırmışlardır. Yapılan çalışmada en yüksek amilaz aktivitesinin *Lactobacillus sp.* G3_4_1TO2 izolatına ait olduğu belirlenmiştir ve enzimin aktivite değeri 88,9 U/mg olarak kaydedilmiştir. Sonuç olarak bu izolatın hem probiyotik bir bakteri olduğu hem de amilaz enzimi üretme yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir.

Paul et al. (2017), yaptıkları bir çalışmada *Bacillus sp.* MB6 suşundan amilaz enzim üretimini araştırmışlardır. Enzim üretim şartları belirlenmiş ve pH değerinin 6,0, sıcaklığın 37 °C ve inkübasyon süresinin 48 saat olduğunu belirtmişlerdir. Enzim aktivitesinin optimum pH değerinin 6,0 ve optimum sıcaklık değerinin 55 °C ve optimum reaksiyon süresinin 30 dakika olduğunu bildirmişlerdir.

Michelin et al. (2010), *Paecilomyces variotii* mantarından elde ettikleri α -amilaz enzimini saflaştırmış ve molekül ağırlığını 75 kDa olarak bulmuştur. Enzimin optimum sıcaklık değerinin 60 °C, optimal pH değerinin ise 4,0 olduğunu bildirmişlerdir. Bunlara ek olarak enzim aktivitesini artıran iyonların Co^{+2} ve Ca^{+2} olduğunu belirlemişlerdir.

Chakraborty et al. (2009), az çalışılmış deniz *Streptomyces sp.*’den amilaz ürettiklerini bildirmişlerdir. Enzimin %2 sakkaroz, %0,15 malt ekstraktı ve %0,35 pepton içeren bir ortamda üretildiğini belirtmişlerdir. Enzim üretimi ve aktivitesi için en uygun sıcaklığın 45 °C olduğunu ve enzimin 85 °C’de aktivitesinin neredeyse %50’sini koruduğunu belirlemişlerdir. Enzim aktivitesinin ticari deterjanlar ve oksidanların varlığında dahi korunduğunu gözlemlemişlerdir. Kısmen saflaştırılmış enzim aktivitesinin 113,64 U/mg olduğunu kaydetmişlerdir. SDS-PAGE ve zimogram aktivite boyamasının, 66 kDa’lık bir moleküler ağırlığa karşılık gelen tek bir bant gösterdiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca elde ettikleri α -amilazın, ticari deterjanların varlığında ve ön inkübasyona tabi tutulduğunda orijinal aktivitesinin %35-70’ini koruduğunu bildirmişlerdir.

Amilaz Üretiminde *P. megaterium* İlgili Yapılan Çalışmalar

Fincan ve Enez (2022) yaptıkları çalışmada bakteriyi Ergani Makam Dağı'ndan izole etmişler ve 16S rRNA analizi sonucunda izolat *B. megaterium* MD-1 olarak tanımlanmıştır. Bakteri ve enzim üretimi için en uygun koşulları 48 saat, 35 °C ve pH 7,0 olarak belirlemişlerdir. Maksimum enzim aktivitesini 40 °C ve pH 8,0'da optimize etmişlerdir. Besin maddesine ilave edilerek çeşitli karbon ve azot kaynaklarının enzim üretimi üzerindeki etkilerini araştırmışlar sonuç olarak karbon kaynaklarının, özellikle sakkaroz, fruktoz ve laktozun enzim üretimini %75 oranında inhibe ettiğini; glukoz, galaktoz ve nişastada ise herhangi bir değişikliğin olmadığını bildirmişlerdir. Ayrıca azot kaynaklarından üre ve sodyum nitratın enzim üretimi üzerinde inhibe edici bir etkisi olduğunu; pepton, tripton, amonyum sülfat, amonyum klorür, amonyum nitrat ve maya özütünün ise böyle bir etki göstermediğini belirtmişlerdir. En yüksek amilaz üreten azot kaynaklarının pepton ilavesi ile elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Abimbola (2022) yaptığı çalışmada manyok çöplüğü topraklarından *B. megaterium*-ISA08 suşunu izole etmiştir. Bakterinin en yüksek amilaz üretim ve aktivitesinin 60 °C sıcaklıkta, pH 6,0 - 8,0'de, 140 rpm'de, karbon kaynağı olarak patates nişastası ve azot kaynağı olarak maya özütü kullanıldığında görüldüğünü belirlemiştir. Optimize edilmiş koşullarda maksimum ekstraselüler α -amilaz üretiminin 284 U/mL ve özgül aktivite 22.81 U/mg gösterdiğini bildirmiştir. Tween 20 ve Tween 80 reaktiflerinin varlığında amilaz üretiminde artış olduğunu gözlemlemiştir.

Rodrigo et al. (2022) çalışmalarında *B. megaterium* ATCC 14581 izolatının amilaz üretim kapasitesinin belirlenmesini amaçlamışlardır. Bu doğrultuda amilaz üretimini optimize etmek için farklı inkübasyon sürelerini test etmişlerdir. En iyi enzim üretimin 24 saatte 30 °C, 150 rpm'de ve başlangıç pH değerini 7,0 olarak bulmuşlardır. Enzim aktivitesinin en iyi 45 °C'de olduğunu bildirmişlerdir.

Tablo 2. *P. megaterium* Bilimsel Sınıflandırılması

Alem	Bacteria
Şube	Bacillota
Sınıf	Bacilli
Takım	Bacillales
Familya	Bacillaceae
Cins	<i>Priestia</i>
Tür	<i>P. megaterium</i>

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Mikroorganizmalar

Tez çalışmasında kullanılan bakteri izolatları, pazar ve manavdan temin edilen patatesten izole edilmiştir. Patatesler buzdolabında ve oda sıcaklığında olmak üzere iki farklı yerde eş zamanlı olarak 15 gün boyunca bekletilmiştir. Süre sonunda patates parçaları steril cam tüplerde bulunan distile suya konulmuştur. Belirli oranlarda seyreltmeler yapılmıştır.

Kullanılan cihazlar

Tablo 3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Cihazlar	Marka/model
Çalkalamalı inkübatör	Binder BD53
Buzdolabı	Siemens KS 42431
Derin dondurucu	Arçelik
pH metre	InoLab pH730 wtw Series
Manyetik karıştırıcı	Daihan Scientific MSH 20A
Hassas terazi	Enver
Spektrofotometre	UV mini-1240 UV-VIS Shimadzu
Su banyosu	CB2 5Q2, Grant Instruments Ltd., Barrington
Santrifüj	Hereus Christ Hereus Christ UJ III
Etüv	Elektro-ma
Distile su cihazı	GFL 2004
Vorteks	Heidolph Reax Top
Otoklav	HMC Hirayama Hiclava HV-50L
Mikroskop	Olympus Europa SE & CO. KG
Steril Kabin	Esco AC2-4E1
Soğutmalı santrifüj	Zentrifugen D-78532

Kullanılan kimyasallar

Tablo 4. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Kimyasallar	Marka
NaOH (SodyumHidroksit)	Carlo Erba
Tris-HCl	Merck
CH ₃ COOH (asetik asit)	Merck
NaCl (Sodyum Klorür)	Merck
CH ₃ COONa (sodyum asetat)	Carlo Erba
Glisin	Merck
Gliserol	Merc
Tris	Merck
CuSO ₄ .5H ₂ O (Bakır Sülfat)	Merck
HCl (Hidroklorik Asit)	Merck
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Amonyum Sülfat)	Teknik
ZnSO ₄	Sigma Aldrich
MnSO ₄	Sigma Aldrich
MgSO ₄	Sigma Aldrich
FeSO ₄	Sigma Aldrich
CoCl ₂	Sigma Aldrich
AgNO ₃	Sigma Aldrich
Na ₂ SeO	Sigma Aldrich

Kullanılan çözelti ve tamponların hazırlanışları

Gliserol stok çözeltisi (%25): Bakterilerin saklanması amacıyla 1,4 g Nutrient Broth (NB) distile suda çözündükten sonra %25 olacak şekilde gliserol eklenmiştir. Son hacim 100 mL'ye tamamlanarak stok çözelti hazırlanmıştır. Önceden steril edilmiş Eppendorf tüplerine 1,5 mL çözeltiden aktarılmıştır.

DNS (Dinitro salisilik asit) (%1): Amilaz enzim reaksiyonu sonucu açığa çıkan indirgen şeker miktarını tespit etmek ve reaksiyonu durdurmak amacı ile kullanılmıştır. 1 g DNS 50 mL deiyonize suyun içerisinde çözöldükten sonra 30 g Na-K-Tartarat ve 20 mL 2 N NaOH eklenerek manyetik karıştırıcıda iyice karıştırılmıştır. Son hacim, distile su eklenerek 100 mL'ye tamamlanmıştır (Miller, 1959).

Niştasta (Substrat) solüsyonu (%1): 1 g çözünebilir niştasta 100 mL pH 7 sodyum fosfat tamponu içerisinde çözünerek hazırlanmıştır.

Lügol solüsyonu: Nişastanın varlığını göstermek için kullanılan solüsyondur (Valls et al, 2012). %1 çözünebilir nişastanın bulunduğu nişastalı nutrient agar (NNA) besiyerinde amilaz aktivitesini tespit etmek amacı ile kullanılmıştır.

Sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi (2N): Besiyerlerinin pH'sını ayarlamak için 2 N konsantrasyonunda hazırlanmıştır. 20 g NaOH 200 mL distile su içerisinde çözündürüldükten sonra son hacim 250 mL'ye tamamlanmıştır.

Hidroklorik asit (HCl) çözeltisi (2N): Besiyerlerinin pH'sının ayarlanması için 2N konsantrasyonunda hazırlanmıştır. %37'lik HCl'den 16,56 mL alınarak son hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Hidrojen peroksit (H₂O₂) çözeltisi (%3): Katalaz enziminin belirlenmesinde kullanılan çözeltidir. 3 mL H₂O₂ 100 mL distile suya eklenerek hazırlanmıştır.

Potasyum hidroksit (KOH) çözeltisi (%3): Bakterilerin Gram (-) veya Gram (+) özelliklerinin belirlenmesi amacıyla kullanılan bir çözeltidir. 100 mL distile suya 3 g KOH eklenerek hazırlanmıştır.

Kullanılan tamponların hazırlanması

Sodyum fosfat tamponu (100 mM, pH 7,0): 15,487 g Na₂HPO₄.7H₂O ve 5,827 g NaH₂PO₄.H₂O distile su içerisinde çözündürülerek 100 mM konsantrasyonunda hazırlanmıştır. Son hacim 1 L'ye tamamlanmıştır.

Glisin NaOH tamponu (50 mM, pH 9,0): 800 mL distile su içerisinde 3,75 g glisin ve 0,35 g NaOH karıştırılmıştır. Çözeltinin son hacmi 1 L'ye tamamlanmıştır.

Asetik asit-sodyum asetat tamponu (50 mM): 4,17 g asetik asit ile 0,51 g sodyum asetat 800 mL distile suda çözündürülmüş ve oluşan karışım 1 L'ye tamamlanmıştır.

Tris-HCl tamponu (50 mM, pH 7,0): 6,06 g tris ve 1,67 g HCl 800 mL hacmindeki distile suda karıştırılmıştır. Karışım 1 L'ye tamamlanmıştır.

SDS-PAGE solüsyonları

Ayırıcı jel tamponu: 8,5 g tris ve 0,4 g SDS, 80 mL deiyonize suda çözündürülmüştür. Daha sonra HCl ile pH değeri 8,9'a ayarlanarak çözeltinin son hacmi 100 mL olana kadar deiyonize su eklenmiştir. Karışım filtrelenerek 4 °C'de saklanmıştır.

Yığılma jel tamponu: 80 mL distile su içerisinde 5,1 g tris ve 0,4 g SDS çözündürülmüştür. pH değeri HCl ile 6,7 olarak ayarlanmış ve son çözelti hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır. Karışım filtrelenerek 4 °C'de saklanmıştır.

Amonyum persülfat (APS) (25%): 4 mL distile suda 1 g APS çözündürülerek hazırlanmıştır.

Yürütme tamponu (10X): 10 g SDS, 144 g glisin ve 30 g tris 900 mL distile su içerisinde çözündürülerek HCl ile pH 8,3'e ayarlanmıştır. Çözeltinin son hacmi 1 L'ye tamamlandıktan sonra filtre edilerek 4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Örnek tamponu (4X): Bir miktar bromofenol blue ile 2 mL %20 SDS, 1 mL gliserol 1 mL 1 M tris-HCl (pH 7) karıştırılarak oda sıcaklığında saklanmıştır. Son konsantrasyonun %20 olması dikkat edilerek karışıma kullanılmadan önce β -merkaptoetanol ilave edilmiştir.

Coomassie brilliant blue boya solüsyonu (0,1–0,5 μ g/track): 450 mL metanolde 2,5 g Coomassie BrilliantBlue R-250 çözündürülmüştür. Elde edilen çözeltiye 70 mL asetik asit ilave edilerek son hacim su ile 1 L'ye tamamlanmıştır. Hazırlanmış olan boya karanlık şişeye konularak oda sıcaklığında saklanmıştır.

Boya uzaklaştırma solüsyonu: 250 mL metanol ile 75 mL asetik asit karıştırılarak son hacim suyla 1 L'ye tamamlanmıştır. Hazırlanmış olan boya karanlık şişede oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Kullanılan besiyerleri

Nutrient broth (NB): Bakterilerin izolasyonu ve geliştirilmesinde kullanılmıştır. 8 g NB su içerisinde manyetik karıştırıcıda çözündürülmüştür. 121 °C'de 15 dk 1,5 atm basınçla sterilize edilmiştir.

Nutrient agar (NA): Bakterilerin katı ortamda büyümesi ve geliştirilmesi amacıyla kullanılmıştır. 20 g NA distile su içerisinde çözündürüldükten sonra son hacmi 1 L'ye tamamlanmıştır. 121 °C'de 15 dk 1,5 atm basınçta sterilize edilmiştir. 45-50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülerek hazırlanmıştır.

Nişastalı nutrient agar (NNA): İzolatların amilaz aktivitesinin taranmasında kullanılmıştır. 20 g NA 1 L distile suda çözölmüş, %1 oranında (10 g) çözünebilir nişasta eklenmiş ve 15 dakika 121 °C'de 1,5 atm basınçta sterilize edilmiştir. 50 °C'ye soğutularak steril petri kaplarına aktararak hazırlanmıştır.

Sıvı amilaz üretim ortamı: İzolatların kantitatif amilaz aktivite tayinlerinde sıvı besiyeri olarak kullanılmıştır. 3 g maya özütü ve 10 g çözünebilir nişasta distile su içerisinde çözölmüş ve hacmi 1 L'ye tamamlanmıştır. Daha sonra 250 mL'lik erlenlere 100'er mL aktarılıp, 15 dakika 121 °C'de 1,5 atm basınçta steril edilmiştir.

Tryptic soy broth (TSB): Bakterinin çoğaltılması için aşı kültürün oluşturulması amacıyla kullanılmıştır. 30 g TSB 1 L distile su içerisinde çözündürülmüş 100 mL'lik erlenlere 25 mL hacminde dağıtılmıştır. 121 °C'de 15 dk 1,5 atm basınçla sterilize edilmiştir.

Tryptic soy agar (TSA): Bakterilerin izole edilmesi ve geliştirilmesi amacı ile kullanılmıştır. 40 g TSA son hacmi 1 L olacak şekilde distile suda çözündürülmüştür. 15 dakika 121 °C'de 1,5 atm basınçta steril edilmiştir. Besiyeri 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petri kaplarına aktarılmıştır.

Tribütirin agar (TBA): Lipolitik aktivitenin belirlenmesinde kullanılan TBA besiyeri için son hacmi 1 L olacak şekilde 10 g gliseril tribüirat, 5 g pepton, 15 g agar ve 3 g maya özütü eklenmiştir. Daha sonra 15 dakika boyunca 121 °C sıcaklıkta ve 1,5 atm basınçta sterilize edilmiştir. Besiyeri 50 °C'ye kadar soğutulmuştur. Ardından steril petri kutularına aktarılmıştır.

Selülozlu agar (CMC-A): Kalitatif selüloz enzim tayininde kullanılmıştır. 20 g NA ve 10 g karboksimetil selüloz (CMC) saf su ile 1 L'ye tamamlanmıştır. 121 °C'de 1,5 atm basınçla 15 dakika steril edilmiştir. Sterilizasyon işlemi sonrasında besiyeri steril petri kaplarına aktarılmıştır.

Skim milk (yağsız süt tozu) agar (SMA): Kalitatif proteaz aktivitelerinin incelenmesinde kullanılmıştır. 20 g NA ile 10 g skim milk 800 mL distile suda çözündürülmüştür. Karışım 1 L'ye tamamlandıktan sonra sterilizasyon işlemi için 1,5 atm basınçlı 121 °C'de 15 dakikaya ayarlanmış olan otoklava konulmuştur. Sterilizasyon işlem sonrasında besiyeri steril petrilere aktarılmıştır.

Asparaginaz testi için kullanılan besiyeri: Son hacmin 1 L olması göz önünde bulundurularak 20 g NA, 10 g asparagin ve 0,018 g fenol kırmızısı (phenol red) distile su içerisinde çözündürülmüştür. 121 °C sıcaklıkta 1,5 atm basınçla 15 dakika steril edilmiştir. Sterilizasyon işleminden sonra besiyeri petri kutularına aktarılmıştır.

Glutaminaz testi için hazırlanan besiyeri: 20 g NA, 10 g glutamik asit ve 0,018 g fenol kırmızısı saf su ile 1 L hacminde hazırlandı. Hazırlanan besiyerleri sterilizasyon işlemi için otoklava konulmuştur. 121 °C sıcaklıkta 15 dakika steril edilmiştir. Sonrasında steril petrilere aktarılmıştır.

D-Ksiloz (D-Xylose) testi için besiyeri: Saf mikroorganizma kültürlerinin fermentasyon reaksiyonlarını belirlemek amacıyla kullanılmıştır. 0,8 g NB, 1 g D-ksiloz ve 0,0018 g fenol kırmızısı distile su içerisinde hazırlanarak son hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır. Besiyerinin pH'sı 7,4 olarak ayarlanmıştır. Cam tüplere 5'er mL aktarılmıştır.

1,5 atm basınçlı 121 °C sıcaklıkta 15 dakika steril edilmiştir. Ekim yapılabilmesi için cam tüp içerisinde bulunan steril besiyerlerinin soğuması beklenmiştir.

Myo-İnositol testinde kullanılan besiyeri: Bakteri izolatlarının fermentasyon reaksiyonlarını belirlemek amacıyla kullanılmıştır. 0,0018 g fenol kırmızısı, 1 g myo-inositol ve 0,8 g NB tartılarak distile su içerisinde karıştırılmıştır. Karışımın son hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır. Ardından tüplüklerde hazırlanan her bir cam tüpe 5 mL besiyeri eklenmiştir. Tüplerin ağzıları kapatıldıktan sonra otoklava konulmuştur. 1,5 atm basınçta 121 °C sıcaklıkla 15 dakika steril edilmiştir. Sterilizasyon sonrası soğumaya bırakılmıştır.

Maltoz testi için besiyeri: Bakteri izolatlarının fermentasyon reaksiyonlarını tespit etmek için kullanılmıştır. 80 mL saf su içerisinde çözündürülen 0,8 g NB'li ortama 1 g maltoz ve 0,0018 fenol kırmızısı ilave edilerek 100 mL'ye tamamlanmıştır. Besiyeri 7,4 pH'ya ayarlanmış ve cam tüplere mikropipetlerle 5'er mL aktarılmıştır. Sterilizasyon işlemi için 121 °C 1,5 atm basınçlı 15 dakikaya ayarlanmış otoklava konulmuştur. Otoklavdan çıktıktan sonra besiyerleri soğumaya bırakılmıştır.

L-Arabinaz testinde kullanılan besiyeri: Saf bakteri kültürlerinin fermentasyon yapıp yapmadığını belirlemek için kullanılmıştır. Distile su içinde 0,8 g NB, 1 g L-arabinoz ve 0,0018 fenol kırmızısı çözündürülerek karışım 100 mL'ye tamamlanmıştır. Besiyeri pH metre ile 7,4'e ayarlanmıştır. Cam deney tüplerine 5'er mL aktarıldıktan sonra 1,5 atmosfer basınçla 121 °C'de 15 dakika steril edilmiştir. Hemen sonrasında besiyerleri soğumaya bırakılmıştır.

Üreli NA besiyeri: Üreyi hidrolize eden suşların belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır. 20 g NA ve 0,018 g fenol kırmızısı son hacmi 1 L olacak şekilde distile suda çözündürülmüştür. Ardından 1,5 atm basınçla 121 °C'de 15 dakika boyunca steril edilmiştir. Sterilizasyon sonrası 50 °C'de %20'lik 20 mL üre katılaşmamış besiyerine filtre edilerek eklenmiştir. Steril petri kutularına aktararak soğutulmuş ve katılaşması sağlanmıştır.

Yumuşak agar besiyeri: Saf bakteri kültürlerinin hareket edebilme özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. 2 g NA 100 mL distile su içerisinde çözündürülmüş ve cam deney tüplerine eşit miktarda aktarılmıştır. 121 °C'de 1,5 atm basınçla 15 dakika steril edilmiştir.

Kanlı agar: Bakterilerin kan hücrelerini parçalayabilme (hemoliz) aktivitelerinin belirlenmesi için hazır %5 koyun kanlı agar besiyeri kullanılmıştır.

Nanopartikül sentezi için kullanılan besiyeri: 8 g NB, 1 g KNO₃, 5 g maya özütü, 10 g çözünebilir nişasta son hacim 1 L olacak şekilde distile su ile karıştırılmıştır. 250 mL'lik

erlenlere 100'er mL eklenmiştir. Sterilizasyon işlemi için 121 °C 1,5 atm basınçlı 15 dakikaya ayarlanmış otoklava konulmuştur. Sterilizasyon sonrası besiyerleri soğumaya bırakılmıştır.

Yöntem

Bakterilerin izolasyonu

Bakteri izolasyonu için yaklaşık 15 gün boyunca eş zamanlı olarak oda sıcaklığında ve buzdolabında beklemiş olan patates parçaları steril cam tüpler içerisinde bulunan distile suda karıştırılmış, çeşitli oranlarla seyreltmeler yapılmıştır. NA besiyeri bulunan petrilere damla yolu ile ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petrilere, 30 °C'ye ayarlanmış etüvde 3 gün bekletildikten sonra büyümesi gerçekleşen mikroorganizmalar, amilaz aktivitesi için taranmıştır.

Bakterilerin saflaştırılması ve saklanması

NA besiyerinde gelişen kültürlerden farklı oldukları düşünülen koloniler izole edilmiş ve NA besiyerlerine ekimleri yapılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan kültürler gliserol stoklarda -80 °C'de saklanmıştır.

Amilaz üreten bakterilerin taranması

Amilaz enzimini üreten mikroorganizmaların taranması için, %1 çözünebilir nişasta içeren NNA besiyerlerine çizgi ekim tekniği ile ekim yapılmıştır. Petri kapları 30 °C'lik etüvde 1-3 gün inkübasyona bırakılmıştır (Singh et al., 2021). Büyüdüğü gözlenen bakteriler lügol solüsyonu ile boyanmıştır. Amilaz enzim sentezi yaparak nişastayı hidrolize eden bakteri izolatlarının etrafında amilolitik zon oluşumu izlenmiştir. Hidroliz zonu oluşturan bakteri izolatları amilaz pozitif olarak değerlendirilmiştir. Zon çapı en büyük olan bakteriler seçilmiş ve bu bakterilerle kantitatif enzim aktivite tayini gerçekleştirilmiştir.

Amilaz üretimi için ön (aşı) kültürün hazırlanması

Amilaz aktivitesine sahip olan bakteri izolatları stok kültürden örnek alınarak NA katı besiyerine ekimleri yapılmıştır. 30 °C'de 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında gelişmiş olan bakteri kolonilerinden steril öze ile alınmış ve 20 mL TSB besiyeri içeren 50 mL'lik erlene ekimleri yapılarak bakteriler 30 °C'de 150 rpm'de 1 gün inkübe edilmiştir. Oluşan kültür, aşı kültür olarak kullanılmıştır.

Sıvı ortamda amilaz üretimi

En geniş hidroliz zonu oluşturan amilaz üreticilerinin kantitatif amilaz aktivite tayinleri substratları olarak kullanılan çözünebilir nişastayı hidrolize etme yeteneklerine göre

spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. 100 mL sıvı amilaz üretim ortamlarına aşılı kültürden 1'er mL (OD₆₀₀ 2) ekim yapılmıştır. İnokülümü yapılan besiyerleri 150 rpm çalkalama hızında 30 °C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. Maksimum seviyede amilaz üretiminin belirlenmesi için amilaz aktiviteleri 4 gün boyunca kontrol edilmiştir. Hidroliz sonucu ortaya çıkan glukoz miktarı DNS çözeltisi ile 540 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ile belirlenmiştir (Bernfeld, 1955).

Amilaz aktivite tayini

İnkübasyon sonrası steril koşullarda sıvı kültürlerden 1'er mL alınarak mikrosantrifüj tüplerine konulmuştur. Bakterilerin uzaklaştırılması için 6000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant ham enzim solüsyonu olarak kullanılmıştır. Cam tüplere kontrol (kör) ve örnek grubu oluşturulmuştur. Örnek tüpe; 0,5 mL substrat solüsyonu ve 0,5 mL ham enzim solüsyonu konulmuştur. Kör tüpe ise 0,5 mL substrat solüsyonu ve 0,5 mL buffer (0,1 M sodyum fosfat tamponu, pH 7,0) konulmuştur. Hazırlanan tüpler 30 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 10 dakika süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında her bir tüpe reaksiyonu durdurmak amacıyla 1'er mL DNS solüsyonu eklenerek 5 dakika boyunca kaynar suda bekletilmiştir. Kaynar suda bekleyen tüplerde açığa çıkan glukoz miktarına bağlı olarak meydana gelen renk değişimi gözlemlenmiştir. Tüpler kaynar sudan alındıktan sonra oda sıcaklığına gelinceye kadar soğumaya bırakılmıştır. Oda sıcaklığına gelen tüplerin optik yoğunluğu (OD) 540 nm dalga boyundaki spektrofotometrede ölçülerek enzim aktivitesi, maltoz standart grafiğine göre hesaplanmıştır (Bernfeld, 1955).

Maltoz standart grafiğinin hazırlanması

10 mL 1 mg/mL konsantrasyonunda stok maltoz çözeltisi hazırlanmıştır. İndirgenen şeker miktarının tespiti için 0,1 M sodyum fosfat tampon ile yapılan belirli seyreltmelerle 10 farklı konsantrasyonda (0-1 mg/mL) maltoz çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanmış olan çözeltiler 30 °C'de 10 dk boyunca su banyosunda bekletilmiştir. Ardından 1 mL DNS eklenerek 5 dakika kaynamaya bırakılmıştır. Oda sıcaklığına gelen tüplerin 540 nm'de spektrofotometrik ölçümleri yapılmıştır. Standart grafik çizilmiş ve elde edilen grafik eğrisinden enzim aktiviteleri hesaplanmıştır. Her bir konsantrasyon üç tekrarlı olarak çalışılmıştır.

Elde edilen standart maltoz grafiği kullanılarak bir ünite amilaz aktivitesi, dakikada 1 µmol şeker açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Aktivitelerin hesaplanması için aşağıda belirtilen denklem kullanılmıştır.

Amilaz aktivitesi (U/mL) = Açığa çıkan şeker miktarı (µmol) x Toplam reaksiyon hacmi (mL) / Reaksiyon süresi (dakika) x Enzim miktarı (mL)

Bakterilerin tanılanması

Klasik yöntemlerle izolatların tanımlanması

Seçilen izolatların klasik yöntemlerle tanısı için biyokimyasal, morfolojik ve fizyolojik testleri yapılmıştır. Yapılan testler çift tekrar şeklinde gerçekleştirilmiştir.

Koloni morfolojisi: NA besi ortamında gelişen mikroorganizmalar koloni türüne, şekline ve rengine göre ayırt edilmiştir.

Hareket testi: 24 saatlik bakteri izolatlarından iğne öze ile cam deney tüplerinde hazırlanmış olan yumuşak agar besi ortamına ekim yapılmıştır. 30 °C sıcaklıkta olan etüvde inkübe edilmiş ve ertesi gün bakteri hareket testi, ortamdaki büyümeye dayalı olarak değerlendirilmiştir. Ekim yapılan yerin etrafında bulanıklığın olması bakterinin hareketli olduğunu, berrak bir görüntüye sahip olması ise bakterinin hareketsiz olduğunu göstermiştir.

Katalaz testi: Bu test, bakterilerde koruyucu bir enzim olan katalaz enziminin varlığını tespit etmek için kullanılan bir yöntemdir. 24 saat süre boyunca NA katı besiyerinde gelişen bakteri izolatından örnek, öze yardımıyla alınarak lam üzerine konulmuştur. %3 oranında H₂O₂ çözeltisi örnek üzerine damlatılmıştır. Hava kabarcıklarının oluşup oluşmadığı gözlemlenmiş ve sonuç değerlendirilmiştir. H₂O₂ çözeltisi damlatıldığında gaz kabarcığı oluşumu katalaz pozitif olarak belirlenirken gaz kabarcığı oluşmaması katalaz negatif olarak değerlendirilmiştir. Bu bilgilerin, bakterilerin tanımlanması ve sınıflandırılmasında önemli bir rol oynadığı kaydedilmiştir (Reiner, 2010).

Hemoliz testi: Bu test, bakterilerin hemolitik yeteneklerinin olup olmadığını belirlemek için kullanılmıştır. Kanlı agara bakteri izolatlarının ekimi gerçekleştirilmiştir. 30 °C'lik etüvde 24 saat boyunca inkübe edilmiş ve inkübasyon sonrası izolatların etrafında oluşan şeffaf zon ve renk açılmalarına göre değerlendirilmiştir (Gurkok, 2022).

KOH testi: 24 saatlik taze saf kültür öze yardımıyla alınarak lam üzerine aktarılmıştır. %3 oranında hazırlanan KOH çözeltisi lam üzerine birkaç kez damlatılarak öze ile lam üzerindeki KOH ve bakteri izolatu iyice karıştırılmıştır. Karışım haline gelen izolatlar öze kullanarak yukarıya doğru kaldırılmış ve özeyle lam arasında oluşan uzamaya (sünme) bakılarak Gram reaksiyon özellikleri değerlendirilmiştir (Moyes et al., 2009). Öze ile lam arasında uzamanın görülmesi Gram negatif olarak değerlendirilirken, uzamanın görülmemesi durumunda Gram pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Üreaz testi: Bakteri izolatının üre hidroliz kabiliyetlerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Saf bakteri kültüründen üreli NA besiyerine ekim yapılmıştır. 30 °C'lik etüvde

24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İzolatların üreaz enzimi sentezleme yeteneği, ürenin parçalanması sonrasında besiyerinde oluşan renk değişimi ile değerlendirilmiştir (Brink, 2010).

Lipaz testi: İzolatın lipaz enzimi üretme yeteneğini belirlemek için yapılmıştır. Bakteri izolatu TBA ortamına ekilmiş ve 30 °C'deki etüvde 24 saat inkübe edilmiştir. İzolatın lipaz enzimini sentezleme yeteneği, TBA ortamında oluşturulan kolonilerin etrafında şeffaf zon oluşmasıyla değerlendirilmiştir (Gurkok and Ozdal, 2021).

Selüloz testi: İzolat CMC-A üzerinde 30 °C'lik etüvde 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra petri üzerine %0,1 Kongo kırmızısı (Congo-red) solüsyonu dökülmüş ve 30 dakika boyunca boyanması sağlanmıştır. Süre sonunda boya 1 M NaCl solüsyonu kullanılarak petriden uzaklaştırılmıştır. CMC, congo-red ile kırmızıya boyandığından, kırmızı zemin üzerinde şeffaf zon oluşturan koloniler, selüloz pozitif olarak değerlendirilmiştir (Kılıçer and Özcan, 2013).

Asparaginaz testi: Bakteri izolatu %1 asparagin ve %0,18 fenol kırmızısı içeren NA ortamına ekilmiş ve 30 °C'lik etüvde 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında izolatu etrafında renk değişimi gözlenmiştir. İzolatın etrafında pembe-kırmızı renk oluşması asparaginaz pozitif olarak değerlendirilmiş, renk değişiminin olmaması ise negatif olarak değerlendirilmiştir.

Glutaminaz testi: Bakteri izolatu glutamik asit ve fenol kırmızısının bulunduğu NA besi ortamına ekilmiştir. 30 °C'lik etüvde 24 saat süre ile inkübe edildikten sonra besiyerinde renk değişimi takip edilmiştir. Besiyerinin renginin sarıdan pembeye dönüşmesi pozitif olarak kaydedilmiştir.

Maltoz testi: Bakteri izolatu maltoz ve fenol kırmızısı içeren sıvı besi ortamında 30 °C'lik etüvde 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası besiyerindeki fermentasyona bağlı renk değişimi izlenmiştir. Nötr pH'da kırmızı olan fenol red, pH 6,8'in altında sarıya, 7,4'ün üzerinde ise macenta veya pembeye dönüşen bir pH göstergesidir. Organizmanın, karbonhidratı kullanabilmesi, genellikle ortamda karbon dioksit (CO₂) gibi asidik yan ürünler oluşturmaya neden olmaktadır. Bu da ortamı asitleştirmekte ve sarı renk gözlemlenmektedir. Ancak, organizma karbonhidratı kullanamıyorsa, pepton gibi protein bileşenlerini kullanabilir. Bu durumda ise ortamda amonyak gibi bazik yan ürünlerin birikmesine, pH'nın yükselmesine ve ortam renginin pembeye dönüşmesine neden olmaktadır. Sonuç olarak, ortamın sarı renge dönüşmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir.

D-Ksiloz testi: Bakteri izolatu D-ksiloz ve fenol kırmızısı içeren, pH 7,4 olan sıvı besi ortamında 30 °C'lik etüvde 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. pH değişikliğine bağlı besi

yerindeki renk değişimi takip edilmiştir. Besi ortamının sarı renge dđnüşmesi ksilozun fermente edilebildiğini gösterdiğinden pozitif olarak değerlendirilmiştir.

L-Arabinoz testi: Bakteri izolatu arabinoz ve fenol kırmızısı içeren sıvı besı ortamında inkübe edilmiştir. İzolatu metabolik aktivitelere bağlı olarak pH değişiklikleri ve besiyerindeki renk değişikliği izlenmiştir. Besiyerinin sarıya dđnüşmesi ortamdaki arabinozun fermente edilebildiğini göstermiş ve pozitif olarak kaydedilmiştir.

Myo-inositol testi: Bakteri izolatu myo-inositol ve fenol kırmızısı içeren sıvı besiyerinde 30 °C’de 24 saat süre ile inkübe edildikten sonra besiyerindeki fermentasyona bağlı renk değişimi takip edilmiştir. Ortam renginin sarıya dđnüşmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Moleküler yöntemlerle izolatların tanılanması

İzolatu 16S rDNA analizi ile moleküler karakterizasyonu hizmet alımı şeklinde yaptırılmıştır. İzolatu tür tayini için, EurX GeneMATRIX Bacterial & Yeast DNA izolasyon kiti kullanılmıştır. DNA izolasyonu sonrasında elde edilen DNA’nın miktarı ve saflığı, Thermo Scientific Nanodrop 2000 spektrofotometre cihazında ölçölmüştür. PCR ęalıřmasında, 27F (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') - 1492R (5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT) primer ęiftleri kullanılarak hedeflenen gen bölgeleri ęoęaltılmıřtır. Yaklaşık 1470 bazlık bölgeyi ęoęaltmak için tek aşamalı PCR yöntemi kullanılmış; bu reaksiyon, Solis Biodyne FIREPol® DNA Polymerase Taq polimeraz enzimiyle geręekleřtirilmiřtir. PCR sonrasında agaroz jelde elde edilen tek bir bant, işlemin başarılı olduğunu göstermiştir.

Tablo 5. PCR Master Mix’in Hazırlanışı

Bileşen	Reaksiyon konsantrasyon
PCR Buffer	1X
MgCl ₂	1,5 mM
dNTP mix	0,2 mM
F. primer	0,3 µM
R. primer	0,3 µM
Taq DNA Polymerase	2 U
DNA template	3 µM
PCR grade su ile 35 µl’ye tamamlanır	

Hazırlanan örneklerin, PCR işlemi için aşağıda verilen döngüler takip edilmiştir.

- 1- 95°C'de 5 dakika süren başlangıç denatürasyonu
- 2- 30 döngü sırası ile;
 - 95°C'de 45 saniye süren denatürasyon
 - 57°C'de 45 saniye süren eşleşme
 - 72°C'de 60 saniye süren uzatma
- 3- 72°C'de 5 dakika süren final uzatma

Sıcaklık 4°C'ye düşürülüp PCR işlemi tamamlanmıştır.

PCR ile elde edilen sonuçlar, 1x TAE tamponuyla hazırlanarak %1,5 agaroz jel içinde 100 volt akımında 90 dakika süreyle elektroforezde yürütülmüş ve ethidium bromide boyası kullanılarak UV ışığında görüntüleri alınmıştır. Elde edilen tek bantlı örnekler için MAGBIO "HighPrep™ PCR Clean-up System" (AC-60005) saflaştırma kiti kullanılmış ve kitin prosedürlerine uygun olarak saflaştırılmıştır. Sanger Dizileme analizi, ABI 3730XL Sanger dizileme cihazı (Applied Biosystems, Foster City, CA) ve BigDye Terminator v3.1 Cycle Dizileme Kiti (Applied Biosystems, Foster City, CA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 27F ve 1492R primerleri ile elde edilen okumalar, konsensus bir dizi oluşturmak için kontig haline getirilmiştir. Bu süreçte, BioEdit yazılımı içinde CAP contig assembly algoritması kullanılmıştır.

Hizmet alımı yoluyla elde edilen DNA sekansları National Center for Biotechnology Information (NCBI) bilgi bankasının Blast Search Programı kullanılarak mevcut verilerle karşılaştırılmış, benzerlikler tespit edilmiş ve GenBank numaraları alınmıştır.

Ayrıca, izolatin filogenetik analizi yapılmış ve çoklu hizalama için MUSCLE, isteğe bağlı olarak hizalama küratörlüğü için Gblocks, filogeni için PhyML ve ağaç çizimi için TreeDyn programlarından yararlanan Phylogeny.fr platformu (<https://www.phylogeny.fr/phylogeny.cgi>) kullanılarak filogenetik ağacı çizilmiştir (Castresana, 2000; Guindon and Gascuel 2003; Edgar, 2004; Anisimova and Gascuel, 2006; Chevenet et al., 2006; Dereeper et al., 2008; Dereeper et al., 2010). Phylogeny.fr platformunda ağaç oluşturma maximum-likelihood (maksimum olabilirlik) varsayılan opsiyonu ile elde edilmiştir (Kuhner ve Felsenstein, 1994).

Amilaz üretim koşullarının optimizasyonu

Kalitatif ve kantitatif taramalara göre en yüksek amilaz üretimi gözlenen bakteri izolatu seçilerek üretim koşulları optimize edilmiştir. Farklı pH ve sıcaklık değerleri, farklı karbon ve

azot kaynakları optimum amilaz üretimi için denenmiştir. Her bir parametre üç tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir

Optimum inkübasyon süresinin belirlenmesi

Seçilen izolatın en yüksek amilaz ürettiği günün belirlenmesi için bakteri izolatı sıvı amilaz üretim ortamında 30 °C 185 rpm’de 5 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Her 24 saatte bir amilaz enzim aktivite tayini yapılmıştır. En uygun olan inkübasyon süresi tespit edilmiştir.

Optimum inokulum miktarının belirlenmesi

Amilaz üretiminde optimum inokulum hacminin belirlenmesi için sıvı besiyerlerine aşı kültüründen 500 µl, 1000 µl, 2000 µl ve 3000 µl ekimler yapılmıştır. Ardından 30 °C, 185 rpm’de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrası örneklerin enzim aktivite tayini gerçekleştirilmiştir.

pH’nın amilaz üretimine etkisinin belirlenmesi

pH’nın amilaz üretimi üzerine etkisinin araştırılması amacıyla, sıvı amilaz üretim besiyerinin başlangıç pH’sı 5.5, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 ve 10.0 olarak ayarlanmış ve bakteri bu besiyerlerinde 30 °C’de ve 185 rpm’de 72 saat boyunca inkübasyona bırakılarak amilaz üretimi belirlenmiştir (Saad et al., 2021).

Sıcaklığın amilaz üretimine etkisinin belirlenmesi

Bakterinin amilaz üretimi için optimum sıcaklığının belirlenmesi için sıvı üretim ortamına inoküle edilen bakteriler 25, 30, 35 ve 40 °C sıcaklıklarda 3 gün inkübasyona bırakılmıştır (Saad et al., 2021).

Azot kaynaklarının amilaz üretimine etkisinin belirlenmesi

Farklı azot kaynaklarının amilaz üretimine etkisinin tespiti için azot kaynakları olarak maya özütü (yeast extract) yerine pepton kazein, sığır et özütü (beef extract), meat extract (et özütü), tripton, bactopecton, üre, NH₄Cl, (NH₄)₂SO₄ ve NaNO₃ %0,3 konsantrasyonda sıvı üretim ortamına eklenmiştir. Steril besiyerlerine inokulum yapıldıktan sonra çalkalamalı inkübatörde 185 rpm’de 30 °C’de 72 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. 72 saat sonunda amilaz üretimi belirlenmiştir (Saad et al., 2021).

Amilaz üretimi için optimum azot kaynağı konsantrasyonunun belirlenmesi

Amilaz üretimi için belirlenmiş olan en iyi azot kaynağı sıvı amilaz üretim ortamına %0,1, %0,3, %0,5, %1, %2 oranlarında eklenmiştir. 121 °C'de 15 dakika steril edildikten sonra besiyerlerine inokulasyonlar yapılmıştır. Ardından 30 °C'de ve 185 rpm'de çalkalamalı inkübatörde 72 saat inkübe edilmiş ve amilaz üretimi izlenmiştir.

Karbon kaynaklarının amilaz üretimine etkisinin belirlenmesi

Karbon kaynaklarının amilaz üretimine etkisinin tespiti için sıvı amilaz üretim ortamına %1 konsantrasyonda karbon kaynağı olarak mısır nişastası, buğday nişastası, patates, fruktoz, sükroz, maltoz, glukoz ve çözünebilir nişasta eklenmiştir. Steril hale gelmiş olan besiyerlerine inokulum yapıldıktan sonra çalkalamalı inkübatörde 185 rpm'de 30 °C'de 72 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Amilaz üretimi takip edilmiştir (Saad et al., 2021).

Amilaz üretimi için optimum karbon kaynağı konsantrasyonunun belirlenmesi

Amilaz üretimi için sıvı amilaz üretim ortamına %0,25, %0,50, %1, %1,5, %2 ve %2,5 konsantrasyonlarında belirlenen en iyi karbon kaynağından eklenmiştir. 121 °C'de 15 dakika sterilizasyondan sonra besiyerlerine inokulum gerçekleştirilmiştir. 30 °C'de ve 185 rpm'de çalkalamalı inkübatörde 72 saat inkübe edilerek ve enzim üretimi takip edilmiştir.

Enzimin saflaştırılması

Belirlenen optimum şartlarda üretilen amilaz enziminin saflaştırılmasında amonyum sülfat ile çöktürme, ultrafiltrasyon ve iyon değişim kromatografisi uygulanmıştır.

Amonyum sülfat çöktürmesi

Bakteri kültürü sıvı amilaz üretim ortamında 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda fermentasyon sıvısı, hücrelerin uzaklaştırılması için 10000 rpm'de 20 dakika boyunca 4 °C'de santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatanta, amonyum sülfatın eklenmesiyle %20, 40, 60 ve 80'lik nihai konsantrasyonlara ulaşılmıştır. Amonyum sülfat süpernatanta yavaş yavaş ilave edilmiş ve en az 4 saat karıştırılarak 4 °C'de tutulmuştur. Proteinler, aynı sıcaklıkta 20 dakika boyunca 10000 rpm'de santrifüjleme yoluyla çöktürülmüştür. Çöken proteinler minimum miktarda 100 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.0) içerisinde çözündürülmüştür. Protein çözeltisindeki tuzlar ile diğer iyonların uzaklaştırılması ve çözeltinin daha yoğun hale gelmesi için 6000 rpm'de, 4 °C'de ultrafiltrasyon (10 kDa cut-off membran, Millipore) uygulanmıştır. Çözelti konsantre edilerek ve 0,22 µm şırınga ucu filtrelerden geçirilerek iyon değişim kromatografisi için hazırlanmıştır.

İyon değişim kromatografisi ile saflaştırma

Protein çözeltilisi, iyon değişirme kromatografisini gerçekleştirmek için 50 mM fosfat tamponu (pH 7,0) ile önceden dengelenmiş bir HiPrep Q XL 16/10 anyon değişim kolonuna yüklenmiştir. Fraksiyonlar lineer NaCl gradient (0 ila 1 M) ile kolondan geçirilmiiştir. Ardından fraksiyonların amilaz aktivite ölçümleri yapılmıştır. Amilaz aktivitesine sahip fraksiyonlar birleştirilmiş, ultrafiltrasyon yoluyla konsantre edilmiş ve protein ölçümü, enzim karakterizasyon çalışmaları ile SDS-PAGE analizlerinde kullanılmak için -20 °C’de saklanmıştır.

Saflaştırılan amilaz enziminin karakterize edilmesi

Enzimin katalitik etkinliği ve substrat ile etkileşimini belirlemek için kinetik özellikleri olan V_{max} (maksimum reaksiyon hızı) ve K_m (Michaelis-Menten sabiti) değerleri hesaplanmıştır. Enzimin saflığı ve moleküler ağırlığı SDS-PAGE yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. Saflaştırılan amilaz enziminin aktivitesi üzerinde sıcaklık, pH, çeşitli reaktifler, metal iyonları, organik çözücüler ve ticari deterjanların etkisi araştırılmıştır.

Amilaz enzim reaksiyonuna ait K_m ve V_{max} kinetik sabitlerinin saptanması

Saflaştırılmış amilaz enziminin kinetik sabitlerini belirlemek için enzimin substratı olan çözünebilir nişasta, %0,1 ile %2 konsantrasyon aralığında kullanılarak aktivite tayinleri gerçekleştirilmiştir.

Proteinlerin SDS-PAGE analizi

Proteinlerin SDS-PAGE analizi standart Laemmli protokolüne göre yapılmıştır (1970). Elektroforez sistemi için Bio-Rad Mini-PROTEAN® Tetra Cell kullanılmıştır.

Ayırıcı jel (%12,5) Tablo 6’da verilmiş olan maddelerin belirtilen konsantrasyonlarda karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. Jel hazırlamadan hemen önce karışıma tetrametiletildiamin (TEMED) ve taze hazırlanmış APS eklenmiştir. Zaman kaybetmeden cam levhalar arasına hazırlanmış olan ayırıcı jel karışımı dökülmüştür. Üzerine su ekleyip hava ile teması engellenmiştir. Polimerleşmesinin gerçekleşmesi için 30 dakika beklenmiştir. 30 dakika sonra su ortamdan uzaklaştırılmıştır. Ardından Tablo 7’de gösterildiği gibi hazırlanan %7.5’lik yığma jeli polimerleşen ayırıcı jelin üzerine dökülmüştür. Kuyucukları oluşturmak için taraklar yerleştirilerek 30 dakika daha polimerize olmaya bırakılmıştır. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra tarak çıkarılmış ve elde edilen kuyucuklar 1X yürütme tamponu ile yıkanarak protein örneklerinin yüklenmesi için hazırlanmıştır.

Tablo 6. Ayırma Jeli Kompozisyonu (%12,5)

Ayırma Jeli (%12,5)	Hacim (mL)
Ayırma jeli tamponu	1,2
%30 Akrilamid stok solüsyonu	2,1
H ₂ O	1,7
APS (%25)	0,03
TEMED	0,003

Tablo 7. Yığma Jel Kompozisyonu (%7,5)

Yığma Jel (%7,5)	Hacim (mL)
Yığma jeli tamponu	0,6
%30 Akrilamid stok solüsyonu	0,4
H ₂ O	1,4
APS (%25)	0,02
TEMED	0,002

Örnek hazırlama ve elektroforez

Örnek denatürasyon karışımı, β -merkaptotanol ve örnek tamponunun 1:4 oranında karıştırılması ile hazırlanmıştır. 5 μ L örnek denatürasyon karışımına 15 μ L örnek eklenerek 5 dakika kaynatılmıştır. Denatüre edilmiş örnekler soğutulduktan sonra en yüksek hızda 10 saniye santrifüj edilmiş ve hazırlanmış olan jelin kuyucuklarına yüklenmiştir. Elektroforez 1 saat boyunca 150 V sabit voltajda gerçekleştirilmiştir. Örneklerin moleküler ağırlığı, Precision Plus Boyanmamış Protein Standardı (250–10 kD) kullanılarak hesaplanmıştır.

Jellerin boyanması ve boyanın uzaklaştırılması

SDS-PAGE işlemi tamamlandıktan sonra jeller, 100-150 mL Coomassie Brilliant Blue R-250 boyama solüsyonu içerisinde oda sıcaklığında hafifçe çalkalanarak 1 saat boyunca boyanmaya bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda boyama solüsyonu dökülmüştür. Ardından jel 100-150 mL boya giderme solüsyonu içerisine yerleştirilmiş ve oda sıcaklığında çalkalanarak 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. Boya çıkarma solüsyonu, jel bazlı boya çıkana ve istenilen protein bandı görünene kadar birkaç kez değiştirilmiştir.

Amilaz enziminin moleküler kütlesinin hesaplanması

Amilaz enziminin moleküler kütlesini hesaplamak için SDS-PAGE’de standart olarak Precision Plus Protein Unstained Standarttan (250-10 kD) yararlanılmıştır. SDS-PAGE

tamamlandıktan sonra standarttaki protein bantlarının ve saflaştırılmış amilaz enziminin nispi göç mesafeleri (Rf), aşağıda verilen denklemin kullanılmasıyla belirlenmiştir. Elde edilen grafik ve denklem, amilaz enziminin elektroforetik koşullar altında moleküler ağırlığını belirlemede kullanılmıştır.

$$Rf = \text{Proteinin göç mesafesi} / \text{Boyanın göç mesafesi}$$

Amilaz aktivitesi üzerine çeşitli parametrelerin etkisi

Amilazın optimum sıcaklığının belirlenmesi

Saflaştırılmış amilaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için 10, 20, 30, 40, 50, 60 ve 70 °C sıcaklıklarda amilaz aktiviteleri ölçülmüştür. Enzim ve substrat çözeltileri reaksiyon öncesi bu belirtilen sıcaklıklarda 10 dakika boyunca bekletilmiştir. Enzim aktivitesinin farklı sıcaklıktaki değişimleri belirlenerek optimum sıcaklık tespit edilmiştir.

Enzimin sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi

Saflaştırılan amilaz enziminin sıcaklık stabilitesini belirlemek için enzim örnekleri 20, 30, 40, 50 ve 60 °C sıcaklıklarında 30, 60, 90 ve 120 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra amilaz aktivitesi ölçülmüştür. Elde edilen veriler, kontrol numunesine göre bağlı aktiviteleri hesaplamak için kullanılmıştır. Enzimin farklı sıcaklıklarda ne kadar süreyle stabil kaldığı tespit edilmiştir.

Amilazın optimum pH'sının belirlenmesi

Saflaştırılmış amilaz enziminin optimum pH'sını belirlemek için pH 4,0-12,0 değerlerinde enzim aktiviteleri incelenmiştir. Farklı pH'larda tamponlar hazırlamak için 50 mM asetik asit-sodyum asetat (4,0-5,0), potasyum fosfat (pH 6,0), tris-HCl (pH 7,0-8,0), glisin-NaOH (pH 9,0-12,0) kullanılmıştır. Enzimin substratı bu tamponlar içerisinde çözündürülerek hazırlanmıştır. Amilaz aktivite tayini belirtilen pH'larda gerçekleştirilmiştir.

Enzimin pH stabilitesinin belirlenmesi

Enzimin pH stabilitesini belirlemek için, enzim örnekleri 50 mM asetik asit-sodyum asetat (4,0-5,0), potasyum fosfat (pH 6,0), tris-HCl (pH 7,0-8,0), glisin-NaOH (pH 9,0-12,0) tampon çözeltileriyle eşit hacimde (1:1 oranında) karıştırılarak 25 °C'de, 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası amilaz aktivitesi ölçülerek kontrol numunesine göre bağlı aktiviteler hesaplanmıştır.

Metal iyonlarının amilaz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi

Metal iyonlarının amilaz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi için; CaCl_2 , MnCl_2 , FeCl_3 , BaCl_2 , AgNO_3 , CdN_2O_4 , CuSO_4 , MgCl_2 , NiCl_2 , ZnSO_4 , CoCl_2 , HgCl_2 ve CuSO_4 bileşiklerinin pH 7,0, 100 mM sodyum fosfat tamponu ile 1, 3 ve 5 mM'lık çözeltileri hazırlanmıştır. Enzim ve bileşik çözeltileri 25 °C'de, eşit hacimlerde (1:1) 1 saat inkübe edilmiş ve enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Kontrol numunesine göre bağıl aktiviteleri hesaplanmıştır.

Çeşitli reaktiflerin amilaz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi

Reaktiflerin amilaz aktivitesi üzerinde etkisini belirlemek için Tween 20, Tween 80, Triton X-100, H_2O_2 , SDS, CTAB ve EDTA'nın pH 7 de 100 mM sodyum fosfat tamponu ile %10'luk çözeltileri hazırlanmıştır. Enzim ve çözeltiler 25 °C'de eşit (1:1) oranda 1 saat inkübe edilerek enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Kontrol numunesine göre bağıl aktiviteleri hesaplanmıştır.

Organik çözücülerin amilaz enzimi üzerine etkisinin belirlenmesi

Organik çözücülerin amilaz enzimi üzerine etkisinin belirlenmesi için aseton, gliserol, etanol, DMSO ve izopropanolun pH 7,0 100 mM sodyum fosfat tamponu ile %15'lik çözeltileri hazırlanmıştır. Enzim ve çözeltiler 25 °C'de eşit (1:1) oranda 1 saat inkübe edilerek enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Kontrol numunesine göre bağıl aktiviteleri hesaplanmıştır.

Ticari deterjanların amilaz enzimi üzerine etkisinin belirlenmesi

Ticari deterjanların amilaz enzimi üzerine etkisinin belirlenmesi için 100 mM, pH 7,0 sodyum fosfat tamponu içerisinde %1 oranında çamaşır deterjanı, sıvı bulaşık deterjanı ve el yıkama deterjanının çözeltileri hazırlanmıştır. Enzim ve çözeltiler eşit (1:1) oranda konularak amilaz enziminin aktiviteleri ölçülmüştür.

Ticari deterjanların amilaz enzim stabilitesi üzerine etkisinin belirlenmesi

Deterjanların amilaz enzim stabilitesi üzerine etkisini belirlemek için 100 mM, pH 7 sodyum fosfat tamponunda %1 oranında sıvı el sabunu, çamaşır deterjanı ve sıvı bulaşık deterjanı çözeltileri hazırlanmıştır. Enzim ve çözeltiler 25 °C'de eşit (1:1) oranda karıştırılarak 1 saat süreyle inkübe edildikten sonra enzim aktiviteleri ölçülmüştür.

Amilaz üretiminde patates kabuklarının kullanılması

Farklı karbon ve azot kaynaklarının yanı sıra, amilaz üreticisi olarak seçilen bakteri izolatının patates kabuklarını kullanarak amilaz üretebilme yetenekleri araştırılmıştır. Bu doğrultuda sıvı amilaz üretim ortamı olarak 0,3 g maya özütü ve farklı miktarlarda (%1, %2, %3, %4, %5, %7,5 ve %10) patates kabukları kullanılmıştır.

Patates kabuklarının hazırlanması ve amilaz üretiminde kullanılması

Atık patates kabukları (potato peel waste: PPW) 60 °C’lik etüvde 24 saat kurutulmuştur. Kuruyan kabuklar rondo ile küçültülüp toz haline geldikten sonra 0.5 mm’lik elekten geçirilerek kullanılmıştır. Farklı miktarlarda PPW (%1-10) ve 0,3 g maya özütü içeren 250 mL’lik flasklardaki 100 mL besiyerine 1 mL önkültür eklenerek 5 gün boyunca 30 °C ve 150 rpm’de inkübe edilmiştir. Amilaz aktivite tayinleri yapılmıştır.

Amilaz üretim koşullarının istatistiksel optimizasyonu

Amilaz üretiminin istatistiksel optimizasyonunda Yanıt Yüzey Metodolojisi (response surface methodology: RSM) Box-Behnken Dizaynı (BBD) ile kullanılmıştır. Üç bağımsız değişkenin [% patates kabuğu (PPW), % maya özütü (yeast) ve başlangıç pH’sı] bağımlı değişken amilaz aktivitesi (U/mL) açısından optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Çalışılan her bir faktör için aralıklar klasik yöntemle gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları sonucu belirlenmiştir. Aralıklar patates kabuğu için %2,5-7,5, maya özütü için %0,1-0,5 ve pH için 5,0-9,0 olarak belirlenmiştir. Bağımsız faktörlerin kodlanmış ve kodlanmamış formları Tablo 8’de verilmiştir. Tablo 9’da verilen deneysel tasarımın dizaynı ve analizi için MINITAB™ v.15 (Minitab Inc., State College, PA) kullanılmıştır. Tasarlanan koşullarda toplamda 30 deney gerçekleştirilmiştir. Kültürler 100 mL çalışma hacmine sahip 250 mL’lik erlenmeyer şişelerinde 30 °C’de, 150 rpm’de, 3 gün boyunca inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonucunda amilaz aktiviteleri ve gelişimleri ölçülmüştür.

Tablo 8. Yanıt Yüzey Metodolojisinde Bağımsız Değişkenlerin Kodlanmış ve Kodlanmamış Düzeyleri

Değişkenler	Kodlanmış Düzeyler		
	-1 (Düşük)	0 (Orta)	+1 (Yüksek)
Kodlanmamış Düzeyler			
Patates Kabuğu (PPW) (%)	2,5	5	7,5
Maya Özütü (Yeast) (%)	0,1	0,3	0,5
Başlangıç pH’sı	5	7	9

Tablo 9. Yanıt Yüzey Metodolojisi Kullanılarak Üç Değişkenin (PPW, Yeast ve pH) Amilaz Üretiminin Optimizasyonu İçin Box-Behnken Dizaynı ile Deneysel Tasarımı ve Deneysel Yanıtları

Sıra	PPW (%)	Yeast (%)	pH	Aktivite (U/ml)	OD ₆₀₀
1	5.0	0.1	9	0.47	3.19
2	5.0	0.5	5	0.55	2.89
3	2.5	0.3	5	0.23	2.52
4	5.0	0.5	9	0.53	2.97
5	7.5	0.1	7	0.63	3.07
6	7.5	0.1	7	0.59	2.87
7	5.0	0.3	7	0.52	3.07
8	5.0	0.1	9	0.45	3.17
9	7.5	0.3	9	0.56	3.19
10	5.0	0.3	7	0.54	2.99
11	5.0	0.3	7	0.55	3.05
12	2.5	0.3	9	0.31	2.72
13	2.5	0.5	7	0.33	2.59
14	5.0	0.1	5	0.38	2.89
15	5.0	0.3	7	0.56	3.01
16	7.5	0.3	5	0.60	2.97
17	2.5	0.1	7	0.19	2.67
18	7.5	0.3	5	0.61	2.95
19	7.5	0.5	7	0.62	3.07
20	5.0	0.5	9	0.56	2.87
21	2.5	0.5	7	0.28	2.53
22	2.5	0.1	7	0.20	2.69
23	2.5	0.3	9	0.33	2.60
24	5.0	0.5	5	0.59	2.87
25	2.5	0.3	5	0.25	2.53
26	7.5	0.5	7	0.63	2.99
27	7.5	0.3	9	0.58	3.04
28	5.0	0.3	7	0.54	2.99
29	5.0	0.3	7	0.53	2.96
30	5.0	0.1	5	0.50	2.80

Amilaz üretimini (Y) patates kabuğu (PPW) konsantrasyonu (%), maya özütü (yeast extract) konsantrasyonu (%) ve pH ile ilişkilendirmek için verilere ikinci dereceden bir polinom denklemi kurulmuştur. Üç faktörlü bir sistem için model denklemi şöyledir:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3$$

Burada Y, tahmin edilen yanıt; b_0 , kesişim; b_1 , b_2 , b_3 , doğrusal katsayılar; b_{11} , b_{22} , b_{33} , karesel katsayılar; b_{12} , b_{13} , b_{23} , etkileşim katsayıları ve X_1 , X_2 , X_3 , bu çalışmada kullanılan bağımsız değişkenlerdir. Deneysel verilerin regresyon analizi, yanıt yüzeylerinin çizilmesi ve bağımsız değişkenlerin optimum değerlerinin belirlenmesi için MINITAB varyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır. Yanıt yüzey grafiklerinin ve kontur grafiklerinin çizimi için de Minitab v.15 programı kullanılmıştır.

Enzimin Biyoteknolojik Uygulamaları

Amilaz enziminin leke çıkarma potansiyelinin araştırılması

Amilaz enziminin deterjan etkisinin araştırılması için 5x5 cm büyüklükte kesilen beyaz pamuklu kumaş parçaları kullanılmıştır. Mısır ve çikolata gibi nişasta içeren gıdalarla hazırlanmış karışımlardan hazırlanmış ve kumaş parçalarına 0,1 mL aktarılmıştır. Pamuklu kumaşlardaki lekelerin kuruması ve sabitlenmesi için 60 °C’de etüve bırakılmıştır. Tablo 10’da gösterilen hacimlerde 250 mL’lik erlenlerde 50 mL’lik yıkama solüsyonları hazırlanmıştır. Yıkama solüsyonu hazırlanırken kullanılan ticari test deterjanları, içlerinde bulunabilecek muhtemel enzimlerin inaktivasyonu için, amilaz enzimi eklenmesinden önce 70 °C’de 1 saat ısıtılmıştır. Kuruyan kumaş parçaları flasklar içerisinde 30 °C’de 30 dakika boyunca 150 rpm’de inkübe edilmiştir. İnkübe sonrası yıkanmış olan kumaş parçaları musluk suyu ile durulanmıştır. 60 °C’de etüvde 1 saat kurutularak fotoğrafları çekilmiştir.

Tablo 10. Yıkama Solüsyonu Kompozisyonu

Yıkama Solüsyonu	Hacim (mL)			
	1	2	3	4
Sodyum fosfat tampon (100 mM, pH 7)	25	25	25	-
Deterjan Solüsyonu (%1)	-	-	12,5	25
Amilaz Solüsyonu (10 U/mL)	-	25	12,5	-
Distile Su	25	-	-	25

Amilaz enzimi ile nanopartikül sentezi ve nanopartiküllerin saflaştırılması

Amilaz enziminin nanopartikül sentezindeki potansiyelini belirlemek için NB besiyerine %1 oranında çözünülebilir nişasta ilave edilmiştir. Bakteri inokulasyonundan 72 saat sonra besiyeri 9000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve hücresiz süpernatant nanopartikül sentezinde kullanılmıştır. Kontrol olarak nişasta içermeyen besiyerinde geliştirilen kültürlerin hücresiz süpernatantı kullanılmıştır. Nanopartikül üretiminde süpernatanta 2 mM konsantrasyonunda AgNO_3 , CoCl_2 , CuSO_4 , FeSO_4 , MgSO_4 , MnSO_4 , Na_2SeO_3 ve ZnSO_4 çözeltilerinden ilave edilmiş ve 30 °C, 150 rpm'de 72 saat inkübe edilmiştir. Ve süre sonunda nanopartikül üretimleri kontrol edilmiştir. İlk olarak tuz çözeltileri içeren besiyerlerinin renk değişimleri kontrol edilmiştir. Nanopartikülleri içeren sıvılar 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve sırayla kloroform, oktanol, etanol ve saf su ile yıkanarak saflaştırılmıştır. Elde edilen örnek 60 °C'de kurutulmuş ve havanda toz haline getirilmiştir.

Nanopartiküllerin karakterizasyonu

Bakterinin amilaz içeren kültür süpernatantı kullanılarak sentezlenen nanopartiküllerin karakterizasyonu ultraviyole-görünür (UV-visible) spektroskopisi, Fourier transform infrared (FT-IR) spektroskopisi, X-ışını difraktometresi (XRD), taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ve geçirimli elektron mikroskopisi (TEM) ile gerçekleştirilmiştir.

UV spektroskopisi ile nanopartiküllerin karakterizasyonu

Nanopartiküllerin UV spektrumları, 190-700 nm aralığında Shimadzu UV-Vis spektrofotometre (UV-1800, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonya) ile elde edilmiştir. Kör numune için ilgili besiyeri kullanılmıştır (Sharifi -Rad et al., 2020).

Fourier transform infrared (FT-IR) spektroskopisi

FT-IR analizi Bruker Vertex 70 kullanılarak 500–4000 cm^{-1} dalga sayısı bölgesinde KBr yöntemi ile yapılmıştır (Jayawardena et al., 2021).

X-ışını difraktometresi (XRD)

Nanopartiküllerin yüzey morfolojisini, boyutunu ve kristal yapısını incelemek için XRD kullanılmıştır. Kırınım modeli, $\lambda = 1.541 \text{ Å}$ dalga boyuna sahip Cu Ka radyasyonu kullanılarak elde edilmiştir. XRD çalışmaları için cam bir plaka üzerine az miktarda örnek konularak örneğin ince bir filmi yapılmıştır. Tarama 10° ile 80° 2 θ değer aralığında 0.02 min⁻¹ ve 1 saniye zaman sabitinde taranmıştır. Cihaz 30 mA akım ve 40 kV voltajda çalıştırılmıştır (Naseer et al., 2020; Jayawardena et al., 2021).

Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Sentezlenen nanopartiküllerin boyut, morfolojik ve kantitatif elemental analizi enerji dağıtıcı X-ışını spektrumları (EDX) ile taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak belirlenmiştir (Jayawardena et al., 2021).

Geçirimli elektron mikroskobu (TEM)

Parçacık boyutunu, morfolojisini ve bileşimini belirlemek için nanopartiküller, yüksek çözünürlüklü bir TEM - Hitachi HT-7700 kullanılarak görselleştirilmiştir (Jayawardena et al., 2021).



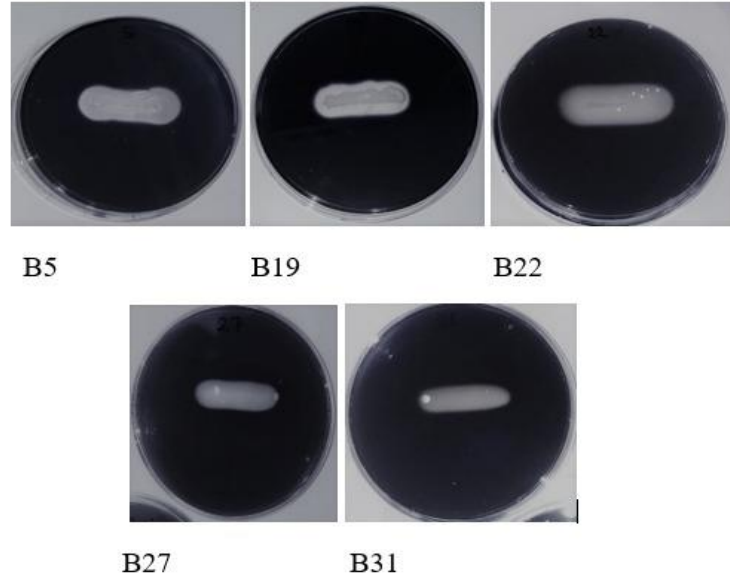
ARAŞTIRMA BULGULARI

Bakterilerin İzolasyonu

Oda sıcaklığında ve buzdolabında 15 gün boyunca beklemiş patateslerden 40 adet bakteri izole edilmiş ve saf kültürleri hazırlanıp gliserol stoklarda -80 °C’de saklanmıştır.

Bakteri İzolatlarının Amilaz Aktivitesinin Belirlenmesi

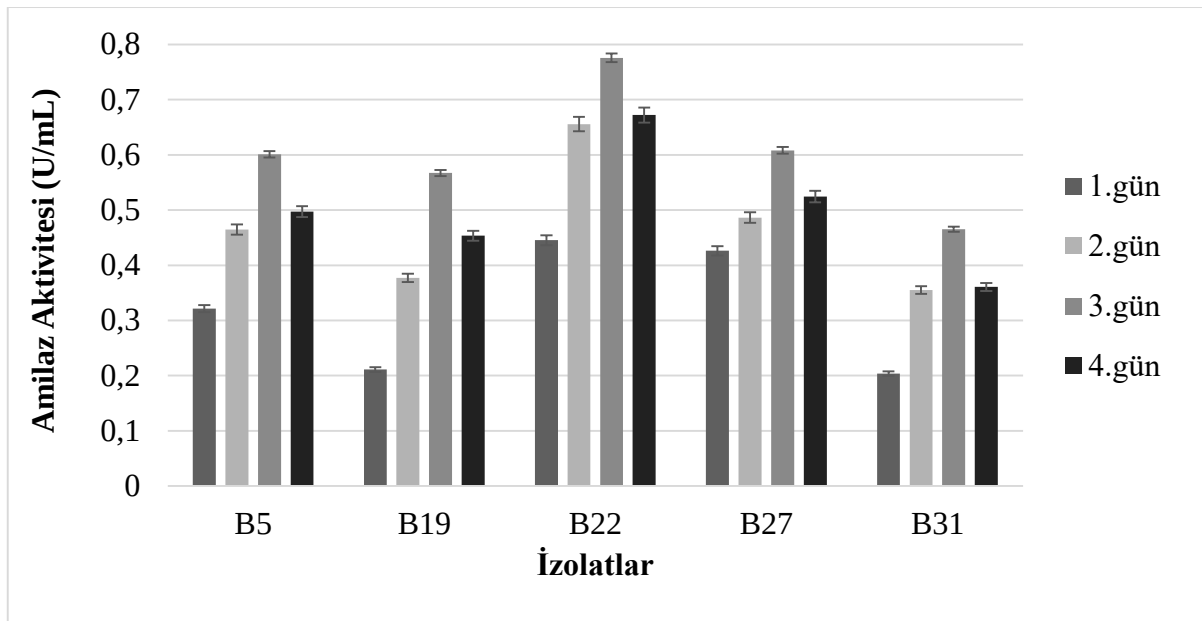
Saflaştırılmış 40 bakteri izolatının amilaz üretim potansiyelleri %1 çözünebilir nişasta içeren NNA besiyerlerinde gelişimleri sonrası lügol solüsyonu ile muamele edilmeleriyle belirlenmiştir. Test edilen bakterilerin %25’inde amilolitik şeffaf zon gözlenmiştir. Katı besiyeri üzerinde oluşturdıkları zon çaplarının genişliğine göre Şekil 3’te gösterilen B5 (18 mm), B19 (15 mm), B22 (21 mm), B27 (14 mm) ve B31 (12 mm) izolatları seçilmiş ve kantitatif amilaz aktivite tayininde kullanılmışlardır.



Şekil 3. Patatesten elde edilen izolatlarla NNA üzerinde 30 °C’de 2 günlük inkübasyon sonucu gözlenen amilolitik zonlar

Kantitatif Amilaz Aktivite Tayini

NNA’da en geniş amilolitik zon çapına sahip olan 5 izolat sıvı amilaz üretim ortamında geliştirilerek aktivite tayinleri gerçekleştirilmiştir. Ek 1’de verilen maltoz grafiğinden yararlanılarak aktivite hesaplamaları yapılmıştır. Şekil 4’te gösterildiği gibi 3. günde en yüksek aktiviteye sahip izolatın 0,78 U/mL ile B22 kodlu izolat olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4. Bakteri izolatlarının sıvı amilaz üretim ortamında 30 °C’de 4 günlük amilaz aktiviteleri

En İyi Amilolitik Bakteri İzolatının Tanılanması

Amilaz aktiviteleri karşılaştırılan izolatlardan en geniş zon oluşturan ve sıvı amilaz üretiminde en yüksek aktiviteye sahip olan B22 kodlu bakteri klasik yöntemlerle ve 16S rDNA sekanslamasıyla tanılanmıştır.

Klasik yöntemlerle tanılama

Klasik yöntemlerle bakteri tanılanmasında biyokimyasal, morfolojik ve fizyolojik testler uygulanmıştır (Galushko and Kuever, 2020) ve sonuçlar Tablo 11’de verilmiştir.

Koloni morfolojisi: B22 kodlu izolatın pigmentsiz, parlak ve yuvarlak koloniler oluşturduğu gözlemlenmiştir.

Hareket testi: B22 izolatının iğne öze ile yumuşak dik agar besiyerine ekimi ve 30 °C’de bir günlük inkübasyonu sonucu ekim alanı boyunca bulanıklık gözlemlenmiş ve hareketli olduğu sonucuna varılmıştır.

KOH testi: B22 izolatının hücre duvarı özelliklerine göre sınıflandırmak için %3’lük KOH çözeltisi ile muamelesi sonrasında sünme gözlemlenmemiş ve izolat Gram-pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Hemoliz testi: Kanlı agarda gelişen B22 kodlu izolatta şeffaf zon gözlenmediğinden hemoliz aktivitesinin bulunmadığı belirlenmiştir.

Katalaz testi: B22 izolatında katalaz enziminin varlığını belirlemek için gerçekleştirilen testte H₂O₂ damlatıldığında gaz kabarcığı olduğu gözlemlenmiştir ve katalaz pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Üreaz testi: B22 kodlu izolatın üreli ortamda inkübasyonu sonucu üreyi parçalamadığı için ortam renginde bir değişiklik meydana getirmediği ve sarı renkte kaldığı tespit edilmiştir.

Lipaz testi: Lipolitik aktivitenin belirlenmesi amacıyla yapılan bu testte B22 izolatının çevresinde şeffaf zona rastlanmamıştır.

Selüloz testi: Selüloz enzimini üretebilme özelliğine sahip olup olmadığını incelemek için gerçekleştirilen test sonucu B22 kodlu izolatın CMC'yi parçaladığı ve Congo-red ile kırmızıya boyanmış olan zeminde koloni etrafında şeffaf zonun olduğu gözlemlenmiştir.

Asparaginaz testi: Asparagin içeren sarı renkli katı besiyerini B22 kodlu izolatın asparaginaz enzimi ile pembe renge dönüştürdüğü gözlemlenmiştir.

Glutaminaz testi: B22 izolatı glutamik asit ve fenol kırmızısı içeren katı besiyerinin rengini pembeye çevirdiği gözlemlenmiştir.

D-Ksiloz testi: B22 izolatının besiyeri rengini sarıya döndürerek asit özelliği gösterdiği gözlemlenmiştir ve ksilozu fermente edebildiği kanısına varılmıştır.

D-Maltoz testi: B22 izolatının ortam rengini sarıya çevirdiği gözlemlenmiştir. Bu da B22 izolatının ortamdaki karbonhidratı kullanarak fermentasyon yaptığını göstermiştir.

L-Arabinoz testi: B22 izolatının ortamın pH'sını düşürerek sarı renge çevirdiği belirlenmiştir. Bu da izolatın ortamdaki şekeri kullanarak fermentasyon yaptığını göstermiştir.

Myo-İnositol testi: Diğer şeker testlerinde olduğu gibi pH değerinin değişmesine bağlı renk dönüşümleri izlenmiştir. B22 izolatının bulunduğu ortamı pembe rengine dönüştürdüğü belirlenmiştir. Dolayısıyla izolatın karbon kaynağı olarak şekeri fermente edemediği tespit edilmiştir.

Moleküler Yöntemlerle Tanılama

B22 izolatının moleküler karakterizasyonunda 16S ribozomal DNA gen bölgesi sekans analizi hizmet alımı yoluyla gerçekleştirilmiştir. Ek 2'de verilen B22 izolatına ait sekans NCBI veri tabanındaki sekanslarla karşılaştırılarak B22 izolatı *Priestia megaterium* strain SFA suşu olarak tanımlanmış ve OR415891.1 GenBank erişim numarası alınmıştır. Ayrıca, Phylogeny.fr platformu ile inşa edilen *P. megaterium* SFA filogenetik ağacı Ek 3'te verilmiştir.

Tablo 11. Amilolitik B22 İzolatının Özellikleri

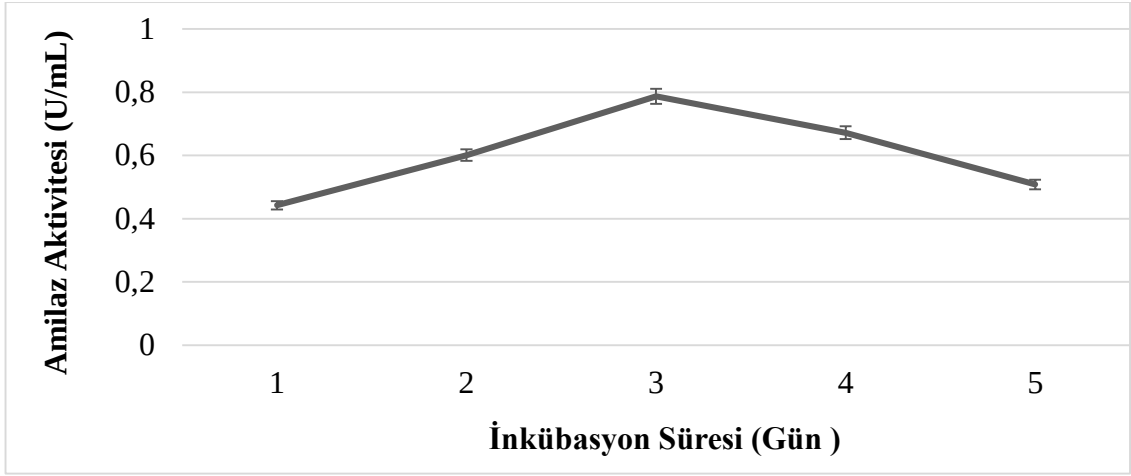
İzolat Kodu	B22
Bakteri Suşu	<i>P. megaterium</i> SFA
GenBank Numarası	OR415891.1
Koloni Rengi	Parlak, krem rengi
Koloni Şekli	Yuvarlak
Hücre Şekli	Basil
Hareket	+
Gram	+
Katalaz	+
Üreaz	-
Hemoliz	-
Lipaz	-
Asparaginaz	+
Selülaz	+
Glutaminaz	+
Proteaz	+
D-ksiloz	+
Maltoz	+
L-arabinose	+
Myo-inositol	-

***P. megaterium* SFA'nın Amilaz Üretim Koşullarının Optimizasyonu**

P. megaterium SFA'nın amilaz üretimi için optimum şartların belirlenmesi amacı ile en uygun inkübasyon süresi, inokulum miktarı, başlangıç pH'sı, inkübasyon sıcaklığı, farklı azot ve karbon kaynakları ve bunların konsantrasyonları belirlenmiştir.

İnkübasyon süresinin amilaz üretimi üzerine etkisi

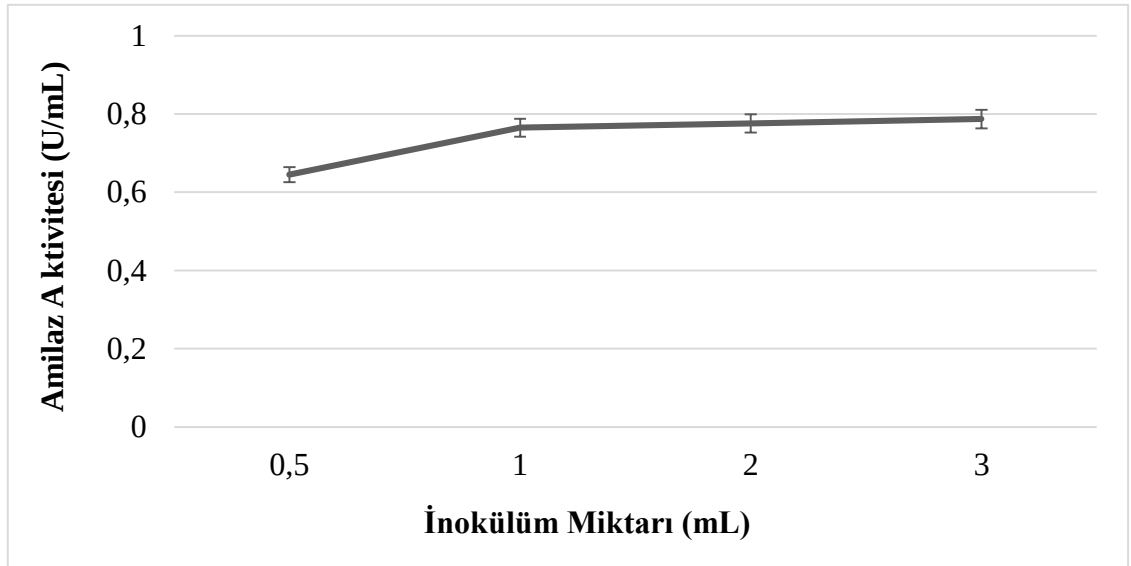
P. megaterium sıvı amilaz üretim ortamında 30 °C'de, 185 rpm'de 5 gün boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon boyunca her gün amilaz aktivite tayini yapılmıştır. Şekil 5'te görüldüğü gibi en yüksek amilaz üretiminin 0,78 U/mL aktivite ile inkübasyonun 3. gününde (72. saatte) olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 5. *P. megaterium* SFA'nın sıvı amilaz üretim ortamında 30 °C ve 185 rpm'de 5 günlük inkübasyon süresinde amilaz üretimi

Optimum inokulum miktarının amilaz üretimine etkisi

İnokülüm miktarının amilaz üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi için amilaz üretim ortamlarına farklı hacimlerde aşı kültürle inokulasyon yapılmıştır. İnokulumun başlangıç bakteri konsantrasyonu OD₆₀₀ 2 olarak ayarlanmıştır. 72. saatte yapılan aktivite tayininde Şekil 6'da görüldüğü üzere 0,76 U/mL aktivite değerine sahip olan 1 mL en uygun inokulum miktarı olarak saptanmıştır. Diğer inokulum miktarlarıyla da yakın sonuçlar elde edilmekle birlikte, çalışmalara 1 mL inokulum miktarı ile devam edilmiştir.

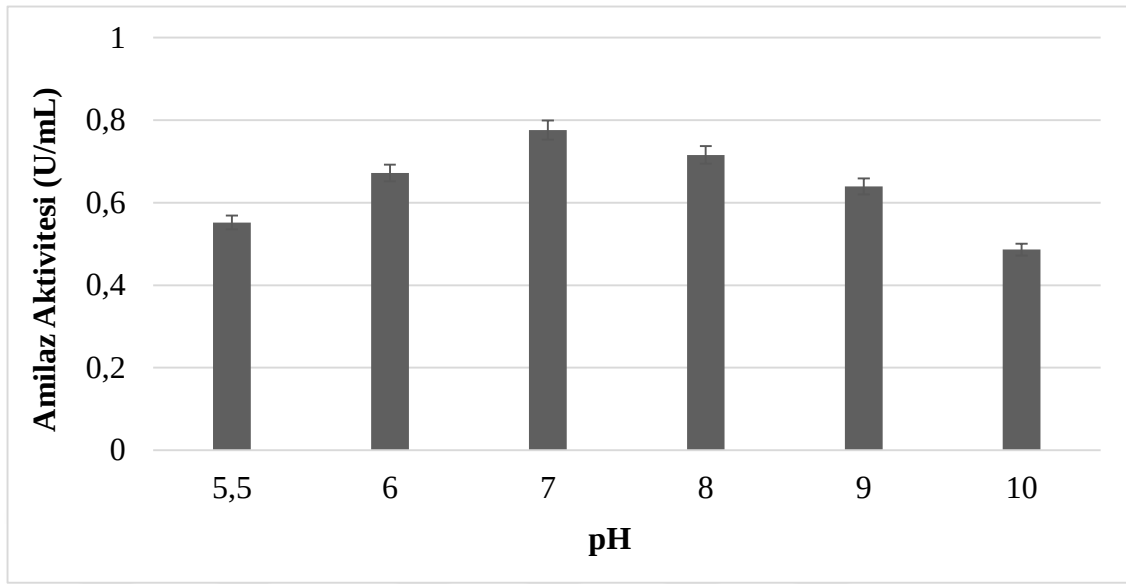


Şekil 6. *P. megaterium* SFA'nın inokulum miktarının amilaz üretimine etkisi

Başlangıç pH'sının amilaz üretimi üzerine etkisi

Amilaz üretimi için optimum başlangıç pH değerinin belirlenmesinde *P. megaterium* bakterisi pH 5,5-10,0 aralığında hazırlanan sıvı amilaz üretim ortamında 30 °C'de, 3 gün

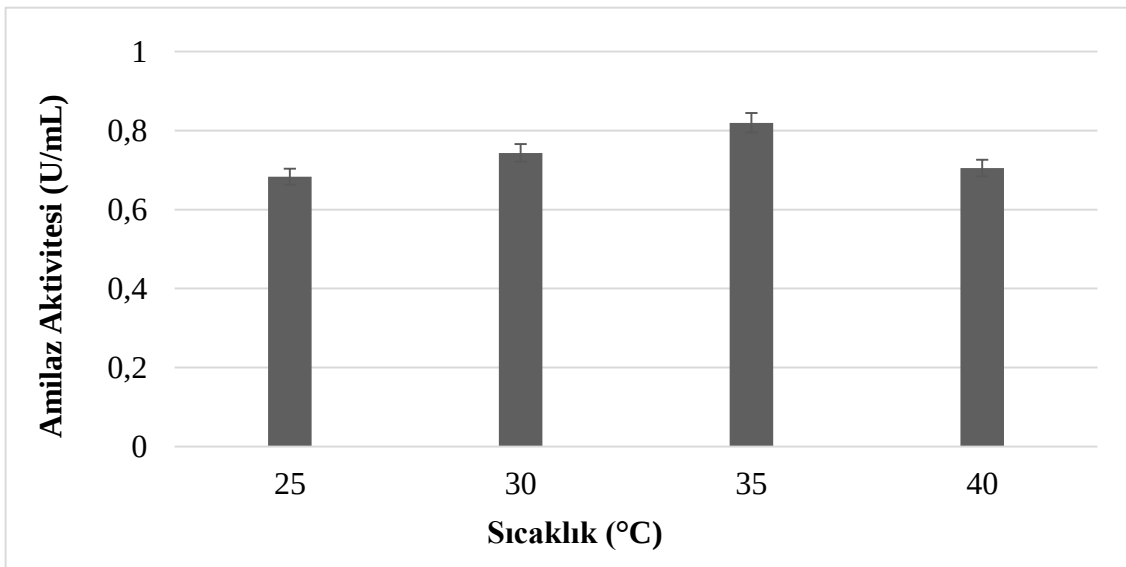
süreyle inkübe edilmiştir. Şekil 7’de görüldüğü üzere en yüksek amilaz üretimi pH 7,0’de elde edilmiştir. Diğer pH değerlerinde enzim üretiminde kademeli düşüş olduğu gözlenmiştir.



Şekil 7. Başlangıç pH’sının *P. megaterium* SFA ile amilaz üretimi üzerine etkisi

Sıcaklığın amilaz üretimi üzerine etkisi

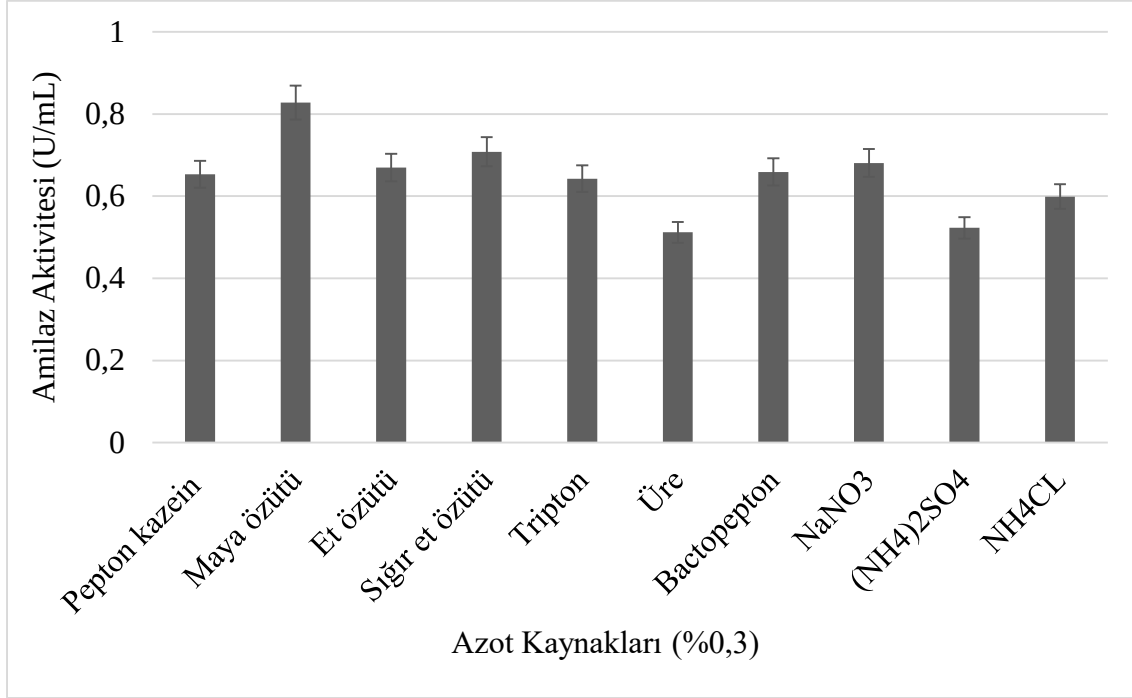
P. megaterium ile amilaz üretimi için optimum sıcaklığı belirlemek için farklı inkübasyon sıcaklıkları denenmiştir. *P. megaterium* izolatının 72 saatlik inkübasyon sonundaki enzim aktivite değerleri Şekil 8’de gösterilmiştir. Enzim üretimi için optimum sıcaklığın 35 °C olduğu belirlenmiştir. 25 °C, 30 °C ve 40 °C’de ise enzim üretiminde düşüş olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 8. Sıcaklığın *P. megaterium* SFA ile amilaz üretimi üzerine etkisi

Azot kaynaklarının amilaz üretimi üzerine etkisi

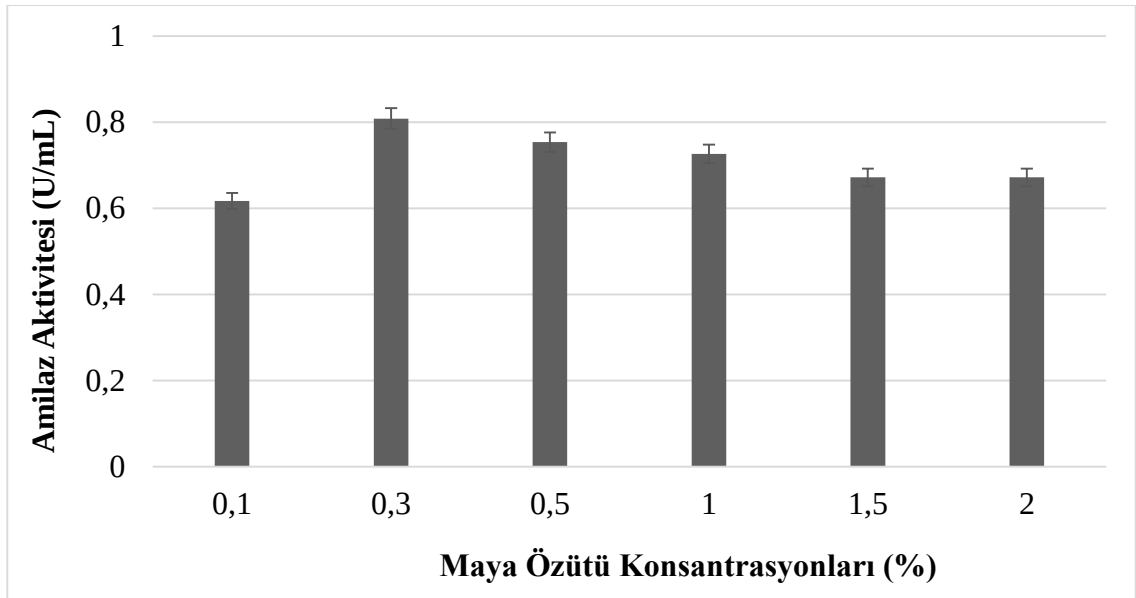
Farklı azot kaynaklarının amilaz üretimi üzerine etkisini belirlemek için karşılaştırılan azot kaynakları arasından en yüksek amilaz üretimi Şekil 9’da da görüldüğü üzere maya özütü varlığında tespit edilmiştir. İnorganik azot kaynaklarının organik azot kaynaklarına göre daha düşük enzim üretimine neden olduğu görülmüştür.



Şekil 9. Azot kaynaklarının *P. megaterium* SFA ile amilaz üretimi üzerine etkisi

Maya özütünün farklı konsantrasyonlarının belirlenmesi

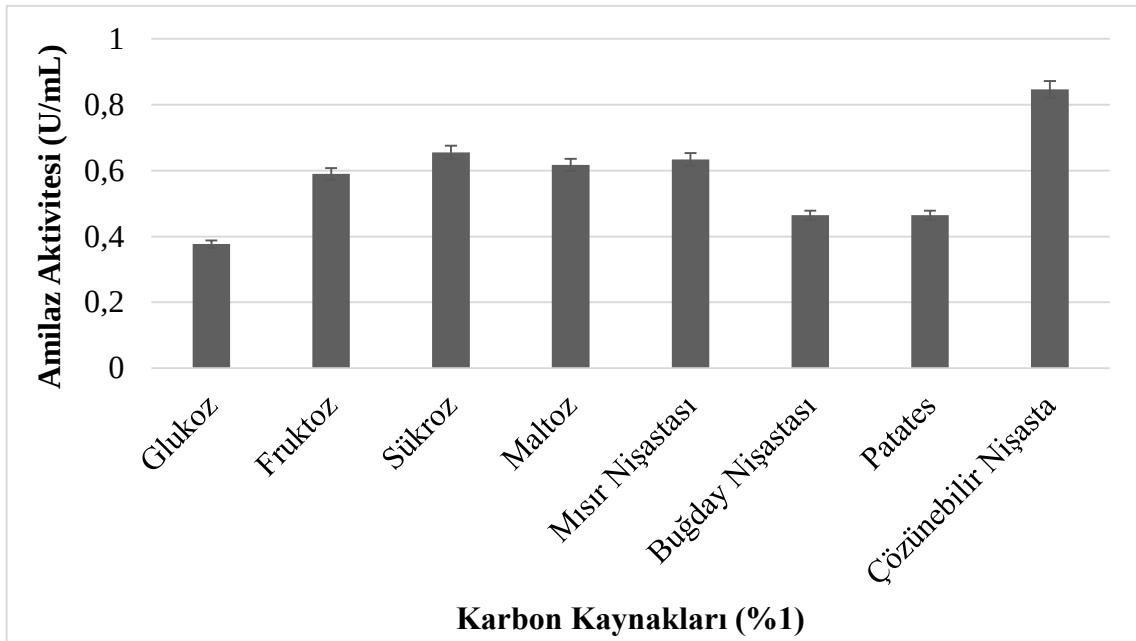
Amilaz üretimi için en iyi azot kaynağı olarak seçilen maya özütünün farklı konsantrasyonlarında elde edilen amilaz aktiviteleri Şekil 10’da verilmiştir. Şekil 10’da gösterildiği gibi en iyi enzim üretimi %0,3’lük maya özütünün varlığında görülmüştür. %0,1 oranında enzim üretiminin düştüğü tespit edilmiştir. %0,5 ve %1 oranında ciddi düşüşlerin görülmediği belirlenmiştir.



Şekil 10. Maya özütü konsantrasyonlarının *P. megaterium* SFA amilaz üretimi üzerine etkisi.

Karbon kaynaklarının enzim üretimi üzerine etkisi

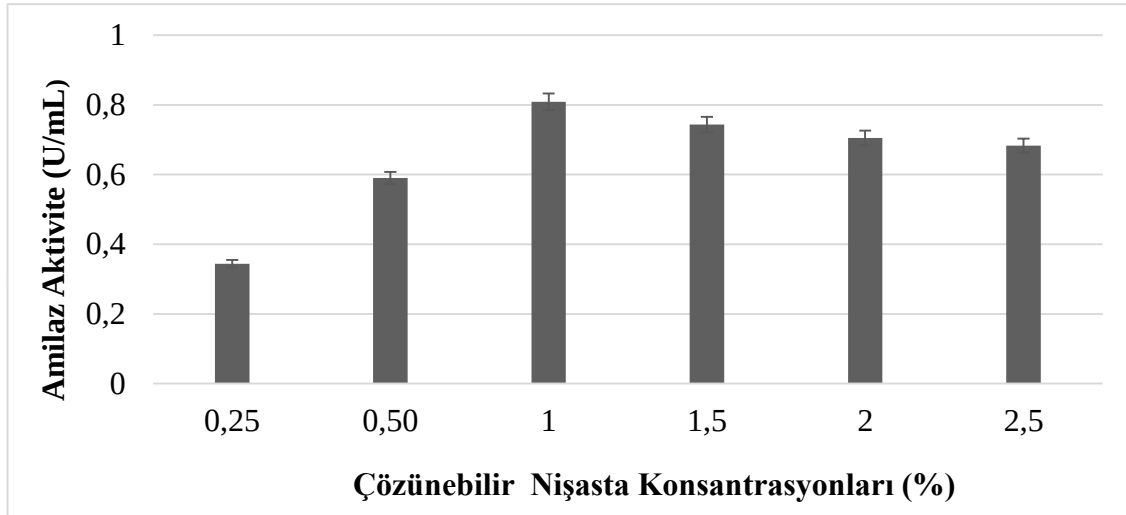
Karbon kaynaklarının amilaz enzimi üzerine etkisini belirlemek için optimum pH'ya ayarlı besiyerleri optimum sıcaklığa ayarlanmış inkübatörlerde 72 saat inkübe edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 11'de verilmiştir. %1 karbon kaynaklarının bulunduğu besiyerlerinde *P. megaterium*'un en iyi enzim üretiminin çözünebilir nişasta kullanıldığında olduğu gözlemlenmiştir. En az enzim üretiminin glukoz bulunan besiyerinde olduğu tespit edilmiştir. Patates ve buğday nişastasının bulunduğu besiyerinde de enzim üretiminin aynı seviyede olduğu görülmüştür.



Şekil 11. Karbon kaynaklarının (%1) *P. megaterium* SFA'nın amilaz üretimi üzerine etkisi

Çözünebilir nişastanın farklı konsantrasyonlarının amilaz üretimine etkisi

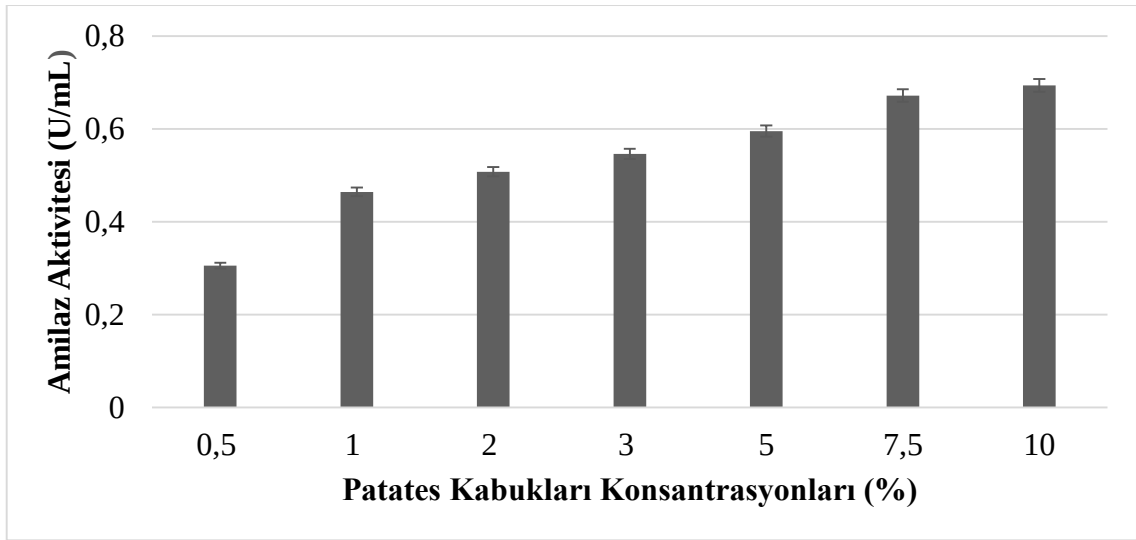
Çözünebilir nişastanın %0,25 - 2,5 konsantrasyonlarda enzim üretimi üzerine etkisi Şekil 12’de verilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi en iyi enzim üretimi %1 nişasta içeren besiyerinde görülmüştür. %0,25 ve %0,50 konsantrasyonlarında enzim üretiminde ciddi düşüş gözlenmiştir. %1,5, %2 ve %2,5 konsantrasyonlu besiyerlerinde ise enzim üretiminde düşüş olduğu ve birbirlerine çok yakın değerlerde olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 12. Çözünebilir nişastanın farklı konsantrasyonlarının *P. megaterium* SFA ile amilaz üretimi üzerine etkisi

Patates Kabuklarından Amilaz Üretimi

Hazır karbon kaynaklarına ek olarak *P. megaterium* SFA bakterisinin patates parçaları varlığında da amilaz üretebileceği görülmüştür. Buradan yola çıkarak patates kabuklarının da amilaz üretiminde değerlendirilebileceği kanısına varılmıştır. İlk olarak farklı miktarlarda patates kabukları varlığında amilaz üretimi araştırılmıştır. Şekil 13’te görüldüğü üzere patates kabuklarının miktarı arttıkça enzim üretiminin arttığı görülmüş; ancak besi ortamının viskozitesi arttığından dolayı %10’dan yüksek konsantrasyonlara çıkılamamıştır.



Şekil 13. Farklı patates kabuğu konsantrasyonlarında *P. megaterium* SFA izolatının amilaz üretimi

Amilaz üretim koşullarının RSM ve BBD ile istatistiksel optimizasyonu

P. megaterium SFA ile amilaz üretimi, yanıt yüzeyi metodolojisinin BBD tasarımı kullanılarak optimize edilmiştir. PPW, maya özütü ve pH'nın etkilerini belirlemek için yapılan BBD deneylerinin sonuçları Tablo 9'da gösterilmiştir.

Amilaz üretimi için ANOVA sonrasında elde edilen regresyon denkleminin katsayıları sırasıyla Tablo 12'de sunulmuştur. Böylece, amilaz üretim tahmini için aşağıdaki model denklem oluşturulmuştur:

$$\text{Amilaz (U/mL)} = -0.852 + 0.2672 \text{ PPW} + 0.946 \text{ Yeast} + 0.1070 \text{ pH} - 0.01439 \text{ PPW*PPW} - 0.483 \text{ Yeast*Yeast} - 0.00481 \text{ pH*pH} - 0.0497 \text{ PPW*Yeast} - 0.00578 \text{ PPW*pH} - 0.0280 \text{ Yeast*pH}$$

Tablo 12. Amilaz Üretimi İçin Tahmin Edilen Çoklu Belirleme Regresyon Katsayıları (R^2)

Terim	Katsayı	Standart Hata	t	p
Sabit	0.5419	0.0120	45.02	0.000
PPW	0.16970	0.00737	23.02	0.000
Yeast	0.04226	0.00737	5.73	0.000
pH	0.00459	0.00737	0.62	0.540
PPW*PPW	-0.0900	0.0108	-8.29	0.000
Yeast*Yeast	-0.0193	0.0108	-1.78	0.090
pH*pH	-0.0193	0.0108	-1.77	0.091
PPW*Yeast	-0.0248	0.0104	-2.38	0.027
PPW*pH	-0.0289	0.0104	-2.77	0.012
Yeast*pH	-0.0112	0.0104	-1.08	0.295
S: 0.0294840 R^2 : 97.01% R^2 (adj): 95.67% R^2 (pred): 92.48%				

Modelin belirleme katsayısı (R^2) amilaz üretimi için 0,97 olarak hesaplanmıştır. R^2 değeri 1.0'a ne kadar yakınsa model o kadar güçlüdür. Bu da model denkleminin verilere yeterince uyduğunu göstermektedir. Amilaz üretimi için 0,92'lik pred R^2 değeri, 0,95'lik adj R^2 değeri ile iyi bir uyum içindedir (Tablo 12). Bu da amilaz üretimi için deneysel ve tahmini değerler arasında iyi bir uyum olduğunu kanıtlamıştır.

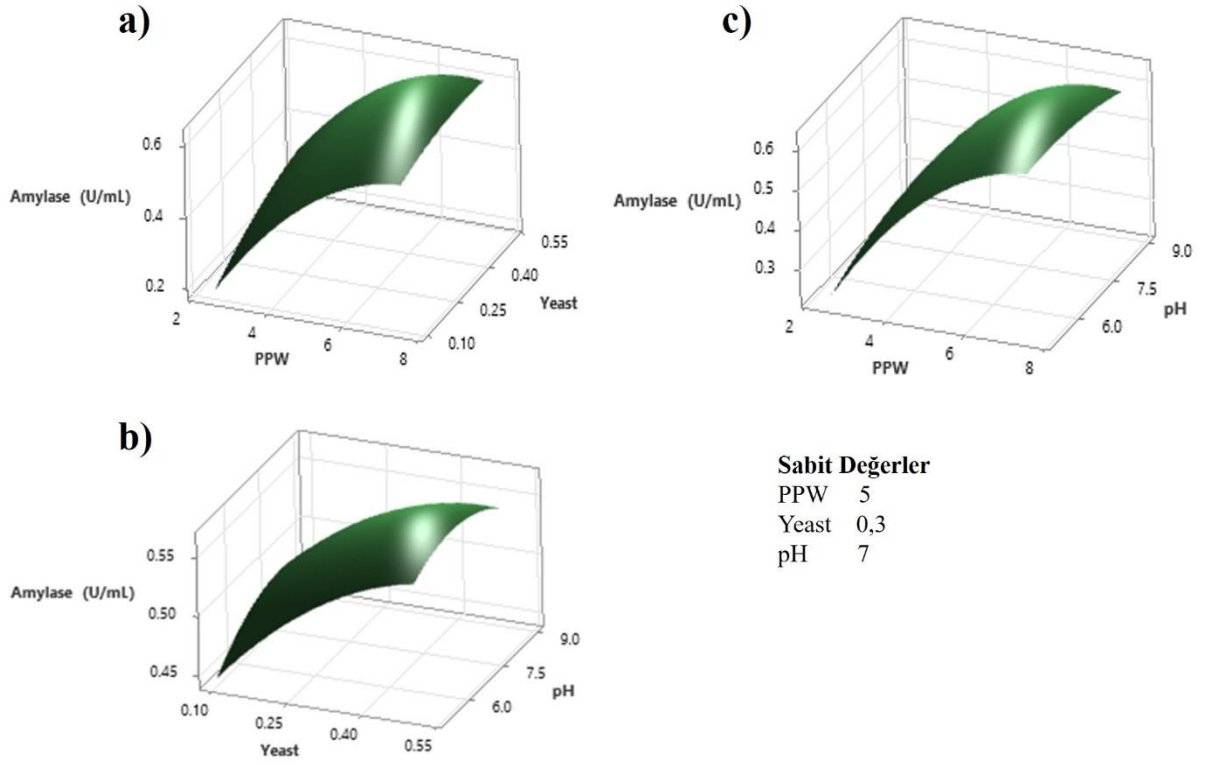
Tablo 13. Kodlanmış Değerler Kullanılarak Amilaz Üretimi İçin Varyans Analizi

Source	Serbestlik Derecesi	SS: Karelerin toplamı	MS: Ortalama kare	F	P
Model	9	0.564199	0.062689	72.11	0.000
Linear	3	0.489697	0.163232	187.77	0.000
Square	3	0.061886	0.020629	23.73	0.000
2-Way Interaction	3	0.012616	0.004205	4.84	0.011
Error	20	0.017386	0.000869		
Lack-of-Fit	3	0.006024	0.002008	3.00	0.059
Pure Error	17	0.011362	0.000668		
Total	29	0.581585			

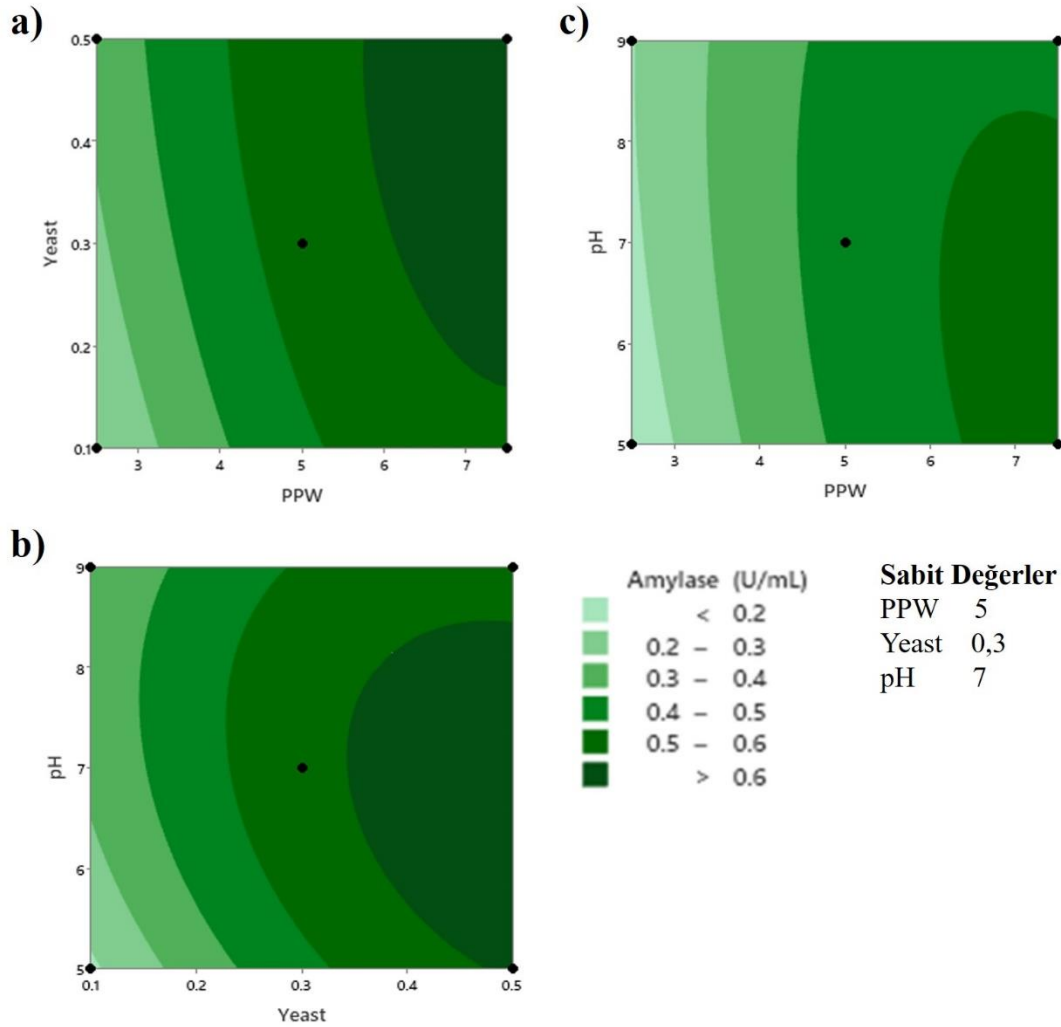
Tablo 12'deki model katsayılarının büyüklükleri, PPW'nin amilaz üretimi üzerinde maya özütü ve pH'dan daha belirgin bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. pH'nın etkisinin ise istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür ($p>0,05$). Karesel etkilerde pozitif bir değer, ilgili değişkenin daha yüksek bir seviyeye çıkarılması halinde yanıtta bir artış olduğunu gösterirken, negatif değer değişkenin düşük seviyelerinde daha iyi bir yanıt elde edildiğini gösterir. Tablo 12'ye bakıldığında, PPW, maya özütü ve pH'nın negatif karesel etkileri vardır. Maya özütü ve pH'nın karesel etkilerinin büyüklüklerinin aynı olduğu görülmüş ancak her ikisinin de istatistiksel olarak önemli olmadıkları bulunmuştur ($p>0,05$). Etkileşimler için, pozitif bir değer, her iki değişkenin de düşük veya yüksek olmak üzere aynı seviyeye değişmesi durumunda yanıtın arttığını gösterir. Negatif bir değer ise değişkenler zıt yönde değişirse (bir değişken yüksek bir seviyeye çıkarken diğeri düşük bir seviyeye inerse) yanıtın arttığını gösterir (Martendal et al., 2007). Etkileşimli etkilerin hepsi negatif olup maya özütü ve pH etkileşiminin istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür ($p>0,05$).

Tablo 13'te gösterilen varyans analizi sonuçları, modelin amilaz üretimi için önemli doğrusal, ikinci dereceden ve etkileşim etkilerine ($p<0,05$) sahip olduğunu göstermiştir.

Varyans analizi sonuçları modelin amilaz üretimini tahmin etmede yeterli olduğunu 0.059 olan, önemsiz ($p>0.05$) uyum eksikliği (Lack-of-fit) değeri ile ortaya koymuştur.



Şekil 14. Amilaz üretimi üzerinde (a) PPW ve yeast, (b) yeast ve pH ve (c) PPW ve pH etkisini gösteren yanıt yüzeyi grafikleri



Şekil 15. Amilaz üretimi üzerinde (a) PPW ve yeast, (b) yeast ve pH ve (c) PPW ve pH etkisini gösteren kontur grafikleri

Amilaz üretimi için a) PPW'ye karşı yeast, b) yeast'e karşı pH, c) PPW'ye karşı pH için yanıt yüzey grafikleri Şekil 14'te ve kontur grafikleri Şekil 15'te verilmiştir. Üçüncü faktör, tüm durumlarda, merkez noktada sabit tutulmuştur (yani sırasıyla pH 7, PPW 5, yeast 0,3).

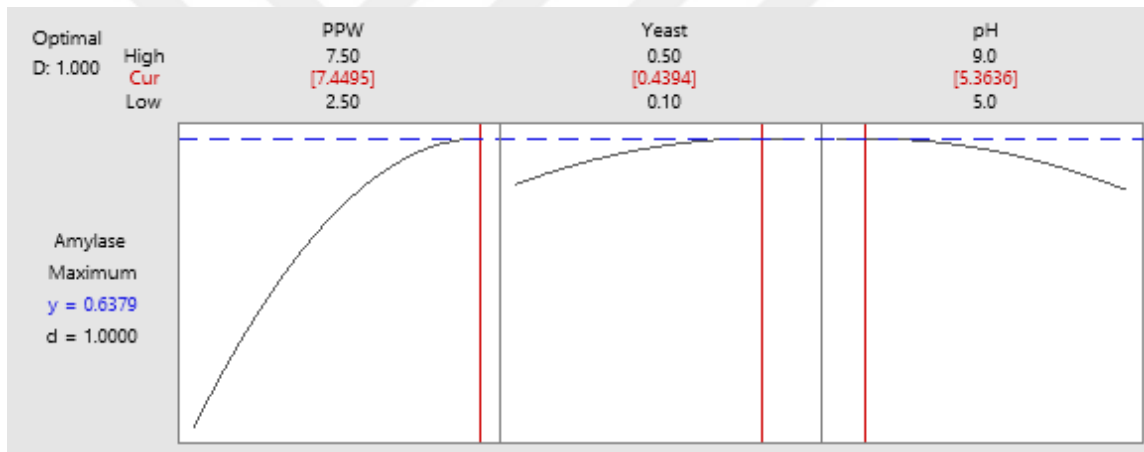
Yanıt yüzeyi ve kontur grafikleri, amilaz üretimi için gereken optimum koşulları ve değişkenler arasındaki etkileşimi anlamaya yardımcı olmaktadır. Şekil 14'teki yüzey grafikleri, optimum noktaların tasarım sınırları içinde olduğunu ve maksimum yanıt için üç değişkenin her birinin optimum seviyelerini işaret eden zirve noktalarını göstermektedir.

Tüm yüzey ve kontur grafiklerine bakıldığında PPW ve yeast değişkenlerinin seviyeleri arttıkça amilaz üretiminin belirli bir seviyeye kadar arttığını göstermiştir. Tablo 12'deki *p* değerinden de görüldüğü üzere pH'nın amilaz üretimi üzerindeki etkisinin önemsiz olduğu Şekil 14.b ve Şekil 14.c'de görülmüştür.

Dairesel, eliptik veya eyer olabilen kontur grafiklerinin şekilleri, değişkenler arasındaki etkileşimlerin önemini göstermek için başka bir araç sağlar. Dairesel kontur grafiği ihmal

edilebilir bir etkileşime işaret ederken, eliptik veya eyer kontur grafiği ilgili değişkenler arasında önemli bir etkileşim olduğunu gösterir (Murthy et al., 2000). Şekil 15.a ve 15.c’de daha eliptik bir kontur grafiği gözlenirken, Şekil 15.b’de dairesel bir kontur grafiği görülmektedir. Bu da Tablo 11’deki değişkenlerin etkileşim değerleriyle tutarlıdır. PPW- yeast ve PPW-pH etkileşimi istatistiksel olarak önemli ($p<0,05$) nitelendirilirken, yeast-pH etkileşimi istatistiksel olarak önemsiz ($p>0,05$) ve ihmal edilebilir nitelendirilebilir.

Minitab v.15’in "response optimizer (yanıt optimize edici)" seçeneği kullanılarak, çalışılan üç faktörün optimum değerleri Şekil 16’da gösterildiği gibi %7,4 PPW, %0,44 yeast ve pH 5,3 olarak bulunmuştur. Bu optimum değerler kullanılarak elde edilmesi beklenen aktivite ise 0,638 U/mL olarak belirlenmiştir. Modeli doğrulamak için, belirlenen optimize kültür koşulları kullanılarak amilaz üretimi için deneyler üç tekrar halinde gerçekleştirilmiştir. Bu optimum koşullar kültürlerde kullanıldığında, gözlenen aktivite, 0,638 U/mL olan tahmin değerlerine çok yakın olan 0,642 U/mL olarak bulunmuştur.



Şekil 16. Maksimum amilaz üretimi için Minitab-Yanıt optimize edici ile tahmin edilen optimum değerler

***P. megaterium* SFA Amilazının Saflaştırılması ve Karakterizasyonu**

Enzim saflaştırılması

Sıvı amilaz üretim ortamında geliştirilen *P. megaterium* SFA’dan amilaz enziminin saflaştırılması için amonyum sülfat çöktürmesi, ultrafiltrasyon ve iyon değişim kromatografisi gerçekleştirilmiştir ve sonuçlar Tablo 14’te verilmiştir. Sonuçlara göre, amilaz 20,4 kat, %9,6 verimle ve 10,2 U/mg spesifik aktivite ile saflaştırılmıştır.

Tablo 14. *P. megaterium* SFA Amilazının Saflaştırma Aşamaları

Saflaştırma işlemi	Hacim (mL)	Protein kons. (mg/mL)	Toplam protein (mg)	Aktivite (U/mL)	Toplam aktivite (U)	Spesifik aktivite (U/mg)	Saflaştırma verimliliği (%)	Saflaştırma derecesi
Süpernatant (Ham enzim)	100	1,8	180	0,8	80	0,5	100	1
Amonyum sülfat çöktürmesi	15	3,5	52,5	2,87	43	0,83	54	1,7
İyon değişim kromatografisi	15	0,05	0,75	0,51	7,65	10,2	9,6	20,4

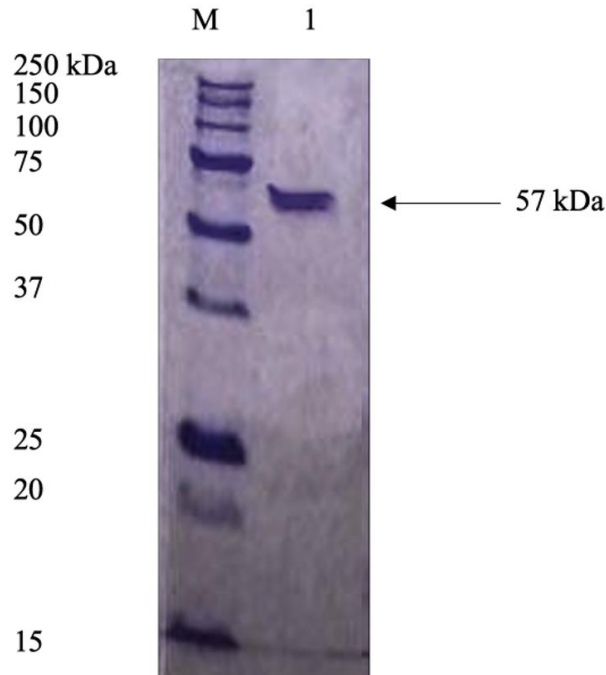
Spesifik amilaz aktivitesi (U/mg protein): Amilaz aktivitesi (U/mL)/Protein miktarı (mg/mL)

Saflaştırma verimliliği (%): [Toplam amilaz aktivitesi (U)/Süpernatant toplam amilaz aktivitesi (U)]x100

Saflaştırma derecesi: Spesifik amilaz aktivitesi (U/mg)/Süpernatant spesifik amilaz aktivitesi (U/mg)

SDS-PAGE Analizleri ve Amilaz Enziminin Moleküler Kütlesinin Hesaplanması

Saflaştırma işlemlerinin etkinliğinin değerlendirilmesi ve amilaz enziminin elektroforetik özelliklerinin belirlenmesi için saflaştırma basamaklarından elde edilmiş olan örneklerin SDS-PAGE analizleri Laemmli yöntemine göre gerçekleştirilmiştir (Laemmli, 1970). Bu analizde, ayırma jeli için %12,5'lik, yığma jeli için ise %5'lik akrilamid jel kullanılmıştır. Şekil 17'de SDS PAGE analizi gösterilmiştir.

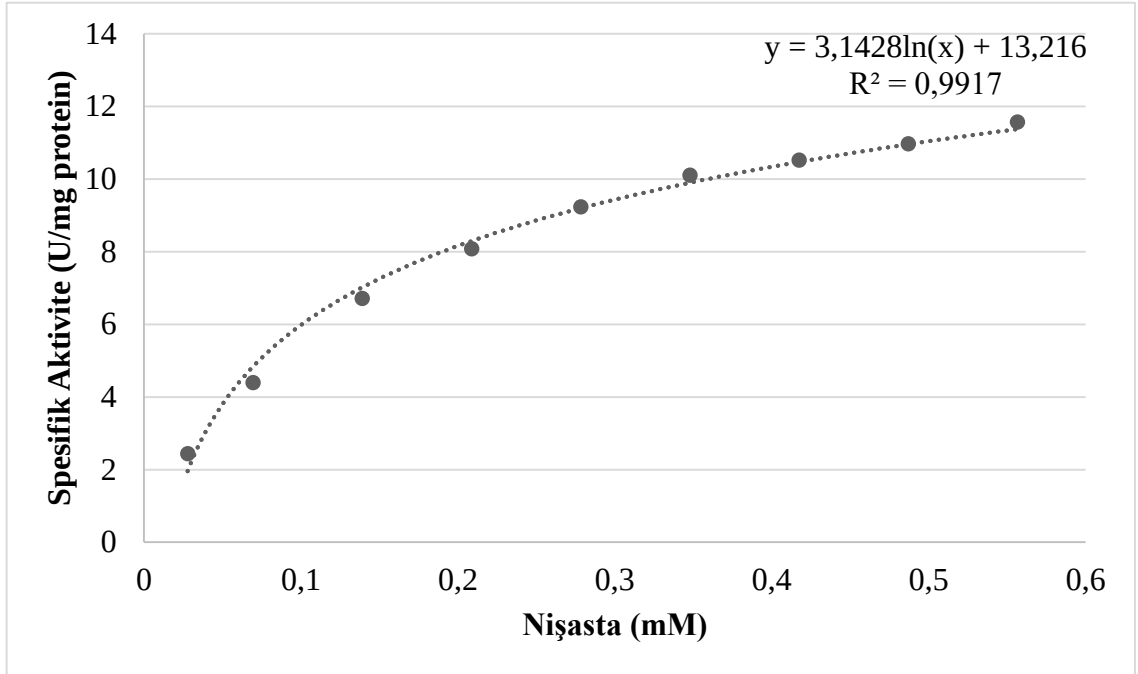


Şekil 17. Saflaştırılmış *P. megaterium* amilaz enziminin SDS-PAGE analizi. M: Precision Plus Protein Unstained Standart (250- 10kD); 1: Saflaştırılmış amilaz örneği

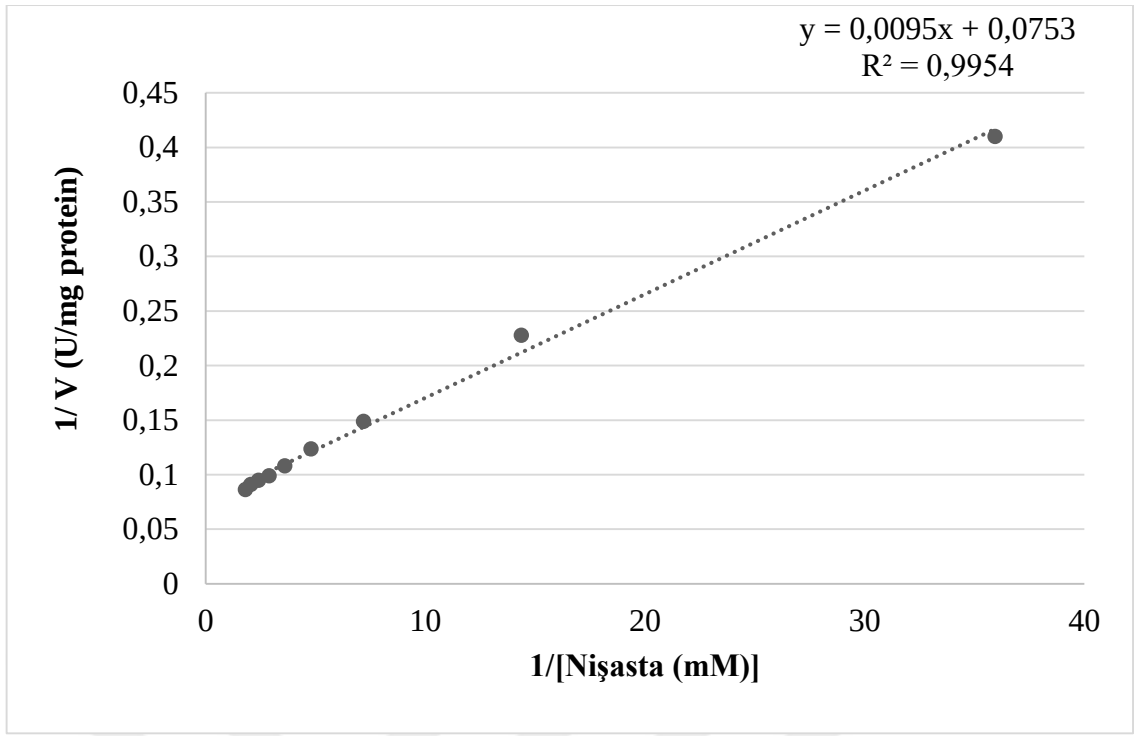
Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standardı kullanılarak çizilen ve Şekil Ek 4.2'den elde edilen denklem kullanılarak, amilaz enziminin nispi göç mesafesi uygun bir konuma yerleştirilerek büyüklüğünün logaritması elde edilmiştir. Bu değer enterpolasyonu, amilaz protein bandının moleküler ağırlığının 57 kDa olduğunu göstermiştir.

Amilaz Enzim Reaksiyonuna Ait K_m ve V_{max} Kinetik Sabitlerinin Saptanması

Saflaştırılan amilaz enziminin kinetik sabitlerini belirlemek için substrat olarak %0,1-%2 konsantrasyon aralığında çözünebilir nişasta kullanılmıştır. Amilaz enziminin Michaelis-Menten grafiği Şekil 18'de ve Lineweaver Burk grafiği Şekil 19'da verilmiştir. Kinetik grafiklerinden yapılan hesaplamalara göre, enzimin V_{max} değeri 13,3 U/mg protein ve K_m değeri 0,126 mM olarak bulunmuştur.



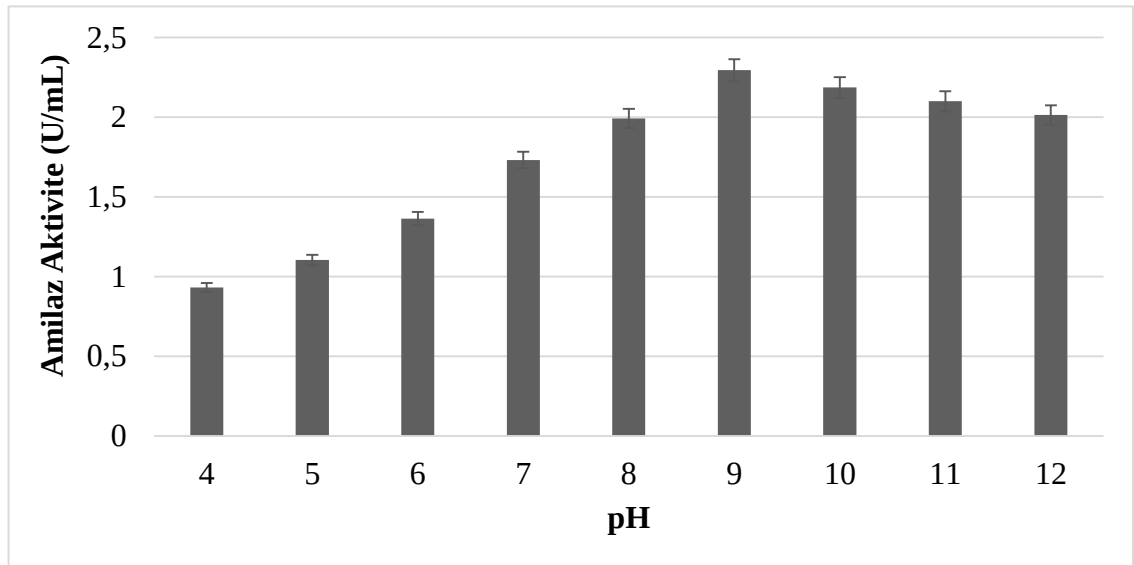
Şekil 18. *P. megaterium* SFA amilazının Michaelis-Menten grafiği



Şekil 19. *P. megaterium* SFA amilazının Lineweaver-Burk grafiği

pH'nın amilaz aktivitesi üzerindeki etkisi

Amilaz enziminin optimum pH değerini belirlemek için pH 4,0-12,0 değerlerinde aktivite tayinleri yapılmıştır. Şekilde 20'de verildiği gibi amilaz enziminin 2,29 U/mL aktivite değeri ile optimum pH'sı 9,0 olarak saptanmıştır.

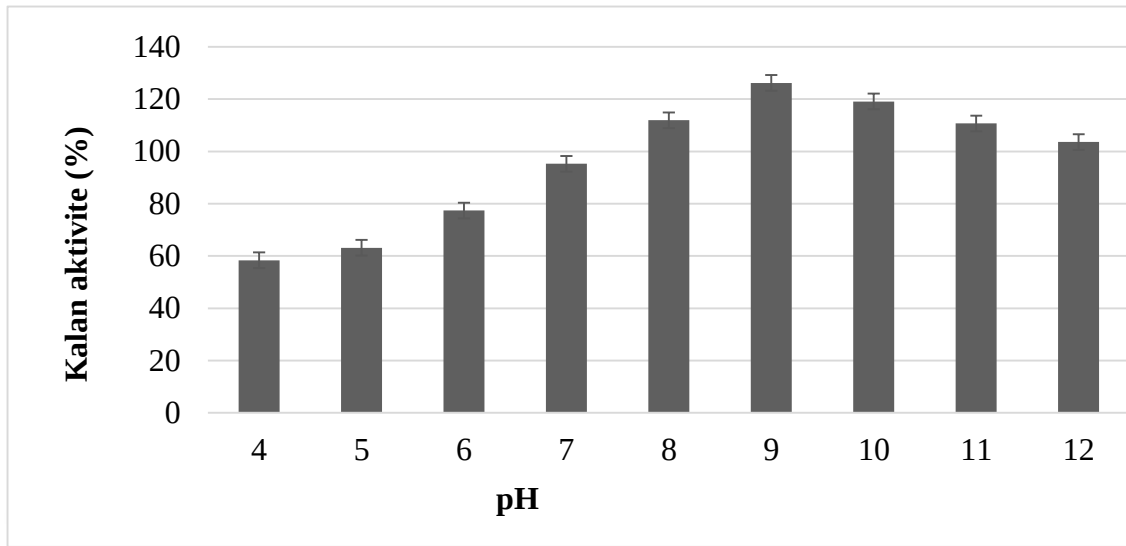


Şekil 20. pH'nın *P. megaterium* SFA amilaz enzim aktivitesine etkisi

Amilaz enziminin pH stabilitesi

Amilaz enziminin pH stabilitesini belirlemek için enzim solüsyonu pH 4,0-12,0 değerlerinde 1 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Enzim aktiviteleri ölçülmüş kontrol

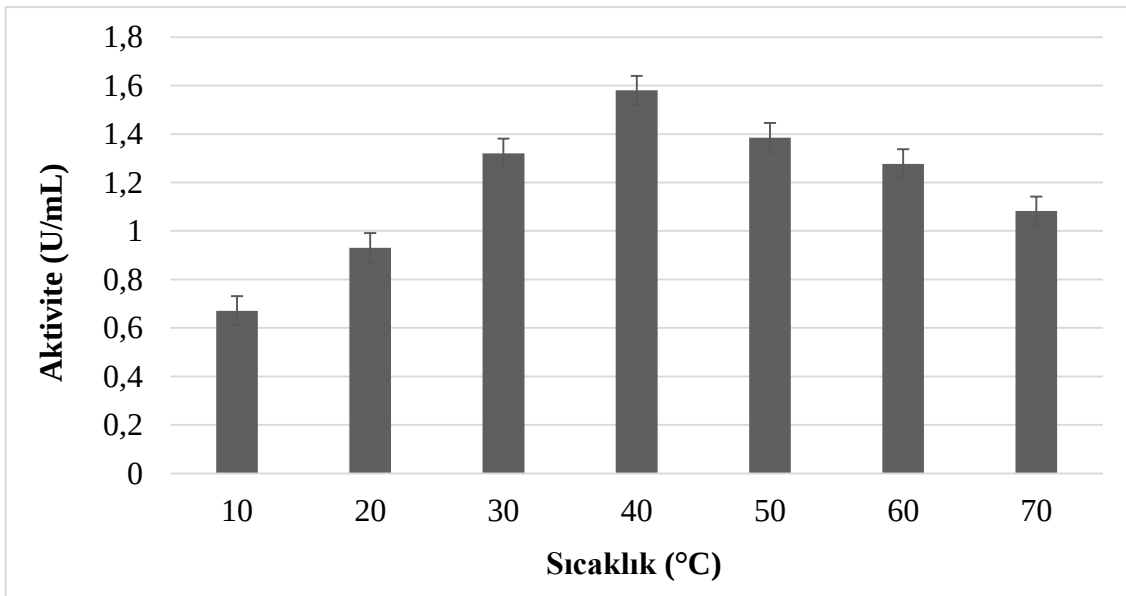
numunesine göre kalan aktiviteler hesaplanmıştır. Şekil 21’de gösterildiği gibi en yüksek kalan aktivite değeri (%126,19) pH 9,0’da tespit edilmiştir.



Şekil 21. *P. megaterium* SFA amilaz enziminin pH stabilitesi

Sıcaklığın amilaz aktivitesi üzerindeki etkisi

P. megaterium’un farklı sıcaklıklarda 72 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilen amilaz aktivite sonuçları Şekil 22’de verilmiştir. En yüksek aktivitenin (1,58 U/mL) elde edildiği optimum sıcaklık değeri 40 °C olarak belirlenmiştir.

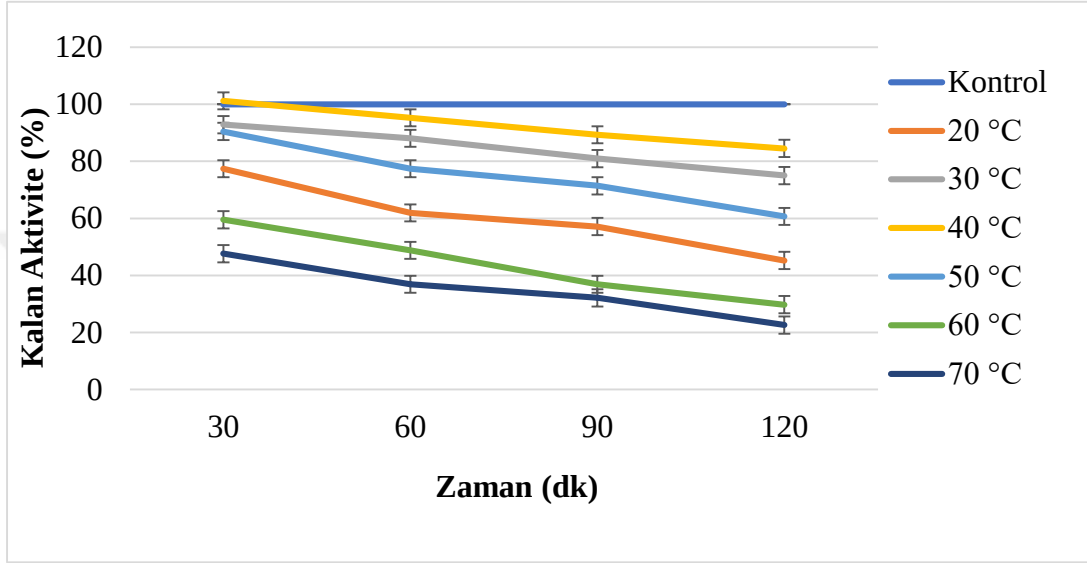


Şekil 22. Sıcaklığın *P. megaterium* SFA amilaz enzim aktivitesine etkisi

Amilaz enziminin sıcaklık stabilitesi

Sıcaklık stabilitesinin belirlenmesinde enzim 20 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C ve 70 °C’de; 30, 60, 90 ve 120 dakikalık inkübasyonlara bırakıldıktan sonra enzim aktiviteleri

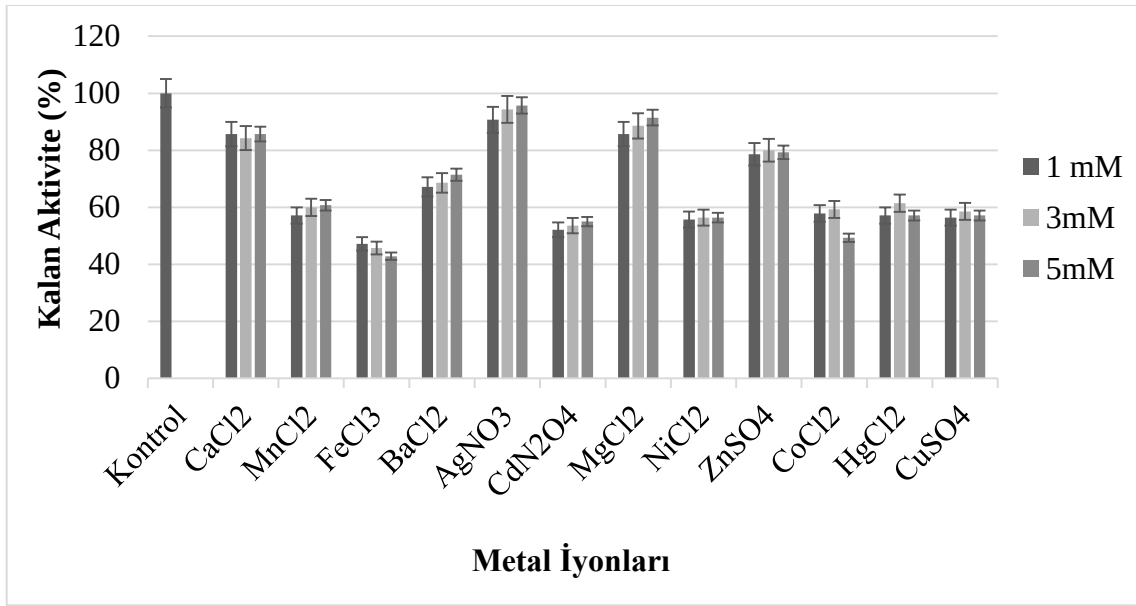
ölçülmüş ve kontrol numunelerine göre kalan aktiviteler hesaplanmış ve sonuçlar Şekil 23'te verilmiştir. Enzimin 30 dakika ön inkübasyonla 40 °C'de kararlı olduğu ve aktivitesinde düşüş olmadığı gözlenmiştir. 120 dakika sonunda bile enzimin aktivitesini 20 °C'de %45 oranında, 30 °C'de %75 oranında, 40 °C'de %84 oranında, 50 °C'de %60 oranında, 60 °C'de %29 ve 70 °C'de ise %22 oranında koruduğu tespit edilmiştir. Ek olarak; daha kısa sürede gerçekleşen inkübasyon sonunda amilaz enzimi diğer süreçlere nispeten kararlılığını daha yüksek oranlarda korumuştur.



Şekil 23. Sıcaklığın *P. megaterium* amilaz enzim aktivitesine etkisi

Metal iyonlarının amilaz aktivitesi üzerindeki etkisi

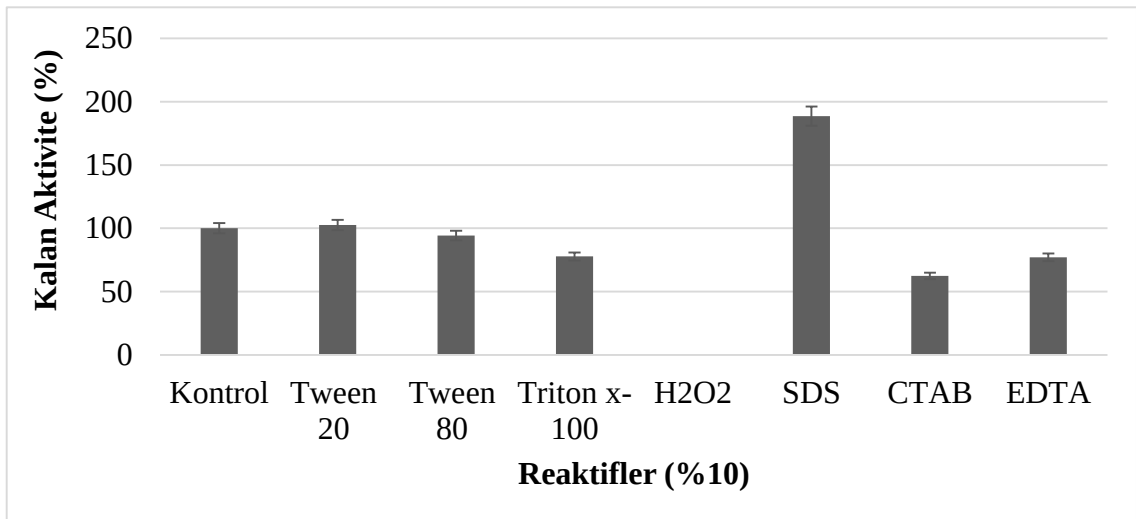
Şekil 24'te görüldüğü üzere farklı konsantrasyonlardaki iyonlar arasında enzim üretimini artıran iyonun olmadığı tespit edilmiştir. Tüm iyonların varlığında enzim üretiminin farklı oranlarda azaldığı belirlenmiştir.



Şekil 24. Metal iyonlarının *P. megaterium* SFA amilaz aktivitesine etkisi

Çeşitli reaktiflerin amilaz aktivitesi üzerindeki etkisi

Reaktiflerin varlığında amilaz bağıl aktivite Şekil 25'te verilmiştir. Amilaz bağıl aktivite Tween 20 varlığında %102, Tween 80'de %94, Triton X-100'de %77, H₂O₂'de %0, SDS'de %188, CTAB'de %62 ve EDTA'da %77 olarak belirlenmiştir. Tween 20 ve 80'de önemli bir fark gözlenmezken H₂O₂'de enzimin tamamen inhibe olduğu gözlenmiştir. Triton X-100, CTAB ve EDTA varlığında enzim aktivitesinde farklı oranlarda düşüş tespit edilmiştir. SDS varlığında ise aktivitenin yaklaşık iki katına çıktığı görülmüştür.

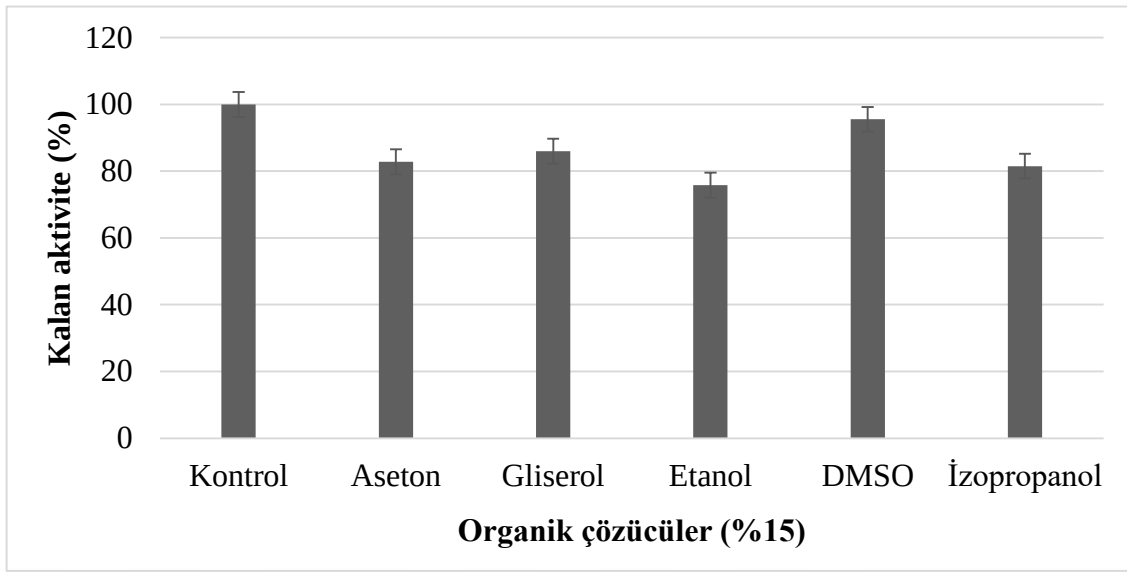


Şekil 25. Reaktiflerin *P. megaterium* SFA amilaz aktivitesine etkisi

Çeşitli organik çözücülerin aktivitesi üzerindeki etkisi

Şekil 26'da görüldüğü gibi farklı organik çözücülerin varlığında bağıl amilaz aktivite sırasıyla aseton varlığında %82, gliserolde %85, etanolde %75, DMSO'da %95,

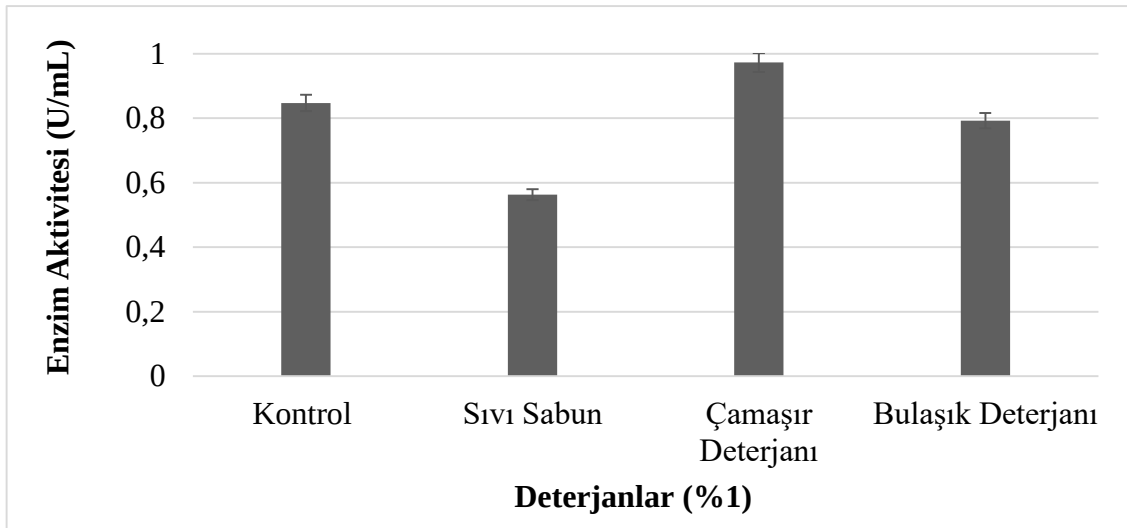
izopropanolde %81 olarak belirlenmiştir. Hiçbir organik çözücü varlığında enzim aktivitesinde artış gözlemlenmemiştir.



Şekil 26. Organik çözücülerin *P. megaterium* SFA amilaz aktivitesine etkisi

Ticari deterjanların amilaz aktivitesi üzerindeki etkisi

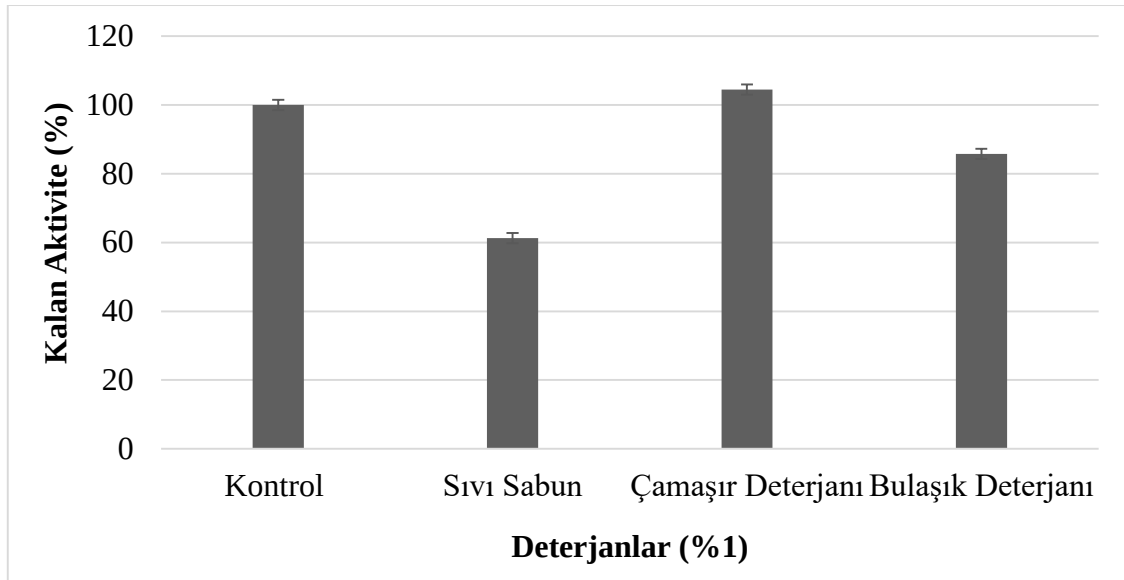
Şekil 27’de görüldüğü gibi en yüksek aktivite çamaşır deterjanında 0,97 U/mL olarak gözlemlenmiştir. Diğer deterjanlar varlığında aktiviteler sırasıyla sıvı bulaşık deterjanında 0,79 U/mL, sıvı el sabununda ise 0,56 U/mL olarak belirlenmiştir.



Şekil 27. Ticari deterjanların amilaz aktivitesi üzerine etkisi

Ticari deterjanların amilaz stabilitesi üzerine etkisi

Şekil 28’de gösterildiği üzere amilazın bağıl aktivite değerleri sırasıyla sıvı el sabunu varlığında %61, çamaşır deterjanında %104 ve bulaşık deterjanında %85 olarak belirlendi.

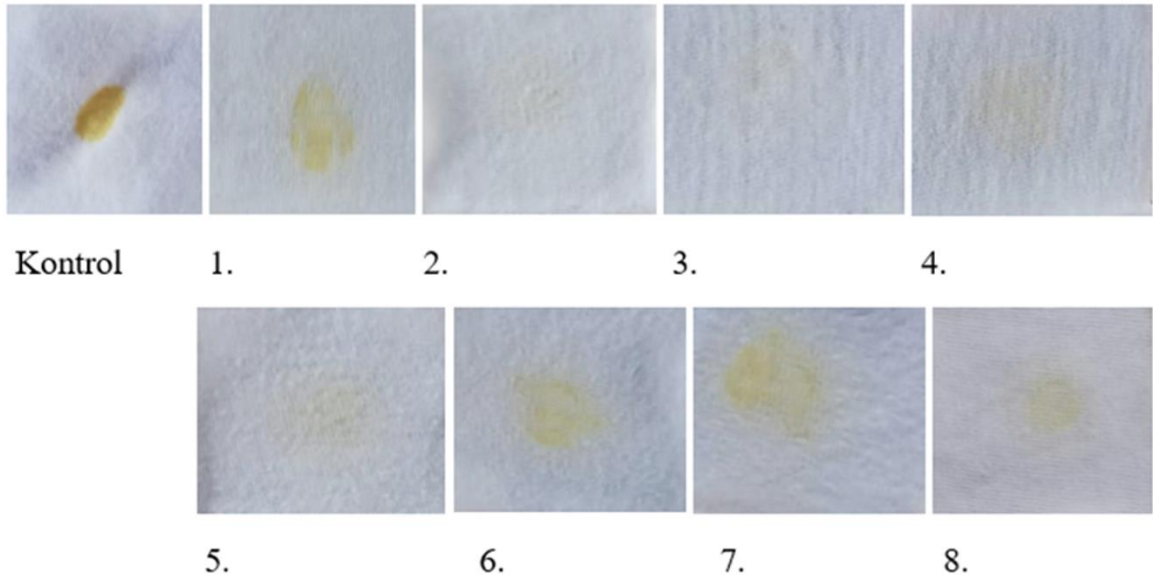


Şekil 28. Ticari deterjanların amilaz enzim stabilitesi üzerine etkisi

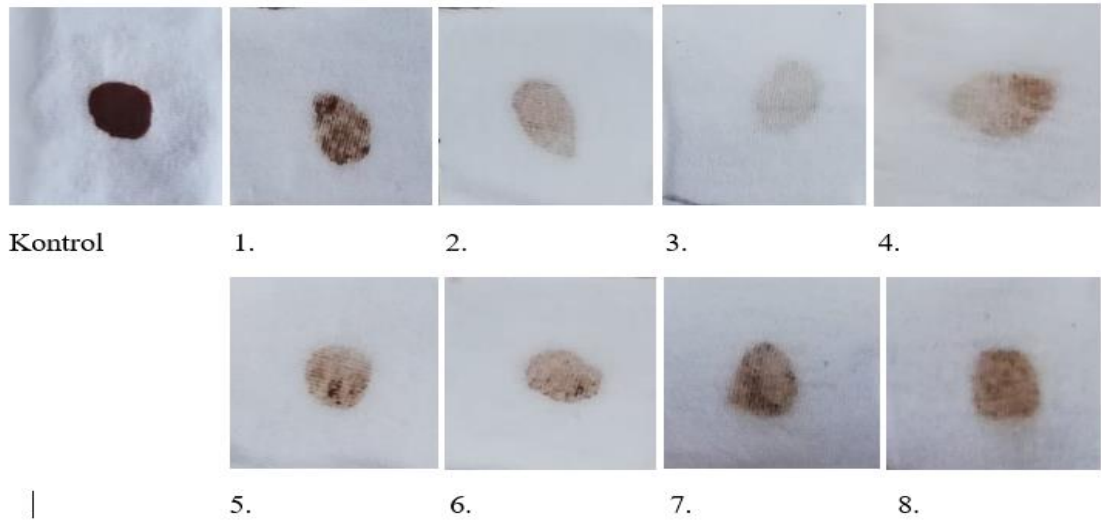
***P. megaterium* SFA Amilaz Enziminin Biyoteknolojik Uygulamaları**

Amilaz enziminin leke çıkarıcı etkisinin belirlenmesi

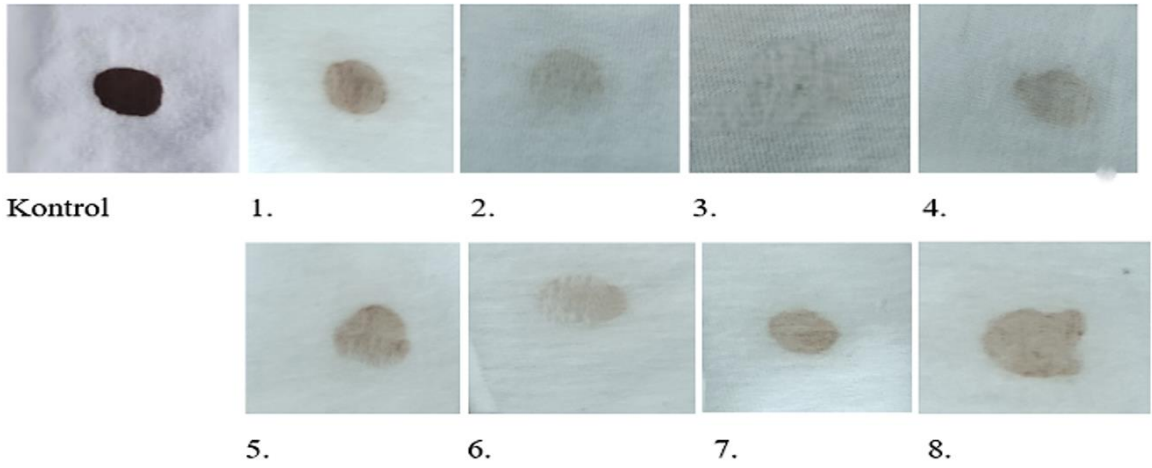
Tablo 9'a göre farklı bileşimlerdeki yıkama çözeltileri hazırlanmış ve amilaz enziminin lekeleri çıkarmadaki etkisinin araştırılması için mısır ve çikolata lekeli kumaşlar 30 °C ve 180 rpm'de 30 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Ayrıca, amilaz enziminin 60 °C sıcaklıkta çikolata lekeleri üzerindeki etkisi de incelenmiştir. Şekil 29 ve Şekil 30'daki sonuçlar, amilaz enziminin 30 °C'de hem mısır hem de çikolata lekelerini çıkarmada etkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca, ek bir deney olarak 60 °C sıcaklıkta gerçekleştirilen çalışma (Şekil 31), amilaz enziminin çikolata lekesini daha etkili bir şekilde çıkardığını ortaya koymuştur. Bu durum, amilazın sıcaklık arttıkça etkinliğinin de artabileceğini göstermiştir. Sonuçlar, amilaz enziminin düşük sıcaklıkta bile etkili bir leke çıkarıcı olarak işlev görebildiğini ve özellikle daha yüksek sıcaklıklarda çikolata lekesine karşı daha güçlü bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir.



Şekil 29. *P. megaterium*'un farklı yıkama çözeltilerinde mısır lekesi üzerindeki yıkama performansı. 1. Distile su ve tampon; 2. Enzim ve tampon; 3. Enzim, tampon ve çamaşır deterjanı; 4. Enzim, tampon ve sıvı el sabunu; 5. Enzim, tampon ve bulaşık deterjanı; 6. Distile su ve sıvı el sabunu; 7. Distile su ve bulaşık deterjanı; 8. Distile su ve çamaşır deterjanı



Şekil 30. *P. megaterium*'un 30 °C'de farklı yıkama çözeltilerinde çikolata lekesi üzerindeki yıkama performansı. 1. Distile su ve tampon; 2. Enzim ve tampon; 3. Enzim, tampon ve çamaşır deterjanı; 4. Enzim, tampon ve bulaşık deterjanı; 5. Enzim, tampon ve sıvı el sabunu; 6. Distile su ve sıvı el sabunu; 7. Distile su ve bulaşık deterjanı; 8. Distile su ve çamaşır deterjanı



Şekil 31. *P. megaterium*'un 60 °C'de farklı yıkama çözeltilerinde çikolata lekesi üzerindeki yıkama performansı. 1. Distile su ve tampon; 2. Enzim ve tampon; 3. Enzim, tampon ve çamaşır deterjanı; 4. Enzim, tampon ve bulaşık deterjanı; 5. Enzim, tampon ve sıvı el sabunu; 6. Distile su ve çamaşır deterjanı; 7. Distile su ve sıvı el sabunu; 8. Distile su ve bulaşık deterjanı

Amilaz enzimi ile nanopartikül sentezinin araştırılması

Nanopartikül üretiminde nişasta içeren NB ortamının *P. megaterium* SFA ile kültivasyonu sonrası elde edilen süpernatanta 2 mM AgNO_3 , CoCl_2 , CuSO_4 , FeSO_4 , MgSO_4 , MnSO_4 , Na_2SeO_3 ve ZnSO_4 çözeltileri ilave edilmiştir. Nanopartikül biyosentezi sırasında renk değişikliklerinin gözlemlenmesi nanopartikül oluşumunun bir göstergesi olduğundan (Ozdal and Gurkok, 2022b), önce tuz çözeltileri içeren besiyerlerinin renk değişimleri kontrol edilmiştir. Besi ortamında renk değişikliği Ag, Cu ve Se nanopartikülleri ile gözlemlenirken; Zn ve Mg nanopartiküllerinde altta beyaz kalıntılar birikmiştir (Şekil 32).



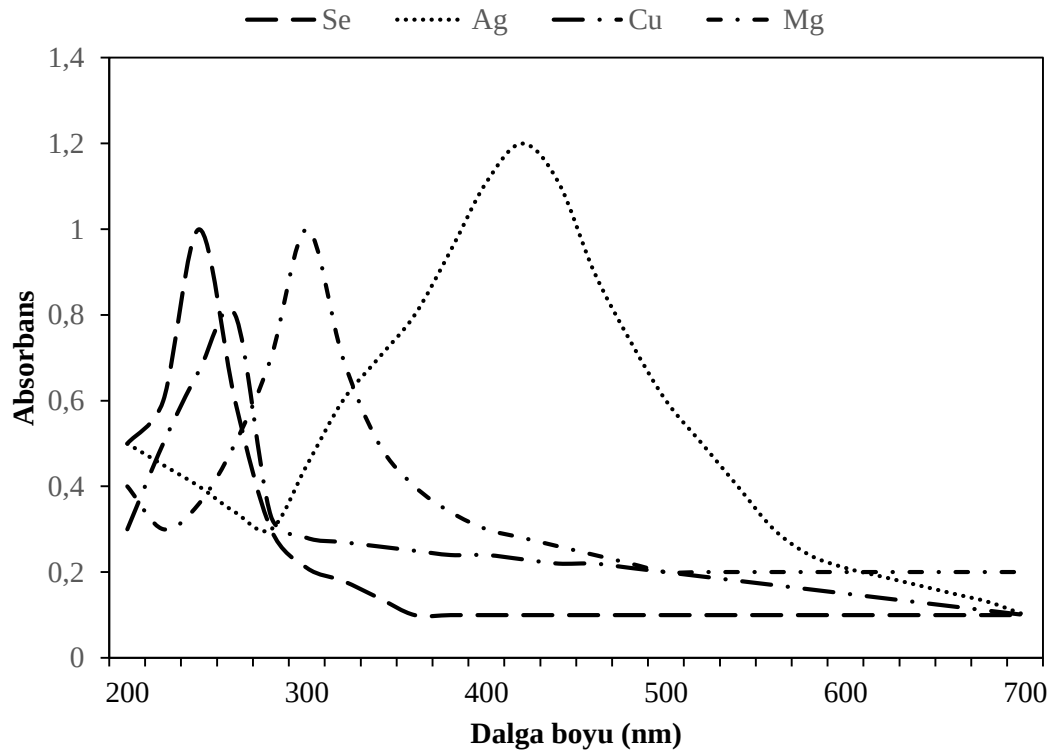
Şekil 32. Nişastalı NB ortamında gelişen *P. megaterium* SFA süpernatantında nanopartikül sentezi sonucu renk değişimleri

Nanopartiküllerin karakterizasyonu

UV-görünür spektroskopi ile nanopartiküllerin karakterizasyonu

P. megaterium SFA ile sentezlenen Ag, Se, Mg ve Cu nanopartiküllerinin UV-görünür absorpsiyon spektrumları Şekil 33'te gösterilmiştir. Ag, Se, Mg ve Cu nanopartiküllerinin maksimum absorpsiyonlarını sırasıyla 420, 240, 260 ve 300 nm'de gösterdiği belirlenmiştir.

UV-Vis spektroskopisi, incelenen CuO nanopartiküllerinin 260 nm'de 0,8, Mg nanopartikülleri 300 nm'de 1, Ag nanopartikülleri 420 nm'de 1,2 ve Se nanopartikülleri 240 nm'de 1 absorpsiyon değerleriyle iyi tanımlanmış bir plazmon bandlarına sahip olduğu gösterilmiştir (Şekil 33).



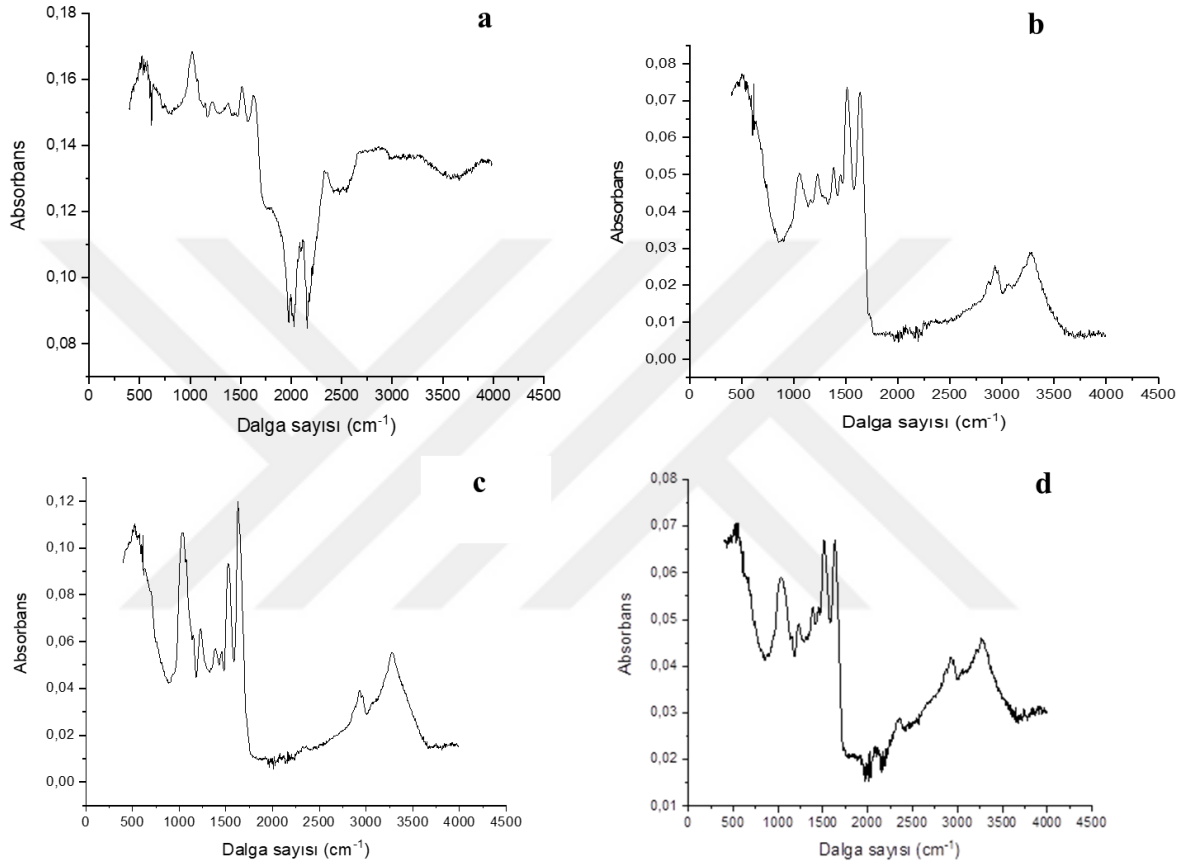
Şekil 33. *P. megaterium* SFA ile sentezlenen Ag, Cu, Mg ve Se nanopartiküllerinin UV-görünür absorpsiyon spektrumları

Fourier transform infrared (FT-IR)

Nanopartiküllerin yapısındaki biyolojik bileşenlerin varlığı hakkında daha fazla bilgi edinmek için FT-IR ölçümü yapılmıştır. FT-IR spektroskopisi ile analizi sonucunda elde edilen spektrumda 4500 ile 500 cm^{-1} dalga boyu arasındaki bölge (MIR) aralığında çalışılmıştır.

Şekil 34 incelendiğinde, farklı nanopartiküller için benzer spektrumlar elde edilmiştir. Elde edilen spektrum incelendiğinde 860-880, 1123-1190, 1577-1586, 2180 ve 3000 cm^{-1} dalga boylarındaki piklerin ortak ve belirgin olduğu görülmüştür. 1600 ve 1400 cm^{-1} 'deki bantlar –CO–NH– grubundan kaynaklanmaktadır (Kotresh et al., 2018). 1123-1190 cm^{-1} 'de elde edilen

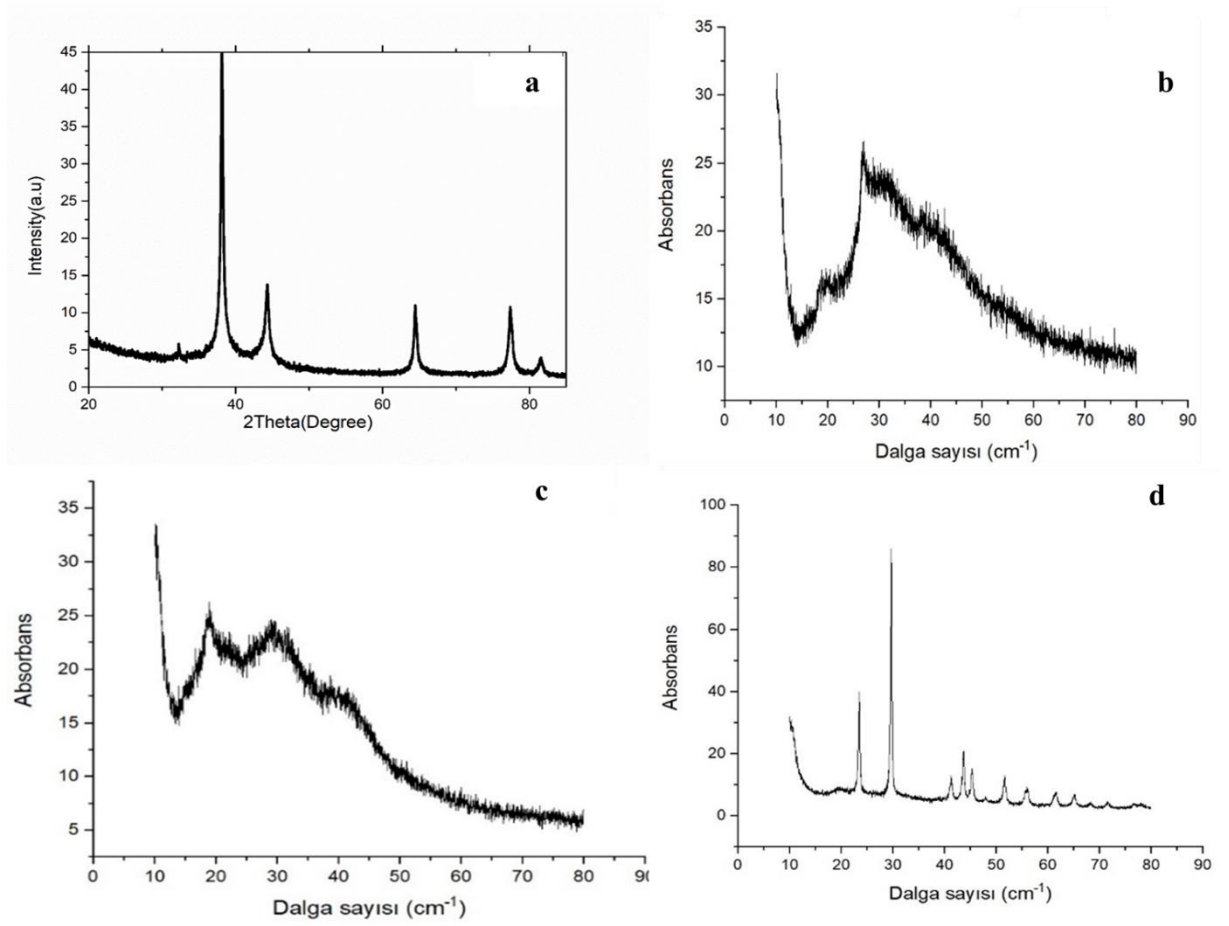
pikin yapısal (C-N) alifatik amid titreşimlerine karşılık geldiği şeklinde belirlenmiştir (Naghshbandi and Moghimi, 2020). Bu bulgular, proteinlerin nanopartiküllere serbest amin grupları veya sistein kalıntıları yoluyla veya misel hücre duvarında bulunan enzimlerdeki negatif yüklü karboksilat gruplarının elektrostatik çekimi yoluyla bağlanabildiğini, dolayısıyla nanopartiküllerin protein tarafından oluşturabileceğini desteklemektedir (Gole et al., 2001; Gajbhiye et al., 2009; Tran et al., 2013).



Şekil 34. *P. megaterium* SFA ile sentezlenen Ag (a), Cu (b), Mg (c) ve Se (d) nanopartiküllerinin FT-IR spektrumu

X-ışını difraktometresi (XRD)

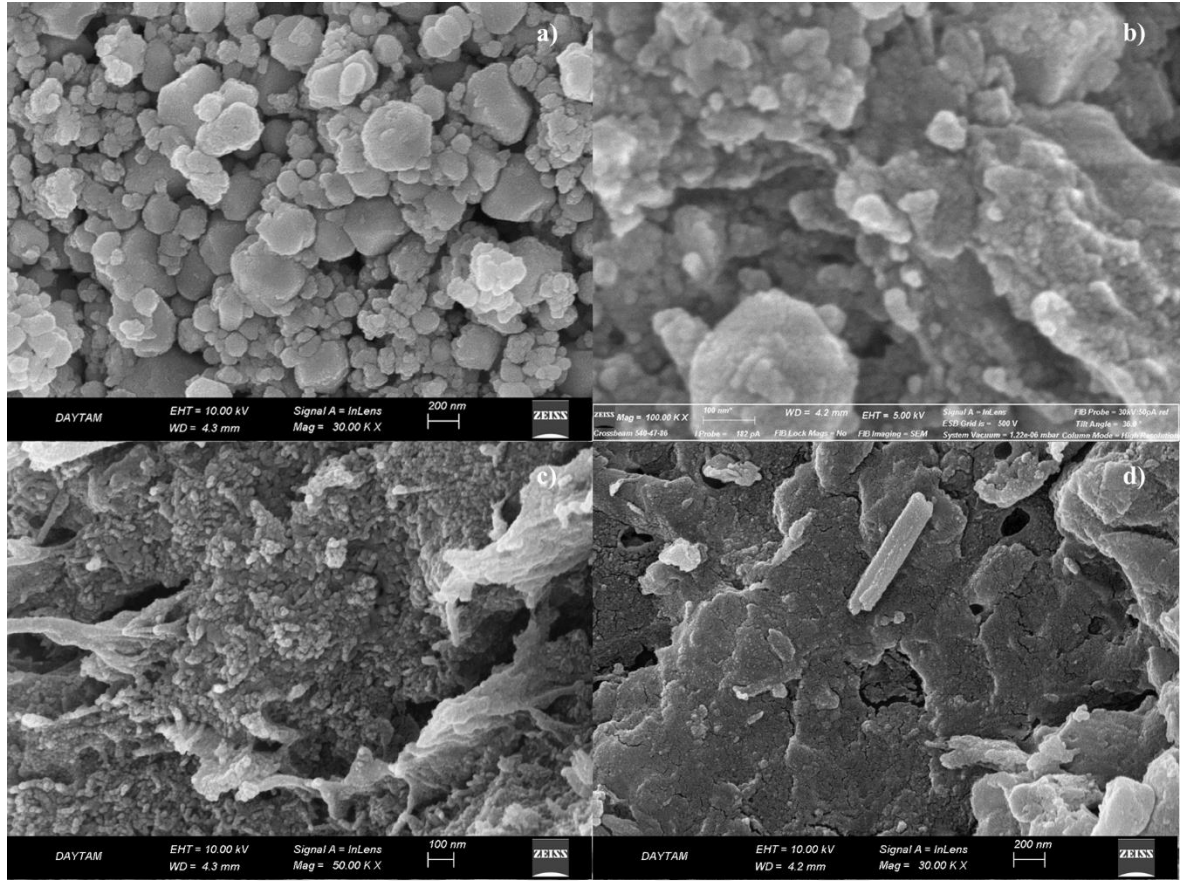
Sentezlenen nanopartiküllerin fazlarını ve kristal yapılarını araştırmak için XRD kullanılmıştır. Nanopartiküllerin yapısal özelliklerini analiz etmek için 10°-80° tarama açıları kullanılmıştır. Ag nanopartiküller için (2θ) 38.11°, 44.30°, 64.45°, 77.40° ve 81.56°'deki kırınım zirveleridir. Se nanoparçacıklarının XRD desenleri (2θ) 38.11, 44.27, 64.22 ve 77.47°, Cu nanopartikülleri için 19 ve 29°, Mg nanopartikülleri için 19, 30 ve 38° oldukları belirlenmiştir (Şekil 35). Elde edilen veriler daha önceki çalışmalarla paralellik göstermektedir (Ansari et al., 2018; Dong et al., 2018; Mickymaray et al., 2019; Arunthirumeni et al., 2022).



Şekil 35. Bakteri tarafından sentezlenen Ag (a), Cu (b), Mg (c) ve Se (d) nanopartiküllerin XRD analizleri

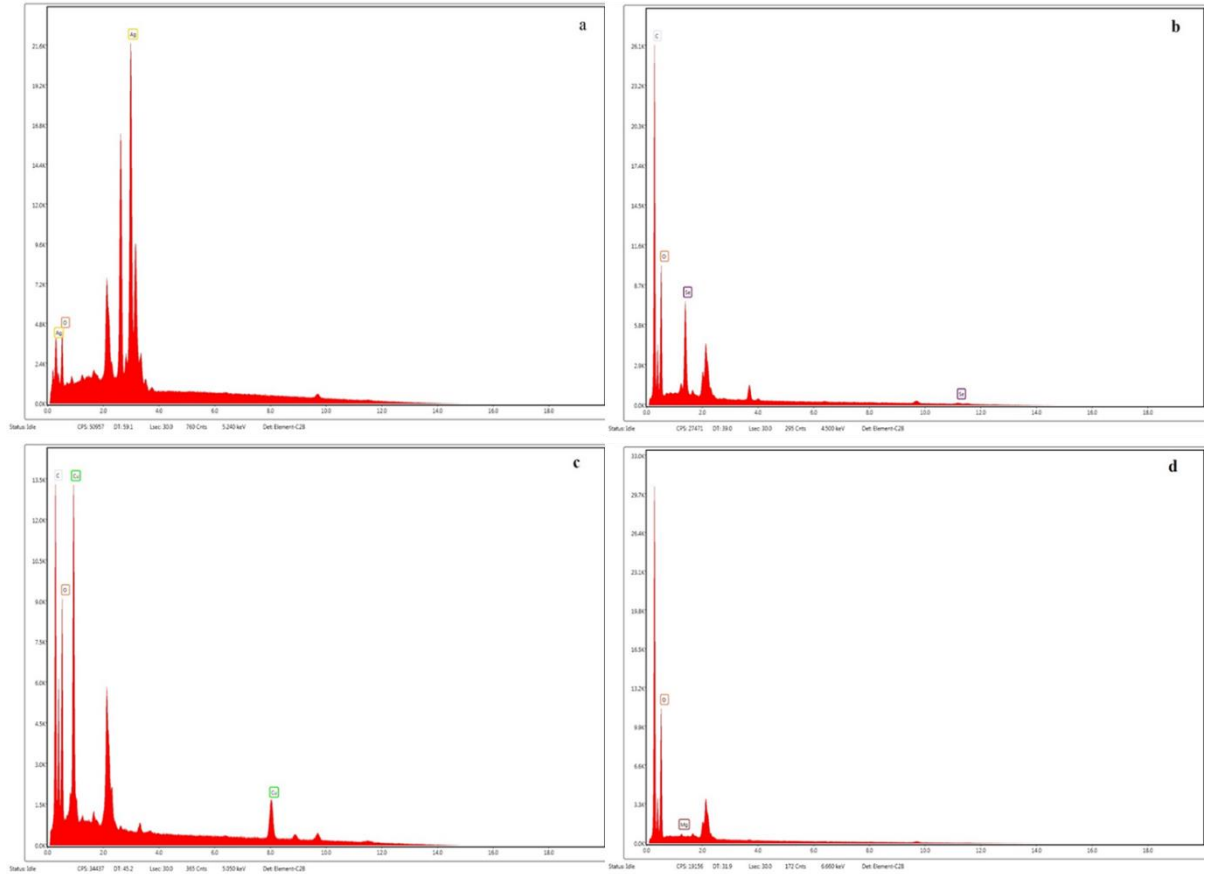
Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Taramalı elektron mikroskobunun (SEM) Ag, Cu, Mg ve Se nanopartikül örnek görüntüleri sırasıyla Şekil 36 a-d'de gösterilmiştir. Şekil 36a'da 70-100 nm çapındaki Ag nanopartiküllerinin mikroküre benzeri formunu göstermektedir. Şekil 36.b'de görüldüğü gibi Cu nanopartikülleri 15–40 nm mikroküre benzeri yapılardan oluşmuştur. Şekil 36.c'de Mg nanopartikülleri 10–40 nm mikroküre benzeri yapılar göstermektedir. Her iki mikrografta da görüldüğü gibi nanopartiküllerin yüzey etkisi nedeniyle yer yer topaklanmalar gözlenmiştir. Se nanopartikülleri küresel formlarına ek olarak ~20-30 nm kübik bir yapı göstermektedir (Şekil 36.d).



Şekil 36. Bakteri tarafından sentezlenen Ag (a), Cu (b), Mg (c) ve Se (d) nanopartiküllerinin SEM analizleri

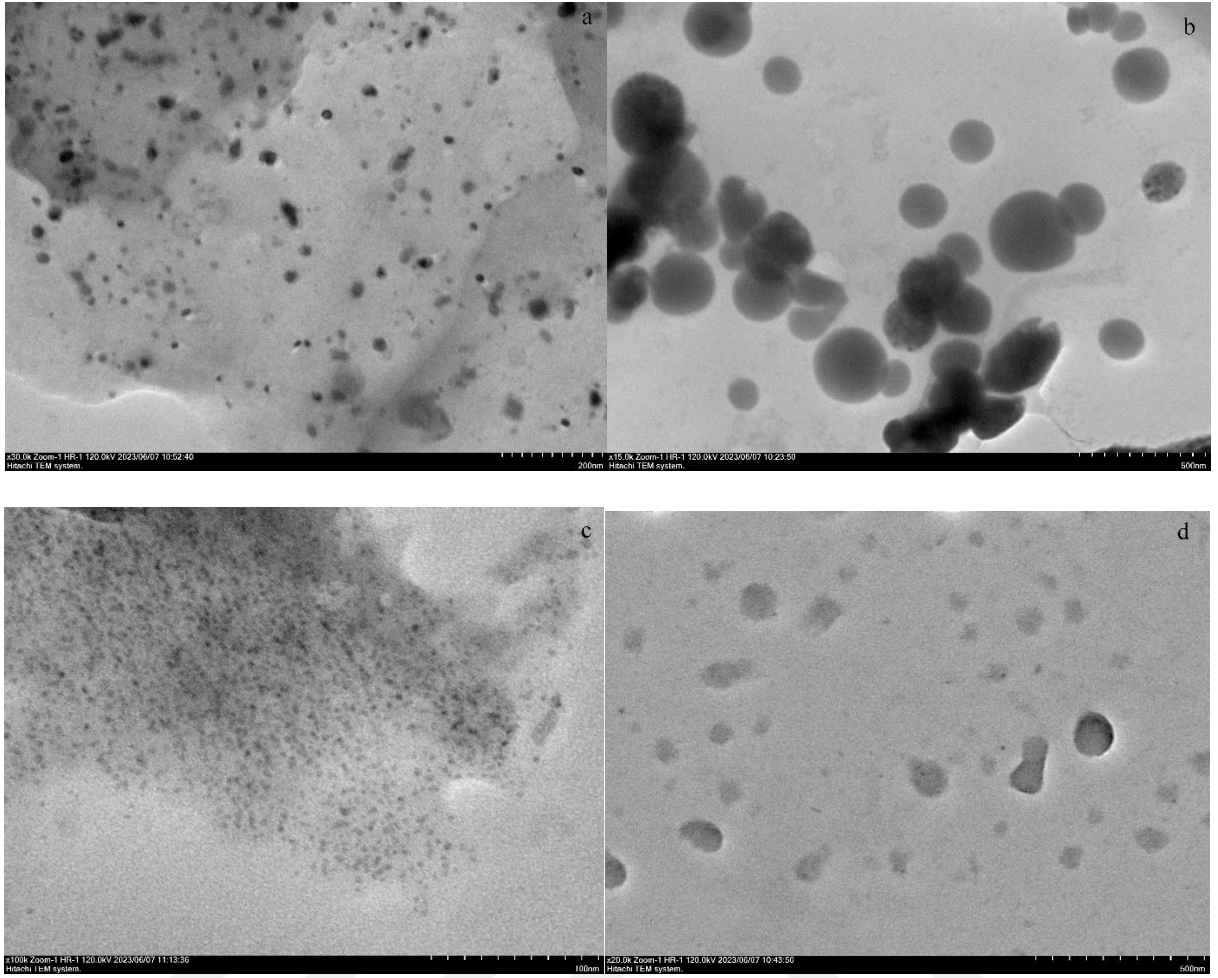
Şekil 37’de gösterilen tipik EDX spektrumu, sırasıyla Ag, Cu, Mg ve Se nanopartiküllerinde ortak elemanların tespit edildiğini göstermiştir. Biyosentezlenmiş malzemede ilgili nanopartiküllerin varlığı, sırasıyla şekildeki EDX spektrumundan gelen güçlü Ag, Se, Cu ve Mg sinyalleriyle doğrulanmıştır. Ayrıca az miktarda Ca, O ve P bileşenleri de bulunmaktadır. Gözlemlenen ekstra Ca, O ve P pikleri, bakterinin büyüme ortamında bulunan moleküllere atfedilebilir. EDX’in sonuçlarının, nanopartiküllerle ilgili önceki makalelere çarpıcı biçimde benzer olduğu görülmüştür (Delgado-Beleño et al., 2018; Salem et al., 2020; Soliman et al., 2023).



Şekil 37. Bakteri tarafından sentezlenen Ag (a), Cu (b), Mg (c) ve Se (d) nanopartiküllerinin EDX analizleri

Geçirimli elektron mikroskobu (TEM)

Biyosentezlenen Ag, Cu, Mg ve Se nanopartiküllerinin boyutunu ve şeklini belirlemek için TEM analizi yapılmıştır (Şekil 38). Bakteriler tarafından üretilen Ag nanopartiküllerinin küresel şekilli ve ortalama 40-50 nm boyutlara sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 38.a). Cu nanopartikülleri ortalama 20 nm boyutunda ve küresel şekilli olduğu belirlenmiştir (Şekil 38.b). Mg nanopartiküllerinin ortalama 60 nm boyuta sahip olduğu ve küresel şekilli olduğu görülmüştür (Şekil 38.c). Se nanopartiküllerinin ortalama 100 nm boyuta sahip olduğu ve küresel olduğu belirlenmiştir (Şekil 38.d). TEM ayrıca parçacıkların çoğunun küresel şekilli olduğunu ve az sayıda nanoparçacığın anizotropik morfolojiye sahip olduğunu göstermiştir.



Şekil 38. Bakteri tarafından sentezlenen Ag (a), Cu (b), Mg (c) ve Se (d) nanopartiküllerinin TEM analizleri

TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Amilazlar, nişasta moleküllerini hidrolize ederek dekstrin ve maltoz gibi ürünlere dönüştürebilen önemli endüstriyel enzimler arasında öne çıkar. Son yıllarda özellikle firincılık, gıda, tekstil ve deterjan endüstrilerindeki yaygın kullanımıyla birlikte enzimlere olan ilgi önemli ölçüde artmıştır. Küresel enzim pazarının yaklaşık %25-33'ünü oluşturan mikroorganizmalardan elde edilen α -amilazlar, endüstriyel uygulamalarda geniş bir rol oynamaktadır. Bugüne kadar birçok mikroorganizmadan amilaz üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu konusunda birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen, biyoteknolojik gelişmeler, bilimsel araştırmalar ve endüstriyel sektörlerde potansiyel yeni kullanım alanları yeni enzim kaynakları bulma çabalarını artırmıştır (Niyomukiza et al., 2022). Bu bağlamda, mikroorganizmalardan elde edilen amilazların özelliklerinin daha ayrıntılı bir şekilde incelenmesi ve yeni mikrobiyal türlerin keşfi, enzim teknolojisi alanında ilerlemeyi destekleyecek ve daha etkili endüstriyel uygulamaların geliştirilmesine olanak tanıyacaktır.

Çalışmamızda ilk olarak bozulmaya başlayan patateslerden iyi bir amilaz üreticisi bakterinin izolasyonu amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, patateslerden 40 tane bakteri izole edilerek saflaştırılmış ve NNA besi ortamında gelişimleri takip edilerek etraflarında oluşan şeffaf zonların genişliğine göre değerlendirilmiştir. En geniş zon çapına sahip olan bakteri izolatları kantitatif aktivite tayinine tabi tutulmuştur.

Hem zon çapı genişliği hem de kantitatif amilaz aktivite tayinine göre patatesten saflaştırılan izolatlar arasından en yüksek aktivite gösteren izolat 16S rRNA sekans analizi ve klasik tanılama yöntemi ile *P. megaterium* SFA olarak tanılanmıştır. İlk kez De Bary (1884) tarafından rapor edilen ve 2020 yılına kadar *B. megaterium* olarak adlandırılan tür, Gupta et al. (2020), *Bacillus* genomları üzerinde yaptıkları karşılaştırmalı filogenetik analizleri neticesinde güncellenerek *P. megaterium* olarak isimlendirilmiştir.

Bacillus oldukça iyi bilinen bir bakteri cinsidir ve birçoğu çubuk şeklinde olan ve genellikle toprakta bulunan çeşitli türleri içerir. *Bacillus* türleri büyük bir kısmının güvenli olması, çeşitli ortam koşullarında hayatta kalmaları ve yüksek üretim kapasitesine sahip olması nedeniyle endüstriyel enzim üretiminde en çok tercih edilen bakterilerdir (Ravindar and Elangovan, 2013). Amilaz üreticisi mikrobiyal kaynakların da başında gelmektedirler (Rehman and Saeed, 2015). Endüstriyel alanda yaygın olarak kullanılan amilaz üreticileri arasında *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* ve *B. stearothermophilus* yer almaktadır (Souza ve Magalhães, 2010).

P. megaterium da biyoteknoloji için çok sayıda patenti ve endüstrideki uygulamaları ile güçlü bir hücre fabrikası olarak nitelendirilmektedir (Biedendieck et al., 2021). *B. megaterium* 'un endüstriyel ve biyoteknolojik önemi, ticari açıdan önemli enzimleri ve B vitamini üretebilme yeteneğinden kaynaklanmaktadır. Genellikle bir toprak organizması olarak bilinen *B. megaterium*, sadece toprakta değil, aynı zamanda pirinç tarlalarından kurutulmuş gıda ürünlerine, deniz suyundan tortulara ve balıklara, normal bitki örtüsüne, hatta arı balına kadar geniş bir yelpazede farklı ortamlarda bulunabilir. Bu özellik, mikroorganizmanın çeşitli ekosistemlerde başarıyla varlığını sürdürebilme yeteneğini vurgular (Vary, 1994). Ayrıca, patatesten de izole edildiği de bildirilmiştir (Liu et al., 2023).

Kantitatif amilaz aktivite analizleri neticesinde *P. megaterium* SFA'da 0,76 U/mL enzim aktivitesi tespit edilmiştir. Yassin et al. (2021), tarafından yapılan bir çalışmada *P. megaterium* SFA ile elde edilen sonuçlara oldukça benzer sonuçlar elde edilmiştir. *Bacillus* cinsine ait olduğu bildirilen M2, M8 ve M13 izolatlarının amilaz aktivite değerleri sırasıyla 0.73 U/mL, 0.74 U/mL ve 0.67 U/mL olarak tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada ise yine *Bacillus* cinsine ait türlerle *P. megaterium* SFA ile elde ettiğimiz aktivitelerden çok daha düşük aktiviteler rapor edilmiştir. Söz konusu çalışmada, *B. megaterium* ATCC 14581, *B. licheniformis* ATCC 14580 ve *B. amyloliquefaciens* ATCC 23350 suşları kullanılmış ve amilaz aktivite değerleri sırasıyla 0.028 U/mL, 0.132 U/mL ve 0.465 U/mL bulunmuştur (Rodrigo et al., 2022).

Çalışmamızın daha sonraki aşamasında ise *P. megaterium* SFA ile amilaz üretiminin hem verimini artırmak hem de daha ekonomik bir üretim sağlamak amacıyla fermantasyon koşullarının optimizasyonuna gidilmiştir. İlk olarak klasik yöntemlerle inkübasyon süresi, başlangıç pH'sı, inkübasyon sıcaklığı, farklı azot ve karbon kaynaklarının kullanımı, bunların konsantrasyonu gibi çeşitli parametrelerde optimizasyon gerçekleştirilmiştir.

P. megaterium SFA'nın optimum inkübasyon süresi 72 saat ve optimum inokulum miktarı 1 mL olarak belirlenmiştir. Bu bulgular, literatürde daha önce yapılmış çalışmalarla uyumluluk göstermektedir. Saxena et al. (2007) *Bacillus* sp. PN5 suşundan maksimum amilaz üretiminin 60. saatte gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Batık ve katı hal fermentasyonu ile α -amilaz üretiminin yapıldığı bir çalışmada Mohanasrinivasan et al. (2014) *B. pumilus* VITMDS2 suşunu kullanmışlar ve optimum inkübasyon süresinin 72. saatte olduğunu belirtmişlerdir.

P. megaterium SFA amilaz üretimi için optimum sıcaklık 35 °C olarak bulunmuştur. Fincan et al. (2021) da *B. licheniformis* SO-B3 suşu ile yaptıkları çalışmada amilaz enziminin optimum üretim sıcaklığını 35 °C olarak bulmuşlardır. *B. subtilis* suşunun kullanıldığı bir

çalışmada ise Al-Johani et al. (2017) maksimum amilaz üretiminin 45 °C’de olduğunu bildirmişlerdir.

P. megaterium SFA amilaz üretimi pH 6-8 aralığında yüksek olmakla birlikte, optimum pH değeri 7,0 olarak belirlenmiştir. Literatüre bakıldığında benzer pek çok sonuçla karşılaşılmıştır. Amilaz üretiminde kullanılan *Streptomyces limosus* (Fairbairn et al., 1986), *B. licheniformis* NH1 (Hmidet et al., 2008) ve *Bacillus* sp. PN5 (Saxena et al., 2007) için de optimum pH 7 olarak rapor edilmiştir.

P. megaterium SFA amilaz üretimi için kullanılan karbon kaynaklarından en yüksek aktivite (0,84 U/mL) çözünebilir nişasta varlığında gözlenirken, azot kaynaklarından en yüksek aktivite 0,82 U/mL ile maya özütü varlığında gözlenmiştir. Hiteshi et al. (2016) *B. licheniformis* ile yaptıkları çalışmada en iyi karbon kaynağının nişastada, en iyi azot kaynağının ise peptonda olduğunu tespit etmişlerdir. *Bacillus* sp. BCC 01-50 suşu ile yapılan bir çalışmada Simair et al. (2017) en yüksek α -amilaz üretiminin karbon kaynaklarından şeker kamışında ve azot kaynaklarından ise sığır eti özütünde olduğunu bildirmişlerdir. *B. megaterium*’un kullanıldığı bir çalışmada Aqeel ve Umar (2010) maksimum amilaz üretiminin karbon kaynaklarından dekstroz, azot kaynaklarından ise pepton varlığında olduğunu belirtmişlerdir. Pinjari ve Kotari (2018) *Bacillus* sp. ile yaptıkları çalışmada amilaz üretim koşullarını araştırmışlar ve en iyi karbon kaynağının fruktoz, en iyi azot kaynağının ise amonyum karbonat olduğunu bildirmişlerdir.

Bünyesinde nişasta bulunan farklı tarımsal, endüstriyel ve gıda atıklarının ya da farklı endüstriyel yan ürünlerin amilaz üretiminde kullanılması hem çevre kirliliğini azaltma hem de düşük maliyetle katma değeri yüksek ürün elde etme açısından büyük önem taşımaktadır. *P. megaterium* SFA ile amilaz üretiminde de hazır karbon kaynaklarına ek olarak patates kabuğu atıkları kullanılmıştır.

P. megaterium SFA bakterisi ile amilaz üretiminde optimum patates kabuğu miktarı belirlenmeye çalışılmış; ancak patates kabuğu miktarı arttıkça enzim üretiminin arttığı gözlemlenmiştir. En yüksek aktivite (0,69 U/mL) çıkılabilen en yüksek konsantrasyon olan %10 patates kabuğu varlığında görülmüştür. Viskozitenin artmasından dolayı daha yüksek değerlerde çalışılmamıştır.

Endüstriyel enzimlerle çalışırken, genellikle enzimin saf halde olması zorunlu değildir; ancak kullanım alanlarına uygunluğu ve stabilitesi gibi önemli özelliklerin belirlenmesi için saflaştırılması ve karakterizasyonunun yapılması elzemdir. Ayrıca, karakterizasyon adımı, enzimin fiziksel, kimyasal ve biyokimyasal özelliklerini belirleyerek optimum çalışma koşullarını ve endüstriyel uygulama potansiyelini anlamamıza yardımcı olur. Bu süreç,

endüstriyel enzimlerin etkinliğini ve performansını artırmak, uygunluk sağlamak ve endüstriyel süreçlere entegrasyonunu kolaylaştırmak için kritik bir öneme sahiptir. Saflaştırma ve karakterizasyon, enzim tabanlı endüstriyel uygulamalarda güvenilir ve verimli sonuçlar elde etmek için temel adımları oluşturur. Bu doğrultuda, ilk olarak *P. megaterium* SFA amilaz enzimi saflaştırılmış ve daha sonra karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. *P. megaterium* SFA'nın amilaz üretim ortamında 3 günlük inkübasyonu sonunda, kültür sıvısı 10000 rpm'de santrifüj edilmiş, elde edilen süpernatant enzim saflaştırma işlemi için kullanılmıştır. Enzimin diğer protein ve bileşenlerden ayrılmasını sağlamak için önce amonyum sülfat çöktürmesi yapılmıştır ve %20'lik amonyum sülfat konsantrasyonunda çöktüğü belirlenmiştir. Amonyum sülfat ile çöktürülen ve tampon ile çözülen örnekler ultrafiltrasyona tabi tutularak hem tuzlardan ve diğer küçük iyonlardan hem de düşük moleküler ağırlıklı proteinlerden arındırılmıştır. Bir sonraki saflaştırma adımında, saflaştırma işlemi tamamlamak için bir HiTrap Q HP kolonu kullanılarak iyon değişim kromatografisi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemler sonucunda, 20,4 kat saflaştırma gerçekleştirilmiş ve spesifik aktivitesi 10,2 U/mg olan saf bir amilaz elde edilmiştir.

Saflaştırılan amilaz enziminin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile 57 kDa olarak hesaplanmıştır. Literatüre bakıldığında bulunan moleküler ağırlığın *Bacillus* türlerine ait bazı amilaz enzimleri ile benzerlik gösterdiği görülmüştür. Örneğin, *B. licheniformis* AI20 α -amilaz enziminin 59,34 kat saflaştırıldığı bir çalışmada moleküler ağırlığının 55 kDa olduğu bildirilmiştir (Abdel-Fattah et al., 2013). *B. licheniformis* 'ten saflaştırılan amilaz enziminin molekül ağırlığı ise bir başka çalışmada 58 kDa olarak bulunmuştur (Mendu et al., 2005). Yine *Bacillus* sp. suşundan izole edilen enzimin moleküler ağırlığının 53.94 kDa olduğu tespit edilmiştir (Aygan, 2015). Ancak mikrobiyal amilaz enzimlerinin çok daha düşük ya da çok daha yüksek moleküler ağırlıklara sahip olabildikleri de görülmüştür. *Nesterenkonia* sp.'den saflaştırılan amilaz enziminin molekül ağırlığı SDS-PAGE tekniği kullanılarak tek bir bantta görülmüş ve 110 kDa olarak kaydedilmiştir. *Geobacillus* sp. TF14 suşundan 17,11 kat saflaştırılmış amilaz enziminin protein molekül ağırlığı 54 kDa olarak bulunmuştur (Keskin and Ertunga, 2017).

Enzim karakterizasyonunda en önemli özelliklerden biri de enzimin optimum çalıştığı sıcaklığın belirlenmesidir. *P. megaterium* SFA amilaz enziminin optimum sıcaklık değerinin 40 °C olduğu belirlenmiştir. Aynı optimum sıcaklık değeri *Pseudomonas stutzeri* 7193 (Zhang and Zeng, 2011) ve *Bacillus* sp. US149 (maUS149) (Mabrouk et al, 2008) amilaz enzimleri için de rapor edilmiştir. Bakteriyel α -amilazlar için optimum sıcaklık, üreten organizmaya bağlı olarak büyük değişkenlik gösterebilmektedir. Örneğin *B. subtilis* KIBGE HAS izolatu için optimum sıcaklık 50 °C (Bano et al., 2011) ve *B. clausii* amilazı için 55 °C (Duedahl-Olesen et

al., 2000) olarak bildirilmiştir. *Streptomyces* sp. amilazı için optimum sıcaklık 50-60 °C (Kaneko et al., 2005) ve *Vibrio* sp. için 55-60 °C olarak belirlenmiştir (Najafi and Kembhavi, 2005).

P. megaterium SFA amilaz enziminin optimal pH değeri 9,0 olarak tespit edilmiştir. Bu da enzimin alkali bir amilaz olduğunu göstermiştir. Çeşitli *Bacillus* türlerinden de alkali amilazlar rapor edilmiştir. Örneğin, *B. halodurans* A-59 amilazı için pH 10 (Horikoshi, 1999) ve *B. subtilis* CB-18 için pH 8,0 (Nwokoro et al., 2015) optimum olarak rapor edilmiştir. *B. licheniformis* NH1'de pH 5,0-10,0 (Hmidet et al., 2008) ve *B. subtilis* KCC103'te pH 5,0-7,0 (Nagarajan et al., 2006) aralıkları optimum olarak rapor edilmiştir. Aynı zamanda mikrobiyal amilazlar arasında asidik tabiatla olan enzimlere de sık rastlanmaktadır. Örneğin, *Streptomyces* sp. izolatu için optimum pH 6,0 olarak kaydedilirken (Kaneko et al. (2005), *Vibrio* sp. (Najafi and Kembhavi, 2005) ve *Bacillus* sp. US149 (Mabrouk et al., 2008) amilazlarının optimum pH'sının 6,5 olduğu tespit edilmiştir. *Bacillus* sp. DR 90 asidofilik bakterisinde ise pH 4,0 optimum olarak belirlenmiştir (Asoodeh et al., 2014). Literatür sonuçlarına göre amilaz üreten organizmaların optimum pH'larının geniş aralıklara sahip olduğu görülmüştür. pH değeri 8,0 ve üzerinde olan alkali amilazlar, özellikle tekstil endüstrisinde, nişastanın sakkarifikasyonunda ve deterjan endüstrisinde potansiyel uygulamalara sahiptir (Saxena et al. 2007).

Enzimlerin endüstriyel uygulamalarda kullanılabilirliğini belirleyen en önemli özelliklerinin başında farklı sıcaklık ve pH koşullarında stabilitelerini korumaları ve aktivite gösterebilmeleri gelmektedir. *P. megaterium* SFA amilaz enziminin sıcaklık stabilitesi araştırıldığında 120 dakika sonunda 40 °C'de %84 oranında aktivitesini korurken 20 °C'de %45, 30 °C'de %75, 50 °C'de %60, 60 °C'de %29 ve 70 °C'de ise %22 oranında aktivitenin korunduğu gözlenmiştir. Ancak daha kısa inkübasyon sürelerinde stabilitesini çok daha yüksek oranlarda koruduğu görülmüştür. Dolayısıyla 30 dakikalık inkübasyon sonunda enzimin kararlılığını 20 °C'de %77 oranında, 30 °C'de %92 oranında, 40 °C'de %101 oranında, 50 °C'de %90 oranında, 60 °C'de %59 oranında ve 70 °C'de ise %47 oranında koruduğu belirlenmiştir. Sıcaklık artışı ile enzim stabilitesinde azalmanın olduğu belirlenmiştir. Asad et al. (2011), *Bacillus* sp. WA21'den kısmi saflaştırdıkları amilaz enzimini, 35-85°C aralığındaki sıcaklıklarda 10 dakika süreyle inkübe ettiklerinde aktivitenin yaklaşık %60'tan fazlasının korunduğunu, 65 °C'de ise orijinal aktivitenin %100'ünü koruduğunu bildirmişlerdir. Najafi ve Kembhavi (2005), *Vibrio* sp. suşundan saflaştırdıkları amilaz enziminin 30 dakikalık inkübasyon sonrasında 65 °C'de aktivitenin %85'ini koruduğunu rapor etmişlerdir.

P. megaterium SFA amilaz enziminin pH stabilitesine bakıldığında, pH 4'te %58, pH 5'te %63, pH 6'da %77, pH 7'de %95, pH 8'de %111, pH 9'da %126, pH 10'da %119, pH

11’de %110 ve pH 12’de ise %113 oranında kararlılığını koruduğu görülmüştür. Özellikle yüksek pH değerlerinde inkübasyon sonrası kontrolden daha yüksek aktiviteler gözlemlenmiştir. Literatürde de benzer sonuçlara sıklıkla rastlanmıştır ve α -amilazların genellikle pH 4,0-11,0 arasında stabil kaldığı gösterilmiştir. *B. strain* HUTBS71 α -amilazı ile yapılan bir çalışmada pH 5,2-10,0 arasında enzim aktivitesinin %100 koruduğu belirtilmiştir (Al-Quadani et al., 2009). Benzer bir şekilde Aygan et al. (2014) *B. subtilis* A10 amilazının 7,0-10,0 arasında aktivitesinin %100’ünü koruduğunu belirtirlerken Nithya et al. (2016) ise *B. licheniformis* KSU-6 amilazının pH 8,0-10,0 aralığında aktivitelerinin %100’ünün koruduğunu rapor etmişlerdir.

P. megaterium SFA amilaz enzimi ile nişasta hidrolizinin kinetik analizi sonucu V_{max} değeri 13,3 U/mg protein ve K_m değeri 0,126 mM olarak bulunmuştur. Ezeji ve Bahl (2006) *Geobacillus thermodenitrificans* HRO10 amilaz enzimi için K_m değerini 3,05 mg/mL ve V_{max} değerini ise 7,35 U/mL olarak kaydetmişlerdir. K_m ve V_{max} değerleri *B. licheniformis* AI20 amilazı için sırasıyla 0,709 mg/mL ve 454 mU/mg (Abdel-Fattah et al., 2013) olarak rapor edilirken, bir başka çalışmada Afrisham et al. (2016) *B. licheniformis* amilazı için 1,203 mg/ml ve 0,01 mg/ml/dk olarak rapor etmişlerdir. Kalia et al. *Trichoderma reesei* amilazı için K_m ve V_{max} değerlerini sırasıyla 2,55 mg/mL ve 53,47 U/mg olarak bulmuşlardır. Düşük K_m değeri, enzimin substratına olan yüksek affinitesinin bir göstergesi olduğundan, endüstriyel işlemlerin hızlı ve kolay bir şekilde gerçekleştirilmesine olanak tanır (Uçar, 2011). Bu nedenle, elde ettiğimiz amilaz enziminin endüstriyel kullanım potansiyelinin yüksek olduğu kanısına varılabilir.

Enzim karakterizasyon çalışmalarında *P. megaterium* SFA amilaz aktivitesi üzerine farklı metal iyonlarının (1, 3 ve 5 mM) etkisi araştırılmış ve herhangi bir metal iyonunun enzimi aktive edici bir etkiye sahip olmadığı, hatta aktivitenin tüm metal iyonları varlığında farklı oranlarda [Ag^+ (%95), Mg^{2+} (%91), Ca^{2+} (%85), Zn^{2+} (%79), Ba^{2+} (%71), Mn^{2+} (%60), Hg^{2+} (%57), Cu^{2+} (%57), Ni^{2+} (%56), Cd^{2+} (%55), Co^{2+} (%49) ve Fe^{3+} (%42)] azaldığı görülmüştür. Çalışmalarında, Wang et al. (2016) *Bacillus* WangLB suşu üzerinde 2 mM Co^{2+} ’ın enzim aktivitesi üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını ancak 5 mM Co^{2+} konsantrasyonunda aktivitenin arttığını tespit etmiştir. Ek olarak, K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} ve Zn^{2+} ’nin aktiviteyi farklı derecelerde inhibe ettiklerini bildirmişlerdir. *B. megaterium* VUMB109 amilazıyla yapılan bir çalışmada kullanılan iyonlardan hiçbir metal iyonunun enzim aktivitesi üzerinde belirgin bir uyarıcı etkiye sahip olmadığı belirtilirken Mg^{2+} , Sn^{2+} ve K^+ iyonlarının enzim aktivitesini çok az miktarda artırdığı Hg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} ve Zn^{2+} gibi ağır metal iyonlarının ise 10 mM konsantrasyonda enzim aktivitesini tamamen engellediği bildirilmiştir (Jana et al.,

2013). *B. amyloliquefaciens* α -amilaz aktivitesi 1 mM konsantrasyonunda Ca^{2+} , Fe^{3+} ve Cu^{2+} iyonları etkisiyle artarken 1 mM ve 5 mM konsantrasyonlarında ise Ni^{2+} ve Mn^{2+} iyonları tarafından inhibe edildiği belirtilmiştir (Fouda, 2021). Ek olarak termofilik suş olan *Bacillus* SMIA-2 amilazı ile iyon etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada enzim Co^{2+} , Cu^{2+} ve Ba^{2+} tarafından güçlü bir şekilde inhibe edilmiş; ancak Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , Sr^{2+} ve Mn^{2+} 'dan daha az etkilenmiştir (Cordeiro et al., 2002).

P. megaterium SFA'nın amilaz enzimi üzerine reaktiflerin (%10) etkisi araştırıldığında SDS (%188) ve Tween-20 (%102) varlığında artarken, Tween-80 (%94), Triton X-100 (%77), EDTA (%77) ve CTAB (%62) varlığında ise azaldığı belirlenmiştir. H_2O_2 etkisi ile de enzimin inhibe olduğu görülmüştür. Arıkan (2008) termofilik *Bacillus* sp. A3-15 α -amilazının 5 mM EDTA varlığında inhibe edildiğini belirtmiştir. Singh et al. (2014), *Streptomyces* sp. MSC702 amilazının %1 Triton X-100, %1 Tween 80 ve 5 mM EDTA içeren ortamlarda stabilitesini kaybettiğini gözlemlemişlerdir. EDTA'nın *Streptomyces* MI-1'in α -amilazının da aktivitesini inhibe ettiği bildirilmiştir (Ali et al., 2023). Menon et al. (2014) *B. subtilis* JS-16 suşu ile yaptıkları çalışmada elde ettikleri amilazın SDS varlığında aktivitesinin iki kat arttığını gözlemleyerek enzimin benzersiz bir özelliğe sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bu özellik çalışmamızla benzerlik göstermektedir.

P. megaterium SFA'nın amilaz enzimi üzerine organik çözücülerin (%15) etkisi belirlenmiştir. Kullanılan organik çözücülerden enzim aktivitesini artıran organik çözücü tespit edilmezken, kalan aktivitelerin sırasıyla DMSO ile %95, gliserol ile %85, aseton ile %82, izopropanol ile %81 ve etanol ile %75 olduğu görülmüştür. Abdel-Fattah et al. (2013) *B. licheniformis* AI20 suşundan üretilen α -amilazın, %10 konsantrasyonda aseton, etanol, metanol, izopropanol ve gliserole karşı yüksek bir kararlılık gösterdiğini belirtmiştir. Ancak %20 konsantrasyonda etanol, metanol, izopropanolun enzim aktivitesinde düşüşe neden olduğu gözlenirken, aseton ve gliserolün enzim aktivitesine etki etmediğini belirtilmiştir.

Rutin karakterizasyon çalışmalarından sonra *P. megaterium* SFA suşundan elde edilen amilaz enziminin biyoteknolojik alanda kullanılabilirliği üzerine araştırmalar yapılmıştır. İlk önce ticari sıvı el yıkama sabunu, bulaşık ve çamaşır deterjanlarının varlığında amilaz enziminin aktivitesi ve stabilitesi araştırılmıştır.

Çamaşır deterjanının varlığında amilaz aktivitesinin 0,97 U/mL olacak şekilde arttığı tespit edilmiştir. Deterjanların varlığında amilaz enziminin stabilitesi incelendiğinde ise bağlı aktivitenin çamaşır deterjanı varlığında %116, bulaşık deterjanı varlığında %80 ve sıvı el sabunu varlığında %49 olduğu belirlenmiştir.

Hidrolitik enzimlerden olan amilazlar, bulaşık ve çamaşır deterjanlarında önemli rol oynayan ana bileşenlerdir. Düşük temizleme sıcaklıklarında bile etkili temizlik sağlayarak enerji tasarrufuna yardımcı olur. Amilazların deterjan bileşeninde kullanılması sıcak suya olan ihtiyacı azaltır ve aynı zamanda temizlik maddelerinin etkinliğini artırır. Dolayısıyla bulaşık ve çamaşır makinelerinde daha az enerji tüketimi ve daha çevre dostu bir temizleme işlemi anlamına gelir (Afrisham et al., 2016).

Çamaşır deterjanı varlığında gösterdiği artan aktivitesi, *P. megaterium* SFA amilaz enziminin çamaşır deterjanı sektörüne daha uygun olduğunu göstermektedir. Bu durumun yanı sıra, çamaşır deterjanlarının tipik olarak pH seviyesinin 9,0 ve üzerinde olduğu bilinmektedir (Haddar et al., 2009) ve deterjana katılacak olan enzimlerin de pH 8-11 arasında stabil kalması beklenmektedir (Baltaş, 2012). *P. megaterium* SFA amilaz enziminin optimum pH değerinin 9 olması ve daha yüksek pH seviyelerinde de aktivite ve stabilitesini koruması, bu enzimin çamaşır deterjanı katkı maddesi olarak kullanılabilirliğini vurgulamaktadır. Sıvı el sabununun asidik özelliğinden dolayı ise enzim aktivitesi azalmıştır (Kuşçulu and Cücer, 2009).

Ayrıca, deterjan sektöründe kullanılabilirliğini göstermek amacıyla, *P. megaterium* SFA suşunun amilaz enzimi ile mısır ve çikolata lekelerini uzaklaştırma performansını belirlemek için farklı yıkama solüsyonları ile testler yapılmıştır. Mısır lekesi için; tampon + distile su, distile su + sıvı el sabunu ve distile su + sıvı bulaşık deterjanının mısır ve çikolata lekelerini çıkarmada etkili olmadığı belirlenmiştir. Enzim + tampon + sıvı el sabunu, enzim + tampon+ bulaşık deterjanı ve distile su + çamaşır deterjanından oluşan yıkama formülasyonlarında lekelerin giderildiği tespit edilmiş; fakat lekelerin tamamen uzaklaştırılmadığı belirlenmiştir. Tampon + enzim ve tampon + enzim + çamaşır deterjanı solüsyonlarının test edildiği uygulamada mısır lekelerinin tamamen giderildiği tespit edilmiştir. Çikolata lekeli kumaşlarda da enzim + tampon + çamaşır deterjanının bulunduğu solüsyonlarda lekeler tamamen giderilmiştir. Bunun yanı sıra diğer yıkama solüsyonlarında da leke çıkarma özelliğinin olduğu fakat lekelerin tamamen giderilmediği belirlenmiştir. Dolayısıyla *P. megaterium* SFA amilazının deterjan sektöründe deterjan katkı maddesi olarak kullanılabileceği düşünülebilir.

P. megaterium SFA'dan elde edilen amilaz, yüksek pH değerlerinde ve sıcaklıklarda bile yüksek aktivite ve stabilitenin yanı sıra metal iyonlarına, yüzey aktif maddelere, organik çözücülere karşı belirli ölçülerde direnç göstermiştir. Çeşitli ticari temizlik maddelerinin varlığında yüksek stabilitesi ve artan enzimatik aktivitesi nedeniyle, nişastalı kirlerin çıkarılmasına yönelik endüstriyel temizlik maddelerinin formülasyonunda kullanılabilir. Bu

özellikler, özellikle deterjan endüstrileri olmak üzere potansiyel endüstriyel kullanımlar için umut vericidir.

Son olarak çalışmamızda amilaz enziminin nanopartikül sentezinde kullanım potansiyeli araştırılmıştır. 72 saatlik inkübasyon sonunda elde edilen süpernatant çeşitli tuzlar varlığında nanopartikül sentezi için kullanılmıştır. Ag, Se, Mg ve Cu nanopartiküllerinin sentezlendiği, ortamdaki renk değişimleriyle gözlemlenebilmiştir. Sentezlenen nanopartiküllerin ileri karakterizasyonları ise UV-görünür spektroskopisi, FT-IR, XRD, SEM ve TEM analizleriyle gerçekleştirilmiştir.

Biyolojik yöntemlerle sentezlenen nanopartiküllerin, kimyasal sentezle karşılaştırıldığında çevre dostu olabileceğini ve daha az toksik olmasından dolayı son yıllarda araştırmacıların büyük ilgisini çekmiştir. Bakteriler de dahil olmak üzere mikroorganizmalar, ekimden sonraki inkübasyon süresi boyunca hücre dışı veya hücre içi olarak nanopartikülleri sentezleyebilir. Bakteriler, metal iyonlarını metal nanopartiküllere indirgeyerek toksisitesini azaltarak biyolojik sentezlenen nanopartiküllerin işlevsel olarak daha önemli hale getirilmesine yardımcı olur ve stabilite sağlar (Xu et al. 2021; Ozdal and Gurkok, 2022).

Bakteriler arasında özellikle *Bacillus* cinsine ait birçok tür kullanılarak farklı metal nanopartiküllerinin sentezi yapılmıştır. Ag nanopartikülünün sentezinde *B. licheniformis* TT01 (Momin et al., 2019; Tan et al., 2021), *B. mojavensis* BTCB15 (Iqtedar et al., 2019), *B. paramycoides* (Dharmaraj et al., 2021), *B. pseudomycoides* MT32 (El-Saadony et al., 2019) kullanılmıştır. Bir araştırma çalışmasında Hajiali et al. (2022), *B. megaterium* ile FeO nanopartikülleri üretilmiştir. ZnO nanopartikülünün sentezinde *B. subtilis* (Hamk et al. 2023; Vosoughian et al., 2023), *B. haynesii* (Rehman et al. 2019) kullanılmıştır. Cu/CuO nanopartiküllerin sentezinde *B. cereus* (Tiwari et al., 2016), *B. subtilis* AM18 (El-Ashry et al., 2023), *B. coagulans* (Dolati et al. 2023) ve *B. altitudinis* (Halder et al., 2022) kullanılmıştır.

Nanopartiküllerin sentezinin ilk göstergesi olarak reaksiyon karışımlarındaki renk değişiklikleri kabul edilmiştir. Örneğin soluk sarıdan kırmızıya renk değişimi selenyum nanopartikülünün oluşumunu, soluk sarıdan koyu kahverengiye renk değişimi gümüş nanopartikülünün oluşumunu, açık maviden koyu yeşil veya kahverengine renk değişimi Cu nanopartiküllerinin oluşumunu, sarıdan sarımsı beyaza renk değişimi ise magnezyum, manganez ve çinko nanopartiküllerinin oluşumunu göstermiştir (Çakıcı et al., 2019; Ali et al., 2020; Dolati et al., 2023). Kolloidal çözeltinin kahverengi veya yeşil renginin, nanoparçacıktaki yüzey plazmon titreşimlerinden kaynaklandığı ve bunların oluşumunun spektroskopik bir göstergesi olduğu bildirilmiştir. Renkteki değişiklik, kültür süpernatantından sulu enzimatik

ekstraktın varlığında iyonlarının atomlarına indirgenmesinin bir sonucudur (Abdeen et al., 2014).

Ag nanopartikülleri, partikül boyutuna, şekline ve partikülün ortamla etkileşimine bağlı olarak 380-450 nm görünür aralıkta belirgin bir absorpsiyon zirvesine sahiptir (Elgorban et al., 2017). Araştırmacılar, Ag nanopartiküllerinin UV-Vis emilim zirvesinin biyosentezinin 420 nm (Saeed et al., 2020), 430 nm (Ibrahim et al., 2021) ve 436 nm’de (Prema et al., 2022) olduğunu bildirmişlerdir. Emilimdeki küçük değişiklik, reaksiyon karışımının bileşimindeki ve koşullarındaki değişikliklerden kaynaklanmaktadır. UV-Vis sonuçları, Se nanopartiküllerinin maksimum emiliminin 190-300 nm aralığında olduğunu bildiren çalışmalarla benzerdir. Daha önceki çalışmalarda Se nanopartiküllerinin absorbans pikleri 274 nm ve 212 nm (Shar et al., 2020) ve 265 nm (Vahdati and Moghadam, 2020) olarak belirlenmiştir. UV-Vis spektroskopisi ile CuO nanoparçacıkları incelenmiş ve 260 nm’de 0,8 absorbans değeriyle iyi tanımlanmış bir plazmon bandına sahip olduğunu gösterilmiştir. CuO- nanopartiküllerinin yüzey plazmon rezonansı görünür aralıkta tespit edilmiştir (Halder et al., 2022). Bakırı veya oksitlenmiş Cu nanopartikülleri çevreleyen bir oksit tabakasının varlığı, 250 ila 300 nm arasında değişen dalga boylarına sahip absorpsiyon modelleriyle sonuçlanma eğilimindedir (Elemike et al., 2019; Halder et al., 2022). Sonuçlarımız biyolojik olarak sentezlenen Cu nanopartiküllerine ilişkin önceki raporlarla uyumludur. *B. altitudinis*’ten sentezlenen Cu nanopartikülleri için yaklaşık 250 nm’de (Halder et al., 2022), *Rubus glaucus* meyvesi ve yaprağı için 234 nm’de (Kumar et al., 2017) ve *Caesalpinia bonducella* tohum ekstraktlarıyla sentezlenen Cu nanopartikülleri için 250 nm’de geniş absorpsiyon spektrum zirveleri gözlemlenmiştir (Mali et al., 2019). Araştırmacılar, ZnO nanopartiküllerinin UV-Vis absorbans piklerini 360 nm (Obeizi et al., 2020), 380 nm (Mohamed et al., 2021) ve 359 nm (Khan et al., 2021)’de olduğunu bildirmiştir. Fungal (*Rhizopus oryzae*) sentezlenmiş MgO nanopartikülleri 282 nm dalga boyunda (Hassan et al., 2021), *Aleo vera* ekstraktlarında elde edilen MgO nanopartikülleri 281 nm’de (Sathya, 2019), *Burkholderia rinojensis* hücresiz süpernatantı kullanılarak elde edilen MgO-nanopartikülleri ise 330 nm’de pik değerleri vermiştir (Abdel-aziz et al., 2020)

FT-IR spektroskopisi kullanılarak yapılan analiz sonucunda elde edilen spektrumlar 4500–500 cm^{-1} (MIR) dalga boyu aralığında incelenmiştir. FT-IR analizi sonucunda elde edilen spektrumların 860-880, 1123-1190, 1577-1586, 2180 ve 3000 cm^{-1} dalga boylarındaki piklerin ortak ve belirgin olduğu görülmüştür. 1600 ve 1400 cm^{-1} ’deki bantlar –CO–NH– grubundan kaynaklanmaktadır (Kotresh et al., 2018). 1123-1190 cm^{-1} ’de elde edilen pikin yapısal (C-N) alifatik amid titreşimlerine karşılık geldiği şeklinde belirlenmiştir (Naghshbandi and Moghimi, 2020). Bu bulgular, proteinlerin nanopartiküllere serbest amin grupları veya sistein kalıntıları

yoluyla veya misel hücre duvarında bulunan enzimlerdeki negatif yüklü karboksilat gruplarının elektrostatik çekimi yoluyla bağlanabildiğini, dolayısıyla nanopartiküllerin protein tarafından oluşturabileceğini desteklemektedir (Gole et al., 2001; Gajbhiye et al., 2009; Tran et al., 2013).

Tüm nanopartiküllerin faz ve kristal yapısı XRD kullanılarak incelenmiştir. Ag nanopartikülleri (2 θ) için kırınım zirveleri 38,11°, 44,30°, 64,45°, 77,40° ve 81,56°'de bulunmuştur. Se nanopartiküllerinin XRD desenleri (2 θ) 38.11, 44.27, 64.22 ve 77.47°, Cu nanopartikülleri için 19, 29° ve Mg nanopartikülleri için 19, 30 ve 38° olarak tespit edilmiştir. Elde edilen veriler daha önceki çalışmalarla paralellik göstermektedir (Ansari et al., 2018; Dong et al., 2018; Mickymaray et al., 2019; Arunthirumeni et al., 2022).

Se nanopartiküllerini sentezlemek için *B. megaterium* ATCC 55000'in süpernatantının kullanıldığı çalışmada TEM sonucu nanoparçacıkların, 29,72 ila 74,36 nm arasında bir nanoölçek aralığında, ortalama 41,2 nm ana çapa sahip küresel bir şekle sahip olduğu gösterilmiştir (Hashem et al., 2021). *B. coagulans* ile yapılan bir çalışmada, TEM ve FESEM görüntülerine göre, CuO nanopartiküllerinin boyutunun 5 ila 47 nm aralığında, ortalama boyutu 13.84 nm ve küresel şekilli olduğu belirlenmiştir. BC-CuO nanopartiküllerinin elementel bileşimine yönelik EDX analizinde bakır ve oksijenin varlığı olarak rapor edilmiştir (Dolati et al., 2023). *B. subtilis* ile yapılan bir çalışmada ortalama çapı 80 nm olan küresel Ag nanopartikülleri SEM analiziyle belirlenmiştir (Tariq et al., 2020). Gümüşe dirençli *B. megaterium* tarafından üretilen gümüş nanopartiküllerinin TEM ve SEM analizleri sonucu 10-60 nm boyut aralığında küresel şekilli gümüş nanopartiküllerin hücre dışı sentezini gösterdi (Karkaj et al., 2013). Başka bir çalışmada *B. megaterium* NCIM 2326 ile gümüş nanopartiküllerinin boyutunun 80-99 nm aralığında olduğu belirlenmiştir (Saravanan et al., 2011). Metalle kirlenmiş topraktan izole edilen ve gümüşe dirençli *B. safensis* TEN12 türü ile üretilen gümüş nanopartiküllerinin SEM ve TEM ile parçacık boyutu 22,77 ile 45,98 nm arasında değişen Ag nanopartiküllerinin kristal yapısını ve küresel şeklini göstermiştir. Enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDX), nano tozda yüksek oranda gümüş içeriğinin mevcut olduğunu ortaya koymuştur (Ahmed et al., 2020). Denizden izole edilen *B. amyloliquefaciens* SRB04 ile üretilen Se nanopartiküllerinin 45,4-68,3 nm civarında ortalama parçacık boyutuna sahip olduğu ve X-ışını kırınımı (XRD) çalışmaları, biyosentezlenen Se nanopartiküllerinin amorf doğasını doğrulamıştır (Ashengroph and Hosseini, 2021).

Sonuçlar

1. Amilaz üreticisi bakterinin patates kabuklarından izolasyonu ve saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Klasik ve moleküler yöntemlerle *P. megaterium* SFA olarak tanımlanmıştır.
2. *P. megaterium* SFA ile en yüksek amilaz üretiminin 3 günlük inkübasyon süresinde, pH 7,0 ve 35 °C'de, çözünebilir nişasta ve maya özütü varlığında elde edildiği tespit edilmiştir.
3. *P. megaterium* SFA amilaz enziminin saflaştırılması için amonyum sülfat çöktürmesi, ultrafiltrasyon ve iyon değişim kromatografisi yöntemleri kullanılmıştır. Enzim 20,4 kat, %9,6 verimle saflaştırılmış ve spesifik aktivitesi 10,2 U/mg olan saf bir amilaz elde edilmiştir.
4. *P. megaterium* SFA amilaz enziminin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile 57 kDa olarak hesaplanmıştır. Nişasta hidrolizinin kinetik analizi sonucu ise V_{max} değeri 13,3 U/mg protein ve K_m değeri 0,126 mM olarak bulunmuştur.
5. Amilaz aktivitesi için optimum sıcaklık 40 °C ve optimum pH 9,0 olarak bulunmuştur.
6. Çeşitli metal iyonları, reaktif ve çözücülerin varlığında *P. megaterium* SFA amilaz enziminin kararlılık durumu araştırılmıştır. Metal iyonları ve çözücüler varlığında enzim üretiminde artış olmadığı, SDS varlığında ise enzim aktivitesinin yaklaşık iki katına çıktığı tespit edilmiştir.
7. Ticari deterjanlardan özellikle çamaşır deterjanı varlığında amilaz enziminin kararlı olduğu gözlenmiştir.
8. Amilaz enziminin pamuklu kumaşlardan çikolata ve mısır lekelerini çıkarmada etkili olduğu görülmüştür.
9. Amilaz enziminin $AgNO_3$, $CuSO_4$, $MgSO_4$ ve Na_2SeO_3 nanopartiküllerinin sentezinde başarılı olduğu görülmüştür.

KAYNAKÇA

- Abdeen, S., Geo, S., Praseetha, P. K., & Dhanya, R. P. (2014). Biosynthesis of silver nanoparticles from Actinomycetes for therapeutic applications. *International Journal of Nano Dimensions* 5(2), 155-162.
- Abdel-Aziz, M. M., Emam, T. M., & Elsherbiny, E. A. (2020). Bioactivity of magnesium oxide nanoparticles synthesized from cell filtrate of endobacterium *Burkholderia rinojensis* against *Fusarium oxysporum*. *Materials Science and Engineering: C*, 109, 110617.
- Abdel-Fattah, Y. R., Soliman, N. A., El-Toukhy, N. M., El-Gendi, H., & Ahmed, R. S. (2013). Production, purification, and characterization of thermostable α -amylase produced by *Bacillus licheniformis* isolate AI20. *Journal of Chemistry*, 2013.
- Abeleda, H. E. P., Javier, A. P., Murillo, A. Q. M., & Baculi, R. Q. (2020). Alpha-amylase conjugated biogenic silver nanoparticles as innovative strategy against biofilm-forming multidrug resistant bacteria. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 29, 101784.
- Abimbola, O. F. (2022). Optimization and production of extracellular *Bacillus megaterium* (ISA08) alpha-amylase isolated from cassava dumpsite soil. *Archieve of Science and Technology*, 3(1) 92 -104.
- Afrisham, S., Badoei-Dalfard, A., Namaki-Shoushtari, A., & Karami, Z. (2016). Characterization of a thermostable, CaCl₂-activated and raw-starch hydrolyzing alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* AT70: Production under solid state fermentation by utilizing agricultural wastes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 132, 98-106.
- Ahmad, R., Mohsin, M., Ahmad, T., & Sardar, M. (2015). Alpha amylase assisted synthesis of TiO₂ nanoparticles: structural characterization and application as antibacterial agents. *Journal of Hazardous Materials*, 283, 171-177.
- Ahmed, N. E., El Shamy, A. R., & Awad, H. M. (2020). Optimization and immobilization of amylase produced by *Aspergillus terreus* using pomegranate peel waste. *Bulletin of the National Research Centre*, 44(1), 1-12.
- Ahmed, T., Shahid, M., Noman, M., Niazi, M. B. K., Zubair, M., Almatroudi, A., Khursid, M., Tariq, F., Mumtaz, R., & Li, B. (2020). Bioprospecting a native silver-resistant *Bacillus safensis* strain for green synthesis and subsequent antibacterial and anticancer activities of silver nanoparticles. *Journal of Advanced Research*, 24, 475-483.
- Aiyer, P. V. (2005). Amylases and their applications. *African Journal of Biotechnology*, 4(13).
- Al-Amri, A., Al-Ghamdi, M. A., Khan, J. A., Altayeb, H. N., Alsulami, H., Sajjad, M., Baothman, O.A., & Nadeem, M. S. (2021). Expressão e caracterização de *Escherichia coli* de alfa-amilase de *Geobacillus thermodenitrificans* DSM-465. *Brazilian Journal of Biology*, 82.
- Al-awsy, M., Obiady, S. A., & Obaidi, A. A. (2017). Producing of amylase enzyme from thermophilic bacteria using agricultural wastes as a substrate. *Austin Journal of Basic and Applied Science*, 11(13), 158-164.
- Al-Bedak, O. A. H., Sakr, R. S., & AL-Kolaibe, A. M. (2022). The microbial amylases: an overview with practical consequences and applications. *Journal of Microbiology & Experimentation*, 10(4), 130-134.

- Ali, I., Sultan, S., Tahir Mahmood, R., Tariq, M., Shamim, Z., Mushtaq, A., & Asiri, M. (2023). Production and characterization of α -amylase from indigenously isolated *Streptomyces* sp. *BioResources*, 18(1), 6.
- Ali, M. A., Ahmed, T., Wu, W., Hossain, A., Hafeez, R., Islam Masum, M. M., Wang, Y., An, Q., Sun, G., & Li, B. (2020). Advancements in plant and microbe-based synthesis of metallic nanoparticles and their antimicrobial activity against plant pathogens. *Nanomaterials*, 10(6), 1146.
- Al-Johani, N. B., Al-Seen, M. N., & Ahmed, Y. M. (2017). Optimization of alkaline α -amylase production by thermophilic *Bacillus subtilis*. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 14(1), 288-301.
- Almuhayawi, M. S., Hassan, E. A., Alkuwaity, K. K., Abujamel, T. S., Mokhtar, J. A., Niyazi, H. A., Almasaudi, S. B., Alamri, T. A., Najjar, E. A., Zabermawi, N. M., Ezher, E. I., Makki, R. M., Niyazi, H. A., & Harakeh, S. M. (2023). Enzymatic-based hydrolysis of digested potato peel wastes by amylase producing fungi to improve biogas generation. *Catalysts*, 13(5), 913.
- Al-Quadan, F., Akel, H., & Natshi, R. (2009). Characteristics of a novel highly thermostable and extremely thermophilic alkalitolerant amylase from hyperthermophilic *Bacillus* strain HUTBS71. *OnLine Journal of Biological Science*, 9, 67-74.
- Anisimova, M., & Gascuel, O. (2006). Bayesian posterior probabilities (Li, 1996; Rannala and Yang. *Large and Small*, 55(4), 539-552.
- Ansari, A., Ali, A., & Asif, M. (2018). Microwave-assisted MgO NP catalyzed one-pot multicomponent synthesis of polysubstituted steroidal pyridines. *New Journal of Chemistry*, 42(1), 184-197.
- Anto, H., Trivedi, U., & Patel, K. (2006). α -Amylase production by *Bacillus cereus* MTCC 1305 using solid-state fermentation. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), 241-245.
- Aqeel, B. M., & Umar, D. M. (2010). Effect of alternative carbon and nitrogen sources on production of alpha-amylase by *Bacillus megaterium*. *World Applied Sciences Journal*, 8(13), 85-90.
- Arapoglou, D., Varzakas, T., Vlyssides, A., & Israilides, C. (2010). Ethanol production from potato peel waste (PPW). *Waste Management*, 30(10), 1898-1902
- Arikan, B. (2008). Highly thermostable, thermophilic, alkaline, SDS and chelator resistant amylase from a thermophilic *Bacillus* sp. isolate A3-15. *Bioresource Technology*, 99(8), 3071-3076.
- Armstrong, E. F. (1933). Enzymes: a discovery and its consequences. *Nature*, 131(3311), 535-537.
- Arunthirumeni, M., Veerammal, V., & Shivakumar, M. S. (2022). Biocontrol efficacy of mycosynthesized selenium nanoparticle using *Trichoderma* sp. on insect pest *Spodoptera litura*. *Journal of Cluster Science*, 33(4), 1645-1653.
- Arya, D. B., Vincent, S. G. T., & Balagurusamy, N. (2022). Physiology of Ethanol Production by *Clostridium thermocellum*. *Bioethanol: Biochemistry and Biotechnological Advances*, 43.
- Asad, W., Asif, M. A. R. I. A., & Rasool, S. A. (2011). Extracellular enzyme production by indigenous thermophilic bacteria: partial purification and characterization of α -amylase by *Bacillus* sp. WA21. *Pakistan Journal of Botany*, 43(2), 1045-1052.

- Ashengroph, M., & Hosseini, S. R. (2021). A newly isolated *Bacillus amyloliquefaciens* SRB04 for the synthesis of selenium nanoparticles with potential antibacterial properties. *International Microbiology*, 24, 103-114.
- Asoodeh, A., Emtenani, S., Emtenani, S., Jalal, R., & Housaindokht, M. R. (2014). Molecular cloning and biochemical characterization of a thermoacidophilic, organic-solvent tolerant α -amylase from a *Bacillus* strain in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 99, 114-120.
- Aygan, A. (2015). Kahramanmaraş Topraklarından İzole Edilen *Bacillus* sp. Tarafından Alfa-Amilaz Üretimi ve Karakterizasyonu. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi*, 5(2), 68-74.
- Aygan, A., Sariturk, S., Kostekci, S., & Tanis, H. (2014). Production and characterization of alkaliphilic alpha-amylase from *Bacillus subtilis* A10 isolated from soils of Kahramanmaraş, Turkey. *African Journal of Microbiology Research*, 8(21), 2168-2173.
- Baltaş, N., 2012. *Anoxybacillus gonensis* Z4 Suşundan Ekstraselüler α -Amilaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Ban, X., Guo, Y., Kaustubh, B., Li, C., Gu, Z., Hu, K., & Li, Z. (2023). The Global amylase research trend in food science technology: A data-driven analysis. *Food Reviews International*, 39(5), 2492-2506.
- Bano, S., Qader, S. A. U., Aman, A., Syed, M. N., & Azhar, A. (2011). Purification and characterization of novel α -amylase from *Bacillus subtilis* KIBGE HAS. *Aaps Pharmscitech*, 12, 255-261.
- Bernfeld P. Amylases, α and β . *Methods in Enzymology*, 1 (1955), pp. 149-158.
- Bertoldo, C., & Antranikian, G. (2002). Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6(2), 151-160.
- Biedendieck, R., Knuuti, T., Moore, S. J., & Jahn, D. (2021). The “beauty in the beast”—the multiple uses of *Priestia megaterium* in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105, 5719-5737.
- Boyce, S., & Tipton, K. F. (2001). Enzyme classification and nomenclature. *e LS*.
- Brandam, C., Meyer, X. M., Proth, J., Strehaiano, P., & Pingaud, H. (2003). An original kinetic model for the enzymatic hydrolysis of starch during mashing. *Biochemical Engineering Journal*, 13(1), 43-52.
- Brink, B., 2010. Urease test protocol. Washington, DC: American Society for Microbiology
- Castresana, J. (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution*, 17(4), 540–552.
- Chakraborty, S., Khopade, A., Kokare, C., Mahadik, K., & Chopade, B. (2009). Isolation and characterization of novel α -amylase from marine *Streptomyces* sp. D1. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 58(1-4), 17-23.
- Chen, L., Huang, W., Hao, M., Yang, F., Shen, H., Yu, S., & Wang, L. (2023). Rapid and ultrasensitive activity detection of α -amylase based on γ -cyclodextrin crosslinked metal-organic framework nanozyme. *International Journal of Biological Macromolecules*, 242, 124881.
- Chevenet, F., Brun, C., Bañuls, A. L., Jacq, B., & Christen, R. (2006). TreeDyn: Towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC Bioinformatics*, 7.

- Chhajed, M., Tiwari, P., Barik, R., Gangwal, A., Thakur, V. M., Chhajed, A., & Dwivedi, S. (2023). Isolation of amylase producing bacteria from soil and its optimization of production parameters by shake flask culture method. *Journal of Biomedical Engineering*, 40(1), 1-16.
- Claus, D., Berkeley, R.C.W., 1986. Genus *Bacillus* Cohn, 1872. In: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt. J.G., Eds., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, p.1105-1139.,
- Cordeiro, C. A. M., Martins, M. L. L., & Luciano, A. B. (2002). Production and properties of alpha-amylase from thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33, 57-61.
- Çakıcı, T., Özdal, M., Kundakcı, M., & Kayalı, R. (2019). ZnSe and CuSe NP's by microbial green synthesis method and comparison of IV characteristics of Au/ZnSe/p-Si/Al and Au/CuSe/p-Si/Al structures. *Materials Science in Semiconductor Processing*, 103, 104610.
- da Silva, S. M., Koehnlein, E. A., Bracht, A., Castoldi, R., de Moraes, G. R., Baesso, M. L., Peralta, R. A., de Souza, C. G. M., de Sa Nakanishi, A. B., & Peralta, R. M. (2014). Inhibition of salivary and pancreatic α -amylases by a pinhão coat (*Araucaria angustifolia*) extract rich in condensed tannin. *Food Research International*, 56, 1-8.
- Das, K., Doley, R., Mukherjee, A.K., 2004. Purification and biochemical characterization of thermostable, alkaliphilic, extracellular α -amylase from *Bacillus subtilis* DM-03, a strain isolated from the traditional food of India. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 40, 291-298.
- De Baere, H. (1999). Starch policy in the European community. *Starch-Stärke*, 51(6), 189-193.
- De Bary A. 1884. *Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze, Mycetozen und Bacterien*. Wilhelm Engelmann, Leipzig, Germany.
- Delgado-Beleño, Y., Martinez-Nuñez, C. E., Cortez-Valadez, M., Flores-López, N. S., & Flores-Acosta, M. (2018). Optical properties of silver, silver sulfide and silver selenide nanoparticles and antibacterial applications. *Materials Research Bulletin*, 99, 385-392.
- Demirkan, E. S., Mikami, B., Adachi, M., Higasa, T., & Utsumi, S. (2005). α -Amylase from *B. amyloliquefaciens*: purification, characterization, raw starch degradation and expression in *E. coli*. *Process Biochemistry*, 40(8), 2629-2636.
- Dereeper, A., Audic, S., Claverie, J.-M., & Blanc, G. (2010). BLAST-EXPLORER helps you building datasets for phylogenetic analysis.
- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.-F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J.-M., & Gascuel, O. (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Research*, 36, 465–469.
- Dharmaraj, D., Krishnamoorthy, M., Rajendran, K., Karuppiyah, K., Annamalai, J., Durairaj, K. R., Santhiyagu, P., & Ethiraj, K. (2021). Antibacterial and cytotoxicity activities of biosynthesized silver oxide (Ag₂O) nanoparticles using *Bacillus paramycoides*. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 61, 102111.
- Dolati, M., Tafvizi, F., Salehipour, M., Komeili Movahed, T., & Jafari, P. (2023). Biogenic copper oxide nanoparticles from *Bacillus coagulans* induced reactive oxygen species generation and apoptotic and anti-metastatic activities in breast cancer cells. *Scientific Reports*, 13(1), 3256.

- Dong, Y., Wang, K., Tan, Y., Wang, Q., Li, J., Mark, H., & Zhang, S. (2018). Synthesis and characterization of pure copper nanostructures using wood inherent architecture as a natural template. *Nanoscale Research Letters*, 13, 1-8.
- Duedahl-Olesen, L., Kragh, K. M., & Zimmermann, W. (2000). Purification and characterisation of a malto-oligosaccharide-forming amylase active at high pH from *Bacillus clausii* BT-21. *Carbohydrate Research*, 329(1), 97-107.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792-1797.
- El-Ashry, R. M., Nader, M. M., Shami, A., Alduwish, M. A., Ahmed, A. E., Alamoud, S. A., Allohibi, A., Alqahtani, F. S., Alghamdi, A. M., Ahmed, A. I., Hassan, A. A., Awad, S. E., & El-Tarabily, K. A. (2023). Ecofriendly synthesis and nematocidal application of copper nanoparticles fabricated from *Bacillus subtilis* AM18, against root-knot nematode of cucumber. *European Journal of Plant Pathology*, 1-29.
- Elemike, E. E., Onwudiwe, D. C., Nundkumar, N., & Singh, M. (2019). CuO and Au-CuO nanoparticles mediated by *Stigmaphyllon ovatum* leaf extract and their anticancer potential. *Inorganic Chemistry Communications*, 104, 93-97.
- Elgorban, A. M., El-Samawaty, A. E. R. M., Abd-Elkader, O. H., Yassin, M. A., Sayed, S. R., Khan, M., & Adil, S. F. (2017). Bioengineered silver nanoparticles using *Curvularia pallescens* and its fungicidal activity against *Cladosporium fulvum*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(7), 1522-1528.
- El-Saadony, M. T., El-Wafai, N. A., El-Fattah, H. I. A., & Mahgoub, S. A. (2019). Biosynthesis, optimization and characterization of silver nanoparticles using a soil isolate of *Bacillus pseudomycooides* MT32 and their antifungal activity against some pathogenic fungi. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 7(4), 238-249.
- Elyasi Far, B., Ahmadi, Y., Yari Khosroushahi, A., & Dilmaghani, A. (2020). Microbial Alpha-Amylase Production: Progress, Challenges and Perspectives. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 2020(3), 350–358.
- Escaramboni, B., Fernández Núñez, E. G., Carvalho, A. F. A., & de Oliva Neto, P. (2018). Ethanol biosynthesis by fast hydrolysis of cassava bagasse using fungal amylases produced in optimized conditions. *Industrial Crops and Products*, 112, 368–377.
- Ezeji, T. C., & Bahl, H. (2006). Purification, characterization, and synergistic action of phytate-resistant α -amylase and α -glucosidase from *Geobacillus thermodenitrificans* HRO10. *Journal of Biotechnology*, 125(1), 27-38.,
- Fairbairn, D. A., Priest, F. G., & Stark, J. R. (1986). Extracellular amylase synthesis by *Streptomyces limosus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 8(2), 89-92.
- Fan, Y., & Picchioni, F. (2020). Modification of starch: A review on the application of “green” solvents and controlled functionalization. *Carbohydrate Polymers*, 241, 116350.
- Far, B. E., Ahmadi, Y., Khosroshahi, A. Y., & Dilmaghani, A. (2020). Microbial alpha-amylase production: progress, challenges and perspectives. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 10(3), 350.
- Farag, M. A., Elmassry, M. M., Baba, M., & Friedman, R. (2019). Revealing the constituents of Egypt’s oldest beer using infrared and mass spectrometry. *Scientific Reports*, 9(1), 16199.

- Farooq, M. A., Ali, S., Hassan, A., Tahir, H. M., Mumtaz, S., & Mumtaz, S. (2021). Biosynthesis and industrial applications of α -amylase: A review. *Archives of Microbiology*, 203, 1281-1292.
- Fincan, S. A., & Enez, B. (2022). Production of α -Amylase from *Bacillus megaterium* MD-1. *Turkish Journal of Nature and Science*, 11(4), 36-41.
- Fincan, S. A., Özdemir, S., Karakaya, A., Enez, B., Mustafov, S. D., Ulutaş, M. S., & Şen, F. (2021). Purification and characterization of thermostable α -amylase produced from *Bacillus licheniformis* So-B3 and its potential in hydrolyzing raw starch. *Life Sciences*, 264, 118639.
- Fouda, F. (2021). Production and evaluation of alpha-amylase produced from *Bacillus Amyloliquefaciens*. *Annals of Agricultural Science, Moshtohor*, 59(2), 361-372.
- Gajbhiye, M., Kesharwani, J., Ingle, A., Gade, A., & Rai, M. (2009). Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their activity against pathogenic fungi in combination with fluconazole. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 5(4), 382-386.
- Galushko, A., & Kuever, J. (2020). In Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria (pp. 1-4).
- Gole, A., Dash, C., Ramakrishnan, V., Sainkar, S. R., Mandale, A. B., Rao, M., & Sastry, M. (2001). Pepsin– gold colloid conjugates: preparation, characterization, and enzymatic activity. *Langmuir*, 17(5), 1674-1679.
- Goyal, N., Gupta, J. K., & Soni, S. K. (2005). A novel raw starch digesting thermostable α -amylase from *Bacillus* sp. I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch. *Enzyme and Microbial Technology*, 37(7), 723-734.
- Guindon, S., & Gascuel, O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52(5), 696-704.
- Gupta, R. S., Patel, S., Saini, N., & Chen, S. (2020). Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel Bacillaceae genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the *Subtilis* and *Cereus* clades of species. *International Journal of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 70(11), 5753-5798.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., & Chauhan, B. (2003). Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 38(11), 1599-1616.
- Gurkok, S., 2022. Screening of high yield biosurfactant producing strains of agribiotechnological importance. In *Applications of Biosurfactant in Agriculture* (pp. 163-180). Academic Press.
- Gurkok, S., Ozdal, M., 2021. Purification and characterization of a novel extracellular, alkaline, thermoactive, and detergent-compatible lipase from *Aeromonas caviae* LipT51 for application in detergent industry. *Protein Expression and Purification*, 180, 105819
- Gürkök, S. (2019). Microbial enzymes in detergents: a review. *International Journal of Science and Engineering Research* 10(9), 75-81.
- Haddar, A., Agrebi, R., Bougatef, A., Hmidet, N., Sellami-Kamoun, A., & Nasri, M. (2009). Two detergent stable alkaline serine-proteases from *Bacillus mojavensis* A21: purification, characterization and potential application as a laundry detergent additive. *Bioresource Technology*, 100(13), 3366-3373.

- Hajiali, S., Daneshjou, S., & Daneshjoo, S. (2022). Biomimetic synthesis of iron oxide nanoparticles from *Bacillus megaterium* to be used in hyperthermia therapy. *AMB Express*, 12(1), 145.
- Halder, U., Roy, R. K., Biswas, R., Khan, D., Mazumder, K., & Bandopadhyay, R. (2022). Synthesis of copper oxide nanoparticles using capsular polymeric substances produced by *Bacillus altitudinis* and investigation of its efficacy to kill pathogenic *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemical Engineering Journal Advances*, 11, 100294.
- Hamk, M., Akçay, F. A., & Avcı, A. (2023). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using *Bacillus subtilis* ZBP4 and their antibacterial potential against foodborne pathogens. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 53(3), 255-264.
- Haq, I., Ashraf, H., Qadeer, M.A., Iqbal, J. 2005. Pearl millet, a source of alpha amylase production by *Bacillus licheniformis*, *Bioresource Technology*, 96 (10), 1201-1204.
- Hashem, A. H., Abdelaziz, A. M., Askar, A. A., Fouda, H. M., Khalil, A. M., Abd-Elsalam, K. A., & Khaleil, M. M. (2021). *Bacillus megaterium*-mediated synthesis of selenium nanoparticles and their antifungal activity against *Rhizoctonia solani* in faba bean plants. *Journal of Fungi*, 7(3), 195.
- Hassan, S. E. D., Fouda, A., Saied, E., Farag, M. M., Eid, A. M., Barghoth, M. G., Awad, M. A., Hamza, M. F., & Awad, M. F. (2021). *Rhizopus oryzae*-mediated green synthesis of magnesium oxide nanoparticles (MgO-NPs): A promising tool for antimicrobial, mosquitocidal action, and tanning effluent treatment. *Journal of Fungi*, 7(5), 372.
- Hemşinli, A. (2022). *Exiguobacterium alkaliphilum* VLP1 tarafından üretilen alkali proteaz enziminin, saflaştırılması, karakterizasyonu ve biyoteknolojik uygulamaları. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Hemşinli, A., & Gurkok, S. (2024). Evaluation of a novel purified and characterized alkaline protease from the extremophile *Exiguobacterium alkaliphilum* VLP1 as a detergent additive. *Biotechnology Journal*, 19, 2300441.
- Hiteshi, K., Didwal, G., & Gupta, R. (2016). Production optimization of α -amylase from *Bacillus licheniformis*. *Journal of Advance Research in Biology & Pharmacy Research*, 1, 1-14.
- Hmidet, N., Bayoudh, A., Berrin, J. G., Kanoun, S., Juge, N., & Nasri, M. (2008). Purification and biochemical characterization of a novel α -amylase from *Bacillus licheniformis* NH1: cloning, nucleotide sequence and expression of amyN gene in *Escherichia coli*. *Process Biochemistry*, 43(5), 499-510.
- Horikoshi, K. (1999). Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(4), 735-750.
- Hussain, I., Siddique, F., Mahmood, M. S., & Ahmed, S. I. (2013). A Review of the Microbiological Aspect of α -amylase Production. *International Journal of Agriculture & Biology*, 15(5).
- Ibrahim, S., Ahmad, Z., Manzoor, M. Z., Mujahid, M., Faheem, Z., & Adnan, A. (2021). Optimization for biogenic microbial synthesis of silver nanoparticles through response surface methodology, characterization, their antimicrobial, antioxidant, and catalytic potential. *Scientific Reports*, 11(1), 770.
- Iqtedar, M., Aslam, M., Akhyar, M., Shehzaad, A., Abdullah, R., & Kaleem, A. (2019). Extracellular biosynthesis, characterization, optimization of silver nanoparticles (AgNPs) using *Bacillus mojavensis* BTCB15 and its antimicrobial activity against multidrug resistant pathogens. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 49(2), 136-142.

- Jana, M., Maity, C., Samanta, S., Pati, B. R., Islam, S. S., Mohapatra, P. K. D., & Mondal, K. C. (2013). Salt-independent thermophilic α -amylase from *Bacillus megaterium* VUMB109: an efficacy testing for preparation of maltooligosaccharides. *Industrial Crops and Products*, 41, 386-391.
- Jayawardena, H. S. N., Liyanage, S. H., Rathnayake, K., Patel, U., & Yan, M. (2021). Analytical methods for characterization of nanomaterial surfaces. *Analytical chemistry*, 93(4), 1889-1911.
- Kalkan, G. (2017). Kaju fıstığından (*Anacardium occidentale*) lipaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu. (Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi). Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya.
- Kalpana, B. J., & Pandian, S. K. (2014). Halotolerant, acid-alkali stable, chelator resistant and raw starch digesting α -amylase from a marine bacterium *Bacillus subtilis* S8-18. *Journal of Basic Microbiology*, 54(8), 802-811.
- Kaneko, T., Ohno, T., & Ohisa, N. (2005). Purification and characterization of a thermostable raw starch digesting amylase from a *Streptomyces* sp. isolated in a milling factory. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69(6), 1073-1081.
- Karkaj, O. S., Salouti, M., Zanjani, R. S., & Derakhshan, F. K. (2013). Extracellular deposition of silver nanoparticles by *Bacillus megaterium*. *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry*, 43(7), 903-906.
- Keskin, M., Gulsen, K. A. Y. A., & Keskin, Ş. (2022). Green synthesis and biochemical properties of propolis based silver nanoparticles. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 22(1), 59-67.
- Keskin, Ş., & Ertunga, N. S. (2017). Purification, immobilization and characterization of thermostable α -amylase from a thermophilic bacterium *Geobacillus* sp. TF14. *Turkish Journal of Biochemistry*, 42(6), 633-642.
- Khan, F., Kang, M. G., Jo, D. M., Chandika, P., Jung, W. K., Kang, H. W., & Kim, Y. M. (2021). Phloroglucinol-gold and-zinc oxide nanoparticles: Antibiofilm and antivirulence activities towards *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Marine Drugs*, 19(11), 601.
- Kılıçer, H., Özcan, B.A.H.R.İ., 2013. Yem katkısı selüloz enzimlerini üreten termofilik *Bacillus* suşlarının izolasyonu ve enzimlerin kısmi karakterizasyonu. *Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 17(4), 1-8
- Koç, Ö., 2015. *Aspergillus fumigatus* HBF125 Ekstraselüler α -amilazının üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.
- Kotresh, K. R., Neelagund, S. E., Mahesh, M. C., & Avinash, B. (2018). Immobilization of hyperthermostable α -amylase using magnetite [Fe₃O₄] nano particle to promote the properties for industrial applications. *Journal of Bionanoscience*, 12(5), 664-670.
- Kuhner, M. K., & Felsenstein, J. (1994). A simulation comparison of phylogeny algorithms under equal and unequal evolutionary rates. *Molecular Biology and Evolution*, 11(3), 459-468.
- Kumar, B., Smita, K., Cumbal, L., Debut, A., & Angulo, Y. (2017). Biofabrication of copper oxide nanoparticles using Andean blackberry (*Rubus glaucus Benth.*) fruit and leaf. *Journal of Saudi Chemical Society*, 21, S475-S480
- Kuşçulu, N. G., & Cücer, N. (2009). *Rhus coriaria* L.'nın Sıvı Sabun İçeriğindeki Önemi. *Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2(2): 93-98.

- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Li, W. F., Zhou, X. X., & Lu, P. (2005). Structural features of thermozymes. *Biotechnology Advances*, 23(4), 271-281.
- Liu, J. M., Liang, Y. T., Wang, S. S., Jin, N., Sun, J., Lu, C., Sun, Y. F., Li, S. Y., Fan, B., & Wang, F. Z. (2023). Antimicrobial activity and comparative metabolomic analysis of *Priestia megaterium* strains derived from potato and dendrobium. *Scientific Reports*, 13(1), 5272.
- Mabrouk, S. B., Messaoud, E. B., Ayadi, D., Jemli, S., Roy, A., Mezghani, M., & Bejar, S. (2008). Cloning and sequencing of an original gene encoding a maltogenic amylase from *Bacillus* sp. US149 strain and characterization of the recombinant activity. *Molecular Biotechnology*, 38, 211-219.
- Mali, S. C., Raj, S., & Trivedi, R. (2019). Biosynthesis of copper oxide nanoparticles using *Enicostemma axillare* (Lam.) leaf extract. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 3:20:100699
- Mendu, D. R., Ratnam, B. V. V., Purnima, A., & Ayyanna, C. (2005). Affinity chromatography of α -amylase from *Bacillus licheniformis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 37(7), 712-717.
- Menon, G., Mody, K., Datta, S. ve Jha, B. (2014). Characterization of alkaliphilic, surfactant stable and raw starch digesting A-amylase from *Bacillus subtilis* strain JS-16. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 5, 8.
- Michelin, M., Silva, T. M., Benassi, V. M., Peixoto-Nogueira, S. C., Moraes, L. A. B., Leão, J. M., Jorge, J. A., Terenzi, H. F., & Maria de Lourdes, T. M. (2010). Purification and characterization of a thermostable α -amylase produced by the fungus *Paecilomyces variotii*. *Carbohydrate Research*, 345(16), 2348-2353.
- Mickymaray, S. (2019). One-step synthesis of silver nanoparticles using Saudi Arabian desert seasonal plant *Sisymbrium irio* and antibacterial activity against multidrug-resistant bacterial strains. *Biomolecules*, 9(11), 662.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428.
- Mohamed, A. A., Abu-Elghait, M., Ahmed, N. E., & Salem, S. S. (2021). Eco-friendly mycogenic synthesis of ZnO and CuO nanoparticles for in vitro antibacterial, antibiofilm, and antifungal applications. *Biological Trace Element Research*, 199, 2788-2799.
- Mohanasrinivasan, V., Diksha, D., Suganthi, V., Selvarajan, E., & Devi, C. S. (2014). Process optimization for enhanced production of α -amylase by submerged (SmF) and solid state fermentation (SSF) using *Bacillus pumilus* VITMDS2. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 5, 1784-1800.
- Mojsov, K. (2012). Microbial α -amylases and their industrial applications: a review. *International Journal of Management, IT and Engineering*, 2(10), 583-609.
- Momin, B., Rahman, S., Jha, N., & Annapure, U. S. (2019). Valorization of mutant *Bacillus licheniformis* M09 supernatant for green synthesis of silver nanoparticles: photocatalytic dye degradation, antibacterial activity, and cytotoxicity. *Bioprocess and biosystems engineering*, 42, 541-553.
- Moyes, R. B., Reynolds, J., Breakwell, D. P., 2009. Differential staining of bacteria: gram stain. *Current Protocols in Microbiology*, 15(1), A-3C.

- Mukherjee, A. K., Borah, M., & Rai, S. K. (2009). To study the influence of different components of fermentable substrates on induction of extracellular α -amylase synthesis by *Bacillus subtilis* DM-03 in solid-state fermentation and exploration of feasibility for inclusion of α -amylase in laundry detergent formulations. *Biochemical Engineering Journal*, 43(2), 149-156.
- Murthy, V. H., & Murthy, V. H. (2020). *Together* (Vol. 617). New York, NY, USA: Harper Collins Publishers.
- Nagarajan, D. R., Rajagopalan, G., & Krishnan, C. (2006). Purification and characterization of a maltooligosaccharide-forming α -amylase from a new *Bacillus subtilis* KCC103. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73, 591-597.
- Naghshbandi, M. P., & Moghimi, H. (2020). Stabilization of phytase on multi-walled carbon nanotubes via covalent immobilization. In *Methods in Enzymology* (Vol. 630, pp. 431-451). Academic Press.
- Naidu, M. A., & Saranraj, P. (2013). Bacterial amylase: a review. *International Journal of Pharmaceutical and Biological Archive*, 4(2), 274-87.
- Naik, B., Kumar, V., Rizwanuddin, S., Chauhan, M., Gupta, A. K., Rustagi, S., Kumar, V., & Gupta, S. (2023). Agro-industrial waste: a cost-effective and eco-friendly substrate to produce amylase. *Food Production, Processing and Nutrition*, 5(1), 30.
- Najafi, M. F., & Kembhavi, A. (2005). One step purification and characterization of an extracellular α -amylase from marine *Vibrio* sp. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(4), 535-539.
- Naramchimeg, B., Kh, A., & Urantulkhur, B. (2019). Process optimization for amylase production of *Bacillus subtilis* M4 mutant strain. *Mongolian Journal of Agricultural Sciences*, 27(02), 8-19.
- Naseer, M., Aslam, U., Khalid, B., & Chen, B. (2020). Green route to synthesize Zinc Oxide Nanoparticles using leaf extracts of *Cassia fistula* and *Melia azadarach* and their antibacterial potential. *Scientific Reports*, 10(1), 9055.
- Nithya, K., Muthukumar, C., Dhanasekaran, D., Kadaikunnan, S., Alharbi, N. S., Khaled, J. M., & Thajuddin, N. (2016). Production, optimization and partial characterization of thermostable and alkaline amylase from *Bacillus licheniformis* KSU-6. *International Journal of Agriculture and Biology*, 18(6).
- Niyomukiza, S., Owino, W., Mathara, J. M., & Maina, N. Isolation, purification and biochemical characterization of alkaline α -amylase from *Bacillus subtilis* strain W3SFR5 isolated from kitchen wastes. *Applied Food Biotechnology*, 10(1), 9-19
- Nwokoro, O., & Anthonia, O. (2015). Studies on the production of alkaline α -amylase from *Bacillus subtilis* CB-18. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 14(1), 71-75.
- Obeizi, Z., Benbouzid, H., Ouchenane, S., Yilmaz, D., Culha, M., & Bououdina, M. (2020). Biosynthesis of Zinc oxide nanoparticles from essential oil of *Eucalyptus globulus* with antimicrobial and anti-biofilm activities. *Materials Today Communications*, 25, 101553.
- Ozdal, M., & Gurkok, S. (2022a). Recent advances in nanoparticles as antibacterial agent. *ADMET and DMPK*, 10(2), 115-129.)
- Ozdal, M., & Gurkok, S. (2022b). Mechanisms of nanoparticles biosynthesis by microorganisms. *The Trends In Nano Materials Synthesis and Applications*, 81-97.

- Padmavathi, T., Bhargavi, R., Priyanka, P. R., Niranjana, N. R., & Pavitra, P. V. (2018). Screening of potential probiotic lactic acid bacteria and production of amylase and its partial purification. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), 357-362.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V. T., Singh, D., & Mohan, R. (2000). Advances in microbial amylases. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 31(2), 135-152
- Parker, K., Salas, M., & Nwosu, V. C. (2010). High fructose corn syrup: production, uses and public health concerns. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 5(5), 71-78.
- Pasteur, L. (2023). *Mémoire sur la fermentation alcoolique*. BoD—Books on Demand.
- Paul, J. S., Lall, B. M., Jadhav, S. K., & Tiwari, K. L. (2017). Parameter's optimization and kinetics study of α -amylase enzyme of *Bacillus* sp. MB6 isolated from vegetable waste. *Process Biochemistry*, 52, 123-129.
- Pinjari, A. B., & Kotari, V. (2018). Characterization of extracellular amylase from *Bacillus* sp. strain RU1. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 6(3), 29-34.
- Prema, P., Ranjani, S. S., Kumar, K. R., Veeramanikandan, V., Mathiyazhagan, N., Nguyen, V. H., & Balaji, P. (2022). Microbial synthesis of silver nanoparticles using *Lactobacillus plantarum* for antioxidant, antibacterial activities. *Inorganic Chemistry Communications*, 136, 109139.
- Ravindar, D. J., & Elangovan, N. (2013). Molecular identification of amylase producing *Bacillus subtilis* and detection of optimal conditions. *Journal of Pharmacy Research*, 6(4), 426-430.
- Rehman, A., & Saeed, A. (2015). Isolation and screening of amylase producing *Bacillus* species from soil. *International Journal of Advanced Research*, 3(4), 151-164.
- Rehman, S., Jermy, B. R., Akhtar, S., Borgio, J. F., Abdul Azeed, S., Ravinayagam, V., Jindan, R. A., Alsalem, Z. H., Buhamid, A., & Gani, A. (2019). Isolation and characterization of a novel thermophile; *Bacillus haynesii*, applied for the green synthesis of ZnO nanoparticles. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 47(1), 2072-2082.
- Reiner, K. (2010). Catalase test protocol. *American Society for Microbiology*, 1-6.
- Rodrigo, W. W. P., Magamulla, L. S., Thiwanka, M. S., & Yapa, Y. M. S. M. (2022). Optimization of Growth Conditions to Identify the Superior *Bacillus* Strain Which Produce High Yield of Thermostable Alpha Amylase. *Advances in Enzyme Research*, 10(1), 1-22.
- Rodríguez-Martínez, B., Coelho, E., Gullón, B., Yáñez, R., & Domingues, L. (2023). Potato peels waste as a sustainable source for biotechnological production of biofuels: Process optimization. *Waste Management*, 155, 320-328.
- Saeed, S., Iqbal, A., & Ashraf, M. A. (2020). Bacterial-mediated synthesis of silver nanoparticles and their significant effect against pathogens. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 37347-37356.
- Saha, S. P., & Mazumdar, D. (2019). Optimization of process parameter for alpha-amylase produced by *Bacillus cereus* amy3 using one factor at a time (OFAT) and central composite rotatable (CCRD) design based response surface methodology (RSM). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 19, 101168.
- Saini, R., Saini, H. S., & Dahiya, A. (2017). Amylases: Characteristics and industrial applications. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(4), 1865-1871.

- Salem, S. S., El-Belely, E. F., Niedbała, G., Alnoman, M. M., Hassan, S. E. D., Eid, A. M., Shaheen, T. I., Elkelish, A., & Fouda, A. (2020). Bactericidal and in-vitro cytotoxic efficacy of silver nanoparticles (Ag-NPs) fabricated by endophytic actinomycetes and their use as coating for the textile fabrics. *Nanomaterials*, 10(10), 2082.
- Saravanan, M., Vemu, A. K., & Barik, S. K. (2011). Rapid biosynthesis of silver nanoparticles from *Bacillus megaterium* (NCIM 2326) and their antibacterial activity on multi drug resistant clinical pathogens. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 88(1), 325-331.
- Sathya, S. (2019). Peg functionalized magnesium oxide nanoparticles using aloe vera extract. *International Journal of Recent Scientific Research*, 10(3), 31422-31424.
- Saxena, R. K., Dutt, K., Agarwal, L., & Nayyar, P. (2007). A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5. *Bioresource Technology*, 98(2), 260-265.
- Selvakumar, P., Ashakumary, L., & Pandey, A. (1998). Biosynthesis of glucoamylase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using tea waste as the basis of a solid substrate. *Bioresource Technology*, 65(1-2), 83-85.
- Shad, M., Hussain, N., Usman, M., Akhtar, M. W., & Sajjad, M. (2023). Exploration of computational approaches to predict the structural features and recent trends in α -amylase production for industrial applications. *Biotechnology and Bioengineering*, 120(8), 2092-2116.
- Shafiei, M., Ziaee, A. A., & Amoozegar, M. A. (2012). Purification and characterization of a halophilic α -amylase with increased activity in the presence of organic solvents from the moderately halophilic *Nesterenkonia* sp. strain F. *Extremophiles*, 16, 627-635.
- Shar, A. H., Lakhan, M. N., Liu, J., Ahmed, M., Chandio, M. B., Shah, A. H., Hanan, A., Ali, I., & Wang, J. (2020). Facile synthesis and characterization of mesoporous titanium oxide nanoparticles for ethanol sensing properties. *Sukkur IBA Journal of Emerging Technologies*, 3(1), 16-22.
- Sharifi-Rad, M., Pohl, P., Epifano, F., & Álvarez-Suarez, J. M. (2020). Green synthesis of silver nanoparticles using *Astragalus tribuloides delile*. root extract: Characterization, antioxidant, antibacterial, and anti-inflammatory activities. *Nanomaterials*, 10(12), 2383.
- Sharma, A., & Satyanarayana, T. (2013). Microbial acid-stable α -amylases: characteristics, genetic engineering and applications. *Process Biochemistry*, 48(2), 201-211.
- Sharma, H., Batra, N., & Singh, J. (2022). Purification, characterization and potential detergent industry application of a thermostable α -amylase from *Bacillus licheniformis* RA31. *Indian Journal of Experimental Biology*, 60(05), 331-342.
- Simair, A. A., Qureshi, A. S., Khushk, I., Ali, C. H., Lashari, S., Bhutto, M. A., Mangrio, G. S., & Lu, C. (2017). Production and partial characterization of α -amylase enzyme from *Bacillus* sp. BCC 01-50 and potential applications. *BioMed Research International*, 2017.
- Singh, R., Kumar, V., & Kapoor, V. (2014). Partial purification and characterization of a heat stable α -amylase from a thermophilic actinobacteria, *Streptomyces* sp. MSC702. *Enzyme Research*, 2014.
- Singh, S., Mangla, J., & Singh, S. (2021). Evaluation of *Aspergillus fumigatus* NTCC1222 as a source of enzymes for detergent industry. *Resources, Environment and Sustainability*, 5, 100030.

- Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K. M., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2006). α -Amylases from microbial sources—an overview on recent developments. *Food Technology Biotechnology*, 44(2), 173-184.
- Soliman, M. K., Salem, S. S., Abu-Elghait, M., & Azab, M. S. (2023). Biosynthesis of silver and gold nanoparticles and their efficacy towards antibacterial, antibiofilm, cytotoxicity, and antioxidant activities. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 195(2), 1158-1183.
- Souza, P.M. & Magalhães P.O. (2010). Application of microbial-amylase in industry-a review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 850–861.
- Syu, M. J., & Chen, Y. H. (1997). A study on the α -amylase fermentation performed by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Chemical Engineering Journal*, 65(3), 237-247.
- Tan, L. V., Tran, T., & Thi, V. D. (2021). Biosynthesis of silver nanoparticles from *Bacillus licheniformis* TT01 isolated from quail manure collected in Vietnam. *Processes*, 9(4), 584.
- Tariq, F., Ahmed, N., Afzal, M., Khan, M. A. U., & Zeshan, B. (2020). Synthesis, Characterization and antimicrobial activity of *Bacillus subtilis*-derived silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 13(5).
- Tatar, S. (2007). Termofil moderately halofilik *Bacillus sp.* suşlarından amilaz enzimi üretimi ve endüstriyel kullanım olanaklarının araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Tekin, A. (2020). *Bacillus halodurans* c-125 alkalın serin proteazının üretimi, karakterizasyonu ve deterjan katkı maddesi olarak kullanımının araştırılması. PhD Thesis, Karadeniz Technical University, Institute of Natural and Applied Science, Trabzon.
- Tiwari, M., Jain, P., Hariharapura, R. C., Narayanan, K., Bhat, U., Udupa, N., & Rao, J. V. (2016). Biosynthesis of copper nanoparticles using copper-resistant *Bacillus cereus*, a soil isolate. *Process Biochemistry*, 51(10), 1348-1356.
- Tiwari, S. P., Srivastava, R., Singh, C. S., Shukla, K., Singh, R. K., Singh, P., Singh, R., Singh N. L., & Sharma, R. (2015). Amylases: an overview with special reference to alpha amylase. *Journal of Global Bioscience*, 4(1), 1886-1901.
- Tran, N. T., Truong, N. P., Gu, W., Jia, Z., Cooper, M. A., & Monteiro, M. J. (2013). Timed-release polymer nanoparticles. *Biomacromolecules*, 14(2), 495-502.
- Tran, P. L., Lee, J. S., & Park, K. H. (2014). Experimental evidence for a 9-binding subsite of *Bacillus licheniformis* thermostable α -amylase. *FEBS Letters*, 588(4), 620-624.
- Tran, T. T. T., Vu, T. T. H., & Nguyen, T. H. (2013). Biosynthesis of silver nanoparticles using *Tithonia diversifolia* leaf extract and their antimicrobial activity. *Materials Letters*, 105, 220-223.
- Tunail, N. 2009. Mikrobiyoloji. Pelin Ofset, Ankara, s. 448. Ankara.
- Uçar, A., 2011. *Aspergillus Sp.* tarafından üretilen amilaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın
- Uzunova, K., Vassileva, A., Kambourova, M., Ivanova, V., Spasova, D., Mandeva, R., Derekova, A., & Tonkova, A. (2001). Production and properties of a bacterial thermostable exo-inulinase. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 56(11-12), 1022-1028.

- Vahdati, M., & Tohidi Moghadam, T. (2020). Synthesis and characterization of selenium nanoparticles-lysozyme nanohybrid system with synergistic antibacterial properties. *Scientific Reports*, 10(1), 510.
- Vaidya, S. O. U. M. Y. A., Srivastava, P. K., Rathore, P. R. A. G. Y. A., & Pandey, A. K. (2015). Amylases: a prospective enzyme in the field of biotechnology. *Journal of Applied Bioscience*, 41(1), 1-18.
- Valls, C., Rojas, C., Pujadas, G., Garcia-Vallve, S., & Mulero, M. (2012). Characterization of the activity and stability of amylase from saliva and detergent: Laboratory practicals for studying the activity and stability of amylase from saliva and various commercial detergents. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 40(4), 254-265.
- Van Den Burg, B. (2003). Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology*, 6(3), 213-218.
- Van der Maarel, M. J. E. C. (2002). Van der VB, Uitdehaag JCM, Leemhuis H, Dijkhuizen L. Properties and applications of starch converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of Biotechnology*, 94, 137-155.
- Vary, P. S. (1994). Prime time for *Bacillus megaterium*. *Microbiology*, 140(5), 1001-1013.
- Vary, P. S., Biedendieck, R., Fuerch, T., Meinhardt, F., Rohde, M., Deckwer, W. D., & Jahn, D. (2007). *Bacillus megaterium*—from simple soil bacterium to industrial protein production host. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76, 957-967.
- Verma, A. K., Mishra, A., Dhiman, T. K., Sardar, M., & Solanki, P. R. (2022). Experimental and in silico interaction studies of alpha amylase-silver nanoparticle: A nano-bio-conjugate. *bioRxiv*, 2022-06.
- Vosoughian, N., Asadbeygi, M., Mohammadi, A., & Soudi, M. R. (2023). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using novel bacterium strain (*Bacillus subtilis* NH1-8) and their in vitro antibacterial and antibiofilm activities against *Salmonella typhimurium*. *Microbial Pathogenesis*, 185, 106457.
- 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.
- Wang, Y. C., Hu, H. F., Ma, J. W., Yan, Q. J., Liu, H. J., & Jiang, Z. Q. (2020). A novel high maltose-forming α -amylase from *Rhizomucor miehei* and its application in the food industry. *Food Chemistry*, 305, 125447.
- Xu, L., Zhu, Z., & Sun, D. W. (2021). Bioinspired nanomodification strategies: Moving from chemical-Based agrosystems to sustainable agriculture. *ACS Nano*, 15(8), 12655-12686.
- Yassin, S. N., Jiru, T. M., & Indracanti, M. (2021). Screening and characterization of thermostable amylase-producing bacteria isolated from soil samples of afdera, Afar region, and molecular detection of amylase-coding gene. *International Journal of Microbiology*, 2021, 1-14.
- Yılmaz, A. A. (2023). Van Gölü'nden izole edilen *Bacillus pumilus* VLC7 ile selüloz üretimi, üretim koşullarının optimizasyonu, selülozün saflaştırılması, karakterizasyonu ve biyoteknolojik uygulamaları. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum
- Zhang, J., & Zeng, R. (2011). Molecular cloning and expression of an extracellular α -amylase gene from an Antarctic deep sea psychrotolerant *Pseudomonas stutzeri* strain 7193. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 841-850.

Zhu, M., Zhai, W., Jiang, H., Lin, L., Wei, W., & Wei, D. (2023). Exploiting loop-grafting strategy resorting on computer-aided design to improve the thermostability of alpha-amylase from *Geobacillus stearothermophilus*. *Process Biochemistry*, 133, 28-38.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	: Fatma AKBAŞ
Doğum tarihi	:
Doğum Yeri	:
Uyruğu	:
Adres	:
Tel	:
E-mail	:
Eğitim	
Lise	: Nenehatun Anadolu Kız Lisesi
Lisans	: Atatürk Üniversitesi/ Fen Fakültesi/Biyoloji
Yüksek lisans	: Atatürk Üniversitesi/ Fen Fakültesi/Biyoloji
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
Tezden Üretilmiş Yayınlar	