

TERMOFİL *Bacillus* sp. BAKTERİSİNDEN LICHENAZ (β -1,3 VE 1,4 GLUCANASE) ENZİMİ ÜRETİMİ, KARAKTERİZASYONU VE BİYOTEKNOLOJİK KULLANILABİLİRLİĞİ

Isolation Of Thermophilic Bacillus sp., Production, Characterization And Determination Of Biotechnological Application Of Lichenase (β -1,3 And 1,4 Glucanase)

Fatma GÖZÜKARA
Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Burhan ARIKAN
Biyoteknoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışmada, değişik ortamlardan izole edilen termofil *Bacillus* sp. suşlarından likenaz enzimi izolasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla bakterilerin farklı sıcaklık ve pH değerlerinde katı besiyerinde üreme ve enzim üretme yetenekleri araştırılmıştır.

Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık 100°C bulunmuştur. Enzim, optimum aktivitesini pH 6.0'da gösterirken, 24 saat süreyle 55°C de pH 3.0-6.0 aralığında ortalama %88 stabilite göstermiştir.

Enzim optimum aktivitesini asidik pH da gösteren termostabil ve asidik pH stabil özellikte olduğu için, özellikle tavuk yemi hazırlama alanında öncelikle kullanılabilir özelliktedir.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus*, likenaz, termofil, asidostabil, halotolerant

ABSTRACT

In this study, the lichenase enzymes from *Bacillus* sp. strains isolated from different environments were produced and characterized. For this purpose, different temperatures and pH values of bacteria in solid plate and enzymes to produce reproductive capabilities were investigated.

The temperature of the enzyme shows optimum activity was found 100°C. The optimum activity was obtained at pH 6.0 the enzyme also presented the enzyme was 88% stable at 55°C between pH 3.0-6.0 for 24 hours.

For the optimum activity of enzyme is indicating that acidic pH stable and acidic pH thermostable are stable properties, preparation of chicken feed, especially in the first available properties.

Key Words: *Bacillus*, lichenase, thermostable, acidostable, halotolerant

Giriş

Enzimler, doğal olarak canlılar tarafından sentezlenen protein yapısında ya da bir kısmı protein olan biyo-moleküllerdir. Enzimler, binlerce yıldır içecek, ekmek ve peynir yapımı gibi işlemlerde varlığı ve görevi bilinmeden kullanılmıştır (Uhlig, 1998).

* Yüksek Lisans Tezi-MSc. Thesis

Endüstriyel alanda kullanılan enzimler bitkisel, hayvansal ve mikroorganizma kökenli olmakla birlikte ağırlıklı olarak mikroorganizmalardan izole edilmektedirler. Bunun nedeni, mikroorganizma kaynaklı enzimlerin katalitik aktivitelerinin yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve daha ucuz olmaları, büyük boyutlarda ve yüksek saflıkta elde edilmesi gibi avantajlara sahip olmasıdır. Örneğin mikrobiyal enzimler ekstrem sıcaklık ve pH değerlerinde çok yüksek düzeyde aktivite gösterirler (Wiseman, 1987; Horikoshi, 1999).

Bacillus cinsi bakteriler toprak, hayvan dışkıları ve bitkisel atıklar üzerinde yaygın olarak bulunurlar. Bu cinsin bireylerinin çoğu zararsız, izolasyonu ve teşhisi kolay, hızlı büyüme oranı ile fermentasyon süresi kısadır. Genel olarak güvenli olmaları, sentezledikleri proteinleri dış ortama salgılama kapasiteleri gibi birçok nedenden dolayı cazip endüstriyel organizmalardır. *Bacillus* türleri çeşitli kompleks substratlara karşı aktivite gösteren çok sayıda ve çeşitli hidrolitik enzimler üretmekte ve salgılamaktadırlar. Bu nedenle *Bacillus* cinsindeki organizmalar, endüstriyel alanda α -amilaz, proteaz, glukonaz, glukoz izomeraz ve endonükleaz gibi enzimlerin üretiminde yaygın şekilde kullanılmaktadırlar (Uhlig, 1998).

β -1,3-1,4 glukanlar, yüksek yapıli bitkilerin hücre duvarlarının yapısında bulunan hem β -1,3 hemde β -1,4 bağıli D-glukoz içeren lineer polisakaritlerdir. Likenazların, β -glukanları diğere glukanazlara göre daha yüksek düzeyde hidroliz etmeleri nedeniyle, kümes hayvanları ve domuz yemlerinin hazırlanmasında giderek ön plana çıkmaktadırlar (Beckmann ve ark., 2006). Bu enzimler arasında endo β -(1,3)-(1,4)-glukanazlar (likenazlar), endosperm hücrelerinin nişastasına α -amilazların ulaşımını kolaylaştırdığından dolayı içki mayalama endüstrisinde spesifik uygulamalara sahiptirler (Beckmann ve ark., 2006).

Bu çalışmada, glukan molekülünü oluşturan β -1,3 ve β -1,4 glikozid bağları ile bağlanmış birimlerin yüksek sıcaklıkta tam hidrolizini gerçekleştirecek termofil ve termostabil Likenaz enzim üreticilerinin izolasyonu, enzim üretiminin gerçekleştirilmesi ve enzimin karakterizasyonunu yapılarak, biyoteknolojik kullanılabilirliğinin (Arpa, yulaf ve buğdaydan yem üretimi amacı ile yararlanılması) araştırılması amaçlanmaktadır.

Materyal ve Metod

Enzim Üreticisi *Bacillus* sp. Bakterilerin İzolasyonu, Tanımlanmaları ve En İyi Enzim Üreticisi Suşun Saptanması.

Değişik ortamlardan örnekler alınarak 1'er gr tartılıp 5 mL steril distile su ile karıştırıldıktan sonra süspansiyon haline getirilmiştir. *Bacillus* sp. sporlu bir bakteri olduğundan, elde edilen süspansiyon 80°C'de 10 dakika inkübe edilerek ısı şoku uygulanmıştır (Lennete ve ark., 1985).

Seçilen bakteri örneklerini tanımlamak amacı ile indol, hidrojen sülfür, hareket, asit, katalaz, jelatin ve kazeini kullanma gibi biyokimyasal testler ile spor, yüzeyde zar oluşturma, dipte çökelti oluşturma ve gram boyama testleri yapılmıştır (Jin ve ark., 1990).

Katı Besiyerinde Farklı pH ve Sıcaklık Değerlerinde Likenaz Enzim Üretime Yeteneğinin Saptanması

İzolasyonu gerçekleştirilen bakteriler 20-60 °C ve pH 5.0-10.0 aralığında 24 h 55 °C de içerisinde likenan bulunan katı besiyerinde üretilmişlerdir. İnkübasyon sonunda koloniler %0.1'lik kongo kırmızısı ile 15 dakika boyandıktan sonra 1M'lık NaCl ile 15 dakika boyanın geri alınması işlemi uygulanmıştır. Kolonilerin etrafında kırmızı zeminde sarı zon oluşumu likenaz pozitif şeklinde değerlendirilmiştir (Hols ve ark., 1994; Burhan ve ark., 2003). *Bacillus* sp. L12 bakterisi likenaz üreticisi olarak seçilmiş ve enzim üretiminde kullanılmıştır.

Enzim Üretimi ve Likenaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması

Seçilen bakteri örneklerinden en geniş zon çapı oluşturan L-12 suşu enzim üretimi için kullanılmıştır. Bu amaçla seçilen suşun bir gecelik taze kültüründen içerisinde likenan bulunan ve pH sı 7.0 olan sıvı LB besiyerine uygun şekilde aşılama yapılarak 24 saat süreyle 55°C'de 250 devir/dakikada çalkalama kültür şeklinde üretim gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen karışık kültür +4°C ve 6000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek bakteriler kültürden uzaklaştırılmış ve sıvı faz temiz bir tüpe aktarılmıştır. Örneğin üzerine %96'lık soğuk etanol eklenmiş ve -33°C'de bir gece bekletilerek alkol presipitasyonu yapılmıştır.

Soğuk çöktürme ortamından alınan örnek +4°C de 20 dakika süreyle 8000 rpm'de santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Dipte toplanan enzim çökeltisi 0.1 M'lik pH'sı 6.8 olan sodyum fosfat tamponunda çözülerek, toplam 250 mL'lik enzim solüsyonu elde edilmiştir. Elde edilen enzimden likenan bulunan katı besiyerine 50 µL damlatılarak aktivite kontrolü yapılmıştır (Srivastava, 1987; Arıkan, 2008).

Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değerinin Saptanması

Enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin saptanması için Sitrat-fosfat (pH 3.0-5.0), Na-fosfat (pH 6.0-8.0) ve Glisin-NaOH (pH 8.5-10.5) tamponları kullanılarak %0.1'lik likenan çözeltileri hazırlanmıştır (Anonymous, 1917). 0.5 ml enzim + 0.5 ml farklı pH değerlerine sahip substrat karıştırılarak 55 °C de 30 dakika inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Aktivite tayini DNS yöntemi kullanılarak UV-visible spektrofotometrede 550 nm dalga boyunda okunarak gerçekleştirilmiştir.

En yüksek absorbans değeri 100 kabul edilerek diğer değerler buna göre oranlanıp optimum aktivitenin görüldüğü pH değeri bulunmuştur (Arıkan, 2008).

Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Değerinin Saptanması

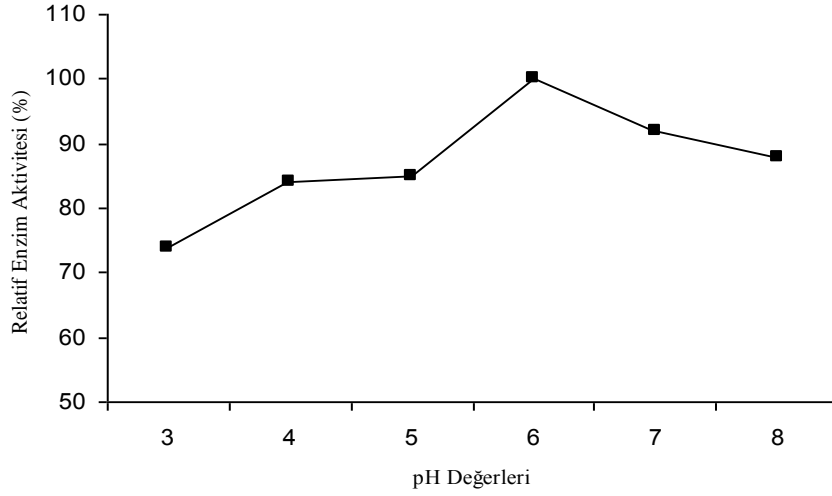
Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerinin saptanması için 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 ve 110 °C'lik sıcaklık değerleri seçilmiştir. 0.5 ml enzim + 0.5 ml substrat (optimum pH değerinde hazırlanmış) karıştırılarak her bir sıcaklık değerinde 30 dakika inkübasyon gerçekleştirilip, DNS yöntemi ile aktivite tayini yapılmıştır. En yüksek absorbans değeri 100 kabul edilerek diğer değerler buna göre oranlanıp optimum aktivitenin görüldüğü sıcaklık değeri bulunmuştur (Gessesse ve Gashe, 1997; Burhan ve ark. 2003).

Bulgular ve Tartışma

Çalışmamızda enzim üretimi amacıyla seçtiğimiz ve L-12 olarak adlandırdığımız *Bacillus* sp. suşundan kısmi saflaştırma yöntemiyle elde edilen likenaz enziminin ait karakterizasyon sonuçları aşağıda verilmiştir.

Likenaz Enziminin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değerine Ait Sonuçlar

Optimum aktivitenin görüldüğü pH değerine ait sonuçlar şekil-1 de verilmiştir.



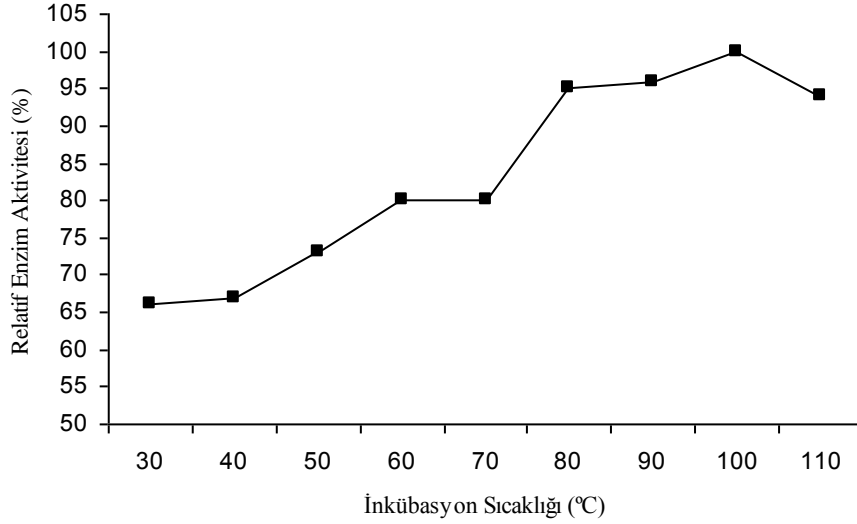
Şekil-1.Likenaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değeri

Bacillus sp. L-12 likenaz enzimi optimum aktiviteyi pH 6.0 da göstermiştir. Analiz edilen diğer pH değerlerinde sırasıyla pH 3.0 te %74, 4.0 te %84, 5.0 te %85, 7.0 de % 92 ve 8.0 de %88 relatif aktivite elde edilmiştir. Bütün pH değerleri dikkate alındığı zaman ortalama genel aktivite %87.1 olarak saptanmıştır.

Vogel ve ark (2006), izolasyonun gerçekleştirdikleri likenaz enzimlerinin optimum pH 4.0 ve 7.0 aralığında aktivite gösterdiklerini belirtmişlerdir. Jung ve ark. (2007) *Bacillus* sp. A8-8 bakterisinden izole edilen termostabil likenaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin 6.0 olduğunu belirtmişlerdir. Li ve ark. (2006), *Bacillus* sp. AC-1 bakterisinden izole edilen termoasidofilik endoglukanaz enziminin optimum aktiviteyi pH 4.5-6.5 aralığında gösterdiğini belirtmişlerdir. Fu ve ark. (2008), L-12 likenaz enziminin elde edilen sonuçlar literatür verileri ile tam bir uyum içindedir.

Likenaz Enziminin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık

Likenaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeriyle ilgili sonuçlar şekil-3 te verilmiştir.



Şekil-3.Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık (°C)

Bacillus sp. L-12 likenaz enzimi optimum aktivitesini 100°C de göstermiştir. Enzim 60 ve 70°C lerde %80 aktivite gösterirken 80°C %95, 90°C de ise %96 aktivite göstermiştir. Sıcaklık 110°C ye yükseltildiğinde enzim aktivitesi %94 e düşmüştür. Mawadza ve ark, (2000), izole edilen endoglukanaz enziminin optimum aktivitesini 65-70°C, Li ve ark. (2006), 70°C, Huang ve Monk (2004) 80°C de gösterdiğini saptamışlardır. Literatür verilerinden daha yüksek optimum aktivite sıcaklığına sahip olan enzim, hiper termofilik özelliktedir.

Sonuç ve Öneriler

Mikrobiyal enzimlerin dünya genelinde yıllık kullanım değerlerine bakıldığı zaman, alkaline proteaz %25, diğer proteazlar %21, Amilaz %18, Renin %10, Trypsin %3, Lipaz %3, diğer karbonhidrat parçalayan enzimler (selülaz ve xylanaz gibi) %10, analitik ve farmasötik enzimler %10 şeklinde bir dağılımla karşılaşılmaktadır (Rao ve ark., 1998).

Endüstride yaygın şekilde kullanılan enzimler arasında *Bacillus* cinsine ait tür ve alttürleri tarafından sentezlenen ondan fazla enzim vardır. Örneğin ticari olarak üretilen ve kullanılan termostabil amilaz enzimlerinin üretilmelerinde *Bacillus amyloliquefaciens* ve *Bacillus licheniformis* en çok kullanılan iki *Bacillus* türüdür (Horikoshi, 1996; Lin ve ark., 1998; Horikoshi, 1999; Kumar ve Takagi, 1999).

Mikroorganizma kaynaklı enzimlerin katalitik aktivitelerinin yüksek olması,

istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve daha ucuz olmaları, büyük boyutlarda ve yüksek saflıkta elde edilmesi gibi avantajlara sahip olmasıdır. Örneğin mikrobiyal enzimler ekstrem sıcaklık ve pH değerlerinde çok yüksek düzeyde aktivite gösterirler (Horikoshi, 1999).

L-12 likenaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değeri 6.0 olarak ölçülmüştür (Şekil-1.). Enzim pH 4.0-8.0 aralığında ortalama % 90 relatif aktiviteye sahiptir. Bütün pH değerleri dikkate alındığında ortalama relatif aktivite %87 düzeyinde gerçekleşmiştir. Stabilitate çalışmaları için seçilen bütün pH değerleri dikkate alındığında ise (pH 3.0-10.0) orijinal aktivitenin 24 saatlik 37°C deki inkübasyon sonunda ortalama %83 devam ettiği saptanmıştır. Enzim özellikle asidik pH da (pH 3.0-6.0 aralığında %88 stabildir) yüksek düzeyde pH stabil özellik taşımaktadır (Şekil-2). Jung ve ark. (2007) *Bacillus* sp. A8-8 bakterisinden izole edilen termostabil likenaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin 6.0 olduğunu belirtmişlerdir. George ve ark, (2001) İzole edilen endoglukanaz enziminin optimum aktivitesinin pH 6.0-8.0 aralığında gösterdiğini saptanmışlardır..

Bacillus sp. L-12 likenaz enzimi optimum aktivitesini 100°C de göstermiştir (Şekil-3). Enzim 60 ve 70°C lerde %80 aktivite gösterirken 80°C %95, 90°C de ise %96 aktiviteye sahiptir. Sıcaklık 110°C ye yükseltildiğinde (yağ banyosunda inkübasyon yapılmıştır) enzim aktivitesi %94 gibi oldukça yüksek bir değerde ölçülmüştür (şelil-3). L12 likenaz enzimi bu veriler dikkate alındığında yüksek düzeyde termofil özellik göstermektedir. Yernool ve ark (1998), izolasyonunu gerçekleştirdikleri iki termostabil endoglukanaz enziminin optimum aktivitesini 95°C de gösterdiğini saptamışlardır. Zverlov ve ark. (1997) *Thermotoga neopolitana* suşundan izole edilen yüksek düzeyde termostabil 1,3-beta endoglukanaz enzimlerinden 73 kDa büyüklükteki fragmentin optimum aktivitesini 95°C, 52 kDa büyüklükteki fragmentin 85°C de göstediğini saptamışlardır.

İzolasyonu gerçekleştirilen L12 likenaz enzimi optimum aktivitesini pH 6.0 da göstermesi ve optimum aktivite sıcaklığının 100 °C olması nedeniyle termoasidofil özelliklere sahiptir.

Bu özellikleri nedeniyle özellikle tavuk yemi hazırlama endüstrisi için ideal bir enzim özelliği göstermektedir. Ayrıca malt oluşumu sırasında kurutma işlemi yüksek sıcaklıkta yapıldığı için bira üretimi için çok kullanışlı bir özellik taşımaktadır.

Kaynaklar

- ARIKAN, B. 2007. Highly Thermostable, Thermophilic, Alkaline, SDS and Chelator Resistant Amylase from a Thermophilic *Bacillus* sp. Isolate A3-15. Bioresource Technology.
- BECKMANN, L., SIMON, O., and VAHJEN, W. 2006. Isolation and identification of mixed linked β -glucan egrading bacteria in the intestine of broiler chickens and partial characteriation of respective 1,3-1,4-glucanase activities. J Basic Microbiol. 46 (3): 175-185.
- BURHAN, A., ÜNALDI, N., CORAL, G., COLAK, O., AYGAN, A., and GÜLNAZ, O. 2003. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline

- and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. Isolate ANT-6. *Process Biochemistry*. 38:1397-1403.
- GESSESSE, A., and GASHE. B:A., 1997. Production of Alkaline Xylanase by an Alkaliphilic *Bacillus* sp. Isolated From an Alkaline Soda Lake. *Journal of Applied Microbiology.*, 83: 402-406.
- HAKAMADA, Y., ENDO, K., TAKIZAWA, S., KOBAYASHI, T., SHIRAI, T., YAMANE, T., and ITO, S., 2002. Enzymatic properties, crystallization and deduced aminoacid sequence of an alkaline endoglucanase from *Bacillus circulans*. *Biochimica et Biophysica Acta*,1570: 174-180.
- HORIKOSHI, K., 1999. Alkaliphiles: Some applications of their products for biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 63 (4): 735-750.
- HUANG, X.P., and MONK, C., 2004. Purification and characterization of a cellulase (CMCase) from a newly isolated thermophilic aerobic bacterium *Caldibacillus cellulovarans* gen.nov., sp. nov. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 20: 85-92.
- KIM, J-Y., HUR, S-H., HONG, J-H., 2005. Purification and characterization of an alkaline cellulase from a newly isolated alkalophilic *Bacillus* sp. HSH-810. *Biotechnol. Lett.*, 27:313-316.
- LENNETE, E.H., BALOWS, A., HAUSLER, J.W. Jr., and SHADOMY, J.H., 1985. *Manuel of clinical Microbiology*. USA, Vol 4, p.1149.
- MAWADZA, C., HATTI-KAUL, R., ZVAUYA, R., and MATTIASON, B., 2000. Purification and characterization of cellulases produced by *Bacillus* Strain. *J. Biotechnol.*, 83: 177-187.
- SRIVASTAVA, R.A.K., 1987. Purification and Chemical Characterization of Thermostable Amylases Produced by *Bacillus stearothermophilus*. *Biochemistry Laboratory, Botany Department, University of Gorakhpur, Gorakhpur 273001, India.*
- UHLIG, H. 1998. *Industrial enzymes and their applications*. JOHN WILEY&SONS, INC. NEW YORK.
- VOGET, S., STEELE, H.L., and STREIT, W.R., 2006. Characterization of metagenome-derived halotolerant cellulase. *J. Biotechnol* 126:26-36.
- WISEMAN, A., 1987. *Handbook of enzyme biotechnology*. Second Edition. Chapter 3. The application of enzymes in industry, p.274-373.