

**T.C.
OSMANIYE KORKUT ATA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**α -AMİLAZ ENZİMLERİNİ ÜRETEN
TERMOFİLİK *Bacillus* SUŞLARININ İZOLASYONU
ve ENZİMLERİN KISMİ KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Celal TÜRKER

**BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**OSMANIYE
ARALIK – 2014**



T.C.
OSMANIYE KORKUT ATA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**α -AMİLAZ ENZİMLERİNİ ÜRETEEN TERMOFİLİK
Bacillus SUŞLARININ İZOLASYONU ve ENZİMLERİN
KİSMİ KARAKTERİZASYONU**

Celal TÜRKER

**BIYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**OSMANIYE
ARALIK - 2014**

Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü “Biyoloji” Ana Bilim Dalı “12YLBYL007” no’lu öğrencisi “Celal TÜRKER” tarafından ‘Yrd. Doç. Dr. Bahri Devrim ÖZCAN’ danışmanlığında hazırlanan ‘ α -Amilaz Enzimlerini Üreten Termofilik *Bacillus* Suşlarının İzolasyonu ve Enzimlerin Kısmi Karakterizasyonu’ başlıklı bu çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

İmza

Yrd. Doç. Dr. Bahri Devrim ÖZCAN

.....

Doç. Dr. Hüsniye AKA SAĞLIKER

.....

Yrd. Doç. Dr. Makbule BAYLAN

.....

Yukarıdaki Jüri kararı Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun/...../..... tarih ve/...../..... Sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Doç. Dr. A. Ali GÜRTEN

Enstitü Müdürü

Uygulanacak olan bu tez çalışması Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından OKÜBAP-2013-PT3-0013 nolu proje ile desteklenmiştir.

Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, çizelge ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, bu çalışma sonucunda elde edilmeyen her türlü bilgi ve ifade için ilgili kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını ve bu tezin Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlandığını bildiririm.

Celal TÜRKER

Üniversitesi : **Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi**
Enstitüsü : **Fen Bilimleri Enstitüsü**
Anabilim Dalı : **Biyoloji Anabilim Dalı**
Tez Danışmanı : **Yrd. Doç. Dr. Bahri Devrim ÖZCAN**
Tez Türü : **Yüksek Lisans**
Tarih : **Aralık-2014**

Celal TÜRKER

**α -AMİLAZ ENZİMLERİNİ ÜRETEN TERMOFİLİK *Bacillus*
SUŞLARININ İZOLASYONU ve ENZİMLERİN KİSMİ
KARAKTERİZASYONU**

ÖZET

Bu çalışmada, Erzin sınırları içerisinde bulunan Burnaz Çayı kıyı kesimlerinden toplanan toprak numunelerinden üç adet termofilik *Bacillus* sp. izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bakteriler sırasıyla *Bacillus* sp. CT1, CT2 ve CT3 olarak isimlendirilmişlerdir. Bakterilerce α -amilaz üretimi CT1 suşu için 60°C, CT2 ve CT3 suşları için ise 80°C'de maksimum düzeye çıkmıştır. CT1 α -amilazı optimum aktivitesini 90°C, CT2 ve CT3 α -amilazları ise 60°C'de göstermişlerdir. Yine CT2 α -amilazı optimum aktivitesini pH 7.0'da, CT1 ve CT3 α -amilazları ise pH 8.0'de göstermişlerdir. CT1, CT2 ve CT3 bakterilerinin α -amilazlarına ait spesifik aktiviteler 55°C'de sırasıyla 317.6, 113.3 ve 362.7 U/mg olarak gerçekleşmiştir. Enzimlerin moleküler ağırlıkları zymogram analizi ile CT1 ve CT3 α -amilazları için 65 kDa, CT2 α -amilazı için ise 38 kDa olarak hesaplanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus* sp., α -amilaz, izolasyon, karakterizasyon

University : **Osmaniye Korkut Ata University**
Institute : **Institute of Natural and Applied Sciences**
Science Programme : **Department of Biology**
Supervisor : **Assist. Pof. Dr. Bahri Devrim ÖZCAN**
Degree Awarded : **M.Sc.**
Date : **December-2014**

Celal TÜRKER

**ISOLATION OF α -AMYLASE PRODUCING THERMOPHILIC
Bacillus STRAINS AND PARTIAL CHARACTERIZATION of the
ENZYMES**

ABSTRACT

In the present study, three thermophilic *Bacillus* strains were isolated from the soil samples collected from the coast sediments of the Burnaz Stream located in Erzin. The isolates were entitled as *Bacillus* sp. CT1, CT2, and CT3, respectively. The maximum α -amylase production was revealed at 60°C for CT1 strain, and at 80°C for CT2 and CT3 strains, respectively. The optimum enzyme activity was observed at 90°C for CT1 α -amylase, where as at 60°C for CT2 and CT3 α -amylases. On the other hand, optimum pH value for CT2 α -amylase was 7.0, where as 8.0 for CT1 and CT3 α -amylases. The specific activities of CT1, CT2, and CT3 bacterial amylases were 317.6, 113.3 and 362.7 U/mg at 55°C, respectively. The estimated molecular weight of CT1 and CT3 α -amylase was 65 kDa, and for CT2 α -amylase was 38 kDa by zymogram analysis.

Key Words: *Bacillus* sp., α -amylase, isolation, characterization

Canum anneme...

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü'nde Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır.

Yüksek Lisans çalışmam boyunca desteğini esirgemeyen, bilgi ve birikimini sabırla sunan danışman hocam Sayın Yrd.Doç.Dr. Bahri Devrim ÖZCAN'a teşekkür ederim.

Yüksek Lisans eğitimim boyunca, her adımda birlikte hareket ettiğim ve manevi desteğini sürekli hissettiğim Yüksek Lisans öğrencisi Harun Reşit KILIÇER'e, yine ihtiyaç duyduğumda benden yardımlarını esirgemeyen Yüksek Lisans öğrencisi Murat PİŞKİN'e ve diğer laboratuvar çalışanlarına teşekkürü bir borç bilirim.

Canım oğlum, kızım, eşim ve tüm aileme, bana verdikleri destekten dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI TEZ BİLDİRİMİ

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
İTHAF SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Enzimlerin Üretim Kaynakları.....	2
1.1.1. Bitkisel Kaynaklı Enzimler.....	3
1.1.2. Hayvansal Kaynaklı Enzimler.....	3
1.1.3. Mikrobiyal Kaynaklı Enzimler.....	4
1.2. Amilazlar.....	8
1.3. α -Amilaz enzimi.....	10
1.4. Sıcaklığa Dirençli α -Amilazlar.....	11
1.4.1. Sıcaklığa Dirençli α -amilaz Enziminin Endüstride Kullanım Alanları.....	13
1.4.1.1. Nişasta Endüstrisi.....	13

1.4.1.2. Deterjan Endüstrisi.....	13
1.4.1.3. Meyve Suyu Üretimi.....	14
1.4.1.4. Alkol Üretimi.....	14
1.4.1.5. Ekmek Yapımı.....	15
1.4.1.6. Tekstil Endüstrisi.....	15
1.4.1.7. Yem Sektörü ve Hayvan Besleme.....	16
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	18
3. MATERYAL ve METOT.....	28
3.1. Materyal.....	28
3.1.1. Bakteriler.....	28
3.1.2. Kimyasal ve Diğer Sarf Malzemeler.....	28
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Aletler.....	28
3.2. Metot.....	29
3.2.1. Bakterilerin İzolasyonu.....	29
3.2.2. Bakterilerin α -Amilaz Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	31
3.2.3. Bakterilerden Master ve Gliserol Stoklarının Hazırlanması.....	32
3.2.4. Bakterilerin Zamana Göre Kütle Artışlarının Belirlenmesi.....	33
3.2.5. Enzimatik Analizler.....	33
3.2.5.1. Enzimlerin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi.....	35
3.2.5.2. Enzimlerin Optimum Aktivite Gösterdiği pH	

Değerinin Belirlenmesi.....	35
3.2.5.3. Enzimlerin Termal (Sıcaklık) Kararlılıklarının Belirlenmesi.....	36
3.2.5.4. İzole Edilen <i>Bacillus sp.</i> Suşlarının Zamana Göre Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	36
3.2.6. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) ve Zimogram Analizleri.....	37
3.2.6.1. Bakterilere Ait Hücre dışı Protein Örneklerinin Hazırlanması.....	37
3.2.6.2. SDS-PAGE'nin Hazırlanması.....	37
3.2.6.3. Enzim Örneklerinin Jele Yüklenmesi ve Elektrofrezisi.....	38
3.2.6.4. SDS-PAGE Jelin Boyanması.....	39
3.2.6.5. Zimogram Analizi ile Enzimlerin Moleküler Ağırlıklarının Belirlenmesi.....	40
3.2.7. İzolatların Antibiyotiklere Karşı Dirençliliklerinin Belirlenmesi.....	40
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	42
4.1. BULGULAR.....	42
4.1.1. İzolatların Zamana Göre Oransal Gelişimi.....	43
4.1.2. İzolatların Antibiyogram Analizleri.....	43
4.1.3. Enzimatik Özellikler.....	44
4.1.3.1. Zamana Göre α -Amilaz Üretimi.....	44
4.1.3.2. α -Amilaz Enzimlerine Ait Optimum Sıcaklık Değerleri.....	45
4.1.3.3. α -Amilaz Enzimlerine Ait Optimum pH Değerleri.....	46

4.1.3.4. α -Amilaz Enzimlerinin Sıcaklığa Dirençliliklerinin Belirlenmesi.....	47
4.1.3.5. Enzimlere Ait Spesifik Aktivite Değerleri.....	48
4.1.4. SDS-PAGE ve Zimogram Analizleri.....	48
4.2. TARTIŞMA.....	49
5. SONUÇ.....	53
KAYNAKLAR.....	54
ÖZGEÇMİŞ.....	66

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Yıllara göre enzim sektörü gelişimi.....	1
Çizelge 1.2. Gıda sanayinde kullanılan enzimler ve uygulama alanları.....	7
Çizelge 1.3. Termostabil α -amilaz üreten bazı mikroorganizmaların doğadaki kaynakları.....	12

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Gram boyama yapılmış <i>Bacillus subtilis</i> bakterisi görseli.....	5
Şekil 1.2. Nişastanın amiloz ve amilopektin formlarının şematik modeli.....	8
Şekil 1.3. α -Amilaz enziminin şematik modeli.....	10
Şekil 3.1. Çalışmanın yürütüldüğü Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı'ndan bir görüntü.....	29
Şekil 3.2. Toprak örneklerinin toplandığı Hatay ili Erzin ilçesi sınırları içinde yer alan Burnaz Çayı'ndan bir görüntü.....	30
Şekil 3.3. Burnaz Çayı kıyı kesimlerinden toprak örneklerinin toplanması.....	30
Şekil 3.4. <i>Bacillus</i> sporlarının LB sıvı besiyerinde çimlendirilmesi	31
Şekil 3.5. Vejetatif <i>Bacillus</i> 'ların LB-agar plaklarına yayma yöntemiyle ekilmesi..	31
Şekil 3.6. LB-agar-nişasta besi ortamında gelişmiş izolatların iyot boyaması ile α -amilaz fenotipik testi.....	32
Şekil 3.7. α -Amilaz aktivitesi gösteren izolatlardan master (A) ve gliserol (B) stoklarının hazırlanması.....	33
Şekil 3.8. İzolatlara ait α -amilaz enzimlerinin DNS yöntemi ile enzimatik analizleri.....	35
Şekil 3.9. İzolatlara ait hücre dışı proteinlerin SDS-PAGE'ye yüklenmesi (A) ve elektroforezi (B).....	39
Şekil 3.10. İzolatların farklı antibiyotik diskleri ile antibiyogram analizleri.....	41
Şekil 4.1. <i>Bacillus sp.</i> CT-1 (A) ve CT-3 (B) izolatlarının Gram boyama sonucu mikroskopik görüntüleri.....	42
Şekil 4.2. <i>Bacillus sp.</i> CT-1, CT-2 ve CT-3 izolatlarının iyot boyaması sonucu α -amilaz aktivitelerinin plak görüntüleri.....	42
Şekil 4.3. <i>Bacillus sp.</i> CT1, CT2 ve CT3 izolatlarının zamana göre kütle artışı.....	43
Şekil 4.4. <i>Bacillus sp.</i> suşlarının antibiyotik emdirilmiş disklerle yapılan antibiyogram görüntüsü.....	44
Şekil 4.5. CT1, CT2 ve CT3 izolatlarının zamana göre α -amilaz üretimi.....	45
Şekil 4.6. İzolatlara ait α -amilaz enzimlerinin değişik sıcaklık koşullarındaki	

relatif aktivite değerleri	45
Şekil 4.7. İzolatlara ait α -amilaz enzimlerinin değişik pH koşullarında gösterdikleri relatif aktivite değerleri.....	46
Şekil 4.8. Enzimlerin farklı sıcaklık koşullarında gösterdikleri termal kararlılık grafiği.....	47
Şekil 4.9. Sıcaklığa göre enzim aktivitesi.....	48
Şekil 4.10. İzolatlara ait SDS-PAGE ve zimogram analizi görüntüsü.....	49

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mirometre
bç	Baz çifti
CMCaz	Karboksimetil selülaz
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNS	Dinitro salisilik asit
EDTA	Etilendiaminotetraasetik asit
gr	Gram
kbç	Kilobaz çifti
kDa	Kilodalton
L	Luria besiyeri
LB	Luria Bertani
M	Molar
mA	Miliamper
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mmol	Milimolar
Na-fosfat	Sodyum fosfat
nm	Nanometre
OD	Optikal densite
RNA	Ribonükleik asit
Rpm	Dakikada devir sayısı
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
sp.	Tür
TCA	Trikloro asetik asit
Tris	2-Amino-2-Hidroksimetilpropan-1,3-diol

U/mg	Ünite/miligram
U/ml	Ünite/mililitre
V	Volt
v/v	Hacim/hacim
w/v	Ağırlık/hacim
α	Alfa
β	Beta

1. GİRİŞ

Enzimler, hücrelerde biyokimyasal reaksiyonları katalize eden protein yapısında moleküllerdir. Hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere günlük ve ekonomik hayata girmiştir (Wiseman, 1987). Enzim terimi ilk kez 1878 yılında Kuhne tarafından kullanılmıştır. 1897 yılında ise Eduard Buchner hücrelerden fonksiyonel enzimleri ekstrakte etmiştir (Paulo ve Gubitz, 2003).

Günümüzde önemli bir endüstriyel ürün kaynağı olan enzimlerin, antik dönemden itibaren insanlar tarafından kullanıldığı bilinmektedir. O dönemde enzimlerin peynir, mayalı ekmek, bira, şarap, sirke gibi gıdaların üretimi, deri, çivit, keten işlemede kullanıldığı bilinmektedir (Kirk vd., 2002). Modern üretim teknikleri ile birlikte enzim endüstrisi ve enzim biyoteknolojisi önemli ilerlemeler kaydetmiş ve böylece enzimlerin daha saf, ucuz ve bol miktarda üretilmeleri olanaklı hale gelmiştir. Enzim üretiminin mali değeri dünya pazarında 1985 yılında 450 milyon dolar iken (Kıran ve Çömlekçioğlu, 2003), bu rakam 1995 yılında 1 milyar Dolar, 2000 yılında 1,5 milyar Dolar (Kirk vd., 2002), 2010 yılında ise 3.3 milyar Dolar seviyesine çıkmış, 2015 yılında ise 4 milyar Dolar'ın üzerine ulaşacağı tahmin edilmektedir (Pasin vd., 2014). Endüstriyel pazarda enzimlerin yıllara göre gelişen kullanım maliyetleri Çizelge 1.1'de gösterilmiştir;

Çizelge 1.1. Yıllara göre enzim sektörü gelişimi (milyon Dolar) (Hasan, vd., 2006).

Yıl	2002	2003	2004	2009
Endüstriyel Enzimler	978,20	1.009,20	1.040,00	1.222,00
Gıda Enzimleri	701,00	720,00	740,00	863,00
Hayvan Yemi Enzimleri	210,80	215,60	220,00	267,00
Toplam	1.890,00	1.945,00	2.000,00	2.352,00

Ticari olarak kullanılan enzimlerin %59'unu proteazlar, %28'ini karbohidrazlar, %3'ünü lipazlar ve %10'unu ise diğer enzim tipleri oluşturmaktadır. Karbohidraz gurubunda yer alan α -amilaz üretimi ise %13 ile önemli bir yere sahiptir (Wiseman, 1987). Diğer bir tespite göre; mikrobiyal enzimlerden alkali proteazlar %25, diğer proteazlar %21, amilazlar %18, yine bir proteaz olan rennin %10, tripsin %3, lipaz %3 ve diğer karbonhidrat parçalayan enzimlerin oranı ise %10 oranlarında kullanıldığı görülmektedir (Rao vd., 1998).

Global pazarda endüstriyel enzimlerin kullanım alanlarına göre dağılımları ise; %34'ü yiyecek ve hayvan yemi, %29'u deterjan ve temizlik, %11'i selüloz ve kağıt, %17'si ise tekstil, deri ve kürk uygulama alanlarında kullanıldıkları bildirilmiştir (Parameswaran vd., 2013). 1985 yılına kadar 2000'den fazla enzim tanımlanmasına karşın, 100 kadarı ticari kullanıma uygun görülmüş bunların ise 18 tanesinin endüstriyel amaçla üretimi gerçekleştirilmiştir (Zeman ve McCrea, 1985). Günümüzde ise 3000'den fazla enzim tanımlanmış, bunların 150-170 tanesinin ticari olarak kullanıldığı bilinmektedir (Parameswaran vd., 2013).

Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ortaya çıkan ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması gibi nedenlerden dolayı biyoteknolojinin, endüstriyel enzimler alanında yapılan araştırmaları daha fazla önem kazanmaktadır. Son yıllarda rekombinant DNA teknolojisinden yararlanılarak enzim üretimi büyük miktarlara ulaşmış, kullanımı giderek artan stratejik bir boyut kazanmıştır (Gessesse, 1998).

1.1. Enzimlerin Üretim Kaynakları

Enzim üretimi genellikle, fermentasyon teknikleri ile uygun küf, maya ve bakteri türleri kullanılarak gerçekleştirilmektedir (Adams ve Moss, 1995; Ray, 1996; Fadiloğlu ve Erkmen, 1999). Endüstride kullanılan enzimler genelde mikroorganizma kökenli olmasının yanı sıra bitkisel ve hayvansal kaynaklı da olabilmektedir (John, 1987).

1.1.1. Bitkisel Kaynaklı Enzimler

Biyoteknolojik enzimlerin bitkisel kaynaklardan elde edilenleri; güvenilirliği doğrulanmış, toksik olmayan ve yenilebilir bitkilerden elde edilebilmektedir (John, 1987).

Proteaz enzim sınıfından papain, bromelain ve ficin, soya fasulyesi lipoksigenazı ve tahıl amilolitik enzimleri, bitkisel kökenli enzim örnekleridir. Bitkisel kökenli enzimlerin kullanım durumu; toprak işleme etkinliği, gelişim döngüsü ve iklim gibi faktörlere bağlı olup, artan talebi karşılayıp karşılayamayacağını belirleyen faktörlerdir. Ayrıca ulusal ve uluslararası politik kuruluşların tarımsal yaklaşımları da bitkisel kökenli enzim ticaretinde önemli bir unsurdur (Godfrey ve West, 1996).

1.1.2. Hayvansal Kaynaklı Enzimler

Hayvansal kaynaklı enzimler, insan yiyecek ürünlerinin hazırlanmasında uzun zamandan beri kullanılmaktadır. Bu enzimler genelde tavuk yumurtasının beyazı, pankreas, domuz midesi, geviş getiren hayvanların karın bölgesi gibi yenilebilen organlardan izole edilmektedir (John, 1987).

Pankreatik lipaz, pankreatik proteaz, pepsinler, pregastrik esterazlar ve rennetler, hayvansal kökenli enzim kaynaklarıdır. Bu enzimlerin üretiminde, yetiştirilen hayvanları kontrol eden ulusal ve uluslararası politik yaklaşımlar ve tarımsal kuruluşların izledikleri politikalar önemli rol oynamaktadır. Yerli ticari hayvan ırklarının korunması, hayvansal dokuların bir ülkeden diğerine taşınması sırasında mevcut risklerin (viral hastalıklar v.b.) yayılımının engellenmesi sebebi ile hayvansal kökenli enzimlerin üretiminin kısıtlanması, mikrobiyal kaynaklı enzimlerin daha önemli hale gelmesine sebep olmuştur (Godfrey ve West, 1996).

1.1.3. Mikrobiyal Kaynaklı Enzimler ve *Bacillus* Cinsi

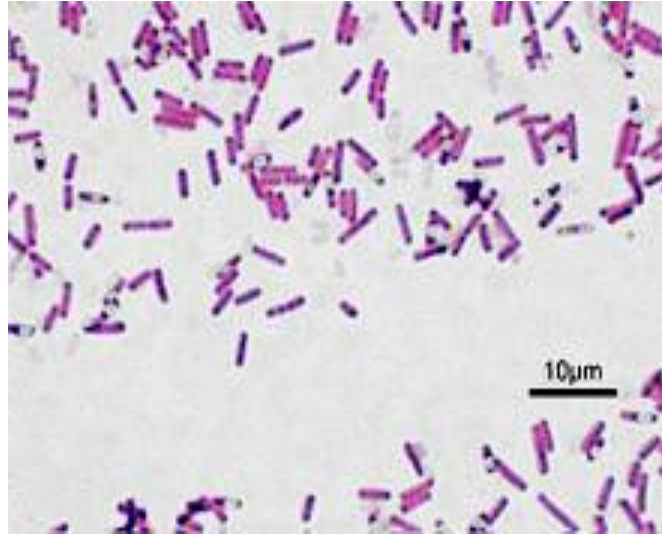
Endüstrinin birçok alanında kullanılan enzimler, genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Mikroorganizma kaynaklı enzimlerin, bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları ve fazla miktarda elde edilebilmeleri, endüstride kullanılmaları konusunda başlıca avantajlarıdır (Wiseman, 1987). Günümüzde pek çok mikroorganizmanın kontrolü ve çoğaltılmasına ait genetik-fizyolojik bilgi mevcut olup, istenilen birçok metabolik ürünler bu yollarla üretilmektedir (Okaför, 2007). Endüstride kullanılan birçok enzim mikrobiyal kökenli olduğu için, endüstriyel enzim seçiminde, mikroorganizma kökenli olanların önemi gün geçtikçe artmaktadır (Demain ve Solomon, 1981). Diğer taraftan enzim üretim kaynağı olarak genellikle mikroorganizmanın tercih edilmesi, üretimin artırılması için ise bunların modifiye edilmesini zorunlu hale getirmektedir. Enzim üretiminde *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger* ve *Aspergillus oryzae* gibi mikroorganizmalar en çok kullanılan enzim kaynaklarıdır (Glazer ve Nikaido, 1995).

Günümüzde ticari öneme sahip enzimler çoğunlukla hidrolazlar olup, mikrobiyal kökenlidir. Belirtilen enzimlerin birçoğu ekstraselüler olarak bulunmakta ve yüksek molekül ağırlığa sahip substratlarla birlikte görev yapmaktadırlar. Ekstraselüler enzimler, besiyeri ve hücre duvarının dışı ile bağlantı halinde olan enzimlerdir (John ve Sons, 1998; Madsen vd., 1973).

Normal ekolojik koşullar dışında yaşayan (çok yüksek veya düşük pH, yüksek tuz konsantrasyonu, volkanlardaki yüksek sıcaklık, kutuplardaki düşük sıcaklık vb) mikroorganizmalar, alkalifilik, asidofilik, halofilik, termofilik, psikrofilik bakteriler şeklinde sınıflandırılmıştır (Zeikus, 1979). Bu bakterilerden olan *Bacillus*'ların birçoğu kötü şartlara dirençli, genelde gram pozitif, spor oluşturan, çubuk şeklinde düz ya da düze yakın hücreler olup, beyaz ve krem renkli, bazı türlerde ise sarı, pembe, portakal renkli, siyah pigmentli koloniler de gözlenmektedir (Şekil 1.1). Vejetatif hücreler 0.5-1.2 µm ile 2.5-10 µm çapındadır. Aerobik ve fakültatif anaerob türleri olup, çoğunlukla oksijen terminal elektron alıcısıdırlar (Buchanan ve Gibbons,

1974). Endüstriyel proseslerde kullanılan enzimlerin büyük bir kısmı *Bacillus* suşları tarafından üretilmekte olup, takriben %75'i hidrolitiktir (Harwood, 1992).

Bacillus türleri toprakta bol miktarda yayılım gösterebilirler de denizlerden, tatlı sulardan ve bunların sedimentlerinden de elde edilebilirler. Üre içeren, yüksek pH değeri olan, asitli ve/veya yüksek sıcaklığa sahip ortamlardan izole edilebilen *Bacillus*'ların bazıları ekstrem koşullarda gelişebilir (Ediz ve Beyatlı, 2005). Termofilik, mezofilik ve psikrofilik türleri olan *Bacillus* cinsi bakterilerin genel üreme aktiviteleri 35-37°C ve pH 7 civarında olsa da bazıları çok yüksek sıcaklıkta bile canlılığını sürdürebilirler. Organik asit, şeker, alkol içeren (karbon kaynağı) ve amonyum bulunduran (nitrojen kaynağı) sentetik ortamlarda çok iyi gelişim göstermektedirler. *Bacillus*'ların endüstri alanında tercih edilmelerinin sebepleri; heterojen olmamaları, kolay kültüre alınabilmeleri, büyük bölümünün kemoototrof olduğu için besin isteklerinin az olmasıdır.



Şekil 1.1. Gram boyama yapılmış *Bacillus subtilis* bakterisi görseli (From Wikipedia, the free encyclopedia; http://en.wikipedia.org/wiki/File:Bacillus_subtilis_Gram.jpg).

Endüstriyel açıdan önemli kimyasal prosesler yüksek sıcaklık ve basınç altında gerçekleştiği için, bu tür ekstrem koşullara dayanıklı enzim arayışı sürmektedir. Günümüzde bu endüstriyel enzimler büyük oranda mezofilik mikroorganizmalardan sağlanmakta olup, görülen avantajlarına rağmen proseslerdeki ekstrem pH, sıcaklık

ve iyon konsantrasyonu gibi uygulamalara dayanıksız olmaları nedeniyle kullanımları sınırlıdır. Son yıllarda ekstremofil (ekstrem termofil) ve ekstreozim (ekstrem termofillerden elde edilen enzim) enzimlere olan ilgi, endüstrideki önemi ve yaygın olarak kullanımı; ekstrem koşullara daha dayanıklı olmaları nedeni ile daha da artmıştır (Fukara, 2007).

Termofilik mikroorganizmalar tarafından üretilen termostabil (sıcaklığa dirençli) enzimler, yüksek sıcaklıklarda stabil kalabilir, aktivitelerini gösterebilirler; yüksek sıcaklıklarda substratların çözünürlüğünün artması, yüksek reaksiyon miktarı, düşük vizkozite ve düşük kontaminasyon riski gibi faktörlerden kaynaklı olarak endüstriyel açıdan mezofilik homologlarına tercih edilmektedir (Hasan, vd., 2006).

Ekstremofillerden ekstreozimlerin üretimleri ile ilgili problemler, ekstrem termofil bakteri genlerinin, mezofilik hücrelere aktarılması ile aşılmaya çalışılmaktadır. Bu yöntemle, ekstremofillerde düşük düzeyde bulunan enzimlerin, mezofilik türdeki mikroorganizmalarda daha yüksek düzeylerde üretilmeleri hedeflenmektedir. Yeni ekstremofil mikroorganizmaların ve ekstrem termofil enzimlerin keşfi ve genetik yöntemleri ile biyokataliz ve biyotransformasyon reaksiyonlarında yeni fırsatlar yakalanacağı belirtilmiştir (Gomes ve Steiner, 2004). Sanayide kullanılan enzimler ve uygulama alanları Çizelge 1.2'de verilmiştir.

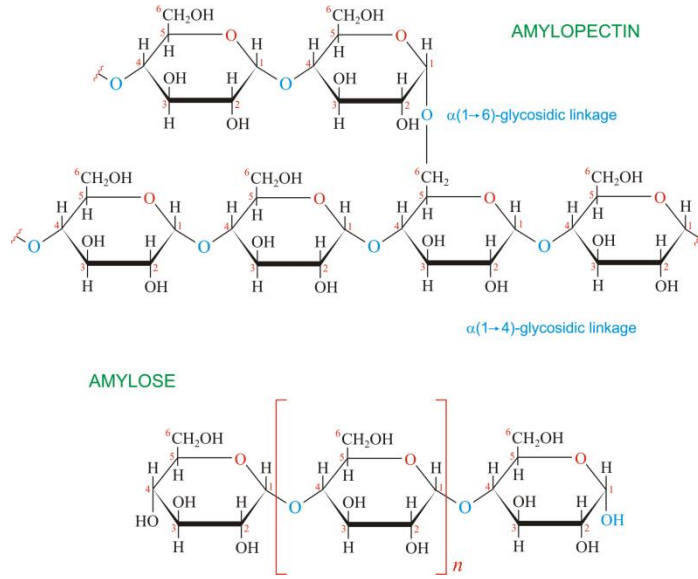
Çizelge 1.2. Gıda sanayinde kullanılan enzimler ve uygulama alanları (Fadıloğlu ve Erkmen, 2004).

Sanayii	Enzim	Uygulama Alanı
Unlu mamüller	Fungal α -amilaz	Genel iyileşme
	Fungal proteaz	Hamurun yumuşatılması
	Lipoksidaz	Ekmeğin beyazlatılması
Bira	Bakteri kaynaklı α -amilaz	Çimlendirilmemiş arpa kullanmak ve tahıl ilavelerinin sıvılaştırılması
	Bakteri kaynaklı proteaz	
	Fungal kaynaklı amiloglukosidaz	Arpa mayasından dekstranların ayrılarak biranın tatlandırılması
	Papain	Soğuktan kaynaklanan bulanıklığın önlenmesi
	β -Glukanaz	Arpa mayasının veya biranın viskozitesinin düşürülmesi
Şurup	Bakteri kaynaklı α -amilaz	Nişastanın yüksek sıcaklıkta çözündürülmesi
	Fungal amiloglukosidaz	Nişastanın tanımlanan şuruplara dönüşümü
	Invertaz	Sukrozun doğal şekere dönüştürülmesi
	Glukoz izomeraz	Glukozun doğal şekere dönüştürülmesi
Peynir	Rennin veya benzerleri	Sütün pıhtılaştırılması
	Penisilinaz	Sütte bulunabilecek antibiyotiklerin uzaklaştırılması
	Nisinaz	
	Katalaz	Süte eklenen hidrojen peroksidin uzaklaştırılması
Dondurma	Laktaz	Laktozun hidrolizi
Meyve	Pektinaz	Ürünlerde genel iyileştirme
Sebze	Selülaz	Yumuşatma, tat ve kokunun iyileştirilmesi
Yumurta	Glukoz oksidaz	Kurutma öncesinde glukozun uzaklaştırılması
	Lipaz	Yumurta akının köpürme özelliğinin arttırılması
Et	Papain	Yumuşatma ve olgunlaştırma

1.2. Amilazlar

Bitki hücresindeki karbonhidratların yapısında şeker, nişasta, pektin, hemiselüloz, selüloz ve lignin bulunur (Sniffen vd., 1992).

Nişasta, soğuk suda çözünmesi mümkün olmayan, bitki hücrelerinde depo materyali olarak önemli bir karbonhidrattır. Amiloz ve amilopektin nişastanın; α -D-glukoz birimlerinden oluşmuş iki molekülüdür (Şekil 1.2). Amiloz; α -1,4-glikozidik bağ yapısının glukoz taneleri arasında bağlanması ile oluşmuş, dallanma göstermeyen düz yapıdadır. Amilopektin ise ek olarak α -1,6-glikozidik dallanmış bağ noktalarını da içermektedir (Balkan, 2008).



Şekil 1.2. Nişastanın amiloz ve amilopektin formlarının şematik modeli.

Nişastanın enzimatik dönüşümü 3 aşamada gerçekleşmektedir. Bu aşamalar; çirşlenme (jelatinizasyon), sıvılaşıma (liquefaction) ve şekerlenme (sakarifikasyon) dir (Rakshit, 1998). Günümüzde nişasta moleküllerini, farklı ürünlere parçalayan birçok enzim bilinmektedir (Gupta vd., 2003). Amilaz enzimiyle karışık diğer enzimler hücre duvarını parçalarlar. Sıcaklığa dirençli amilaz enzimlerinin kullanılması ile diğer enzimlerin etkisi minimuma indirilir (Van Soest, 1994).

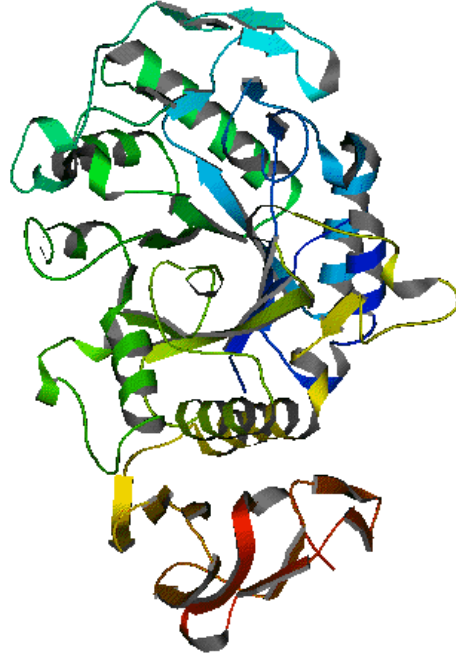
Amilazlar (1,4- α -D-glukanohidrolaz; EC 3.2.1.1.), nişastanın α -1,4 bağlarını hidrolize eden doğadaki bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar tarafından sentezlenen enzim grubudur. α -Amilazlar, amiloz, amilopektin ve glikojeni oluşturan glikoz birimleri arasında bulunan glikozidik bağları parçalayabilirler. Amilazlar ile nişastanın 24-48 saat gibi uzun bir parçalanma zamanına ihtiyaç duymasının nedeni, amilazların, parçalanmaya dirençli ham nişasta granülleri üzerinde iyi bir etkiye sahip olmamasıdır. Mikroorganizmalardan elde edilen; ham nişastayı hidrolize edebilen α -amilazların sıcaklık, pH, molekül ağırlık, termostabilite (sıcaklığa dayanıklılık) ve başka fizikokimyasal parametreleri, çeşitli farklılık ve benzerlikler gösterebilir (Balkan, 2008; Aygan, 2008).

Amilaz enzimleri, endoamilazlar ve ekzoamilazlar olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Endoamilazlar nişasta molekülünün içsel bölgelerden hidrolizini katalizleyerek farklı uzunluklarda düz ve dallanmış oligosakkaritlerin oluşmasını sağlarlar. Buna karşılık ekzoamilazlar nişasta molekülünü uçlardan hidrolize ederek daha kısa son ürünlerin oluşmasını katalize ederler (Yamagata ve Udaka, 1994; Bertoldo ve Antranikian, 2002; Haki ve Rakshit, 2003).

Nötrofilik özelliğe sahip amilaz enzimleri pH 5.0-7.5 aralığında aktivite gösterirken, deterjan sanayinde kullanılan amilaz enzimleri pH 8.0-11.0 aralığında aktivite göstermektedirler. Bu amilazlar alkalifik *Bacillus* türlerinden izole edilebilmektedirler. Amilaz enzimi biracılıkta ve damıtılmış içki üretiminde, tahıl ürünleri ve çikolata işleme teknolojisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Loffler, 1986). Ayrıca amilaz enzimi, nişastanın sıvılaştırılması, ekmek üretimi, glikoz ve fruktoz üretimi, nişastadan alkol üretimi, tekstil endüstrisinde nişasta kirliliğinin giderilmesi gibi alanlarda da yaygın şekilde kullanılmakta, kuru temizleme gibi özel teknoloji alanlarında da artan bir öneme sahip olmaktadır (Igarashi vd., 1998; Uhlig, 1998).

1.3. α -Amilaz Enzimi

α -Amilaz, endüstriyel açıdan önemli, bilinen en eski enzimlerden biridir (Syu ve Chen, 1997), (Şekil 1.3). Bu enzim ilk defa 1939 yılında *Bacillus subtilis* suşu kullanılarak Japonya’da üretilmiştir. *B. subtilis* ve *B. licheniformis* bakterileri α -amilaz enzimi üretimi için, 1970’li yıllarda geniş çapta kullanılmıştır. α -Amilaz enzimi, nişasta molekülündeki α -1,4 bağlarını parçalayarak glikoz, maltoz, maltotrioz ve α -limit dekstrinlerin oluşumunu sağlamaktadır. Glikoamilaz α -1,3, α -1,4 ve α -1,6 bağlarını kopararak glikoz molekülüne dönüştürmektedir. Mantarlar ve bakteriler tarafından üretilen α -amilaz, β -amilaz, glikoamilaz ve glikoizomeraz gibi enzimler nişastayı parçalama yeteneğine sahiptirler (Lee, 1996).



Şekil 1.3. α -Amilaz enziminin şematik modeli.

Fungal α -amilazların, unlu mamül ürünlerin endüstrisinde kullanımı yaygındır. α -Amilaz ve β -amilaz etkisinin prosesde ortaya çıkması sonucu glukoz ve maltoz, ekmek mayası (*Saccharomyces cerevisiae*) tarafından kullanılarak karbondioksit ve etanol açığa çıkar. *Aspergillus oryzae*'nin ürettiği α -amilaz enziminin ısıya duyarlılığı oldukça düşük olması sebebi ile pişirme sırasında inaktive olmaz.

Laboratuvar çalışmalarında, *Aspergillus oryzae*'nin kaynağı olduğu α -amilaz enzimi, gerek tek başına kullanıldığında, gerekse pentozanaz enzimi ile birlikte kullanıldığında kabarma hacminin oldukça arttığı görülmüştür (Krishnarau ve Hosoney, 1994).

Bakteriyel α -amilazların kendi arasındaki sekans benzerliğine bakarak *Bacillus licheniformis* (BLA) ve *Bacillus amyloliquefaciens* (BAA) arasında %80; *Bacillus stearothermophilus* (BStA) ile *Bacillus licheniformis* (BLA) arasında %65 benzerlik olduğu tespit edilmiştir (Nielsen vd., 2003). Yapısal benzerliklerine karşın bu enzimlerin termal dayanıklılıkları ve yarı ömürlerinin farklı olduğu da söylenebilir.

1.3.1. Sıcaklığa Dirençli α -Amilazlar

Termofilik bakterilerde hücre duvarlarının yapı taşı yağ asitleri hücrede hidrofobik bir çevre sağlayarak yüksek sıcaklığa karşı direnç kazandırmaktadır (Herbert ve Sharp, 1992). Bu bakteriler 50-80°C arasında gelişim göstermekte, sentezlenen enzimler ise 60-80°C optimum sıcaklık ile mezofilik ve hipertermofilik enzimler arasında sıcaklığa direnç göstermektedirler. Termofil ve hipertermofil kaynaklı enzimler, 40°C'nin altında etkin bir aktivite gösteremezler (Vieille ve Zeikus, 2001; Andrade vd., 1999).

Sıcaklığa dirençli, sarmal yapıdaki proteinlerin mezofilik olan benzerlerinden daha kararlı oldukları gözlemlenmiştir. Sıcaklığa dirençli proteinlerin yapısında, sıcaklığa en dayanıklı aminoasit olarak bilinen arjinin daha fazla bulunurken, sıcaklığa en hassas olduğu bilinen sistin bu proteinlerin yapısında oldukça seyrek halde bulunmaktadır. Yapılan deney çalışmalarında termofilik proteinlerin stabilizasyonunda, hidrofobik interaksiyonların önemli bir yeri olduğu ortaya konmuştur. Hidrofobik yapıda interaksiyonlar, sıcaklığa dirençli proteinlerle dimer oluşturarak termal hidrolize karşı dayanımı arttırmaktadır. Diğer taraftan sıcaklığa dirençli olan bu proteinler disülfid bağları, hidrojen bağları, aromatik interaksiyonlar, elektrostatik gibi etkilerle yüksek ısı koşullarında direnç göstermektedir (Kumar ve Nussinov, 2001).

Bakteri, mantar ve mayaların da içinde bulunduğu mikroorganizmalar, nişastayı hidroliz edebilen α -1,4 ve α -1,6 bağlarını kırabilen termofil α -amilaz enzimleri üretebilirler (Fujiwara, 2002).

Bazı termofilik α -amilaz üreten mikroorganizmaların yaşam alanları Çizelge 1.3’de gösterilmiştir.

Çizelge 1.3. Termostabil α -amilaz üreten bazı mikroorganizmaların doğadaki kaynakları (Haki ve Rakshit, 2003).

Kaynak	Mikroorganizma	Enzim
Sıcak su kaynağı	<i>Thermus</i> sp.	α -Amilaz
Sıcak su kaynağı	<i>Bacillus</i> sp. WN.11	α -Amilaz
Derin deniz hidrotermal kaynağı	<i>Staphilothermus marinus</i>	α -Amilaz
Sıcak su kaynaklarının sedimentleri	<i>Bacillus</i> sp. 3183	α -Amilaz

Üretilen termostabil α -amilaz enziminin kullanımı; yüksek sıcaklıklardaki proseslerde bakteri ve virüs kontaminasyonu riskini en aza indirmektedir (Fujiwara, 2002).

Sıcaklığa dirençli α -amilazlar başta bira ve nişastadan şeker üretimi (Leveque vd., 2000), tekstil endüstrisi (Hendriksen vd., 1999; Asgher vd., 2007), deterjan endüstrisi (Hewitt ve Solomons, 1996; Lin vd., 1998; Asgher vd., 2007), çiftlik hayvanlarında sindirimin iyileştirilmesi (Godfrey ve West, 1996; Nir vd., 1993; Canoğulları, 1999) olmak üzere birçok kullanım alanı bulmuştur.

1.4. Sıcaklığa Dirençli α -Amilaz Enziminin Endüstride Kullanım Alanları

1.4.1. Nişasta Endüstrisi

Nişastanın asitle hidrolize edilmesi sonucu tatlı bir madde eldesi ilk olarak 1811 tarihine dayanmakta olup, bu yöntemle 1831 yılında bir Amerikan şirketi 115 litre şurup üretimi yapmıştır (BeMiller ve Whistler, 2009). Günümüzde gıda sanayi için önemli bir ürün olan yüksek fruktozlu mısır şurubu genellikle mısır nişastasının enzimatik hidrolizi ile üretilmekte, bununla birlikte kimyasal tekniklerle üretim de devam etmektedir (Parker vd., 2010). Mısır nişastasından glikoz ve fruktoz üretimi için kullanılan glukoamilaz ve izomeraz enzimleri işlemin son aşamalarında kullanılırken, α -amilaz enzimi ise işlemin ilk anında uygun ortamda nişasta granüllerini hidroliz ederek dekstrin zincirlerine parçalaması için kullanılmaktadır (Poyrazoğlu, 2007).

1.4.2. Deterjan Endüstrisi

Deterjan endüstrisinde gereksinim duyulan, ekstrem koşullarda (alkali pH, yüksek sıcaklık, surfaktan madde varlığı) dayanıklılığını koruyan enzim ihtiyacı asırdır. Termostabil enzimler, denaturantları tolere edebildiği için aynı amaçla deterjan endüstrisinde kullanılmaktadır (Fujiwara, 2002).

Avrupada alkali α -amilazdan otomatik makine deterjanı ve ağır deterjan üretiminde yararlanılmaktadır. Bu deterjanlarda kullanılan α -amilazlarda optimum aktivite pH'sının 8.0-11.0 aralığında olması istenir. Sıvılaştırıcı α -amilazın önemli bir kısmı *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis*, *B. thermoamyloliquefaciense*'den elde edilmektedir (Lo vd., 2001).

Deterjanların uygulamalarında pH'sı yüksek alkali ve çevre okside olduğu için enzim surfaktanlara dirençli olmak zorundadır. Deterjana eklenen diğer unsurlar ise metal iyon kelatlayan ajanlar ve proteazlardır (Nielsen ve Borchert, 2000).

1.4.3. Meyve Suyu Üretimi

Endüstride meyve suyu üretiminde kullanılan meyvelerden henüz olgunlaşmamış olanları nişasta açısından oldukça yüksek içeriğe sahip olduklarından bulanıklığa neden olmaktadır. Bahsedilen sorunun çözümünde α -amilaz enzimi; armut, elma gibi meyvelerin sularını berrak hale getirme işleminde başarıyla kullanılmaktadır (Li vd., 2005).

Endüstriyel gıda üretimlerinde, α -amilaz enzimi ile hidrolize edilen kaynaklardan açığa çıkan son ürünler başarıyla kullanılmaktadır. Bu son ürünlerden olan 'dekstrinler', nişastanın glikoza kadar hidrolize olması sonucu oluşan ilk üründür. Çözünürlükleri yüksek olup, yoğun şurup kıvamındadır. Dekstrinler, çeşitli gıda ürünlerinde koyulaştırıcı ve kıvam verici olarak kullanılmaktadır (Keskin, 1982).

1.4.4. Alkol Üretimi

Önceki dönemlerde malt kullanılarak üretilen alkollü içecekler, son yıllarda enzim yardımı ile yapılan saflaştırma işlemiyle üretilmekte; az miktarda enzim kullanılarak depolama ve taşıma işlemleri kolay hale getirilerek hammadde maliyetleri %30'a kadar düşürülmektedir.

Nişasta kaynaklı alkollü içeceklerden viski için mısır, çavdar, arpa, buğday kullanılırken, yüksek alkollü diğer içeceklerin çoğunda tahıllar kullanılmaktadır. İçerik, nişasta kaynaklı bu hammaddeler uzun zincirli glikoz zincirler oluşturmakta, mayanın nişastayı alkole dönüştürebilmesi için bu zincirlerin enzim yardımı ile küçük moleküllere yıkımının gerçekleşmesi (sıvılaştırma (liquefaction) ve şekerlenme (saccharification)) gerekmektedir. Alkol üretiminde hammadde olarak kullanılan nişastalı ürünlerde, nişastayı belli bir süre parçaladıktan sonra ortama maya aşılanaarak, fermentasyon işlemine geçiş sırasında α -amilaz ve amiloglikosidaz enzimi yaygın olarak kullanılmaktadır (Wiseman, 1987). Bira üretilirken de hammaddesi olan arpadaki yoğun nişastanın parçalanması için α -amilaz enzimi

kullanılmakta, açığa çıkan ürün ise alkol fermentasyonunda mayalar tarafından kullanılan şeker olmaktadır (Wiseman, 1987).

1.4.5. Ekmek Yapımı

α -Amilaz enzimi hamur mayalanma süresini kısaltarak pişirme süresinde, dolayısıyla fazla ekmek üretiminde de etkili olmaktadır. α -Amilaz etkisi ile oluşan şeker, pişme sırasında karamelize olduğundan ekmeğin kolay renk almasını sağlar. Ayrıca oluşan bu şeker, maya tarafından tüketilerek açığa çıkan karbondioksit gazının fırın sıcaklığında genişleyerek ekmeğin hacimli, düzgün yapılı, kolay sindirilebilir, kaliteli bir gıda maddesi olmasını sağlar.

α -Amilaz enzimi ekmeğin bayatlama süresini arttırması ve raf ömrünü uzatması açısından da önemlidir. Ayrıca glikozdan üretilen fruktoz şurubu ekmek ve pasta yapımı sırasında da kullanılmaktadır (Şimşek, 2006).

1.4.6. Tekstil Endüstrisi

Tekstil sektöründe, dokuma sırasında eğilen ipliklerin hassasiyetini gidermek için sıcak nişasta kullanılmaktadır. Dokuma tezgahındaki bitirme operasyonu olan 'finishing process-sonlandırma' işleminde ve yine dokuma sırasında kaplamaları, yağlama sırasında kırılmaları önlemek için; kullanılan fazla miktarda nişasta, termostabil α -amilaz enzimi kullanılarak giderilir (Şimşek, 2006). Dokuma aşamasında iplerin sağlam olması ve kopmasının engellenmesi için yüksek nişastaya maruz bırakılan bu işlem 'haşılama' olarak adlandırılır. Kumaş dokunup hazırlandığı zaman fazla olan nişastayı uzaklaştırma işlemi, 'haşıl alma' olarak adlandırılır ve yüksek sıcaklıklarda gerçekleşen bu işlemler için α -amilaz enzimi kullanılır (Tarakçıoğlu, 1979). α -Amilazın yüksek sıcaklığa dayanıklı tipi olduğu gibi, düşük sıcaklığa dayanıklı çeşitleri de endüstride kullanılmaktadır. Örnek olarak enzim piyasasında yerini alan, ticari adı Optimize® olan amilaz enzimleri nişastanın parçalanmasına yardımcı olarak kumaşa haşıl sökme işleminde kullanılabilecek bir ürün olarak sunulmuştur. DuPont firmasının piyasaya sürdüğü bu ürün, geniş pH

aralığına sahip, soğuk bekletme (cold pad batch) ve çektirme (exhaust) yöntemleri için uygun olarak nitelenmiş; sıcak bekletme, jigger, kontinu ve buhar prosesleri için de kullanıldığı belirtilmiştir. Tekstil sektöründe kullanılan α -amilaz enzimleri surfaktanlarla karışık bulunabildiği gibi saf olarakda pazarlanabilmektedir. Dericilikte ise α -amilaz enzimleri derinin renklendirme ve koyulaştırma işlemlerinde kullanılmaktadır (Şimşek, 2006).

1.4.7. Yem Sektörü ve Hayvan Besleme

Hayvan yemlerine; besin değeri olmayan çözülebilir lifleri parçalamak ve hayvanların kendi mide enzimlerinin desteklenmesi amacı ile katılan enzimler; sindirim enzimleri desteklenmesinde, amilaz ve proteaz enzimlerinin; büyümenin erken evrelerinde enzimlerin pankreatik salgılanmasının sindirim ihtiyacını tamamen karşılamadığı bilindiğinden kullanılması önerilmektedir. Kümes hayvanlarında ise amilaz ve proteaz enzim üretiminin kuluçkadan çıkışta ilk 10 gün yüksek miktarda üretilmesine karşılık, bazı durumlarda eksik kalabildiği görülmektedir (Nir ve ark., 1993). Karşılaşılan bu sorunla mücadelede %0.1 düzeyinde α -amilaz enziminin yem katkısı olarak verilmesi ile kuru madde tüketimi/canlı ağırlık kazancı, but ve göğüs kısımlarında deri ve yağ oranları açısından daha kaliteli karkas elde edilmesi mümkün olmaktadır (Canoğulları, 1999).

Yem sektöründe, yemlerde kuru ısıtma işlemine (90°C'de 30 dakika) dayanıklı enzimlerin peletleme işlemi sırasında uygulanan sıcak buhar (85°C'de 15 dakika) varlığında aktivitelerini kaybetme tehlikesinin çözümü için, sıcaklığa dirençli α -amilaz, ksilanaz, β -glukanaz gibi enzimlerin yemlere katılmasının sağlanarak, enzimin ısıtma işleminden etkilenmeden, substrat üzerindeki kararlılığını koruma eğiliminin devam edeceği bildirilmiştir (Özcan, 2005).

Bu çalışmanın amacı, Erzincan sınırları içerisinde bulunan Burnaz Çayı kıyı kesimlerinden alınmış toprak numunelerinde bulunan *Bacillus* sp.'lerin izolasyonu, sıcaklığa dirençli α -amilaz üreten suşların belirlenmesi ve sıcaklığa dirençli α -amilaz enzimlerinin karakterizasyonunun yapılmasıdır.

Tezin kapsamı ise aşağıda maddeler halinde verilmiştir:

- 1- Hatay ili Erzin ilçesi sınırları içerisinde bulunan Burnaz ayı kıyı kesimlerinden toprak numunelerinin toplanması,
- 2- Toplanan rneklerin 80°C'de 10 dk. pastörize edilerek vejetatif hücrelerin ldrlmesi,
- 3-*Bacillus* sporlarının zengin besiyerinde imlendirilerek vejetatif forma dönüştürülmesi,
- 4- Kolonilerin nişasta içeren agar besiyerlerinde α -amilaz aktivitesi bakımından taranması,
- 5- α -Amilaz üreten bakterilerin antibiyotik diskleri ile antibiyogramlarının yapılması,
- 6- α -Amilaz enzimlerine ait bazı enzimatik özelliklerin (sıcaklık optimumu, pH optimumu, sıcaklık direnci) belirlenmesi,
- 7- Enzimlerin moleküler ağırlıklarının SDS-PAGE ve zymogram analizleri ile belirlenmesi,
- 8- Tezin yazılması ve sunumu.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Kneen ve Sandstedt (1946), bakteriyel kökenli α -amilazların diğer α -amilazlara göre daha büyük sıcaklık stabilitesine sahip olduklarını bildirmişlerdir.

Stark ve Tetrault (1951), 70°C sıcaklık ve pH 6.4 koşullarında izole ettikleri *Bacillus stearothermophilus* bakterisi tarafından üretilen α -amilaz enziminin inaktivasyon sıcaklığının 90°C olduğunu belirtmişlerdir.

Ediz ve Beyatlı (2005), *Bacillus* türlerinin ürettikleri proteinler nedeniyle ticari bir öneme sahip olduklarını, ürettikleri enzimlerden subtilisin, selüloz ve amilazların deterjan endüstrisinde, nötral proteazların süt endüstrisinde ve farklı amilazlar ile pullulanazların besin ve meyve suyu endüstrisinde kullandıklarını bildirmişlerdir.

Zemek vd. (1981), *Bacillus* cinsindeki polisakkarit hidroliz eden enzimler üzerine çalışmışlar, sonuç olarak 25 türün 118 suşunda polisakkarit halde hidroliz enzimleri ürettiklerini bildirmişlerdir.

Srivastava vd. (1984), termofil *Bacillus* sp. AK-2 suşundan pH ve sıcaklık optimumları sırasıyla 6.5 ve 68°C olan hücreiçi (intraselüler) sıcaklığa dirençli amilazları izole ederek DEAE-selüloz kolon kromatografi yöntemi ile saflaştırmışlardır. pH'nın 8.5'den 7.0'a çekilmesiyle enzimin birbirinden ayrılabilen üç parçasına (FI, FII, FIII) ait nişasta molekülünü hidrolize etme yeteneğinin azaltıldığını, bu üç parçaya ait elektroforetik deneylerin tek bir bant verdiğini, ortama 20 mM kalsiyum ilavesi ile üç parçanın da aktivitesinin arttığını, optimum sıcaklığın her üç parça için de 65°C, optimum pH'nın ise FI ve FIII için 6.0, FII için ise 6.5 olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar amilaz molekülündeki -SH grubunun enzim aktivitesi için gerekli olduğunu, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} ve Mn^{2+} iyonları dışında çalışılan diğer metal iyonlarının α - ve β -amilaz aktivitelerini inhibe ettiğini, EDTA'nın farklı dozlarına bağlı inhibisyon gösterdiğini de bildirmişlerdir. Son olarak araştırmacılar FI ve FIII'ün α -amilaz, FII'nin ise β -amilaz tip bir enzim olduğunu da belirtmişlerdir.

Thudt vd. (1985), *B. stearothermophilus*'a ait sıcaklığa dirençli α -amilaz genini (*amy*) taşıyan pCA43 plazmid DNA'sını *Staphylococcus carnosus*'a aktarmışlar, *amy* geninin, hibrit plazmid pamy7'nin 5.4 kbç büyüklüğündeki DNA parçasına lokalize olduğunu ortaya koymuşlardır. Ayrıca diğer *Staphylococcal* türlerine de pamy7 plazmid DNA'sını transforme ettiklerinde, bu türlerin süpernatantlarındaki (hücre dışı sıvı) α -amilazın aktivitesinin %80'den fazla olduğunu, aktivitesi en yüksek suşun ise *Staphylococcus aureus* olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar son olarak α -amilaz enzimi üzerinde yaptıkları çalışmalarda moleküler ağırlığını 58.000 dalton, optimum pH ve sıcaklık değerlerinin ise sırasıyla 5.3-6.3 ve 65°C olduğunu belirtmişlerdir.

Nakajima vd. (1985), *B. stearothermophilus* bakterisinin ürettiği α -amilaz genine ait DNA baz dizilerini tanımlayıp, genin 1647 bç ve 549 amino asitten oluştuğunu göstermişlerdir. Araştırmacılar NH₂-terminal amino asit dizisini analiz edip, ekstraselüler amilazın 515 amino asit içerdiğini ve moleküler ağırlığının 58.779 dalton olduğunu, sıcaklığa dirençli α -amilaz geninin *B. amyloliquefaciens*'e ait sıcaklığa dirençli α -amilaz geni ile %61 benzerlik gösterdiğini belirtmişlerdir.

Mielenz ve Mickel (1985), pBR322, pBR325 ve pWL625 vektörlerini kullanarak *B. stearothermophilus* ATCC 31783'e ait sıcaklığa dirençli α -amilaz genini taşıyan DNA parçasını *E. coli*'de, pC194 vektörü yardımı ile de *B. subtilis*'te klonlamışlardır. Araştırmacılar bu çalışma ile elde ettikleri rekombinant *E. coli* ve *B. subtilis* bakterilerine patent de almışlardır.

Srivastava (1987), bir *B. stearothermophilus* suşu tarafından üretilen sıcaklığa dirençli α -amilaz enzimini 4 aşamalı bir işlemle sonra saflaştırmış, saflaştırdığı α -amilaz enziminin 80°C sıcaklıkta ve pH 6.9'da maksimum aktivite gösterdiğini, yine amilaz aktivitesi için Fe³⁺, Cd²⁺, Pb²⁺, Hg²⁺, Ni²⁺ ve Ag¹⁺'nin güçlü inhibitör, Zn²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺ ve Al³⁺'un ılımlı inhibitör, Ca²⁺, Ba²⁺, Sr²⁺ ve K⁺'nin ise stimülatör (Ca²⁺>Ba²⁺>Sr²⁺>K⁺) elementler olduğunu belirtmiştir. Araştırmacı, incelediği ayrılabilir iki enzim fraksiyonunu NaCl gradient elusyon yardımıyla DEAE-selüloz-kolumda ayırtmış, enzim analizleri sonucu fraksiyon I'in α -amilaz, fraksiyon

II'nin ise β -amilaz aktivitesi gösterdiğini belirtmiştir. Her iki enzimi de poliakrilamid jelde incelemiş ve α -amilazın moleküler ağırlığını 48.000 dalton, β -amilaz'ın moleküler ağırlığını ise 57.000 dalton olarak hesaplamıştır.

Lin ve Tsay (1987), kendi çalışma sonuçları ile önceden izole edilmiş olan *B. stearothermophilus* Q8 suşuna ait sıcaklığa dirençli α -amilaz enzimini saflaştırmış, genin optimum eksprese sıcaklığının 90°C olduğunu, 100°C'de enzimin aktivitesinin %81'ini koruduğunu belirlemişlerdir. Enzimin pH 9.0, 8.0 ve 10.0'da sırasıyla %100, %98 ve %41 aktivite gösterdiklerini de belirtmişlerdir. Araştırmacılar, 10 mM Ca^{2+} varlığında enzimin 100°C'de 15 dakika inkübasyonu sonucu aktivitesinin %67'sini muhafaza ettiğini, substrat içermeyen fakat Ca^{2+} içeren ortamda enzimin 90°C'de 2 saat inkübasyonu sonucunda aktivitesinin ancak %10'unu koruduğunu bildirmişlerdir. 0.1 ve 1 mM konsantrasyonlarındaki Na^+ ve 0.1 mM konsantrasyonundaki Mn^{2+} katyonları ile 10 mM konsantrasyonlardaki OH, Cl, I, HCO_3 , NO_2 ve N_3 anyonlarının teşvik edici (stimülatör) etki gösterdiğini, ortama üre ve KMnO_4 ilavesinin enzim aktivitesinde düşmeye sebep olduğunu, düşük konsantrasyonlarda SDS ve Tween 80 ilavesi durumunda enzim aktivitesinin korunduğunu göstermişlerdir. Galaktoz ve maltoz inhibitör etki göstermezken, fruktoz, mannoz, ksiloz ve laktozun enzim aktivitesi üzerinde hafif inhibitör etki gösterdiğini, ayrıca enzimin, polisakkaritleri oransal olarak hidrolize etme sırasının amiloz>çözünür nişasta=mısır nişastası>glikojen şeklinde olduğunu da belirtmişlerdir.

Satoh vd. (1988), daha önce *B. stearothermophilus* DY-5 suşundan klonlanmış sıcaklığa dirençli α -amilaz geninin, bazı *B. stearothermophilus* suşlarına ait sıcaklığa dirençli α -amilaz genleriyle aralarındaki yapısal benzerliklerini karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar α -amilaz geninin DY-5 suşuna ait α -amilaz geni ile ve "suş 799" olarak nitelenen bir grup *B. stearothermophilus* suşuna ait α -amilaz genleri ile benzer olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca 5S rRNA ve ribozomal proteinlerin eletroforetik örneklerine bakarak DY-5 suşu ile DSM2334 suşlarının birbirleriyle

benzer özellikte olduğunu, buna karşılık 799 nolu suşun ise bunlardan daha farklı özellikte olduğunu göstermişlerdir.

Oriel ve Schwacha (1988), *B. stearothermophilus*'a ait sıcaklığa dirençli α -amilaz genini *E. coli*'de klonlamışlardır. Araştırmacılar elde ettikleri rekombinant enzimin gen verici *Bacillus* tarafından üretilmiş olan enzim ile aynı biyokimyasal özellikte olduğunu, moleküler ağırlığının 57.000 dalton olduğunu, Ca^{+2} iyonu varlığında 90°C sıcaklığa dirençli olduğunu, L besiyerinde ekstraselüler enzim üretiminin çok az olduğunu, gliserol veya nişasta içeren minimal besiyerinde organizma gelişiminin baskı altında kaldığını, fakat gliserol ve nişasta içeren besiyerinde α -amilaz üretimi artmış doğal mutantları izole ettiklerini de bildirmişlerdir.

Scheirlinck vd. (1989), *B. stearothermophilus*'a ait sıcaklığa dirençli α -amilaz geni ile *Clostridium thermocellum*'a ait endoglukanaz genlerini, ticari *Lactobacillus plantarum* suşuna transforme etmişlerdir. Transformasyon işleminde elektroporasyon tekniğini kullanan araştırmacılar, rekombinant suşların belirtilen iki enzimi de ürettiklerini belirlemiş fakat plazmid DNA üzerinde bulunan genlerin sınırlı miktarda enzim ürettikleri için her iki geni de *L. plantarum*'un kromozomuna rekombinasyon yöntemi ile entegre ettiklerini, elde ettikleri rekombinant suşların selülitik silaj kültürü olarak da kullanılabileceğini de bildirmişlerdir.

Pechàň vd. (1989), *B. amyloliquefaciens* α -amilazı ile benzer özellikler gösteren α -amilaz genlerini taşıyan *B. subtilis* suşlarını (pBDA318, pUBA10, pUBA11 ve pUBA20 plazmidlerini taşıyan) plazmid ve α -amilaz genlerinin varlığı bakımından taramışlardır. Belirtilen 4 adet plazmidi taşıyan *B. subtilis* suşlarını antibiyotik seleksiyonuna tabi tutmadan 50 generasyon boyunca kültüre almışlar, yapılan çalışma sonunda pUBA11 plazmidinin endüstriyel enzim üretimi için uygun olduğunu, diğer suşların ise yapı olarak ve enzim salgılama yetenekleri yönünden aynı uygunluğu göstermediklerini bildirmişlerdir.

Sharp vd. (1989), termostabil α -amilaz enziminin şeker endüstrisinde, mayalanma ve nişastanın parçalanmasında, farklı ticari proseslerde de uygulama alanı bulabileceğini bildirmişlerdir.

Jørgensen vd. (1990), yeni ve güvenilir bir DNA füzyon metodunu yayınlamışlardır. *B. licheniformis* α -amilaz geninin nükleotid dizileri ile *B. stearothermophilus* α -amilaz geninin nükleotid dizileri arasında tam bir füzyonu sağladıklarını bildirdikleri araştırmalarında, bu metodu daha önce *B. stearothermophilus*'dan klonlanmış α -amilaz geninin *B. subtilis*'te üretim verimliliğini artırmak için kullandıklarını açıklamışlardır. Sonuç olarak *B. subtilis*'te her iki enzim aktivitesini de gösteren, doğru olarak çalıştığını belirledikleri hibrid translasyonel proteini elde ettiklerini belirtmişlerdir.

Jin vd. (1990), termostabil halde α -amilaz üreten bazı termofil türde aerob bakterileri, geleneksel Chinese koji'den izole etmiş, bu bakterilerin Çin'de geleneksel sake içkilerinin mayalanmasında kullanarak α -amilaz üretimini incelemişlerdir.

Cocconcelli vd. (1991), *B. stearothermophilus*'a ait α -amilaz genini (sıcaklığa dirençli) taşıyan rekombinant pPSC22 plazmid DNA'sını, farklı *Lactobacillus* suşlarına entegre ederek, sıcaklığa dirençli α -amilaz enziminin üretimini gerçekleştirdiklerini belirtmişlerdir.

Diderichsen vd. (1991), *B. stearothermophilus*'a ait sıcaklığa dirençli α -amilaz genini (*AmyS*), yeni geliştirilmiş olan rekombinasyonla gen füzyonu isimli yöntemle (in vivo ortamda) *B. subtilis*'e klonlamışlardır. Araştırmacılar *AmyS* geninin *B. subtilis*'te ekspresyonunu (protein üretimi) artırmayı amaçladıklarını fakat *B. licheniformis*'de *AmyS* genini klonlayarak daha iyi ürünler elde ettiklerini belirtmişlerdir.

Wind vd. (1994), bir patates işleme endüstrisinden yüksek derecede sıcaklığa dirençli α -amilaz üreten yeni bir *B. stearothermophilus* suşunu izole etmişlerdir. Yarı ömrü 80°C'de 5.1 saat, 90°C'de 2.4 saat olan bu enzimin optimum çalışma sıcaklığının 70°C, optimum pH'sının ise 5.5-6.0 olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar bakterinin büyüme oranı ile enzim üretimi arasında ters bir ilişki bulduklarını, enzimin düşük sıcaklıklarda ve düşük nişasta konsantrasyonu olan durumlarda bakteri tarafından daha iyi üretildiğini, bakterinin en iyi 65°C'de üreme göstermesine karşılık (3.9 U/ml) enziminin en iyi 40°C'de sentezlendiğini (143 U/ml) bildirmişlerdir.

Takasaki vd. (1994), amilazların önemli kullanım alanlarından bir diğerinin de çeşitli nişasta şekerleri üretilirken nişastanın sıvılaştırılması olduğunu belirtmişlerdir.

Lee vd. (1994), sıcaklığa dirençli ve alkalifilik *Bacillus* sp. XAL601 suşunu topraktan izole edip bu suşun sıcaklığa dirençli, alkalik-kararlı α -amilaz ve pullulanaz aktivitesine sahip bir enzim ürettiklerini bildirmişlerdir. Genin C-terminal bölgesinde Gly-Ser-Gly-Thr-Thr-Pro amino asit dizilişinin 12 kez tekrar ettiğini belirttikleri araştırmalarında, bu suşa ait α -amilaz-pullulanaz genini (*aapT*) klonlayarak, genin 6.096 bazdan meydana geldiğini ve 224.992 dalton moleküler ağırlığında 2.032 amino asit içeren bir enzimi şifrelediğini göstermişlerdir. Ayrıca enzim aktivitesi için optimum sıcaklık 70°C, pH değerinin 9.0 olduğunu ve enzimin 60-70°C sıcaklıkta ve pH 8.0-9.0'da ham nişastayı parçaladığını ortaya koyan araştırmacılar, *aapT* genini *E. coli*'de sub-klonladıklarını ve genin *lac* promotorunun kontrolü altında çalıştığını da belirtmişlerdir.

Özcan (1996), kendine ait α -amilaz geni mutasyonla köreltilmiş *B. subtilis* suşuna, *B. stearothermophilus*'a ait sıcaklığa dirençli α -amilaz genini protoplast füzyonu yöntemi ile aktarmıştır. Araştırmacı elde edilen fuzant suşun *B. subtilis*'in gelişme sıcaklığı olan 37°C'de geliştiğini fakat sıcaklığa dirençli α -amilaz enziminin bu sıcaklıkta ortamda inaktif olarak kaldığını, enzimin aktif hale gelerek nişastayı

parçaladığı sıcaklığın, *B. stearothermophilus*'un gelişme sıcaklığı olan 55°C olduğunun tespit edildiğini belirtmiştir.

Daniel vd. (1996), *P. wosei* amilazının yarılanma ömrünü 100°C de 6 saat, *P. furiosus* amilazının ise 120°C de 2 saat olarak tespit ettiklerini belirtmişlerdir.

Sidhu vd. (1997), topraktan izole ettikleri amilolitik ve sıcaklığa dirençli olan *Bacillus* sp. MK716 bakterisine ait 100°C'de dahi aktivitesini muhafaza edebilen ekstrem termofil bir α -amilaz genini etil metan sülfonat ile muamele ederek mutasyona uğratmışlardır. Bu şekilde enzim üretiminin 40 kat arttığını belirten araştırmacılar, mutasyona uğramış olan sıcaklığa dirençli bu α -amilaz genini pBR322 plazmid DNA'sı ile *E. coli*'de klonlayarak 4.8 kbç'lik genin baz dizilerini okumuşlar, son olarak genin kendisini de içeren 2.0 kbç'lik fragmenti *B. subtilis*'te klonlayarak enzim üretimini 107 kat daha artırdıklarını bildirmişlerdir.

Lin vd. (1998), *Bacillus* sp. TS-23 suşunda SDS-PAGE ile amilaz aktivitesi gösteren ve molekül ağırlıkları 150-45 kDa olan iki amilaz bandı bulduklarını bildirmişlerdir. Yine araştırmacılar, enzim sentezinin 42-60°C sıcaklıkta, optimum 55°C'de oluştuğunu, *Bacillus* sp. TS-23 suşunun 55°C'de ürediğini tespit etmişlerdir. Yaptıkları araştırmalar ışığında amilaz üretimi ve bakteri üremesi için optimum sıcaklığın aynı olduğunu tespit etmişlerdir.

Tanaka ve Hoshino (1999), deterjanlarda kullanılan ve kirliliklerin uzaklaştırılmasına yardımcı olan α -amilazların substrat özgüllükleri üzerine çalışma yapmışlardır.

Ali vd. (1999), Tunus'daki bir sıcak su kaynağına ait topraktan *Bacillus* sp. US100 suşunu izole etmişler, bu suş tarafından salgılanan termoaktif türde amilazın optimum aktivite sıcaklığının 82°C olduğunu, enzimin 110°C'de ve %20 (w/v)'lik substrat varlığında, yarılanma ömrünün 40 dakika olduğunu belirtmişlerdir. α -Amilaz aktivitesi gösteren 3 kbç'lik DNA fragmentini pUT57 vektörü ile *E. coli*'de

klonladıklarını, enzimin nişastayı parçalaması sonucu açığa çıkan son ürünün maltohekzaoz ve maltopentaoz olduğunu da bildirmişlerdir.

Beaujean vd. (2000), patatesten direk olarak ilk defa çift fonksiyonlu bir gen ile glukoz ve fruktozu elde ettiklerini belirterek *B. stearothermophilus*'a ait sıcaklığa dirençli α -amilaz geni ile *Thermus thermophilus*'a ait sıcaklığa dirençli glukoz izomeraz genlerini füzyona soktuklarını, bifonksiyonel bir gen elde ederek, bu enzimatik kompleksin 65°C'de aktivite gösterdiğini de belirtmişlerdir.

Chakraborty vd. (2000), topraktan izole ettikleri *B. stearothermophilus* suşuna ait sıcaklığa dirençli α -amilaz enzimini saflaştırmışlardır. Enzimin moleküler ağırlığını SDS-PAGE ile 64 kDa olarak belirlemişlerdir. Yapılan çalışmada enzimin çok geniş pH aralığında çalıştığını, maksimum aktivitesini pH 7.0'da gösterdiğini, 100°C'nin üzerinde bozulmaya başladığını ve 100°C'de %90 oranda katalitik aktivitesini koruduğunu, 50°C'de ise en iyi optimum aktivitesini gösterdiğini bildirmişlerdir.

Duedahl-Olesen vd. (2000), *Bacillus clausii*'den moleküler ağırlığı 101kDa olan, ayrıca nişastadan maltoheksoz oluşturabilen amilaz izolasyon ve karakterizasyonunu yapmışlardır. Araştırmacılar enzimin optimum 9.5 pH'da ve 55°C'de aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Ali vd. (2001), *B. stearothermophilus* US100'e ait maltohekzaoz formundaki α -amilaz enziminin 549 amino asitten meydana geldiğini, moleküler ağırlığının 59 kDa olduğunu ve diğer *B. stearothermophilus* α -amilazları ile büyük bir benzerlik gösterdiğini, bu benzerliğin özellikle DY-5 ve DN1792 suşlarına ait α -amilaz ile en yüksek düzeye çıktığını belirtmişlerdir.

Zhang vd. (2004), yaptıkları çalışmada alkali *Bacillus* suşundan amilaz ve selülaz enzimi üretimi olduğunu bildirmişlerdir.

Najafi vd. (2005), ekstraselüler α -amilaz üreticisi *Bacillus subtilis*'in enzim optimumununun pH 6.0 ve 55°C'de olup, maksimum enzim üretiminin 37°C'de gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar EDTA'nın etkisi ile enzimin inhibe olmaması, bu enzimin metallo enzim olmadığına kanıtı olabileceğini de belirtmişlerdir.

Aygan (2008), haloalkalofil *Bacillus* sp. izolasyonu ile amilaz, selüloz ve ksilenaz enzim üretimlerini ve karakterizasyonlarını yaptığı çalışmalarda amilaz optimum aktivitesini 150°C sıcaklıkta ve pH 10.5'de, selüloz enziminin 50°C sıcaklıkta ve pH 11.0 de, ksilenaz enziminin ise 40°C sıcaklıkta ve pH 6.0'da gerçekleştirdiğini tespit etmiştir.

Negi ve Banerjee (2009), *Aspergillus awamori*'den amilaz ve proteaz enzimlerini izole etmişler, iki enziminde de stabilitelelerinin, geniş bir pH (3.0-9.0) ve sıcaklık aralığında (25-70°C) gerçekleştiğini ortaya koymuşlardır.

Janecek (2009), bitkisel ve arkea kökenli α -amilazların evrimsel olarak yakın (akraba) olmalarına rağmen her birinin kendi aralarında spesifik olarak farklılığa sahip olduklarını belirtmiştir.

Coşkun (2010), alkalifilik Van Gölü, halofilik Tuz Gölü ve Adana'da yerelması yetiştiriciliği yapılan topraklardan α -amilaz, ksilenaz ve CMCaz üreten alkalifilik, halofilik ve termofilik *Bacillus* sp. suşlarının izolasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirmiştir. Alkalifilik *Bacillus* sp. VA-24 suşu tarafından üretilen α -amilaz enziminin moleküler ağırlığı yaklaşık 120 kDa, sıcaklık ve pH optimumu sırasıyla 90°C ve 11.0 olarak belirtilmiştir. Araştırmacı enzimin 100°C'de aktivitesinin tamamını koruduğunu da belirtmiştir.

Bano vd. (2011), *Bacillus subtilis* KIBGE HAS suşundan izole ettikleri α -amilaz enziminin moleküler ağırlığını belirlemek için SDS-PAGE analizi yapmışlar, moleküler ağırlığının 56.000 Da olduğunu ve optimum aktivitesini pH 7.5'ta ve 50°C'de gerçekleştirdiğini belirtmişlerdir.

Özdemir ve Sıdal (2013), endüstriyel bir enzim olan α -amilaz enziminin çeşitli mikroorganizmalardan elde edildiğini, endüstride kullanılan en önemli materyallerden biri olan nişastayı hidroliz edebildiğini belirtmişlerdir. Bir amilaz üreticisi olan *Streptomyces* MC10 suşunu Manisa Celal Bayar Üniversitesi'nden alınan toprak örneklerinden izole ederek karakterizasyonunu gerçekleştirmişler, optimum fermentasyon şartlarında enzimin üretim süresinin 4 gün, substrat konsantrasyonunun %1, pH optimumunun 7.5 ve optimum üretim sıcaklığının ise 28°C olduğunu bildirmişlerdir.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Bakteriler

Çalışmada kullanılan *Bacillus* sp. CT-1, CT-2 ve CT-3 bakterileri, Hatay ili Erzin ilçesi sınırları içerisinde bulunan Burnaz Çayı kıyı kesimlerinden alınan toprak numunelerinden izole edilmiştir.

3.1.2. Kimyasal ve Diğer Sarf Malzemeler

Çalışmada kullanılan kimyasal ve diğer sarf malzemeler aksi belirtilmedikçe Merc, Sigma, Ambresco'dan kimyasal malzeme satan firmalar aracılığı ile temin edilmiştir.

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Aletler

Çalışmada kullanılan aletlerden santrifüj (Hettich), otoklav (Hirayama), inkübatörler (Nüve ve Memmert), su banyosu (Memmert), spektrofotometre (Pharmacia), hassas terazi (Denver), vorteks ve manyetik karıştırıcı (Ika), steril kabin (Nuair), çalkalayıcı (Ika), pH metre (Hanna), protein jel elektroforez takımı ve güç kaynağı (Atto), otomatik pipetler (Brand ve Axygen), no-frost buzdolabı (Arçelik), çalışmanın yürütüldüğü Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı'nda mevcut bulunmaktadır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Çalışmanın yürütüldüğü Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı'ndan bir görüntü

3.2. Metot

3.2.1. Bakterilerin İzolasyonu

Bakteri izolasyonu için gerekli toprak numuneleri Türkiye'nin Hatay ili Erzin ilçesi sınırları içerisinde bulunan Burnaz Çayı kıyı kesimlerinden (Şekil 3.2) daha önce steril edilmiş numune kaplarına alınmış (Şekil 3.3) ve kapların ağzı kapalı bir şekilde laboratuvara taşınmıştır. Laboratuvara getirilen toprak örnekleri önce steril saf su ile sulandırılarak iyice karıştırılmış, tortunun çökmesi için yarım saat beklendikten sonra üstteki sıvı kısımdan 1 ml numune alınmıştır. Alınan sıvı numune 85°C'de 15 dakika inkübe edilerek vejetatif bakterilerin ölmesi sağlanmıştır. Daha sonra numune, termofilik *Bacillus* sporlarının çimlenmesi için 25 ml hacimli LB besiyerine (%10 w/v tripton, %5 w/v maya özütü, %10 w/v NaCl, pH 7.5) aktarılarak 55°C'de çalkalama yöntemiyle 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.4). Ertesi gün, içerisinde bakteriler üremiş olan kültür sıvısından seri sulandırmalar yapılmış ve 10^{-4} - 10^{-6} oranlarında sulandırılmış olan numunelerden LB-agar (%15 w/v agar) plaklarına cam çubukla yayma yöntemiyle ekimleri yapılmıştır (Şekil 3.5). Plaklar bakterilerin koloni oluşturmaları için ters çevrilerek tekrar 55°C'ye ayarlanmış inkübatöre konmuş ve gece boyunca üremeye bırakılmıştır. Ertesi gün besiyerinde

gelişen koloniler steril kürdan yardımıyla tek tek toplanarak numaralandırılmış yeni LB-agar plaklarına alınmış ve tekrar 55°C’de bir gece inkübasyondan sonra ileri araştırmalar için parafilm ile sarılarak +4°C’ye kaldırılmıştır.



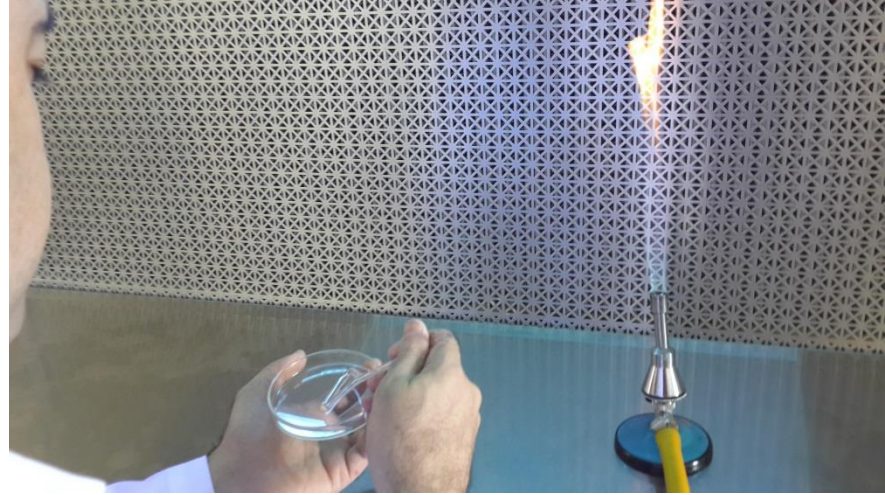
Şekil 3.2. Toprak örneklerinin toplandığı Hatay ili Erzin ilçesi sınırları içinde yer alan Burnaz Çayı’ndan bir görüntü



Şekil 3.3. Burnaz Çayı kıyı kesimlerinden toprak örneklerinin toplanması



Şekil 3.4. *Bacillus* sporlarının LB sıvı besiyerinde çimlendirilmesi



Şekil 3.5. Vejetatif *Bacillus*'ların LB-agar plaklarına yayma yöntemiyle ekilmesi

3.2.2. Bakterilerin α -Amilaz Aktivitelerinin Belirlenmesi

İzolatlar tek tek steril kürdanlarla %0.5 w/v nişasta içeren LB-agar plaklarına aktararak 55°C'de inkübasyona bırakılmışlardır. Ertesi gün koloni gelişimi tamamlandıktan sonra plakların kapağına iyot kristalleri ezilmiş ve plaklar ters çevrilerek besiyerlerinin iyot buharı ile boyanması sağlanmıştır (Şekil 3.6). Maviye boyanan zeminde etrafında beyazımtırak zon oluşturan koloniler α -amilaz pozitif bakteriler olarak belirlenmiştir.

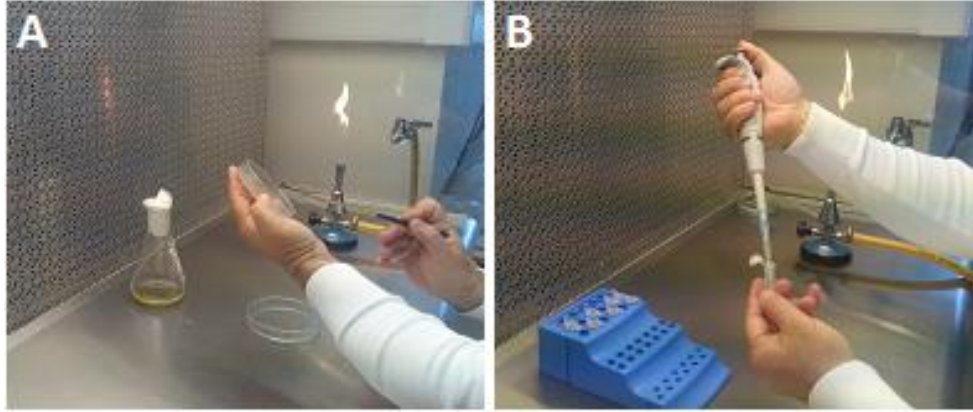


Şekil 3.6. LB-agar-nişasta besi ortamında gelişmiş izolatların iyot boyaması ile α -amilaz fenotipik testi

3.2.3. Bakterilerden Master ve Gliserol Stoklarının Hazırlanması

α -Amilaz aktivitesi gösterdiği belirlenen bakterilerden günlük kullanım için master stok, uzun süre muhafazaları için ise gliserol stoklar hazırlanmıştır. Master stok için LB sıvı besiyerinde üreyen bakteri kültürleri steril öze yardımı ile tek tek düşecek şekilde LB Agar plaklarına ekilmiş (Şekil 3.7A) ve gece boyunca 55°C sıcaklık koşullarında üremeye bırakılmıştır. Ertesi gün üzerinde bakteri kolonileri gelişmiş olan plaklar etiketlenerek +4°C’de muhafaza edilmişlerdir.

Gliserol stok için ise, gece boyunca LB sıvı besi ortamında üreyen bakteri kültürlerinden uygun miktarlarda alınarak daha önce cryo tüplerinde sterilize edilmiş olan gliserol ile karıştırılmış (%20 gliserol, %80 bakteri kültürü) ve vorteks ile homojenize edildikten sonra etiketlenerek muhafaza için -20°C’ye kaldırılmıştır (Şekil 3.7B).



Şekil 3.7. α -Amilaz aktivitesi gösteren izolatlardan master (A) ve gliserol (B) stoklarının hazırlanması

3.2.4. Bakterilerin Zamana Göre Kütle Artışlarının Belirlenmesi

Gece boyunca uygun koşullarda sıvı besi ortamında üremiş olan bakteri kültürlerinden ertesi sabah 50 ml hacimli steril LB sıvı besiyerine %1 olacak şekilde aşılama yapılmış ve 55°C'ye ayarlanmış inkübatörde uygun çalkalama hızında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun yapıldığı saat baz alınarak her 12 saatte bir (0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84) 5 ml kültür örneği alınarak 1'er ml efendorf tüplerine paylaştırılmıştır. Örnekler 10.000 rpm'de 10 dakika süre ile santrifüj edilerek bakterilerin pelet oluşturması sağlanmıştır. Tüplerden sıvı faz uzaklaştırılmış ve her bir bakteri peleti 1'er ml distile saf su ile çözülmüştür. Örneklerin, saf su şahit olarak kullanılmak üzere spektrofotometrede OD₆₀₀ nm dalga boyunda ölçümleri yapılmıştır. Herbir bakteriye ait 5 örneğin ortalaması alınarak her 12 saatlik dilimin bakteri kütle artışı spektrofotometrik olarak belirlenmiştir.

3.2.5. Enzimatik Analizler

Enzimatik analizler için öncesinde, Na-fosfat bafır (0.1 M, pH 6.5) ve bu bafır kullanılarak substrat solüsyonu (%2 w/v çözümlü nişasta) hazırlanmıştır.

Dinitrosalisilik asit yöntemine göre enzim analizi aşağıda verilen protokol uyarınca yapılmıştır (Miller, 1959):

1. Uygun koşullarda LB sıvı besiyerinde 24 saat süreyle üremiş olan bakteri kültürleri 4900 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir.
2. Süpernatant kısımlar temiz bir kaba alınarak buz üzerinde muhafaza edilmişlerdir.
3. Cam deney tüpleri etiketlenerek (Kontrol (1 adet), Enzim kontrol (4 adet), Substrat kontrol (4 adet), Enzim+substrat (5 adet)) hazır hale getirilmiştir.
4. Deney tüplerine aşağıda verilen bileşenler seri halde ilave edilmiştir:
Kontrol : 1 ml Na-fosfat bafır
Enzim kontrol : 0.5 ml süpernatant + 0.5 ml Na-fosfat bafır
Substrat kontrol : 0.5 ml substrat + 0.5 ml Na-fosfat bafır
Enzim + Substrat : 0.5 ml süpernatant + 0.5 ml substrat
5. Hazırlanan deney tüpleri vortekslenerek 55°C'ye ayarlanmış su banyosuna dikkatli bir şekilde konmuş ve enzimin substratı hidrolize etmesi için 30 dk süreyle inkübe edilmiştir.
6. Süre sonunda tüpler çıkarılarak her birinin üzerine 1.5'er ml DNS solüsyonu (20 gr Dinitrosalisilik asit, 4 gr fenol, 1 gr sodyum sülfid, 400 gr sodyum-potasyum tartarat, 1 lt %2'lik NaOH çözeltisi içinde çözülerek saf su ile 2 lt'ye tamamlanır) ilave edilerek vortekslenmiştir.
7. Tüpler kaynar su içerisinde 5 dk inkübe edilerek açığa çıkan şekerlerin renk değiştirmesi sağlanmıştır. Sonrasında örneklerin oda sıcaklığında soğuması için beklenmiştir (Şekil 3.8).
8. Kontrol grubu şahit olarak kullanılmış ve tüm tüplerdeki örnekler spektrofotometre (Pharmacia) ile OD₅₄₀ nm dalga boyunda ölçülmüştür.
9. Önce her bir gruba (enzim+substrat, enzim kontrol, substrat kontrol) ait ortalama değerler hesaplanmış, sonra ise enzim+substrat ortalamalarından enzim kontrol ve substrat kontrol ortalamaları çıkarılarak enzimlere ait aktivite değerleri spektrofotometrik olarak elde edilmiştir.
10. En yüksek değer 100 kabul edilerek diğer değerler relatif olarak hesaplanmıştır.
11. Elde edilen relatif aktivite değerleri kullanılarak ilgili grafikler oluşturulmuştur.
12. Bir enzim ünitesi, 1 dk boyunca 55°C'de substrattan 1 mmol glikozu serbest bırakan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.



Şekil 3.8. İzolatlara ait α -amilaz enzimlerinin DNS yöntemi ile enzimatik analizleri

3.2.5.1. Enzimlerin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi

Enzimlerin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerlerinin belirlenmesi amacı ile 40-100°C arasında olacak şekilde her 10°C’de bir reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Bunun için 0.5 ml enzim ve 0.5 ml substrat (%2 w/v nişasta) karışımı yukarıda belirtilen sıcaklık değerlerinde 30 dakika süreyle inkübe edildikten sonra, her bir tüpe 1.5 ml DNS solüsyonu eklenmiş ve sonrasında 5 dakika süreyle kaynatma işlemi uygulanmıştır. Aynı şekilde, substrat ve enzim kontrolleri de hazırlanarak aynı işlemlere tabi tutulmuştur. Soğutulan örnekler OD₅₄₀ nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülmüştür. En yüksek absorbansın elde edildiği sıcaklık değeri baz alınarak yüzde (%) olarak relatif aktivite değerleri belirlenmiştir.

3.2.5.2. Enzimlerin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değerlerinin Belirlenmesi

Sıvı besiyerinde 24 saat süreyle üremiş olan *Bacillus* sp.’ler santrifüjlenerek çöktürülmüş ve enzim kokteyli içeren hücre dışı sıvı kısımlar (süpernatant) elde edilmiştir. Diğer taraftan enzimlerin optimum aktivite gösterdikleri pH değerlerinin belirlenmesi için gerekli olan solüsyonlar; Na-asetat (0.1 M, pH 5.0-6.0), Na-fosfat (0.1 M, pH 6.0-7.0) ve Tris (0.1 M, pH 7.0-9.0) hazırlanmıştır. Yine her bir pH değerinde hazırlanmış olan tamponlar kullanılarak, herbir pH değerine ait substrat (%)

2 w/v nişasta) hazırlanmıştır. Aktivite tayini için 0.5 ml enzim ve 0.5 ml substrat tüpte karıştırılarak optimum sıcaklık değerinde 30 dakika süreyle reaksiyona sokulmuştur. İnkübasyon sonunda herbir tüpe 1.5 ml DNS solüsyonu eklenmiş ve sonrasında kaynar su içerisinde 5 dk bekletilmiştir. Aynı şekilde, herbir pH değerine ait substrat ve enzim kontrolleri de hazırlanarak aynı işlemlere tabi tutulmuştur. Örnekler oda sıcaklığında kendiliğinden soğumaya bırakılmış ve sonrasında OD₅₄₀ nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçülerek absorbans değerleri kaydedilmiştir. En yüksek absorbans değerinin elde edildiği pH değeri baz alınarak yüzde (%) olarak relatif enzim aktiviteleri belirlenmiştir.

3.2.5.3. Enzimlerin Termal (Sıcaklık) Kararlılıklarının Belirlenmesi

Termal (sıcaklık) stabilitelerinin belirlenmesi için enzimler (enzim kontrol grubunda kullanılan enzimler de dahil olmak üzere) reaksiyondan önce 30-90°C aralığında değişen sıcaklık değerlerinde 15 dakika süreyle ön inkübasyona bırakılmışlardır. Ön inkübasyon uygulaması yapıldıktan sonra 0.5 ml enzim ve 0.5 ml substrat (%2 w/v nişasta) optimum aktivitenin gerçekleştiği pH ve sıcaklık değerlerinde 30 dakika süreyle reaksiyona sokulmuşlardır. Reaksiyon sonunda karışıma 1.5 ml DNS solüsyonu eklenmiş, 5 dakikalık kaynatma işleminin ardından soğuması beklendikten sonra OD₅₄₀ nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçüm yapılmıştır. Elde edilen veriler değerlendirilerek her enzim için farklı sıcaklıklarda aktivite kayıpları relatif olarak (%) belirlenmiştir.

3.2.5.4. İzole Edilen *Bacillus* sp. Suşlarının Zamana Göre Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Zamana göre enzim aktivitelerinin belirlenmesinde, bakteri inokülasyonu işleminin başlangıcından itibaren her 12 saatte bir olmak üzere 84 saat boyunca bakteri kültüründen enzim numuneleri alınmıştır. Enzim (0.5 ml) ve substrat (0.5 ml %2'lik nişasta) karışımı 37°C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra örnek karışımına 1.5 ml DNS eklenmiş ve 5 dakika süreyle kaynatma işlemi uygulanmıştır. Soğutulan

örnekler OD₅₄₀ nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülmüş ve farklı zaman aralıklarında enzim aktivitesi relatif olarak (%) belirlenmiştir.

3.2.6. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ve Zimogram Analizleri

3.2.6.1. Bakterilere Ait Hücre dışı Protein Örneklerinin Hazırlanması

Bakteriler LB sıvı besi ortamında 55°C’de uygun çalkalama hızında 48 saat boyunca üretilmişlerdir. Süre sonunda bakteriler santrifüj ile 4.900 rpm’de 10 dk süreyle santrifüj edilerek hasat edilmişlerdir. Santrifügasyon sonrasında bakterilere ait hücre dışı sıvı faz (süpernatant) başka steril tüplere alınarak üzerine 1:1 oranında %20 (v/v) TCA ilave edilmiş, sonrasında homojenize edilerek 24 saat süreyle oda sıcaklığında muhafaza edilmişlerdir. Süre sonunda örnekler 4.950 rpm’de 10 dk süreyle santrifüj edilmiş ve hücre dışı proteinler pelet haline getirilmiştir. Süpernatant kısım dökülerek uzaklaştırılmış, protein peletleri ise 20-30 dk süreyle kurutulmuştur. Son olarak protein peletleri uygun hacimde (100-200 µl) tris solüsyonu (1 M, pH: 8.0) ile çözülerek daha sonra kullanılmak üzere -20°C’ye kaldırılmıştır.

3.2.6.2. SDS-PAGE’nin Hazırlanması

SDS-PAGE çalışması Laemmli (1970)’e göre yapılmıştır. SDS-PAGE, yoğunlukları farklı olan iki ayrı katmandan meydana gelmektedir. Üstteki katman (toplayıcı jel) proteinlerin bir araya gelerek ayırıcı jele beraber girmelerini sağlarken, ayırıcı jel proteinlerin moleküler ağırlığına göre birbirinden ayrılarak farklı bölgelerde bantlar oluşturmalarını sağlar. SDS-PAGE düzeneği üretici firma tarafından verilen protokole göre hazırlanmıştır. Jel ise %12’lik olacak şekilde aşağıda verilen protokol uyarınca hazırlanmıştır:

1. Ayırıcı jel (akrilamid (%30 w/v) 12.0 ml, Tris (2 M, pH 8.8) 5.62 ml, SDS (%10 w/v) 0.3 ml, saf su, 12.1 ml) karışımı hazırlandıktan sonra, polimerizasyonu sağlamak için üzerine 200 µl amonyum persülfat (%10 w/v) ve 20 µl TEMED ilave

edilerek daha önce hazırlanan iki cam levhadan oluşan düzenek arasındaki boşluğa bir pastör pipeti yardımıyla üstten yaklaşık 4 cm boşluk kalacak şekilde dökülmüştür.

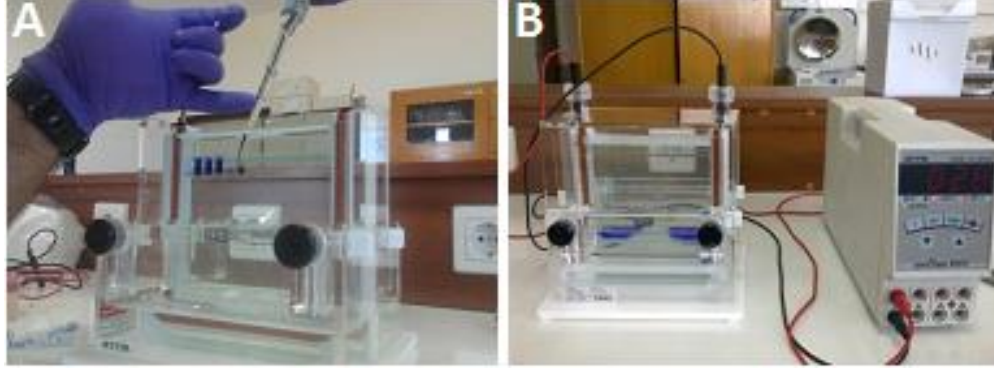
2. Jelin üzerine hava ile temasını önlemek için ince bir katman olacak şekilde su ile satüre edilmiş bütanol (veya saf su) ilave edilerek polimerizasyon için 45 dk beklenmiştir.
3. Süre sonunda üstte bulunan bütanol uzaklaştırılmış ve kalanı bir parça filtre kâğıdına emdirilerek jel bütanoldan iyice arındırılmıştır.
4. Toplayıcı jel (akrilamid (%30 w/v) 1.8 ml, tris (0,5 M, pH 6,8) 3.65 ml, SDS (%10 w/v) 0.15 ml, saf su 9.4 ml) hazırlanarak polimerize olması için içerisine 100 µl amonyum persülfat (%10 w/v) ve 10 µl TEMED eklenmiş ve vakit kaybetmeden bir pipet yardımıyla toplayıcı jelin üzerine dökülmüştür.
5. Hemen arkasından jel tarağı yerleştirilerek donması için 45 dk beklenmiştir.
6. Jel donduktan sonra tarak çıkarılmış ve jel daha önce hazırlanmış olan elektroforez tankı düzeneği içerisine yerleştirilmiştir.
7. Düzeneğe, jele alttan ve üstten temas edecek şekilde elektrod solüsyonu (0.05 M glisin, 0.05 M tris-baz, %0.1 SDS) ilave edilmiştir.

3.2.6.3. Enzim Örneklerinin Jele Yüklenmesi ve Elektroforezi

Enzim örneklerinin jele yüklenmesi ve elektroforezi aşağıda verilen protokol uyarınca yapılmıştır:

1. Daha önce hazırlanmış olan protein örneklerinin üzerine 1:2 hacim kaynatma solüsyonu (0.25 M Tris-HCL (pH 6.8), %15 w/v SDS, %50 v/v gliserol, %25 v/v β-merkaptoethanol, %0.01 w/v bromophenol blue) ilave edilerek ticari markır ile birlikte (Fermentas, SM0431) kaynar suda 3 dk süreyle bekletilmiştir.
2. Kaynatma işlemi tamamlandıktan sonra jelin birinci kuyusuna markır olacak şekilde, protein örnekleri sırasıyla diğer kuyulara 30-50 µl olacak şekilde bir mikropipet yardımıyla eklenmiştir.

3. Elektroforez tankı güç kaynağına bağlandıktan sonra protein örnekleri toplayıcı jelde 25 mA, 60 V, ayırıcı jelde ise 40 mA, 80 V akım uygulanarak yürütülmüştür. İzleme boyası jelin sonuna geldiğinde akım durdurularak elektroforez sonlandırılmıştır (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. İzolatlara ait hücre dışı proteinlerin SDS-PAGE'ye yüklenmesi (A) ve elektroforezi (B)

3.2.6.4. SDS-PAGE Jelin Boyanması

SDS-PAGE jelin boyanması aşağıda verilen protokol uyarınca yapılmıştır:

1. Elektroforez tamamlandıktan sonra jel, iki cam levha arasından dikkatlice çıkarılarak içerisinde boyama solüsyonu (%40 v/v metanol, %10 v/v glisial asetik asit, %50 v/v saf su, %0,1w/v Coomassie blue R 250) bulunan kabın içerisine konmuş ve 1 saat süreyle boyanması beklenmiştir.
2. Süre sonunda jel boya solüsyonundan alınarak bu sefer destain (%40 v/v metanol, %10 v/v glisial asetik asit, %50 v/v saf su) solüsyonu içerisine konmuş ve fazla boya uzaklaştırılmıştır. Solüsyon birkaç kez değiştirilerek protein bantları iyice görünür hale gelmesi sağlanmıştır.
3. Jel görüntüsü netleştikten sonra fotoğraflanmıştır.

3.2.6.5. Zimogram Analizi ile Enzimlerin Moleküler Ağırlıklarının Belirlenmesi

Enzimlerin moleküler ağırlıklarının zimogram analizi ile belirlenmesi aşağıda verilen protokol uyarınca yapılmıştır:

1. SDS-Nişasta-PAGE jeli, %12'lik SDS-PAGE jele 3 ml nişasta solüsyonu (%2 w/v) ilave edilmesi ve aynı miktarda suyun toplam hacimden düşürülmesi ile hazırlanmıştır.
2. Protein örnekleri SDS-Nişasta-PAGE jelde elektroforez edildikten sonra iki cam levha arasından dikkatli bir şekilde çıkarılarak Solüsyon-1 (50 mM Na₂HPO₄+50 mM NaH₂PO₄+%20 v/v izopropanol) içerisinde 1 saat süreyle bekletilerek SDS'nin uzaklaşması sağlanmıştır.
3. Süre sonunda jel bu sefer Solüsyon-2 (50 mM Na₂HPO₄+50 mM NaH₂PO₄+1 mM EDTA+5 mM β-merkapt ethanol) içerisine konarak gece boyunca bu solüsyonda +4°C'de muhafaza edilmiştir. Böylece denatüre olan proteinlerin renatüre olması sağlanmıştır.
4. Ertesi sabah jel bu sefer Solüsyon-3 (50 mM Na₂HPO₄ + 50 mM NaH₂PO₄) içerisine konmuş ve +4°C'de 1 saat süreyle muhafaza edilmiştir.
5. Süre sonunda jel bu solüsyondan da alınarak cam bir levha üzerine konmuş ve streç film ile iyice sarılmıştır. Bu halde jel 4-5 saat süreyle 55°C'de inkübe edilmiş ve enzimlerin jeldeki nişastayı hidrolize etmesi sağlanmıştır.
6. İnkübasyon sonunda jel iyodin boyasına (%0,1 w/v iyodin, %50 v/v metanol) alınarak aktivite bantları görününceye kadar (20-30 dk) bu boya içerisinde bekletilmiştir (Saul ve ark, 1990).
7. Markır proteinler yardımıyla enzimlerin moleküler ağırlıkları hesaplanmıştır.

3.2.7. İzolatların Antibiyotiklere Karşı Dirençliliklerinin Belirlenmesi

İzolatların antibiyotiklere karşı dirençliliklerinin belirlenmesi aşağıda verilen protokol uyarınca yapılmıştır:

1. İzolat bakteriler LB-sıvı besiyerinde gece boyunca uygun çalkalama hızında üretilmişlerdir.

2. Üremiş olan bakteriler ayrı ayrı olacak şekilde LB-agar plaklarına cam çubukla yayılmışlardır.
3. Farklı antibiyotikler emdirilmiş ticari antibiyotik diskleri, bakteri yayılmış olan katı besi ortamına belirli aralıklarla yerleştirilmiş ve 10-15 dk süreyle beklenerek kuruması sağlanmıştır (Şekil 3.10).
4. Bakteri ekilmiş plaklar 55°C’de 1 gece inkübe edilerek bakterilerin üremesi sağlanmıştır.
5. Ertesi gün antibiyotik disklerinin etrafında bakteri gelişip gelişmediğine bakılarak bakterilerin antibiyotik dirençlilikleri belirlenmiştir.

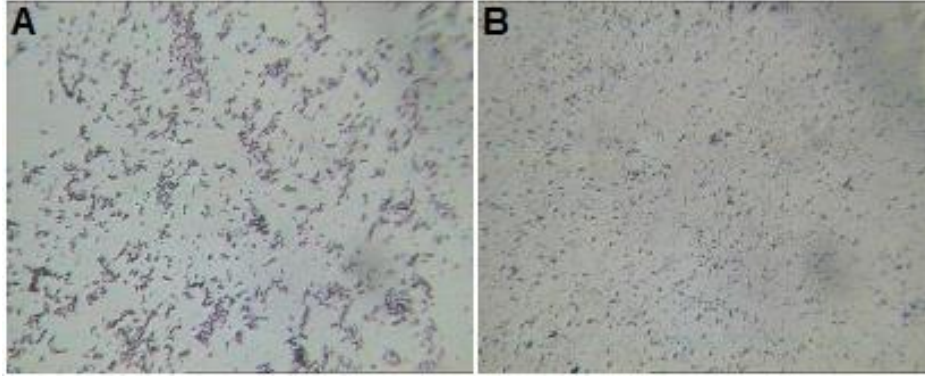


Şekil 3.10. İzolatların farklı antibiyotik diskleri ile antibiyogram analizleri

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. BULGULAR

Çalışmada Hatay ili Erzin sınırları içerisinde yer alan Burnaz Çayı kıyı kesimlerinden toplanan toprak numunelerinden üç adet *Bacillus* sp. suşu (CT1, CT2 ve CT3) izole edilmiştir. Her üç izolat da Gram (+), çubuk formunda, spor oluşturan aerobik mikroorganizmalardır (Şekil 4.1). *Bacillus* sp. CT1, CT2 ve CT3 çözüner nişasta içeren besi ortamında iyot boyaması ile α -amilaz aktivitesi göstermişlerdir (Şekil 4.2).



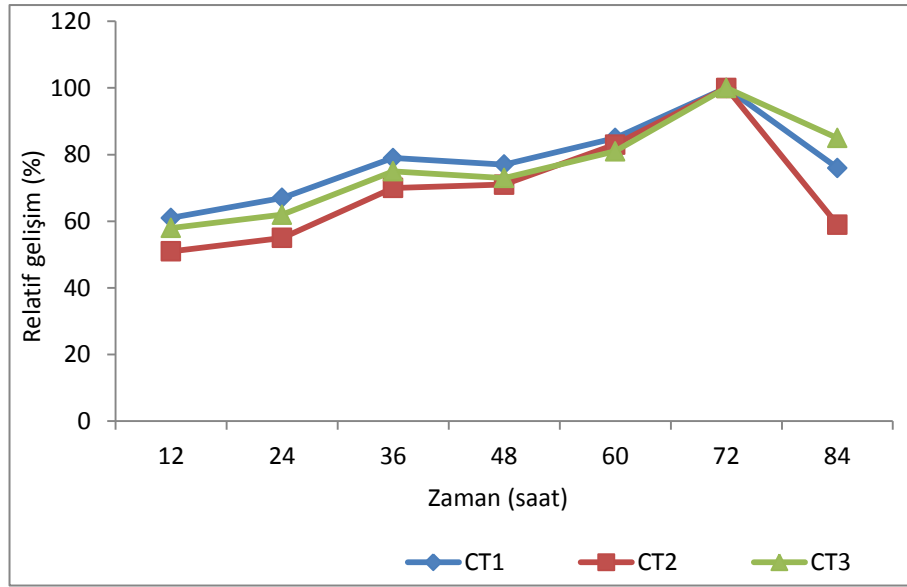
Şekil 4.1. *Bacillus* sp. CT-1 (A) ve CT-3 (B) izolatlarının Gram boyama sonucu mikroskobik görüntüleri



Şekil 4.2. *Bacillus* sp. CT-1, CT-2 ve CT-3 izolatlarının iyot boyaması sonucu α -amilaz aktivitelerinin plak görüntüleri

4.1.1. İzolatların Zamana Göre Oransal Gelişimi

Her üç izolat da LB sıvı besiyerine ekilmiş ve 55°C sıcaklık koşullarında 84 saat süreyle inkübasyona bırakılmışlardır. Her 12 saatte bir bakteri örneği alınmış ve kütle artışı spektrofotometrik olarak takip edilmiştir. Her üç bakteri de maksimum kütle seviyesine üreme periyodunun 72. saatinde ulaşmıştır (Şekil 4.3).



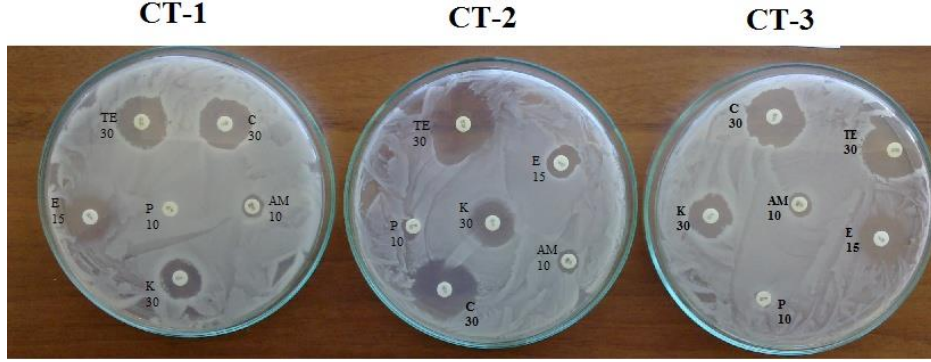
Şekil 4.3. *Bacillus* sp. CT1, CT2 ve CT3 izolatlarının zamana göre kütle artışı

CT1, CT2 ve CT3 izolatlarının kütle artışı, 12. saatte sırası ile %61, 51 ve 58 olarak gerçekleşmiştir. 72. saatten sonra yine her üç bakterinin kütle miktarında düşüş gözlenmiştir (Şekil 4.3.).

4.1.2. İzolatların Antibiyogram Analizleri

Bacillus sp. CT1, CT2 ve CT3 izolatları ayrı ayrı olacak şekilde ticari antibiyotik diskleri (amfisilin, tetrasiklin, kloramfenikol, eritromisin, kanamisin, penisilin) ile antibiyogram testine tabi tutulmuşlardır. Antibiyogram sonrasında her üç izolatın da amfisilin ve penisilin antibiyotiklerine karşı dirençli olduğu, diğer antibiyotiklere

(tetrasiklin, kloramfenikol, eritromisin, kanamisin) ise hassas olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. *Bacillus* sp. suşlarının antibiyotik emdirilmiş disklerle yapılan antibiyogram görüntüsü

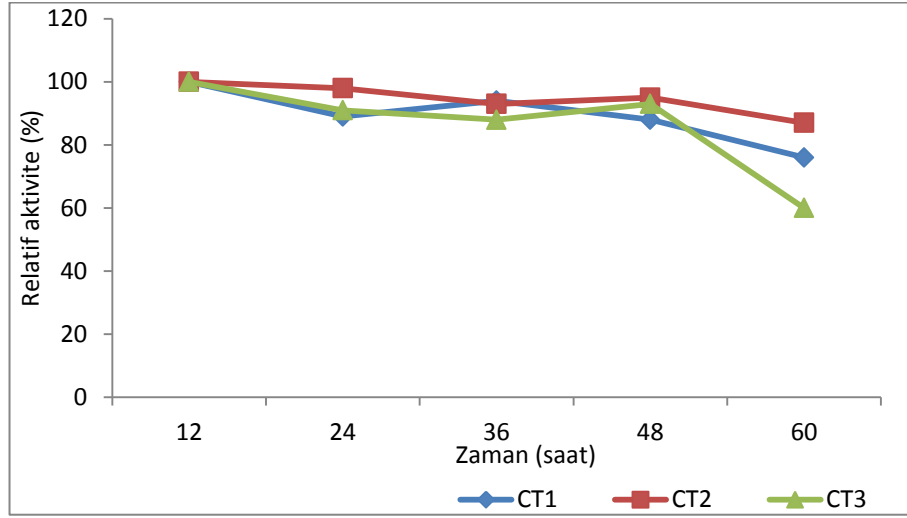
4.1.3. Enzimatik Özellikler

Bacillus sp. CT1, CT2 ve CT3 izolatları tarafından ekstraselüler olarak üretilen α -amilaz enzimlerinin kısmi karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir.

4.1.3.1. Zamana Göre α -Amilaz Üretimi

İzolatların üreme periyodunun her 12 saatinde bir enzim numuneleri alınmış ve DNS yöntemiyle zamana göre enzim üretimleri relatif olarak belirlenmiştir. Her üç izolat da en yüksek düzeyde α -amilaz üretimini üreme periyodunun 12. saatinde gerçekleştirmiştir (Şekil 4.5). Bu saat diliminden sonra her üç enzimin de aktivitesinde hafif düşüşler gözlenmiştir.

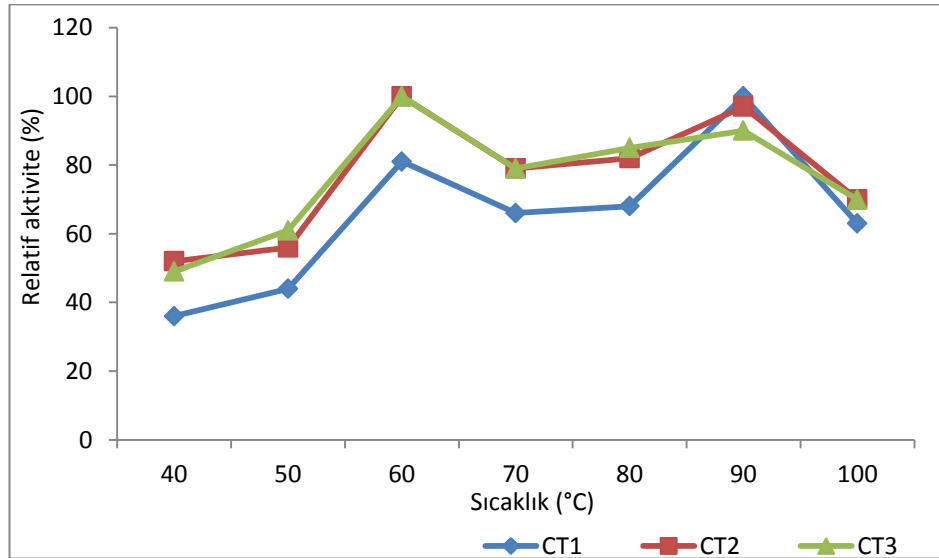
Üreme periyodunun 60. saatinde, CT1, CT2 ve CT3 izolatlarına ait oransal enzim aktiviteleri sırasıyla %76, 87 ve 60 olarak gerçekleşmiştir. 12-60 saat aralığında ortalama enzim üretimi CT1, CT2 ve CT3 izolatları için sırasıyla %89.4, %94.6 ve %86.4 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.5. CT1, CT2 ve CT3 izolatlarının zamana göre α -amilaz üretimi

4.1.3.2. α -Amilaz Enzimlerine Ait Optimum Sıcaklık Değerleri

İzolatlar tarafından üretilen α -amilaz enzimlerine ait optimum sıcaklık değerleri belirlenmiştir. Elde edilen bulgulara göre CT1 suşu tarafından üretilen α -amilazın optimum aktivite için gereksinim duyduğu sıcaklık değeri 90°C iken, CT2 ve CT3 α -amilazları için bu değer 60°C olarak belirlenmiştir (Şekil 4.6).

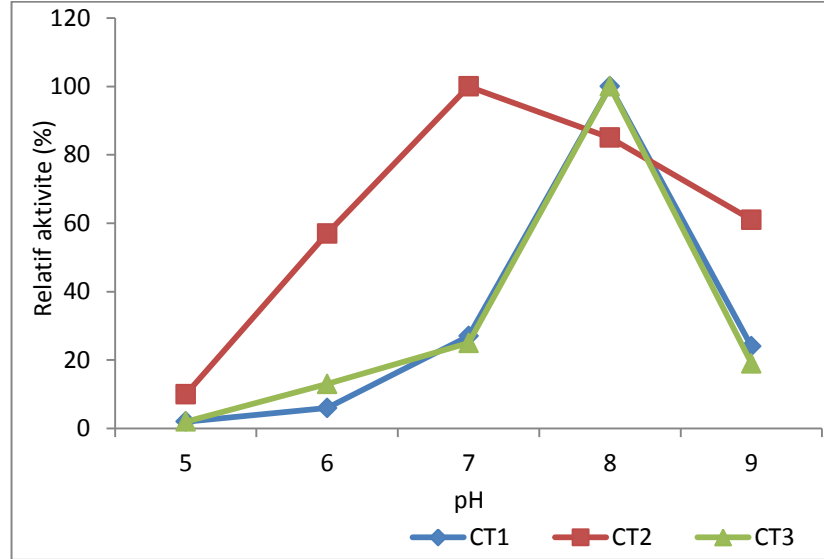


Şekil 4.6. İzolatlara ait α -amilaz enzimlerinin değişik sıcaklık koşullarındaki relatif aktivite değerleri

60-90°C'ler arasındaki ortalama enzim aktiviteleri CT1, CT2 ve CT3 α -amilazları için sırasıyla %79, 90 ve 89 olarak gerçekleşmiştir. Yine CT1 α -amilazı 100°C'de aktivitesinin %63'ünü gösterirken, CT2 ve CT3 α -amilazları %70'ini göstermişlerdir.

4.1.3.3. α -Amilaz Enzimlerine Ait Optimum pH Değerleri

Bacillus sp. CT1, CT2 ve CT3 α -amilazlarına ait optimum aktivite için gerekli olan pH değerleri araştırılmıştır. *Bacillus* sp. CT2 α -amilazı optimum aktivitesini pH 7.0'de gösterirken, CT1 ve CT3 α -amilazları pH 8.0'de göstermişlerdir (Şekil 4.7).



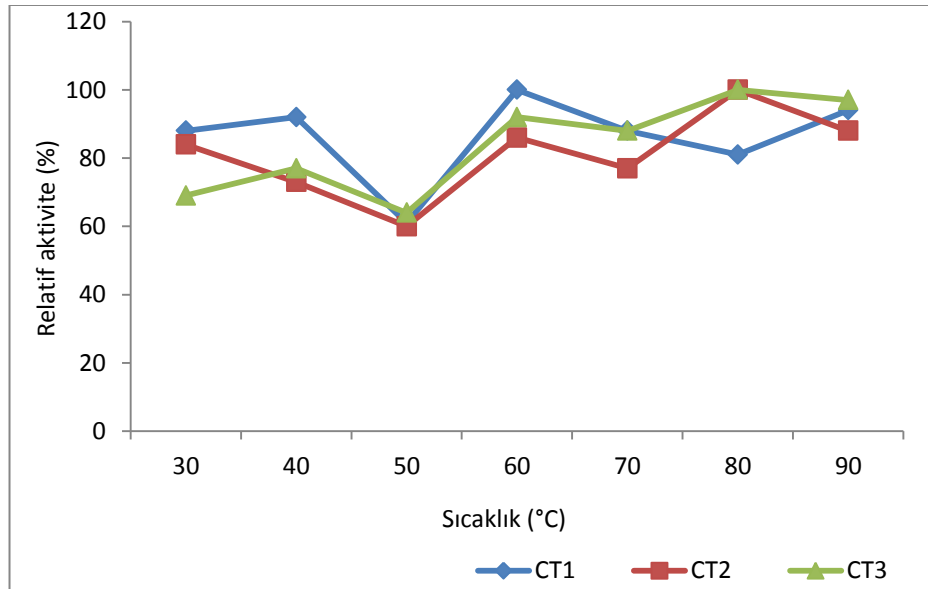
Şekil 4.7. İzolatlara ait α -amilaz enzimlerinin değişik pH koşullarında gösterdikleri relatif aktivite değerleri

Bacillus sp. CT1 α -amilazı pH 7.0 ve 9.0 değerlerinde sırasıyla %27 ve %24 oranında aktivite göstermiştir. Aynı pH değerlerinde CT3 α -amilazı da benzer oransal aktivite özelliklerine sahip olmuştur. Bu enzim pH 7.0 ve 9.0 değerinde sırasıyla %25 ve %19 oranında aktivite göstermiştir. CT2 α -amilazı ise CT1 ve CT3 α -amilazlarından farklı olarak daha geniş bir pH aralığında yüksek aktivite oranları sergilemiştir. CT2 α -amilazı pH 6.0, 8.0 ve 9.0 değerlerinde sırasıyla %57, 85 ve 61 oranında aktivite göstermiştir. pH 6.0-9.0 aralığında CT1 ve CT3 α -amilazları

ortalama %39 aktivite gösterirken, CT2 α -amilazı aynı pH aralığında ortalama %76 aktivite göstermiştir.

4.1.3.4. α -Amilaz Enzimlerinin Sıcaklığa Dirençliliklerinin Belirlenmesi

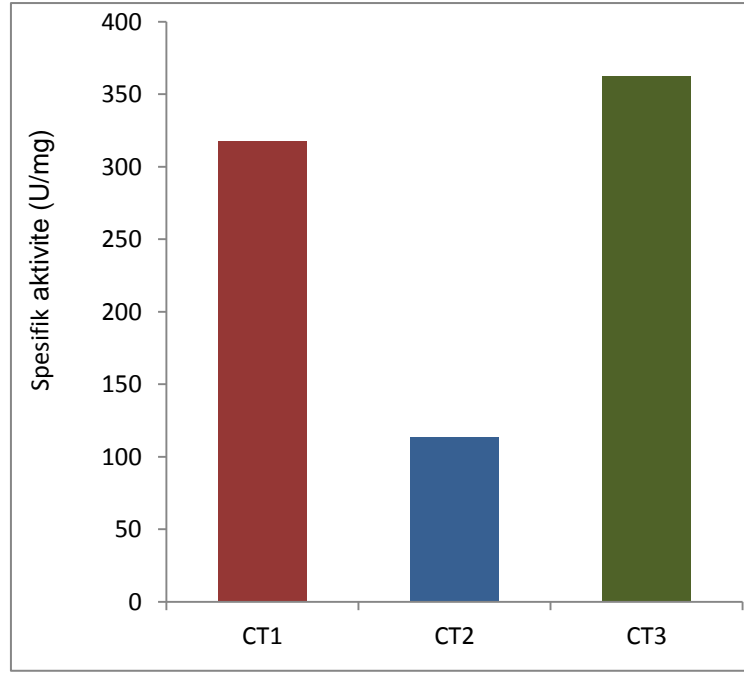
Her üç enzimde substrat ile reaksiyona sokulmadan önce, 30-90°C arasında değişen farklı sıcaklık koşullarında 15'er dk. süreyle ön inkübasyona tabi tutulmuştur. Sonrasında enzimler substrat ile optimum sıcaklık ve pH koşullarında 30 dk süreyle reaksiyona sokulmuş ve açığa çıkan şeker DNS yöntemi ile belirlenmiştir. Elde edilen bulgulara göre CT1 α -amilazının 60°C'de 15 dk. ön inkübasyondan sonra aktivitesinin tamamını koruduğu gözlenmiştir. Bu sıcaklık değeri CT2 ve CT3 α -amilazlarının her ikisi için de 80°C olarak belirlenmiştir. Her üç enzim de 50°C'de 15 dk. ön inkübasyondan sonra aktivitelerinin yaklaşık %40'ını kaybetmişlerdir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Enzimlerin farklı sıcaklık koşullarında gösterdikleri termal kararlılık grafiği

4.1.3.5. Enzimlere Ait Spesifik Aktivite Değerleri

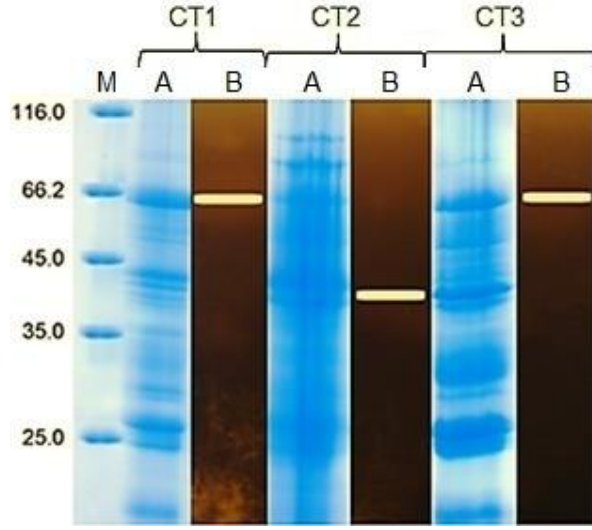
Enzimlere ait spesifik aktivite değerleri hesaplanmış, CT1, CT2 ve CT3 α -amilazları için bu değerler sırasıyla 317.6, 113.3 ve 362.7 U/mg olarak bulunmuştur. Enzimler bu spesifik aktivite değerlerine substrat olarak nişastanın kullanıldığı durumda ulaşmışlardır (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Sıcaklığa göre enzim aktivitesi

4.1.4. SDS-PAGE ve Zimogram Analizleri

Her üç enzime ait moleküler ağırlıklar SDS-Nişasta-PAGE'de zimogram analizi ile belirlenmiştir. Enzimlere ait moleküler ağırlıklar BioCapt MW programı ile hesaplanmış, CT1 ve CT3 α -amilazlarının moleküler ağırlığı 65 kDa, CT2 α -amilazının moleküler ağırlığı ise 38 kDa olarak belirlenmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. İzolatlara ait SDS-PAGE ve zimogram analizi görüntüsü (M: Markır, A: SDS-PAGE’de toplam proteinler, B: Zimogram analizinde iyodin boyaması ile ortaya çıkarılan α -amilaz aktivite bantları)

4.2. TARTIŞMA

Nişastayı hidrolize eden birçok *Bacillus* cinsi bakteri bilinmektedir. Bu şekilde nişastayı parçalayan enzimleri üreten *B. stearothermophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. megaterium*, *B. thuringiensis*, *B. coagulans*, *B. globisporus*, *B. alvei* ve *B. macerans* türleri tanımlanmıştır (Claus ve Berkeley, 1986). Bununla birlikte, bu mikroorganizmalar arasında sadece birkaçı sıcaklığa dirençli α -amilaz üretmektedir. *B. stearothermophilus* ve *B. licheniformis* α -amilazları iyi düzeyde karakterize edilmiş ve nişasta sanayinde yoğun şekilde kullanılmıştır. Amilolitik enzimlerin nişasta sanayinde kullanımında sıcaklığa dirençliliğin önemli olması, termofilik ve hipertermofilik mikroorganizmalara; sıcaklığa dirençli enzimlerin kaynağı olarak önemli bir rol yüklemiştir (Burhan vd., 2003).

Bacillus sp. CT1, CT2 ve CT3 bakterileri 55°C’de izole edilmişlerdir. (Vieille ve Zeikus, 2001) termofilik organizmaların optimum olarak 50-80°C’de gelişim gösterdiklerini bildirmiştir. Bu durumda *Bacillus* sp. CT1, CT2 ve CT3 izolatları termofilik olarak tanımlanabilir. Bu izolatlardan CT1 en yüksek α -amilaz aktivitesini 60°C’de, CT2 ve CT3 ise 80°C’de göstermişlerdir. α -Amilaz enzimlerinin optimum

sıcaklık değerleri ile bu enzimleri üreten mikroorganizmaların gelişim için optimum sıcaklık değerlerinin birbirleri ile benzer özellik gösterdikleri bildirilmiştir (Vihinen ve Mantsala, 1989). Bu çalışmada izole edilen bakterilerin optimum gelişim sıcaklık değerleri ile bu bakterilerce üretilen enzimlerin optimum sıcaklık değerleri bu literatür bildirişi ile benzerlik göstermektedir.

Çalışmada izole edilen bakterilere ait CT1 α -amilazı optimum aktivitesini 90°C’de gösterirken, CT2 ve CT3 α -amilazları 60°C’de göstermişlerdir (Şekil 4.6). *B. stearothermophilus* α -amilazlarının optimum olarak 50-70°C sıcaklıklarda aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Campbell, 1955; Pfueller ve Elliot, 1969; Ogasahara vd., 1970; Kim vd., 1989). Bununla birlikte *B. stearothermophilus* α -amilazlarının 90°C sıcaklık değerinde optimum aktivite gösterdiğine dair literatür bildirişleri nadirdir. (Lin ve Tsay, 1987) izole ettikleri *B. stearothermophilus* α -amilazının 90°C’de optimum aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. 90°C’de optimum aktivite gösteren enzimler daha ziyade aşırı sıcaklığa dirençli (extrem thermostable) enzimler olarak isimlendirilirler. Yang vd. (2004), yaptıkları araştırmada çalıştıkları ve 90°C sıcaklıkta optimum aktivite gösteren α -amilaz enzimini aşırı sıcaklığa dirençli olarak tanımlamışlardır. Bu durumda, mevcut çalışmada izole edilen *Bacillus* sp. CT1, CT2 ve CT3 izolatları *B. stearothermophilus* türüne ait suşlar olabilir. Fakat bunu kesin olarak söyleyebilmek için, 50 farklı karbon kaynağını içeren API 50 CHB testi ile teyit edilmesi gerekmektedir (Wind vd., 1994). Nişastanın her üç enzim ile hidrolizinde son ürün glikoz olmuştur. Bununla birlikte, nişastanın α -amilaz enzimlerince hidrolizi sonucunda glikozun tek ürün olduğunu söylemek zordur. Çünkü nişasta molekülünden serbest bırakılan dekstrinler serbest enzimlerce hızlı bir şekilde küçük fragmanlara hidrolize olmalıdır (Mamo ve Gessesse, 1999).

Çalışmada izole edilen her üç bakteriye ait α -amilaz enzimleri geniş sıcaklık aralıklarında aktivite göstermelerine karşın, pH aktiviteleri açısından geniş bir aralığa sahip olmamıştır. CT1 ve CT3 α -amilazları optimum aktivitelerini pH 8.0’de göstermişlerdir (Şekil 4.7). Fakat her iki enzim de pH 7.0 ve 9.0’da ciddi bir aktivite kaybına uğramışlardır. CT1 ve CT3 α -amilazları pH 7.0’da aktivitelerinin sırasıyla %73 ve %55’ini kaybederken, pH 9.0’da yine sırasıyla aktivitelerinin %76 ve

%81'ini kaybetmişlerdir. CT2 α -amilazı ise diğer iki enzime karşılık biraz daha geniş bir pH aralığında yüksek aktivite oranları sergilemiştir. CT2 α -amilazı optimum aktivitesini pH 7.0'da gösterirken, pH 6.0, 8.0 ve 9.0 değerlerinde aktivitesinin sırasıyla %57, 85 ve 61'ini göstermiştir. pH 6.0-9.0 aralığında CT1 ve CT3 α -amilazları ortalama %39 aktivite gösterirken, CT2 α -amilazı bu pH aralıklarında ortalama %76 aktivite göstermiştir. Genel olarak α -amilaz enzimlerinin pH optimumları 2.0-12.0 arasında değişiklik göstermektedir (Vihinen ve Mantsala, 1989) ve genellikle 4.0-11.0 pH aralıklarında kararlı olmaktadır (Fogarty ve Kelly, 1979; Khoo vd., 1994; Hamilton vd., 1999). Benzer şekilde nötral yada hafif alkali pH değerlerinde optimum aktivite gösteren sıcaklığa dirençli α -amilaz enzimleri daha önce rapor edilmiştir (Rasooli vd., 2008; Gaur vd., 2012; Oyeleke ve Oduwale, 2009). Enzimlerin geniş bir pH aralığında aktivite göstermeleri arzu edilen bir durumdur. Bu enzimler farklı endüstriyel alanlarda kullanılabilme potansiyeline sahiptirler. Bu çalışmamızda izole edilen CT1 ve CT3 α -amilazları için bunu söylemek mümkün değildir.

CT1, CT2 ve CT3 α -amilazları için spesifik aktivite değerleri sırasıyla 317.6, 113.3 ve 362.7 U/mg olarak hesaplanmıştır. Genellikle α -amilazların spesifik aktivite değerleri değişkenlik göstermektedir. Mahdavi vd. (2010), çalıştıkları *B. cereus*'a ait α -amilaz enziminin spesifik aktivitesini 50 U/mg olarak hesaplarken, Akcan vd. (2011), *B. subtilis* RSKK96 suşuna ait α -amilaz enziminin spesifik aktivitesini 858.6 U/mg olarak hesaplamışlardır. Bu bildirimler dikkate alındığında, araştırdığımız enzimlere ait spesifik aktivite değerleri normal sınırlar içerisinde görülmektedir. Mutagenesis veya klonlama yöntemleriyle bu değerlerin artırılması durumunda, enzimlerin endüstriyel kullanım için daha uygun hale getirilebileceği öngörülmektedir.

Sıcaklığa dirençli CT1 ve CT3 α -amilazlarının moleküler ağırlığı 65 kDa, CT2 α -amilazının moleküler ağırlığı ise 38 kDa olarak hesaplanmıştır. Genellikle α -amilaz enzimlerinin moleküler ağırlıkları 50-60 kDa aralığında olmaktadır. Bununla birlikte α -amilazların moleküler ağırlıklarının 10-210 kDa arasında değişebileceği de rapor edilmiştir (Gupta vd., 2003). α -Amilaz enzimlerinin moleküler ağırlıkları arasındaki

bu varyasyon, organizmalarda bulunan gen farklılıklarının sonucudur (Sidhu vd., 1997). *Bacillus* sp. CT1, CT2 ve CT3 α -amilazları ile benzer moleküler ağırlıklara sahip α -amilazlar daha önce rapor edilmişlerdir. Bu enzimlerden *B.licheniformis* JAR-26 (Jyoti vd., 2011), *Bacillus* sp. AB68 (Aygan vd., 2008), *B. subtilis* BS5 (Femi-Ola ve Olowe, 2011) ve *B. subtilis* X-23 (Ohdan vd., 1999) tarafından üretilen α -amilazların moleküler ağırlıkları sırasıyla 38, 66, 63 ve 67 kDa olarak rapor edilmişlerdir.

5. SONUÇ

Bu çalışmada sıcaklığa dirençli α -amilaz enzimleri üreten üç adet *Bacillus* sp. izole edilerek enzimlerin kısmi karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Her üç enzim de geniş bir sıcaklık aralığında (60-90°C) aktivite göstermelerine karşın, çok dar bir pH aralığında (CT1 ve CT3 α -amilazları için pH 8.0, CT2 α -amilazı için pH 7.0) aktivite göstermişlerdir. Enzimlerin sıcaklığa dirençli olmaları ve hafif alkali özellik göstermeleri endüstriyel kullanım açısından önem taşıyabilir özellikte olduklarını kanıtlamaktadır. Bu enzimlerin üretimlerinin daha ileri bir çalışmada moleküler genetik yöntemleri yardımı ile artırılarak optimize edilmeleri sonucunda ticari kullanım olanaklarının ortaya konulması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Adams, M.R., Moss, M.O., Food Microbiology. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 252-302, 1995.
- Akcan, N., Uyar, F., Güven, A., Alpha-amylase production by *Bacillus subtilis* RSKK96 in submerged cultivation. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 17 (Suppl A): 17-22, 2011.
- Ali, M.B., Mezghani, M., Bejar, S., A thermostable α -amylase producing maltohexaose from a new isolated *Bacillus* sp. US100: Study of activity and molecular cloning of the corresponding gene. Enzyme and Microbial Technology, 24: 584-589, 1999.
- Ali, M.B., Mezghani, M., Bejar, S., purification and sequence analysis of the atypical maltohexaose-forming α -amylase of the *B. stearothermophilus* US100. Enzyme and Microbial Technology, 28: 537-542, 2001.
- Andrade, C.M.M.C., Pereira, N., Antranikian, G., Extremely thermophilic microorganisms and their polymer-hydrolytic enzymes. Revista de Microbiologia, 30: 287-298, 1999.
- Asgher, M., Asad, M.J., Rahman, S.U., Legge, R.L., A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. Journal of Food Engineering, 79: 950-955, 2007.
- Aygan, A., Arıkan, B., Korkmaz, H., Dinçer, S., Çolak, Ö., Highly thermostable and alkaline α -amylase from a halotolerant-alkaliphilic *Bacillus* sp. AB68. Brazilian Journal of Microbiology, 39(3): 1517-8382, 2008.
- Aygan, A., Haloalkalofil *Bacillus* sp. izolasyonu, amilaz, selüloz ve ksilenaz enzimlerinin üretimi, karakterizasyonu ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilirliği. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Adana, 153-154, 2008.
- Balkan, B., Katı substrat fermentasyonu ile ham nişastayı parçalayan yeni bir fungal amilaz üretimi, saflaştırılması ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi. Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne, 53-65, 2008.

- Bano, S., Qader, S.A.U., Aman, A., Syed, M.N., Azhar, A., Purification and characterization of novel α -amylase from *Bacillus subtilis* Kibge Has. American Association of Pharmaceutical Scientists, 12(1): 255-261, 2011.
- Beaujean, A., Dducrocq-Assaf, C., Sangwan, R.S., Lilius, G., Bulow, L., Sangwan-Norreel, B.S., Engineering direct fructose production in processed potato tubers by expressing a bifunctional α -amylase/glucose isomerase gene complex. Biotechnology and Bioengineering, 70(1): 9-16, 2000.
- BeMiller, J., Whistler, R. Starch: Chemistry and Technology. Hobbs, L. Sweeteners from Starch: Production, Properties and Uses. p 808. Academic Press is an imprint of Elsevier, 2009.
- Bertoldo, C., Antranikian, G., Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. Current Opinion in Chemical Biology, 6: 151-160, 2002.
- Buchanan, R.E., Gibbons, N.E., Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th edition, The Williams and Wilkins Company, 1246 p. Baltimore, 1974.
- Burhan, A., Nisa, U., Gokhan, C., Omer, C., Ashabil, A., Osman, G., 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, 2003.
- Campbell, L.L., Purification and some properties of a α -amylase from a facultative thermophilic bacteria. Archives of Biochemistry and Biophysics, 54: 154-161, 1955.
- Canoğulları, S., Etlik piliç karma yemlerinde enzim kullanımı ve kullanım koşulları. Doktora Tezi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Zootekni Anabilim Dalı, Adana, 1999.
- Chakraborty, K., Bhattacharyya, B.K., Sen, S.K., Purification and characterization of a thermostable α -amylase from *Bacillus stearothermophilus*. Folia Microbiol (Praha), 45 (3): 207-210, 2000.
- Claus, D., Berkeley, R.C.W., The Genus *Bacillus*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G. (Eds.). Williams and Wilkins, Baltimore, pp: 1105-1139, 1986.

- Cocconcelli, P.S., Gasson, M.J., Morelli, L., Bottazzi, V., Single-stranded DNA plasmid, vector construction and cloning of *Bacillus stearotherophilus* α -amylase in *Lactobacillus*. *Research in Microbiology*, 142 (6): 643-652, 1991.
- Coşkun, A., Endüstriyel enzimler üreten yeni *Bacillus* sp. suşlarının izolasyonu ve karakterizasyonu. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Adana, 132, 2010.
- Daniel, R.M., Dines, M., Petach, H.H., The denaturation and degradation of stable enzymes at high temperatures. *Biochemical Journal*, Jul 1, 317: 1-11, 1996.
- Demain, A.L., Solomon, N.A., In *Industrial Microbiology and the Advent of Genetic Engineering*, pp. 3-14. Scientific American, Freeman&Comp., San Francisco, 1981.
- Diderichsen, B., Poulsen, G.B., Jorgensen, P.L., Cloning and expression of an amylase gene from *Bacillus stearotherophilus*. *Research in Microbiology*, 142 (7-8): 793-796, 1991.
- Duedahl-Olesen, L., Kragh, K.M., Zimmermann, W., Purification and characterisation of a malto-oligosaccharide-forming amylase active at high pH from *Bacillus clausii* BT-21. *Carbohydrate Research*, 329: 97–107, 2000.
- Ediz, N., Beyatlı, Y., *Bacillus* cinsi bakteriler tarafından biyoplastik üretimi. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 3 (5): 1-22, 2005.
- Fadıloğlu S., Erkmen O., Gıda sanayinde enzimlerin önemi. *Gıda*, 29(5): 393-400, 2004.
- Fadıloğlu, S., Erkmen, O., Lipase production by *Rhizopus oryzae* growing on different carbon and nitrogen sources. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 1936-1938, 1999.
- Femi-Ola, T.O., Olowe, B.M., Characterization of alpha-amylase from *Bacillus subtilis* BS5 isolated from *Amitermes evuncifer* silvestri. *Research Journal of Microbiology*, 6: 140-146, 2011.
- Fogarty, W.M., Kelly, C.T., *Developments in Microbial Extracellular Enzymes*. In: *Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology*, Wiseman, A. (Ed.). Vol. 3, Wiley, New York, pp: 45-108, 1979.
- Fujiwara, S. Extremophiles: Developments of their special functions and potential resource. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94 (6): 518-525, 2002.

- Fukara G., Bazı ekstrem termofil bakterilerin amilazlarının özelliklerinin belirlenmesi Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2, 2007.
- Gaur, D., Jain, P.K., Bajpai, V., Production of extracellular α -amylase by thermophilic *Bacillus* sp. isolated from arid and semi-arid region of Rajasthan, India. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 2 (5): 675-684, 2012.
- Gessesse, A., Purification and properties of two thermostable alkaline xylanases from an alkaliphilic *Bacillus* sp., *Applied and Environmental Microbiology*. 64 (9) 3533-3535, 1998.
- Glazer, A., Nikaido, H., *Microbial Biotechnology, Fundamentals of Applied Microbiology*. W.H. Freeman and Company, USA, 1995.
- Godfrey, T., West, S., *Introduction to Industrial Enzymology. Industrial Enzymology (Second Edition)*. Ed. by T. Godfrey and S. West. Stockton Press, New York, 1996.
- Gomes, J., Steiner, W., Extremophiles and extremozymes. *Food Technology and Biotechnology*. 42(4): 223–235, 2004.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., Chauhan, B., Microbial α -amylases: A biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 38: 1599-1616, 2003.
- Haki, G.D., Rakshit, S.K., Developments in industrially important thermostable enzymes: A review. *Bioresource Technology*, 89: 17-34, 2003.
- Hamilton, L.M., Kelly, C.T., Fogarty, W.M., Purification and properties of the raw starch degrading α -amylase of *Bacillus* sp. IMD 434. *Biotechnology Letters*, 21: 111-115, 1999.
- Harwood, C.R., *Bacillus subtilis and Its Relatives: Molecular Biological and Industrial Workhorses*. Elsevier Science Publishers Ltd. (U.K.), 10: 247-256, 1992.
- Hasan F., Shah A.A., Hameed, A., Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(2): 235-251, 2006.

- Hendriksen, H.V., Pedersen, S., Bisgard-Frantzen, H., A process for textile warp sizing using enzymatically modified starches. Patent Application WO 99/35325, 1999.
- Herbert, R., Sharp, R., Molecular Biology and Biotechnology of Extremophiles. Chapman and Hall, NY., 1992.
- Hewitt, C.J., Solomons, G.L., The production of α -amylase (E.C.3.2.1.1.) by *Bacillus amyloliquefaciens*, in a complex and a totally defined synthetic culture medium. Journal of Industrial Microbiology, 17: 96-99, 1996.
- Igarashi, K., Hatada Y., Hagihara, H., Saeki, K., Takaiwa, M., Uemura, T., Ara, K., Ozaki, K., Kawai, S., Kobayashi, T., Ito, S., Enzymatic properties of a novel liquefying α -amylase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate and entire nucleotide and amino acid sequences. Applied and Environmental Microbiology, 64(9): 3282-3289, 1998.
- Janecek S., Amylolytic enzymes-focus on the alpha-amylases from archaea and plants. Nova Biotechnologia, 9-1, 2009.
- Jin, F., Cheng, X., Shi, Y., Zhang, C., Isolation of new thermophilic aerobic bacteria which produce thermostable α -amylase. Journal of General and Applied Microbiology. 36: 415-424, 1990.
- John, F.K., Enzyme Technology (H.J. Rehm., G. Reed, editors). Biotechnology, 7A: 37-62, 1987.
- John, W., Sons, I., Industrial Enzymes and Their Applications. United States of America. 454 p, 1998.
- Jorgensen, P.L., Hansen, C.K., Poulsen, G.B., Diderichsen, B., In vivo genetic engineering: Homologous recombination as a tool for plasmid construction. Gene, 96: 37-41, 1990.
- Jyoti, J., Lal, N., Lal, R., Kaushik, A., Partial purification and characterization of an acidophilic extracellular α -amylase from *Bacillus licheniformis* JAR-26. International Journal of Advanced Biotechnology and Research, 2 (3): 315-320, 2011.
- Keskin, H., Besin Kimyası. Cilt II. S : 558. Fatih Yayınevi, İstanbul, 1982.

- Khoo, S.L., Amirul, A.A., Kamaruzaman, M., Nazalan, N., Azizan, M.N., Purification and characterization of α -amylase from *Aspergillus flavus*. *Folia Microbiologica*, 39: 392-398, 1994.
- Kıran, Ö.E., Çömlekçioğlu, U. Zeytinli Ilıcası (Kahramanmaraş)'ndan termofil alkafilik amilolitik *Bacillus* sp. suslarının izolasyonu ve amilaz üretme yetenekleri üzerine azot kaynaklarının etkisi. *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi* 6 (2): 41-48, 2003.
- Kim, J., Nanmori, T., Shinke, R., Thermostable raw starch digesting amylase from *Bacillus stearothermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55: 1638-1639, 1989.
- Kirk, O., Borchert, T.V., Fuglsang, C.C., Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 345-351, 2002.
- Kneen, E., Sandstedt, R.M., Application of the Amylases in Milling and Baking Technology. (J.A. Anderson, Editör), *Enzyme and Their Role in Wheat Technology*. Interscience Publishers, Inc., New York, pp, 89-126, 1946.
- Krishnarau, L., Hosney, R.C., Enzymes increase loaf volume of bread supplemented with starch tailigs and insoluble pentosans. *Journal of Food Science*, 59, 1251-1254, 1994.
- Kumar, H.D., Nussinov, R., How do thermophilic proteins deal with heat? A review. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58: 1216-1233, 2001.
- Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685, 1970.
- Lee, B.H., *Fundamentals of Biotechnology*, VCH Publishers, USA, 431 p, 1996.
- Lee, S.P., Morikawa, M., Takagi, M., Imanaka, T., Cloning of the aapT gene and characterization of its product, α -amylase-pullulanase (AapT), from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. strain XAL601. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 3764-3773, 1994.
- Leveque, E., Janecek, S., Haye, B., Belarbi, A., Thermophilic archaeal amylolytic enzymes-catalytic mechanism, substrate specificity and stability. *Enzyme and Microbial Technology*, 26: 3-14, 2000.
- Li, W.F., Zhou, X.X., Lu, P., Structural features of thermozymes. *Biotechnology Advances*, 23: 271-281, 2005.

- Lin, H.Y., Tsay, S.S., Extracellular thermostable alpha-amylase from *Bacillus stearothermophilus* Q8. *Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi*, 20(4): 327-338, 1987.
- Lin, L.L., Chyau, C.C., Hsu, W.H., Production and properties of a raw-starch-degrading amylase from the thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. TS-23. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 28: 61-68, 1998.
- Lo, H.F., Lin, L.L., Chen, H.L., Hsu, W.H., Chang, C.T., Enzymatic properties of SDS resistant *Bacillus* sp. TS-23 alpha amylase produced by recombinant *E.coli*. *Process Biochemistry*, 36: 743-750, 2001.
- Loffler, A., Proteolytic enzymes: Source and applications. *Food Technology*, 40(1); 63-70, 1986.
- Madsen, G.B., Norman, B.E., Slott, S., A new heat-stable bacterial amylase and its use in high-temperature liquefaction. *Starke*, 25, 304, 1973.
- Mahdavi, A., Sajedi, R.H., Rassa, M., Jafarian, V., Characterization of an α -amylase with broad temperature activity from an acid-neutralizing *Bacillus cereus* strain. *Iranian Journal of Biotechnology*, 8 (2): 103-111, 2010.
- Mamo, G., Gessesse, A., Purification and characterization of two raw-starch digesting thermostable amylase from a thermophilic *Bacillus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 25: 433-438, 1999.
- Mielenz, J.R., Mickel, S., Process for Cloning the Gene Coding for a Thermostable α -Amylase into *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. United States Patent: 4,493,893, 1985.
- Miller, G.L., Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31: 426-428, 1959.
- Najafi, M.F., Deobagkar, D., Deobagkar, D., Purification and characterization of an extracellular α -amylase from *Bacillus subtilis* AX20. *Protein Expression and Purification*, 41: 349-354, 2005.
- Nakajima, R., Imanaka, T., Aiba, S., Nucleotide sequence of the *Bacillus stearothermophilus* α -amylase gene. *Journal of Bacteriology*, 163(1): 401-406, 1985.

- Negi, S., Banerjee, R., Characterization of amylase and protease produced by *Aspergillus awamori* in a single bioreactor. Food Research International. 42(4): 443-448, 2009.
- Nielsen, A.D., Pusey, M.L., Fuglsang, C.C., Westh, P., A proposed mechanism for the thermal denaturation of a recombinant *Bacillus halmopalus* alpha amylase- the effect of calcium ions. Biochimica et Biophysica Acta., 1652: 52-63, 2003.
- Nielsen, J.E., Borchert, V., Protein engineering of bacterial-amylases. Biochimica et Biophysica ACTA, 1543: 253-274, 2000.
- Nir, I., Nitsan, Z., Mahagna, M., Comparative growth and development of the digestive organs and some enzymes in broiler and egg type chicks after hatching. British Poultry Science, 34: 523-532, 1993.
- Ogasahara, K., Imanishi, A., Isemura, T., Studies on thermophilic α -amylases from *Bacillus stearothermophilus*, I. Some general and physiochemical properties of the thermophilic α -amylase. Journal of Biochemistry, 67: 65-75, 1970.
- Ohdan, K., Kuriki, T., Kaneko, H., Shimada, J., Takada, T., Fujimoto, Z., Mizuno, H., Okada, S., Characteristics of two forms of alpha-amylases and structural implication. Applied and Environmental Microbiology, 65(10): 4652-4658., 1999.
- Okafor N., Modern Industrial Microbiology and Biotechnology. Department of Biological Sciences Clemson University, South Carolina, 22: 398-406, 2007.
- Oriel, P., Schwacha, A., Growth on starch and extracellular production of thermostable amylase by *Escherichia coli*. Enzyme and Microbial Technology, 10: 42-46, 1988.
- Oyeleke, S.B., Oduwole, A.A., Production of amylase by bacteria isolated from a cassava waste dumpsite in Minna, Niger State, Nigeria. African Journal of Microbiology Research, 3 (4): 143-146, 2009.
- Özcan B.D., Sıcaklığa dirençli amilaz genlerinin klonlanması üzerine çalışmalar. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, pp. 8-10, 2005.
- Özcan, N., Protoplast füzyonu ile *Bacillus stearothermophilus*'a ait sıcaklık dirençli α -amilaz geninin *Bacillus subtilis* kromozomuna aktarılması. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 11 (4): 97-106, 1996.

- Özdemir A., Sidal U., *Streptomyces* sp. Mc10 suşunun alfa amilaz üretim kabiliyetinin belirlenmesi. Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 9: 139–146, 2013.
- Binod, P., Palkhiwala, P., Gaikawai, R., Nampoothiri, K.M., Duggal, A., Dey, K., Pandey, A., Industrial enzymes-present status and future perspectives for India, Journal of Scientific and Industrial Research, 72: 271-286, 2013.
- Parker, K., Salas, M., Nwosu, V.C. High fructose corn syrup: Production, uses and public health concerns. Biotechnology and Molecular Biology Review. 5 (5): 71–78, 2010.
- Pasin, T.M., Benassi, V.M., Moreira, E.A., Jorge, J.A., Polizeli, M.L.T.M., Prospecting filamentous fungi for amylase production: Standardization of *Aspergillus japonicus* culture conditions. British Biotechnology Journal, 4 (4): 482-489, 2014.
- Paulo, A. C., Gubitz, G. M., Textile processing with enzymes. CRC press, Cornwall, England. ISBN 1 85573 610 1, 2003.
- Pechan, P., Bukovska, G., Kovacova, D., Timko, J., Stability of the recombinant plasmids carrying the α -amylase gene in *Bacillus* strains. Biotechnology Letters, 11 (10): 723-728, 1989.
- Pfueller, S.L., Elliott, W.H., The extracellular α -amylase of *Bacillus stearothermophilus*. Journal of Biological Chemistry, 244: 48-54, 1969.
- Poyrazoğlu, A.G., Nişasta endüstrisi atık sularının bitki yetiştirilmesinde kullanım olanaklarının araştırılması. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Adana, 5, 2007.
- Rakshit, S.K., Utilization of starch industry wastes. In: Martin, A. (Ed.), Bioconversion of Waste Materials to Industrial Products, second ed. Blackie Academic and Professional, pp. 293-315, 1998.
- Rao, B.M., Tanksale, M.A., Ghatge, S.M., Deshpande, V.V., Vasanti, V.D. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62 (3): 597- 635, 1998.
- Rasooli, I., Astaneh, S.D.A., Borna, H., Barchini, K.A., A thermostable α -amylase producing natural variant of *Bacillus* spp. isolated from soil in Iran. American Journal of Agricultural and Biological Sciences, 3 (3): 591-596, 2008.

- Ray, B., *Fundamental Food Microbiology*. CRC press, Inc., New York, pp. 169-180, 1996.
- Satoh, H., Nishida, H., Isono, K., Evidence for movement of the α -amylase gene into two phylogenetically distant *Bacillus stearothermophilus*. *Journal of Bacteriology*, 170 (3): 1034-1040, 1988.
- Saul, D.J., Williams, L.C., Grayling, R.A., Chamley, L.W., Love, D.R., Bergquist, P.L., celB, a gene coding for a bifunctional cellulase from the extreme thermophile *Caldocellum saccharolyticum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 3117-3124, 1990.
- Scheirlinck, T., Mahillon, J., Joos, H., Dhaese, P., Michiels, F., Integration and expression of α -amylase and endoglucanase genes in the *Lactobacillus plantarum* chromosome. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(9): 2130-2137, 1989.
- Sharp, R.J., Scawen, M.D. Atkinson, T., Fermentation and down stream processing of *Bacillus*. In : Harwood CR (&d) *Bacillus*. *Biotechnology Handbooks*, Vol 2. Plenum Press, New York, pp. 255-292, 1989.
- Shibuya, I., Iimura, Y., Ishikawa, T., Oucki, K., Matsuyama, A., Yamamoto, T., Isolation and characterization of starch utilizing mutants of *Escherichia coli*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 50: 875-882, 1986.
- Sidhu, G.S., Sharma, P., Chakrabarti, T., Gupta, J.K., Strain improvement for the production of a thermostable α -amylase. *Enzyme and Microbial Technology*, 21: 525-530, 1997.
- Sniffen C.J., O'Conner, J.D., Van Soest, P.J., , Fox, D.G., Russell, J.B., A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *Journal of Animal Science*, 70(11): 3562-3577, 1992.
- Srivastava, R.A.K., Mathur, S.N. Baruah, J.N., Partial purification and properties of thermostable intracellular amylases from a thermophilic *Bacillus* sp. AK-2. *Acta Microbiologica Polonica*, 33 (1): 57-66, 1984.
- Srivastava, R.A.K., Purification and chemical characterization of thermostable amylases produced by *Bacillus stearothermophilus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 9: 749-754, 1987.

- Stark, E., Tetrault, P.A., Isolation bacterial, cell-free, starchsaccharifying enzymes from the medium at 70°C. *Journal of Bacteriology*, 62: 247-249, 1951.
- Syu M.J., Chen, Y.H., A study on the α -amylase fermentation performed by *Bacillus amyloliquefacien*. *Chemical Engineering Journal*, 65: 237-247, 1997.
- Şimşek T., Türkiye'nin değişik bölgelerinden termostabil α -amilaz üreten *Bacillus sp.* türlerinin izolasyonu, karakterizasyonu ve α -amilaz geninin klonlanması. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara, 8, 2006.
- Takasaki, Y., Frutanl, S., I-Iayashi, S., Imada, K., Acid-stable and thermostable a-amylase from *Bacillus licheniformis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 77(1): 94-96, 1994.
- Tanaka A., Hoshino E., Study on the substrate specificity of α -amylases that contribute to soil removal in detergents. *Journal of Surfactants and Detergents*, 2: 193-199, 1999.
- Tarakçıoğlu, Y., An amylase producing maltotriose from *Bacillus subtilis*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49(4):1091-1097, 1979.
- Thudt, K., Schleifer, K.H., Gotz, F., Cloning and expression of the α -amylase gene from *Bacillus stearothermophilus* in several staphylococcal species. *Gene*, 37(1-3): 163-169, 1985.
- Uhlig, H., Industrial enzymes and their applications. John Wiley&Sons, Inc. ISBN: 978-0-471-19660-0-454, 1998.
- Van Soest, P.J., Fiber and physico chemical properties of feeds in: Nutritional ecology of the ruminant. Second edition. Cornell University Press, 140-155, 1994.
- Vieille, C., Zeikus, G.J., Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65: 1-43, 2001.
- Vihinen, M., Mantsala, P., Microbial amylolytic enzymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 24: 329-418, 1989.
- Wind, R.D., Buitelaar, R.M., Eggink, G., Huizing, H.J., Dijkhuizen, L., Characterization of a new *Bacillus stearothermophilus* isolate: A highly thermostable a-amylase producing strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41: 155-162, 1994.

- Wiseman, A., Handbook of Enzymes Biotechnology. Second Edition. Chapter 3. The Application of Enzymes in Industry, pp. 274-373, 1987.
- Yamagata, H., Udaka, S., Starch-processing enzymes produced by recombinant bacteria. In: Recombinant Microbes for Industrial and Agricultural Applications, Murooka, Y., Imanaka, T. (Eds.). Marcel Dekker Inc., New York, pp: 325-340, 1994.
- Yang, S-J., Lee, H-S., Park, C-S., Kim, Y-R., Moon, T-W., Park, K-H., Enzymatic analysis of an amylolytic enzyme from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* reveals its novel catalytic properties as both an α -amylase and a cyclodextrin-hydrolyzing enzyme. Applied and Environmental Microbiology, 70 (10): 5988-5995, 2004.
- Zeikus, J.G., Thermophilic bacteria: ecology, physiology and technology. Enzyme and Microbial Technology 1: 243-252, 1979.
- Zeman, N.W. and McCrea, J.M., Alpha-amylase production using a recombinant DNA organism. Cereal Foods World, 30 (1) : 777-780, 1985.
- Zemek J., Augustin J., Borris R., Kuniak L., Švaboa M., Pacova Z., Polysaccharide-hydrolyzing enzymes in the genus *Bacillus*. Folia Microbiol, 26: 403-407, 1981.
- Zhang, C., Xing, X.H., Liu, M.S., Production of multienzymes consisting of alkaline amylase and cellulase by mixed alkalophilic culture and their potential use in the saccharification of sweet potato. Biochemical Engineering Journal, 181-187, 2004.
- “From Wikipedia, the free encyclopedia, 2014” Erişim adresi: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Bacillus_subtilis_Gram.jpg, Erişim tarihi: 18.05.2014.
- “Susta Innovation Journal, 2014” Erişim adresi: <http://sustainnovation.net/duPontdan-surdurulebilir-tekstil-islemleri-icin-cozumler/>. Erişim tarihi: 30.05.2014.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Celal TÜRKER
Doğum Tarihi : 10.03.1975
E-Posta Adresi : fakioglutarim@hotmail.com

Öğrenim Durumu :

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Bitirme Yılı
Lise	Dörtyol Lisesi		1993
Lisans	Toprak Bölümü Ziraat Fakültesi	Çukurova Ün.	1998

İş Tecrübesi :

Görev Ünvanı	Görev Yeri	Yıl
Zirai İlaç Bayii (Ziraat Müh.)	Dörtyol/Hatay	2014-
TARSİM Havuz Eksperi (Ziraat Müh.)	ADANA Bölge Müd.	2014-
Toprak Koruma Projesi Uzmanı (Ziraat Müh.)	Akdeniz Bölgesi	2014-