

T.C.
SİİRT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bacillus mojavensis ve *Bacillus vallismortis*'ten ALFA-AMİLAZ ÜRETİMİ,
SAFLAŞTIRILMASI ve KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Adem KARAKAYA
(133104002)

Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Sadi ÖZDEMİR
Ortak Danışman: Yrd. Doç. Dr. Erdal ÖĞÜN

Haziran-2016
SİİRT

TEZ KABUL VE ONAYI

Adem KARAKAYA tarafından hazırlanan “*Bacillus mojavensis* ve *Bacillus vallismortis*’ten Alfa-Amilaz Üretimi, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu” adlı tez çalışması 02/06/16 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği/oyçokluğu ile Siirt Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan

Doç. Dr. Abdurrahman DÜNDAR

Danışman

Doç. Dr. Sadi ÖZDEMİR

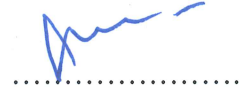
Üye

Doç. Dr. Veysi OKUMUŞ

İmza


.....


.....


.....

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum.


Doç. Dr. Koray ÖZRENK
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışması Siirt Üniversitesi BAP Birimi tarafından 2015-SİÜFEB-08 nolu proje ile desteklenmiştir.

ÖN SÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleriyle her türlü desteği sağlayan ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam sayın Doç. Dr. Sadin ÖZDEMİR'e teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarında yardımlarıyla her zaman yanımda olan hocalarım sayın Doç. Dr. Veysi OKUMUŞ'a, Yrd. Doç. Dr. M. Emre EREZ'e, Yrd. Doç. Dr. Lokman KAYCI'ya ve Uzman Mehmet FİDAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Saflaştırma aşamasında yardımlarını gördüğüm, Dicle Üniversitesi Öğretim Üyesi sayın Yrd. Doç. Dr. Sema FİNCAN AGÜLOĞLU ve Bingöl Üniversitesi Öğretim Üyesi sayın Yrd. Doç. Dr. Barış ENEZ'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımın her aşamasında yanımda olan ve maddi-manevi desteklerini eksik etmeyen Biyoloji Bölümü Yüksek Lisans arkadaşlarım M. Kadir ODUNCU'ya, Yusuf TEĞİN'e ve Cahit ELMA'ya, ayrıca Veli ŞAHİN'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın yürütülmesinde maddi destek sağlayan Siirt Üniversitesi BAP Birimi'ne ve sağlanan olanaklar nedeniyle Biyoloji Bölümüne teşekkürlerimi sunarım.

Sabır ve destekleriyle her zaman yanımda olmalarından dolayı başta eşim Çiğdem KARAKAYA olmak üzere oğullarım Onur Emre KARAKAYA ve Ahmet Mert KARAKAYA'ya sevgilerimi sunarım.

Adem KARAKAYA
SİİRT-2016

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖN SÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	viii
KISALTMALAR VE SİMGELERLİSTESİ.....	x
ÖZET.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Biyoteknoloji.....	1
1.1.1. Biyoteknolojik uygulamalar.....	1
1.2. Enzim Biyoteknolojisi.....	2
1.3. Nişasta ve Nişasta Endüstrisi.....	3
1.4. α -Amilaz Enziminin Genel Özellikleri.....	4
1.5. α -Amilaz Enziminin Biyoteknolojik Kullanım Alanları.....	7
1.5.1. α -Amilazların ekmekçilikte kullanımı.....	7
1.5.2. α -Amilazların deterjan sanayinde kullanımı.....	7
1.5.3. α -Amilazların tekstil sanayinde kullanımı.....	8
1.5.4. α -Amilazların sağlık alanında kullanımı.....	8
1.5.5. α -Amilazların kağıt sanayinde kullanımı.....	8
1.5.6. α -Amilazların meyve suyu sanayinde kullanımı.....	8
1.5.7. α -Amilazların yem sanayinde kullanımı.....	9
1.6. <i>Bacillus</i> Cinsi.....	9
1.6.1. <i>Bacillus mojavensis</i> ve <i>Bacillus vallismortis</i>	9
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI.....	11
3. MATERYAL VE METOT.....	24
3.1. Biyolojik Materyal.....	24
3.2. Kimyasal Maddeler.....	24
3.2.1. Azot kaynakları.....	24
3.2.2. Karbon kaynakları.....	24
3.2.3. Besiyeri maddeleri.....	24
3.2.4. Deterjanlar.....	24
3.2.5. Elektroforetik maddeler.....	24
3.3. Besiyerleri.....	25
3.3.1. Sıvı besiyeri [Nutrient broth (NB)].....	25
3.3.2. Katı besiyeri.....	25
3.4. Tamponlar.....	25
3.5. Kullanılan Aletler.....	25

3.6. Bakteri İzolasyon İşlemi ve Saf Kültür Bakteri Üretimi	26
3.7. Bakteri Üretimi	26
3.8. Gram Boyama.....	26
3.9. Antibiyotiklere Karşı Duyarlılık Testi.....	27
3.10. Katalaz Testi	27
3.11. Oksidaz Testi	27
3.12. API 20 NE	28
3.13. Enzim Eldesi.....	28
3.14. Enzim Aktivite Tayini (Bernfeld Yöntemi)	28
3.14.1. Bernfeld reaktifinin hazırlanması	28
3.15. Protein Miktar Tayini	29
3.15.1. Alkalın çözeltisinin hazırlanışı	29
3.16. Farklı İnkübasyon Sürelerinin α -Amilaz Üretimi Üzerine Etkisinin Araştırılması	29
3.17. Farklı Sıcaklık Değerlerinin (20-60 °C) α -Amilaz Üretimi Üzerine Etkisinin Araştırılması	29
3.18. Farklı pH Değerlerinin (pH: 3.0-11.0) α -Amilaz Üretimi Üzerine Etkisinin Araştırılması	30
3.19. Farklı NaCl Konsantrasyonlarının α -Amilaz Üretimi Üzerine Etkisinin Araştırılması	30
3.20. Farklı Karbon Kaynaklarının α -Amilaz Üretimi Üzerine Etkisinin Araştırılması	30
3.21. Farklı Azot Kaynaklarının α -Amilaz Üretimi Üzerine Etkisinin Araştırılması	30
3.22. Farklı Sürfaktanların α -Amilaz Üretimi Üzerine Etkisinin Araştırılması	31
3.23. Farklı Tarımsal Atıkların α -Amilaz Üretimi Üzerine Etkisinin Araştırılması ..	31
3.24. Farklı Metallerin α -Amilaz Üretimi Üzerine Etkisinin Araştırılması	31
3.25. Enzim Saflaştırılması.....	31
3.25.1. α -Amilaz enziminin saflaştırılması	31
3.26. Farklı Sıcaklık Değerlerinin Saflaştırılmış α -Amilaz Aktivitesi ve Stabilitesi Üzerine Etkisinin Araştırılması	33
3.27. Farklı pH Değerlerinin Saflaştırılmış α -Amilaz Aktivitesi ve Stabilitesi Üzerine Etkisinin Araştırılması.....	33
3.28. Farklı NaCl Konsantrasyonlarının Saflaştırılmış α -Amilaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Araştırılması.....	33
3.29. Saflaştırılmış α -Amilaz Aktivitesi Üzerine Bazı Metallerin Etkisinin Araştırılması	33
3.30. Saflaştırılmış α -Amilazın Farklı Nişastalardaki Aktivitesinin Araştırılması	34
3.31. Farklı Etanol ve β -Merkaptoetanol Konsantrasyonlarında Saflaştırılmış α -Amilaz Aktivitesinin Araştırılması.....	34
3.32. İnce-Tabaka Kromatografisi (TLC)	34
3.33. %1'lik Ham Nişastanın Saflaştırılmış α -Amilaz Tarafından Parçalanması ve Işık Mikroskopunda Görüntülenmesi.....	34
3.34. %0.5'lik Farklı Deterjanların α -Amilaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Araştırılması	35
3.35. Çözünür ve Çözünür Olmayan Nişasta Tayini.....	35
3.36. Elektroforez	36
3.36.1. Nondenatüre poliakrilamid jel elektroforezi (Laemmli)	36
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	37

4.1. Biyokimyasal Testler	37
4.1.1. Gram boyama	37
4.1.2. Katalaz testi	38
4.1.3. Oksidaz testi	38
4.1.4. Antibiyotiklere duyarlılık testi	39
4.1.5. API 20 NE testi.....	40
4.2. Farklı İnkübasyon Sürelerinin α -Amilaz Üretimi Üzerine Etkisinin Araştırılması	42
4.3. Farklı Sıcaklık Değerlerinin α -Amilaz Üretimi Üzerine Etkisinin Araştırılması	44
4.4. Farklı pH Değerlerinin α -Amilaz Üretimi Üzerine Etkisinin Araştırılması.....	45
4.5. Farklı NaCl Konsantrasyonlarının α -Amilaz Üretimi Üzerine Etkisinin Araştırılması	46
4.6. Farklı Azot Kaynaklarının α -Amilaz Üretimi Üzerine Etkisinin Araştırılması ..	47
4.7. Farklı Karbon Kaynaklarının α -Amilaz Üretimi Üzerine Etkisinin Araştırılması	48
4.8. Farklı Sürfaktanların α -Amilaz Üretimi Üzerine Etkisinin Araştırılması	49
4.9. Farklı Tarımsal Atıkların α -Amilaz Üretimi Üzerine Etkisinin Araştırılması	50
4.10. Farklı Metallerin α -Amilaz Üretimi Üzerine Etkisinin Araştırılması	51
4.11. <i>Bacillus vallismortis</i> ve <i>Bacillus mojavensis</i> 'ten Elde Edilen α -Amilazların Saflaştırılması ve Kinetiği	53
4.12. Farklı Sıcaklık Değerlerinin α -Amilaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Araştırılması	56
4.13. Farklı pH Değerlerinin α -Amilaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Araştırılması...	57
4.14. Farklı Sıcaklık Değerlerinin Zamana Bağlı Olarak α -Amilaz Stabilitesine Etkisi	59
4.15. Farklı pH Değerlerinin Zamana Bağlı Olarak α -Amilaz Stabilitesi Üzerine Etkisi.....	60
4.16. Farklı NaCl Konsantrasyonlarının α -Amilaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	62
4.17. Farklı Metallerin α -Amilaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	63
4.18. <i>B. vallismortis</i> ve <i>B. mojavensis</i> 'ten Elde Edilen α -Amilazın Farklı Nişastalardaki Aktivitesinin İncelenmesi	65
4.19. Etanol ve β -Merkaptoetanol Varlığında <i>B. vallismortis</i> ve <i>B. mojavensis</i> 'ten Elde Edilen α -Amilazların Aktivitelerinin İncelenmesi	66
4.20. <i>B. vallismortis</i> ve <i>B. mojavensis</i> 'ten Elde Edilen Saflaştırılmış α -Amilazların Çözünür Nişasta Substrat Olarak Kullanılarak İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) Yöntemiyle Son Ürünlerin Tespit Edilmesi	67
4.21. Ham Nişasta Parçalama	70
4.22. Farklı Sürfaktan ve Deterjanların α -Amilaz Aktivitesine Etkilerinin İncelenmesi	72
4.23. Elma Suyu Nişasta İçeriği ve Berraklaştırılması	74
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	76
5.1. Sonuçlar	76
5.2. Öneriler	82
6. KAYNAKLAR.....	83
ÖZGEÇMİŞ	91

TABLULAR LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1.1. Kullanım alanlarına göre biyoteknolojik öneme sahip bazı enzimler	3
Tablo 4.1. Antibiyotiklere duyarlılık testi	40
Tablo 4.2. API 20NE testi.....	42
Tablo 4.3. Bazı metallerin α -amilaz üretimine etkileri.....	52
Tablo 4.4. <i>B. vallismortis</i> 'ten α -amilaz saflaştırılması.....	54
Tablo 4.5. <i>B. mojavensis</i> 'ten α -amilaz saflaştırılması.....	54
Tablo 4.6. 0.3 ve 1.5 mM konsantrasyondaki bazı metallerin α -amilaz aktivitesi üzerine etkileri	65
Tablo 4.7. Farklı etanol ve β -merkaptetanol konsantrasyonlarında α -amilaz aktivitesi.....	67

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1. Amiloz ve amilopektin yapıları.....	6
Şekil 1.2. Amilazın nişastayı hidrolizi sonucunda oluşan ürünler	6
Şekil 4.1. <i>Bacillus vallismortis</i> gram boyama.....	37
Şekil 4.2. <i>Bacillus mojavensis</i> gram boyama.....	37
Şekil 4.3. <i>Bacillus vallismortis</i> oksidaz testi.....	38
Şekil 4.4. <i>Bacillus mojavensis</i> oksidaz testi.....	38
Şekil 4.5. <i>Bacillus vallismortis</i> antibiyotik duyarlılık testi	39
Şekil 4.6. <i>Bacillus mojavensis</i> antibiyotik duyarlılık testi	39
Şekil 4.7. <i>Bacillus vallismortis</i> API 20 NE testi	41
Şekil 4.8. <i>Bacillus mojavensis</i> API 20 NE testi	41
Şekil 4.9. Farklı inkübasyon sürelerinde α -amilaz üretimi	43
Şekil 4.10. Farklı sıcaklık değerlerinde α -amilaz üretimi	45
Şekil 4.11. Farklı pH değerlerinde α -amilaz üretimi.....	46
Şekil 4.12. Farklı NaCl konsantrasyonlarında α -amilaz üretimi.....	46
Şekil 4.13. Farklı azot kaynaklarında α -amilaz üretimi	48
Şekil 4.14. Farklı karbon kaynaklarında α -amilaz üretimi.....	49
Şekil 4.15. Farklı surfaktanlarda α -amilaz üretimi.....	50
Şekil 4.16. Tarımsal atıkların α -amilaz üretimi üzerine etkisi	51
Şekil 4.17. <i>B. vallismortis</i> 'ten elde edilen saflaştırılmış α -amilazın SDS-PAGE ile molekül ağırlığının saptanması.....	55
Şekil 4.18. <i>B. mojavensis</i> 'ten elde edilen saflaştırılmış α -amilazın SDS-PAGE ile molekül ağırlığının saptanması.....	55
Şekil 4.19. Farklı sıcaklık değerlerinde α -amilaz aktivitesi	57
Şekil 4.20. Farklı pH değerlerinde α -amilaz aktivitesi	58
Şekil 4.21. <i>B. vallismortis</i> α -amilazının farklı sıcaklık değerlerinde zamana bağlı sıcaklık stabilitesi	60
Şekil 4.22. <i>B. mojavensis</i> α -amilazının farklı sıcaklık değerlerinde zamana bağlı sıcaklık stabilitesi	60
Şekil 4.23. <i>B. vallismortis</i> α -amilazının farklı pH değerlerinde zamana bağlı stabilite tayini	62
Şekil 4.24. <i>B. mojavensis</i> α -amilazının farklı pH değerlerinde zamana bağlı stabilite tayini	62
Şekil 4.25. Farklı NaCl ₂ konsantrasyonlarında α -amilaz aktivitesi	63
Şekil 4.26. Farklı nişastalarda α -amilaz aktivitesi	66
Şekil 4.27. <i>B. vallismortis</i> 'ten saflaştırılan α -amilazın çözünür nişasta ile zamana bağlı oluşan son ürünlerin İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) ile gösterimi ..	69
Şekil 4.28. <i>B. mojavensis</i> 'ten saflaştırılan α -amilazın çözünür nişasta ile zamana bağlı oluşan son ürünlerin İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) ile gösterimi ..	69
Şekil 4.29. <i>B. vallismortis</i> 'ten saflaştırılmış α -amilazın ham buğday ve mısır nişastalarını hidrolizi	71
Şekil 4.30. <i>B. mojavensis</i> 'ten saflaştırılmış α -amilazın ham buğday ve mısır nişastalarını hidrolizi	71
Şekil 4.31. Farklı deterjanların ve surfaktanların <i>B. vallismortis</i> α -amilaz aktivitesine etkisi.....	73
Şekil 4.32. Farklı deterjanların ve surfaktanların <i>B. mojavensis</i> α -amilaz aktivitesine etkisi.....	73

- Şekil 4.33.** *B. vallismortis* α -amilazının kırmızı ve yeşil elma çözünür nişasta içeriğini hidroliz oranları 75
- Şekil 4.34.** *B. mojavensis* α -amilazının kırmızı ve yeşil elma çözünür nişasta içeriğini hidroliz oranları 75

KISALTMALAR VE SİMGELERLİSTESİ

<u>Kısaltma</u>	<u>Açıklama</u>
PYE	: Peptonlu Maya Ekstraktı
SD	: Siklodekstrin
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PMSF	: Fenilmetil Sülfonil Florür
SSF	: Katı-Faz Fermantasyonu
EDTA	: Etilen diamin tetraasetik Asit
EGTA	: Etilen Glikol Tetraasetik Asit
BSG	: Birada Kullanılan Tahıl
CHAPS	: [3-[(3-Colamidopropyl) Dimethyl-Lammonio]-1-Propanesulfonate]
CFU	: Koloni Oluşturan Birim
BBD	: Box-Behnken Dizaynı
APS	: Amonyum Persülfat
BFB	: Brom Fenol Blue
NB	: Nurtient Broth
NADH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
3,5 DNS	: 3,5 Dinitro Salisilik Asit
BSA	: Bovim Serum Albümin
FCR	: Folin Ciocalteu Reaktifi
DEAE	: Dietilaminoetil
TLC	: Thin Layer Chromatography
Rh	: Ham Nişasta Hidroliz Oranı
A₀	: Reaksiyondan Önce Ham Nişasta Miktarı
A₁	: Reaksiyonundan Sonra Süpernatant İçindeki Şeker Miktarı
TEMED	: N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine
S	: Duyarlı
I	: Orta Duyarlı
R	: Direnç
U/mL	: Ünite/mililitre
mM	: Millimolar
v/w	: Hacim/ağırlık
w/w	: Ağırlık/ağırlık
v/v	: Hacim/hacim
U/mg	: Ünite/miligram
kDa	: Kilo dalton
U/g	: Ünite/gram
nm	: Nanometre
mL	: Mililitre
mA	: Miliamper
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre

<u>Simge</u>	<u>Açıklama</u>
%	: Yüzde
β	: Beta
α	: Alfa
$^{\circ}\text{C}$: Santigrat derece

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bacillus mojavensis ve *Bacillus vallismortis*'ten ALFA-AMİLAZ ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI ve KARAKTERİZASYONU

Adem KARAKAYA

Siirt Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Sadin ÖZDEMİR

Ortak Danışman: Yrd. Doç. Dr. Erdal ÖĞÜN

2016, 91 Sayfa

Bu çalışmada, Şırnak (Meryemderesi) sıcak su kaynağı çamurundan izole edilen termotolerant *Bacillus vallismortis* ve *Bacillus mojavensis* kullanıldı. İnkübasyon zamanı, sıcaklık, pH, karbon ve azot kaynakları, farklı metal iyonları, tarımsal atıklar (muz, elma ve portakal kabuğu, arpa kepeği ve fasulye küsbesi), tuz konsantrasyonu, farklı surfaktanlar gibi çeşitli parametrelerin α -amilazların üretimi üzerine etkisi çalışıldı. *B. vallismortis* ile α -amilaz üretimi için optimum inkübasyon zamanı, sıcaklık ve pH sırasıyla 36. saat, 35 °C ve 7.0 olarak bulunurken, *B. mojavensis* ile α -amilaz üretimi için optimum inkübasyon zamanı, sıcaklık ve pH sırasıyla 36. saat, 35 °C ve 6.0 olarak bulundu. Kontrol ile karşılaştırıldığında, *B. vallismortis*'te Mn(II) ve Ca(II) varlığında α -amilaz üretimi yaklaşık %10 ve Triton-X100 ve Tween-20 ile sırasıyla %8.2 ve %12.4 yükseldi. Optimum koşullarda fermentasyon ortamına %0.05 Tween-20 eklendiğinde, *B. mojavensis* için en yüksek α -amilaz üretimi 4282.6 U/mg olarak belirlendi. *B. vallismortis* ve *B. mojavensis*'ten elde edilen α -amilazlar sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve dietilaminoetil (DEAE) selüloz iyon değiştirici kromatografisi ile saflaştırıldı. α -Amilazlar *B. vallismortis* için 51 kat ve %30 verimle ve *B. mojavensis* için 34 kat ve %18 verimle saflaştırıldı. Saflaştırılmış α -amilazların molekül ağırlığı *B. vallismortis* ve *B. mojavensis* için sırasıyla 74 kDa ve 73 kDa olarak saptandı. *B. vallismortis*'ten elde edilen α -amilaz sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve dietilaminoetil (DEAE) selüloz iyon değiştirici kromatografisi ile saflaştırıldı. Saflaştırılmış α -amilazların molekül ağırlıkları *B. vallismortis* ve *B. mojavensis* için sırasıyla 74 kD ve 73 kD olarak bulundu. Saflaştırılmış enzimlerin aktivitesi üzerine sıcaklık ve sıcaklık stabilite, pH ve pH stabilite, inhibitörler ve metaller etkisi denendi. Bu α -amilazların ham mısır ve buğday nişastalarına karşı iyi bir hidroliz oranı gösterdiği belirlendi. Çözünür nişasta son hidroliz ürünleri ince tabaka kromatografisi (TLC) ile analiz edildi. Hidroliz ürünlerinde glukoz (G1), maltoz (G2), maltotrioz (G3), maltotetroz (G4) ve maltooligosakkaritler vardı. Bunlara ilaveten saflaştırılmış α -amilazların elma suyu berraklaştırılması ve ev tipi çamaşır deterjanları endüstrilerinde kullanımı test edildi.

Anahtar Kelimeler: α -Amilaz, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus vallismortis*, deterjan, elma suyu berraklaştırılması, ham nişasta, ince tabaka kromatografisi (TLC)

ABSTRACT

MS THESIS

ALPHA AMYLASE PRODUCTION, PURIFICATION and CHARACTERIZATION of *Bacillus mojavensis* and *Bacillus vallismortis*

Adem KARAKAYA

The Graduate School of Natural and Applied Science of Siirt University
The Degree of Master of Science
In Biology

Supervisor : Assoc. Prof. Sadin ÖZDEMİR

Co-Supervisor : Asst. Prof. Erdal ÖĞÜN

2016, 91 Pages

In this study, a novel thermotolerant *Bacillus vallismortis* and *Bacillus mojavensis* was isolated from thermal springs mud sample in Sirnak (Meyremderesi), Turkey. Influences of various parameters such as incubation time, temperature and pH, carbon and nitrogen sources, various metal ions, agriculture wates (banana, apple, and orange husk, barley bran, and bean pulp), NaCl concentration, different surfactants on α -amylases production were examined. The optimum incubation time, temperature and pH for production of α -amylase was found 36th, 35 °C and 7.0, respectively by *B. vallismortis* while the optimum temperature and pH for amylase production was found to be 35°C at pH 6.0 by *B. mojavensis*. When compared with control, the amylase production increased approximately 10% in presence of Mn(II) and Ca(II) and 8.2% and 12.4% with Triton-X100 and Tween-20, respectively for *B. vallismortis*. The highest α -amylase production was determined as 4282,6 U/mg for *B. mojavensis* when 0.05% Tween-20 was added to fermentation medium under the optimum conditions. Thermostable α -amylases obtained from *B. vallismortis* and *B. mojavensis*, were purified using 70% ammonium sulfate precipitation, dialysis, and diethylaminoethyl (DEAE) cellulose ion exchange chromatography, respectively. The α -amylases were purified with a 51-fold and 30% yield for *B. vallismortis* and 34-fold and 18% yield for *B. mojavensis*, respectively. The molecular masses of purified α -amylases were found as 74 kD and 73 kD for *B. vallismortis* and *B. mojavensis*, respectively. Effect of temperature and temperature stability, pH and pH stability, inhibitors and some metal ions on purified α -enzymes activity were experimented. It was revealed good hydrolyzing rate towards to raw starches of corn and wheat for both α -amylases. The end-yields of soluble starch hydrolysis were analyzed by thin-layer chromatography (TLC). The hydrolysis products were glucose (G1), maltose (G2), maltotriose (G3), maltotetraose (G4), and maltooligosaccharides. In addition to these, the usage of purified α -amylases in clarifacation of apple juice and domestic washing detergents industries were tested.

Key words: α -Amylase, apple juice clarification, detergents, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus vallismortis*, raw starch, thin-layer chromatography (TLC)

1. GİRİŞ

1.1. Biyoteknoloji

Biyoteknoloji; insanlık için yararlı ürünlerin elde edilebilmesi amacıyla biyolojik sistemlerin üretimi, işlenmesi, kontrolü ve manipasyonu olarak tanımlanabilir. Biyoteknolojik uygulamalarda temel bilimlerin yanında mühendislik bilimlerinden de faydalanılmaktadır. Bu uygulamalar; mikrobiyoloji, biyokimya, moleküler biyoloji, hücre biyolojisi, immünoloji, genetik mühendisliği, protein mühendisliği ve enzimoloji gibi farklı alanları bünyesinde toplar.

Biyoteknolojinin çalışma alanını insanlığın temel problemleri oluşturur. Protein üretimi, temiz enerji kaynakları, insan sağlığını koruyucu bileşiklerin üretilmesi, salgın hastalıklarla mücadele ve çevreye zararlı atıkların bertarafı bu çalışma alanlarına örnek olarak verilebilir.

Biyoteknoloji, temel buluşlarını kısa zamanda faydalı ticari ürünlere dönüştürebilmesiyle kendi talebini de oluşturabilir. Bu anlamda diğer teknolojilerden ayrılabilir. Örneğin, termofilik bir bakteri olan *Thermus aquaticus*'tan elde edilen bir enzim olan Taq Polimeraz enzimi PCR'nin önemli bir girdisidir (Çaplan, 2011).

1.1.1. Biyoteknolojik uygulamalar

- İnsan sağlığına yönelik olarak proteinlerin üretilmesi,
- Kanser ve AIDS gibi birçok hastalığın tedavisi ve önlenmesinde kullanılacak genetik ürünlerin elde edilmesi,
- Çok uç şartlara sahip ortamlarda (sıcak, kurak, tuzlu, vb.) yaşayan organizmaların enzimlerini ve biyomoleküllerini saflaştırarak bunların çeşitli endüstrilerde kullanılması,
- Bazı metabolik sorunlara ya da bulaşıcı hastalıklara karşı koyacak proteinlerin üretimi,
- İnsanlardaki zararlı genlerin elemine edilmesi,
- Bazı hormon, antikor, vitamin ve antibiyotiklerin üretilmesi,
- Aşı, pestisit ve tıbbi bitki üretimi,
- Hasar görmüş beyin hücrelerinin ve omuriliğin onarımı,
- Yeni sebze ve meyve üretimi,

- Organik atıkları metabolize edecek bakterilerin elde edilmesi gibi işlemler biyoteknolojik uygulamalara örnek olarak verilebilir.

1.2. Enzim Biyoteknolojisi

Enzimler; canlı hücreler tarafından sentez edilen, kimyasal tepkimelerde katalizör görevi yapan, genellikle protein yapısında olan moleküllerdir. Enzimler değişikliğe uğramadan aktivasyon enerjisini düşürürler, tepkimelerin hızını ve özgülüğünü düzenleyebilirler (Bhat, 2000).

Enzimler uzun zaman önce ekmek yapımı, peynir ve alkol üretimi gibi biyoteknolojik işlemlerde kullanılsa da, özelliklerinin anlaşılması yakın tarihte olmuştur. 1783 yılında Spallanzani'nin atmaca mide suyunun eti parçaladığını bulması, 1811 yılında Kirchoff'un buğday nişastasının zamanla dekstrin ve şekerlere dönüştüğünü belirlemesi, 1830 yılında Robiquet, Boutron ve Chalan'nın amigdalinin acı badem tarafından hidrolize edildiğini bulması enzim teknolojisi ile ilgili önemli adımlar olmuştur (Çalışkan, 2011).

Modern enzim teknolojisi, 1874 yılında Danimarkalı kimyager Christian Hansen'in tuz ekstraksiyonuyla kurutulmuş sığır midelerinden rennet enzimini elde etmesi ile başlamıştır. Bu ürün, endüstriyel amaçla üretilmiş ve saf denilebilecek ilk enzimdir (Tanyıldızı, 2005).

1876'da Kühne, canlı organizmalardan elde edilen fermentler için "enzim" terimini kullanmıştır. 1897'de Eduard Buchner, içinde canlı hücre bulunmayan maya özütünün şekeri fermante etme yeteneği olduğunu göstermiştir. Enzimlerin hücre dışında aktivitesinin gösterilmesinin ardından bu alandaki çalışmalar geliştirilerek devam etmiştir.

Endüstriyel uygulamalarda enzim kaynağı olarak bitkisel, hayvansal ve mikroorganizma kökenli enzimler kullanılabilir. Bugün endüstriyel alanda kullanılan enzimler çoğunlukla mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Mikroorganizmaların daha hızlı, yüksek oranda ve yüksek saflıkta üretilmeleri, üretim maliyetlerinin daha ekonomik olması, mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin daha yüksek aktiviteye sahip olması, daha stabil olması ve daha az yan ürün oluşturmaları gibi avantajları nedeniyle, enzim kaynağı olarak mikroorganizmalar tercih edilmektedir (Wiseman, 1987; Horikoshi, 1999).

Çeşitli endüstrilerde enzimlerin kullanımları incelendiğinde, geniş bir kullanım alanına ve bu alanlarda oldukça yüksek pazar payına sahip oldukları görülmektedir. Enzimler deterjan sanayinde %37, tekstil sanayinde %12, nişasta endüstrisinde %11, ekmekçilikte %8, hayvan yemi sanayinde %6 ve toplamda %75'lik pazar payına sahiptir (Tanyıldızı, 2007).

Dünya genelinde, mikroorganizma kaynaklı enzimlerin ticari olarak kullanılan enzimlere oranı incelendiğinde; alkali proteazların %25, diğer proteazların %21, amilazların %18, reninin %10, tripsinin %3, lipazın %3 ve diğer karbonhidrat parçalayan enzimlerin %10 oranında kullanıldığı görülmektedir (Kıran ve Çömlekçioğlu, 2003).

Tablo 1.1. Kullanım alanlarına göre biyoteknolojik öneme sahip bazı enzimler

ENZİM	SUBSTRAT	KATALİZE EDİLEN REAKSİYON	KULLANIM ALANI
α -Amilaz	Nişasta	Nişasta→Dekstroz Şurubu	Ekmekçilik, bira, deterjan, maltoz üretimi
Kitinaz	Kitin	Kitin→Kitobiyoz	Gıda, kozmetik, ilaç, tarım
Pullulanaz	Nişasta	Nişasta→Dekstroz Şurubu	Glukoz şurubu üretimi
Ksilanaz	Arabinoksilan	Kağıt hamuru→Ksilan+Lignin	Kağıt endüstrisi
Proteaz	Protein	Protein→Aminoasit+pepetid	Ekmekçilik, bira, deterjan, dericilik
Selülaz	Selüloz	Selüloz→Glukoz	Selüloz hidrolizi, deterjanlarda polimer bozulma
Lipaz	Katı ve sıvı yağ	Yağ→Yağ asidi+Gliserol	İlaç, kozmetik, deri, deterjan, süt
Laktaz	Laktoz	Laktoz→Glukoz+Galaktoz	Süt endüstrisi
Katalaz	Hidrojen peroksit	Katalaz→H ₂ O ₂ +H ₂ O	Kauçuk endüstrisi

1.3. Nişasta ve Nişasta Endüstrisi

Nişasta; tohumlar, yumrular ve çeşitli bitkilerde bulunan bir depo polisakarittir. Nişasta, doğrusal glukoz monomerlerinin α -1,4 bağları ile oluşan amiloz polimeri ile

yine glukoz monomerlerinin α -1,4 ve α -1,6 bağları ile dallanmış bir polimeri olan amilopektin olmak üzere iki bileşenden oluşur (Muralikrishna ve Nirmala, 2005).

Nişasta suda çözünmez granüllerden oluşmaktadır ve tüm yüksek bitkiler için karbonhidrat depo kaynağıdır. Nişastayı meydana getiren granüllerin şekli ve büyüklüğü bitki türlerine göre değişmektedir (Maarel ve ark., 2002).

Nişastanın karmaşık yapısı nedeniyle oligosakkaritlere, maltoz ve glukoz gibi daha küçük şekerlere yıkımı için uygun enzim kombinasyonlarına ihtiyaç duymaktadır (Bertoldo ve Antranikian, 2002).

Dekstrin, nişastanın α -amilaz enzimi ile hidroliz edilmesiyle oluşan kısa moleküllü ilk üründür. Çözünürlüğü yüksek, yoğun şurup kıvamında bir madde olup, gıda sanayinde kıvam arttırıcı dolgu maddesi olarak kullanılmaktadır.

Nişastanın glukozu kadar parçalanması, dekstrinler oluşuktan sonra, ortama glikoamilazın eklenmesiyle sağlanmaktadır. Oluşan glukoz, şurup ya da kristal halde elde edilebilir. Glukoz şurubuna glukozizomeraz enzimi eklenmesiyle fruktozlu şurup üretimi yapılmaktadır. Tatalandırıcı özelliği yüksek olan fruktoz şurupları; meyve suyu, süt, ekmek, pasta ve şekerleme imalatı ile konservecilik gibi alanlarda kullanılmaktadır (Tatar, 2007).

Nişastanın maltoza kadar parçalanması, önce α -amilaz enzimi ile sıvılaştırılıp, sonra ortama izoamilaz ve pullulanaz enzimlerinin eklenmesi ile meydana gelmektedir. Oluşan maltoz tatlandırıcı olarak kullanılmasının yanında reçel, şekerleme, ekmek ve bira imalatında da kullanılmaktadır. Nişastanın parçalanması sırasında maltotetroz yan ürün olarak açığa çıkmaktadır. Oluşan maltotetroz ise nem tutucu olarak kullanılmaktadır (Tatar, 2007).

Nişasta kolay ulaşılabilirliği ve ucuz bir kaynak olması ile ekmekçilik, meyve suyu endüstrisi, yem sanayi, ilaç, tekstil, kağıt ve deterjan endüstrilerinde kullanılmaktadır.

1.4. α -Amilaz Enziminin Genel Özellikleri

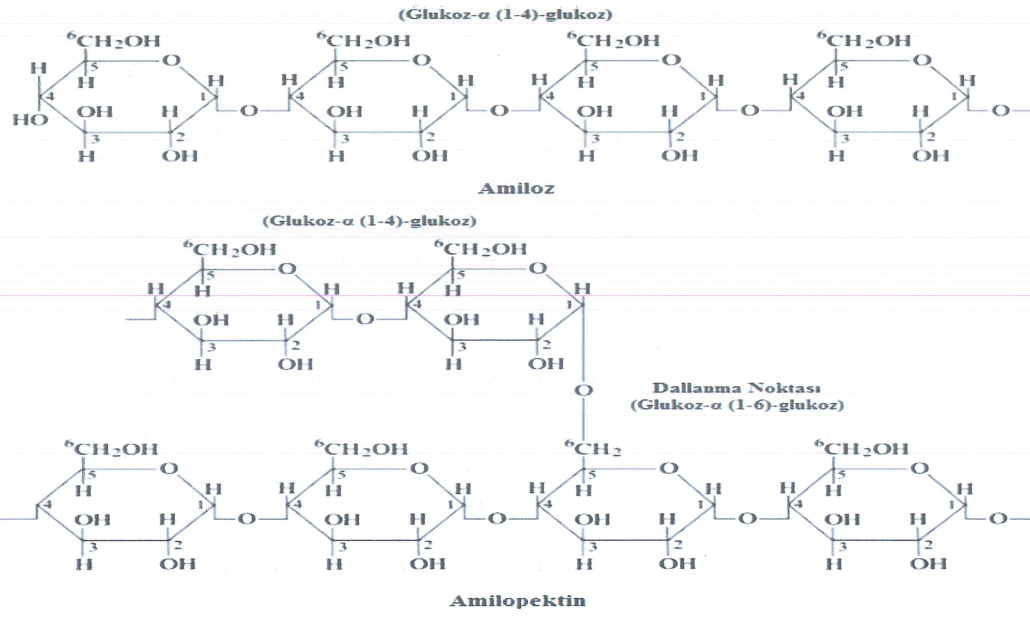
Amilazlar, nişasta moleküllerini hidroliz ederek, glukoz ünitelerinden oluşan daha küçük polimerlere parçalayan enzimlerdir. Bitkisel ve hayvansal kaynaklardan da elde edilebilen amilazların biyoteknolojik kullanımlarında kaynak olarak daha çok mikroorganizmalar kullanılmaktadır (Chakraborty ve ark., 2011).

Amilazlar aynı zamanda tohum çimlenmesi ve olgunlaşmasında önemli rol oynarlar. Çeşitli metabolik aktiviteler için şeker oluşumu ve hayvanlarda nişastanın sindiriminde etkili olurlar (Muralikrishna ve Nirmala, 2005).

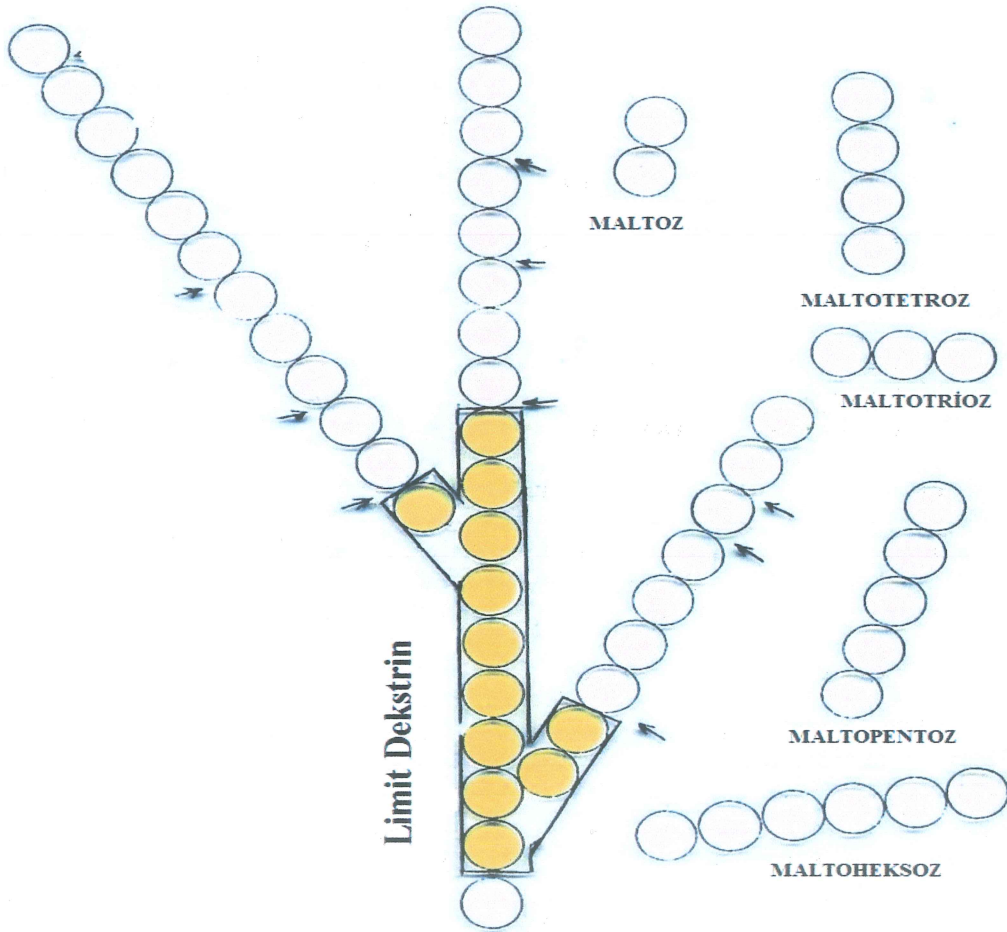
Amilazların isimlendirilmesinde farklı yapılar rol oynamaktadır. Ohlsson, 1930 yılında malttaki hidroliz sonucu oluşan şekerleri anomerik yapılarına göre α ve β olarak sınıflandırmıştır (Gupta ve ark., 2003). Bunun yanında amilazlar, endo-amilazlar ve ekzo-amilazlar olarak da gruplandırılabilirler. Endo-amilazlar, nişasta molekülün iç kısmından α -1,4 bağlarını rastgele hidroliz ederler. Bu hidroliz sonunda çeşitli zincir uzunluklarında, dallı ve lineer dizilişe sahip oligosakkaritler meydana gelir. Ekzo-amilazlar, amiloz veya amilopektin dış glukoz birimlerine (indirgen olmayan uçlarına) etki ederek maltoz ve sınırlı dekstrin veya glukoz oluşumunu sağlarlar. Sınırlı dekstrinler ise; dört ya da daha fazla glukoz içeren dekstrinlerdir, orjinal amilopektin yapısının α -1,6 glukozid bağlarını içerdiklerinden, amilazlar bu yapılara etki edemezler ve sınırlı (limit) dekstrin olarak adlandırılırlar.

Nişastanın enzimatik hidrolizi sonunda meydana gelen ürünler α -optik konformasyonu gösterdiğinden bu enzimlere α -amilazlar denilmektedir. Bunun yanında α -amilazlar nişastanın iç kısmındaki α -1,4 bağlarını katalizledikleri için endo-enzimlerdir (Ray ve ark., 2008).

Amilazlar; nişasta ve glikojen gibi polisakkaritlerde ve bunların yıkım ürünlerindeki α -1,4 glukozidik bağlarını parçalarken, α -1,6 bağlarına etki etmezler (Windish ve Mhatre, 1965). α -Amilazların özellikleri ve etki mekanizması, enzimin kaynağına göre farklılık gösterebilir. Amilozun α -amilazlar ile katalizi sonucunda maltotrioz ve maltoz meydana gelir. Amilopektinin katalizi sonucu ise α -limit dekstrinler, glukoz ve maltoz meydana gelir (Fogarty, 1983; Tanyıldızı, 2005).



Şekil 1.1. Amiloz ve amilopektin yapıları (Ghanbarzadeh ve Almasi, 2013)



Şekil 1.2. Amilazın nişastayı hidrolizi sonucunda oluşan türünler (Url-1)

1.5. α -Amilaz Enziminin Biyoteknolojik Kullanım Alanları

Nişastanın kullanıldığı endüstrilerde α -amilazlar büyük öneme sahip hidrolitik enzimlerdir. α -Amilazlar özellikle gıda, deterjan, tekstil, ilaç ve kağıt endüstrilerinde kullanılmakta olup, bu enzimin başlıca kaynaklarını mikroorganizmalar oluşturmaktadır.

Mikrobiyal amilazlar bugün, nişasta işleme endüstrisinde kimyasal hidrolizin yeri tamamen almış durumdadır. Günümüzde amilazlar, enzimler arasında dünya genelinde büyük bir pazar payına sahiptirler (Gupta ve ark., 2003).

1.5.1. α -Amilazların ekmekçilikte kullanımı

Enzimler, daha kaliteli ürün elde etmek amacıyla, ekmek endüstrisinde yüzyıllardan beri kullanılmaktadır. α -Amilazlar fermantasyonun uyarılmasını, ekmeğin daha hacimli olmasını, ekmek içinin daha yumuşak olmasını, renginin daha güzel görünmesini, kabuğunun daha iyi kızarmasını ve raf ömrünün uzamasını sağladıklarından bu endüstride oldukça önemlidirler (Dağaşan, 1997).

1.5.2. α -Amilazların deterjan sanayinde kullanımı

Amilazlar deterjan sanayinde hem bulaşık hem de çamaşır deterjanları sektöründe yaygın olarak kullanılmaktadır. Nişasta lekeleri içeren kıyafetler ve yemek araç gereçlerinin temizlenmesinde amilazların kullanılması bu lekelerin giderilebilmesi için gereklidir.

İlk otomatik bulaşık makinesi deterjanları ahşap ve porselen malzemelere zarar verirken bu sorunun çözümü α -amilaz enziminin deterjanlarda kullanımıyla sağlanmıştır. Bunun yanında enzim serbest deterjanlarla çok daha ılımlı koşullar oluşturmakta ve yıkama sıcaklığının düşürülmesini de sağlamaktadır (Gupta ve ark., 2003).

α -Amilazlar toz deterjanlarda 1975'ten bu yana kullanılmaktadır. Günümüzde bulaşık ve çamaşır deterjanlarının büyük bir bölümünde termostabil α -amilazlar kullanılmaktadır. Sıvı deterjanların yaklaşık %90'lık bir kısmında α -amilazlar kullanılmakta olup bu enzimin talebi ve kullanımı gün geçtikçe artmaktadır (Gupta ve ark., 2003).

1.5.3. α -Amilazların tekstil sanayinde kullanımı

Tekstil endüstrisinde iplikler, sağlam ve düzgün olmaları için kolay çıkarılabilir, ucuz ve kolaylıkla temin edilebilen çözelti halindeki nişastalarla işleme tutulurlar. Bu işleme haşılama denilmekte olup, dokuma işlemi yapıldıktan sonra fazla nişastanın geri alınması için, nişastaya seçici ve ipliklere zarar vermeyen α -amilaz enzimi kullanılmaktadır (Tarakçıoğlu, 1979).

1.5.4. α -Amilazların sağlık alanında kullanımı

Amilazlar insan vücudunda tükrük bezleri ve pankreastan sentezlenmektedirler. Laboratuvar analizlerinde, amilaz değerlerine bakılarak bazı hastalıkların teşhis edilmesi kolaylaşmaktadır. Örneğin akut pankreatit durumunda amilaz değerinin yükseldiği görülmektedir. Akut böbrek yetmezliği olan hastalarda ise bu değer normal değerlerin çok üzerine çıkmaktadır. Bunun yanında kalp krizi, akut alkol zehirlenmesi, perforé peptik ülser, diyabetik ketoasidoz ve bazı tükrük bezi hastalıklarında amilaz değerlerinde farklılıklar oluşmakta ve buna bağlı teşhisler konulabilmektedir (Tokullugil ve ark., 1998).

1.5.5. α -Amilazların kağıt sanayinde kullanımı

Amilazlar, kağıt hamuru ve kağıt ürünleri sektöründe kağıdın dayanıklılığını arttırmak ve tozlaşmanın önlenmesi amacıyla kullanılmaktadırlar. Amilazlarla kağıt ürünlerinin muamelesi aynı zamanda kağıdın silinebilirliğini de arttırmaktadır. Bu amaçla genellikle mısır ve patates nişastaları kullanılmaktadır. Doğal nişasta çözeltileri yüksek vizkoziteli olduklarından bu vizkozitenin düşürülmesi amacıyla amilaz enzimi kullanılmaktadır.

1.5.6. α -Amilazların meyve suyu sanayinde kullanımı

α -Amilazların meyve suyu sanayinde de kullanım alanları bulunmaktadır. Meyve suyu üretimi için kullanılacak meyveler tam olgunlaşmadan toplandıığında, bu meyvelerin içeriğindeki nişasta, meyve sularında tüketiciler tarafından istenmeyen bulanık bir görüntü oluşturmaktadır. Meyve suyu üretimi aşamasında α -amilaz ilave edilmesiyle bu bulanıklığın giderilmesi sağlanmaktadır.

1.5.7. α -Amilazların yem sanayinde kullanımı

Kümes hayvanlarının beslenmesinde önemli yer tutan mısır yemlerinin sindirimini kolaylaştırmak amacıyla α -amilazlar kullanılabilirler. Bunun yanında süttten yeni kesilmiş büyükbaş hayvanların yemlerinde de katkı maddesi olarak α -amilazlar kullanılmaktadırlar (Aiyer, 2005; Aehle, 2007).

1.6. *Bacillus* Cinsi

Bilimsel sınıflandırmada; *Eubacteria* alemi, *Firmicutes* şubesi, *Bacilli* sınıfı, *Bacillales* takımı, *Bacillaceae* familyasına ait *Bacillus*'lar, sporlu, gram pozitif, çubuk şekilli ve bazen uzun zincirler oluşturabilen aerobik bakterilerdir.

Sıcak, soğuk ve kuru ortamlara dayanıklı oldukları için yeryüzünde geniş bir alanda yaşayabilmektedirler. Toprakta, suda, jeotermal çamur ve su örneklerinde bulunabilmektedirler.

Herhangi bir karbon kaynağı içeren tanımlı ortamlarda oldukça iyi gelişirler. Birçok basil, ürettikleri hücre dışı enzimler sayesinde polisakkarit, nükleik asit, lipid gibi kompleks polimerleri yıkarak, bunları karbon kaynağı ve elektron vericisi olarak kullanabilmektedir. Basillerin çoğu basitrasin, polimiksin, tirosidin, gramisidin ve sirkulin gibi antibiyotikler üretirler. Birçok durumda bu antibiyotikler, kültürün durgunluk fazına girmesi ve sporlanmaya başlaması sırasında salınır (Madigan ve Martinko, 2012).

Bacillus cinsleri, termostabil özellikte enzim ürettikleri için bu bakterilerin endüstriyel önemleri bulunmaktadır. Bu enzimler amilaz, proteaz ve ribonükleaz gibi enzimler olup; tekstil, gıda, deterjan, kağıt ve ilaç sanayilerinde yaygın kullanım alanları bulmaktadırlar (Arıkan ve ark., 2003; Bolton ve ark., 1997).

1.6.1. *Bacillus mojavensis* ve *Bacillus vallismortis*

Roberts ve arkadaşları ABD'nin Kaliforniya Eyaleti sınırları içerisinde bulunan Mojave Çölü'nden elde ettikleri toprak örneklerinden izole ettikleri *Bacillus* cinsi *mojavensis* ve *vallismortis* türü bakterileri literatüre eklemişlerdir. Bu bakteriler isimlerini bu çöl ve bu çölün bir kısmını kapsayan Death Valley (Ölüm Vadisi)'den almışlardır. Bu bölge yaklaşık olarak deniz seviyesinin 86 metre altında bulunmaktadır ve Kuzey Amerika'nın en sıcak ve kurak bölgesidir.

Bacillus vallismortis, en yakın *Bacillus* türü olan *Bacillus subtilis*'ten DNA dizisindeki farklılıklar ile kolayca ayırt edilebilir. *B. subtilis*, *B. mojavensis*, *B. atrophacus*, *B. amyloliquefaciens* ve *B. licheniformis* genomik melezleşme verileri ile ayırt edilebilirler. Bu türler ortak genler için belirgin DNA dizisi kümeleri oluştururlar ve bu dizilerin uzaklaştırılması sonucunda bu türlerin arasındaki dönüşüm seviyelerinin düşük olduğu gözlenir. Bununla birlikte bu türler arasındaki dizi farklılıkları çok az fenotipik farklılıklar oluşturur. *B. subtilis*'in *B. atrophaeus*'tan yalnızca pigmentasyon ile fenotipik ayrımı yapılabilir (Roberts ve ark., 1996). *Bacillus mojavensis*, *Bacillus subtilis*'ten yağ asidi kompozisyonu, direnç farklılıkları ve DNA dizi farklılıklarıyla ayırt edilebilir (Roberts ve ark., 1996).

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

Babu ve Satyanarayana (1994), *Bacillus coagulans* B49'dan katı faz fermantasyonu (SSF) tekniğiyle ekstrasellüler termostabil α -amilaz üretimi üzerine çalışmışlardır. Musluk suyuyla nemlendirilmiş buğday kepeğinden önemli miktarlarda amilaz üretimini 22707 (U/g kuru bakteriyel kepek)/tuz solüsyonu (25692 U) olarak bildirmişlerdir. SSF koşullarının optimizasyonu ile enzim üretiminde önemli iyileştirmeler sağlandığını bildirmişlerdir (6700 U). Kültür ortamı ve koşullarına dayanarak α -amilaz üretim fazındaki değişiklikleri gözlemlemişler (72 saatte 25000 U flask; reaktör 48 saatte 26350 U) ve koşulları (durağan flask 72 saatte 24946 U; çalkalamalı flask 48 saatte 25263 U) bildirmişlerdir. En yüksek enzim üretiminin havalandırılmalı reaktörde tespit etmişlerdir. SSF'de yüksek glukoz konsantrasyonunda katabolik baskılanmanın varlığının belli olmadığını bildirmişlerdir. Büyük tanklardaki mikroorganizma üretiminde 96 saatte enzim üretimini 17515 ünite olarak elde etmişlerdir.

Mc Tighe ve ark. (1995), alkalofilik *Bacillus* sp. IMD 370'den saflaştırılmış amilaz enziminin maksimum aktivitesini pH 10.0 ve 40 °C olarak tespit etmişlerdir. İzoelektrik noktasını 4.9 olarak göstermişlerdir. Bağlı molekül kütlelerini SDS-PAGE ile 159.000 olarak bulmuşlar ve 1mM etilendiamintetraasetik asit (EDTA) tarafından %47 oranında inhibe edildiğini bildirmişlerdir. *Bacillus* sp. IMD 370 amilazının etki mekanizması ve alışlagelmiş amilolitik enzim sınıflandırmasına uymadığından dolayı diğer amilazlardan farklı olduğunu belirtmişlerdir.

Swamy ve Seenayya (1996), *Clostridium thermosulfurogenes* SV9'dan elde ettikleri pullulanaz ve α -amilazı uygun çevresel koşullar, değişik azot ve karbon kaynakları kullanarak optimize etmişlerdir. Pullulanaz ve α -amilaz için optimum sıcaklığı ve pH değerlerini sırasıyla 60 °C ve 7.0 olarak tespit etmişlerdir. En yüksek oranda pullulanaz ve α -amilaz üretimini üstel üreme fazının sonunda (12 saat) elde etmişlerdir. Peptonlu maya ekstraktının (PYE) pullulanaz ve α -amilaz enzimleri için en uygun azot kaynağı olduğunu ifade etmişlerdir. PYE'li ortama vitamin ve mineral takviyesi yapılarak pullulanaz (0-64 U/ml) ve α -amilaz (0-40 U/ml) üretiminin artırıldığını bildirmişlerdir. En yüksek miktarda pullulanazın; substrat olarak patates nişastasının bulunduğu ortamda, α -amilazın ise substrat olarak buğday nişastasının bulunduğu ortamda üretildiğini tespit etmişlerdir.

Hamilton ve ark. (1999), *Bacillus* sp. IMD 435'den işlenmemiş nişasta parçalayan fakat işlenmiş nişasta adsorblayan α -amilaz üretmişlerdir. En yüksek amilaz verimini, karbon kaynağı olarak laktozun (%4, w/v) ve azot kaynağı olarak maya ekstraktının (%2, w/v) bulunduğu ortamda elde etmişlerdir. En yüksek amilaz verimine laktozlu ortamda ulaşılmasına rağmen, biyokütle seviyesinin dikkat çekecek şekilde nişasta ve β -siklodekstrin bulunan ortamda daha az olduğunu gözlemlemişlerdir. Enzimi α -Siklodekstrin (SD) Sefaros 6B kolon yöntemini kullanarak tek basamakta elde etmişler ve enzimin molekül ağırlığı 63000 dalton, maksimum aktivitesinin pH 6.0 ve 65 °C'de olduğunu bildirmişlerdir. Çözünebilir nişasta ve ham mısır nişastasının hidrolizi sonucu son ürün olarak glukoz ve maltoz ortaya çıktığını bildirmişlerdir.

Mamo ve Gessesse (1999), termofilik *Bacillus* suşu WN11'den AmyI ve AmyII olmak üzere iki çeşit α -amilaz saflaştırmışlardır. AmyI ve AmyII'nin molekül ağırlıklarını sırasıyla, 76 ve 53 kDa olarak hesaplamışlardır. Bu iki amilazın da patates ve mısır nişastası granüllerine tamamen tutunduklarını bildirmişlerdir. Ham nişastanın bulunduğu ortamda, enzim dozunun 1 U/mg ve inkübasyon sıcaklığının 60 °C olarak ayarlandığında, AmyI için patates ve mısır nişastalarının hidroliz yüzdeleri sırasıyla %77 ve %44, AmyII için ise %82 ve %37 olarak elde etmişlerdir. Optimum aktivite sıcaklığını iki enzim için de 75-80 °C ve 80 °C'de 4 saat inkübasyon sonunda enzimin orijinal aktivitesini yaklaşık olarak %50 koruduğunu bildirmişlerdir. İki enzimin optimum pH'sını 5.5 olarak bulmuşlar ve pH 5.5-9.0 aralığında stabilitesini göstermişlerdir. Bu enzimlerin aktivitesinin Hg^{+2} , Cu^{+2} ve Fe^{+2} varlığında inhibe edildiğini fakat Zn^{+2} mevcudiyetinde inhibisyonun meydana gelmediğini tespit etmişlerdir.

Cordeiro ve ark. (2002), termofilik *Bacillus* sp SMIA-2'den α -amilaz enziminin üretimini ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Maksimum amilaz üretimine çözünebilir nişasta içeren kültür ortamında ve 48. saatte ulaşmışlardır. Enzimin pH 7.5 ve 70 °C sıcaklıkta maksimum aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir. 50 °C'de 2 saat sonunda enzimin stabil kaldığını ve 60 °C, 70 °C ve 90 °C'de aktivitesini sırasıyla %4, %13 ve %38'ini kaybettiğini tespit etmişlerdir. Enzimin orijinal aktivitesinin Co^{+2} , Cu^{+2} ve Ba^{+2} tarafından güçlü bir şekilde inhibe edildiğini, Ca^{+2} , Mg^{+2} , Ni^{+2} , Sr^{+2} ve Mn^{+2} 'dan daha az etkilendiğini saptamışlardır.

Beg ve Gupta (2003), *Bacillus mojavensis* bakterisinden ekstrasellüler tiol-bağımlı ve oksidasyona karşı stabil olan alkali serin proteaz enziminin pH 10.5 ve 60 °C sıcaklıkta optimum stabilite sergilediğini ve ayrıca pH 7.0-11.5 gibi geniş bir aralıkta 48

saat süre stabil kaldığını tespit etmişlerdir. Proteazın 60, 65 ve 70 °C'deki yarılanma ömürlerini sırasıyla 150, 15 ve 7 dakika olarak hesaplamışlardır.

Haq ve ark. (2003), *Bacillus licheniformis* bakterisinden alfa amilaz üretimine yönelik yeni bir ortamın seçimini çalışmışlardır. Buğday kepeği, ayçiçeği unu, pamuk çekirdeği unu, soya fasulyesi unu ve pirinç kepeği gibi farklı tarımsal yan ürünleri alfa amilaz üretimi için test etmişlerdir. Farklı tarımsal yan ürünlerin değerlendirilmesinde, alfa amilaz üretimi için buğday kepeğinin en uygun ortam olduğunu bildirmişlerdir. %1'lik çözünebilir nişasta ile darı nişastası yer değiştirildiğinde ve besiyeri konsantrasyonları %0.5 seviyesine düşürüldüğü zaman bile üretimin 2 kat arttığını tespit etmişlerdir. Yeni oluşturulan fermantasyon ortamının (ağırlık/hacim olarak %) buğday kepeği (1.25), besin sıvısı (0.5), darı nişastası (1.0), laktoz (0.5), NaCl 100 ml fosfat tamponu içerisinde 0.2 CaCl₂ ihtiva ettiğini bildirmişlerdir.

Konsula ve Liakopoulou-Kyriakides (2004), taze koyun sütünden izole ettikleri ılımlı termofilik *Bacillus subtilis* suşunu ekstrasellüler termostabil α -amilaz üretiminde kullanmışlardır. En yüksek amilaz üretimini, düşük nişasta konsantrasyonlarını içeren ortamda 40 °C'de elde etmişlerdir. Enzimin 135 °C ve pH 6.5 değerinde en yüksek aktivite gösterdiğini ve termostabilitenin kalsiyum ya da nişasta varlığında geliştirildiğini bildirmişlerdir. Bu termostabil α -amilazı çeşitli nişastaların hidrolizinde kullanmışlardır. Amonyum sülfat ham enzim preparatı, hücre olmayan süpernatanttaki gibi test edilen nişastayı parçaladığını bildirmişlerdir. Enzim kaynağı olarak temiz süpernatant kullanımının hidroliz maliyetlerini düşüreceği için son derece avantajlı olduğunu ifade etmişlerdir. Reaksiyon sıcaklığının 70 °C'ye çıkarılmasıyla tüm substratların yüksek hidroliz oranları sergilediğini göstermişlerdir. Tüm sıcaklıklarda patates nişastasının hidrolizinin diğer nişastalara göre daha yüksek oranda indirgen şeker meydana getirdiğini belirtmişlerdir. İndirgenmiş şekerlerin meydana gelmesinde çözünebilir nişasta ve pirinç nişastasın ikinci ve üçüncü sırada yer aldıklarını bildirmişlerdir. Çalışılan α -amilazın, mısır ve yulaf nişastasına karşı oldukça düşük afinite gösterdiğini belirtmişlerdir.

Goyal ve ark. (2005), doğal toprak örneklerinden izole ettikleri *Bacillus* sp. I-3'ün patates nişastasına karşı yüksek parçalama aktivitesi gösterdiğini bildirmişlerdir. Çeşitli kültür ve çevresel ortamların optimizasyonu sonucunda α -amilaz verimini 642 U/mL olarak tespit etmişlerdir. Kısmen saflaştırılmış enzimin karakterizasyonunda, en yüksek aktivitesinin 70 °C ve pH 7.0 ortamında olduğunu ve 10 mM CaCl₂.2H₂O ortamında yüksek termostabilite gösterdiğini tespit etmişlerdir. 10 mM CaCl₂.2H₂O

ortamında enzimin 70 °C'de 3.5 saat boyunca aktivitesini %90'dan fazla koruyabildiğini göstermişlerdir. Enzimin en yüksek aktivitesini (2.5), (0.5) ve (0.5) saat sonunda 80, 90 ve 100 °C'lerde sırasıyla %80, %59 ve %26 koruduğunu bildirmişlerdir. Enzim preparatının nişasta granüllerine karşı yüksek afiniteye sahip olduğunu ve tamamıyla enzim tarafından adsorbe edildiğini tespit etmişlerdir. Enzimin işlenmemiş patates nişastasını 12 saat gibi kısa bir sürede %12.5'lik oranda hidroliz ettiğini bildirmişlerdir.

Kunamneni ve ark. (2005), termofilik mantar *Thermomyces lanuginosus* tarafından katı-faz fermantasyon (SSF) tekniği ile hücre dışı amilaz üretimini çalışmışlardır. Enzim üretimi için katı substrat olarak buğday kepeği, melas kepeği, pirinç kepeği, buğday taneleri, öğütülmüş mısır, mısır koçanı ve öğütülmüş buğday örneklerini kullanılmışlardır. En yüksek enzim aktivitesini buğday kepeğinde, inkübasyon sıcaklığı 50 °C, başlangıç nem oranı %90, pH (6.0), ekim oranı %10 (v/w), tuz konsantrasyonu 1.5/10 (v/w), substrat ağırlığının flask hacme oranı 1:100 ile ek olarak çözünebilir nişasta (%1 w/w) ve pepton (%1 w/w) olacak şekilde 120 saat inkübasyon sonunda 534 U/g olarak elde etmişlerdir.

Najafi ve ark. (2005), hücre dışı α -amilaz üreten *Bacillus subtilis* AX20'yi topraktan izole etmişlerdir. Mikroorganizmanın tanımlanmasını biyokimyasal testlerin yanı sıra 16S rDNA dizileme ile gerçekleştirmişlerdir. En yüksek amilaz aktivitesini (38 U/mL) kültürün 37 °C'de üretilmesi ile birlikte durağan faz aşamasında tespit etmişlerdir. Enzim %24.2 geri kazanımı ile homojen hale getirmiş ve 4133 U/mg spesifik aktivite elde etmişlerdir. Doğal proteinin SDS-PAGE ile yapılan analizinde, moleküler büyüklüğü 78 kDa olan ve 149 kDa'luk homodimer polipeptidi oluşturan bir molekül gözlemlenmiştir. Amilazın en iyi pH 6.0'da ve 55 °C'de aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir. Enzimin Hg^{+2} , Ag^{+2} ve Cu^{+2} ile inhibe edildiğini tespit etmişler ve hiçbir metal iyonlarına gereklilik görülmediğini bildirmişlerdir. Enzim, EDTA veya EGTA ile inhibe edilmediğini, bunun için bu enzimin bir metaloenzim olmadığını ifade etmişlerdir. Kullanılan mısır nişastasını ve çözünen nişastanın son ürünlerinin glukoz (%70-75) ve maltoz (%20-25) olduğunu tespit etmişlerdir. Analiz sonucundaki mavi değer ve son ürünlerin hızlı şekilde azalması amilaz için endo modunun olduğunu gösterdiğini ifade etmişlerdir. Saflaştırılmış amilazın endüstriyel uygulamalar için kullanışlı ve dikkat çekici özellikler gösterdiğini bildirmişlerdir.

Behal ve ark. (2006), *Bacillus* sp. AB 04'ten elde ettikleri alkali α -amilaz enziminin karakterizasyonu üzerine çalışmışlardır. Alkali α -amilaz üretimini %1 fruktoz

ve %1 et özütü içeren besiyeri ortamında gerçekleştirmişlerdir. Enzimin optimum sıcaklığını 40 °C olarak belirleyip 50 °C ile 80 °C arasında stabil olduğunu tespit etmişlerdir. Enzim için optimum pH'yı 8.0 olarak bulmuş, pH 7.0 ile 10.0 arasında stabil olduğunu belirlemişlerdir. Ca^{+2} ve Co^{+2} iyonlarının enzim aktivitesini güçlü bir oranda arttırdığını tespit etmişlerdir.

Asgher ve ark. (2007), termofilik *Bacillus subtilis* JS-2004'ten temostabil α -amilaz enzimi üretimini ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bakteri inkübasyon süresini 48 saat, sıcaklığı 50 °C ve pH'yı 7.0 olarak tespit etmişlerdir. Bakterinin ürediği ortama Ca^{+2} , maya özütü ve glukoz ilave ederek bu maddelerin bakterinin üremesine ve enzim üretimine olan etkilerini araştırmışlardır. Maksimum enzim üretimini 72 U/mL olarak 48. saatte pH 7.0 ve 50 °C'de elde etmişlerdir. Enzimin optimum pH'sını 8.0, optimum sıcaklığını da 70 °C olarak belirlemişlerdir. Ca^{+2} 'un enzim aktivitesi üzerinde iyi bir aktivatör olduğunu, Co^{+2} , Cu^{+2} ve Hg^{+2} tarafından enzimin güçlü bir şekilde inhibe edildiğini, Mg^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} , Mn^{+2} ve Ni^{+2} iyonlarından enzimin daha az etkilendiğini bildirmişlerdir.

Saxena ve ark. (2007), yüksek temostabil amilaz üreten *Bacillus* sp. PN5'i topraktan izole etmişler ve (%) 0.6 nişasta, 0.5 pepton, 0.3 maya ekstraktı içeren ve 7.0 pH ortamında 60 °C'de 60 saat inkübasyon sonunda amilaz üretimini 65.23 U mL⁻¹ olarak elde etmişlerdir. En yüksek amilaz aktivitesini pH 10.0 ve 90 °C'de tespit etmişlerdir. Enzimin pH 10.0'da 1 saat sonunda aktivitesini %80 koruduğunu bildirmişlerdir. Enzimin 1 saat sonunda 105 °C'de %65 aktiviteye, 80-100 °C arasındaki sıcaklıklarda %100 stabiliteye sahip olduğunu saptamışlardır. Bununla birlikte sodyum dodesil sülfat ile 1 saat inkübe edildikten sonra %86 stabilite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bu özellikleri ile enzimin nişasta şekerlendirilmesinde ve deterjan formülasyonunda kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Hmidet ve ark. (2008), *Bacillus licheniformis*'ten izole ettikleri ısıya dayanıklı α -amilazı saflaştırıp, karakterize etmiş, α -amilaz genini izole edip, sekanslayarak *Escherichia coli* BL21'de eksprese etmişlerdir. BLA.NH1 enzimini %40-60 amonyum sülfat çöktürmesi, Sefadeks G-100 jel filtrasyonu ve Sefaroz mono Q anyon değiştirme kromatografisi ile homojenize etmiş, spesifik aktivitesinde 3.08 kat artış ve %15.9 geri dönüşüm ile elde etmişlerdir. BLA.NH1'in molekül ağırlığını sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve jel filtrasyonu ile 58 kDa olarak hesaplamışlardır. Enzimin pH 5.0-10.0 aralığında yüksek oranda aktivite gösterdiğini

bildirmişlerdir. pH 5.0, 9.0 ve 10.0'daki aktivitelerini yaklaşık olarak sırasıyla %89, %96.6 ve %90 olarak elde etmişlerdir. Saflaştırılmış enzimin optimum sıcaklığını 90 °C olarak bulmuşlardır. BLA.NH1 enziminin EDTA'ya karşı duyarlı olduğunu fakat Ca⁺² iyonlarının varlığında aktivitesinin tetiklenmediğini bildirmişlerdir. Saflaştırılmış enzimin surfaktanlara (SDS, Twin-20 ve Triton X-100) karşı son derece yüksek stabilite gösterdiğini ve ticari olarak katı ve sıvı deterjanlarla 40 °C'de mükemmel uyum sağladığını belirterek deterjan endüstrisinde potansiyel uygulamalarının olabileceğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte enzimin oksidatif ajanlara karşı oldukça stabil olduğunu göstererek, %1'lik sodyum perborat (w/v) ile 1 saat inkübasyon sonunda aktivitesini %57 oranında koruduğunu tespit etmişlerdir.

Liu ve Xu (2008), yeni izole edilmiş *Bacillus* sp. YX-1'den elde ettikleri yeni bir ham nişasta parçalayıcı α -amilazın saflaştırılmasını ve karakterizasyonunu rapor etmişlerdir. En yüksek α -amilaz aktivitesini (53 U mL⁻¹) 45 °C'de 44 saat inkübasyon sonunda elde etmişlerdir. Enzimi amonyum sülfat ile çöktürme, iyon değiştirme ve jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırmış ve molekül ağırlığını SDS-PAGE ile 56 kDa olarak tespit etmişlerdir. Enzimin pH 4.5-11.0 gibi geniş bir aralıkta aktivite gösterdiğini ve optimum aktiviteyi pH 5.0'da ve 40-50 °C'de gösterdiğini bildirmişlerdir. Enzimin pH 5.0'da %20 konsantrasyonlardaki çeşitli ham mısır nişastalarını güçlü bir şekilde hidrolize ettiğini bildirerek, nişasta endüstrisinde 12 saatlik bir periyotta kullanılabileceğini ifade etmişlerdir. Enzimin kısmi aminoasit dizilerinin analizini yaparak farklı bir α -amilaz olduğunu açıklamışlardır.

Mukherjee ve ark. (2009), *Bacillus subtilis* DM-03'den α -amilaz üretimi için katı-faz fermantasyon tekniği (SSF) ile bazı tarım-sanayi atıklarını kullanmışlar ve patates kabuğunun α -amilaz üretimi için en iyi substrat olduğunu ortaya koymuşlardır. Lineer multiple regresyon analizine göre mayalanabilir ürünün nişasta içeriği yüksek ise α -amilaz sentezinin arttığını tespit etmişlerdir. Yüksek şeker oranlı substratın enzim sentezindeki katabolik baskısından dolayı negatif etki oluşturduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, substratın C/N oranının α -amilaz sentezinin uyarılmasında önemli rol oynadığını göstermişlerdir. Batık fermantasyon sonuçlarına göre *Bacillus subtilis* DM-03'ün 72 saat inkübe edildiği optimum koşullardaki katı-faz fermantasyonunda (SSF), 1 gram kuru substrattan 532±5 U ürettiğini bildirmişlerdir. *Bacillus subtilis* DM-03'den elde edilen α -amilazın çamaşır deterjanlarına karşı oldukça yüksek bir direnç ve uyum gösterdiğini bildirmişlerdir.

Özdemir ve ark. (2009), Katı-hal fermantasyon tekniği ile (SSF) *Bacillus subtilis*'ten ekstrasellüler amilaz üretimini çalışmışlardır. En yüksek amilaz üretimi için işlem parametrelerini sırayla optimize etmişlerdir. Amilaz üretimi için muz kabuğu, karpuz kabuğu, mercimek kepeği, buğday kepeği, kavun kabuğu, farklı inkübasyon süreleri (24-144 saat), parçacık büyüklüğü (500-2500), substratın başlangıç nem konsantrasyonu (hacim başına kütleye göre %40-70), inokülasyon büyüklüğü (hacim başına kütleye göre %10-60) ve inokülasyon konsantrasyonu (hacim başına kütleye göre %10-60) gibi parametreleri test etmişlerdir. En yüksek amilaz üretimini (4857 U/mg) başlangıç nem oranı %60, ekim miktarı %30, katı substart olarak muz kabuğu ve %1 nişasta mevcudiyetinde 37 °C'de 72 saat fermantasyon sonucunda elde etmişlerdir.

Poli ve ark. (2009), altı termofilik ekstremofil (*Anoxybacillus amylolyticus*, *Geobacillus thermoleovorans*, *Geobacillus thermoleovorans* alttür *stromboliensis*, *Geobacillus toebii* alttür *decanicus*, *Bacillus thermantarcticus* ve *Thermus oshimai*) bakterileri farklı çevrelerden izole etmiş ve ağır metal dirençlerini incelemişlerdir. Ağır metallerin mikroorganizmaların gelişmesi üzerine etkilerini 0.01-20 mM'ı kapsayan konsantrasyonlarda çeşitli iz metaller (Ni^{+2} , Zn^{+2} , Co^{+2} , Hg^{+2} , Mn^{+2} , Cr^{+6} , Cu^{+2} , Fe^{+3} ve Cd^{+2}) ile fermente tanklarda gözlemlemişlerdir. Metal toksisitesinin türe ve kullanılan metale bağlı olarak değişkenlik gösterdiğini tespit etmişlerdir. Test edilen mikroorganizmaların arasında α -amilaz üreten *A. amylolyticus* bakterisi üzerinde yoğunlaşmışlardır. Bu asidotermofilik bakteriyi Antartika'da bulunan Rittmann Dağları'ndaki jeotermal topraklardan izole etmişlerdir. Bu yüzden *A. amylolyticus* bakterisinde α -amilaz biyosentezi ve aktivitesi üzerine ağır metallerin etkisini araştırmışlardır. Bakteriler ağır metallerin bulunduğu ortamlarda geliştirildiklerinde α -amilaz üretiminde azalmanın olduğu buna bağlı olarak da α -amilaz aktivitesinde de azalma olduğunu bildirmişlerdir. Bu durumun metallerin enzim biyosentezi üzerine etki ettiklerini göstermekte olduğunu belirtmişlerdir. Deneyin yapıldığı süre zarfında da ağır metallerin mevcudiyeti ile birlikte enzim aktivitesinde bir azalmanın olduğunu kaydetmişlerdir. Böylece, bakterilerdeki α -amilaz miktarındaki azalmanın ağır metalleri tespit etmek için olası ve hassas bir biyolojik tayin yöntemi olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Prakash ve ark. (2009), halofilik bakteri suşu *Chromohalobacter* sp. TVSP 101 suşundan hücre dışı, halotolerant, alkali-stabil ve ılımlı termofilik α -amilaz üretimini bildirmişlerdir. Daha fazla amilaz üretimi için pH, NaCl, sıcaklık ve substrat düzeylerini ayarlayarak, amilaz üretimi için optimize etmişlerdir. En yüksek amilaz üretimini %20

NaCl ya da %15 KCl, pH 9.0 ve 37 °C'de, %0.5 pirinç unu ve tripton ortamında tespit etmişlerdir. 50 mM CaCl₂'ün ortama eklenmesinin amilaz üretimini %29 arttırdığını bildirmişlerdir. Ortamdan saflaştırdıkları amilaz I ve amilaz II enzimlerinin molekül ağırlıklarını sırasıyla 72 kDa ve 62 kDa olarak bulmuşlardır. İki enzimin de en yüksek aktiviteye sahip olduğu ortamı pH 9.0, sıcaklık 65 °C ve %0-20 (w/v) NaCl varlığında tespit etmişlerdir. Fakat amilaz I'in NaCl olmayan ortamda amilaz II'den daha stabil olduğunu belirtmişlerdir. Enzimlerin karbonhidratı hidrolize edip, son ürün olarak ortamda maltotetroz, maltotrioz, maltoz ve glukoz oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Asoodeh ve ark. (2010), yeni izole ettikleri *Bacillus sp. ferdowsicou*'dan elde ettikleri asidofil α -amilazı saflaştırıp karakterize etmişlerdir. Enzimin moleküler büyüklüğünü 53 kDa olarak belirlemişler, pH 3.5-7.0 değerleri arasında stabil ve optimum pH'nın 4.5 civarında olduğunu saptamışlardır. Enzim optimum sıcaklığının 70 °C civarında ve aktivitesinin 75 °C'de 45 dakikalık inkübasyon sonunda %75'den fazla korunduğunu tespit etmişlerdir. Enzim aktivitesinin Zn⁺² ve EDTA varlığında azaldığını, Hg⁺²'nin enzimi inhibe ettiğini, Ba⁺²'un enzim aktivitesini yaklaşık %15 civarında arttırdığını ve Fe⁺², Mg⁺², Ca⁺², Na⁺, K⁺, PMSF, Triton X-100 ve β -merkaptetanolün enzim aktivitesinde önemli derece etkilerinin olduğunu tespit etmişlerdir.

Hashemi ve ark. (2010), buğday kepeğini substrat olarak kullanarak katı faz fermantasyon tekniği ile *Bacillus sp. KR-8104*'den hem düşük pH'da aktif hem de Ca-bağımsız α -amilaz üretmişlerdir. Nem oranı, nemlendirici ajanlar, parçacık büyüklüğü, inkübasyon süresi ve sıcaklığı, inokülasyon hacmi, %1'lik farklı karbon ve azot kaynağı gibi farklı parametrelerin enzim üretimi üzerine etkisini araştırmışlardır.

Pancha ve ark. (2010), Merkez Tuz ve Deniz Kimyası Araştırma Enstitüsü Deneysel Tuz Çiftliği'nden izole edilen *Bacillus sp.* tarafından salgılanan oldukça sıcaklık aktif ve termostabil amilaz elde etmişlerdir. %0.5 NaCl, %0.5 pepton, %0.3 et ekstraktı, %1 nişasta varlığında; 37 °C'de, pH 7.0 ve 48 saat inkübasyon süresi sonunda 452 U mL⁻¹ veriminde amilaz elde etmişlerdir. En yüksek amilaz aktivitesini pH 8.0 ve 110 °C olarak tespit etmişlerdir. Ham enzimin pH 6.0-11.0 arasında oldukça aktif ve 60 °C'de 30 dakika inkübasyon süresi sonrasında termostabil olduğunu belirtmişlerdir.

Zhao ve ark. (2010), Çin'in Nanjing ilinde toplanan Broadleaf Holly bitki sapından *Bacillus vallismortis* ZZ185 izole etmişlerdir. ZZ185 izolatının hem kültür filtratının hem de bütanol ekstraktının, bitki patojenleri olan *Fusarium graminearum*, *Alternaria alternata*, *Rhizoctonia solani*, *Cryphonectria parasitica* ve *Phytophthora*

capsici'ye karşı güçlü büyüme inhibisyonu gösterdiğini bildirmişlerdir. Güçlü antifungal aktivitesi gösteren *B. vallismortis* ZZ1852'in biyoaktif bileşiklerinin, bitki hastalıklarının biyolojik kontrolü için alternatif bir kaynak olabileceğini belirtmişlerdir.

Božić ve ark. (2011), *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a tarafından 37 °C'de 24 saatlik fermantasyon sonunda üretilen α -amilazın, ham nişastayı yüksek etkinlikte parçaladığını belirtmişlerdir. Jel filtrasyon kromatografisinde enzimi %38 verimle ve 6 kat oranında saflaştırmışlardır. Molekül ağırlığının 31 kDa olduğunu saptamışlardır. Saflaştırılmış enzimin pH 6.5'de ve 90 °C'de optimum aktivite gösterdiği bildirmişlerdir. Saflaştırılmış α -amilazın CaCl_2 varlığında 70 °C'de 6 saat inkübasyondan sonra %55 aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Co^{+2} , Ni^{+2} ve Ca^{+2} 'un enzim aktivitesini hafiften artırırken Hg^{+2} 'nin enzim aktivitesini inhibe ettiğini saptamışlardır. Saflaştırılan enzim jelatinasyon sıcaklığının altındaki sıcaklıkta çeşitli ham nişastaları yüksek etkinlikte parçaladığını kanıtlamışlardır.

Elkady ve ark. (2011), Mısır'daki bir tuz göletinden biyoflokülant üreten bir bakteri izole etmişler ve izolatanın 16S rDNA sonuçlarına göre *Bacillus mojavensis* olduğunu tespit etmişlerdir.

Hashemi ve ark. (2011), *Bacillus* sp. KR-8104'den batık fermantasyon tekniği ile α -amilaz üretimi için birada kullanılan tahılı (BSG) katı substrat olarak kullanmışlardır. Doehlert deneysel düzeni kullanarak α -amilaz üretimini, BSG konsantrasyonunun optimizasyonu ve inkübasyon zamanı sayesinde maksimize etmişlerdir. Optimizasyon işlemlerinde test edilen en yüksek BSG miktarının (%5, w/v) üretimi 5.1 kat arttırdığını tespit etmişlerdir. Daha sonra, BSG'nin suda çözünen ve çözünmeyen fraksiyonlarını α -amilaz üretiminde çalışmışlardır. Tüm BSG örneklerinin α -amilaz üretimi için önemli katkılarının olduğunu tespit etmişlerdir.

Ling ve ark. (2011), Çin'in Shandong ilinin Jinan Yağ Rafineri Fabrikası'nın atıklarıyla kirletilmiş toprağından poli-aromatik hidrokarbonları parçalayan yeni bir bakteri izole etmişlerdir. İzolatı 16S rDNA sekansı, DNA-DNA hibridizasyonu, yağ asidi analizleri ve çeşitli fizyolojik karakterizasyonlar sonucu *Bacillus vallismortis* olarak tanımlamışlardır. İzolatı gram pozitif, hareketli, endospor oluşturan, aerobik, oksidaz ve katalaz pozitif olarak tespit etmişlerdir. Hücrelerin 0.8-1.0 μm eninde ve 2.0-2.5 μm uzunluğunda, tekli veya çift ve bazen çok zincirli olduğunu saptamışlardır.

Mahdavi ve ark. (2011), iki iyi bilinen homolog mezofilik ve termofilik *Bacillus amyloliquefaciens* (BAA) ve *Bacillus licheniformis* (BLA)'ten elde edilen α -amilazlar ve *Bacillus cereus* (BCA)'tan elde edilen soğuk aktif α -amilaz üzerine karşılaştırmalı

biyokimyasal ve yapısal çalışmalar uygulamışlardır. Yüksek derecede sekans ve yapısal benzerliklere rağmen, sırasıyla BCA, BAA ve BLA'nın optimum sıcaklıklarının 50, 70 ve 90 °C olarak çok farklılık gösterdiğini saptamışlardır. BCA ve BAA için sıcaklık inaktivasyon yarılma ömürlerini sırasıyla 1 ve 9 dakika olarak tespit ederlerken bu sıcaklıkta BLA için inaktivasyonu gözlemlememişlerdir.

Özdemir ve ark. (2011), Dicle Üniversitesi kampüs alanındaki toprak örneklerinden bir *Bacillus* suşu izole etmişlerdir. 16S ribozomal RNA dizisini inceleyerek mikroorganizmanın *Bacillus subtilis* ile yakından ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. α -Amilaz üretimi üzerine karbon ve azot kaynakları, çeşitli nişasta ve unlar, inkübasyon zamanı ve farklı kimyasallar gibi değişik kültür ortamlarını incelemişlerdir. En fazla enzim üretimini (7516 U/mL) %0.05 Tween-40 içeren bazal ortam A içerisinde 24 saat inkübasyon sonunda elde etmişlerdir. Kısmen saflaştırılmış enzimin maksimum aktivitesini 60 °C'de pH 6.0 ortamında tespit etmişlerdir. Kısmi saflaştırılmış enzim aktivitesi üzerine %0.2 konsantrasyonlardaki deterjanların [sodyum dodesil sülfat (SDS), CHAPS [3-[(3-colamidopropyl) dimethyl-lammonio]-1-propanesulfonate] ve ticari Omo Matik deterjan) etkisini belli zaman aralıklarıyla (15-150 dak.) incelemiş ve inhibisyon etkisini sırayla SDS > Omo Matik > CHAPS olarak bildirmişlerdir. Düşük konsantrasyonlardaki (1.5 mM) farklı metal iyonlarının α -amilaz aktivitesi üzerine etkilerini incelemişler ve Co^{+2} 'ın hafif inhibisyon, Hg^{+2} ve Cd^{+2} 'un güçlü bir inhibisyon meydana getirdiğini, Ca^{+2} ve Mg^{+2} 'un enzim aktivitesini arttırdığını tespit etmişlerdir. Farklı Ca^{+2} konsantrasyonlarının (10-300 mM) enzim aktivitesi üzerine olan etkilerini çalışmışlar ve 20 mM Ca^{+2} ortamında enzim aktivitesinin arttığını bildirmişlerdir.

Özdemir ve ark. (2011), Türkiye, Afyonkarahisar, Gazlıgöl'deki sıcak su kaynaklarından yeni bir bakteri izole etmişlerdir. Morfolojik, biyokimyasal ve 16S rRNA gen dizisi analizine dayanarak, izolat bakterinin DNA'sının *Anoxybacillus flavithermus* türleri ile %99 benzerlik gösterdiğini tespit etmişlerdir. Tarımsal atıklar substrat olarak kullanılarak, katı-hal fermantasyon tekniği ile termofilik *Anoxybacillus flavithermus*'tan α -amilaz üretimini çalışmışlardır. Enzim üretimi için katı substrat olarak darı, muz kabuğu, buğday kabuğu, pirinç kabuğu, mercimek kabuğu, karpuz kabuğu ve darı küspesi kullanmışlardır. Bunlar arasından α -amilaz üretimi için en uygun substratın pirinç kabuğu olduğunu tespit etmişlerdir (1.271 U/mg). En yüksek amilaz üretimini 1.0 μm parçacık büyüklüğü, %70 (w/v) başlangıç nem konsantrasyonu, %40 ekim miktarı (v/w) ile 72 saat inkübasyon sonunda elde etmişlerdir. Çeşitli azot

kaynaklarını test etmiş ve sonuçta en yüksek amilaz üretimini (3.170 U/mg) %1 pepton ortamında tespit etmişlerdir. Karbon kaynağı olarak %1 nişasta eklendiğinde α -amilaz üretiminin arttığını (2.364 U/mg) gözlemlemişlerdir. α -Amilaz aktivitesi için optimum sıcaklığı 70 °C olarak bildirmişlerdir. Enzimim pH 6.0-8.0 aralığında stabil olduğunu belirleyip, optimum aktivitenin pH 6.0'da olduğunu tespit etmişlerdir.

Sharma ve Satyanarayana (2011), yeni asidofilik bir bakteri olan *Bacillus acidicola* TSAS12'den istatistiksel yaklaşımlar kullanarak batık fermantasyon tekniği ile asidik α -amilaz üretiminin optimizasyonunu çalışmışlardır. En yüksek enzim üretiminin %2.75 nişasta, %0.01 K₂HPO₄, %2 inokülasyon hacmi (1.9x10⁸ CFU mL⁻¹) ve 33 °C'deki inkübasyon koşullarında elde edildiğini bildirmişlerdir.

Wang ve ark. (2011), *Chryseobacterium taeanense* TKU001'i topraktan izole etmişlerdir. Maş fasulyesi tozunu karbon/azot kaynağı olarak kullanılarak TKU001 için α -amilaz üretimi için test etmişlerdir. Fermantasyon sonunda α -amilazı saflaştırmışlar, SDS-PAGE ve jel filtrasyonu ile molekül ağırlığını sırasıyla 46 ve 47 kDa olarak bulmuşlardır. α -Amilazın optimum pH, optimum sıcaklık, pH stabilite ve sıcaklık stabilitesini sırasıyla 9.0-50 °C, 6.0-11.0 ve <60 °C olarak tespit etmişlerdir. Enzimin etkin bir biçimde çözünür nişastayı parçalayarak glukoz ve maltozun son ürün olarak oluştuğunu bildirmişlerdir. 5 mM Ca⁺² ve %2'lik Tween-40'ın ortama ilavesiyle enzim aktivitesinin sırasıyla 3.52 ve 3.27 kat arttığını belirtmişlerdir.

Kikani ve Singh (2012), termofilik bir bakteri olan *Anoxybacillus beppuensis* TSSC-1'i bir sıcak su kaynağından izole etmişlerdir. İzolatın en yüksek α -amilaz üretimini 55 °C ve pH 7.0'da bulmuşlardır. Enzimi tek bir basamakta fenil sefaroza 6FF'de %58 verim ve 19.5 katlık saflaştırma katsayısıyla saflaştırmışlardır. Enzimin molekül ağırlığını 43 kDa olarak tespit etmişlerdir. Optimum enzim sıcaklığını ve pH'sını sırasıyla 80 °C ve 7.0 olarak saptamışlardır. Enzimin metal iyonlarına bağlı aktivite sergilemediğini ve kimyasal denatürasyonlara karşı dirençli olduğunu tespit etmişlerdir.

Roy ve ark. (2012), yüksek oranda alkalik α -amilaz üreten *Bacillus subtilis* AS-S01a'yı Hindistan'ın Assam Bölgesi toprak örneğinden izole etmişlerdir. Enzimin molekül büyüklüğünü 21 kDa olarak tespit etmişlerdir. Saflaştırılan enzimin optimum sıcaklığını 55 °C ve optimum pH'sını 9.0 olarak bulmuşlardır. Saflaştırılan α -amilazın aktivitesini oksidanlar, surfaktanlar, EDTA ve ticari çamaşır deterjanları varlığında koruduğunu tespit ederek, çeşitli endüstriyel uygulamalar için uygun olduğunu bildirmişlerdir.

Zhang ve ark. (2012), bir tekstil endüstri bölgesinin çamur ve atık su örneklerinden bakteri izole etmişler ve izolatanın 16S rDNA, fizyolojik ve biyokimyasal test sonuçlarına göre *Bacillus vallismortis* olduğunu belirtmişlerdir. *B. vallismortis*'in pH ve sıcaklık stabil lakkaz salgılayarak trifenilmetan boyasını parçaladığını saptamışlardır.

Kumar ve ark. (2013), *Bacillus laterosporus*'tan elde edilen termostabil α -amilazın üretim ve karakterizasyonunu çalışmışlardır. En yüksek enzim üretimi sırasıyla %0.58 maya özütü, %2.44 nişasta, %2.34 pepton ve %0.11 NaCl varlığında 4.838 U/ml olarak elde etmişlerdir. Enzim saflaştırılmasını amonyum sülfat ve boyut dışlama kromatografisi ile gerçekleştirmişlerdir. En yüksek saflaştırmayı 4.71 kat olarak elde etmişlerdir. Saflaştırılan enzimin optimum sıcaklık ve pH değerlerini sırasıyla 60 °C ve 7.0 olarak saptamışlardır. EDTA ve Ca^{+2} varlığında enzim aktivitesinde bir etkilenme olmadığını, bununla birlikte Mg^{+2} , SDS ve β -merkaptotanol varlığında enzim aktivitesinde azalmanın olduğunu tespit etmişlerdir.

Chand ve ark. (2014), yaptıkları çalışmada yerel bir bölgeden izole ettikleri *Bacillus* sp. KR-8104'den α -amilaz üretiminin optimizasyonunu ve eş zamanlı olarak pamuklu kumaşlardan haşıl giderimini test etmişlerdir. Optimum enzim üretimini 45 °C ve pH 5.0-6.0'da elde etmişlerdir. Optimum haşıl sökme işlemi 40-45 °C, pH 5.0-6.0'da (TEGEWA ÖLÇEK 6) için 10 saat ve (TEGEWA ÖLÇEK 9) için 22-24 saat olarak elde etmişlerdir.

Fincan ve ark. (2014), Türkiye, Afyon, Ömer'deki sıcak su kaynaklarından izole ettikleri *Anoxybacillus flavithermus*'tan elde ettikleri α -amilazın üretimi ve karakterizasyonunu bildirmişlerdir. Gram pozitif, spor oluşturan, hareketli, ılımlı termofilik ve 16S rRNA analizi ile yeni bir bakteri suşu olarak tanımlamışlardır. Bakteri gelişimi için optimum koşulları (besiyeri ortamı pH'sını 6.0, sıcaklığı 55 °C ve zamanı 20 saat olarak) tespit etmişlerdir. Maksimum α -amilaz aktivitesini 24 saat inkübasyon sonunda, pH 7.0 ortamında ve 55 °C sıcaklıkta bulmuşlardır. *A. flavithermus*'tan elde edilen termostabil α -amilazı %70 $(NH_4)_2SO_4$ ve iyon-değişimi kromatografisi ile saflaştırmışlardır (5.2 kat; %65.8 verimli). α -Amilazın molekül ağırlığı 60 kDa olarak tespit etmişlerdir (SDS-PAGE).

Martínez-Gallegos ve ark. (2014), ozonun, *Bacillus subtilis*'ten elde edilen α -amilaza etkisini pH 7.5 ve 25 °C'de araştırmışlardır. Ozon/enzim oranının katlanarak artmasıyla, ozonasyondan sonra α -amilazın aktivitesinin göreceli düştüğünü göstermişlerdir.

Mesbah ve Wiegel (2014), etanol çöktürme, anyon değiştirici kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisiyle *Amphibacillus* sp. NM-Ra2'den elde edilen ekstrasellüler α -amilazı saflaştırmışlardır. Enzim en yüksek aktivitesinin 1.9 M NaCl, pH 8.0 ve 54 °C'de elde edildiğini ve 0-4.3 M NaCl ve 37-65 °C aralıklarında enzimin aktif olduğunu saptamışlardır. Enzimin moleköl büyüklüğünü 50 kDa (SDS-PAGE) olarak tespit etmişlerdir. Enzimin EDTA tarafından inhibe edildiğini fakat PMSF, DTT, H₂O₂, Triton X-100, Tween-20 ve Tween-80 varlığında stabil ve aktif olduğunu göstermişlerdir. K⁺'un enzimi aktive ettiğini, Cu⁺² ve Mg⁺²'un enzim aktivitesini inhibe ettiğini ve Hg⁺², Zn⁺² ve Fe⁺²'in enzim aktivitesi üzerinde etkisinin olmadığını belirtmişlerdir. Amilazın %25 (v/v) etanol, metanol ve benzen varlığında stabil ve aktif olduğunu saptamışlardır. Nişastanın hidrolizi sonucunda ürün olarak en çok maltoz ve maltotrioz olduğunu göstermişlerdir.

Sen ve ark. (2014), bir kaplıcadan izole ettikleri *Alcaligenes faecalis* SSB17'den termostabil alfa-amilaz üretimi ve karakterizasyonunu çalışmışlardır. Enzim üretimi üzerine sıcaklığın, pH'nın ve zamanın tek tek ve kombine etkilerini 4 farklı besiyerinde Box-Behnken Dizaynı (BBD) kullanarak test etmişlerdir. Enzimi amonyum sülfat ve boyut dışlama kromatografisi ile saflaştırmışlardır. En yüksek saflaştırmayı boyut dışlama kromatografisi ile 60 kat olarak elde etmişlerdir. Saflaştırılan enzimin moleköl ağırlığını elektroforez (SDS-PAGE) sonucunda 52 kDa olarak saptamışlardır.

Kallel ve ark. (2015), Tunus Sahrası'ndan UEB-FK olarak isimlendirilen yeni bir bakteri izole etmişlerdir. 16S rDNA sekans analiz sonuçlarına göre bu izolat *Bacillus mojavensis* olarak tanımlanmıştır. Bu izolatın ekstrasellüler ksilanaz ürettiğini belirtmişlerdir. Enzimin optimum pH ve sıcaklığını sırasıyla 4.0 ve 50 °C olarak bulmuşlar ve enzimin 60 °C'de 90 dakika inkübe edildiğinde önemli derecede sıcaklık stabilitesinin olduğunu saptamışlardır. Bunlara ilave olarak geniş bir pH aralığında (3.0-9.0) ve bazı deterjan ve organik solventler varlığında stabil kaldığını tespit etmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Biyolojik Materyal

Çalışmalarımızda, Şırnak (Meryemderesi) sıcak su kaynağı çamurundan izole edilen termotolerant *Bacillus vallismortis* ve *Bacillus mojavensis* kullanıldı.

3.2. Kimyasal Maddeler

3.2.1. Azot kaynakları

Azot kaynağı olarak üre, amonyum sülfat, amonyum asetat, amonyum tiyosiyanat, metiyonin ve glisin kullanıldı.

3.2.2. Karbon kaynakları

Karbon kaynağı olarak nişasta, glukoz, sukroz, fruktoz, galaktoz ve laktoz kullanıldı.

3.2.3. Besiyeri maddeleri

Nutrient Broth ve Nutrient Broth Agar kullanıldı.

3.2.4. Deterjanlar

SDS, Tween-20, Tween-40, Triton X-100, Alo, Tursil ve Omo kullanıldı.

3.2.5. Elektroforetik maddeler

%30 Akrilamid /%0.8 Bis Akrilamid: 30 g akrilamid, 0.8 g bis akrilamid saf su ile 100 mL'ye tamamlanıp, filtre edildi. Koyu renkli şişede 4 °C'de saklandı.

1.5 M Tris-HCl pH 8.8: 54.45 g Tris-base 150 mL'ye tamamlandı. 1N HCl ile pH 8.8'e ayarlanarak hacim saf su ile 300 mL'ye tamamlanıp, filtre edilerek, 4 °C'de saklandı.

0.5 M Tris-HCl pH 6.8: 6 g Tris-base 60 mL saf suda çözülerek, 1N HCl ile pH 6.8'e ayarlanıp, hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı. Filtre edilerek, 4 °C'de saklandı.

%10'luk APS (Amonyum persülfat): 0.1 g APS saf su ile 1 mL'ye tamamlandı.

Elektroforez Tamponu: 3 g Tris, 14.4 g glisin, 0.1 g SDS, 1 litre saf su ilave edilerek hazırlanıp, 4 °C’de saklandı.

İz Boya: 7 mL 0.1M Tris-HCl pH 6.8, 3.6 mL gliserol ve 1.2 mg BFB (Brom Fenol Blue)’ye 10 mL saf su ilave edildi. 1’er mL olacak şekilde, ependorflara konarak -21 °C’de saklandı.

%10’luk SDS: 0.1 g SDS saf su ile 1 mL’ye tamamlandı.

%3’lük Nişasta: 0.3 g nişasta 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 ile 10 mL’e tamamlandı.

İyot Solusyonu: 14 mM KI ve 10 mM I₂ saf su ile 50 mL’ye tamamlandı.

3.3. Besiyerleri

3.3.1. Sıvı besiyeri [Nutrient broth (NB)]

8 gram Nutrient Broth, çeşme suyu ile 1 litreye tamamlanıp otoklavlanarak hazırlandı.

3.3.2. Katı besiyeri

8 g Nutrient Broth’a 15 gram agar ilave edilip, çeşme suyu ile 1 litreye tamamlanarak otoklavlandı. Otoklavlandıktan sonra steril petri kaplarına aktarımı yapıldı.

3.4. Tamponlar

Sitrik Asit tamponu: 0.1 M (pH:3.0), (pH:4.0), (pH:5.0) hazırlandı.

Sodyum Fosfat tamponu: 0.2 M (pH:6.0), (pH:7.0), (pH:8.0) hazırlandı.

Sodyum Karbonat tamponu: 0.1 M (pH:9.0), (pH:10.2), (pH:10.8) hazırlandı.

3.5. Kullanılan Aletler

Steril Kabin (NUVE LN 090)

Spektrofotometre (SHIMADZU UV MİNİ-1240)

Çalkalayıcı (JEIO TECH SI-600)

Soğutmalı Santrifüj (EPPENDORF CEBTRIFUGE 5430R)

Vorteks (JEIO TECH VM-96B)

Magnetik Karıştırıcı (WISESTIR MSH-20D)

Etüv (NUVE EN 400, NUVE EN 500)

Digital Göstergeli Hassas Terazı (SHIMADZU AU X220)
Otoklav (NUVE OT 4060V)
Çalkalamalı Su Banyosu (NUVE ST402)
pH metre (HM DIGITAL PH-200)
Blander (Sinbo)

3.6. Bakteri İzolasyon İşlemi ve Saf Kültür Bakteri Üretimi

Bakteri izolasyonu için 10 g çamur örnekleri steril koşullarda 90 mL steril su içeren erlenlere aktararak 10^{-1} 'lik seyreltmeler elde edildi. Karışımların çalkalanarak homojen hale gelmesi sağlandıktan sonra benzer şekilde ardışık transferler yapılarak 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , ve 10^{-5} 'lik dilüsyonlar elde edildi. Farklı oranlarda seyreltilmiş süspansiyonlardan 1 mL alınarak steril petri kutularına aktarılıp, üzerlerine besiyerlerinden 20 mL ilave edildi ve homojenizasyonları sağlandı. Mikroorganizmaların izolasyonunda yukarıdaki işlem gerçekleştirilmeden önce seyreltilmiş süspansiyonlar $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dakika ısıl işleme tabi tutuldu. Spor oluşturan mikroorganizmalar bu işlem sonucunda canlılıklarını korurken spor morfolojisi oluşturmayan diğer mikroorganizmalar ölmektedirler. Yukarıda belirtilen işlemler her seyreltilmiş süspansiyondan 10 petri kutusuna ekim yapılacak şekilde gerçekleştirildi, ekim yapılmış petri kutuları termotolerant mikroorganizmaların izolasyonu için $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 1 gün inkübe edildi. Sulardan izolasyon için öncelikle su örneğinden besiyerine inokule edilerek ve termotolerant mikroorganizmaların izolasyonu için de $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de inkübasyona bırakıldı. 24 saatlik inkübasyon sonunda zenginleşmiş kültürden katı besiyerlerine çizgi ekim yaparak saf kültürleri elde edildi. NB sıvı besiyerine katı besiyerinden platin öze yardımıyla ekim yapıldı. Çalkalayıcıda 120 rpm'de, $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat inkübe edildi.

3.7. Bakteri Üretimi

Steril edilmiş platin öze yardımıyla katı besiyerinden Nutrient Broth besiyerine ekim yapıldı. Çalkalayıcıda 120 rpm'de $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 16 saat inkübe edildi. 16 saat sonunda bu besiyerinden 200 μL alınarak (%1) önceden otoklavlanmış sıvı besiyerlerine ekim yapılarak bakteri üretimi sağlandı.

3.8. Gram Boyama

NB katı besiyerinde gecelik üretilen bakteri örneklerinden öze yardımıyla koloni alındı. Temiz lamın bir kenarına serum fizyolojik damlatılıp kolonilerin yayma işlemi gerçekleştirildikten sonra preparat kurutulup alevden geçirilerek tespit edildi. Elde edilen preparat üzerine kristal viyole solüsyon dökülerek 2 dakika bekletilerek boyanması sağlandı ve daha sonra su ile yıkandı. Preparat üzerine lugol dökülerek 1 dakika bekletildi ve süre sonunda yıkandı. Deklorizasyonu sağlamak amacıyla %96'lık alkol döküldü ve 15-20 saniye bekletilip ve yıkandı. Son işlem olarak sulu fuksin ile 2 dakika bekletildi ve su ile yıkanarak boya giderildi. Preparatlar kurutma kağıdında kurutulduktan sonra immersiyon yağı damlatılarak immersiyon objektifi altında inceleme yapıldı.

3.9. Antibiyotiklere Karşı Duyarlılık Testi

Bu test mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı gösterdikleri özellikleri belirlemek için yapıldı. Bu test için, izolatların üreyebilmesi amacıyla uygun besi ortamına (NB-katı) bakterilerin taze kültürlerinden yayma ekim yapıldı ve farklı antibiyotiklerinin bulunduğu diskler ekim yapılan yüzeye bırakılıp 36 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda antibiyotik disklerin etrafında zon oluşup oluşmadığı gözlemlenip, zon büyüklüğüne göre değerlendirme yapıldı.

3.10. Katalaz Testi

Bu test, mikroorganizmaların katalaz enzimi sentezleyip sentezlemediklerini saptamak amacıyla yapıldı. Bunun için taze haldeki (18-24 saatlik) mikroorganizma kültürleri (katı) kullanılarak bu kültürlere yavaş yavaş %3'lük taze hazırlanmış hidrojen peroksit ilave edildikten sonra 5 dakika inkübe edildi. Hidrojen peroksit ilavesinden sonra kolonilerin bulunduğu yerlerde kabarcıkların oluşması katalaz enziminin sentezlendiğini, hava kabarcıkları oluşmaması ise katalaz enziminin sentezlenmediğini göstermektedir.

3.11. Oksidaz Testi

Oksidaz testi, intrasellüler olarak mikroorganizmalar tarafından sentezlenen sitokrom oksidaz enziminin varlığını gösteren bir testtir. Bu enzim NADH gibi verici bileşiklerden bir elektron alıcısına elektron taşınmasını katalize eder. Sitokrom sistemi sadece aerob ve son hidrojen alıcısı olarak oksijeni kullanma yeteneğine sahip olan

organizmalarda bulunur. Bu metabolizmanın son ürünü su veya hidrojen peroksittir. Test yapılırken renksiz bir boya, enzim için yapay bir elektron alıcısı olarak kullanılır. Böylece boya okside edilir ve koyu mor bir bileşik olan indofenol mavisi oluşur. Bu rengin oluşması oksidaz testinin pozitif olduğunu göstermektedir.

3.12. API 20 NE

API 20 NE, enterik olmayan bakterilerin tanımlanması için 8 geleneksel testi, 12 asimilasyon testini ve bir veritabanını kombine eden standartlaştırılmış bir sistemdir. API 20 NE, dehidrate madde ve substratlar içeren 20 mikrotüpten oluşmaktadır.

Öncelikle bakteriler katı besiyerinde 35 °C'de 24 saat inkübe edilerek üretildi. Katı besiyerinden steril öze ile bakteri kolonileri alınarak makfarlant cihazında steril saf su ile makfarlant değeri 0.5 olacak şekilde ayarlandı. Bu bakteri solüsyonu API 20 NE mikrotüplerine eklendi. Yine 35 °C'de 24 saat inkübe edildi. Mikrotüplerdeki renk değişimine göre her mikrotüpe (+) veya (-) değerler verilip biyokimyasal özellikleri belirlendi ve bu değerlere web sitesine girilerek mikroorganizma tanımlaması yapıldı.

3.13. Enzim Eldesi

Otoklavlanarak steril edilen sıvı besiyerlerine inokülasyon oranı %1 olacak şekilde ekimler yapıldı. 36 saat inkübasyon sonunda besiyeri 7.000 rpm'de 7 dakika santrifüj edildi. Elde edilen üst sıvı enzim aktivite çalışmalarında kullanıldı.

3.14. Enzim Aktivite Tayini (Bernfeld Yöntemi)

Enzim aktivitesi Bernfeld yöntemiyle tespit edildi (Bernfeld, 1955). 100 µL enzim çözeltisi veya 10 µL saf enzim üzerine 200 µL %0.5'lik nişasta çözeltisi (0,1 M pH:8.0 Tris-HCl tamponu içerisinde çözünmüş) eklenerek, etüvde 50 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Süre sonunda reaksiyonu durdurmak için 400 µL 3,5 DNS (3,5 dinitro salisilik asit) ilave edilerek 5 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. DNS yüksek sıcaklıkta indirgen şeker uçlarıyla reaksiyona girerek reaksiyonun durmasını sağlar ve aynı zamanda renk oluşumu meydana getirir. Su banyosundan sonra 3 mL saf su eklenerek, spektrofotometrede 489 nm'de aktivite tayini yapıldı.

3.14.1. Bernfeld reaktifinin hazırlanması

Bir beherde 5 gram 3,5 dinitro salisilik asit 100 mL saf su içinde çözüldü. Ayrı bir beherde 8 gram NaOH çözeltisi 75 mL suda çözüldü. Daha sonra NaOH çözeltisi yavaş yavaş 3,5 dinitro salisilik asit üzerine eklendi. Sıcak su banyosunda bir süre bekletildikten sonra üzerine 150 gram Na-K-Tartarat azar azar eklendi. Son olarak hacim, saf su ile 500 mL'ye tamamlandı (Bernfeld, 1955).

3.15. Protein Miktar Tayini

Önce konsantrasyonunu bildiğimiz standart protein çözeltisi [1mg/mL BSA (Bovim serum albümin)] hazırlandı. Bu standart çözeltiliden faydalanarak konsantrasyonunu bilmediğimiz çözeltideki protein miktarı Lowry yöntemine göre hesaplandı. Bunun için artan konsantrasyonlarda hazırlanan standart ve 50 µL enzim çözeltisi alınarak tüplerin hepsine 5 mL alkalın çözeltisi eklenip ve 15 dk 40 °C'de bekletildikten sonra tüplerin hepsine 1:1 oranında seyreltilmiş 500 µL FCR (Folin Reaktifi) eklenip ve 30 dakika karanlıkta bekletildikten sonra spektrofotometrede 660 nm'de absorpsiyon değerleri ölçüldü.

3.15.1. Alkalın çözeltisinin hazırlanışı

A: 0.1 N NaOH içinde %2 (w/v) Na₂CO₃ çözüldü.

B: %1 (w/v) Na-K-Tartarat içinde %5 (w/v) CuSO₄. 5H₂O çözüldü.

C: 50 mL A belirteci ile 1 mL B belirteci karıştırılarak hazırlandı.

3.16. Farklı İnkübasyon Sürelerinin α-Amilaz Üretimi Üzerine Etkisinin Araştırılması

Otoklavlanmış 100 mL'lik erlenmayer içerisinde hazırlanmış 20 mL NB besiyerlerine %1 oranında ekim yapıldı. Ekim yapılan besiyerleri (pH: 7.0) 45 °C'de 120 rpm'de inkübe edildi. 0., 4., 8., 12., 16., 24., 36., 48., 72., ve 96. saatlerde NB besiyerinden elde edilen üst sıvılardan Bernfeld yöntemine göre α-amilaz aktivite tayini yapıldı ve daha sonra protein miktar tayini yapılarak enzim üretim miktarları belirlendi.

3.17. Farklı Sıcaklık Değerlerinin (20-60 °C) α-Amilaz Üretimi Üzerine Etkisinin Araştırılması

Steril edilen besiyerlerine (pH: 7.0) inokülasyon oranı %1 olacak şekilde ekim yapıldı. Çalkalayıcıda 20-60 °C (5 °C'lik artışlarla) sıcaklıklarda, 120 rpm'de inkübe edildi. 36 saat inkübasyon sonunda NB besiyerinden elde edilen üst sıvıdan Bernfeld yöntemine göre α -amilaz tayini yapıldı ve enzim üretimi hesaplandı.

3.18. Farklı pH Değerlerinin (pH: 3.0-11.0) α -Amilaz Üretimi Üzerine Etkisinin Araştırılması

NaOH ve HCl kullanılarak besiyeri pH'ları 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 ve 11.0 olacak şekilde ayarlandı. Steril edilen besiyerlerine inokülasyon oranı %1 olacak şekilde ekim yapıldı. Çalkalayıcıda 120 rpm'de, 35 °C sıcaklıkta, 36 saat inkübe edildi. Süre sonunda NB besiyerinden elde edilen üst sıvıdan Bernfeld yöntemine göre α -amilaz aktivitesi belirlenip, enzim üretim miktarları tespit edildi.

3.19. Farklı NaCl Konsantrasyonlarının α -Amilaz Üretimi Üzerine Etkisinin Araştırılması

Besiyerlerindeki NaCl konsantrasyonu %0, %2.5, %5, %7.5 ve %10 olacak şekilde ayarlandı. Steril edilen besiyerlerine inokülasyon oranı %1 olacak şekilde ekimler yapıldı. 120 rpm'de, 35 °C sıcaklıkta, 36 saat inkübe edildi. Süre sonunda NB besiyerinden elde edilen üst sıvıdan Bernfeld yöntemine göre α -amilaz aktivite tayini yapıldı.

3.20. Farklı Karbon Kaynaklarının α -Amilaz Üretimi Üzerine Etkisinin Araştırılması

Karbon kaynağı olarak nişasta, fruktoz, sükroz, laktoz, galaktoz ve glukoz kullanıldı. Steril edilen besiyerlerine karbon kaynakları (%1) eklenerek, inokülasyon oranı %1 olacak şekilde bakteri ekimi yapıldı. 120 rpm'de, 35 °C sıcaklıkta, 36 saat inkübe edildi. Süre sonunda NB besiyerinden elde edilen üst sıvıdan Bernfeld yöntemine göre α -amilaz aktivite tayini yapılarak α -amilaz üretimi hesaplandı.

3.21. Farklı Azot Kaynaklarının α -Amilaz Üretimi Üzerine Etkisinin Araştırılması

Azot kaynağı olarak üre, amonyum sülfat, amonyum asetat, amonyum tiyosiyanat, metiyonin ve glisin kullanıldı. Azot kaynaklarının besiyerindeki oranı %1

olacak şekilde ayarlandı. Steril edilen besiyerlerine inokülasyon oranı %1 olacak şekilde ekim yapıldı ve optimum koşullarda inkübe edildi. Süre sonunda NB besiyerinden elde edilen üst sıvıdan Bernfeld yöntemine göre α -amilaz aktivite tayini yapıldı. Buna bağlı α -amilaz üretimi belirlendi.

3.22. Farklı Sürfaktanların α -Amilaz Üretimi Üzerine Etkisinin Araştırılması

Sürfaktan olarak TritonX-100 ve Tween-20 kullanıldı. Besiyerindeki konsantrasyonları %0.05, %0.1 ve %0.5 olacak şekilde eklenerek otoklavlanıp steril edildi. İnokülasyon oranı %1 olacak şekilde ekim yapılan besiyerleri optimum koşullarda inkübe edildi. Süre sonunda NB besiyerinden elde edilen üst sıvıdan Bernfeld yöntemine göre α -amilaz aktivite tayini yapıldı ve α -amilaz üretimi hesaplandı.

3.23. Farklı Tarımsal Atıkların α -Amilaz Üretimi Üzerine Etkisinin Araştırılması

Tarımsal atık olarak; elma kabuğu, portakal kabuğu, muz kabuğu, fıstık kabuğu, fıstık yaprağı, buğday kepeği, arpa kepeği ve fasulye küspesi kullanıldı. Bu tarımsal atıklar önce 50 °C'de kurutuldu. Daha sonra blendır yardımıyla parçalanıp elendi. Tarımsal atıklar, besiyerindeki oranı %2 (v/w) olacak şekilde eklenerek otoklavlandı, ekim yapılan besiyerleri daha sonra optimum koşullarda inkübe edildi. Süre sonunda NB besiyerinden elde edilen üst sıvıdan Bernfeld yöntemine göre α -amilaz aktivitesi belirlendi. α -Amilaz üretim miktarları tespit edildi.

3.24. Farklı Metallerin α -Amilaz Üretimi Üzerine Etkisinin Araştırılması

CaCl₂, CoCl₂, ZnCl₂, CuCl₂, NiCl₂, MnCl₂, CdCl₂ ve PbCl₂ gibi farklı metallerin besiyerlerindeki konsantrasyonları 100, 250 ve 500 mg/L olacak şekilde eklenerek steril edildi. İnokülasyon oranı %1 olacak şekilde ekim yapıldı. Daha sonra optimum koşullarda inkübe edilerek, NB besiyerinden elde edilen üst sıvıdan Bernfeld yöntemine göre α -amilaz aktivitesi tayini yapıp α -amilaz üretimi hesaplandı.

3.25. Enzim Saflaştırılması

3.25.1. α -Amilaz enziminin saflaştırılması

Optimum koşullarda üretimi yapılan bakteri kültürleri soğutmalı santrifüjde 10.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek elde edilen üst sıvılar enzim saflaştırılmasında kullanıldı. Enzim saflaştırmada birbirini takip eden üç işlem uygulandı. Bu işlemler; amonyum sülfat ile çöktürme, diyaliz ve iyon değiştirici kromatografisidir.

3.25.1.1. Amonyum sülfat çöktürmesi

Steril bir beherde toplanan süpernatant üzerine sırasıyla %40, %50, %60 ve %70'lik doğunluk seviyelerinde olacak şekilde amonyum sülfat $[(NH_4)_2SO_4]$ ilave edildi. Daha sonra karışım soğutmalı santrifüjde 10.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi.

3.25.1.2. Diyaliz

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen pelet 0.1 M pH 7.0 Tris-HCl tamponu içerisinde çözülerek 12 kDa ve daha büyük molekül ağırlığındaki maddeleri tutan diyaliz hortumu içerisine aktarıldı. Diyaliz hortumu içerisindeki enzim solüsyonu saf suya karşı 4 °C'de magnetik karıştırıcı ile karıştırılarak bir gece bekletildi. Elde edilen diyalizattan protein ve enzim aktivite tayinleri yapıldı.

3.25.1.3. DEAE- selüloz kolon kromatografisi

Dietilaminoetil (DEAE) selüloz kolon kromatografisi için 1.5-20 cm ebadında cam kolon kullanıldı. Kolon 0.01 M fosfat tamponu (pH: 8.0) içinde hazırlanan Whatman DEAE-Selüloz kolon dolgu maddesiyle dolduruldu. Kolon 0.1 M potasyum fosfat tamponuyla (pH: 8.0) dengelendi. Diyalizat enzim solüsyonu DEAE-Selüloz DE-32 kolonuna verildi. 0.1-1 M NaCl içeren 0.1 M fosfat tamponu (pH: 8.0) kullanılarak linear gradient hazırlandı. Fraksiyon kolektörü, akış hızı saatte 20 mL ve her tüp 3 mL olacak şekilde ayarlandı. Kolon 0.1-1 M NaCl gradienti ile yıkanarak fraksiyonlar toplandı. Elde edilen örneklerden α -amilaz aktivitesi ve protein miktar tayini yapıldı. Yüksek aktivitenin tespit edildiği örnekler birleştirildi ve liyofilize edildi. Elektroferez ile saflaştırılan α -amilaz enziminin molekül ağırlığı tespit edildi. Saf enzim, karakterizasyon işlemlerini yapmak üzere -21°C'de saklandı.

3.26. Farklı Sıcaklık Değerlerinin Safılaştırılmış α -Amilaz Aktivitesi ve Stabilitesi Üzerine Etkisinin Araştırılması

200 μ L %0.5'lik nişasta çözeltisi, 10 μ L saf enzim ile 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ve 90 °C sıcaklıklarda inkübe edildikten sonra Bernfeld yöntemine göre enzim aktivite tayini yapıldı. Böylece iki bakteri suşundan elde edilen α -amilazların optimum sıcaklığı tespit edildi.

Daha sonra saf enzim 40, 50, 60 ve 70 °C'lerde inkübe edilip 0, 30, 60, 90, 120, 180 ve 240'ıncı dakikalarda Bernfeld yöntemine göre α -amilaz aktivite tayini yapılarak α -amilazların sıcaklık stabiliteleleri belirlendi.

3.27. Farklı pH Değerlerinin Safılaştırılmış α -Amilaz Aktivitesi ve Stabilitesi Üzerine Etkisinin Araştırılması

Çözünür nişasta sırasıyla, sitrik asit (0.1 M pH: 3.0, 4.0 ve 5.0), soyum fosfat (0.2 M pH: 6.0, 7.0 ve 8.0) ve sodyum karbonat (0.1 M pH: 9.0, 10.2 ve 10.8) tamponları içerisindeki oranı %0.5 olacak şekilde hazırlandı. Daha sonra optimum sıcaklıkta α -amilaz aktivite tayini yapılarak α -amilazların optimum pH değerleri belirlendi.

Safılaştırılmış enzim farklı pH (4.0, 5.0, 6.0, 7.0 ve 8.0) değerlerinde 0, 30, 60, 90, 120, 180 ve 240 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra 70 °C'de Bernfeld yöntemine göre amilaz aktivite tayini yapıldı ve pH stabilite değerleri hesaplandı.

3.28. Farklı NaCl Konsantrasyonlarının Safılaştırılmış α -Amilaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Araştırılması

Son konsantrasyonları %2.5, %5, %7.5, %10, %12.5, %15, %20 ve %25 olacak şekilde hazırlanan NaCl ile safılaştırılmış α -amilaz deney tüplerine eklenip, optimum koşullarda inkübe edildikten sonra Bernfeld yöntemine göre α -amilaz aktiviteleri belirlendi.

3.29. Safılaştırılmış α -Amilaz Aktivitesi Üzerine Bazı Metallerin Etkisinin Araştırılması

Son konsantrasyonları 0.3 mM ve 1.5 mM olacak şekilde hazırlanan farklı metaller (CdCl₂, PbCl₂, CuCl₂, CaCl₂, NiCl₂, CrCl₂, HgCl₂, AgCl₂, CoCl₂, MnCl₂ ve

ZnCl₂) ile saflaştırılmış α -amilaz deney tüplerine eklendi. Optimum koşullarda inkübe edildikten sonra α -amilaz aktivite tayini yapıldı.

3.30. Saflaştırılmış α -Amilazın Farklı Nişastalardaki Aktivitesinin Araştırılması

Saflaştırılmış α -amilaz, %0.5 oranında hazırlanan farklı nişasta (buğday, patates, ticari buğday ve ticari patates) çözeltileriyle inkübe edildi ve Bernfeld yöntemine göre amilaz aktivite tayini yapıldı.

3.31. Farklı Etanol ve β -Merkaptoetanol Konsantrasyonlarında Saflaştırılmış α -Amilaz Aktivitesinin Araştırılması

Saflaştırılmış enzim ile farklı konsantrasyonlardaki (%1, %2.5, %5, %7.5, %10, %15 ve %20) etanol ve β -merkaptetanol deney tüplerine eklenerek optimum koşullarda inkübe edildi. Daha sonra α -amilaz aktivite tayini yapıldı.

3.32. İnce-Tabaka Kromatografisi (TLC)

Saflaştırılmış α -amilaz, son parçalanma ürünlerini belirlemek için çözünebilir buğday nişastası ile farklı zaman aralıklarında inkübe edildi. Farklı inkübasyon sürelerinin sonunda reaksiyon karışımları, TLC (Thin Layer Chromatography) plakası üzerinde, çözücü olarak n-bütanol/metanol/H₂O (8:4:3,v/v/v) kullanılarak yürütüldü ve oda ısısında kurumaya bırakıldı. Daha sonra TLC plakası üzerine sülfürik asit/metanol solüsyonu (1:7, v/v) püskürtülerek, 10 dakika boyunca 95 °C'de kurutulduktan sonra reaksiyon ürünleri görselleştirildi.

3.33. %1'lik Ham Nişastanın Saflaştırılmış α -Amilaz Tarafından Parçalanması ve Işık Mikroskobunda Görüntülenmesi

Ham buğday ve mısır nişasta taneleri atık maddeleri uzaklaştırmak için saf su ile 3 kez yıkandı ve daha sonra kurutuldu. %1'lik ham buğday ve mısır nişastaları 50 mM pH 5.0 sitrik asit tamponu içerisinde süspansiyon halinde hazırlandıktan sonra, 990 μ L süspansiyon halindeki nişastaların üzerine 10 μ L saflaştırılmış enzim eklenerek reaksiyon başlatıldı. Saflaştırılmış enzim ve ham nişasta karışımları, 240 dakika boyunca 55 °C'de inkübe edildi. 240 dakika inkübasyondan sonra bu reaksiyon sonucu oluşan karışım santrifüjlendi ve oluşan süpernatantlar DNS asit yöntemiyle ölçülerek

standart maltoz ile oluşan indirgen şekerler belirlendi. Ham nişasta hidroliz oranı (Rh), aşağıdaki formül ile tespit edildi:

$$Rh (\%) = (A_1/A_0) 100,$$

burada A_0 reaksiyondan önce ham nişasta miktarı ve A_1 reaksiyonundan sonra süpernatant içindeki şeker miktarıdır (Mitsuiki ve ark., 2005). 240 dakika sonra hidrolize edilen buğday ve mısır nişastaları iki kez saf etanol ile yıkanarak iyodür çözeltisi ile 5 dakika muamele edildi ve Olympus CX31 ışık mikroskobu ile 400 kat büyütme altında enzim ile etkileştirilmeyen nişastalar kontrol olarak kullanılarak fotoğraflandı.

3.34. %0.5'lik Farklı Deterjanların α -Amilaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Araştırılması

%0.5'lik deterjan çözeltileri hazırlandı. Her bir tüpe 200 μ L deterjan çözeltisi, 200 μ L %0.5'lik nişasta ve 10 μ L saflaştırılmış enzim ilave edildi. Optimum koşullarda inkübe edildikten sonra Bernfeld yöntemine göre enzim aktivite tayini yapıldı.

3.35. Çözünür ve Çözünür Olmayan Nişasta Tayini

Olgunlaşmamış elmalar toplanıp yıkandıktan sonra küçük parçalara kesildi ve blendırda iyice çekildi. Daha sonra 1000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildikten sonra 90 °C'de 5 dakika bekletilerek pastörize edildi. Pelet eşit hacimlerde önce 2M HCl ve daha sonra 2M NaOH ile sırasıyla muamele edildi. 0.1 M asetat tamponu (pH 4.6) ile seyreltilerek iyodür yöntemine göre çözünür olmayan nişasta miktarı hesaplandı. Çözünür nişasta miktarı ise süpernatant kullanılarak aynı yöntemle tespit edildi. Aynı zamanda çözünür ve çözünür olmayan elma nişastasını saflaştırılmış amilaz ile inkübe edilerek nişasta giderimi iyodür yöntemine göre aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

İyodür Yöntemi: 0.1 M iyot çözeltisi ile potasyum iyodür çözeltisi (5g/100mL) aynı hacimlerde karıştırıldı. 1 mL nişasta içeren örnek 0.5 mL iyodür çözeltisi ile karıştırılarak oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi ve 615 nm'de spektrofotometrede absorbansları tayin edildi.

$$\%Nişasta\ Giderimi = [(Ni_{baş} - Ni_{son})/Ni_{baş}] \times 100$$

$Ni_{baş}$ = Başlangıçtaki Nişasta Miktarı

Ni_{son} = Son Nişasta Miktarı

3.36. Elektroforez

3.36.1. Nondenatüre poliakrilamid jel elektroforezi (Laemmli)

3.36.1.1. Jelin hazırlanması

Çalışmalarımızda %10'luk jel kullanıldı. Ayırma jeli için, 3.3 mL akrilamid / bis akrilamid, 1.35 mL 0.1 M Tris-HCl (pH: 8.8), 4.8 mL saf su, 75 µL %10'luk APS (Amonyum persülfat), 7.5 µL %10'luk SDS, 660 µL %3'lük nişasta ve 10 µL TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilediamin)'den oluşan ayırma jeli buz içerisinde ve sürekli magnetik karıştırıcı ile karıştırılarak hazırlandı.

Konsantrasyon jeli için, 520 µL akrilamid/bis akrilamid, 1 mL 0.1 M Tris-HCl (pH: 6.8) , 20 µL %10'luk APS, 4 µL TEMED, 4 µL %10'luk SDS ve 2.44 mL saf sudan oluşan karışım hazırlandı. İşlemler buz içerisinde ve karıştırılarak yapıldı.

İki cam levha arasına 6 cm yükseklikte ayırma jeli döküldü, üzerine pastör pipetiyle, su ile doyurulmuş izopropanol konarak hava ile teması kesildi. Oda ısısında 30-60 dakika polimerizasyon gerçekleşti. Polimerizasyon gerçekleştikten sonra izopropanol distile su ile yıkandı. Kuyucukların oluşması için tarak yerleştirildi ve konsantrasyon jeli döküldü. Hava ile temasını kesmek için üzerine izopropanol eklendi. Oda sıcaklığında 30-45 dakika polimerizasyon gözlendi.

3.36.1.2. Elektroforez işlemi

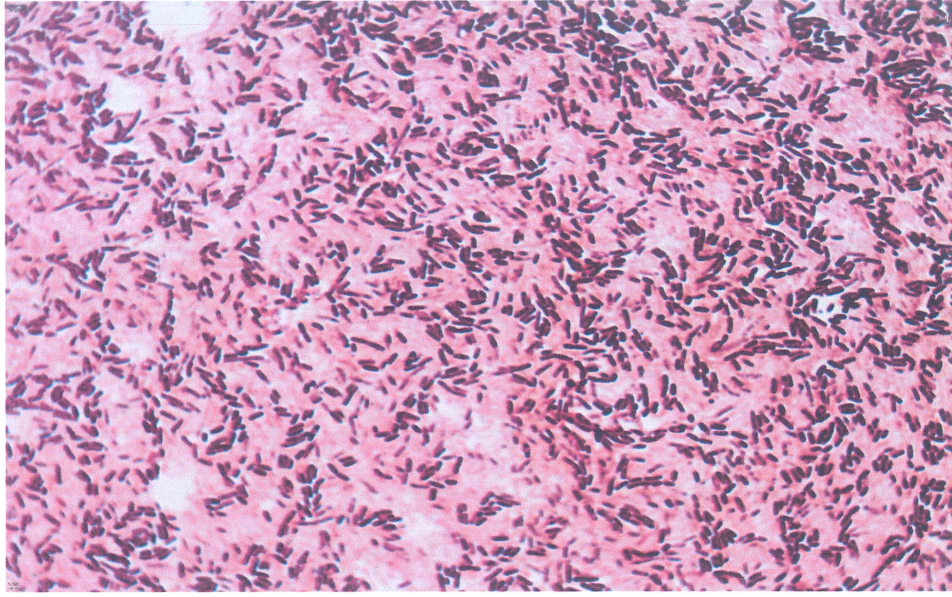
Standart protein ticari alfa-amilazdan (0.005 g/mL) 30 µL ve 20 µL alındı. Farklı ependorflar içerisine konulup üzerlerine 15'er µL iz boya eklendi. Elektroforez yapılacağı zaman jelin üzerindeki su uzaklaştırıldı. Saflaştırılmış enzim çözeltisinden 30 µL alıp bir ependorf içerisine konulup üzerlerine 15 µL iz boya eklendi. Örnekler kuyucuklara konuldu. 1.00 mm'lik jele 40 mA akım verildi ve 2 saat sonra elektroforez işlemi tamamlandı. Camlar arasındaki jel çıkarıldıktan sonra, *Bacillus vallismortis*'ten elde edilen α-amilaz 0.1 M sitrik asit tamponu (pH 5.0), *Bacillus mojavensis*'ten elde edilen α-amilaz için 0.2 M sodyum fosfat tamponu (pH 6.0) içerisinde 1 saat bekletildi. Daha sonra 0.1 M Tris-HCl (pH 6.0)'de bekletildi. Sonra tampon çözeltisi dökülüp üzerine iyot solüsyonu eklendi ve yarım saat sonra incelemeye alındı (Laemmli, 1970; Matzka, 2000).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

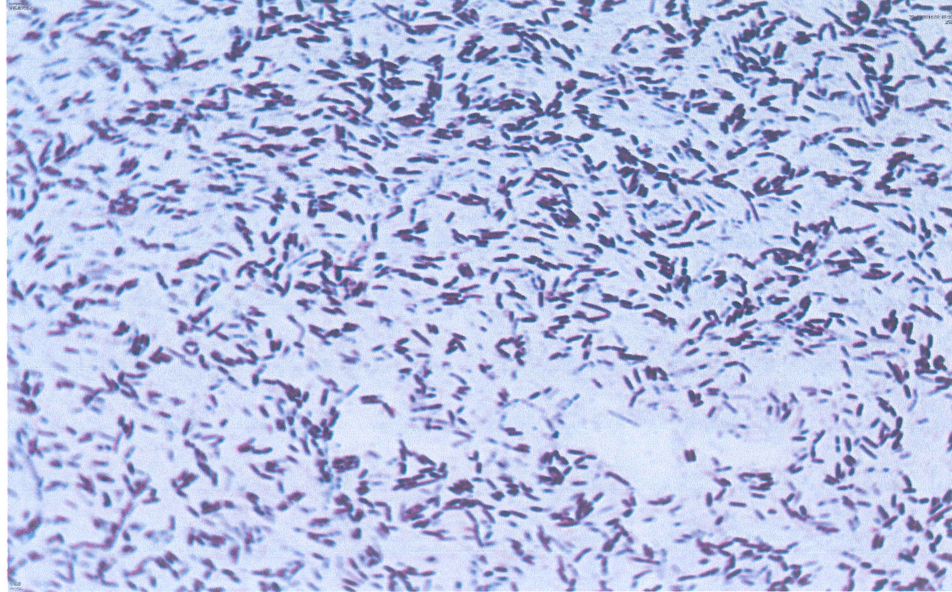
4.1. Biyokimyasal Testler

4.1.1. Gram boyama

Bacillus vallismortis ve *Bacillus mojavensis*'ten elde edilen kononiler Gram Boyama Yöntemi ile boyanarak fotoğraflandı. Şekil 4.1 ve 4.2'de görüldüğü gibi iki bakteri suşunda da gram (+) bakteri olduğu belirlendi.



Şekil 4.1. *Bacillus vallismortis* gram boyama (+)



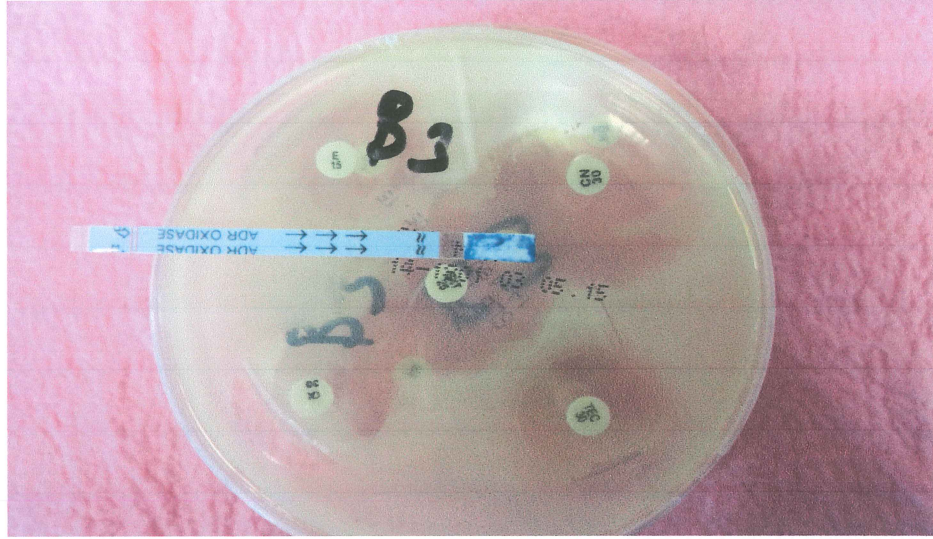
Şekil 4.2. *Bacillus mojavensis* gram boyama (+)

4.1.2. Katalaz testi

İki bakteri suşundan elde edilen koloniler katalaz testine tabi tutuldu. Test sonuçlarına göre *Bacillus vallismortis* ve *Bacillus mojavensis* bakterilerinin katalaz enzimi sentezledikleri (katalaz pozitif) tespit edildi.

4.1.3. Oksidaz testi

Oksidaz testi sonucuna göre *Bacillus vallismortis* ve *Bacillus mojavensis* bakterilerinde sitokrom oksidaz enziminin varlığı (oksidaz pozitif) tespit edildi. Sonuçlar fotoğraflanarak Şekil 4.3 ve 4.4'te gösterildi.



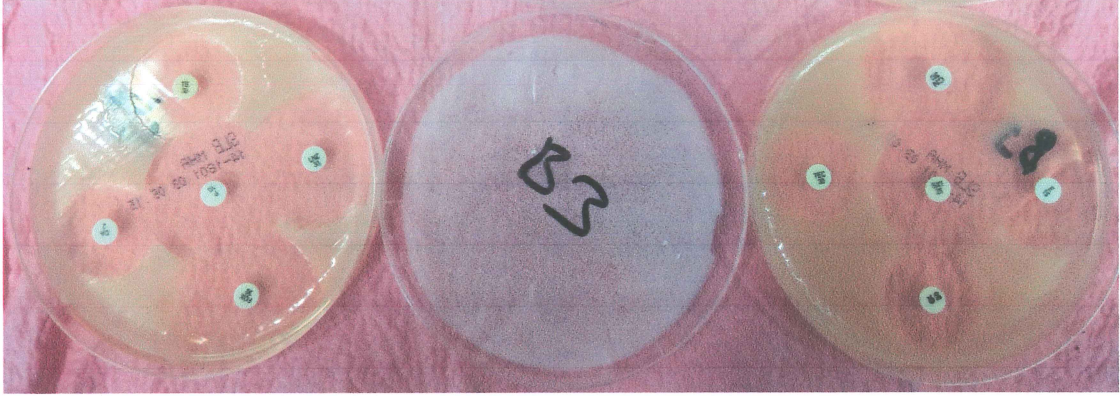
Şekil 4.3. *Bacillus vallismortis* oksidaz testi



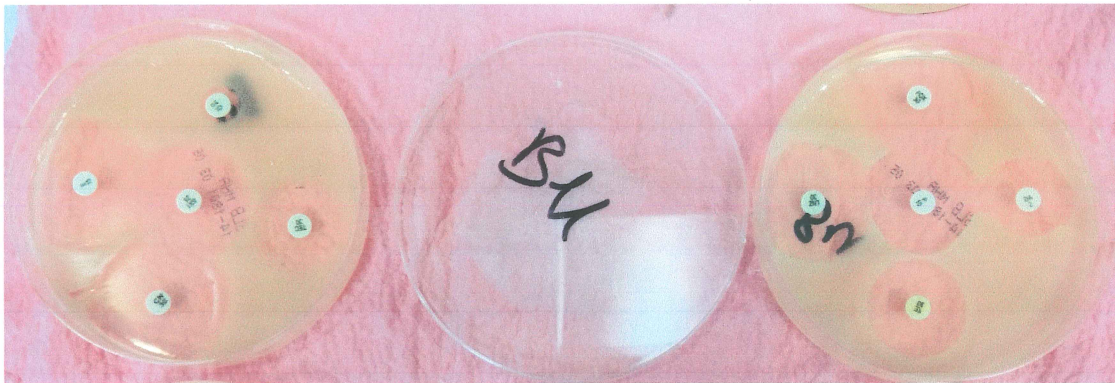
Şekil 4.4. *Bacillus mojavensis* oksidaz testi

4.1.4. Antibiyotiklere duyarlılık testi

İki bakteri suşu için yapılan antibiyotik duyarlılık testi Şekil 4.5 ve 4.6'da fotoğraflanarak gösterildi. Test sonuçlarına göre (Tablo 4.1) *Bacillus vallismortis*'in sefotaksime, *Bacillus mojavensis* ise sefotaksim ve penisiline dirençli olduğu, bunların dışında kullanılan diğer antibiyotiklere duyarlı oldukları belirlendi.



Şekil 4.5. *Bacillus vallismortis* antibiyotiklere duyarlılık testi



Şekil 4.6. *Bacillus mojavensis* antibiyotiklere duyarlılık testi

Tablo 4.1. Antibiyotiklere duyarlılık testi

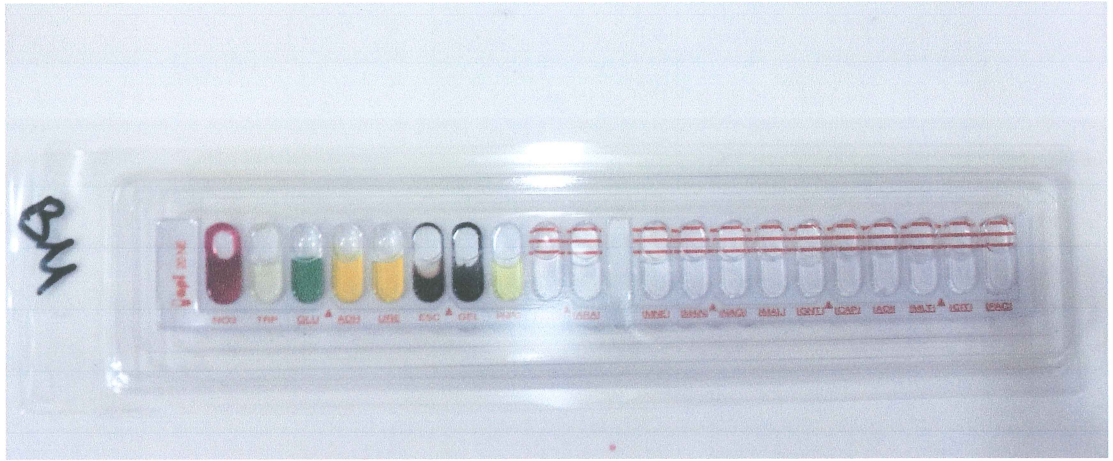
ANTİBİYOTİK ADI	DUYARLI/DİRENÇLİ			BAKTERİ	
	S	I	R	<i>B.vallismortis</i>	<i>B.mojavensis</i>
GENTAMİSİN 10 MC	≥15	13-14	≤12	30	34
ERİTROMİSİN 15 MC	≥23	14-22	≤13	31	33
TRIMETHOPRİM+SULFAMETOKSAZOL 25 MC	≥16	11-15	≤10	29	31
SEFOTAKSİM 30 MC	≥26	23-25	≤22	22	9
TEİKOPLANİN 30 MC	≥18	13-17	≤12	18	21
SEFOKSİTİN 30 MC	≥22		≤21	33	29
KLİNDAMİSİN 2MC	≥21	15-20	≤14	22	21
PENİSİLİN G 10 MC	≥29		≤28	35	28
TETRASİKLİN 30 MC	≥19	15-18	≤14	27	25
LİNEZOLİD 30 MC	≥21		≤20	32	32

4.1.5. API 20 NE testi

B. vallismortis ve *B. mojavensis* için yapılan API 20NE testi sonuçları fotoğraflanarak Şekil 4.7 ve Şekil 4.8’de gösterildi. Tablo 4.2’de görüldüğü gibi iki bakteri şuşunun da biyokimyasal bir test olan API 20NE sonuçlarının benzer olduğu belirlendi. Test sonuçlarına göre iki bakteri şuşunun da; Potasyum Nitrat (KNO₃), Eskulin Ferric Citrate (ESC), Gelatin (Bovin) (GEL), 4-Nitrofenil β-D-Galaktopiranzid (PNPG), D-Glukz (Asimilasyon) (GLU) testlerinin sonuçlarının pozitif olduğu tespit edildi. L-Triptofan (TRP), Üre (URE), L_Arabinoz (ARA), D-Mannoz (MNE), D-Mannitol (MAN), N-Asetil-Glukozamin (NAG), D-Maltoz (MAL), Potasyum Glukonat (GNT), Kaprik Asit (CAP), Adipik Asit (ADI), Malik Asit (MLT), Trisodyum Sitrat (CIT), Fenilasetik Asit (PAC) testlerinin negatif olduğu belirlendi.



Şekil 4.7. *Bacillus vallismortis* API 20 NE testi



Şekil 4.8. *Bacillus mojavensis* API 20 NE testi

Tablo 4.2. API 20 NE testi

API 20 NE			
TESTLER	AKTİF İÇERİK	REAKSİYON/ENZİMER	SONUÇ
NO ₃	POTASYUM NİTRAT	NİTRATI İNDİRGEME	POZİTİF
TRP	L-TRİPTOFAN	İNDOL ÜRETİMİ	NEGATİF
GLU	D-GLUKOZ	FERMENTASYON	NEGATİF
ADH	L-ARGİNİN	ARGİNİNE DİHYDROLAZ	NEGATİF
URE	URE	UREAZ	NEGATİF
ESC	ESCULIN FERRİC CITRATE	HYDROLİZ (B- GLUKOSİDAZ)	POZİTİF
GEL	GELATİN (BOVIN)	HYDROLİZ (PROTEAZ)	POZİTİF
PNPG	4-NİROFENİL-BD- GALAKTOPIRANAZİD	B-GALAKTOSİDAZ	POZİTİF
GLU	D-GLUKOZ	ASİMİLASYON	POZİTİF
ARA	L-ARABİNOZ	ASİMİLASYON	NEGATİF
MNE	D-MANNOZ	ASİMİLASYON	NEGATİF
MAN	D-MANNİTOL	ASİMİLASYON	NEGATİF
NAG	N-ASETİL -GLUKOZAMİN	ASİMİLASYON	NEGATİF
MAL	D-MALTOZ	ASİMİLASYON	NEGATİF
GNT	POTASYUM GLUKONAT	ASİMİLASYON	NEGATİF
CAP	KAPRİK ASİT	ASİMİLASYON	NEGATİF
ADI	ADİPİK ASİT	ASİMİLASYON	NEGATİF
MLT	MALİK ASİT	ASİMİLASYON	NEGATİF
CIT	TRİSODYUM SİTRAT	ASİMİLASYON	NEGATİF
PAC	FENİLASETİK ASİT	ASİMİLASYON	NEGATİF

4.2. Farklı İnkübasyon Sürelerinin α -Amilaz Üretimi Üzerine Etkisinin Araştırılması

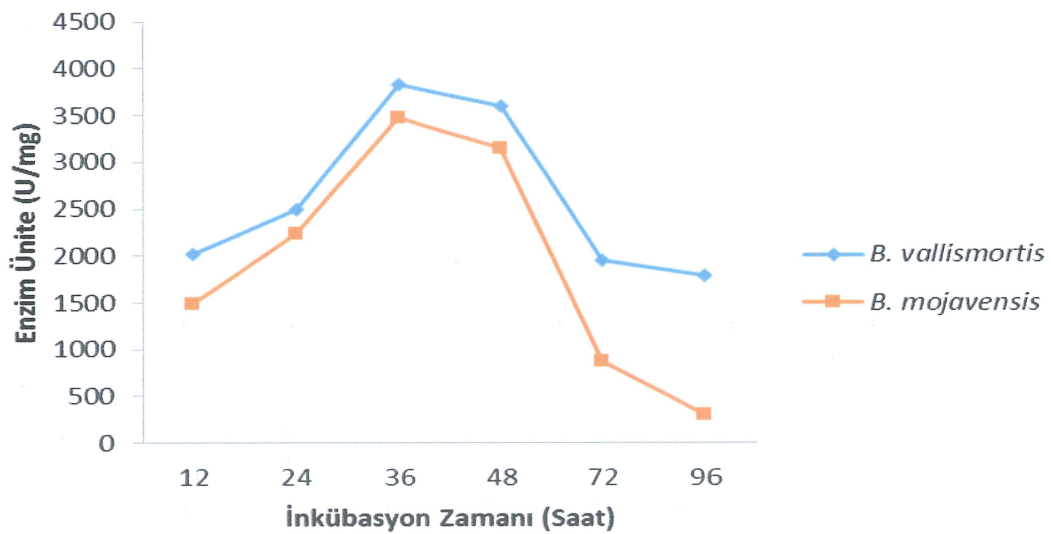
Farklı inkübasyon sürelerinin (12, 24, 36, 48, 72 ve 96. saatler) *Bacillus vallismortis* ve *Bacillus mojavensis*'ten α -amilaz üretimi üzerine etkisi incelendi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.9'da gösterilmiştir.

12 saat inkübasyon sonunda *Bacillus vallismortis* ve *Bacillus mojavensis* için α -amilaz üretim miktarları sırasıyla 2017.28 U/mg ve 1480.38 U/mg olarak bulundu. *B.*

vallismortis ve *B. mojavensis*'ten α -amilaz üretiminde, inkübasyon süresi 12 saatten 24 saate çıkarıldığında, enzim üretiminin sırasıyla yaklaşık %24 ve %51 arttığı, 24 saatten 36 saate çıkarıldığında ise 24. saate kıyasla %54 ve %55 arttığı tespit edildi. İnkübasyon süresi 36 saatten 48 saate yükseldiğinde *B. vallismortis* ve *B. mojavensis* için enzim üretiminin sırasıyla yaklaşık %6 ve %9 azaldığı belirlendi.

36. saatten sonra bakteri üremesindeki azalmaya bağlı olarak enzim üretiminin azaldığını düşünmekteyiz (bakteri üretimi sonuçları gösterilmemiştir). Bu azalmanın nedenlerinin; ortamda oluşan metabolik atıklar ve toksik bileşikler, oksijen ve besin miktarında azalma ve bunlara bağlı olarak da ortamın pH değerinin değişmesi olduğu kanaatindeyiz. Elde ettiğimiz sonuçlara göre en yüksek enzim üretimi *B. vallismortis* için 3832.08 U/mg ve *B. mojavensis* için 3473.085 U/mg olarak 36 saat inkübasyon süresinde elde edildi ve bundan sonraki çalışmalarımızda bu süre inkübasyon süresi olarak belirlendi.

Benzer şekilde Özdemir ve ark. (2009), katı-hal fermantasyon tekniği ile (SSF) *Bacillus subtilis*'ten ekstrasellüler amilaz üretimini 72 saat fermantasyon sonucu elde etmişlerdir. Pancha ve ark. (2010), Merkez Tuz ve Deniz Kimyası Araştırma Enstitüsü deneysel tuz çiftliğinden izole edilen *Bacillus* sp.'den en yüksek termostabil amilazı 48 saat inkübasyon süresinde elde etmişlerdir. Özdemir ve ark. (2011), Dicle Üniversitesi Kampüs alanındaki toprak örneklerinden izole ettikleri *Bacillus subtilis*'ten en yüksek enzim üretimini 24 saat inkübasyon sonunda tespit etmişlerdir.



Şekil 4.9. Farklı inkübasyon sürelerinde α -amilaz üretimi

4.3. Farklı Sıcaklık Değerlerinin α -Amilaz Üretimi Üzerine Etkisinin Araştırılması

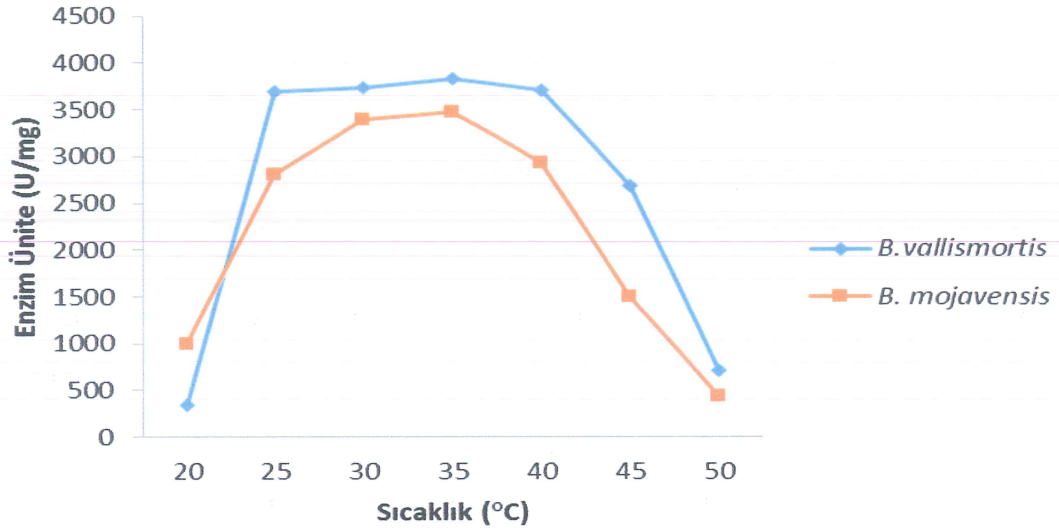
Farklı sıcaklık değerlerinin (20, 25, 30, 35, 40, 45 ve 50 °C) α -amilaz üretimi üzerine etkileri test edildi. Sonuçlar Şekil 4.10'da gösterilmiştir.

20 °C'de *Bacillus vallismortis* ve *Bacillus mojavensis* için α -amilaz üretimi sırasıyla 348.54 U/mg ve 997.22 U/mg olarak bulundu. *B. vallismortis* ve *B. mojavensis*'ten α -amilaz üretiminde sıcaklığın 20 °C'den 25 °C'ye çıkarılmasıyla α -amilaz üretiminin sırasıyla yaklaşık %958 ve %182 arttığı tespit edildi. İnkübasyon sıcaklığı 25 °C'den 30 °C'ye yükselmesiyle α -amilaz üretiminin sırasıyla yaklaşık %1 ve %20 arttığı belirlendi. İnkübasyon sıcaklığı 30 °C'den 35 °C'ye yükselmesiyle α -amilaz üretiminin sırasıyla yaklaşık %3 ve %2 arttığı tespit edildi.

B. vallismortis ve *B. mojavensis*'ten α -amilaz üretiminde inkübasyon sıcaklığının 35 °C'den 40 °C'ye yükselmesiyle α -amilaz üretiminin sırasıyla %3 ve %15 azaldığı ve daha yüksek inkübasyon sıcaklıklarında inkübasyon sıcaklığının artışına paralel bir şekilde α -amilaz üretiminin azaldığı belirlendi.

25 °C'nin altında ve 40 °C'nin üzerindeki inkübasyon sıcaklıklarında α -amilaz üretiminin azalmasının, bakteri üremesindeki azalmadan kaynaklandığını düşünmekteyiz. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde, α -amilaz üretiminde *B. vallismortis* için 25-40 °C aralığının, *B. mojavensis* için ise 30-35 °C aralığının oldukça uygun olduğu tespit edildi. *B. vallismortis* ve *B. mojavensis* için en yüksek enzim üretimi sırasıyla 3832.08 U/mg ve 3473.08 U/mg olarak 35 °C'de elde edildi. Bundan sonraki çalışmalarımızda her iki bakteri suşu için inkübasyon sıcaklığı olarak 35 °C kullanıldı.

Benzer şekilde Najafi ve ark. (2005), topraktan izole ettikleri *Bacillus subtilis* AX20'den en yüksek amilaz aktivitesini kültürün 37 °C'de büyütülmesi ile birlikte durağan faz aşamasında tespit etmişlerdir. Özdemir ve ark. (2009), katı-faz fermantasyon (SSF) tekniği ile *Bacillus subtilis*'ten ekstrasellüler amilaz üretimini çalışmışlar ve en yüksek amilaz üretimini 37 °C'de elde etmişlerdir. Sharma ve Satyanarayana (2011), *Bacillus acidicola* TSAS12'den batık fermantasyon tekniği ile α -amilaz üretiminin optimizasyonunu çalışmışlar ve en yüksek enzim üretiminin 33 °C'deki inkübasyon koşullarında elde edildiğini tespit etmişlerdir. Çalışmalarımızda en yüksek amilaz üretimini elde ettiğimiz 35 °C sıcaklık değeri, *Bacillus* suşlarıyla çalışma yapılan yukarıda belirtilen araştırmalarla benzer sonuçlar göstermiştir.



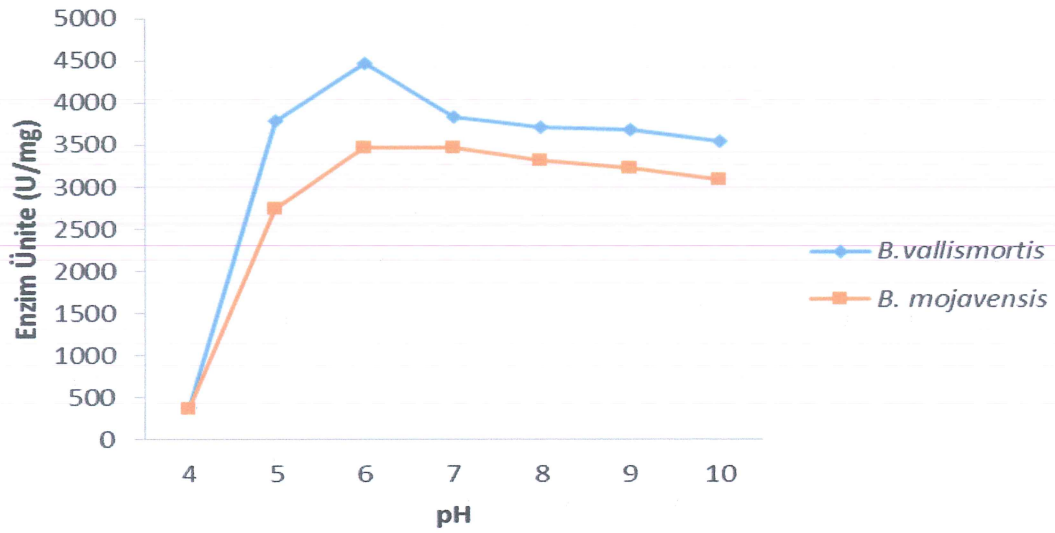
Şekil 4.10. Farklı sıcaklık değerlerinde α -amilaz üretimi

4.4. Farklı pH Değerlerinin α -Amilaz Üretimi Üzerine Etkisinin Araştırılması

Enzim üretimi üzerine farklı pH değerlerinin (4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 ve 10.0) etkisi incelendi. Şekil 4.11’de görüldüğü gibi pH 4.0’da α -amilaz üretimi *B. vallismortis* ve *B. mojavensis* için sırasıyla 383.90 U/mg ve 367.24 U/mg iken pH 5.0’da 3791.46 U/mg ve 2747.76 U/mg olduğu belirlendi. İnkübasyon pH’sı 5.0’dan 6.0’a arttığında *B. vallismortis* için α -amilaz üretiminde yaklaşık %18 artış görüldü. *B. mojavensis* için inkübasyon pH’sı 5.0’dan 7.0’a arttığında α -amilaz üretiminde yaklaşık %26 artış görüldü.

İki bakteri suşundan da pH 8.0, 9.0 ve 10.0’da enzim üretiminde çok önemli bir azalmanın olmadığı belirlendi. Optimum inkübasyon pH’sının *B. vallismortis* ve *B. mojavensis* için sırasıyla 6.0 ve 7.0 olduğu tespit edildi. Bundan sonraki çalışmalarımızda enzim üretimi için bu pH değerleri kullanıldı.

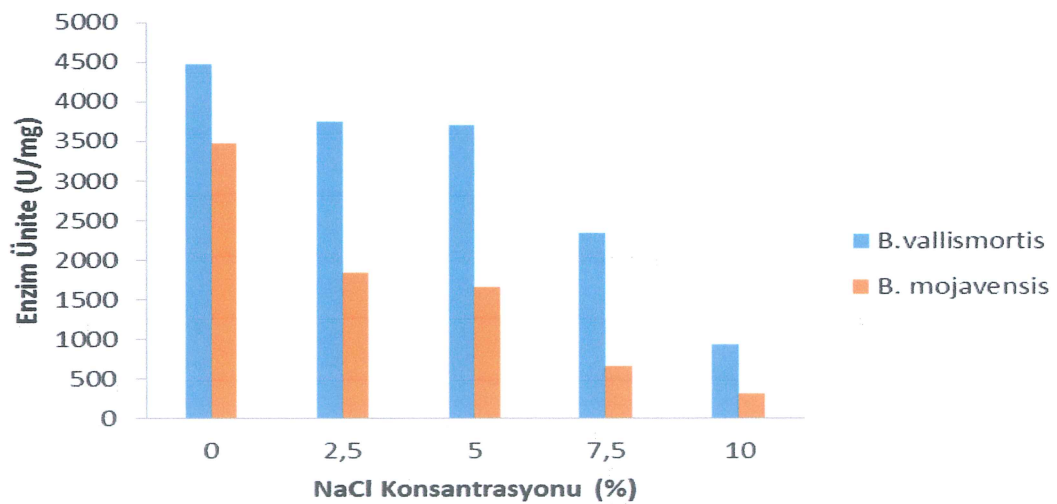
Benzer şekilde Saxena ve ark. (2007), yüksek termostabil amilaz üreten *Bacillus* sp. PN5’den amilaz üretimini pH 7.0 ortamında elde etmişlerdir. Pancha ve ark. (2010), Merkez Tuz ve Deniz Kimyası Araştırma Enstitüsü deneysel tuz çiftliğinden izole ettikleri *Bacillus* sp.’den termostabil amilaz üretimini pH 7.0 de gerçekleştirmişlerdir. Fincan ve ark. (2014), Afyon, Ömer’deki sıcak su kaynaklarından izole ettikleri *Anoxybacillus flavithermus*’tan izole ettikleri α -amilaz için optimum pH’yı 6.0 olarak tespit etmişlerdir. Elde ettiğimiz sonuçlar yukarıda belirtilen literatürler ile uyum göstermektedir.



Şekil 4.11. Farklı pH değerlerinde α -amilaz üretimi

4.5. Farklı NaCl Konsantrasyonlarının α -Amilaz Üretimi Üzerine Etkisinin Araştırılması

Farklı NaCl konsantrasyonlarının (%2.5, %5, %7.5 ve %10) α -amilaz üretimine etkisi incelendi. Şekil 4.12’te görüldüğü gibi *B. vallismortis*’ten α -amilaz üretiminde %2.5, %5, %7.5 ve %10 NaCl konsantrasyonlarında kontrole kıyasla sırasıyla yaklaşık %16, %17, %48 ve %79 düşüş tespit edildi. *B. mojavensis*’te ise aynı NaCl konsantrasyonlarında sırasıyla %47, %52, %81 ve %91 düşüş belirlendi. Bu sonuçlara göre enzim üretiminin, NaCl konsantrasyonundaki artışa paralel olarak azaldığı tespit edildi.

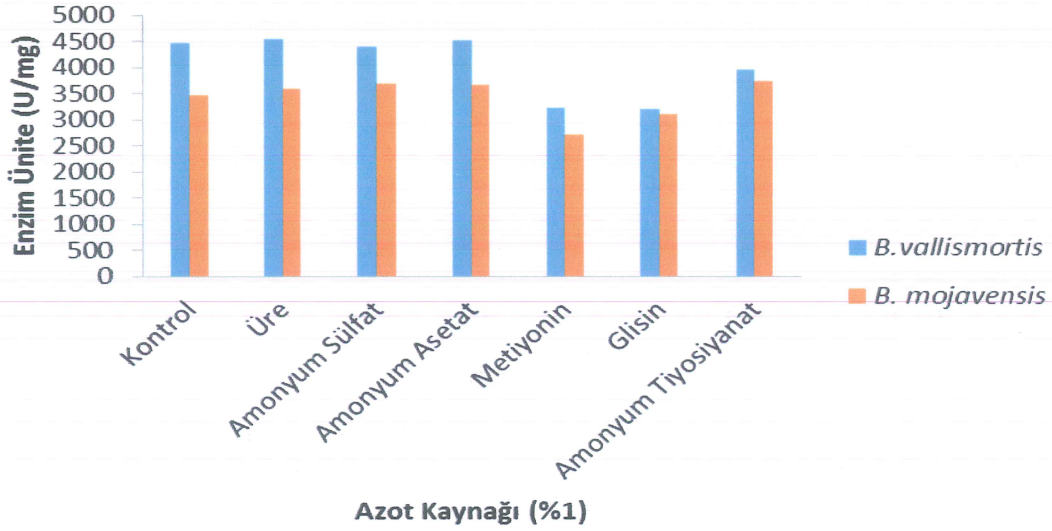


Şekil 4.12. Farklı NaCl konsantrasyonlarında α -amilaz üretimi

4.6. Farklı Azot Kaynaklarının α -Amilaz Üretimi Üzerine Etkisinin Araştırılması

Besiyerlerindeki son konsantrasyonları %1 olacak şekilde eklenen farklı azot kaynaklarının (üre, amonyum sülfat, amonyum asetat, metiyonin, glisin ve amonyum tiyosiyanat) α -amilaz üretimi üzerine etkisi Şekil 4.13'te görülmektedir. *B. vallismortis*'ten α -amilaz üretimi incelendiğinde, üre ve amonyum asetatın bulunduğu ortamda α -amilaz üretiminin kontrole kıyasla sırasıyla yaklaşık %2 ve %1 arttığı gözlemlendi. Azot kaynağı olarak amonyum sülfat, metiyonin, glisin ve amonyum tiyosiyanat kullanıldığında α -amilaz üretiminin kontrole kıyasla sırasıyla yaklaşık %2, %28, %29 ve %11 düştüğü belirlendi. *B. mojavensis*'ten α -amilaz üretimi incelendiğinde ise üre, amonyum sülfat, amonyum asetat ve amonyum tiyosiyanat bulunduğu ortamda kontrole kıyasla α -amilaz üretiminin sırasıyla yaklaşık %3, %6, %5 ve %8 arttığı tespit edildi. Metiyonin ve glisin bulunan ortamda α -amilaz üretiminde %22 ve %11 azalma olduğu belirlendi.

Benzer şekilde, Krishna ve Chandrasekanon (1996), muz sapı *Bacillus subtilis* CBTK 106 tarafından substrat olarak kullanılarak, SSF yöntemiyle azot kaynağı olarak %1'lik amonyum sülfat veya amonyum nitrat ve %0.5'lik et özütü veya peptonun enzim sentezini uyardığı sonucuna varmışlardır. Mulimani ve ark. (2000), SSF yöntemiyle *Gibberella fujikuroi*'den en yüksek α -amilaz üretimini incelemişler, buğday kepeğini substrat olarak kullanarak ve %2.5'lik azot kaynağı ilavesi yaparak, en yüksek aktiviteyi amonyum sülfatlı ortamda tespit etmişlerdir. Ramachandra ve ark. (2004), COC (Coconut oil cake) *Aspergillus oryzae* tarafından substrat olarak kullanılarak, SSF yöntemiyle azot kaynağı olarak %1'lik amonyum sülfatın α -amilaz aktivitesini uyardığını tespit etmişlerdir. Özdemir ve ark. (2011), Afyonkarahisar, Gazlıgöl'deki sıcak su kaynaklarından izole ettikleri *Anoxybacillus flavithermus* için en yüksek amilaz üretimini %1 pepton ortamında tespit etmişlerdir.



Şekil 4.13. Farklı azot kaynaklarında α -amilaz üretimi

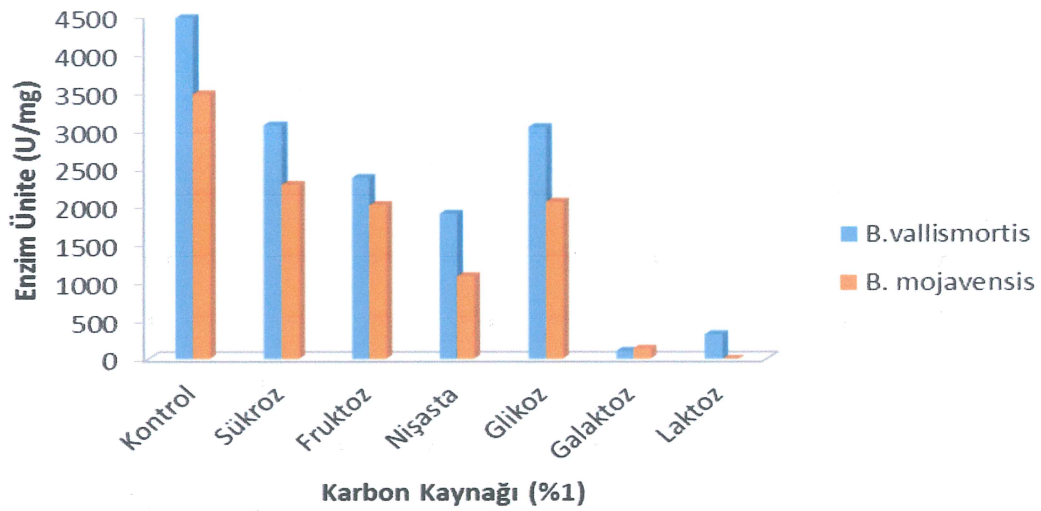
4.7. Farklı Karbon Kaynaklarının α -Amilaz Üretimi Üzerine Etkisinin Araştırılması

%1'lik karbon kaynaklarının (sükroz, fruktoz, nişasta, glukoz, galaktoz ve laktoz) α -amilaz üretimi üzerine etkisi test edildi. Şekilde 4.14'te görüldüğü gibi *B. vallismortis* ve *B. mojavensis*'ten α -amilaz üretiminde test edilen tüm karbon kaynaklarının kontrole kıyasla enzim üretiminde azalmaya neden olduğu saptandı. *B. vallismortis*'ten α -amilaz üretiminde, ortamda sükroz, fruktoz, nişasta, glukoz, galaktoz ve laktoz varlığında, kontrole kıyasla sırasıyla %31, %47, %57, %32, %98 ve %93 azalma meydana geldiği belirlendi. *B. mojavensis*'ten α -amilaz üretiminde, ortamda sükroz, fruktoz, nişasta, glukoz ve galaktoz varlığında, kontrole kıyasla, sırasıyla %34, %42, %69, %41 ve %96 azalma meydana geldiği görüldü. Laktoz bulunan ortamda *B. mojavensis*'in α -amilaz üretmediği tespit edildi. Çalışılan karbon kaynakları içinde en yüksek amilaz üretimi *B. vallismortis* için 3064.63 U/mg ve *B. mojavensis* için 2285.32 U/mg olarak sükroz bulunan ortamda tespit edildi. Her iki bakteride de kullanılan karbon kaynaklarında enzim üretiminin azalmasının nedeninin katabolik represyon olduğunu düşünmekteyiz.

Elde edilen sonuçlara göre, *B. vallismortis* ve *B. mojavensis*'ten elde edilecek α -amilazın üretimini arttırmak için besiyeri bileşimine test edilen karbon kaynaklarını eklemeye gerek olmadığı belirlenmiştir.

Krishna ve Chandrasekanon (1996), muz sapı *Bacillus subtilis* CBTK 106 tarafından substrat olarak kullanılarak, SSF yöntemiyle %0.1'lik nişasta eklentisinin α -

amilaz sentezini uyardığını tespit etmişlerdir. Ayrıca glukoz ilavesinde α -amilaz aktivitesinin görülmediğini bildirmişlerdir. Hamilton ve ark. (1999), *Bacillus* sp. IMD 435'den α -amilaz üretimini çalışmışlar, glukoz ve fruktoz ihtiva eden besiyerinde amilaz aktivitesinin görülmediğini rapor etmişlerdir. Mulimani ve arkadaşları, (2000) SSF yöntemiyle *Gibberella fujikuroi* tarafından buğday kepeği substrat olarak kullanılarak %1'lik glukozun kontrolden düşük çıktığını tespit etmişlerdir. Ramachandra ve ark. (2004), COC (Coconut oil cake) *Aspergillus oryzae* tarafından substrat olarak kullanılarak, SSF yöntemiyle %2 şeker ilavesinden sonra sükrözün α -amilaz aktivitesinde hiçbir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir.

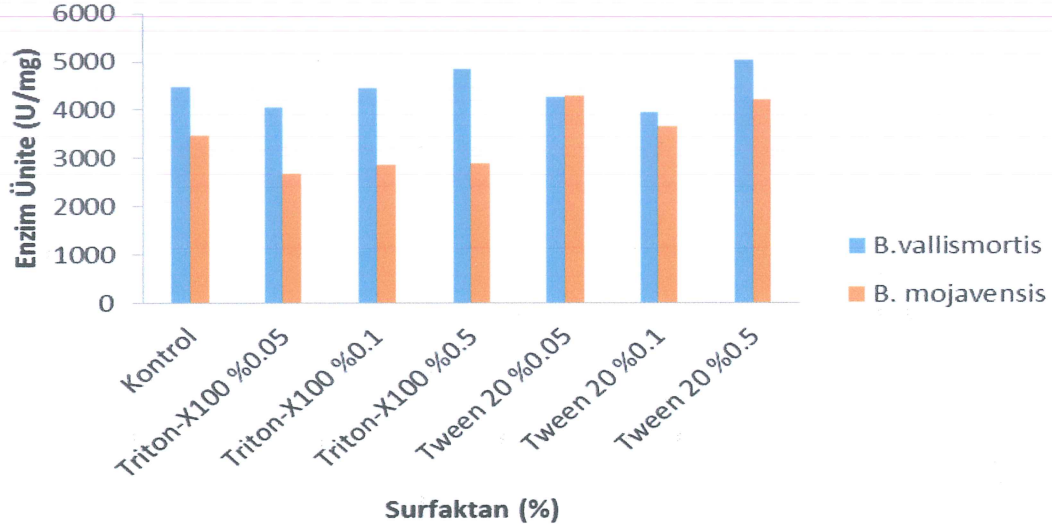


Şekil 4.14. Farklı karbon kaynaklarında α -amilaz üretimi

4.8. Farklı Sürfaktanların α -Amilaz Üretimi Üzerine Etkisinin Araştırılması

Triton-X100 ve Tween-20'nin, besiyerlerindeki farklı konsantrasyonlarının (%0.05, %0.1 ve %0.5) α -amilaz üretimi üzerine etkisi çalışıldı. Şekil 4.15'de görüldüğü gibi en yüksek α -amilaz üretimi *B. vallismortis* için %0.5 Tween-20 bulunan ortamda kontrole kıyasla %12 artışla 5028.2 U/mg olarak bulundu. *B. mojavensis* için en yüksek α -amilaz üretimi ise %0.05 Tween-20 eklenen ortamda kontrole kıyasla %23 artışla 4282.69 U/mg olarak elde edildi. Genel olarak surfaktanlar hücre yüzeyini genişletebilir ve hücre yüzeyindeki porların genişlemesine neden olabilirler. Bu durum salgılanan enzimlerin hücreden daha kolay bir şekilde çıkmasına neden olmaktadır. Enzim üretimindeki artışların nedeninin hücre yüzeyindeki porların genişlemesi olduğu düşünülmektedir.

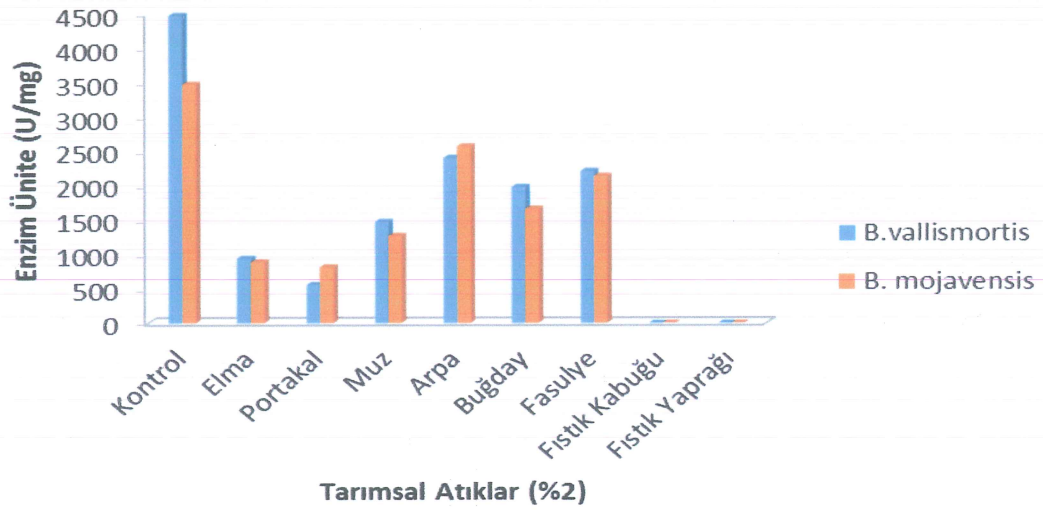
Benzer şekilde Özdemir ve ark. (2011), Dicle Üniversitesi kampüs alanındaki toprak örneklerinden izole ettikleri *Bacillus subtilis*'ten en fazla α -amilaz üretimini (7516 U/ml) %0.05 Tween-40 içeren bazal ortam A içerisinde elde etmişlerdir. Elde edilen sonuçlar Özdemir ve ark. (2015)'nin çalışmalarıyla da uyum göstermektedir.



Şekil 4.15. Farklı surfaktanlarda α -amilaz üretimi

4.9. Farklı Tarımsal Atıkların α -Amilaz Üretimi Üzerine Etkisinin Araştırılması

Besiyerlerine %2 oranında eklenen tarımsal atıkların (elma kabuğu, portakal kabuğu, muz kabuğu, arpa kepeği, buğday kepeği, fasulye küspesi, fıstık kabuğu ve fıstık yaprağı) α -amilaz üretimi üzerine etkisi incelendi. Bu tarımsal atıklardan fıstık yaprağı ve fıstık kabuğunun bakteri gelişimini inhibe ettiği ve buna paralel olarak da enzim üretiminin gerçekleşmediği tespit edildi. Şekil 4.16 incelendiğinde elma kabuğu, portakal kabuğu, muz kabuğu, arpa kepeği ve fasulye küspesinin kontrole kıyasla α -amilaz üretiminde azalmaya neden olduğu görüldü. Kullanılan tarımsal atıklar içinde *B. vallismortis* ve *B. mojavensis*'ten en yüksek amilaz üretimi arpa kepeği bulunan besiyerinde elde edildi. Bu tarımsal atıkların α -amilaz üretiminde azalma meydana getirmesinin nedeni olarak elma kabuğu, muz kabuğu, arpa kepeği ve fasulye küspesinin şeker içeriğinin fazla olmasının enzim üretimini baskılaması olduğunu düşünmekteyiz.



Şekil 4.16. Tarımsal atıkların α -amilaz üretimi üzerine etkisi

4.10. Farklı Metallerin α -Amilaz Üretimi Üzerine Etkisinin Araştırılması

Konsantrasyonları 100, 250 ve 500 mg/L olacak şekilde hazırlanan $MnCl_2$, $NiCl_2$, $CaCl_2$, $PbCl_2$, $CuCl_2$ ve $CdCl_2$ 'ün α -amilaz üretimine etkisi incelendi (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. incelendiğinde *B. vallismortis*'ten α -amilaz üretiminde ortamda 250 mg/L $CaCl_2$ varlığında α -amilaz üretiminin kontrole kıyasla %10 artış gösterdiği belirlendi. *B. mojavensis*'ten α -amilaz üretiminde ise ortamda 250 mg/L $MnCl_2$ varlığında kontrole kıyasla %27 arttığı belirlendi. *B. vallismortis* ve *B. mojavensis*'te 500 mg/L $MnCl_2$ ile 250 ve 500 mg/L $NiCl_2$ konsantrasyonlarının bakteri üremesinde inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edildi (bakteri üretim sonucu gösterilmemiştir). 100, 250 ve 500 mg/L $PbCl_2$ bulunan ortamlarda α -amilaz üretiminin konsantrasyon oranına paralel olarak artış gösterdiği görüldü. 500 mg/L $PbCl_2$ varlığında *B. vallismortis* ve *B. mojavensis*'ten α -amilaz üretiminin kontrole kıyasla sırasıyla yaklaşık %4 ve %8 arttığı gözlemlendi. *B. vallismortis* ve *B. mojavensis*'te $CuCl_2$ 'ün artan konsantrasyonlarında paralel bir inhibisyon sergilediği görüldü. Ortamda $CdCl_2$ varlığının α -amilaz üretimini önemli ölçüde azalttığı belirlendi.

Poli ve ark. (2009), ağır metallerin mikroorganizmaların gelişmesi üzerine etkilerini 0.01-20 mM'ı kapsayan konsantrasyonlarda çeşitli iz metaller, (Ni^{+2} , Zn^{+2} , Co^{+2} , Hg^{+2} , Mn^{+2} , Cr^{+6} , Cu^{+2} , Fe^{+3} ve Cd^{+2}) ile fermente tanklarda gözlemlenmişlerdir. *A. amylolyticus* bakterisinde α -amilaz biyosentezi ve aktivitesi üzerine ağır metallerin etkisini araştırmışlar, bakteriler ağır metallerin uygulaması ile birlikte geliştirildiklerinde α -amilaz üretiminde azalmanın olduğu, buna bağlı olarak α -amilaz

aktivitesinde azalma gözlemlediklerini bildirmişlerdir. Prakash ve ark. (2009), halofilik bakteri suşu *Chromohalobacter* sp. TVSP 101 suşundan hücre dışı, halotolerant, alkali-stabil ve ılımlı termofilik α -amilaz üretimini bildirmişler, 50 mM CaCl_2 'ün ortama eklenmesinin amilaz üretimini %29 arttırdığını bildirmişlerdir. Elde ettiğimiz sonuçlar Parakash ve ark. (2009) ve Poli ve ark. (2009) ile benzerlik göstermektedir.

Tablo 4.3. Bazı metallerin α -amilaz üretimine etkileri

Metaller	mg/L	Enzim Ünite (U/mg)	
		<i>B. vallismortis</i>	<i>B. mojavensis</i>
MnCl₂	100	4220.76	3648.23
	250	4849.34	4398.66
	500	-	-
NiCl₂	100	3889.45	2954.10
	250	-	-
	500	-	-
CaCl₂	100	4314.25	3462.11
	250	4913.44	3700.46
	500	4822.20	3682.61
PbCl₂	100	3956.60	3078.56
	250	4172.95	3282.64
	500	4635.98	3754.94
CuCl₂	100	2402.95	521.28
	250	772.66	273.15
	500	448.81	253.17
CdCl₂	100	468.31	541.10
	250	486.04	517.39
	500	212.82	455.13
Kontrol	-	4471.57	3473.08

4.11. *Bacillus vallismortis* ve *Bacillus mojavensis*'ten Elde Edilen α -Amilazların Saflaştırılması ve Kinetiği

B. vallismortis ve *B. mojavensis*'ten elden edilen termostabil α -amilazlar sırasıyla %70'lik amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve DEAE-selüloz kolondan geçirilerek üç aşamada saflaştırıldı. *B. vallismortis*'ten elde edilen termostabil α -amilaz, 51-kat ve %30 verimle saflaştırıldı. *B. mojavensis*'ten elde edilen termostabil α -amilaz ise 34-kat ve %18 verim ile elde edildi. Farklı araştırmacılar tarafından değişik mikroorganizmalardan üretilen α -amilazların saflaştırma kat sayıları ve verimleri bu çalışmadaki sonuçlarla paralellik göstermektedir. Chakraborty ve ark. (2011), *Saccharopolyspora* sp. A9'dan elde ettikleri α -amilazı 39.1-kat ve %25.27 verimle, Ağuloğlu ve Enez (2014), *Geobacillus stearothermophilus*'tan elde ettikleri α -amilazı 65-kat ve %46 verimle ve Ağuloğlu Fincan ve ark. (2014), termofilik *Anoxybacillus flavithermus*'tan elde ettikleri α -amilazı 51-kat ve %30 verimle saflaştırmışlardır.

B. vallismortis ve *B. mojavensis*'ten saflaştırılan α -amilazın molekül ağırlıkları sırasıyla 73 ve 74 kDa olarak tespit edildi (Şekil 4.17, Şekil 4.18). Benzer şekilde, Mamo ve Gessesse (1999), termofilik *Bacillus* sp. WN11'den saflaştırdıkları termostabil amilaz I ve amilaz II'nin molekül ağırlıklarını sırası ile 76 ve 53 kDa olarak bulmuşlardır. Pandey ve ark. (2000), *Bacillus* sp.'lerden elde edilen α -amilazların molekül büyüklüğünün 42-150 kDa arasında değişiklik gösterdiğini rapor etmişlerdir. Arıkan ve ark. (2003), topraktan izole ettikleri *Bacillus* sp. ANT-6Y'den saflaştırdıkları termostabil ve alkalik α -amilaz enziminin molekül ağırlığını 94.5 kDa olarak bulmuşlardır. Murakami ve ark. (2007), *Bacillus halodurans* 38C-2-1'den ürettikleri iki alkali termotolerant α -amilazın molekül ağırlıklarını 105 kDa ve 75 kDa olarak rapor etmişlerdir. Arıkan (2008), termofilik *Bacillus* sp. A3-15'ten üretilen alkalik ve termostabil α -amilazı kısmi olarak saflaştırarak SDS-PAGE elektroforez ile 86 kDa ve 60 kDa molekül ağırlıklarında bağımsız iki band elde etmiştir. Michelin ve ark. (2010), fungus *Paecilomyces variotii*'den elde ettikleri termostabil α -amilazın molekül ağırlığını SDS-PAGE ile yaklaşık 75 kDa'luk tek bir band halinde göstermişlerdir. Shafiei ve ark. (2010), *Nesterenkonia* sp. F suşundan amilaz enzimi saflaştırılmasını gerçekleştirerek, enzimin molekül ağırlığını yaklaşık olarak 100-106 kDa olarak tespit etmişlerdir. Ağuloğlu Fincan ve ark. (2014), termofilik *Anoxybacillus flavithermus*'tan saflaştırdıkları termostabil α -amilazın molekül ağırlığını 60 kDa olarak bulmuşlardır. Ağuloğlu Fincan ve Enez (2014), termofilik *Geobacillus stearothermophilus*'tan

saflaştırdıkları termofilik α -amilazın molekül ağırlığını 63 kDa olarak rapor etmişlerdir. Özdemir ve ark. (2015), termofilik *Anoxybacillus flavithermus* sp.'den ürettikleri termostabilik α -amilazın molekül ağırlığını 96 kDa olarak tespit etmişlerdir. Zafar ve ark. (2015), *Thermotoga petrophila*'dan saflaştırdıkları yüksek termostabil α -amilazın molekül ağırlığını 70 kDa olarak bulmuşlardır.

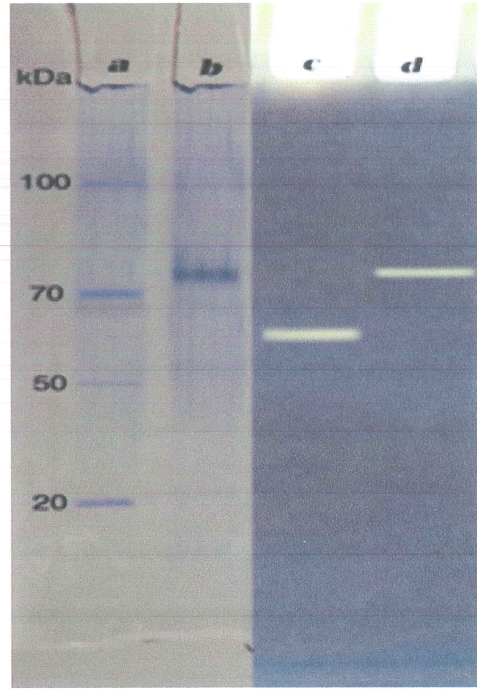
Substrat olarak çözümlü nişasta kullanılarak *B. vallismortis*'ten elde edilen saflaştırılmış α -amilazın K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 0.01 mM ve 3.38 mmol dk⁻¹ olarak tespit edildi. *B. mojavensis*'ten elde edilen saflaştırılmış α -amilazın K_m ve V_{max} değerleri ise 0.007964 mM ve 2.77 mmol dk⁻¹ olarak bulundu. Çalışmamıza paralel şekilde, Aguilar ve ark. (2000), *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010T'den elde ettikleri saflaştırılmış α -amilazın K_m değerini 3.44 mg/mL olarak rapor etmişlerdir. Ağüloğlu Fincan ve ark. (2014), termofilik *Anoxybacillus flavithermus*'tan elde ettikleri saflaştırılmış α -amilazın K_m ve V_{max} değerlerini sırasıyla 0.005 mM ve 3.5 μ mol dk⁻¹ olarak bulmuşlardır.

Tablo 4.4. *B. vallismortis*'ten α -amilaz saflaştırılması

Basamaklar	Toplam Aktivite (U)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Verim (%)	Saflaştırma Katsayısı
Ham Ekstrakt	262.972	149.642	1757	100	1
(NH ₄) SO ₄ Çöktürmesi/Diyaliz	163.765	11.884	13781	62	8
DEAE	78.360	0.881	88981	30	51

Tablo 4.5. *B. mojavensis*'ten α -amilaz saflaştırılması

Basamaklar	Toplam Aktivite (U)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Verim (%)	Saflaştırma Katsayısı
Ham Ekstrakt	283.374	188.444	1.504	100	1
(NH ₄) SO ₄ Çöktürmesi/Diyaliz	106.705	8.746	12.201	38	8
DEAE	50.929	0.982	51.870	18	34



Şekil 4.17. *B. vallismortis*'ten elde edilen saflaştırılmış α -amilazın molekül ağırlığının SDS-PAGE ile gösterimi (a) Standart proteinler (b) Selüloz DEAE'dan saflaştırılmış enzim (2 μ L); Negatif-PAGE (iodin boyası kullanılarak) (c) Standart α -amilaz (d) Selüloz DEAE'den saflaştırılmış enzim



Şekil 4.18. *B. mojavensis*'ten elde edilen saflaştırılmış α -amilazın molekül ağırlığının SDS-PAGE ile saptanması (a) Standart proteinler (b) Diyaliz sonrası (c) Selüloz DEAE'den saflaştırılmış enzim; Negatif-PAGE (iodin boyası kullanılarak) (d) Standart α -amilaz (e) Selüloz DEAE'den saflaştırılmış enzim

4.12. Farklı Sıcaklık Değerlerinin α -Amilaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin

Araştırılması

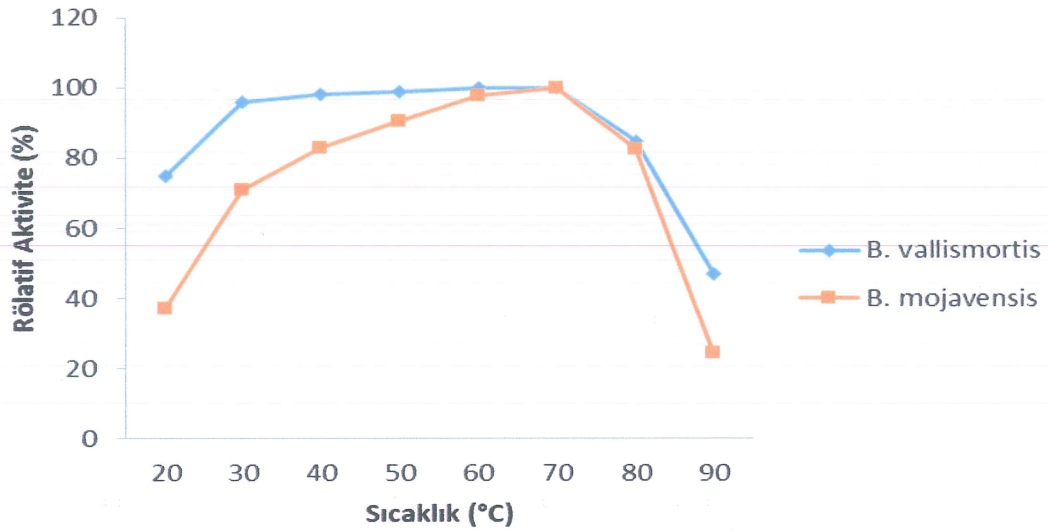
B. vallismortis ve *B. mojavensis*'ten elde edilen saflaştırılmış α -amilaz aktivitesi üzerine farklı sıcaklık değerlerinin (20-90 °C) etkisi Şekil 4.19'da görülmektedir.

Elde edilen sonuçlara göre, *B. vallismortis*'ten elde edilen α -amilaz için 30, 40, 50, 60 ve 70 °C'de aktivite değerlerinde önemli bir değişikliğin olmadığı saptandı. En yüksek enzim aktivitesi 70 °C'de elde edildi ve 70 °C'deki enzim aktivitesi ile 30, 40, 50 ve 60 °C'deki α -amilaz aktiviteleri karşılaştırıldığında rölatif aktiviteler sırasıyla %95, %98, %98 ve %99 olarak bulundu. Sıcaklık 70 °C'den 20 °C'ye düşürüldüğünde ise enzimin aktivitesinde %25 düşüş görüldü. Sıcaklık 70 °C'den 80 ve 90 °C'ye yükseltildiğinde ise enzim aktivitesinde sırasıyla %16 ve %54 düşüş tespit edildi.

B. mojavensis'ten elde edilen α -amilazın optimum aktivitesi de 70 °C olarak bulundu. 30, 40, 50 ve 60 °C'deki α -amilaz aktiviteleri karşılaştırıldığında rölatif aktiviteler sırasıyla %70, %82, %90 ve %97 olarak tespit edildi. Sıcaklık 80 ve 90 °C'ye yükseltildiğinde ise enzim aktivitesinde sırasıyla %18 ve %76 azalma olduğu belirlendi. Sıcaklık 20 °C'ye düşürüldüğünde ise α -amilaz aktivitesinde %63 düşüş tespit edildi.

Benzer şekilde, Cordeiro ve ark. (2002), α -amilaz enziminin 70 °C'de en yüksek aktiviteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Asgher ve ark. (2007), α -amilaz enziminin optimum sıcaklığını 70 °C olarak belirlemişlerdir. Asoodeh ve ark. (2010), yeni izole ettikleri *Bacillus* sp. *ferdowsicou*'dan elde edilen saflaştırılmış asidofil α -amilazın optimum sıcaklığının 70 °C civarında olduğunu tespit etmişlerdir. Özdemir ve ark. (2011), Dicle Üniversitesi kampüs alanındaki toprak örneklerinden bir *Bacillus* suşu izole etmişler, *Bacillus subtilis* ile yakından ilişkili olduğunu bildikleri bakteriden elde ettikleri kısmen saflaştırılmış α -amilaz enziminin en yüksek aktivitesini 60 °C olarak tespit etmişlerdir. Özdemir ve ark. (2012), termofilik *Anoxybacillus flavithermus* sp.'den saflaştırdıkları termostabil α -amilazın optimum sıcaklığını 70 °C olarak bulmuşlardır. Kumar ve ark. (2013), *Bacillus laterosporus*'tan elde edilen termostabil α -amilazın üretim ve karakterizasyonunu çalışmışlar, saflaştırılan enzimin optimum sıcaklık değerlerini 60 °C olarak saptamışlardır.

Optimum sıcaklığın 70 °C gibi yüksek bir sıcaklık olması ve *B. vallismortis*'in 30-80 °C sıcaklık aralığında, *B. mojavensis*'in 40-80 °C sıcaklık aralığında oldukça yüksek aktivite göstermelerinin, bu enzimlerin biyoteknolojik kullanımı için önemli bir avantaj olduğunu düşünmekteyiz.



Şekil 4.19. Farklı sıcaklık değerlerinde α -amilaz aktivitesi

4.13. Farklı pH Değerlerinin α -Amilaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Araştırılması

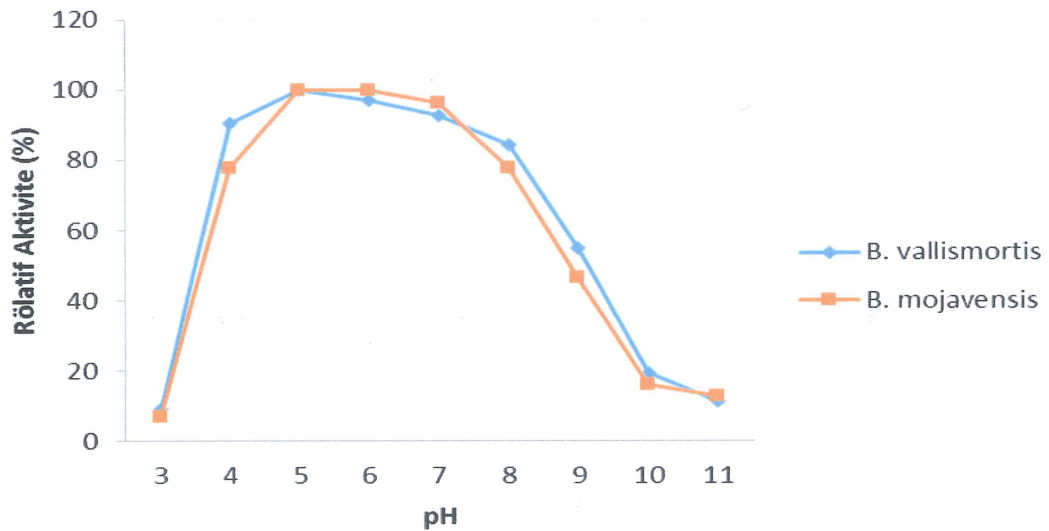
Farklı pH değerlerinin (3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 ve 11.0) *B. vallismortis* ve *B. mojavensis*'ten elde edilen saflaştırılmış α -amilazın aktivitesine etkileri test edildi. Şekil 4.16'da görüldüğü gibi pH 4.0'dan 3.0'a düştüğünde her iki bakteriden de elde edilen enzimin aktivitesinde keskin bir düşüş olduğu görülmektedir. *B. vallismortis* için optimum enzim aktivitesi pH 5.0 olarak saptandı. pH 5.0'la karşılaştığımızda pH 6.0, 7.0 ve 8.0'daki rölatif enzim aktiviteleri sırasıyla %97, %93 ve %84 olarak belirlendi ve pH 9.0, 10.0 ve 11.0'da ise aktivitenin önemli ölçüde düşerek sırasıyla %55, %19 ve %11 olduğu tespit edildi.

B. mojavensis'ten elde edilen α -amilazın da aktivitesinin pH 3.0'de %7 olduğu, pH 4.0'a yükseldiğinde ise enzim aktivitesinin %77 olduğu belirlendi. pH 5.0, 6.0 ve 7.0'da α -amilaz aktivitelerinin hemen hemen benzer olduğu ve en yüksek α -amilaz aktivitesinin pH 6.0'da olduğu tespit edildi. pH 6.0'dan 8.0, 9.0, 10.0 ve 11.0'e yükseldiğinde α -amilaz aktiviteleri sırasıyla %78, %47, %16 ve %13 olarak belirlendi.

Benzer şekilde, Hamilton ve ark. (1999), *Bacillus* sp. IMD 435'den α -amilaz üretmişler, enzimin en yüksek aktivitesini pH 6.0'da gösterdiğini bildirmişlerdir. Mamo ve Gessesse (1999), termofilik *Bacillus* suşu WN11'in hücre olmayan süpernatantından AmyI ve AmyII olmak üzere iki çeşit α -amilaz saflaştırmışlar, iki enzimin de optimum pH'sını 5.5 olarak bulmuşlardır. Konsula ve Liakopoulou-Kyriakides (2004), taze koyun sütünden izole ettikleri ılımlı termofilik *Bacillus subtilis* suşunu hücre dışı,

termostabil α -amilaz üretiminde kullanmışlar, enzimin pH 6.5 değerinde en yüksek aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Najafi ve ark. (2005), hücre dışı α -amilaz üretme yeteneği olan *Bacillus subtilis* AX20'den elde edilen amilazın en iyi pH 6.0'da aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir. Liu ve Xu (2008), yeni izole edilmiş *Bacillus* sp. YX-1'den elde ettikleri yeni bir ham nişasta parçalayıcı α -amilazın saflaştırılmasını ve karakterizasyonunu rapor etmişler, enzimin optimum aktiviteyi pH 5.0'da gösterdiğini bildirmişlerdir. Asoodeh ve ark. (2010), izole ettikleri *Bacillus* sp. *ferdowsicou*'dan elde edilen asidofil α -amilazı saflaştırıp karakterize etmişler, enzimin optimum pH'sının 4.5 civarında olduğunu saptamışlardır. Božić ve ark. (2011), *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a tarafından üretilen α -amilazın pH 6.5'de optimum aktivite gösterdiği bulmuşlardır. Özdemir ve ark. (2011), Dicle Üniversitesi kampüs alanındaki toprak örneklerinden bir *Bacillus* suşu izole etmişler, kısmen saflaştırılmış α -amilaz enzimin en yüksek aktivitesini pH 6.0'da tespit etmişlerdir.

Şekil 4.20'de görüldüğü gibi optimum pH'nın *B. vallismortis* için 5.0, *B. mojavensis* için 6.0 olduğu tespit edildi. *B. vallismortis* ve *B. mojavensis*'ten elde edilen α -amilazların geniş pH aralığında (pH 4.0-8.0) aktivitelerini koruduğu belirlenmiş olup, bu durumun enzimin çeşitli endüstrilerde kullanımı için önemli bir avantaj olduğunu düşünmekteyiz.



Şekil 4.20. Farklı pH değerlerinde α -amilaz aktivitesi

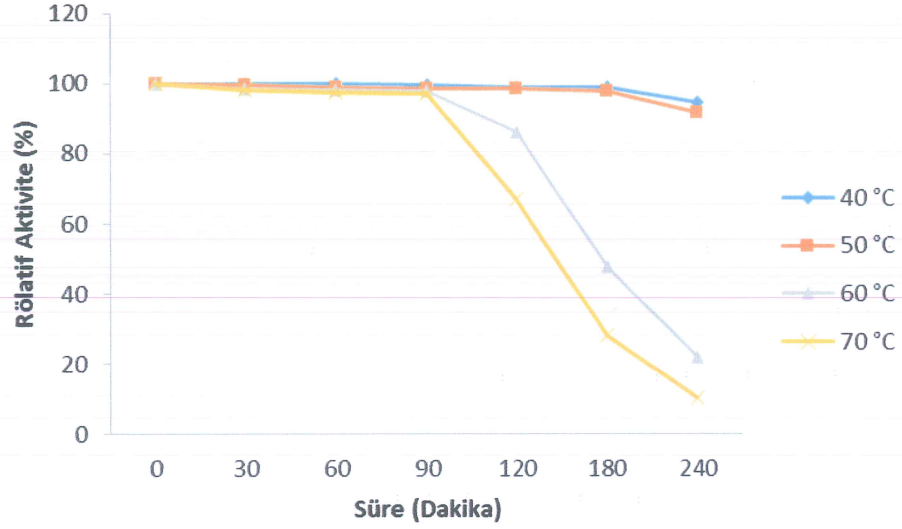
4.14. Farklı Sıcaklık Değerlerinin Zamana Bağlı Olarak α -Amilaz Stabilitesine Etkisi

Saflaştırılmış α -amilazın sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi amacıyla enzim 40, 50, 60 ve 70 °C'de farklı sürelerde (30, 60, 90, 120, 180 ve 240 dakika) inkübe edildi ve bu sürelerin sonunda α -amilaz aktivite tayini yapıldı.

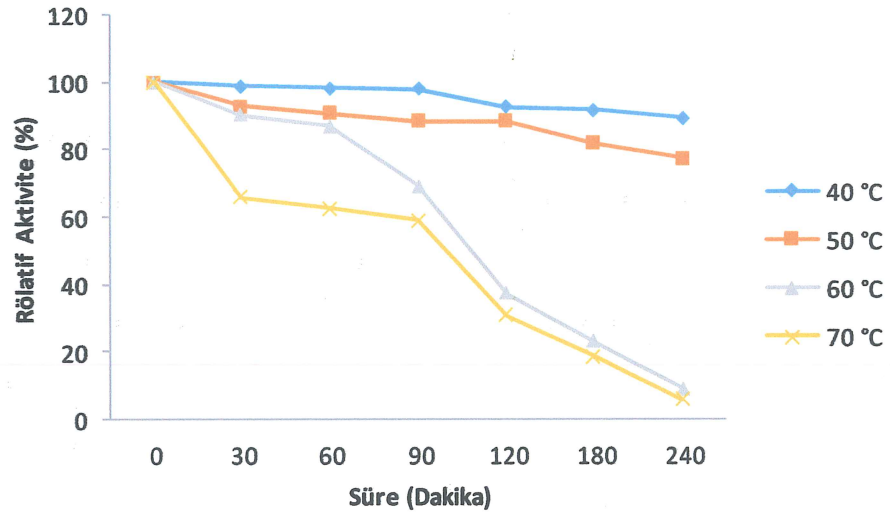
Şekil 4.21'de görüldüğü gibi *B. vallismortis*'ten elde edilen α -amilazın aktivitesini 60 ve 70 °C'de 90 dakika %97'nin üzerinde koruduğu belirlendi. Enzimin 40 ve 50 °C'de 240 dakika boyunca %91'in üzerinde aktiviteye sahip olduğu tespit edildi. 60 °C'de 120, 180 ve 240 dakika sonunda enzim aktivitesinin sırasıyla %86, %47 ve %22, 70 °C'de ise %67, %28 ve %10 olduğu saptandı.

Şekil 4.22'de *B. mojavensis* α -amilazının farklı sıcaklık değerlerindeki stabiliteleri incelendiğinde, 40 ve 50 °C'de 240 dakika inkübasyon sonunda enzim aktivitesinin sırasıyla %87 ve %77 olduğu tespit edildi. 60 ve 70°C'de 30, 60, 90 120, 180 ve 240 dakikada aktivite sırasıyla %90 ve %66, %87 ve %63, %69 ve %59, %37 ve %31 , %23 ve %18 ile %9 ve %6 olduğu saptandı.

Benzer şekilde, Messaoud ve ark. (2004), *Bacillus subtilis* US116 tarafından üretilen α -amilazın, 70 °C'de 3 saat, 65 °C'de ise 5 saat sonra %50 aktivite kaybına uğradığını belirlemişlerdir. Asoodeh ve ark. (2010), *Bacillus sp. ferdowsicou*'dan elde edilen asidofil α -amilazın 75 °C'de 45 dakikalık inkübasyon sonunda aktivitesini %75'den daha fazla koruduğunu tespit etmişlerdir. Božić ve ark. (2011), *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a tarafından üretilen saflaştırılmış α -amilazın CaCl₂ varlığında 70 °C'de 6 saat inkübasyondan sonra %55 aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Haddar ve ark. (2012), *Bacillus mojavensis* A21'den elde edilen ksilanaz enzimin 30 °C'den 60 °C'ye kadar 60 dakika inkübe edildiğinde başlangıç aktivitesinin %80'ini koruduğunu tespit etmişlerdir.



Şekil 4.21. *B. vallismortis* α -amilazının farklı sıcaklık değerlerinde zamana bağlı sıcaklık stabilitesi



Şekil 4.22. *B. mojavensis* α -amilazının farklı sıcaklık değerlerinde zamana bağlı sıcaklık stabilitesi

4.15. Farklı pH Değerlerinin Zamana Bağlı Olarak α -Amilaz Stabilitesi Üzerine Etkisi

Saflaştırılmış α -amilaz pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 ve 8.0'da 30, 60, 90, 120, 180 ve 240 dakika inkübe edildi ve bu sürelerin sonunda α -amilaz aktivite tayini yapıldı (Şekil 4.23, Şekil 4.24).

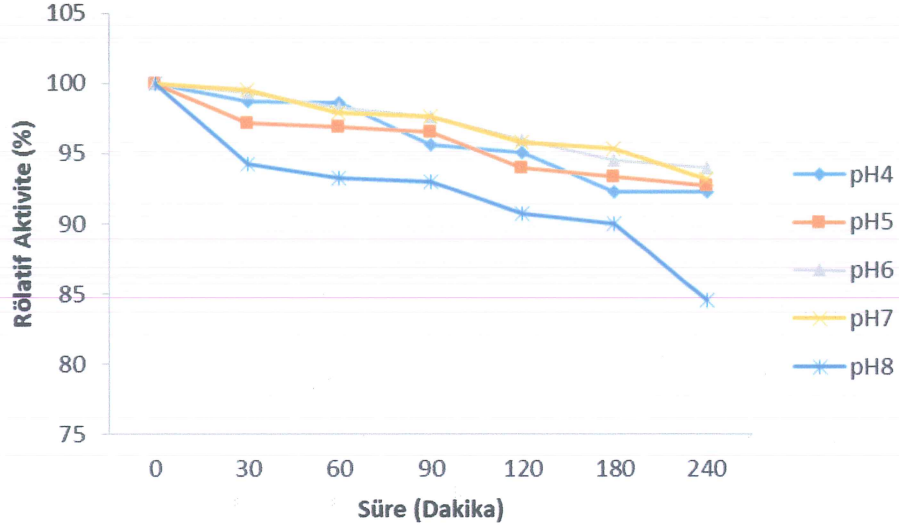
B. vallismortis'ten elde edilen α -amilazın aktivitesini pH 4.0, 5.0, 6.0 ve 7.0'da 180 dakika inkübasyon süresi sonrasında %90'ın üzerinde koruduğu belirlendi. α -

Amilazın pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 ve 8.0'de 240 dakika inkübasyon süresi sonrasında ise sırasıyla %92, %92, %94, %93 ve %84 aktiviteye sahip olduğu tespit edildi.

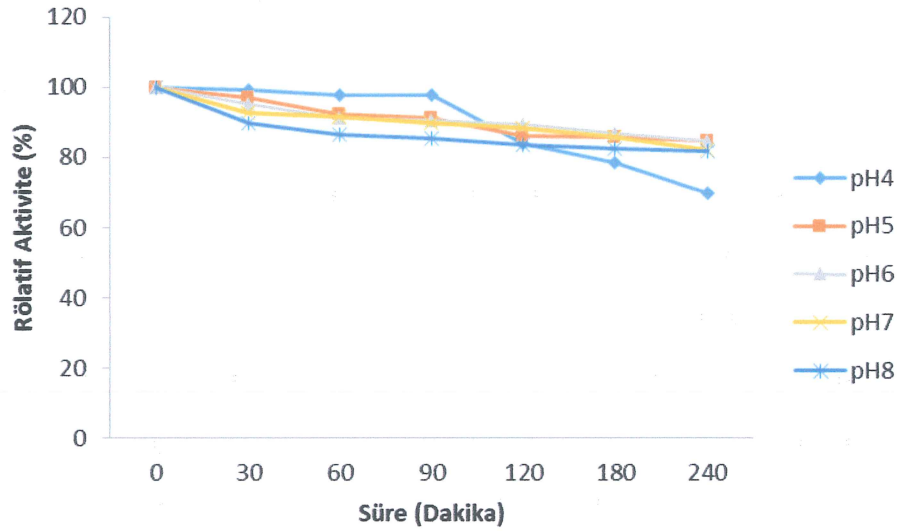
B. mojavensis'ten elde edilen α -amilazın pH 4.0, 5.0 ve 6.0'da 90 dakika inkübasyon sonunda aktivitesini %90'ın üzerinde koruduğu belirlendi. Aynı pH değerlerinde 240 dakika sonunda sırasıyla %70, %85 ve %85 aktiviteye sahip oldukları bulundu. pH 7.0 ve 8.0'da 90 dakika sonunda aktivitenin sırasıyla, %90 ve %86 olduğu ve 240 dakika sonunda bu pH değerlerinde aktivitenin sırasıyla, %82 ve %82 olduğu belirlendi.

Benzer şekilde, Mamo ve Gessesse (1999), termofilik *Bacillus* WN11'den AmyI ve AmyII olmak üzere iki çeşit α -amilaz saflaştırmışlar ve pH 5.5-9.0 aralığında stabilite gösterdiğini bildirmişlerdir. Hamidet ve ark. (2008), *Bacillus licheniformis*'ten izole ettikleri ısıya dayanıklı α -amilazı saflaştırıp, karakterize etmişler, α -amilaz genini izole edip, sekanslayarak *Escherichia coli* BL21'de eksprese etmişler, enzimin yüksek oranda pH 5.0 ve 10.0 aralığında aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. pH 5.0, 9.0 ve 10.0'daki aktivitelerini yaklaşık olarak, sırasıyla % 89, %96.6 ve %90 olarak elde etmişlerdir. Asoodeh ve ark. (2010), yeni izole ettikleri *Bacillus* sp. *ferdowsicou*'dan elde edilen asidofil α -amilazın pH 3.5-7.0 değerleri arasında stabil olduğunu saptamışlardır. Özdemir ve ark. (2011), Afyonkarahisar, Gazlıgöl'deki sıcak su kaynaklarından izole ettikleri termofilik *Anoxybacillus flavithermus*'tan α -amilaz üretimini çalışmışlar, enzimim pH 6.0-8.0 aralığında stabil olduğunu tespit etmişlerdir.

B. vallismortis ve *B. mojavensis*'ten elde edilen α -amilazların stabilitelelerini, çalıştığımız pH aralığında (pH 4.0-8.0), 240 dakika boyunca, oldukça yüksek oranlarda korumalarının özellikle nişastanın sıvılaştırılması ve deterjan endüstrilerinde kullanımı için önemli bir avantaj olduğunu düşünmekteyiz.



Şekil 4.23. *B. vallismortis* α -amilazının farklı pH değerlerinde zamana bağlı stabilite tayini

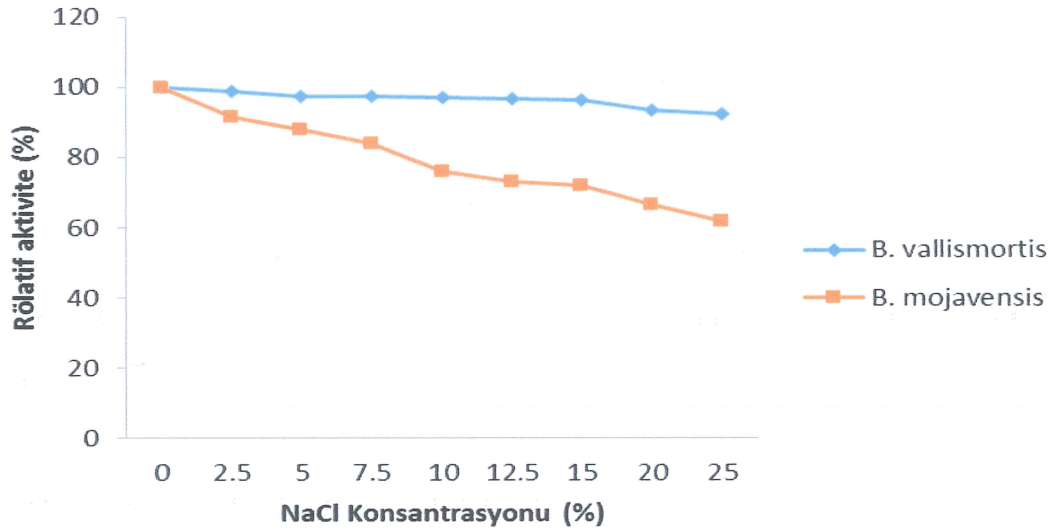


Şekil 4.24. *B. mojavensis* α -amilazının farklı pH değerlerinde zamana bağlı stabilite tayini

4.16. Farklı NaCl Konsantrasyonlarının α -Amilaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Farklı NaCl konsantrasyonlarının (%2.5, %5, %7.5, %10, %15, %20 ve %25) *B. vallismortis* ve *B. mojavensis*'ten elde edilen α -amilazların aktiviteleri üzerine etkisi incelendi (Şekil 4.25). *B. vallismortis* α -amilazının aktivitesinin %2.5, %5 ve %7.5 NaCl konsantrasyonlarında, kontrole karşılaştırıldığında sırasıyla %98, %97 ve %97 olduğu tespit edildi. Enzimin %10 NaCl varlığında %96 aktivite gösterdiği, NaCl konsantrasyonu %25'e çıkarıldığında ise aktivitenin %92'ye düştüğü belirlendi.

B. mojavensis α -amilazının aktivitesi ise %5 ve %7.5 NaCl konsantrasyonlarında kontrole kıyasla sırasıyla %87 ve %83 olarak bulundu. Enzimin %10 NaCl varlığında %75 aktivite gösterdiği, NaCl konsantrasyonu %25'e çıkarıldığında ise %61 aktivite gösterdiği belirlendi. Şekil 4.21'de görüldüğü gibi *B. vallismortis* ve *B. mojavensis* α -amilazlarının artan NaCl konsantrasyonuna paralel olarak aktivitelerinde azalma olduğu belirlendi. Bu aktivite kaybının *B. mojavensis*'te daha fazla olduğu ve buna göre *B. mojavensis* α -amilazının *B. vallismortis* α -amilazına göre NaCl'e daha duyarlı olduğu tespit edildi. Çeşitli araştırmacılar farklı mikroorganizmalardan ürettikleri α -amilaz aktivitesi üzerine farklı NaCl konsantrasyonlarının etkisini test etmişlerdir (Good ve Hartman, 1970; Deutch, 2002; Parakash ve ark., 2009). Elde ettiğimiz deneysel sonuçlar bu çalışmalar ile paralellik göstermektedir.



Şekil 4.25. Farklı NaCl konsantrasyonlarında α -amilaz aktivitesi

4.17. Farklı Metallerin α -Amilaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Bu çalışmamızda CdCl_2 , PbCl_2 , CuCl_2 , CaCl_2 , NiCl_2 , CrCl_2 , HgCl_2 , AgCl_2 , CoCl_2 , MnCl_2 ve ZnCl_2 'ün 0.3 ve 1.5 mM konsantrasyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir.

Tablo 4.6'da görüldüğü gibi, test edilen tüm metal iyonlarının 0.3 mM konsantrasyonunda *B. vallismortis*'ten elde edilen saflaştırılmış α -amilaz aktivitesi üzerine önemli bir etkilerinin olmadığı saptandı. Kontrol ile karşılaştırdığımızda CdCl_2 , AgCl_2 ve ZnCl_2 'ün 1.5 mM konsantrasyonunda α -amilaz aktivitesinde sırasıyla yaklaşık

%43, %21 ve %29 inhibisyona neden olduğu tespit edildi. 0.3 mM HgCl₂ varlığında α-amilaz aktivitesi %99 iken, 1.5 mM HgCl₂ varlığında α-amilaz aktivitesi görülmedi.

B. mojavensis'ten elde edilen saflaştırılmış α-amilazın aktivitesinin ise 0.3 mM CdCl₂, HgCl₂, AgCl₂ ve ZnCl₂ varlığında kontrole kıyasla sırasıyla yaklaşık %16, %17, %12 ve %14 azalma gösterdiği belirlendi. 0.3 mM CoCl₂ ve MnCl₂ varlığında ise α-amilaz aktivitesinde sırasıyla %8 ve %6 artış görüldü. *B. mojavensis*'ten elde edilen saflaştırılmış α-amilazın 0.3 mM HgCl₂ varlığında enzim aktivitesinde %18'lik bir azalmanın olduğu tespit edildi. 1.5 mM HgCl₂ varlığında ise α-amilaz aktivitesi görülmedi. 1.5 mM CdCl₂, ZnCl₂ ve AgCl₂ varlığında α-amilaz aktivitesinde sırasıyla %78, %56 ve %70 azalma görülürken, 1.5 mM CoCl₂ varlığında %6 artış tespit edildi.

Benzer şekilde, Behal ve ark. (2006), *Bacillus* sp. AB 04'ten elde ettikleri alkali α-amilaz enziminin karakterizasyonu üzerine çalışmışlardır. Ca⁺² ve Co⁺² iyonlarının enzim aktivitesini güçlü bir oranda arttığını tespit etmişlerdir. Asgher ve ark. (2007), termofilik *Bacillus subtilis* JS-2004'ten temostabil α-amilaz enzimi üretimini ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Ca⁺²'un enzim aktivitesi üzerinde iyi bir aktivatör olduğunu, Co⁺², Cu⁺² ve Hg⁺² tarafından enzimin güçlü bir şekilde inhibe edildiğini, Mg⁺², Zn⁺², Fe⁺², Mn⁺² ve Ni⁺² iyonlarından enzimin daha az etkilendiğini bulmuşlardır. Božić ve ark. (2011), Co⁺², Ni⁺² ve Ca⁺² enzim aktivitesini hafiften arttırırken Hg⁺²'nin enzim aktivitesini inhibe ettiğini saptamışlardır. Bununla birlikte, çeşitli metallerin saflaştırılmış α-amilaz aktivitesi üzerine etkileri Mamo ve Gessesse (1999), Agüloğlu Fincan ve Enez (2014) ile Liu ve ark. (2015), tarafından da test edilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar bu çalışmalar ile benzerlik göstermektedir.

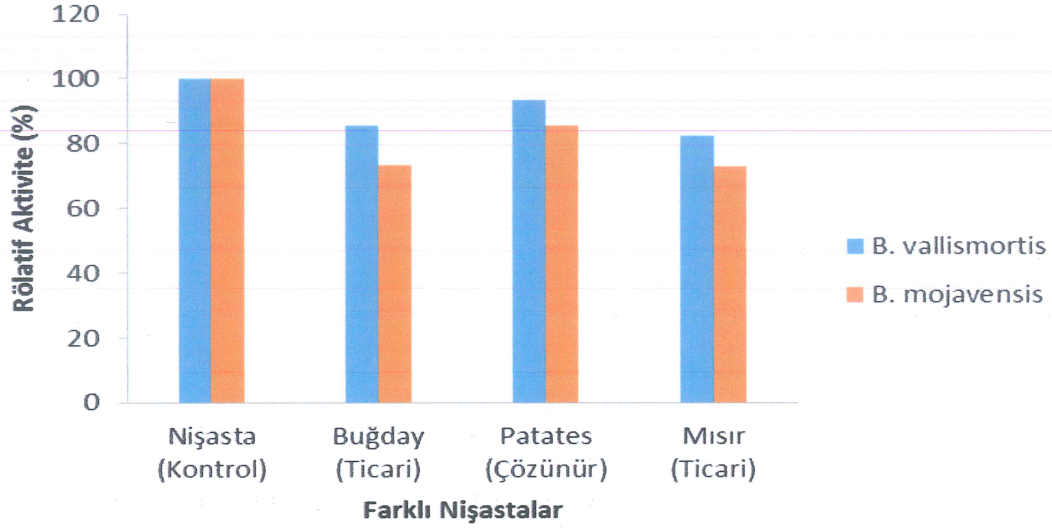
Tablo 4.6. 0.3 ve 1.5 mM konsantrasyondaki metallerin α -amilaz aktivitesi üzerine etkileri

Metaller	<i>B. vallismortis</i>		<i>B. mojavensis</i>	
	0.3 mM	1.5 mM	0.3 mM	1.5 mM
Kontrol	100	100	100	100
CdCl ₂	98.3	57.5	84.2	22.4
PbCl ₂	100.5	102.8	97.7	97.5
CuCl ₂	100.6	101.8	99.4	100.2
CaCl ₂	100.3	102.2	94.4	99.1
NiCl ₂	100	103.1	96.1	100
CrCl ₂	100	102.7	93.7	100.3
HgCl ₂	99.3	0	82.6	0
AgCl ₂	100.9	79.6	87.8	44.3
CoCl ₂	101.1	103.7	108.4	106.7
MnCl ₂	101.4	102.5	106.5	96.9
ZnCl ₂	98.4	71.7	86.1	30.7

4.18. *B. vallismortis* ve *B. mojavensis*'ten Elde Edilen α -Amilazın Farklı Nişastalardaki Aktivitesinin İncelenmesi

B. vallismortis ve *B. mojavensis* tarafından üretilen saflaştırılmış α -amilazların farklı nişasta endüstrilerindeki kullanılabilirliğini test etmek için çözünür buğday, çözünür patates, ticari buğday ve ticari mısır nişastaları substrat olarak kullanıldı. Sonuçlar Şekil 4.26'da görülmektedir. Bu sonuçlara göre *B. vallismortis*'ten elde edilen saflaştırılmış enzimin ticari buğday nişastasası, çözünür patates nişastasası ve ticari mısır nişastalarını çözünür buğday nişastasasına kıyasla sırasıyla %85, %93 ve %82 oranlarında

ve benzer şekilde *B. mojavensis*'ten elde edilen saflaştırılmış enzim ise sırasıyla %73, %85 ve %73 oranlarında parçaladığı tespit edildi.



Şekil 4.26. Farklı nişastalarda α -amilaz aktivitesi

4.19. Etanol ve β -Merkaptoetanol Varlığında *B. vallismortis* ve *B. mojavensis*'ten Elde Edilen α -Amilazların Aktivitelerinin İncelenmesi

Farklı etanol ve β -merkuptoetanol konsantrasyonlarının *B. vallismortis* ve *B. mojavensis*'ten elde edilen saflaştırılmış α -amilaz aktivitesi üzerine olan etkileri Tablo 4.7'de sunulmuştur. *B. vallismortis* tarafından üretilen saflaştırılmış α -amilaz aktivitesinin çalışılan tüm etanol konsantrasyonlarında kontrole kıyasla artış gösterdiği belirlendi ve en yüksek α -amilaz aktivitesi %7.5'lik etanol konsantrasyonunda %114.5 olarak tespit edildi. *B. mojavensis*'ten elde edilen saflaştırılmış α -amilaz aktivitesinin çalışılan tüm etanol konsantrasyonlarında kontrolden daha düşük çıktığı bulundu. %20'lik etanolün enzim aktivitesini kontrole kıyasla yaklaşık olarak %17 oranında düşürdüğü görüldü.

Tabloda 4.7'de görüldüğü gibi *B. vallismortis*'ten elde edilen α -amilaz aktivitesinin %1'lik β -merkuptoetanol konsantrasyonunda kontrolden %2 oranında yüksek olduğu tespit edildi. β -merkuptoetanol konsantrasyonunun %2.5 ve %5'e yükseltilmesiyle enzim aktivitesini sırasıyla %22 ve %89 oranlarında düşürdüğü belirlendi. Artan konsantrasyonlarda enzim aktivitesinin giderek azaldığı ve %20 β -merkuptoetanol konsantrasyonunda α -amilaz aktivitesinin olmadığı tespit edildi.

B. mojavensis tarafından üretilen α -amilaz aktivitesinin %1'lik β -merkaptotanol konsantrasyonunda kontrol ile karşılaştırıldığında yaklaşık %24 arttığı görüldü. %2.5'lik β -merkaptotanol konsantrasyonunda enzim aktivitesinin, kontrol ile kıyasladığımızda %96 olduğu belirlendi. %5 ve artan β -merkaptotanol konsantrasyonlarında ise enzim aktivitesinin önemli ölçüde azaldığı tespit edildi.

Benzer şekilde, Mesbah ve Wiegel (2014), *Amphibacillus* sp. NM-Ra2'den elde edilen ekstrasellüler α -amilazı saflaştırmışlar ve amilazın %25 (v/v) etanol, metanol ve benzen varlığında stabil ve aktif olduğunu saptamışlardır.

Tablo 4.7. Farklı etanol ve β -merkaptotanol konsantrasyonlarında α -amilaz aktivitesi

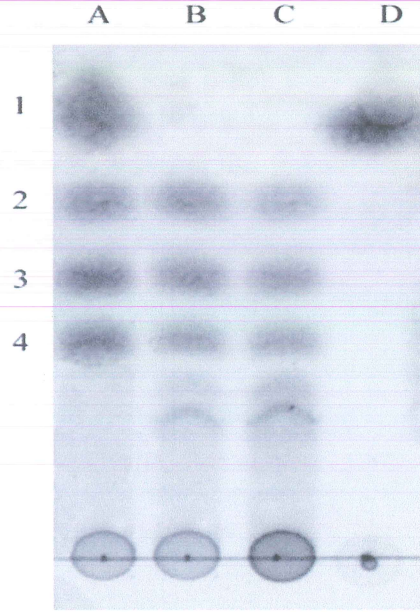
Konsantrasyon (%)	<i>B. vallismortis</i>		<i>B. mojavensis</i>	
	Etanol	β -Merkaptotanol	Etanol	β -Merkaptotanol
Kontrol	100	100	100	100
1	107.9	102.7	86.6	124.2
2.5	109.1	78.7	87.5	96.2
5	114.1	11.9	90.7	8.1
7.5	114.5	3.7	90.4	1.9
10	111.7	2.4	87.5	1.3
15	108.7	1.2	85.8	0.8
20	108.3	0	83.1	0.7

4.20. *B. vallismortis* ve *B. mojavensis*'ten Elde Edilen Saflaştırılmış α -Amilazların Çözünür Nişasta Substrat Olarak Kullanılarak İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) Yöntemiyle Son Ürünlerin Tespit Edilmesi

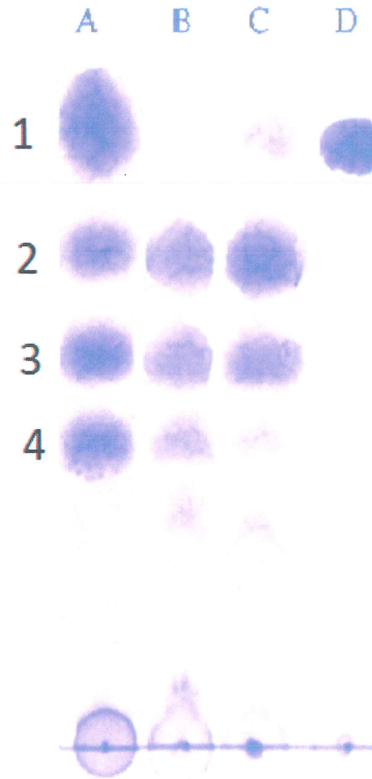
B. vallismortis ve *B. mojavensis*'ten elde edilen saflaştırılmış α -amilazların çözünür nişasta substrat olarak kullanılarak ince tabaka kromatografisi (TLC) yöntemiyle oluşan son ürünler Şekil 4.27 ve Şekil 4.28'de görülmektedir. Standart

olarak glukoz (G1), maltoz (G2), maltotrioz (G3) ve maltotetroz (G4) kullanıldı. Saflaştırılmış α -amilazlar 15, 30 ve 240 dakika çözünür nişasta ile optimum koşullarda inkübe edildi. Şekil 4.27 ve Şekil 4.28'de görüldüğü gibi *B. vallismortis* ve *B. mojavensis* tarafından üretilen saflaştırılmış α -amilazların çözünür nişastayı hidroliz ettiği tespit edildi. 15 dakika sonunda maltoz, maltotrioz, maltotetroz ve maltooligosakkaritler, 30 dakika sonunda glukoz, maltoz, maltotrioz ve maltooligosakkaritler elde edildiği belirlendi. 240 dakikalık inkübasyon süresi sonunda çözünür nişastanın tamamen glukozla hidrolize olduğu tespit edildi. Elde ettiğimiz sonuçlar Takasaki (1985) ile paralellik göstermektedir. Sarıkaya ve Gürgün (2000), *Bacillus* suşlarından elde ettikleri α -amilazların, yaptıkları TLC sonrasında nişastayı maltoz ve az miktarda da glukozla hidroliz ettiklerini bildirmişlerdir. Messaoud ve ark. (2004), *Bacillus subtilis* US116 tarafından üretilen saflaştırılmış α -amilazın nişastayı parçalaması sonucu maltoheptoz ve maltoheksoz oluştuğunu bildirmişlerdir. Karmakar ve Ray (2011), *Bacillus* sp KR11'den elde ettikleri termostabil α -amilazın nişastayı parçalaması sonucunda oluşan hidroliz ürünlerinde özellikle maltotriozun baskın olduğunu ve maltotriozun yanı sıra oluşan son ürünün maltoz olduğunu belirtmişlerdir. Gligorijevic ve ark. (2014), farklı *Bacillus* suşlarından saflaştırdıkları α -amilazların ham mısır ve çözünür nişastanın substrat olarak kullanıldığı çalışma sonrasında, oluşan son ürünleri TLC yöntemiyle analiz etmişlerdir. Bu sonuçlara göre en çok maltotrioz oluşurken, maltoz ve maltoheksozun da hidroliz ürünü olduklarını bildirmişlerdir.

Bu sonuçlara göre *B. vallismortis* ve *B. mojavensis*'ten üretilen saflaştırılmış α -amilazın nişasta sıvılaştırma endüstrisi ve gıda endüstrisinde kullanılabileceğini düşünmekteyiz.



Şekil 4.27. *B. vallismortis*'ten saflaştırılan α -amilazın çözünür nişasta ile zamana bağlı oluşan son ürünlerin ince tabaka kromatografisi (TLC) ile gösterimi
 (a) Sütun A, 1: Glukoz (G1), maltoz (G2), maltotrioz (G3) ve maltotetroz (G4), (b) Sütun B-D, sırasıyla 15 dak., 30 dak. ve 240 dak. reaksiyon süreleri

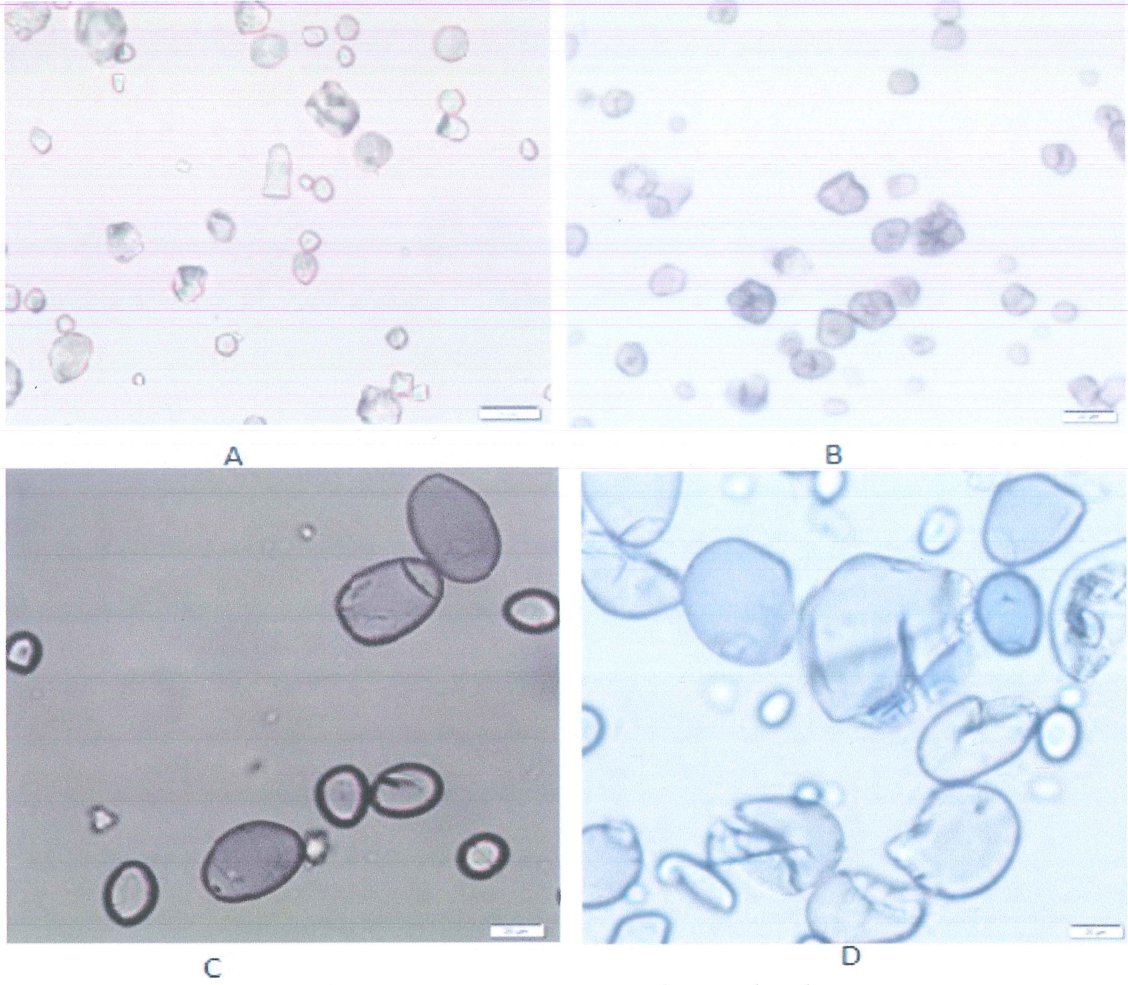


Şekil 4.28. *B. mojavensis*'ten saflaştırılan α -amilazın çözünür nişasta ile zamana bağlı oluşan son ürünlerin ince tabaka kromatografisi (TLC) ile gösterimi
 (a) Sütun A, 1: Glukoz (G1), maltoz (G2), maltotrioz (G3) ve maltotetroz (G4), (b) Sütun B-D, sırasıyla 15 dak., 30 dak. ve 240 dak. reaksiyon süreleri

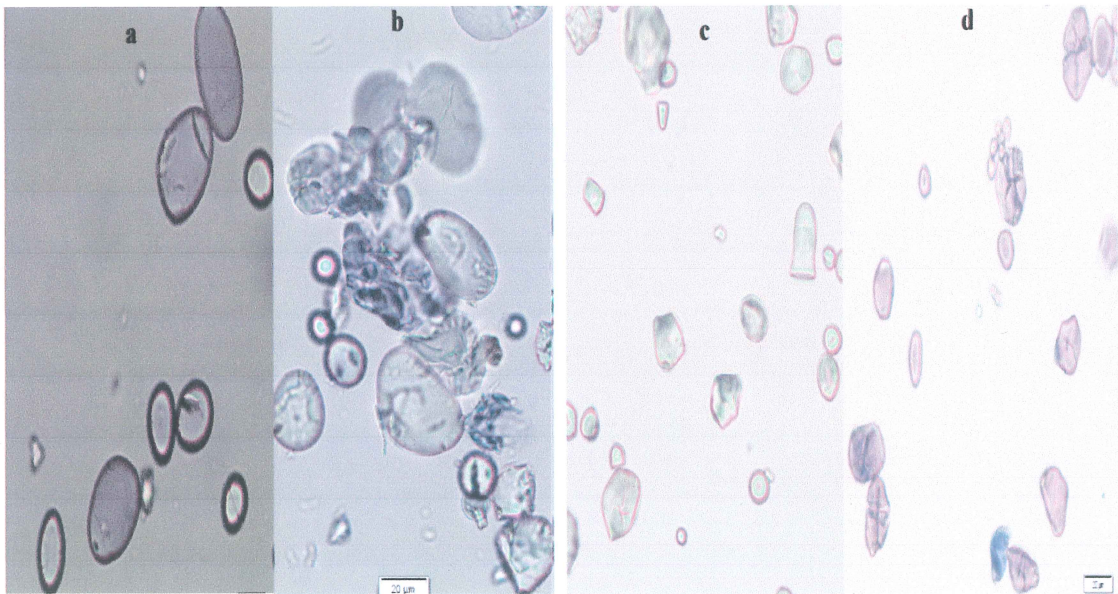
4.21. Ham Nişasta Parçalama

B. vallismortis ve *B. mojavensis*'ten üretilen saflaştırılmış α -amilazların ham buğday ve mısır nişastaları substrat olarak kullanılarak bunları parçalama potansiyeli test edildi. Elde edilen sonuçlara göre *B. vallismortis* ve *B. mojavensis*'ten üretilen saflaştırılmış α -amilazların ham mısır ve buğday nişastalarını etkili bir şekilde parçaladığı belirlendi. *B. vallismortis*'ten üretilen saflaştırılmış α -amilazın 4 saat inkübasyon sonunda %1 konsantrasyondaki ham mısır ve buğday nişastalarını hidroliz oranları sırasıyla %38.9 ve %41.3 olarak bulundu. *B. mojavensis*'ten elde edilen saflaştırılmış enzimin 4 saat inkübasyon sonunda %1 konsantrasyondaki ham mısır ve buğday nişastalarını parçalama oranları sırasıyla %36.7 ve %39.2 olarak tespit edildi. Benzer şekilde Shafiei ve ark. (2010), *Nesterenkonia* sp.'den elde edilen saflaştırılmış halofilik α -amilazın ham buğday ve mısır nişastalarını 48 saat inkübasyon sonunda sırasıyla %38 ve %20 oranında parçaladığını belirlemişlerdir. Paralel sonuçlar Hayashida ve ark. (1988) ile Bozöic ve ark. (2011), tarafından da rapor edilmiştir.

B. vallismortis ve *B. mojavensis*'ten üretilen saflaştırılmış α -amilazların ham buğday ve mısır nişastalarını hidroliz çalışmaları bir ilk çalışmadır. Ham nişasta granüllerinin parçalanması ekonomik açıdan çok önemlidir. Bu çalışmada kullanılan saflaştırılmış her iki enzimin de gıda, fermantasyon ve nişastanın jelatinasyonu gibi farklı endüstrilerde ham buğday ve mısır nişastası hidrolizi için kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Parçalanmış buğday ve mısır nişastası granülleri Olympus CX31 ışık mikroskobu ile görüntülenmiştir. Şekil 4.29 ve Şekil 4.30'da enzim ile hiç muamele edilmemiş ham buğday ve mısır nişasta taneleri ile enzim ile 4 saat inkübe edilen ham buğday ve mısır nişasta taneleri gösterilmektedir. Bu sonuçlara göre enzim ile 4 saatlik muamele sonucunda nişasta granüllerinin parçalandığı açıkça görülmektedir.



Şekil 4.29. *B. vallismortis*'ten saflaştırılmış α -amilazın ham buğday ve mısır nişastalarını hidrolizi (a) Ham mısır nişastası kontrol, (b) Hidroliz sonrası ham mısır nişastası, (c) Ham buğday nişastası kontrol, (d) Hidroliz sonrası ham buğday nişastası

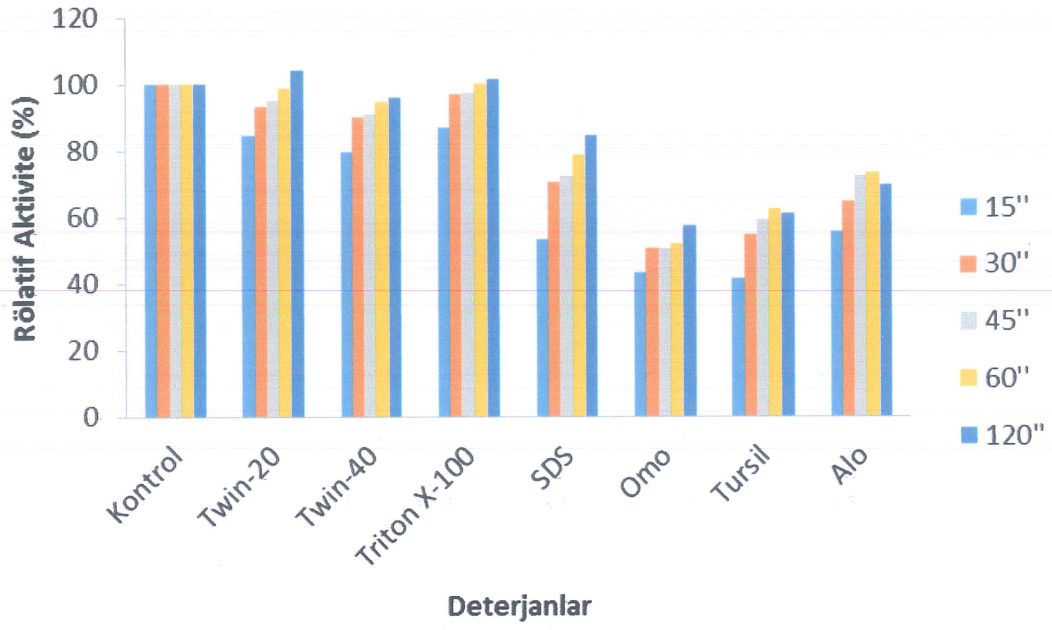


Şekil 4.30. *B. mojavensis*'ten saflaştırılmış α -amilazın ham buğday ve mısır nişastalarını hidrolizi (a) Ham mısır nişastası kontrol, (b) Hidroliz sonrası ham mısır nişastası, (c) Ham buğday nişastası kontrol, (d) Hidroliz sonrası ham buğday nişastası

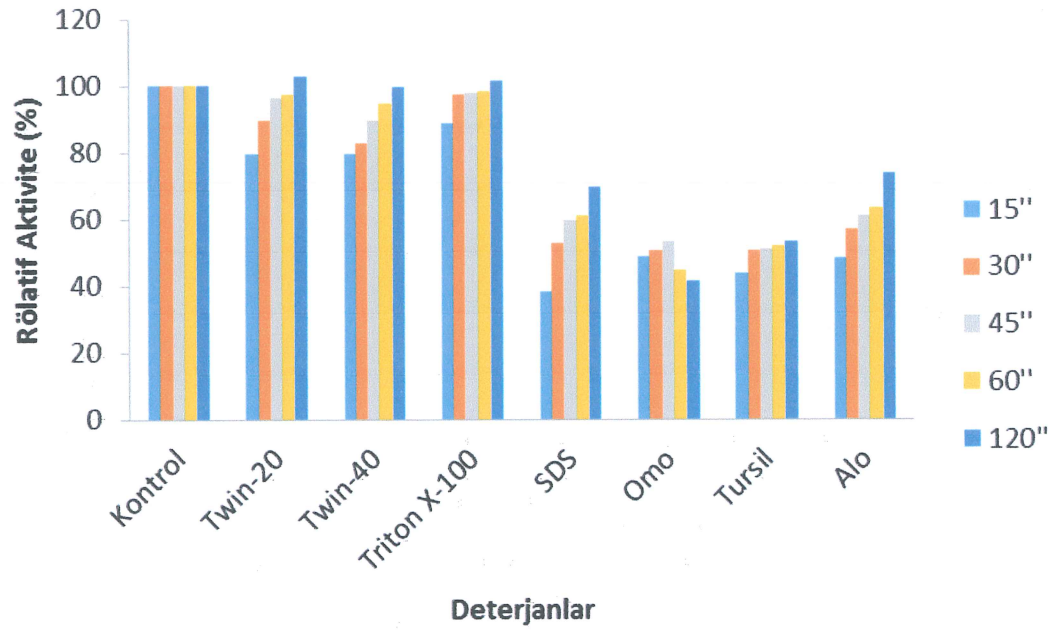
4.22. Farklı Surfaktan ve Deterjanların α -Amilaz Aktivitesine Etkilerinin İncelenmesi

%2'lik Omo, Tursil, Alo, SDS, Tween-20, Tween-40 ve Triton X-100 gibi deterjan ve surfaktanların *B. vallismortis* ve *B. mojavensis*'ten üretilen saflaştırılmış α -amilaz aktivitesi üzerine 15 ile 120 dakikalık zaman aralığındaki etkisi Şekil 4.31'de görülmektedir. Bu sonuçlara göre kontrol ile karşılaştırıldığında 15. dakikada çalışılan Tween-20, Tween-40 ve Triton X-100'ün enzim aktivitesini kısmi inhibe ettiği gözlenirken SDS, Omo, Tursil ve Alo'nun daha fazla inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edildi. Şekil 4.31'de görüldüğü gibi çalışılan tüm deterjan ve surfaktanların inhibisyon etkisinin artan zaman dilimlerinde azaldığı saptandı.

120. dakika sonunda, *B. vallismortis* ve *B. mojavensis*'ten üretilen saflaştırılmış α -amilazların aktivitesi üzerine Tween-20, Tween-40, Triton X-100, SDS, Omo, Tursil, Alo'nun etkileri kontrole kıyasla sırasıyla %104, %101; %95, %99; %101, %101; %84, %69; %57, %41; %61, %53 ve %69, %73 olarak belirlendi (Şekil 4.32). Paralel sonuçlar Goyal ve ark. (2005); Carvalho ve ark. (2008); Özdemir ve ark. (2011) ve Pathak ve Rekadwad (2013) tarafından da elde edilmiştir. Enzimin stabilite testi ve deterjanların etkisi üzerine yapılan testlerden görüleceği gibi *B. vallismortis* ve *B. mojavensis*'ten üretilen saflaştırılmış α -amilazların ticari olarak deterjan sanayinde kullanılabileceği görülmektedir. Elde ettiğimiz sonuçlar daha önce yapılan çalışmalar ile (Özdemir ve ark. 2011; Mesbah ve Wiegel 2014) benzerlik göstermektedir.



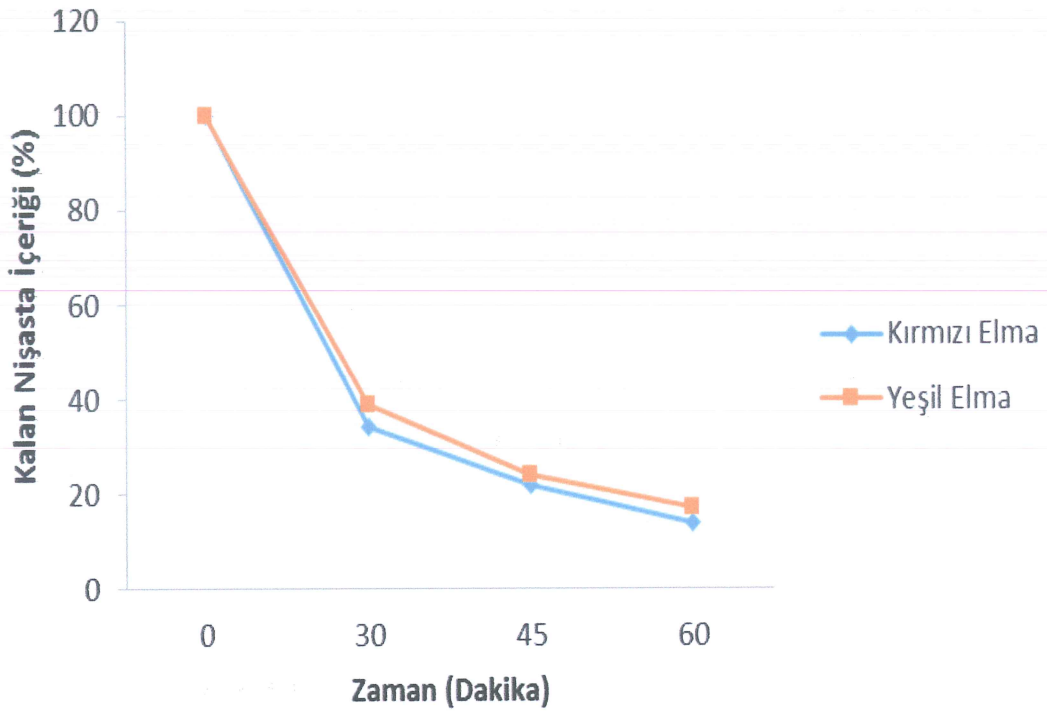
Şekil 4.31. Farklı deterjanların *B. vallismortis* α -amilaz aktivitesine etkisi



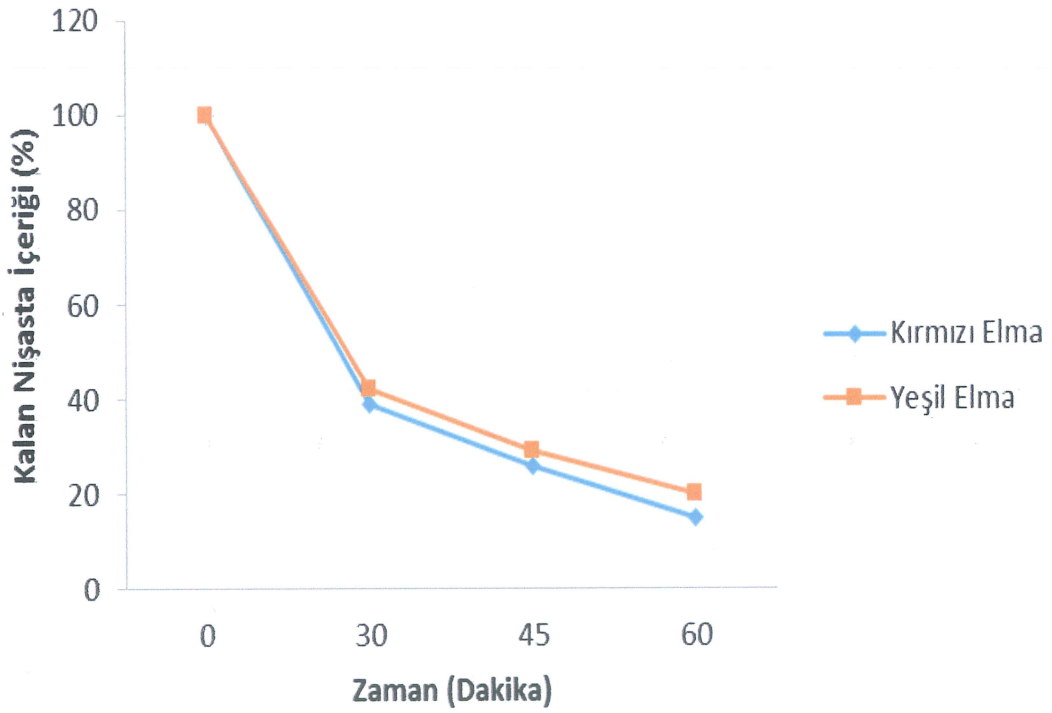
Şekil 4.32. Farklı deterjanların *B. mojavensis* α -amilaz aktivitesine etkisi

4.23. Elma Suyu Nişasta İçeriği ve Berraklaştırılması

Olgunlaşmamış kırmızı ve yeşil elma nişasta miktarları Carrín ark. (2004)'nın yöntemi kullanılarak test edildi. Olgunlaşmamış kırmızı elmadaki çözümlü nişasta miktarı 0.59 g/L, çözümlenmeyen nişasta miktarı 3.87 g/L, olgunlaşmamış yeşil elmadaki çözümlü nişasta miktarı 0.52 g/L, çözümlenmeyen nişasta miktarı 3.68 g/L olarak belirlendi. Olgunlaşmamış kırmızı ve yeşil elmadaki çözümlü nişastanın parçalanma oranını tespit etmek için *B. vallismortis* ve *B. mojavensis*'ten elde edilen saflaştırılmış α -amilazlar ile 30, 45 ve 60 dakika inkübe edildi. *B. vallismortis* α -amilazının kırmızı ve yeşil elma çözümlü nişasta içeriğini 30, 45 ve 60 dakika sonunda sırasıyla %66 ve %61, %78 ve %76, %86 ve %83, *B. mojavensis* α -amilazının ise kırmızı ve yeşil elma çözümlü nişasta içeriğini 30, 45 ve 60 dakika sonunda sırasıyla %61 ve %58, %74 ve %71, %85 ve %80 oranlarında parçaladığı belirlendi (Şekil 4.33 ve Şekil 4.34). Elde ettiğimiz sonuçlar Carrín ve ark. (2004)'nın ticari amilazlar ile yaptıkları elma suyu berraklaştırılması çalışması ile benzerlik göstermektedir. Bu sonuçlara göre *B. vallismortis* ve *B. mojavensis*'ten elde edilen saflaştırılmış α -amilazların elma suyu endüstrisinde elma sularının berraklaştırılması amacıyla kullanılabileceğini düşünmekteyiz.



Şekil 4.33. *B. vallismortis* α -amilazının kırmızı ve yeşil elma çözümlü nişasta içeriğini hidroliz oranları



Şekil 4.34. *B. mojavensis* α -amilazının kırmızı ve yeşil elma çözümlü nişasta içeriğini hidroliz oranları

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Çalışmamızda Şırnak (Meryem Deresi) sıcak su kaynağı çamur örneklerinden izole edilen *Bacillus vallismortis* ve *Bacillus mojavensis* kullanıldı. *B. vallismortis* ve *B. mojavensis* suşlarının biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla gram boyama, katalaz testi ve oksidaz testi yapıldı. İki bakteri suşunun da gram (+), katalaz (+) ve oksidaz (+) olduğu belirlendi. Antibiyotiklere karşı duyarlılık testi yapıldı ve *B. vallismortis*'in sefoksitime, *B. mojavensis*'in sefoksitim ve penisiline karşı dirençli olduğu tespit edildi. Yapılan API 20NE testi sonucu iki suşun da NO₃ (+), ESC (+), GEL (+), PNP (+) ve GLU (+) oldukları belirlendi.

Daha sonra *B. vallismortis* ve *B. mojavensis*'ten α -amilaz üretimi üzerine farklı inkübasyon sürelerinin, sıcaklıklarının ve pH değerlerinin, NaCl₂ konsantrasyonlarının, azot ve karbon kaynaklarının, surfaktanların, tarımsal atıkların ve bazı metallerin etkisi test edildi.

α -Amilaz üretimi üzerine farklı inkübasyon sürelerinin etkisi araştırıldı ve *B. vallismortis* ve *B. mojavensis* için en yüksek α -amilaz üretiminin 36 saat inkübasyon süresinde meydana geldiği görüldü. 36 saat inkübasyon süresi sonunda α -amilaz üretimi *B. vallismortis* için 3832.08 U/mg ve *B. mojavensis* için 3473.085 U/mg olarak elde edildi.

Farklı sıcaklık değerlerinin α -amilaz üretimine etkisi incelendi. *B. vallismortis* ve *B. mojavensis* için en yüksek α -amilaz üretiminin gerçekleştiği sıcaklığın 35 °C olduğu belirlendi. Bununla beraber iki suş için de 25-40 °C aralığında α -amilaz üretim miktarlarının oldukça yakın sonuçlar verdiği tespit edildi. Geniş bir sıcaklık aralığında yüksek oranda enzim üretiminin ekonomik olarak avantajlı olduğu düşünülmektedir.

α -Amilaz üretimi üzerine farklı pH değerlerinin etkisi test edildi ve elde ettiğimiz sonuçlara göre en yüksek α -amilaz üretiminin *B. vallismortis* için pH 6.0 ve *B. mojavensis* için ise pH 7.0'da olduğu belirlendi. *B. vallismortis*'ten pH 6.0'da 4471.574 U/mg α -amilaz elde edildi ve pH 5.0-10.0 aralığında oldukça yüksek oranda α -amilaz üretildiği belirlendi. *B. mojavensis*'ten pH 7.0'da 3473.085 U/mg α -amilaz elde edildi ve pH 6.0-10.0 aralığında α -amilaz üretiminin oldukça yüksek olduğu gözlemlendi.

Besiyerlerine farklı oranlarda eklenen NaCl'ün α -amilaz üretimine etkisi incelendi. *B. vallismortis* ve *B. mojavensis* için ortamda artan NaCl konsantrasyonuna paralel olarak α -amilaz üretiminin kontrole kıyasla düştüğü tespit edildi.

B. vallismortis ve *B. mojavensis*'ten α -amilaz üretiminde, besiyerlerine %1 oranında eklenen farklı azot kaynaklarının etkisi incelendi. Kullanılan azot kaynaklarından üre ve amonyum asetatın, *B. vallismortis*'ten α -amilaz üretimini kontrole kıyasla arttırdığı belirlendi. Bu artışın, üre kullanılan besiyerinde %2, amonyum asetat kullanılan besiyerinde %1 olduğu görüldü. *B. mojavensis*'te ise α -amilaz üretiminin üre kullanılan besiyerinde %3, amonyum sülfat kullanılan besiyerinde %6, amonyum asetat kullanılan besiyerinde %5 ve amonyum tiyosiyanat kullanılan besiyerinde %8 arttığı tespit edildi.

Besiyerlerine %1 oranında eklenen karbon kaynaklarının α -amilaz üretimine etkisi test edildi. *B. vallismortis* ve *B. mojavensis*'ten α -amilaz üretiminde, kullanılan şükroz, fruktoz, nişasta, glukoz, galaktoz ve laktozun α -amilaz üretiminde azalmaya neden olduğu görüldü. Bu azalmanın sebebinin katabolik represyondan kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Surfaktanın α -amilaz üretimine etkisini incelemek amacıyla besiyerlerine farklı konsantrasyonlarda Triton X-100 ve Tween-20 eklendi. *B. vallismortis*'te kontrole kıyasla en yüksek enzim üretimi %0.5 Tween-20 ortamında 5028.207 U/mg olarak elde edildi. *B. mojavensis*'te ise %0.05 Tween-20 ortamında 4282.695 U/mg olarak bulundu. Surfaktanların hücre zarında bulunan por açıklıklarını genişletmelerinden dolayı enzimin hücre dışına daha kolay salgılanabileceğini, böylece enzim aktivitesini arttırdıklarını düşüncesindeyiz.

Besiyerlerine %2 oranında eklenen bazı tarımsal atıkların *B. vallismortis* ve *B. mojavensis*'ten α -amilaz üretimine etkisi incelendi. Kullanılan tarımsal atıklardan fıstık kabuğu ve fıstık yaprağının, iki bakteri suşunda da inhibisyon etkisi sonucu bakteri üremesini engellediği ve buna bağlı olarak da α -amilaz üretiminin gerçekleşmediği tespit edildi. Kullanılan diğer tarımsal atıkların kontrole kıyasla α -amilaz üretiminde azalmaya neden olduğu belirlendi. Bu azalmanın, kullandığımız tarımsal atıklardaki şeker içeriğinden kaynaklandığı düşünülebilir.

Besiyerlerine farklı oranlarda eklenen metallerin, *B. vallismortis* ve *B. mojavensis*'ten α -amilaz üretimine etkisi incelendi. Besiyeri ortamında 250 mg/L CaCl_2 varlığında *B. vallismortis*'ten elde edilen α -amilazın kontrole kıyasla %10 arttığı tespit edildi. *B. mojavensis*'te ise bu artışın %27 olduğu görüldü. Buradaki artışın, Ca^{+2} 'ün enzim aktivitesi için kofaktör olduğundan kaynaklandığını düşünmekteyiz. Bununla birlikte kullanılan metallere 250 ve 500 mg/L NiCl_2 'ün ve 500 mg/L MnCl_2 'ün

eklendiği besiyerlerinde, iki bakteri suşunun da üremesini inhibe ettiğinden bu ortamlarda α -amilaz üretiminin gerçekleşmediği belirlendi.

Optimum üretim parametreleri belirlendikten sonra, *B. vallismortis* ve *B. mojavensis*'ten elde edilen α -amilaz enzimleri saflaştırıldı. Saflaştırma işleminden sonra bu iki enzimin karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. *B. vallismortis* ve *B. mojavensis*'ten elde edilen saflaştırılmış α -amilazların karakterizasyonu için; sıcaklık ve sıcaklık stabilite, pH ve pH stabilite, inhibitörler ve metaller, farklı NaCl₂ konsantrasyonlarının etkisi ve farklı nişastaları hidroliz oranları incelendi. Çözünür nişasta son hidroliz ürünleri ince tabaka kromatografisi (TLC) ile analiz edildi. Bunlara ilaveten saflaştırılmış α -amilazların, ham buğday ve mısır nişastalarını parçalama oranları, elma suyu nişasta içeriğinin belirlenmesi, elma suyu berraklaştırılması ve ev tipi çamaşır deterjanları endüstrilerinde kullanımı test edildi.

B. vallismortis ve *B. mojavensis*'ten α -amilaz enzimi üretimi için optimum koşullar belirlendikten sonra enzim saflaştırma işlemlerine geçildi. *B. vallismortis* ve *B. mojavensis*'ten elde edilen termostabil α -amilaz üç saflaştırma aşamasından sonra sırasıyla 51 ve 34 kat saflaştırıldı ve %30 ve %18 verim elde edildi. *B. vallismortis* ve *B. mojavensis*'ten elde edilen α -amilazların molekül ağırlıkları sırasıyla, 74 kDa ve 73 kDa olarak bulundu.

Farklı sıcaklık değerlerinin (20-90 °C) *B. vallismortis* ve *B. mojavensis*'ten elde edilen saflaştırılmış α -amilaz aktivitesi üzerine etkisi test edildi. *B. vallismortis*'ten elde edilen saflaştırılmış α -amilazın optimum sıcaklığı 70 °C olarak tespit edildi. Enzimin 30-60 °C'lerdeki rölatif aktivitelerinin %95'in üzerinde olduğu belirlendi. 20 ve 80 °C'lerde ise rölatif aktiviteler sırasıyla %75 ve %84 olarak bulundu. *B. mojavensis*'ten elde edilen α -amilazın optimum aktivitesi de 70 °C olarak tespit edildi. Enzimin 30-60 °C'lerdeki rölatif aktivitelerinin ise %70'in üzerinde olduğu belirlendi. 20 ve 80 °C'lerde ise rölatif aktiviteler sırasıyla %37 ve %82 olarak bulundu. İki bakteri suşundan da elde edilen saflaştırılmış α -amilazların 70 °C gibi yüksek bir sıcaklıkta optimum aktivite göstermeleri ve yaklaşık 40-80 °C sıcaklık aralığında oldukça yüksek aktiviteye sahip olmaları bu bakterilerden elde edilen α -amilazların çeşitli endüstrilerde kullanımı açısından önemli olduğunu düşünmekteyiz.

B. vallismortis ve *B. mojavensis*'ten elde edilen saflaştırılmış α -amilaz aktivitesi üzerine farklı pH değerlerinin (3.0-11.0) etkisi test edildi. *B. vallismortis*'ten elde edilen saflaştırılmış α -amilazın optimum aktivitesini pH 5.0'da gösterdiği belirlendi. pH 4.0-8.0 aralığında enzimin %84'ün üzerinde rölatif aktivite gösterdiği tespit edildi. *B.*

mojavensis'ten elde edilen saflaştırılmış α -amilazın optimum pH'sının 6.0 olduğu bulundu. pH 4.0-8.0 aralığında %77'nin üzerinde aktivite gösterdiği belirlendi. İki bakteriden de elde edilen α -amilazların 4.0-8.0 pH aralığında yüksek oranda aktivite göstermelerinin bu enzimlerin biyoteknolojik kullanımları için önemli bir avantaj olduğu kanaatindeyiz.

Zamana bağlı (0-240 dak.) olarak farklı sıcaklıkların (40-70 °C), *B. vallismortis* ve *B. mojavensis*'ten elde edilen saflaştırılmış α -amilaz stabiliteyi üzerine etkileri araştırıldı. *B. vallismortis*'ten elde edilen saflaştırılmış α -amilazın 90 dakika inkübasyon sonunda test edilen tüm sıcaklıklarda (40, 50, 60 ve 70 °C) aktivitesini %97'nin üzerinde koruduğu, 40 ve 50 °C'de ise 240 dakika inkübasyon sonunda dahi %91'in üzerinde aktivite gösterdiği belirlendi. *B. mojavensis*'ten elde edilen saflaştırılmış α -amilazın ise 90 dakika inkübasyon sonunda 40, 50, 60 ve 70 °C'deki aktiviteleri sırasıyla %97, %88, %69 ve %59 olarak bulundu. 240 dakika inkübasyon sonunda 40 ve 50 °C'de %77'nin üzerinde aktivite gösterirken, 60 ve 70 °C'de ise enzim aktivitesinde çok büyük oranda azalmanın olduğu belirlendi.

Farklı pH değerlerinin (4.0-8.0) zamana bağlı olarak (0-240 dak.) *B. vallismortis* ve *B. mojavensis*'ten elde edilen saflaştırılmış α -amilaz stabiliteyi üzerine etkileri incelendi. *B. vallismortis*'ten elde edilen saflaştırılmış α -amilazın test edilen tüm pH değerlerinde (4.0, 5.0, 6.0, 7.0 ve 8.0) 240 dakika inkübasyon süresinde %84'ün üzerinde aktiviteye sahip olduğu belirlendi. *B. mojavensis*'ten elde edilen saflaştırılmış α -amilazın ise aynı sürede %70'in üzerinde aktivite gösterdiği tespit edildi. *B. vallismortis* ve *B. mojavensis*'ten elde edilen saflaştırılmış α -amilazların stabiliteyi 240 dakika boyunca pH 4.0-8.0 aralığında oldukça yüksek oranlarda korunmasının özellikle nişastanın sıvılaştırılması ve deterjan endüstrilerinde kullanımı için önemli bir özellik olduğu kanaatindeyiz.

B. vallismortis ve *B. mojavensis*'ten elde edilen saflaştırılmış α -amilaz aktivitesi üzerine farklı NaCl konsantrasyonlarının (%2.5, %5, %7.5, %10, %15, %20 ve %25) etkisi test edildi. Elde edilen sonuçlara göre; *B. vallismortis*'ten elde edilen saflaştırılmış α -amilaz aktivitesinin NaCl konsantrasyonlarındaki artışa paralel olarak kısmen azaldığı ve %25 NaCl konsantrasyonunda yaklaşık %92 aktivite gösterdiği tespit edildi. *B. mojavensis*'ten elde edilen saflaştırılmış α -amilaz aktivitesinin de NaCl konsantrasyonlarındaki artışa paralel olarak azaldığı fakat aktivite kaybının *B. vallismortis*'ten elde edilen enzime göre daha fazla olduğu belirlendi. *B. vallismortis*'ten

elde edilen saflaştırılmış α -amilaz aktivitesinin %25 NaCl konsantrasyonunda %61 aktiviteye sahip olduğu tespit edildi.

0.3 ve 1.5 mM konsantrasyondaki farklı metallerin (CdCl_2 , PbCl_2 , CuCl_2 , CaCl_2 , NiCl_2 , CrCl_2 , HgCl_2 , AgCl_2 , CoCl_2 , MnCl_2 ve ZnCl_2) *B. vallismortis* ve *B. mojavensis*'ten elde edilen saflaştırılmış α -amilaz aktivitesi üzerine etkisi incelendi. Test edilen tüm metallerin 0.3 mM konsantrasyonlarının *B. vallismortis*'ten elde edilen saflaştırılmış α -amilaz aktivitesi üzerine önemli bir etkisinin olmadığı görüldü. Fakat aynı konsantrasyondaki CdCl_2 , HgCl_2 ve ZnCl_2 'ün *B. mojavensis*'ten elde edilen saflaştırılmış α -amilaz aktivitesinde sırasıyla %16, %18 ve %14 azalma meydana getirdikleri belirlenirken, CoCl_2 ve MnCl_2 'ün de sırasıyla %6 ve %8 artış meydana getirdiği tespit edildi. *B. vallismortis*'ten elde edilen α -amilaz aktivitesinde 1.5 mM konsantrasyondaki CdCl_2 , AgCl_2 ve ZnCl_2 'ün sırasıyla %43, %21 ve %29, *B. mojavensis*'ten elde edilen α -amilaz aktivitesinde ise %78, %56 ve %70 düşüşe neden olduğu belirlendi. 1.5 mM HgCl_2 konsantrasyonun ise her iki bakteri suşundan da elde edilen saflaştırılmış α -amilazı inhibe ettiği tespit edildi.

Çözünür buğday, çözünür patates, ticari buğday ve ticari mısır nişastaları substrat olarak kullanılarak *B. vallismortis* ve *B. mojavensis* tarafından üretilen saflaştırılmış α -amilazların farklı nişasta endüstrilerindeki kullanılabilirliği test edildi. Elde edilen sonuçlara göre *B. vallismortis*'ten elde edilen saflaştırılmış α -amilazın çözünür patates nişastasası, ticari buğday nişastasası ve ticari mısır nişastalarını, çözünür buğday nişastasına kıyasla sırasıyla %93, %85 ve %82 oranlarında ve benzer şekilde *B. mojavensis*'ten elde edilen saflaştırılmış enzim ise sırasıyla %85, %73 ve %73 oranlarında parçaladığı tespit edildi.

B. vallismortis ve *B. mojavensis*'ten elde edilen saflaştırılmış α -amilaz aktivitesi üzerine farklı etanol ve β -merkaptöetanol konsantrasyonlarının (%1, %2.5, %5, %7.5, %10, %15 ve %20) etkisi incelendi. Elde edilen sonuçlara göre *B. vallismortis*'ten elde edilen saflaştırılmış α -amilazın aktivitesinde tüm etanol konsantrasyonlarında artış meydana geldiği görüldü. *B. vallismortis* için β -merkaptöetanolün %1'lik konsantrasyonunda %2 aktivite artışı olduğu, %2.5 ve artan konsantrasyonlarında aktivitenin giderek düştüğü ve %20 konsantrasyonda α -amilaz aktivitesinin olmadığı tespit edildi. *B. mojavensis*'ten elde edilen saflaştırılmış α -amilaz aktivitesi ise; kullanılan tüm etanol konsantrasyonlarında artan konsantrasyona paralel olarak azaldığı ve %20 etanolde %83 aktivite gösterdiği belirlendi. *B. mojavensis* için β -merkaptöetanolün %1'lik konsantrasyonunda aktivitede %24 artış, %2'lik

konsantrasyonunda %4 azalma meydana geldiği tespit edildi. %5 ve artan β -merkaptolanol konsantrasyonlarda α -amilaz aktivitesinde keskin bir düşüş olduğu belirlendi.

B. vallismortis ve *B. mojavensis*'ten elde edilen saflaştırılmış α -amilazlara substrat olarak çözünür nişasta kullanılarak TLC işlemi uygulandı ve hidroliz ürünleri görüntülendi. *B. vallismortis*'ten elde edilen α -amilaz 15, 30 ve 240 dakika çözünür nişasta ile inkübe edildi. 15 ve 30 dakika sonunda maltoz, maltotrioz, maltotetroz ve maltooligosakkaritlerin meydana geldiği, 240 dakika sonunda çözünür nişastanın tamamen glukozla hidrolize edildiği belirlendi. *B. mojavensis*'ten elde edilen α -amilaz, 15 dakika inkübasyon sonunda maltoz, maltotrioz, maltotetroz, maltooligosakkaritler meydana getirdi. 30 dakika sonunda glukoz, maltoz, maltotrioz, maltotetroz ve maltooligosakkaritler elde edildi. 240 dakika sonunda çözünür nişastanın tamamen glukozla hidrolize olduğu tespit edildi. Hidroliz ana son ürünleriyle ilgili olarak bu çalışmada kullanılan saflaştırılmış α -amilazların şeker üretimi ya da kısa zincirli oligosakkarit oluşumu ile ilgili endüstri alanlarında uygulanabileceği düşünülmektedir.

Saflaştırılmış α -amilazların ham buğday ve mısır nişastalarını parçalama yüzdeleri incelendi. *B. vallismortis*'ten elde edilen saflaştırılmış α -amilaz 4 saat inkübe edildikten sonra ham buğday ve mısır nişastalarını parçalama yüzdelerinin %38.9 ve %41.3 olduğu belirlendi. *B. mojavensis*'ten elde edilen saflaştırılmış α -amilazın ham buğday ve mısır nişastalarını parçalama yüzdeleri ise sırasıyla %36.7 ve %39.2 olarak tespit edildi.

Farklı deterjan ve surfaktanların (Tween-20, Tween-40, Triton X-100, SDS, Omo, Tursil ve Alo) %2'lik konsantrasyonlarının *B. vallismortis* ve *B. mojavensis*'ten elde edilen saflaştırılmış α -amilaz aktiviteleri üzerine etkisi araştırıldı. İnkübasyon süresi olarak 15, 30, 45, 60 ve 120 dakika kullanıldı. Elde edilen sonuçlara göre, en uzun inkübasyon süresi olan 120 dakikada, *B. vallismortis* ve *B. mojavensis*'ten üretilen saflaştırılmış α -amilazların aktivitesi üzerine Tween-20, Tween-40, Triton X-100, SDS, Omo, Tursil, Alo'nun etkileri kontrol ile karşılaştırdığımızda sırasıyla %104, %101; %95, %99; %101, %101; %84, %69; %57, %41; %61, %53 ve %69, %73 olarak belirlendi. Bu sonuçlara göre iki bakteri suşundan da elde edilen saflaştırılmış α -amilazların ticari olarak deterjan sanayinde kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

Olgunlaşmamış elma suyundaki nişasta içeriğinin berraklaştırılmasında *B. vallismortis* ve *B. mojavensis*'ten elde edilen saflaştırılmış α -amilazların etkisi test edildi. 30, 45 ve 60 dakika inkübasyon sonunda kırmızı ve yeşil elmadaki nişastaların

bozunma yüzdeleri, *B. vallismortis* için kırmızı elmada sırasıyla %66, %78 ve %86 olarak, yeşil elmada %61, %76 ve %83 olarak tespit edildi. *B. mojavensis* için kırmızı elmadaki nişasta bozunma yüzdeleri %61, %74 ve %85 olarak, yeşil elmadaki nişasta bozunma yüzdeleri ise %58, %71 ve %80 olarak belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre *B. vallismortis* ve *B. mojavensis*'ten saflaştırılan α -amilazların meyve suyu berraklaştırılmasında kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

5.2. Öneriler

Bu tez çalışmasında Şırnak (Meryem Deresi) sıcak su kaynağı çamur örneklerinden izole edilen *Bacillus vallismortis* ve *Bacillus mojavensis*'in biyoteknolojide en yaygın kullanılan enzimlerden biri olan α -amilaz için iyi birer üretici oldukları ve biyoteknoloji uygulamalarında α -amilaz üretimi için kullanılabileceği düşünülmektedir.

Bu termotolerant bakterilerden üretilen α -amilazın sıcaklık, pH, kimyasal ajanlara ve deterjanlara karşı dayanıklı olmasından dolayı çeşitli nişasta endüstrilerinde kullanılabileceği düşünülmektedir. Özellikle, geniş bir sıcaklık ve pH stabilitesine sahip olmalarından dolayı nişastanın sıvılaştırılması ve deterjan endüstrisinde kullanılabilirliği açıkça görülmektedir.

Maltoz ve maltooligosakkaritler, yaşlı ve bebek mamalarına gıda katkısı olarak eklenmektedir. Bu çalışmada kullanılan her iki mikroorganizmadan üretilen α -amilazların çözünür nişastayı maltoz ve maltooligosakkaritlere parçalıyor olması büyük önem arz etmektedir. Aynı zamanda bu amilazların ham buğday ve mısır nişastasını da hidrolize edebilmesi nedeniyle bunların gıda endüstrisinde de değerlendirilebilme potansiyeline sahip oldukları kanaatindeyiz.

Bununla birlikte, bu çalışmada kullanılan α -amilazların surfaktan ve deterjanlara karşı stabil olmalarından dolayı ev tipi çamaşır ve bulaşık deterjanlarında nişasta içerikli kirleticilerin uzaklaştırılması için yararlanılabileceğini öngörmekteyiz. Bunlara ilaveten, bu α -amilazların elma suyu sanayinde, berraklaştırma amaçlı kullanılabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak *Bacillus vallismortis* ve *Bacillus mojavensis*'ten elde edilen saflaştırılmış α -amilazların nişastanın sıvılaştırılması, gıda, çamaşır ve bulaşık deterjanı ve elma suyu berraklaştırılması gibi çeşitli nişasta endüstrileri için üretilerek ülkemizin enzim biyoteknolojisine de ekonomik anlamda katkı yapacağı düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Aehle, W., 2007. Enzymes in Industry Production and Applications, *Third, Completely Revised Edition*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, KGaA, Germany, 99-262p.
- Agüloğlu Fincan S. & Enez B., 2014. Production, purification, and characterization of thermostable α -amylase from thermophilic *Geobacillus stearothermophilus*, *Starch/Stärke*, 66: 182–189.
- Agüloğlu Fincan, S., Enez, B., Özdemir, S., & Matpan Bekler, F. (2014). Purification and characterization of thermostable α -amylase from thermophilic *Anoxybacillus flavithermus*, *Carbohydrate Polymers*, 102, 144–150.
- Aiyer, P. V., 2005. Amylases and their applications, *African Journal of Biotechnology*, 4(13): 1525-1529.
- Arkan, B., Unaldı, N., Coral, G., Çolak, Ö., Ashabil, A., Osman, G., 2003. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6, *Process Biochemistry*, vol. 38, p. 1397-1403.
- Asgher, M., Javaid Asad, M., Rahman, S.U., Legge, R.L., 2007. A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *Journal of Food Engineering*, 79: 950-955.
- Asoodeh, A., Chamani, J. K., Lazgian, M., 2010. A novel thermostable, acidophilic α -amylase from a new thermophilic "*Bacillus* sp. *Ferdowsicus*" isolated from Ferdows hot mineral spring in Iran: Purification and biochemical characterization, *International Journal of Biological Macromolecules*, 46, 289-297.
- Babu, K. R. & Satyanarayana, T., 1994. α -Amylase production by thermophilic *Bacillus coagulans* in solid state fermentation, *Process Biochemistry*, Vol. 30, No. 4, pp. 305-309.
- Beg, Q. K., Gupta, R., 2003. Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*, *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 294-304.
- Behal, A., Singh, J., Sharma, M.K., Puri, P., Batra, N., 2006. Characterization of Alkaline α -Amylase from *Bacillus* sp. AB 04, *International Journal of Agriculture Biology*, 48:80-83.
- Bertoldo, C. And Antranikian, G., 2002. Starch hydrolizing enzymes from thermophilic archaea and bacteria, *Current Opinion in Chemical Biology*, 6: 151-160.
- Bhat, M.K., 2000. Cellulase and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 8 (5): 355-458.
- Bolton, D.J., Kelly, C.T., Fogarty, W.M., 1997. Purification and characterization of the α -amylase of *Bacillus flavothermus*, *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 20 p. 340-343.
- Božić, N., Ruiz, J., López-Santín, J., Vujčić, Z., 2011. Production and properties of the highly efficient raw starch digesting α -amylase from a *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a, *Biochemical Engineering Journal*, 53, 203-209.

- Carvalho RV, Correa TLR, Silva JCM, de Oliveira Mansur LRC, Martins MLL., 2008. Properties of an amylase from thermophilic *Bacillus* sp. *Braz J Microbiol.* 39:102-107.
- Carrín, M. E., Ceci, L. N., Lozana J. E., 2004. Characterisation of starch in apple juice and its degradation by amylases, *Food Chem.*, 87, 173-178.
- Chakraborty, S., Khopade, A., Biao, R., Jian, W., Liu, X.Y., Mahadik, K., Chopade, B., Zhang, L., Kokare, C., 2011. Characterization and stability studies on surfactant, detergent and oxidant stable α -amylase from marine haloalkaliphilic *Saccharopolyspora* sp. A9, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68: 52-58.
- Chand, N., Sajedi, R. H., Nateri, A. S., Kajeh, K., Rassa, M., 2014. Fermentative desizing of cotton fabric using an α -amylase-producing *Bacillus* strain: Optimization of simultaneous enzyme production and desizing, *Process Biochemistry*, 49, 1884-1888.
- Cordeiro, C.A.M., Martins, M.L.L., Luciano, A.B., 2002. Production and properties of α -amylase from thermophilic *Bacillus* sp., *Brazilian Journal of Microbiology*, 33: 57-61.
- Çalışkan, S., 2011. *Geobacillus* sp. Tarafından Termostabil α -Amilaz Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 1-1.
- Çaphan, A.İ., 2011. Biyoteknoloji nedir? [online], (Edition), <https://biyoinformatik.files.wordpress.com/2007/02/bolum2.pdf> [Ziyaret Tarihi: 7 Nisan 2015].
- Dağaşan, L., 1997. Enzim Mühendisliğinde Temel Konular ve Uygulamalar, *Marmara Araştırma Merkezi, Lisans Üstü Yaz Okulu (E.M.T.U)*, Bölüm 15.
- Elkady, M.F., Farag, S., Zaki, S., Abu-Elreesh, G., El-Haleem, D.A., 2011. *Bacillus mojavensis* strain 32A, a bioflocculant-producing bacterium, isolated from an Egyptian salt production pond, *Bioresource Technology*, Volume 102, Issue 17, Pages 8143-8151.
- Fincan, S.A., Enez, B., Özdemir, S., Matpan Bekler, F., 2014. Purification and characterization of thermostable α -amylase from thermophilic *Anoxybacillus flavithermus*, *Carbohydrate Polymers*, 102, 144-150.
- Fogarty, W. M., 1983. Microbial Enzymes and Biotechnology, *Applied Science*, 2-72.
- Ghanbarzadeh, B. ve Almasi, H., 2013. Biodegradable polymers [online], (Edition), University of Tabriz, Iran, <http://www.intechopen.com/books/biodegradation-life-of-science/biodegradable-polymers> [Ziyaret Tarihi: 26 Mayıs 2015].
- Gligorijević, N., Stevanović, N., Loncar, N., Baošić, Vujčić, Z. and Božić, N., 2014. A thin layer chromatographic comparison of raw and soluble starch hydrolysis patterns of some α -amylases from *Bacillus* sp. isolated in Serbia, *Journal of the Serbian Chemical Society*, 79, (4), 411-420.
- Goyal, N., Gupta, J. K., Soni, S. K., 2005. A novel raw starch digesting thermostable α -amylase from *Bacillus* sp. I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch, *Enzyme and Microbial Technology*, 37, 723-734.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., Chauhan, B., 2003. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective, *Process Biochemistry*, 38, 1599-1616.

- Haddar, A., Bougatef, A., Agrebi, R., Sellami-Kamoun, A., Nasri, M., 2009. A novel surfactant-stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus mojavensis* A21. Purification and characterization, *Process Biochemistry*, 44, 29-35.
- Haddar, A., Sellami-Kamoun, A., FakhFakh-Zouari, N., Hmidet, N., Nasr, M., 2010. Characterization of detergent stable and feather degrading serine proteasas from *Bacillus mojavensis* A21, *Biochemical Engineering Journal*, 51, 53-63.
- Haddar, A., Driss, D., Frikha, F., Ellouz-Chaabouni, S., Nasri, M., 2012. Alkaline xylanases from *Bacillus mojavensis* A21: Production and generation of xylooligosaccharides, *International of Biological Macromolecules*, 51, 647-656.
- Hamilton, L. M., Kelly, C. T., Fogarty, W.M., 1999. Production and properties of the raw starch-digesting α -amylase of *Bacillus* sp. IMD 435. *Process Biochemistry*, 35, 27-31.
- Haq, I., Ashraf, H., Iqbal, J., Qadeer, M. A., 2003. Production of alpha amylase by *Bacillus licheniformis* using an economical medium, *Bioresource Technology*, 87, 57-61.
- Hashemi, M., Razavi, S. H., Shojaosadati, S. A., Mousavi, S. M., Khajeh, K. and Safari, M., 2010. Development of a solid-state fermentation process for production of an alpha amylase with potentially interesting properties, *Journal of Bioscience and Bioengineering* VOL. 110 No. 3, 333-337.
- Hashemi, M., Razavi, S.H., Shojaosadati, S.A., Mousavi, S.M., 2011. The potential of brewer's spent grain to improve the production of α -amylase by *Bacillus* sp. KR-8104 in submerged fermentation system, *New Biotechnology*, Volume 28, Issue 2, 165-172.
- Hayashida, S., Teramoto, Y., Inoue, T., 1988. Production and characteristics of raw potato-starch-digesting α -amylase from *Bacillus subtilis* 65. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1516-1522.
- Hmidet, N., Bayouh, A., Berrin, J. G., Kanoun, S., Juge, N., Nasri, M., 2008. Purification and biochemical characterization of a novel α -amylase from *Bacillus licheniformis* NH1 cloning, nucleotide sequence and expression of *amyN* gene in *Escherichia coli*, *Process Biochemistry*, 43, 499-510.
- Horikoshi, R. and Sharp, R. 1992. *Molecular Biology and Biotechnology of Extremophiles*, Blackie&Son Ltd, New York.
- Jianhua Liu., Weiguang Xia., Abdullahi A.Y., Fan Wu Qin Ai., Dingyuan Feng. & Jianjun Zuo., 2015. Purification and Partial Characterization of an Acidic α -Amylase from a Newly Isolated *Bacillus subtilis* ZJ-1 that may be Applied to Feed Enzyme, *Prep Biochem Biotechnol*, 45: 259-267.
- Kallel, F., Driss, D., Bouaziz, F., Neifer, M., Ghorbel, R., Chaabouni, S. E., 2015. Production of xylooligosaccharides from garlic straw xylan by purified xylanase from *Bacillus mojavensis* UEB-FK and their in vitro evaluation as prebiotics, *Food and Bioproducts Processing* 94:536-546.
- Karmakar, M. and Rina Rani, R., 2011. A maltotriose producing thermostable amylase from *Bacillus* sp. KR11, *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 1(3):91-99.

- Kıran, Ö.E. ve Çömlekçioğlu, U., 2003. Zeytinli Ilıcası (Kahramanmaraş)'ından termofil alkafilik amilolitik *Bacillus* sp. suşlarının izolasyonu ve amilaz üretme yetenekleri üzerine azot kaynaklarının etkisi. *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi* 6(2): 41-48..
- Kikani, B. A., Singh, S. P., 2012. The stability and thermodynamic parameters of a very thermostable and calcium-independent α -amylase from a newly isolated bacterium, *Anoxybacillus beppuensis* TSSC-1, *Process Biochemistry*, 47, 1791-1798.
- Konsula, Z., Liakopoulou-Kyriakides, M., 2004. Hydrolysis of starches by the action of an α -amylase from *Bacillus subtilis*, *Process Biochemistry*, 39, 1745-1749.
- Krishna C. Chandrasekaran M., 1996. Banana waste as substrate for α -amylase production by *Bacillus subtilis* (CBTK 106) under solid-state fermentation, *Microbial Biotechnology*, 46:106-111.
- Kumar, N. M., Karthikeyan, S., Jayaraman, G., 2013. Thermostable alpha-amylase enzyme production from *Bacillus laterosporus*: Statistical optimization, purification and characterization, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 2, 38-44.
- Kunamneni, A., Permaul, K. and Singh, S., 2005. Amylase production in solid state fermentation by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*, *Journal Of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 100, No. 2, 168-171.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-685.
- Ling, J., Zhang, G., Sun, H., Fan, Y., Ju, Y., Zhang, C., 2011. Isolation and characterization of a novel pyrene-degrading *Bacillus vallismortis* strain JY3A, *Science of the Total Environment*, 409, 1994-2000.
- Liu, X. D., Xu, Y., 2008. A novel raw starch digesting α -amylase from a newly isolated *Bacillus* sp. XY-1: purification and characterization, *Bioresource Technology*, 99, 4315-4320.
- Maarel, Marc J.E.C. van der., Veen, Bart van der., Uitdehaag, Joost C.M., Leemhuis, Hans, Dijkhuizen, L., 2002. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family, *Journal of Biotechnology*, 94, 137-155.
- Madigan M.T., Martinko, J.M., 2012. Brock mikroorganizmaların biyolojisi, Prof. Dr. Çökmüş, C., *Palme Yayıncılık*, Ankara, 379-379.
- Mahdavi, A., Sajedi, R. H., Asghari, S. M., Taghdir, M., Rassa, M., 2011. An analysis of temperature adaptation in cold active, mesophilic and thermophilic *Bacillus* α -amylases, *International Journal of Biological Macromolecules*, 49, 1038-1045.
- Mamo, G., Gessesse, A., 1999. Purification and characterization of two raw-starch-digesting thermostable α -amylases from a thermophilic *Bacillus*, *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 433-438.
- Martínez-Gallegos, J. F., Jurado-Alameda, E., Carrasquilla-Carmona, J. L., Jiménez-Pérez, J. L., Romero-Pareja, P. M., 2014. Characterization of the ozone effect over an α -amylase from *Bacillus licheniformis*, *Biochemical Engineering Journal*, 85, 119-124.
- Matzka J., 2000. Proteins, *FEMS Microbiology*, vol.183 p.55-61.

- Mesbah, N. M., Wiegel, J., 2014. Halophilic alkali-and thermostable amylase from a novel polyextremophilic *Amphibacillus* sp. NM-Ra2, *International Journal of Biological Macromolecules*, 70, 222-229.
- Messaoud E.B., Ali B.M., Elleuch N., Masmoudi N.F., Bejar S., 2004. Purification and properties of a maltaheptaose- and maltohexaose-forming amylase produced by *Bacillus subtilis* US116, *Enzyme and Microbial Technology*, 34:662-666.
- Mc Tighe, M. A., Kelly, C. T., Doyle, E. M. and Fogarty, W. M., 1995. The alkaline amylase of the alkalophilic *Bacillus* sp. IMD 370, *Enzyme and Microbial Technology*, 17:570-573.
- Michele Michelin, T.M., Silva, V.M., Benassi, S.C. Peixoto-Nogueira, L.A.B., Moraes, J.M., Leão, J.A., Terenzi, H.F., Polizeli Mde, L., 2010. Purification and characterization of a thermostable α -amylase produced by the fungus *Paecilomyces variotii*, *Carbohydr. Res*, 345, 2348–2353.
- Mitsuiki, S., Mukae, K., Sakai, M., Goto, M., Hayashida, S., & Furukawa, K., 2005. Comparative characterization of raw starch hydrolyzing α -amylases from various *Bacillus* strains, *Enzyme and Microbial Technology*, 37, 410-416.
- Mukherjee, A. K., Borah, M., Rai, S. K., 2009. To study the influence of different components of fermentable substrates on induction of extracellular α -amylase synthesis by *Bacillus subtilis* DM-03 in solid-state fermentation and exploration of feasibility for inclusion of α -amylase in laundry detergent formulation, *Biochemical Engineering Journal*, 43, 149-156.
- Mulimani V.H., Patil G.N. 2000. α -Amylase production by solid state fermentation: a new practical approach to biotechnology courses, *Biochemical Education*, 28 :161-163.
- Murakami, S., Nishimoto, H., Toyama, Y., Shimamoto, E., Takenaka, S., Kaulpiboon, J., Prousoontorn, M., Limpaseni, T., Pongsawasdi, P., Aoki, K., 2007. Purification and characterization of two alkaline, thermotolerant α -amylases from *Bacillus halodurans* 38C-2-1 and expression of the cloned gene in *Escherichia coli*, *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 71, 2393–2401.
- Muralikrishna, G ve Nirmala, M., 2005. Cereal α -amylases-an overview, *Carbohydrate Polimers*, 60, 163-173.
- Najafi, M. F., Deobagkar, D., Deobagkar, D., 2005. Purification and characterization of an extracellular α -amylase from *Bacillus subtilis* AX20, *Protein Expression and Purification*, 41, 349-354.
- Özdemir, S., Güven, K., Baysal, Z. And Uyar, F., 2009. Screening of various organic substrates and the development of a suitable low-cost fermentation medium for the production of α -amylase by *Bacillus subtilis*, *Food Technol. Biotechnol*, 47 (4) 364-369.
- Özdemir, S., Matpan, F., Güven, K., Baysal, Z., 2011. Production and characterization of partially purified extracellular thermostable α -amylase by *Bacillus subtilis* in submerged fermentation (SmF), *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 41:4, 365-381.
- Özdemir, S., Matpan, F., Okumus, V., Dündar, A., Ulutas, M. S., Kumru, M., 2012. Isolation of a thermophilic *Anoxybacillus flavithermus* sp. nov. and production of

- thermostable α -amylase under solid-state fermentation (SSF), *Ann Microbiol*, 62:1367-1375.
- Özdemir S., Okumus, V. Ulutas M.S., Dündar A., Akarsubasi A.T., Dumontet S., 2015. "Production and characterization of thermostable α -amylase from thermophilic *Anoxybacillus flavithermus* sp. nov. SO-19", *Starch*, DOI: 10.1002/star.201500071.
- Pancha , I., Jain, D., Shrivastav, A., Mishra, S. K., Shethia, B., Mishra, S., Mohandas V. P., Jha, B., 2010. *International Journal of Biological Macromolecules*, 47, 288-291.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C.R., Soccol, V.T., Singh, D., Mohan, R., 2000. "Advances in microbial amylases". *Biotechnol. Appl. Biochem*, 31, 135–152.
- Pathak AP, Rekadwad BN., 2013. Isolation of thermophilic *Bacillus* sp. strain EF_TYK1-5 and production of industrially important thermostable α -amylase using suspended solids for fermentation. *J Sci Ind Res*. 72:685–689.
- Poli, A., Salerno, A., Laezza, G., Donato, P., Dumontet, S., Nicolaus, B., 2009. Heavy metal resistance of some thermophiles: potential use of α -amylase from *Anoxybacillus amylolyticus* as a microbial enzymatic bioassay, *Research in Microbiology*, 160, 99-106.
- Prakash, B., Vidyasagar, M., Madhukumar, M. S., Muralikrishna, G., Sreeramulu, K., 2009. Production, purification, and characterization of two extremely halotolerant, thermostable, and alkali-stable α -amylases from *Chromohalobacter* sp. TVSP 101, *Process Biochemistry*, 44, 210-215.
- Ramachandra S., Patel K.A., Nampoothiri M.K., Francis F., Nagy Y., Szakacs G., Pandey A., 2004. Coconut oil cake-a potential raw material for the production of α -amylase, *Bioresource Technology*, 39:169-174.
- Ray, R. C., Kar, S., Nayak, S., Swain, M. R., 2008. Extracellular α -amylase production by *Bacillus brevis* MTCC 7521, *Food Biotechnology*, 234-246.
- Roberts, S. M., Nakamura L. K. and Cohan, F. M., 1996. *Journal Of Systematic Bacteriology*, Vol. 46, No. 2. Apr. 1996, p. 470–475.
- Roberts, S. M., Nakamura L. K. and Cohan, F. M., 1996. *Systematic and evolutionary microbiology*, doi: 10.1099/00207713-44-2-256 IJSEM April 1994 vol. 44 no. 2 256-264.
- Roy, K. J., Rai, K. S., Mukherjee, A. K., 2012. Characterization and application of a detergent-stable alkaline α -amylase from *Bacillus subtilis* strain AS-S01a, *International Journal of Biological Macromolecules*, 50, 219-229.
- Sarikaya, E., 2000. Increase of the α -amylase yield by some *Bacillus* strains, *J. Biol*, 24, 299-308.
- Saxena, R. K., Dutt, K., Agarwal, L., Nayyar, P., 2007. A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5, *Bioresource Technology*, 98, 260-265.
- Sen, S. K., Dora, T. K., Bandyopadhyay, B., Mohapatra, P. K. D., Raut, S., 2014. Thermostable alpha-amylase enzyme production from hot spring isolates *Alcaligenes faecalis* SSB17 – Statistical optimization, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 3, 218-226.

- Shafiei, M., Ziaee, A-A., Amoozegar, M.A., 2010. Purification and biochemical characterization of a novel SDS and surfactant stable, raw starch digesting, and halophilic α -amylase from a moderately halophilic bacterium, *Nesterenkonia* sp. strain F, *Process Biochemistry*, 45, 694-699.
- Sharma, A. And Satyanarayana, T., 2011. Optimization of medium components and cultural variables for enhanced production of acidic high maltose-forming and Ca^{+2} -independent α -amylase by *Bacillus acidicola*, *Journal of Bioscience and Bioengineering* VOL. 111 No. 5, 550-553.
- Swamy, M. V. & Seenayya, G., 1996. Thermostable pullulanase and α -amylase activity from *Clostridium thermosulfurogenes* SV9 – optimization of culture conditions for enzyme production, *Process Biochemistry*, Vol. 31., No. 2., 157-162.
- Takasaki, Y., 1985. An amylase producing maltotriose from *B. subtilis*, *Agric. Biol. Chem.* 49, 1091–1097.
- Tanyıldızı, M.Ş., 2005. Çeşitli Bakteri Türleriyle Farklı Ortam Ve Çalışma Şartlarında α -Amilaz Üretiminin İncelenmesi, Doktora tezi, *Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Elazığ, 3-3, 39-39.
- Tanyıldızı, M.Ş., Özer, D., Elibol, M., 2007. Production of bacterial α -amylase by *B. amyloliquefaciens* under solid state fermentation, *Biochemical Engineering Journal*, 37, 294-297.
- Tarakçıoğlu, Y., 1979. An amylase producing maltotriose from *Bacillus subtilis*, *Agric. Biol. Chem.* 49 (4): 1901-1907.
- Tatar, S., 2007. Termofil Moderately Halofilik *Bacillus* sp. Suşlarından Amilaz Enzimi Üretimi ve Endüstriyel Kullanım Olanaklarının Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Adana, 16-16.
- Tokullugil, A., Gür, E., Dirican, M., Tuncel, P., Ulukaya, E., Özyener, F., Kurt, A., Cangül, H., 1998. Klinik Biyokimya, Bölüm 12, p. *Nobel&Güneş Tıp Kitapevi*, s. 180, 1998.
- Wang, S. L., Liang, Y. C., Liang, T. W., 2011. Purification and characterization of a novel alkali-stable α -amylase from *Chryseobacterium taeanense* TKU001, and application in antioxidant and prebiotic, *Process Biochemistry*, 46, 745-750.
- Windish, W. W., Mhatre, N. S., 1965. Microbial Amylase, *Adv. Appl. Microbiol.*, 7, 273-304.
- Wiseman, A. 1987. Handbook of enzyme biotechnology. Second Edition. Chapter 3. *The application of enzymes in industry*, pp.274-373.
- Zafar, A., Aftab, M.N., Ud Din, Z., Aftab, S., Iqbal, I., Ul Haq, I. 2015. Cloning, Purification and Characterization of a Highly Thermostable Amylase Gene of *Thermotoga petrophila* into *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.* 2, 1–18.
- Zhang, C., Diao, H., Lu, F., Bie, X., Wang, Y., Lu, Z., 2012. Degradation of triphenylmethane dyes using a temperature and pH stable spore laccase from a novel strain of *Bacillus vallismortis*, *Bioresource Technology*, 126, 80-86.
- Zhao, Z., Wang, Q., Wang, K., Brian, K., Liu, C., Gu, Y., 2010. Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 in vitro and identification of its antifungal components, *Bioresource Technology*, vol. 101, no. 1, pp. 292-297.

Url-1 <<http://www.boulangerie.net/forums/bnweb/dt/ensymes/ensymes3.php> >, [Ziyaret Tarihi: 02 Mart 2015].

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı Adem KARAKAYA
Doğum Yeri ve Tarihi Keşap 1981
Telefon 05053162401
E-posta karakayaadem@mynet.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Bafra Sağlık Meslek Lisesi, Bafra, Samsun	1999
Üniversite	: Siirt Üniversitesi, Merkez, Siirt	2013
Yüksek Lisans	: Siirt Üniversitesi, Merkez, Siirt	2016
Doktora	: -	

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2001-2002	Siirt Merkez Sağırsu Sağlık Ocağı	Sağlık Mem
2002-2003	Siirt Merkez Bahçelievler Sağlık Ocağı	Sağlık Mem
2003-2013	Siirt Devlet Hastanesi	Sağlık Mem
2013-2015	Siirt Merkez Toplum Sağlığı Merkezi	Sağlık Mem
2015-	Siirt Halk Sağlığı Laboratuvarı	Biyolog

UZMANLIK ALANI

Mikrobiyal Enzim Biyoteknolojisi

YABANCI DİLLER

İngilizce