

T.C.  
DİCLE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KATI FAZ FERMANTASYON (SSF) TEKNİĞİ İLE *Bacillus licheniformis*  
ATCC 14580 'DEN  $\alpha$ -AMİLAZ ÜRETİMİ

Emrah Demiray

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN: Doç. Dr. Fikret UYAR

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR  
Haziran 2013

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca maddi ve manevi her türlü desteğini benden esirgemeyen, engin bilgisi ve örnek kişiliğı ile yoluma ışık tutan değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Fikret UYAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında yoğun emek ve zaman harcayan, bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren ikinci danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Cem ÖZİÇ'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında her daim bilgisine başvurduğum, gerek bilgi birikimi gerekse de yardımlarını benden esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Nurullah AKCAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasındaki desteklerinden dolayı değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Zübeyde BAYSAL ve Sayın Prof. Dr. Murat BİRİCİK'e teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca yardımlarını benden esirgemeyen, karşılaştığım zorlukları aşmamda değerli zamanını benim için cömertçe harcayan ve benimle birlikte mücadele eden değerli dostum Hüsamettin AYGÜN'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında hep yanımda olan ve varlığı ile bana güç veren değerli arkadaşım Alevcan KAPLAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Yaşadığım her türlü sıkıntıda yanımda olan, hiçbir zaman desteklerini benden esirgemeyen ve varlıkları ile bana güç katan biricik aileme ve değerli dostlarıma sevgi, saygı ve şükranlarımı sunarım.

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR .....	I
İÇİNDEKİLER .....	II
ÖZET .....	V
ABSTRACT .....	VI
ÇİZELGE LİSTESİ .....	VII
ŞEKİL LİSTESİ .....	VIII
KISALTMA VE SİMGELER .....	IX
1. GİRİŞ .....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ .....	5
2.1. Genel Bilgiler .....	5
2.2. $\alpha$ -Amilaz .....	5
2.2.1. $\alpha$ -Amilazın karakteristik özellikleri .....	6
2.2.2. $\alpha$ -Amilazların Endüstrideki Kullanım Alanları .....	7
2.2.2.1. $\alpha$ -Amilazın Tekstil Sanayinde Kullanımı .....	8
2.2.2.2. $\alpha$ -Amilazın Deterjan Sanayinde Kullanımı .....	8
2.2.2.3. $\alpha$ -Amilazın Fırıncılıkta Kullanımı .....	8
2.2.2.4. $\alpha$ -Amilazın Kağıt Sanayinde Kullanımı .....	8
2.2.2.5. $\alpha$ -Amilazın Alkol Üretiminde Kullanımı .....	9
2.2.2.6. $\alpha$ -Amilazın Nişastanın Sıvılaştırılmasında Kullanımı .....	9
2.3. Nişasta .....	10
2.3.1. Nişastayı Parçalayan Enzimler .....	13
2.4. SSF'in Tarihçesi .....	14
2.4.1. SSF'in SmF'e Göre Avantajları ve Dezavantajları .....	15
2.5. <i>Bacillus</i> Cinsi .....	16
2.5.1. <i>Bacillus licheniformis</i> .....	16
2.6. Önceki Çalışmalar .....	17

<b>3.</b>	<b>MATERYAL ve METOT</b>	23
3.1	Biyolojik Materyal	23
3.2	Kimyasal Maddeler	23
3.2.1.	Azot Kaynakları	23
3.2.2.	Karbon Kaynakları	23
3.2.3.	Metal İyonları	23
3.2.4.	Deterjanlar	23
3.3.	Besi yerleri	23
3.3.1.	Katı Besiyeri	23
3.3.2.	Sıvı Besiyeri	24
3.3.2.1.	Nutrient Broth (NB) Besiyeri	24
3.3.2.2	Luria Broth (LB) Besiyeri	24
3.3.3.	SSF Besiyeri	24
3.4.	Çözeltiler	24
3.4.1.	Tampon Çözelti	24
3.4.2.	Nişastanın Hazırlanması	24
3.4.3.	Bernfeld Reaktifinin Hazırlanması	25
3.5.	Kullanılan Cihazlar	25
3.6.	Bakteri Üretimi	25
3.7.	SSF Besiyerinde Enzim Üretimi	26
3.8.	Enzim Aktivite Tayini	26
3.8.1.	$\alpha$ -Amilaz Aktivite Tayini	26
3.9.	$\alpha$ -Amilaz Üretimi Üzerine Farklı Parametrelerin Etkisinin İncelenmesi	26
3.9.1.	Optimum Substratın Belirlenmesi	26
3.9.2.	Optimum İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi	26
3.9.3.	Optimum İnkübasyon Sıcaklığının Belirlenmesi	27
3.9.4.	Optimum Ekstraksiyon Ortamının Belirlenmesi	27
3.9.5.	Optimum pH'nin Belirlenmesi	27

3.9.6.	Optimum Aktivite Sıcaklığının Belirlenmesi...	27
3.9.7.	Uygun Ekim Miktarının Belirlenmesi .....	27
3.9.8.	$\alpha$ -Amilaz Aktivitesi için Uygun Çalkalama Hızının Belirlenmesi .....	28
3.9.9.	$\alpha$ -Amilaz Üretimi Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisinin İncelenmesi.....	28
3.9.10.	$\alpha$ -Amilaz Üretimi Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisinin İncelenmesi.....	28
3.9.11.	$\alpha$ -Amilaz Üretimi Üzerine Metal Tuzlarının Etkisinin İncelenmesi.....	28
<b>4.</b>	<b>BULGULAR</b> .....	<b>29</b>
<b>5.</b>	<b>TARTIŞMA ve SONUÇ</b> .....	<b>39</b>
<b>6.</b>	<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>45</b>
	<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>55</b>

## ÖZET

KATI FAZ FERMANTASYON (SSF) TEKNİĞİ İLE *Bacillus licheniformis* ATCC 14580'den  $\alpha$ -AMİLAZ ÜRETİMİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Emrah DEMİRAY

DİCLE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2013

Enzimler; biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen makromoleküllerdir. Bitkisel ve hayvansal kaynakların yanı sıra mikroorganizmalardan elde edilirler. Endüstride kullanılan enzimler genellikle mikroorganizma kaynaklıdır. Mikroorganizma kaynaklı enzimlerin daha fazla tercih edilmelerinin sebebi; bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, yan ürün oluşturmaması, daha stabil ve ucuz olması, kültür ortamında kolay çoğalmaları, fazla miktarda elde edilebilmesi gibi avantajlara sahip olmalarıdır. Bioteknolojik uygulamaların gelişimine paralel olarak enzimlerin kullanım alanları ve endüstriyel önemleri de gün geçtikçe artmaktadır. Enzimler günümüzde gıda, tekstil, içecek, deterjan sanayi ve sağlık sektörü gibi pek çok alanda kullanılırlar. Enzimlerin küresel pazardaki payı her geçen gün artmakta olup 2015 yılında yaklaşık olarak 4 milyar doları bulacağı tahmin edilmektedir.

Çalışmamızda katı faz fermentasyonu (SSF) tekniği ile *Bacillus licheniformis* ATCC 14580'den  $\alpha$ -amilaz üretimi üzerine çeşitli parametrelerin etkisini araştırarak optimum koşulları belirlemeye çalıştık. SSF besiyeri için pirinç kabuğu, buğday kepeği, arpa kabuğu, mercimek kabuğu, pamuk sapı ve öğütülmüş mısır küspesi katı substrat olarak kullanıldı. En iyi aktivite pirinç kabuğunda elde edildiğinden sonraki çalışmalarımızda katı substrat olarak pirinç kabuğu kullanıldı.  $\alpha$ -Amilaz için en iyi inkübasyon süresinin 48. saat olduğu tespit edildi. Maximum  $\alpha$ -amilaz aktivitesi sırasıyla pH: 7.0'de ve 37°C'de tespit edildi. İnokülüm hacmi 2 ml olarak belirlendi. Bunun yanı sıra  $\alpha$ -amilaz için optimum aktivite sıcaklığı 70°C, optimum çalkalama hızı 120 rpm, optimum substrat miktarı 3 gr, uygun ekstraksiyon ortamı % 0.5 NaCl olarak belirlendi. Farklı azot ve karbon kaynaklarının enzim üretimi üzerine etkisi incelendi. Amonyum sulfat, amonyum nitrat, amonyum klorür ve triptonun enzim üretimini eser miktarda azalttığı, kazein, pepton, yeast ekstrakt ve beef ekstraktın da enzim üretimini ciddi oranda azalttığı tespit edildi. Karbon kaynaklarından ise laktozun enzim üretimini % 50 civarında inhibe ettiği, bunun yanı sıra fruktoz, glukoz, galaktoz, maltoz ve sukrozun ise enzim üretimini büyük ölçüde inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bazı metal tuzlarının enzim üzerindeki etkisine bakıldı. MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O'nun enzim üretimini arttırdığı, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O , ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ve CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O'nun üretimi güçlü bir şekilde inhibe ettiği tespit edildi. Ayrıca CaCl<sub>2</sub>'nin de enzim üretimini hafif ölçüde azalttığı tespit edildi.

**Anahtar Kelimeler:** *Bacillus licheniformis*,  $\alpha$ -Amilaz, Bioteknoloji, Katı Faz Fermantasyonu (SSF), Pirinç Kabuğu

## ABSTRACT

$\alpha$ -AMYLASE PRODUCTION from *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 with SOLID STATE FERMENTATION (SSF)

MSc THESIS

Emrah DEMİRAY

UNIVERSITY OF DICLE  
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES  
DEPARTMENT OF BIOLOGY

2013

Enzymes are macromolecules which catalyze biochemical reactions. They are derived from vegetable, animal or microorganismal sources. Microorganism-derived enzymes are mostly used in industry; they are preferred to vegetable or animal-derived enzymes because of their advantages including having considerably higher catalytic activity, not producing by-products, being relatively cheaper and more stable and being obtained abundantly. Correspondingly to the development of biotechnological applications, importance of enzymes increase along with their usage in industry. Enzymes are currently used in several areas such as food, textile, beverage, and detergent industries, as well as in health sector. The share of enzymes in the market is on the increase globally, predicting an amount of about 4 billions USD in 2015.

In this research, effects of various parameters on  $\alpha$ -amylase production of *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 have been studied using the solid state fermentation (SSF) method in order to determine the optimum conditions. Rice husk, wheat bran, barley cereal, lentils shell, cotton stalk and crushed maize pulp were separately used as solid substrates for SSF medium. As the best result was obtained with rice husk in early trials, this material was used as solid substrate for subsequent experiments. The best incubation time has been determined as 48<sup>th</sup> hour. Maximum  $\alpha$ -amylase production was determined with pH 7.0 at 37°C. Inoculum volume was found to be 2 mL. Additionally, 70°C of activity temperature, 120 rpm of shaking speed, 3 g of substrat, and % 0.5 of NaCl as extraction medium were determined as optimal values for  $\alpha$ -amylase. Effects of various nitrogen and carbon sources on the enzyme production were examined: casein, pepton, yeast extract and beef extract significantly reduced enzyme production, while ammonium sulfate, ammonium nitrate, ammonium chloride, and tripton caused a minor reduction. As carbon sources, fructose, glucose, galactose, maltose and sucrose markedly inhibited enzyme production, and inhibitor reached to about 50% when lactose was used. Effects of some metal ions were also examined: MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O caused an increase in the enzyme production, while ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O and CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O were strong inhibitors. In addition, It was detected that CaCl<sub>2</sub> also slightly reduced the enzyme production.

**Key Words:** *Bacillus licheniformis*,  $\alpha$ -Amylase, Biotechnology, Solid State Fermentation (SSF), Wheat Brean

## ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge No</u>		<u>Sayfa No</u>
<b>Çizelge 1.1.</b>	Mikrobiyal enzimler ve kullanım alanları	3
<b>Çizelge 4.1.</b>	Enzim üretimi üzerine substratın etkisi	29
<b>Çizelge 4.2.</b>	$\alpha$ -Amilaz üretimi üzerine ekstraksiyon ortamının etkisi	32
<b>Çizelge 4.3.</b>	Enzim üretimi üzerine azot kaynaklarının etkisi	35
<b>Çizelge 4.4.</b>	Enzim üretimi üzerine karbon kaynaklarının etkisi	36
<b>Çizelge 4.5.</b>	Enzim üretimi üzerine metal tuzlarının etkisi	37



## ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil No</u>		<u>SayfaNo</u>
Şekil 2.1.	$\alpha$ -Amilazın nişastayı hidrolizi.	6
Şekil 2.2.	$\alpha$ -Amilaz ailesi enzimlerinin katalitik aktif bölgesi ve enzimlerin substrata etki mekanizmasının genel şeması	7
Şekil 2.3.	İdeal yöntem ve geleneksel yöntemle nişasta sıvılaştırma basamakları	10
Şekil 2.4.	a) Amilozun kimyasal yapısı b) Amilopektinin $\alpha$ -1,6 dallanma noktasının kimyasal görünümü c) Amiloz ve Amilopektinin nişasta granülleri şeklindeki konfigürasyonunun hipotetik gösterimi	12
Şekil 2.5.	Amilolitik enzimler tarafından nişastanın degradasyonu	13
Şekil 2.6.	<i>Bacillus licheniformis</i> 'in elektron mikroskopundaki görünümü	17
Şekil 4.1.	$\alpha$ -Amilaz üretimi üzerine inkübasyon süresinin etkisi	30
Şekil 4.2.	$\alpha$ -Amilaz üretimi üzerine inkübasyon sıcaklığının etkisi	31
Şekil 4.3.	$\alpha$ -Amilaz üretimi üzerine başlangıç pH'sının etkisi	32
Şekil 4.4.	$\alpha$ -Amilaz için optimum aktivite sıcaklığı	33
Şekil 4.5.	$\alpha$ -Amilaz için uygun ekim miktarı	34
Şekil 4.6.	$\alpha$ -Amilaz için optimum çalkalama hızı	34
Şekil 4.7.	$\alpha$ -Amilaz için uygun substrat miktarı	37

## KISALTMA VE SİMGELER

CaCl <sub>2</sub>	:	Kalsiyum klorür
CuSO <sub>4</sub>	:	Bakır sülfat
CGM	:	Corn Gluten Meal
DNS	:	Dinitrosalisilik asit
DCA	:	Deoksikolik asit
FeSO <sub>4</sub>	:	Demir sülfat
LB	:	Luria Broth
MgSO <sub>4</sub>	:	Magnezyum sülfat
NaCl	:	Sodyum klorür
NaOH	:	Sodyum hidroksit
NB	:	Nutrient Broth
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	:	Amonyum nitrat
RH	:	Rice Husk
RSM	:	Response Surface Methodology
SDS	:	Sodyum Dodesil Sülfat
SmF	:	Submerged Fermentation
SSF	:	Solid State Fermentation
WB	:	Wheat Bran
YE	:	Yeast Extract
ZnSO <sub>4</sub>	:	Çinko sülfat

## 1. GİRİŞ

Endüstriyel açıdan önemi bulunan pek çok reaksiyon, biyolojik ortamlarda çok daha ılımlı koşullarda gerçekleşmektedir. Bu da uygun reaksiyon koşulları yaratmada kilit rol onayan enzimlerin endüstride kullanımını kaçınılmaz kılmıştır. Biyokimyasal reaksiyonları hızlandıran, genel olarak protein yapısında olan ve organizmadaki biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen biyolojik makromoleküllere enzim denir (Telefoncu 1997). Enzimlerin endüstride kullanılması ile yüksek basınç ve sıcaklık gibi enerji gerektiren koşulların ortadan kalkması ekonomik açıdan yarar sağlamaktadır (Çetin 1983). Dünya genelinde endüstriyel enzim pazarı 1,4 milyar USD dolayında olup, yılda % 10'un üzerinde pazar ağı artışı ve % 4-5 oranında satış artışı ile en yaygın tüketim alanlarından. Endüstriyel enzim üretiminin % 75'i gıda, deterjan ve nişasta endüstrileri içerisinde yer almaktadır (Cowan 1996). Ticari olarak kullanılan enzimlerin % 59'unu proteazlar, % 28'ini karbohidrazlar, % 3'ünü lipazlar ve % 10'unu ise diğer enzimler oluşturmaktadır. Karbohidrazlar grubuna giren  $\alpha$ -amilaz üretimi % 13 ile önemli bir yer tutmaktadır (Wiesman 1987, Kıran ve ark. 2006).

Endüstride kullanılan en önemli ham materyallerden biri nişastadır. Nişasta bitkilerde depo polisakkarit formunda bol miktarda bulunmaktadır ve yiyecek endüstrisinde geniş çapta kullanılan glukoz, fruktoz ve maltoz içeren şurupların üretimi için oldukça ucuz bir kaynaktır. Nişasta granüllerinde moleküller iç ve ara moleküler bağlar ile polikristalin fazda yoğun bir şekilde paketlenmiştir. Bu yüzden soğuk suda çözünmez. Sıklıkla kimyasallara ve enzimlere karşı dirençlidir (Goyal ve ark. 2005).

Doğal (ham) nişastayı sindiren amilazlar yiyecek ve meyve suyu endüstrileri için ticari açıdan önemli enzimlerdir. Doğal nişastayı sindiren amilazlar fungus, (Abe ve ark. 1988; Morita ve Fukuoka 1997; Marlida ve ark. 2000; Matsubara ve ark. 2004) bakteri (Hayashida ve ark. 1988; Lin ve ark. 1998) ve mayalardan (Nagasaka ve ark. 1995) elde edilmişlerdir.

Nişastanın hidrolizinde merkezi bir rol üstlenen amilazlar; nişastanın glikoz, maltoz, maltotrioz, oligosakkarit (alfa-limit dekstrin) ve alfa 1-6 glikozidik bağları gibi ürünlere parçalanmasını sağlayan büyük öneme sahip hidrolitik enzimlerdir (Gupta ve ark. 2003, Taniguchi ve Honnda 2009).  $\alpha$ -Amilazlar düz amiloz molekülü ve dallanmış

## 1. GİRİŞ

---

amilopektin molekülündeki  $\alpha$ -1,4 glikozidik bağlarını parçalayan ekstraselüler enzimlerdir (Kandra 2003, Vishnu ve ark. 2006).

Amilaz, proteaz, lipaz gibi endüstriyel açıdan önemli enzimlerin üretiminde Derin Kültür Fermentasyonu (SmF) olarak adlandırılan sıvı süspansiyonlar kullanılmaktadır. Ancak bugüne kadar teşhis edilen mikroorganizmaların yaklaşık olarak % 99' unun yaşamlarını sürdürdükleri doğal ortamlarda serbest su bulunmamaktadır (Hölker ve ark. 2004). SmF tekniği ile yapılan üretimlerde mikroorganizmalara doğal ortamları sağlanmış olmayabilir ve metabolik verimlilikleri de olumsuz bir şekilde etkilenebilir. Katı substrat fermantasyonu (SSF), SmF' e alternatif olan enzim üretim tekniğidir. SSF serbest suyun yokluğunda nemli katı materyaller üzerinde mikroorganizmaların büyümesi olarak tanımlanmaktadır. Bu fermentasyon sisteminde su miktarı SmF'e göre çok azdır. Bu yüzden mikroorganizmaların adapte olduğu doğal ortamları sağlanmış olmaktadır (Perez-Guerra ve ark. 2003).

Çizelge 1.1. Mikrobiyal enzimler ve kullanım alanları (Madigan ve ark. 2011).

<b>Enzim</b>	<b>Mikrobiyal Kaynak</b>	<b>Kullanım Alanı</b>	<b>Sanayi</b>
Amilaz	Mantar	Ekmek yapımı	Fırıncılık
	Bakteri	Nişasta ile kaplama	Kağıt Sanayi
	Mantar	Şurup, Glukoz üretimi	Gıda Sanayi
	Bakteri	Haşıl sökme	Tekstil Sanayi
	Bakteri	Leke giderici	Deterjan Sanayi
Proteaz	Mantar	Ekmek yapımı	Fırıncılık
	Bakteri	Leke giderici	Kuru temizleme
	Bakteri	Yaraların temizlenmesi	Tıp
	Bakteri	Haşıl sökme	Tekstil Sanayi
	Bakteri	Leke giderici	Deterjan Sanayi
Rennin	Mantar	Sütün pıhtılaştırılması	Peynir yapımı
Selülaz	Bakteri	Kumaş yumuşatıcısı, parlatıcı,	Deterjan Sanayi
Lipaz	Mantar	Yağların parçalanması	Mandıra Deterjan Sanayi
Laktaz	Mantar	Laktozun parçalanması	Mandıra Gıda Sanayi
DNA polimeraz	Bakteri, Arke	PCR yöntemi ile DNA replikasyonu	Biyolojik araştırmalar Adli Tıp



## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

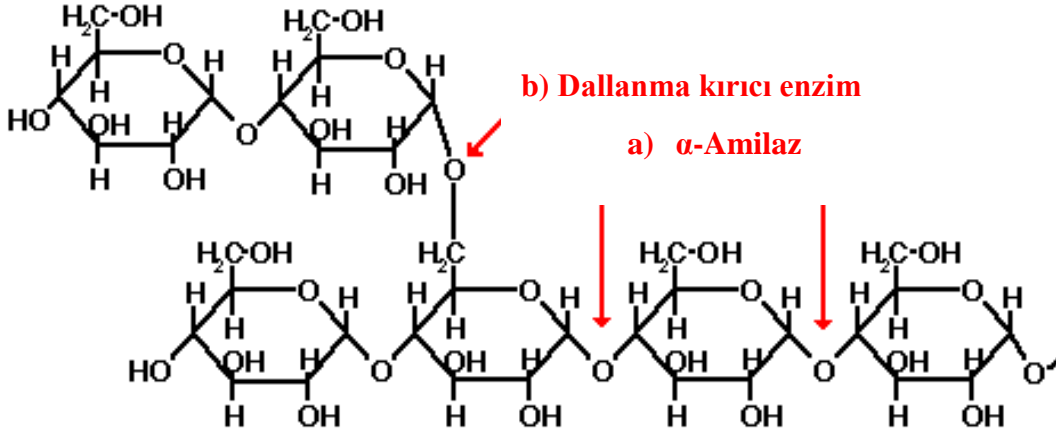
### 2.1. Genel Bilgiler

### 2.2. $\alpha$ -Amilaz

Amilazların tarihi 1811 yılında Kirchoff tarafından nişasta parçalayıcı enzimlerin bulunması ile başlamaktadır. Buna ek olarak Leuchs 1831 yılında benzer etkiyi insan tükürüğü ile elde edilebileceğini göstererek sürdürmüştür. Bernfeld (1955) tükürüğün bu özelliğine Berzelius tarafından pityalin adının verildiğini, 1833' te Payen ve Persoz'un ise maltta nişastayı parçalayan bir maddenin varlığını ortaya çıkardıklarını ve buna da diastaz adını verdiklerini belirtmektedir. 1895'te Beijerinck' in önerisinden bu yana tüm nişasta parçalayan enzimler amilazlar olarak adlandırılmıştır (Anonymous 1988).

$\alpha$ -Amilaz ticari olarak kullanılan ilk enzimdir (Bernfeld 1955, Sarıkaya 1995). Amilazlar nişastayı hidroliz ederek dekstrin, oligosakkarid ve glukoz molekülleri gibi ürünlere parçalayan endüstriyel öneme sahip hidrolitik enzimler sınıfında yer almaktadır. Amilazlar nişastadaki mevcut glikozidik bağlarını parçalama durumuna göre endoamilazlar ve ekzoamilazlar olmak üzere iki gruba ayrılır. Endoamilaz (iç taraftan etkiyen) grubunda yer alan  $\alpha$ -amilaz (E.C 3.2.1.1;  $\alpha$ -1,4 glukon, glukonhidrolaz) çok kullanılan bir hidrolaz olup nişastanın linear zincirini oluşturan amiloz zinciri içindeki komşu 1,4- $\alpha$ -D-glukozidik bağları rastgele yerlerden kırar. Ekzoamilaz (dış taraftan etkiyen) grubunda yer alan  $\beta$ -amilaz (E.C 3.2.1.2;  $\alpha$ -1,4 glukonmalthidrolaz) nişastanın indirgen olmayan ucundan başlayarak glikozoidik bağları parçalar (Pandey 1999, Taniguchi ve Honda 2009).

$\alpha$ -Amilaz iç etkili bir enzimdir. Rastgele biçimde nişasta polimerlerinin iç kısmındaki zincirleri hidrolizler; dallanmış ve doğrusal oligosakkaritlerin oluşumuna yol açar (Crabb ve Mitchinson 1997).  $\alpha$ - Amilaz enziminin hidrolizi ile serbest bırakılan hemiasetal grupları  $\alpha$ -optik konformasyona sahip olduklarından bu enzimlere yaygın olarak  $\alpha$ -amilaz denilmektedir (Windish ve Mhatra 1965).



Şekil 2.1.  $\alpha$ -Amilazın nişastayı hidrolizi (Anonim)

Çeşitli mikroorganizmalardan elde edilen, doğal nişastayı direk hidroliz edebilen  $\alpha$ -amilazların pH, sıcaklık, molekül ağırlığı, termostabilitesi ve diğer fiziko kimyasal parametreleri farklılık ve benzerlik göstermektedir.

Doğal nişastayı hidrolizleyen  $\alpha$ -amilazların aynı zamanda nişastayı adsorblama yeteneğine sahip olduğu farklı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Lin ve ark. 1998; Goyal ve ark. 2005). Enzimin doğal nişastayı hidrolizi ile nişastaya tutunması arasında doğru orantı vardır ama nişasta granüllerine tutunma mekanizması hala tam olarak belli değildir. Bazı araştırmacılar bunun muhtemelen enzimin sahip olduğu C-terminal bağlayıcı domain sayesinde olabileceğini açıklamışlardır (Sarıkaya ve ark. 2000).

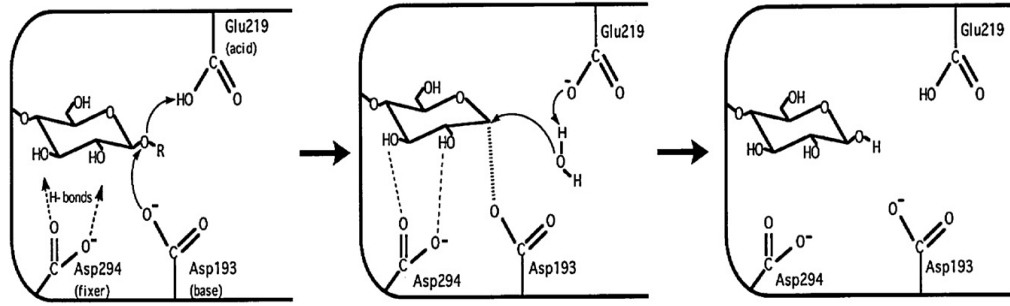
### 2.2.1. $\alpha$ -Amilazların Karakteristik Özellikleri

$\alpha$ -Amilazlar, amiloz, amilopektin, siklodekstrin, glikojen ve maltotrioz gibi diğer substratlarla kıyaslandığında en yüksek özgünlüğü nişastaya karşı göstermektedir (Winkelmann ve ark. 1992). pH 2- 12 gibi geniş bir aralıkta aktivite gösterebilen birçok  $\alpha$ -amilazın optimal pH'sı asidik ve nötral aralıklardadır (Vihinen ve Mantsala 1989). Bununla birlikte bilinen asit- stabil amilazların bir çoğunda termostabilite eksiktir. Bu da nişasta endüstrisi için önemli bir kısıtlamadır dolayısıyla son dönemdeki çalışmalar asidik şartlarda yaşayabilen termostabil mikroorganizmaların izolasyonu üzerine yoğunlaşmaktadır (Pandey ve ark. 2000). Mikrobial  $\alpha$ -amilazların molekül ağırlığı 12.5-160 kDa arasında değişmektedir (Sharma ve Satyanarayana 2013).



Sülfidril grup reaktanları, p-hidroksimerküribenzoik asit, iyodoasetat, EDTA ve ağır metal iyonları  $\alpha$ -amilazı inhibe eder. Birçok  $\alpha$ -amilaz  $Hg^{2+}$  tarafından inhibe edilir.  $Hg^{2+}$  indol halkalarını okside eder ve triptofan gibi aromatik halkalar ile etkileşime girer (Hamilton ve ark. 1999).

Çeşitli kasyonlar, substratlar ve diğer stabilizörler  $\alpha$ -amilazların termostabilitesini etkiler.  $\alpha$ -Amilazlar  $Ca^{2+}$  iyonuna yüksek affinitesi olan enzimlerdir.  $Ca^{2+}$  iyonları birçok  $\alpha$ -amilazın aktivitesini ve termal stabilitesini değiştirir ve bu enzimlerin termal stabiliteyi genelde  $Ca^{2+}$  iyonunun varlığında artırır. EDTA ile  $Ca^{2+}$  iyonları uzaklaştırılıp bu iyonların tekrar ortama eklenmesi ile enzimin aktivitesi artırılıp azaltılabilir. Bununla birlikte aktivitesi ve stabilitesi  $Ca^{2+}$  iyonlarına ihtiyaç duymayan asit-stabil  $\alpha$ -amilazların varlığı da rapor edilmiştir (Vihinen ve Mantsala 1989; Dong ve ark. 1997; Khajeh ve ark. 2010).



Şekil 2.2.  $\alpha$ -Amilaz ailesi enzimlerinin katalitik aktif bölgesi ve enzimlerin substrata etki mekanizmasının genel şeması (Hasegawa ve ark. 1999).

### 2. 2. 2. $\alpha$ -Amilazların Endüstrideki Kullanım Alanları

$\alpha$ -Amilaz ticari olarak kullanılan ilk enzimdir (Kıran ve ark. 2006). Amilazlar nişastayı temel alan endüstriler için en önemli enzimler arasındadır. Günümüzde amilazlar gıda, deterjan, tekstil, kağıt ve ilaç sanayi gibi endüstriyel alanlarda sıkça kullanılmaktadır (Gupta ve ark. 2003, Gangadharan ve ark. 2008, Mukherjee ve ark. 2009). Bu anlamda mikrobiyal amilazlar nişastayı temel alan endüstrilerde neredeyse tamamen kimyasal hidrolizlerin yerini almıştır (Gupta ve ark. 2003, Kunamneni ve ark. 2005).

### 2.2.2.1. $\alpha$ -Amilazın Tekstil Sanayinde Kullanımı

Tekstil endüstrisinde dokuma sırasında ipliklerin sağlam ve düzgün olması ve kopmaması için iplikler, nişasta içeren bir çözelti ile muamele edilmektedir. Haşılama adı verilen bu işlemde sonra kumaştaki fazla nişastanın uzaklaştırılması gerekir. Bunun için kumaş dokunduktan sonra haşıl alma ajanı olarak da  $\alpha$ -amilaz kullanılmaktadır (Kıran ve ark. 2006).

### 2.2.2.2. $\alpha$ -Amilazın Deterjan Sanayinde Kullanımı

1975'ten beri toz halindeki deterjanlara katılmakta olan  $\alpha$ -amilaz günümüzde bütün sıvı deterjanların % 90'ında bulunmaktadır ve son zamanlarda bulaşık makinesi deterjanlarına da katılmaktadır (Gupta ve ark. 2003). Son yıllarda özellikle kuru temizleme gibi yeni alanlarda da giderek artan şekilde kullanım alanı bulmuştur. Nötrofilik özelliğe sahip amilazlar genel olarak pH 5.0-7.5 aralığında aktivite gösterirken, özellikle deterjan sanayisinde kullanılan amilazlar pH 8.0-11.0 aralığında aktivite göstermekte olup, alkalifilik *Bacillus* türlerinden izole edilmektedirler (Igarashi ve ark. 1998).

### 2.2.2.3. $\alpha$ -Amilazın Fırıncılıkta Kullanımı

Uzun yıllardan beri mikrobiyal  $\alpha$ -amilazlar fırıncılıkta yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu enzimler ekmeğin daha hacimli olmasını, daha güzel kızarmasını ve daha yumuşak olmasını sağlar.  $\alpha$ -Amilaz yalnızca fermantasyon oranını arttırmaz aynı zamanda hamurun vizkozitesinin düşürülmesini de sağlar. Geleneksel olarak ekmek ürünlerinin bayatlamasını engellemek, tat ve yapı kalitesini arttırmak için çeşitli katkı maddeleri kullanılmaktadır. Son zamanlardaki araştırmalar  $\alpha$ -amilaz, dallanma enzimleri ve dallanma yapmayan enzimler, maltogenik amilazlar,  $\beta$ -amilazlar, amiloglukosidazların kullanımları üzerine yoğunlaşmıştır (Gupta ve ark. 2003).

### 2.2.2.4. $\alpha$ -Amilazın Kağıt Sanayinde Kullanımı

Kağıt kaplama amacıyla kağıdın nişasta ile muamele edilmesi gerekir. Kağıdın nişasta ile kaplanması, kağıdı işlem sırasında mekaniksel etkilere karşı korumakla kalmayıp aynı zamanda kağıdın sertliği, direnci ve kalitesinin de artması sağlanmış olur.

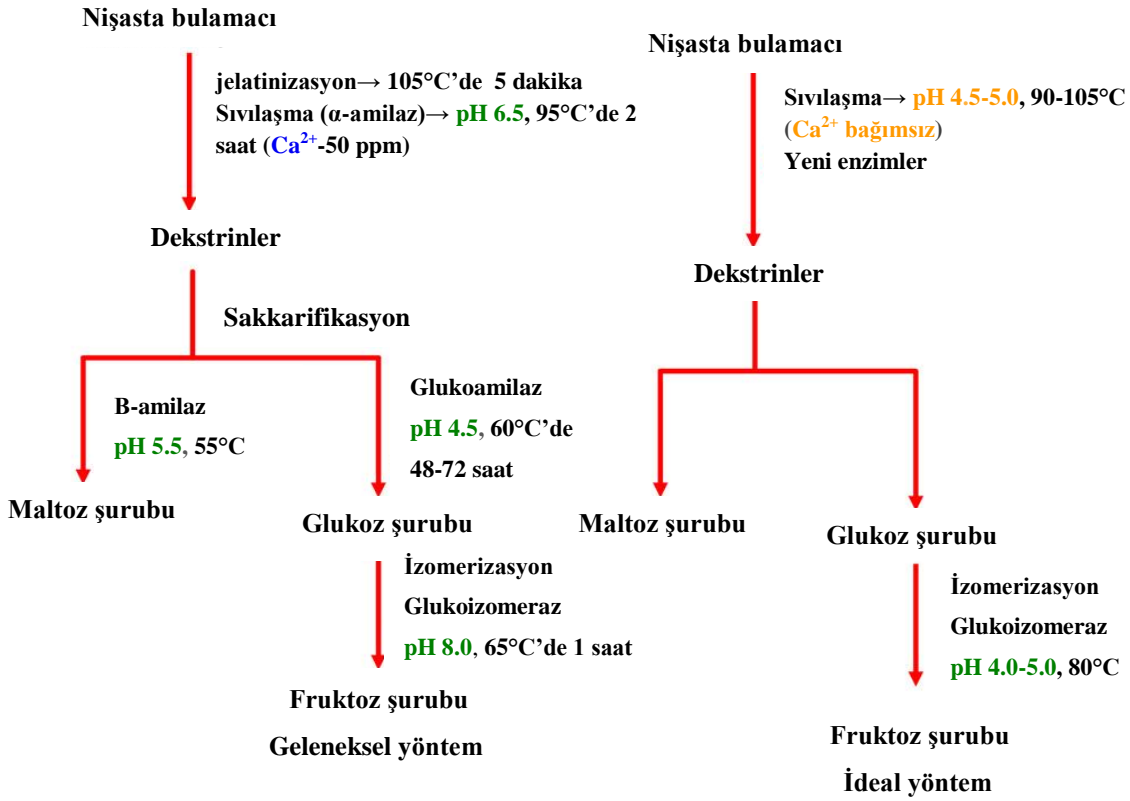
Kağıtla muamele edilen fazla nişastalar enzim yardımıyla ortamdaki uzaklaştırılır (Gupta ve ark. 2003).

#### **2.2.2.5. $\alpha$ -Amilazın Alkol Üretiminde Kullanımı**

Bira teknolojisinde üretim sürecini kısaltmak, yatırım ve işçilik giderlerini en az düzeye indirmek bu sektörde enzim kullanımının esas amacını oluşturmaktadır. Bu amaçla en çok alfa amilaz ve proteazlardan yararlanılmaktadır (Dönmez 1986). Alkol üretiminde hammadde olarak kullanılan nişastalı materyaller  $\alpha$ -amilaz ve amiloglukozidaz enzimleri ile muamele edilmektedir. Nişasta yeterince parçalandıktan sonra ortama maya aşılansarak fermantasyon işlemine geçilmektedir (Sarıkaya 1995).

#### **2.2.2.6. $\alpha$ -Amilazın Nişastanın Sıvılaştırılmasında Kullanımı**

Piyasada bulunan birçok ürün için kullanılan  $\alpha$ -amilazlar nişastanın glukoz, fruktoz ve maltoza dönüştürülmesini sağlarlar. Nişastanın sıvılaştırılmasında yüksek oranda termostabil  $\alpha$ -amilazlar kullanılır (Gupta ve ark. 2003, Aiyer 2005).  $\alpha$ -Amilazların en önemli pazarı, glukoz ve fruktozdur. Nişasta yüksek fruktoz şuruplarına dönüştürülmektedir. Bunlar yüksek tatlandırıcı özelliklerinden dolayı alkolsüz içecek endüstrisinde fazla miktarlarda kullanılmaktadırlar. Ayrıca alkol fermantasyonu için nişastanın sıvılaştırılması ve şekerleşmesi için yüksek sıcaklıklarda aktif bir termostabil  $\alpha$ -amilaz kullanımına gereksinim duyulmaktadır. Meyve suyu endüstrisinde de, özellikle elma ve armut meyve sularının berraklaştırılmasında kullanılmaktadır. Meyveler tam olgunlaşmadan toplandığında meyvede bulunan nişastadan dolayı meyve suyunda bulanıklık oluşmaktadır. Bu sorun, ortama  $\alpha$ -amilaz ilave edilerek çözülmektedir (Ekşi 1988, Gupta ve ark. 2003, Pandey ve ark. 2005).



Şekil 2. 3. İdeal yöntem ve geleneksel yöntemle nişasta sıvılaştırma basamakları (Sharma ve Satyanarayana 2013).

### 2.3. Nişasta

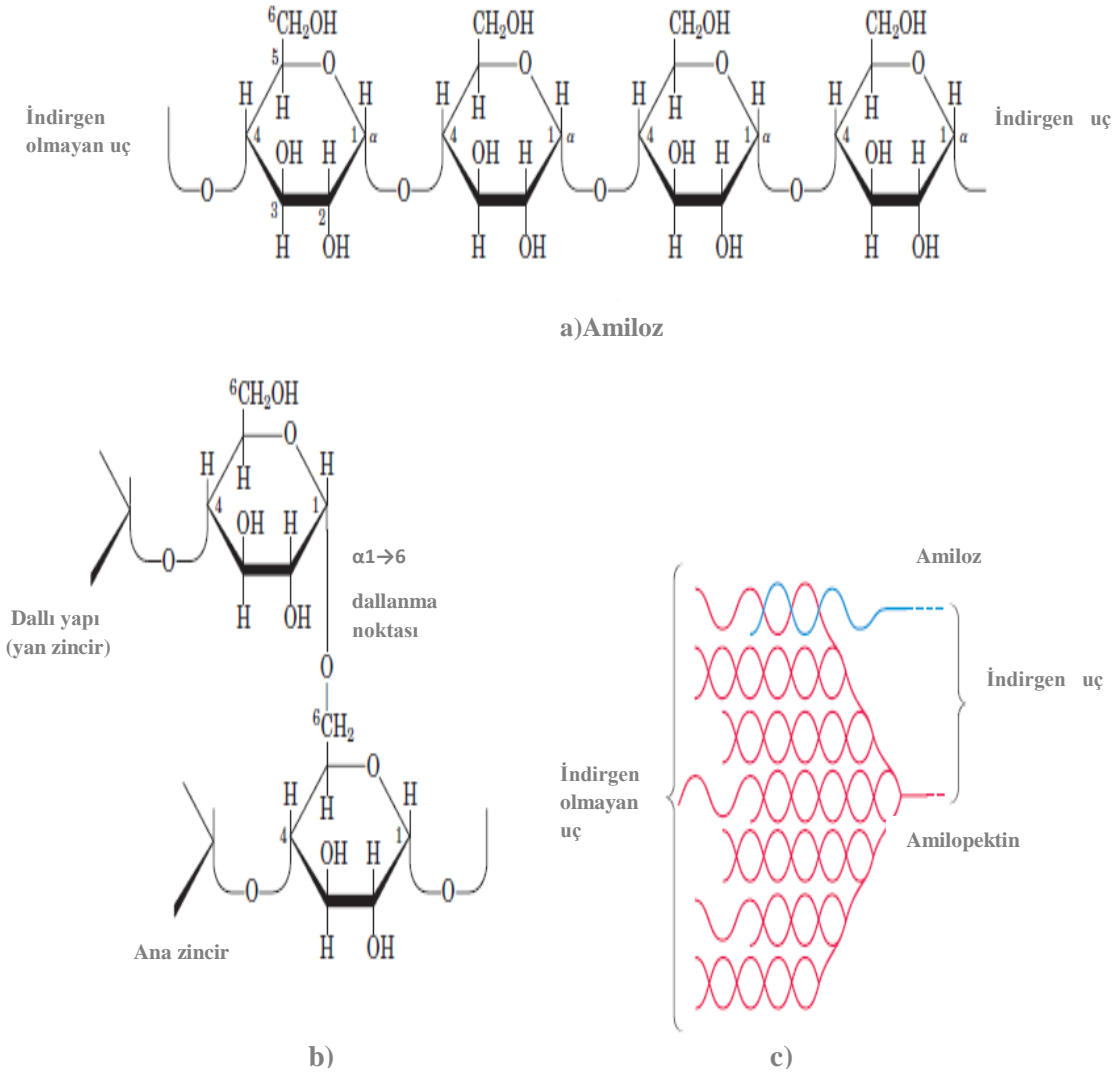
Nişasta güneş enerjisi sayesinde bitkiler tarafından fotosentez ile elde edilen temel karbonhidrattır. Soğuk suda çözünmeyen nişasta granülleri bütün tahıl tanelerinin başlıca ögesidir. Yüksek bitkilerde tümüyle  $\alpha$ -D-glukozdan oluşan depo maddesidir ve pek çok organizma için özellikle de insanlar için zorunlu enerji kaynağını oluşturur. Besinsel olarak nişasta bütün insan popülasyonlarında beslenmenin başlıca ögesidir (Maldonado ve Lopez, 1995). Amilaz enzimlerinin substratı olan nişasta esasen bitkilerin bir depo karbohidratı olup, D-glukoz birimlerinden oluşan ve  $(C_6H_{10}O_5)_n$  kapalı formülü ile gösterilen oldukça heterojen yapıları bir moleküldür (Berkeley 1997). Bu heterojenlik, farklı molekül yapıları iki polisakkarit içermesinden kaynaklanmaktadır (Bernfeld 1955). Nişasta, glukozun amiloz ve amilopektin olmak üzere iki değişik polimerine sahiptir. Amiloz, uzun dallanmamış glukoz ( $\alpha$ 1-4) polimerinden oluşur. Bu tür zincirlerin molekül ağırlıkları birkaç binden bir milyona kadar ulaşır.

Amilopektin ise oldukça yüksek molekül ağırlığına sahiptir (100 milyona kadar). Ancak amilozdan farklı olarak yüksek derecede dallanma bulunmaktadır.

Amilopektinde amilozda olduğu gibi ( $\alpha$ 1-4) bağlanmaların yanısıra her 24 ila 30 rezidü arasında ( $\alpha$ 1-6) bağ tipinden oluşan dallanmalar bulunmaktadır. (Nelson ve Cox 2005). Zincir ve bundan çıkan yan zincirleri de amilozdaki gibi helezonlaşmıştır (Yenson 1981).

Amiloz sıcak suda çözünür ve iyod ile mavi renk verir. İndirgen olmayan bir karbonhidrattır (Menevşe ve Menevşe 1982), 100-700 glukoz birimi içerir. Glukoz birimlerinin oluşturduğu zincir helezon şeklinde kıvrılmış olup her kıvrım 4-6 glukoz birimi içerir (Bailey ve Ollis 1977). Amilopektin ise 500-2000 ya da daha fazla glukoz ünitesi içerir. Dallı yapılar 15 glukoz ünitesinden yapılmıştır. Bu molekül suda basınç altında ısıtıldığı zaman çözünür. Amilopektin oda sıcaklığında bırakıldığında kararlı bir eriyik meydana getirir (Çağatay 1976). Amilopektin sıcak suda çözünmez ve iyod ile kırmızı renk verir (Menevşe ve Menevşe 1982).

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ



**Şekil 2. 4.** a) Amilozun kimyasal yapısı b) Amilopektinin  $\alpha$ -1,6 dallanma noktasının kimyasal görünümü c) Amiloz ve Amilopektinin nişasta granülleri şeklindeki konfigürasyonunun hipotetik gösterimi (Lehninger)

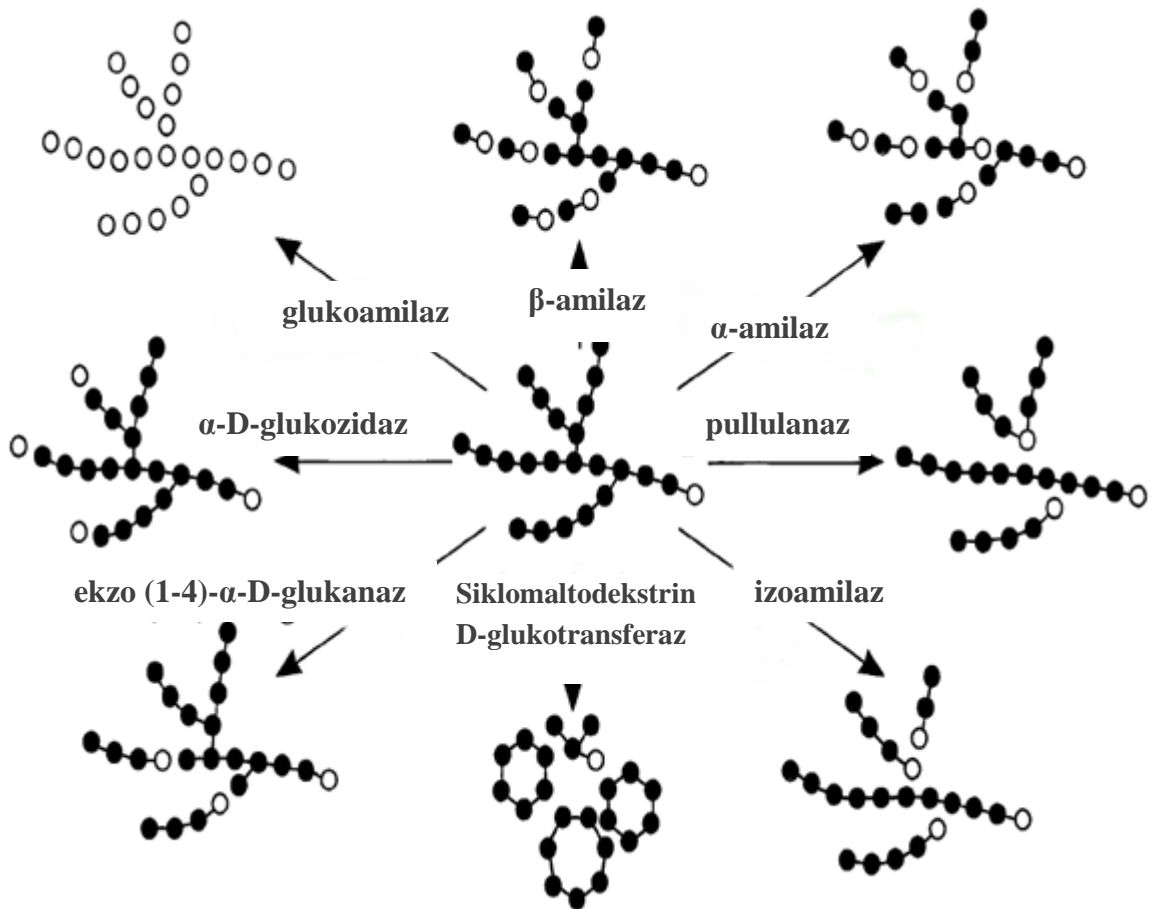
Amilozdaki mavi renk, glukoz birimlerinden oluşan helezon kıvrımları boşluklarına iyotun yerleşmesi ile meydana gelir ve spektrofotometrede şiddetli ışık absorpsiyonuna neden olur (Yenson 1981). Amiloz nişasta tanesinin iç kısmında bulunur ve nişasta türünün % 15-20' sini, amilopektin ise nişasta tanesinin dış kısmında bulunur ve nişasta türünün % 75-80' ini oluşturur (Swinkels 1985).

Dünya genelinde her yıl milyonlarca ton nişasta meydana gelmektedir ve bu nişasta, glukoz ve fruktoz şuruplarının yanısıra glukoz kristalleri, siklodekstrinler, maltodekstrinler, dekstrinler ve modifiye nişasta gibi ürünlere dönüştürülmektedir. Teknolojik ilerlemeler ile nişasta endüstrisinde enzimlerin kullanılmasındaki artış

özellikle gıda ve içecek endüstrilerinde büyük miktarlarda fruktoz şuruplarının glukoz içeriğini artırma amacıyla kullanılan dönüşüm metotlarını daha ucuz hale getirmiştir (Pandey ve ark. 2004).

### 2.3.1. Nişastayı Parçalayan Enzimler

Mikroorganizmalar nişastayı parçalayan değişik enzimler üretirler. Bunlar endoamilazlar [ $\alpha$ -1,4 glukon-glukanohidrolaz; E.C. 3.2.1.1]; ekzoamilazlar [ $\beta$ -amilaz (E.C.3.2.1.2), glukoamilaz ( $\alpha$ -1,4-D-glukanhidrolaz),  $\alpha$ -galaktosidaz (E.C.3.2.1.20), siklodekstrin glikosil-transferaz (E.C.2.4.1.19), maltogenik  $\alpha$ -amilaz (E.C.3.2.1.133), maltooligosakkarit amilaz ve maltoheksoz amilaz (E.C.3.2.1.98)]'dır. Dallı yapı göstermeyen enzimler özellikle  $\alpha$ -1,6 bağlarını hidroliz ederler. İzoamilaz (E.C. 3.2.1.168), pullulanaz (E.C. 3.2.1.41) ve amilopullulanazlar ise amilopektin dallarındaki  $\alpha$ -1,6 glikozidik bağlarını kırarlar (Pandey ve ark. 2005).



Şekil 2.5. Amilolitik enzimler tarafından nişastanın degradasyonu (Ismaya ve ark. 2012)

### 2.4. SSF'in Tarihçesi

SSF tarihine göz atıldığında II. Dünya Savaşı sırasında penisilinin çok önemli olmasından dolayı SmF (Submerged Fermentation) ile bileşik oluşturmada model teknoloji oldu. Araştırmacılar zamanlarını ve dikkatlerini SmF üzerine yoğunlaştırdıkları için muhtemelen bilinmeyen SSF ihmal edildi. Ancak 1950-1960 yıllarında mantar kültürleri kullanılarak küçük çapta araştırmalar da devam etti. SSF için bir diğer kilometre taşı 1960-1970 yıllarında bu yöntemle mitotoksinlerin üretimi oldu. Tarım ve sanayi atıklarından proteinle zenginleştirilmiş hayvan yemi üretimi bir diğer önemli gelişme oldu. Böylece birçok araştırmacı SSF yöntemiyle ilgilenmeye başladı ve SSF yöntemine olan ilgi artarak devam etti (Singhania ve ark. 2009, Pandey 2003).

SSF serbest akıcı suyun yokluğunda nemli materyaller üzerinde mikroorganizmaların büyümesi olarak tanımlanmaktadır (Perez-Guerra ve ark. 2003). SSF tekniğinde mikrobiyal büyüme ve ürün oluşumu düşük nem içeriğine sahip katı substrat partikülünün yüzeyinde veya yakınında meydana geldiği için SmF kültürlerinden farklıdır (Pandey ve ark. 1999).

Biyoteknolojik uygulamalarda SSF sistemleri iki şekilde tasarlanmışlardır:

1-Statik reaktördeki fermentasyonlar

2-Ara sıra veya sürekli havalandırılan fermentasyonlar

İkinci fermentasyon tipinde aflatoksin ve enzimlerin üretimi gerçekleşmektedir.

SSF kullanılan mikroorganizmalara göre 2 çeşide ayrılmaktadır:

1-Doğal SSF; doğal mikrofloranın kullanıldığı SSF sürecidir.

2-Saf kültür SSF; mikroorganizmaların saf kültürleri tek veya kombine olarak kullanılır (Nigam ve Singh 1994).

Tarımsal yan ürünler genellikle SSF'de kullanılan en iyi substratlardır. Bu substratlar enzim üreten mikroorganizmaların üretimi için kullanılır. SSF'de kullanılan substratların bazıları buğday kepeği, pirinç kepeği, mısır kepeği, buğday samanı, pirinç samanı, pirinç kabuğu, talaş, muz atıkları, çay atıkları, cassava (*Manihot esculenta*)



kökünden nişasta elde edilmesi sırasında meydana gelen atıklar, palmiye yağı fabrikası atıkları, buğday unu, mısır unu, nişasta vb. (Pandey ve ark. 1999).

#### 2.4.1. SSF'in SmF'e Göre Avantajları ve Dezavantajları

SSF'nin SmF'e göre avantajları şunlardır:

- ✓ SSF ile SmF arasındaki çalışmalar karşılaştırıldığında SSF daha fazla verime sahiptir.
- ✓ SSF'te bakteri ve maya kontaminasyonu daha azdır.
- ✓ Kültür ortamı genellikle SmF'e göre çok basittir. Suda çözülmeyen katı substrat, genellikle mikroorganizmanın büyümesi için gerekli besini sağlar.
- ✓ Kullanılan düzenekler ekonomik açıdan çok ucuzdur.
- ✓ Atık su çok az olduğundan daha az çevre kirliliğine yol açmaktadır. (Perez-Guerra ve ark. 2003)
- ✓ Düşük maliyet ve tekrarlanabilir harcamalar
- ✓ Düşük enerji ihtiyacı (Pandey ve ark. 2000).
- ✓ Daha kolay havalandırma
- ✓ Küçük ölçeklerde bile ekonomik kullanım (Akcan 2009)

Dezavantajlar:

- ✓ Nadiren meydana gelen bakteriyel ve fungal kontaminasyon
- ✓ Substratlar genellikle ön uygulamaya ihtiyaç duyar (öğütme, parçalama, homojenizasyon, fiziksel, kimyasal ve enzimatik hidroliz, buhar uygulama gibi).
- ✓ Sıvı substrat fermentasyonuna göre biyokütle (üreme) miktarının saptanması zordur. Çünkü misel ve katı substrat arasındaki sıkı

penetrasyon biyokütlenin tamamen elde edilmesini engeller (Rahardjo ve ark 2004).

- ✓ Üreme esnasında oluşan metabolik sıcaklığın uzaklaştırılması oldukça zordur.
- ✓ Parametrelerin (pH, sıcaklık, nem vb.) kontrolünün zor olması
- ✓ Yüksek miktarda saf olmayan ürün eldesi ve ürünlerin maliyetinin artması (Couto ve Sanroman 2006)

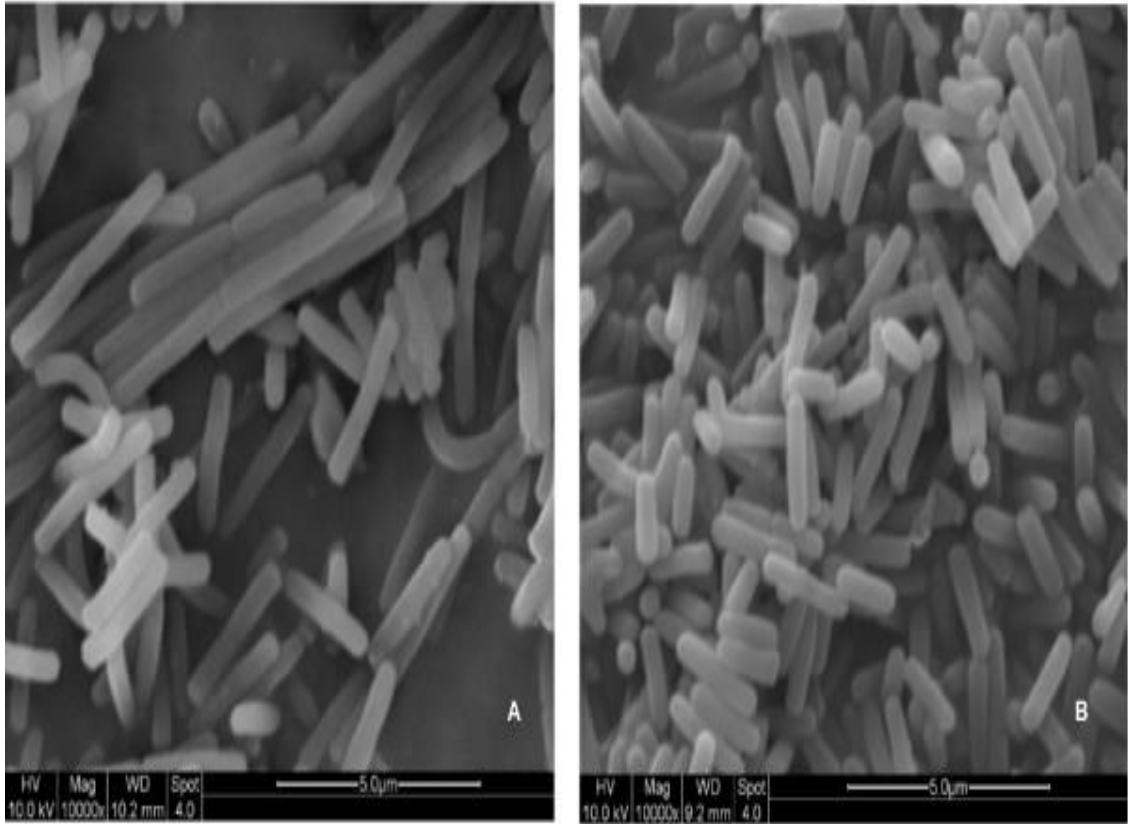
### 2.5. *Bacillus* Cinsi

*Bacillus*, aerobik olarak gelişen ve dormant endospor oluşturan farklı bir bakteri cinsidir. *Bacillus anthracis* ve *Bacillus subtilis* gibi *Bacillus* türleri, Alman biyologlar Ferdinand Cohn ve Robert Koch tarafından ilk defa sistematik bir şekilde tarif edilmiş bakteri türlerindedir (Cohn 1962, Koch 1962). *Bacillus* cinsi G+C oranı düşük gram pozitif bakterilerden oluşur (Kingdom Bacteria; Phylum Firmicutes; Class Bacilli; Order Bacillales; Family Bacillaceae). En yakın ilişkili olduğu cinsler *Listeria*, *Streptococcus* ve *Staphylococcus*'tur (Ciccarelli ve ark. 2006, Wu ve ark. 2009). Doğada her yerde bulunabilen *Bacillus* türleri tatlısu, tuzlusu, toprak ve hava gibi ortamların yanısıra bitki ve hayvanlardan da izole edilebilir (Pignatelli ve ark. 2009). Fenotipik çeşitliliğe sahip *Bacillus* cinsinin üyeleri şaşırtıcıdır. Yüksek sıcaklık, aşırı tuzluluk, asidik şartlar gibi aşırı ortamlara uyum sağlayan türleri vardır (Holt 1986). Bazı türleri arsenik ya da selenyum gibi sıra dışı terminal elektron akseptörlerini kullanır (Switzer Blum ve ark. 1998).

#### 2.5.1. *Bacillus licheniformis*

Doğada her yerde bulunabilen *B. licheniformis* genellikle toprakta spor olarak bulunur. Aerobik solunum yapan diğer *Bacillus* üyelerinin aksine *B. licheniformis* fakultatif anaerobik bir bakteridir. Genellikle saprofit olan *B. licheniformis* çeşitli proteazlar ve kompleks polisakkaritleri parçalayabilen enzimleri üretebilmesi ile besin döngüsüne önemli bir katkıda bulunur. Türün üyeleri denitrifikasyon yapabilme özelliğine sahiptirler. Bununla birlikte genellikle spor formunda bulduklarından bakteriyel denitrifikasyona olan katkıları azdır (Alexander 1977).

*Bacillus licheniformis*; fermentasyon endüstrisinde, biyoteknolojik öneme sahip amilaz, proteaz, antibiyotikler, çevre ve insan sağlığı açısından çok az risk oluşturan özel kimyasalların üretimi için yaygın olarak kullanılır. Tıp ve veterinerlikte yaygın olarak kullanılan "Bacitracin" adı verilen ilk antibiyotik peptidi *Bacillus licheniformis* kültüründen elde edilmiştir (He ve ark. 2006). *Bacillus licheniformis*'ten elde edilen diğer enzimler ve bazı metabolitler aşağıda verilmiştir: Gümüş nano-kristalleri (Kalimunthu ve ark. 2008),  $\beta$ -laktamaz BS3 (Beck ve ark. 2008), ksilanaz (Liu ve Liu 2008), endoglukanaz (Bischoff ve ark. 2007), elastaz (Qihe ve ark. 2007).



Şekil 2.6. *Bacillus licheniformis*'in elektron mikroskopundaki görünümü (Niu ve ark. 2009)

## 2.6. Önceki Çalışmalar

Krishna ve Chandrasekaran (1996) SSF tekniğiyle muz kabuğunu katı substrat olarak kullanarak *Bacillus subtilis* CBTK 106'dan  $\alpha$ -amilaz üretimi üzerine bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada SSF ortamının bazı optimizasyonları olan; başlangıç nem içeriği, partikül büyüklüğü, inkübasyon sıcaklığı, inkübasyon süresi, pH'sı ve ortama eklenen azot ve karbon kaynaklarının enzim üretimi üzerine etkisini incelemişlerdir.

Uygun başlangıç nem içeriği % 70, uygun partikül büyüklüğü 400 µm, başlangıç pH 7.0 ve inkübasyon sıcaklığı 35°C olarak tespit edilmiştir. Azot kaynağı olarak % 1'lik amonyum sülfat/sodyum nitrat, % 0.5'lik et özütü/pepton; karbon kaynağı olarak ise % 0.1'lik glukoz, sukroz, nişasta ve maltozun enzim üretimini arttırdığını belirlemişlerdir.

Baysal ve ark. (2003) Diyarbakır-Çermik sıcak su kaynağından izole ettikleri termotoleran *Bacillus subtilis* bakterisinden SSF tekniğiyle α-amilaz elde etmişlerdir. Çalışmada buğday kepeği (WB) ve pirinç kabuğu (RH) substrat olarak kullanılmış ve enzim üretimi için optimum şartlar belirlenmeye çalışılmıştır. Yaklaşık inkübasyon süresi, nem seviyesi, parçacık büyüklüğü ve inokülüm konsantrasyonunu belirlemişlerdir. Maksimum ürün miktarı buğday kepeği ve pirinç kabuğunda sırasıyla 159.520 U/g ve 21.760 U/g, 0.1M pH 7 fosfat tamponunda % 30 nem seviyesi ile 24. ve 48. saatlerde elde edilmiştir. Partikül büyüklüğü ve inokülüm konsantrasyonunu buğday kepeği ve pirinç kabuğunda sırasıyla 1000 µm, % 20 ve 500 µm, % 15 olarak tespit etmişlerdir. Enzim miktarının buğday kepeğinde, pirinç kabuğundan 7 kat daha fazla bulunduğunu rapor etmişlerdir.

Bahçeci (2004) Tuz Gölünden izole edilen bakterilerin endüstriyel öneme sahip ksilanaz, selüloz, α-amilaz ve proteaz enzimlerini üretilen üretilmediklerini tespit etmek amacıyla araştırmalar yapmıştır. Elde edilen izolatların birinin *Bacillus pumilis*, iki izolatın *Bacillus subtilis* ve geriye kalanların *Bacillus licheniformis* olduğunu tespit etmiştir. Bu izolatların önemli ölçüde amilaz ve proteaz enzimi ürettiği belirlenmiştir. Proteaz enziminin optimum aktivite sıcaklıkları 50–60°C ve optimum pH 7.0–7.4 olarak belirlenmiştir. Proteaz enziminin 80°C ve pH:9'a kadar stabilite gösterdiği belirtilmiştir.

Rahardjo ve ark. (2005) SSF tekniğiyle *Aspergillus oryzae*'nin aerial miselinden α-amilaz üretimi üzerine bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada *Aspergillus oryzae*'nin aerial miselinde hem α-amilaz üretiminin gerçekleştiği hem de mantarın kütesinde güçlü bir artış olduğunu tespit etmişlerdir. Mantar filamentlerinin morfolojileri, koloni oluşturabilmeleri ve katı substrata işleyebilme yeteneklerinden dolayı SSF için uygun mikroorganizmalar olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmada total α-amilaz aktivitesinin 20–65. saatlerde artış gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Sodhi ve ark. (2005) Hindistan-Manikaran sıcak su kaynağından izole ettikleri termotolerant *Bacillus* PS-7'den emaye kaplı metal tabaklar ve erlenmayer şişelerinde

SSF tekniğiyle oldukça yüksek miktarda termostabil  $\alpha$ -amilaz elde etmişlerdir. Katı substrat miktarı, nem miktarı, inkübasyon sıcaklığı, surfaktantın varlığı veya yokluğu, karbon, azot, mineral, aminoasit ve vitamin kaynaklarının enzim üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Maksimum enzim üretimi 464.000 U/g ile gliserol (% 1.0 w/w), soya küspesi (% 1.0 w/w), L-prolin (% 0.1 w/w), vitamin B-kompleksi (% 0.01) ile desteklenmiş buğday kepeği, % 1 Tween-40, 1/1.5 oranında 1 mM  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , inkübasyon süresi 48. saat ve 37°C'de elde edilmiştir. Enzimin, fenil hidrofobik etkileşim kromatografisinin ardından sephadex G-75 kolonu ile hazırlanmış jel filtrasyonu ve amonyum sülfat çöktürmesi ile kısmi olarak 12.7 kat saflaştırılması sağlanmıştır. Kısmen saflaştırılmış enzimin 60°C ve pH 6.5'ta maksimum aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir.  $Ca^{+2}$ 'nin enzim üzerindeki etkisi sırasıyla 60°C'de 6 saat ve 70°C'de 5 saat süreyle gözlemlenmiş, ancak enzimin aktivitesinde herhangi bir artışa rastlanmamıştır.

Shukla ve Kar (2006) SSF tekniğiyle *Bacillus licheniformis* ve *Bacillus subtilis*'ten  $\alpha$ -amilaz üretmek için substrat kaynağı olarak buğday kabuğu ve patates kabuğunu kullanmışlar ve amilaz üretimi açısından patates kabuğunda buğday kabuğuna göre daha iyi bir sonuç elde etmişlerdir. *Bacillus licheniformis* için optimum şartlar altında en yüksek enzim miktarı patates kabuğunda 270 U/ml ve buğday kabuğunda 175 U/ml iken *Bacillus subtilis*'te ise patates kabuğunda 600 U/ml ve buğday kabuğunda 265 U/ml olarak tespit etmişlerdir. *Bacillus licheniformis*'te 90°C'de ve pH 9.0'da, *Bacillus subtilis*'te ise 60°C'de ve pH 7.0'da en iyi enzim aktivesi elde edilmiştir.

Thippeswamy ve ark. (2006) endüstriyel atıklardan izole edilen bakteriyel suşu *Bacillus* olarak tanımlamışlar, suştan elde edilen termostabil ekstrasellüler amilaz kısmen saflaştırılmış ve enzim için optimum sıcaklık 60°C ve pH 6.5 olarak tespit edilmiştir.

Asgher ve ark. ( 2007 ) termofilik *Bacillus subtilis* JS 2004'ten termostabil  $\alpha$ -amilaz üretimi üzerine bir çalışma yapmışlardır. Kalsiyum, maya özütü ve glukoz katkılarının bakterinin büyümesi ve enzim üretimi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Maksimum enzim üretimini 72 U/ml, 48. saatte, pH 7.0'da ve 50°C'de elde etmişlerdir. Kalsiyum ve maya özütü eklentisinin mikrobiyal büyümeyi ve enzim üretimini

artırdığını, % 1 glukozun ise azalttığını belirlemişlerdir. Enzimin 1-6 saatlerinde ve 70°C 'de oldukça stabil olduğunu 80°C'de % 12 ve 90°C'de % 48 aktivite kaybı gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ca<sup>2+</sup>'nin enzim aktivitesini % 117 civarında arttırdığını Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup> 'nın inhibe ettiğini, Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> ve Mn<sup>2+</sup> 'ın da çok az etkilediğini belirtmişlerdir. *Bacillus subtilis* JS 2004'ün oldukça yüksek miktarda termostabil α-amilaz ürettiğini bu nedenle hem nişastanın hidroliz edilmesinde hem de yiyecek endüstrisinde kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

El-Tayeb ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada *Bacillus subtilis* (SCH suşu) ve *Bacillus amyloliquefaciens* (267CH suşu) suşları kullanarak α-amilaz üretimini multiprotein-mineral ortamı kullanarak biyoreaktörde gerçekleştirilmişlerdir. SCH suşu tarafından α-amilaz üretimi için optimum pH olarak pH 4-7, 267CH suşu tarafından α-amilaz üretimi için ise pH 4-8 olarak bulunmuştur. Aynı bilim adamları yaptıkları bir diğer çalışmada ise nişasta konsantrasyonunun % 0.5 olduğu durumda en iyi enzim üretiminin 37-75°C sıcaklık aralığında, buna karşın % 35 nişasta varlığında ise en iyi enzim üretiminin 85-95°C aralığında olduğunu belirtmişlerdir.

Tanyıldızı ve ark. (2007) *Bacillus amyloliquefaciens*'ten SSF tekniğiyle α-amilaz elde etmeye çalışmışlardır. En iyi enzim aktivitesini elde etmek için hayvan yemi olarak kullanılan ve oldukça ucuz olan mısır küspesini (CGM; corn gluten meal), yedi farklı konsantrasyonda incelemişlerdir. 5-40 g/L arasında değişen miktarlarda kullanılan CGM'de en iyi enzim aktivitesini 30 g/L'de bulmuşlardır. Farklı azot kaynaklarından pepton ve maya üzerinde yapılan çalışmada en yüksek aktivite 10 g/L ile yeast extract (YE)'ta tespit etmişlerdir. MgSO<sub>4</sub> ve CaCl<sub>2</sub>'nin enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendiğinde önemli bir etkisinin olmadığı sonucuna varmışlardır. Çalkalama hızının enzim üretimi üzerine etkisini incelemişler ve 100-150-200 rpm çalkalama hızlarından en iyi etkiyi 150 rpm olarak tespit etmişlerdir. 25°C-45°C arasında altı farklı inkübasyon sıcaklığında en iyi aktivite 33°C'de, pH 5.0 ile 8.0 arasında yapılan dört farklı pH'da ise en iyi aktiviteyi pH 7.0'de tespit etmişlerdir.

Ray ve ark. (2008) *Bacillus brevis* MTCC 7521'den ekstrasellüler α-amilaz elde etmeye çalışmışlardır. Optimum sıcaklık 50°C, pH 6.0 ve inkübasyon süresi 36. saat olarak tespit edilmiştir. Kullanılan azot kaynaklarından et özütünün, diğer azot kaynaklarından pepton, maya özütü ve kazein ile karşılaştırıldığında amilaz üretimini

daha çok arttırdığını, asparajin, potasyum nitrat, amonyum sülfat, amonyum nitrat ve ürenin enzim üretimini azalttığını tespit etmişlerdir.  $Ca^{2+}$  veya surfaktantların (Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80, sodyum lauril sülfat % 0.02) enzim aktivitesini arttırmadığını da belirtmişlerdir.

Mukherjee ve ark. (2009) SSF tekniğiyle *Bacillus subtilis* DM03'ten sentezlenen ekstrasellüler  $\alpha$ -amilaz üzerine fermente substratların etkisi hakkında araştırmalar yapmışlardır. Çalışmada enzim üretimi için patates kabuğu en iyi substrat olarak tespit edilmiştir. Katabolit represyondan dolayı yüksek oranda şeker içeriğinin (glukoz, fruktoz, galaktoz, laktoz, maltoz) enzim sentezi üzerinde negatif bir etki oluşturduğunu ancak çeşitli analizlerin yüksek oranda nişasta içeren fermente substratların  $\alpha$ -amilaz sentezini tetiklediğini tespit etmişlerdir.

Riaz ve ark. (2009) yeni izole edilen *Bacillus subtilis* KIBGE-HAR suşundan elde edilen termostabil  $\alpha$ -amilazın üretimi ve karakterizasyonu çalışmasında, 24 saat'lik inkübasyon sonrasında hücre popülasyonu ve  $\alpha$ -amilaz aktivitesinin maksimum seviyeye ulaştığını gözlemlemişlerdir. Enzim üretimi için optimum sıcaklığın  $50^{\circ}C$  ve optimum pH değerinin ise pH 7.0 olduğunu saptamışlardır.

Hashemi ve ark. (2010) substrat kaynağı olarak buğday kepeğinin kullanıldığı çalışmada SSF tekniğiyle *Bacillus* sp. KR-8104'den kalsiyum'dan bağımsız ham  $\alpha$ -amilaz elde etmeye ve enzim aktivitesi üzerinde düşük pH'nın sinerjistik etkisini belirlemeye çalışmışlardır. Katı substratın içerdiği nem oranı, parça büyüklüğü, inkübasyon sıcaklığı ve süresi, inokülüm, farklı karbon ve nitrojen kaynaklarının enzim üretimi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Maksimum enzim üretimi için 1:1.5 oranında çeşme suyu ile nemlendirilmiş buğday kepeği (140 U/g), % 1 ( $NH_4NO_3$ ), % 1 laktoz, inkübasyon sıcaklığını  $37^{\circ}C$  ve inkübasyon süresini 42. saat olarak tespit etmişlerdir.  $40^{\circ}C$  ve  $45^{\circ}C$  sıcaklık aralıklarında enzim üretiminin düşük olmasıyla birlikte canlı hücre sayısının yüksek olduğunu saptamışlardır.

Karataş ve ark. (2012) tarafından *Bacillus licheniformis* ZB-05 bakterisinde SSF yöntemi kullanılarak amilaz ve proteaz üretimi üzerine 8 ayrı tarımsal bitki atığının test edildiği bir çalışmada en iyi katı substratın pirinç kabuğu olduğunu tespit etmişlerdir ( $\alpha$ -amilaz için 443 U/g, proteaz için 469 U/g). % 2 oranındaki çözünür nişastanın  $\alpha$ -

amilaz üretimini arttırdığı gözlenirken % 1 oranındaki maltozun ise proteaz üretimini arttırdığı tespit edildi.

Kumar ve ark. (2012) *Bacillus* sp. MNJ23 bakterisinden  $\alpha$ -amilaz ve  $\beta$ -galaktozidazı saflaştırmışlar ve pH, termal stabilite, çeşitli metal iyonları ve reaktanların bu enzimlerin aktivitesi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada SDS-PAGE yöntemiyle amilazın molekül ağırlığının 25 kDa olduğu saptanmıştır. Her iki enzimin de pH 8-10 ve 50°C 'ye kadar stabilitelelerini koruyabildikleri tespit edilmiştir. Kalsiyum ve kobalt iyonları  $\alpha$ -amilaz aktivitesini artırırken magnezyum ve sodyum iyonlarının enzim aktivitesini inhibe ettiği tespit edilmiştir. Ayrıca merkaptoetanol ve SDS'nin  $\alpha$ -amilaz aktivitesini inhibe ettiği saptanmıştır.

Sankaralingam ve ark. (2012) yapmış oldukları bir çalışmada SmF yöntemiyle *Bacillus licheniformis*'ten  $\alpha$ -amilaz üretimi üzerine bir takım parametrelerin etkisini araştırmışlardır. Çalışmada  $\alpha$ -amilaz üretimi için optimum inkübasyon süresinin 48. saat, optimum sıcaklığın 30°C ve optimum pH'nın 7.0 olduğu saptanmıştır. Maximum amilaz üretimi üzerine farklı karbon kaynaklarının etkisi incelenmiş olup en yüksek amilaz miktarı laktoz içeren ortamda elde edilmiştir. Aynı şekilde farklı organik ve inorganik azot kaynaklarının enzim üretimi üzerine etkileri incelenmiş olup en iyi amilaz üretimi sırasıyla yeast ekstrakt ve amonyum sülfat varlığında elde edilmiştir.

Khemakhem ve ark. (2013) çemen otu bitkisinin tohumundan elde etmiş oldukları maltojenik amilaz ile ilgili yapmış oldukları bir çalışmada SDS-PAGE yöntemiyle enzimin molekül ağırlığının 68 kDa olduğunu belirlemişler ve enzimin maximum aktivitesini pH 5, 60°C'de 258 U/mg olarak tespit etmişler. Ayrıca enzimin geniş bir pH stabilitesine sahip olduğunu ortaya koymuşlardır.

Kumar ve ark. (2013) *Bacillus laterosporus* bakterisinin üretmiş olduğu termostabil  $\alpha$ -amilazın saflaştırılması, optimizasyonu ve karakterizasyonu üzerine yapmış oldukları çalışmada dört besiyeri bileşeninin (yeast ekstrakt, nişasta, pepton ve NaCl) enzim üretimi üzerine etkisini incelemek için RSM (response surface methodology) yöntemini kullanmışlardır. Yapılan çalışma sonucu optimum değerler yeast ekstrakt için % 0.58, nişasta için % 2.44, pepton için % 2.34 ve NaCl için % 0.11 olarak belirlenmiş ve maximum enzim aktivitesi 4.838 U/ml olarak tespit edilmiştir.



### **3. MATERYAL ve METOT**

#### **3.1. Biyolojik Materyal**

Yaptığımız çalışmada ticari olarak Microbiologist inc.'ten temin edilen *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 biyolojik materyal olarak kullanıldı.

#### **3.2. Kimyasal Maddeler**

##### **3.2.1. Azot Kaynakları**

Maya özütü ve amonyum sülfat Merck'ten; kazein, pepton, et özütü Oxoid'den; tripton Difco'dan; amonyum nitrat ve amonyum klorür Riedel De Haen'den temin edilmiştir.

##### **3.2.2. Karbon Kaynakları**

Fruktoz, galaktoz, laktoz ve maltoz Sigma'dan; sukroz Difco'dan; glukoz Merck'ten; temin edilmiştir.

##### **3.2.3. Metal İyonları**

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ve CaCl<sub>2</sub> Merck'ten; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O Riedel De Haen'den, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O Analar'dan, temin edilmiştir.

##### **3.2.4. Deterjanlar**

Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) ve Tween40 Merck'ten, TritonX100 Sigma'dan temin edilmiştir.

#### **3.3. Besiyerleri**

##### **3.3.1. Katı Besiyeri**

8 g Nutrient Broth (Oxoid) ve 16 g agar (Merck), 1000 ml saf suya tamamlanarak çözüldükten sonra otoklava bırakıldı.

#### 3.3.2. Sıvı Besiyeri

##### 3.3.2.1. Nutrient Broth (NB) Besiyeri

8 g NB, 1000 ml saf suya tamamlanıp çözünme işlemi tamamlandıktan sonra otoklava bırakıldı.

##### 3.3.2.2. Luria Broth (LB) Besiyeri

10 g maya özütü, 5 g NaCl (Merck), 5 g tripton, 1000 ml saf suya tamamlanıp çözünmesi sağlandıktan sonra otoklava bırakıldı.

#### 3.3.3. SSF Besiyeri

Pamuk sapı, öğütülmüş mısır küşpesi, mercimek kabuğu, pirinç kabuğu, buğday kepeği ve arpa kabuğu kurutularak blendırdan geçirildi. Farklı gözenek büyüklüğündeki eleklerden geçirilerek 500, 1000 ve 1500 µm, olmak üzere üç farklı parça büyüklüğünde substratlar elde edildi. 1500 µm büyüklüğünde olanlar alındı. 100 ml'lik erlenmayer içerisinde hacim % 30 olacak şekilde 3 g tartılıp üzerine 10 ml çeşme suyu eklendi 121°C'de 15 dk otoklavda bekletilerek steril edildi. Soğuduktan sonra 600 nm'de 0.6 OD'ye gelen bakterilerden % 30 inokulum besiyerine katılarak 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Çalışmamızda buğday kepeği kontrol olarak kullanıldı.

#### 3.4. Çözeltiler

##### 3.4.1. Tampon Çözelti

pH 7.0 için; 30 ml 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 19 ml 0.1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> hazırlanır. Hazırlanan bu çözeltiler bir beher içerisinde karıştırıldıktan sonra hacimleri saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

##### 3.4.2. Nişastanın Hazırlanması

% 0.5'lik nişasta 0.1M pH 7.0 sodyum fosfat tamponu içinde çözünmesi sağlanarak hazırlandı.

### 3.4.3. Bernfeld Reaktifinin Hazırlanması

Bir beherde 20 g 3,5 dinitrosalisilik asit (DNS veya DCA), 400 ml saf suya tamamlanarak suda çözüldü. Başka bir beherde 32 g NaOH 300 ml saf su içinde çözüldü. DNS karıştırıcıda karışmaya devam ederken üzerine yavaş yavaş NaOH çözeltisi ilave edildi. Karışım bir süre sıcak su banyosunda bekletildi. Üzerine 600 g Na-K tartarat azar azar eklendi. Son olarak çözeltinin hacmi saf su ile 2000 ml'ye tamamlandı. Bernfeld reaktifi  $\alpha$ -amilaz enzim aktivite tayininde reaksiyon durdurucu olarak kullanıldı.

### 3.5. Kullanılan Cihazlar

Otoklav (Hirayama)

Etüv (Heraeus)

Steril Kabin (Telstar AV 100)

Soğutmalı Santrifüj (Sigma Christ 2K 15)

pH Metre (METTLER MP220)

Magnetik Karıştırıcı (Stuart)

Çalkalayıcı (Selecta P)

Elektronik Terazı (GEC Avery)

İnkübatör (EN 400)

Deep-Freeze (Sanyo Medical Freezer)

Vorteks (Fisons Whirli Mixer)

Küvet (Light path)

Mikropipet (Eppendorf)

Blendır (Waring Commercial Laboratory Blender)

Spektrofotometre (Varian)

### 3.6. Bakteri Üretimi

NB ve LB sıvı besiyerlerine katı besiyerinden platin öze yardımıyla ekim yapıldı. Çalkalayıcıda 37°C sıcaklıkta 150 rpm çalkalama hızında 24 saat inkübasyona bırakıldı. 600 nm'de 0.6 OD'ye gelen bakteri kolonilerinden SSF besiyerine ekim yapıldı.

#### **3.7. SSF Besiyerinde Enzim Üretimi**

SSF besiyeri 120. saate kadar inkübasyona bırakıldı. 24 saatte bir SSF besiyeri üzerine 10 ml çeşme suyu eklenip 30 dk çalkalandıktan sonra karışım steril gazlı bezle süzüldü. Süzüntü santrifüj tüpüne aktarılarak soğutmalı santrifüjde 10.000 rpm'de 5dk santrifüj edildi. Üst sıvı enzim aktivite tayinlerinde kullanıldı.

#### **3.8. Enzim Aktivite Tayini**

##### **3.8.1. $\alpha$ -Amilaz Aktivite Tayini**

$\alpha$ -Amilaz aktivite tayini Bernfeld yöntemine göre yapıldı (Bernfeld 1955). Bu yöntemde göre 150  $\mu$ l enzim çözeltisi ve 200  $\mu$ l % 0.5'lik nişasta çözeltisi (0.1 M, pH 7.0 fosfat tamponunda çözünmüş) 37°C'de 30 dk inkübe edildi. Bu süre sonunda reaksiyonu durdurmak için 400  $\mu$ l DNS (3,5-dinitrosalisilik asit) çözeltisi ilave edilerek 5 dk kaynar su banyosunda bekletildi. DNS, sıcakta indirgen şeker uçlarıyla tepkimeye girerek reaksiyonun durmasını ve renk oluşumunu sağlar. Örnekler soğuduktan sonra üzerine 8 ml saf su ilave edilerek seyreltme yapıldı. Daha sonra karıştırılarak 489 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapıldı. Bir enzim ünitesi deney şartları altında 1  $\mu$ mol nişastayı 30 dk'da maltoza parçalayan enzim miktarı olarak tanımlandı.

#### **3.9. $\alpha$ -Amilaz Üretimi Üzerine Farklı Parametrelerin Etkisinin İncelenmesi**

##### **3.9.1. Optimum Substratın Belirlenmesi**

Pamuk sapı, öğütülmüş mısır kütlesi, mercimek kabuğu, arpa kabuğu, pirinç kabuğu ve buğday kepeği 3 g tartılarak erlenlere aktarıldıktan sonra üzerine çeşme suyu eklenip otoklava bırakıldı. Daha sonra 600 nm'de 0.6 OD'ye gelen bakterilerden 3000  $\mu$ l ekim yapılarak  $\alpha$ -amilaz üretimi üzerine her birinden farklı substratların etkisi incelendi.

##### **3.9.2. Optimum İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi**

Hazırlanan SSF besiyerleri, sterilizasyon ve ekim işlemlerinden sonra inkübasyona bırakıldı. 120. saate kadar 24 saatte bir enzim aktivite tayini yapılarak en uygun inkübasyon süresi tespit edilmeye çalışıldı.

### **3.9.3. Optimum İnkübasyon Sıcaklığının Belirlenmesi**

SSF besiyerleri hazırlanıp otoklav işleminden sonra bakteri ekimi yapıldı. Örnekler 25, 30, 35, 37, 40, 45, 50 ve 55°C sıcaklıklarda inkübasyona bırakıldı. 48. saatte örneklerin üst sıvısından aktivite tayinine bakıldı.

### **3.9.4. Optimum Ekstraksiyon Ortamının Belirlenmesi**

% 0.5 NaCl, % 1 TritonX100, % 1 SDS, % 1 Tween 40, saf su, pH 7 sodyum fosfat tamponu ve çeşme suyu (10 ml) kullanılarak enzim üretimi için en iyi ekstraksiyon ortamı tespit edilmeye çalışıldı. 48. saatte örneklerin üst sıvısından aktivite tayinine bakıldı.

### **3.9.5. Optimum pH'ın Belirlenmesi**

Enzim üretimi üzerine başlangıç pH'nın etkisini incelemek için çeşme suyunun pH'sı 4, 5, 6, 7, 8, 9 ve 10 olmak üzere farklı pH'lara 0.1 M HCl ve 0.1 M NaOH ile ayarlandı. Hazırlanan SSF besiyerlerinin otoklavda sterilizasyonu sağlandıktan sonra ekim yapıldı. Daha sonra örnekler inkübasyona bırakıldı. 48. saatte örneklerin üst sıvısından aktivite tayinine bakıldı.

### **3.9.6. Optimum Aktivite Sıcaklığının Belirlenmesi**

Enzimlerin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini incelemek için reaksiyon başlatıldıktan sonra örnekler, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80 ve 90°C'lerdeki sıcaklık aralıklarında 30 dk aralıklarla aktivite tayini yapılarak optimum aktivite sıcaklığı tespit edilmeye çalışıldı.

### **3.9.7. Uygun Ekim Miktarının Belirlenmesi**

SSF besiyerlerine, besiyeri hacminin % 10, 20, 30, 40, 60 ve 80'i olacak şekilde 1000 µl'den 8000 µl'ye kadar değişen miktarlarda bakteri ekimi yapıldıktan sonra örnekler inkübasyona bırakıldı. 48. saatte örneklerin üst sıvısından enzim aktivite tayini yapıldı.

#### **3.9.8. $\alpha$ -Amilaz Aktivitesi İçin Çalkalama Hızının Belirlenmesi**

$\alpha$ -Amilaz üretimi için 60, 100, 120, 150, 180 ve 200 rpm olmak üzere farklı çalkalama hızlarına bırakılan örneklerden 48. saat sonunda alınan üst sıvıdan aktivite tayini yapıldı.

#### **3.9.9. $\alpha$ -Amilaz Üretimi Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisinin İncelenmesi**

SSF besiyerleri hazırlandıktan sonra besiyeri hacminin % 1'i olacak şekilde azot kaynaklarından; amonyum sülfat, amonyum nitrat, amonyum klorür, et özütü, tripton, pepton, maya özütü ve kazein SSF besiyerlerine eklendi. Örneklerle 10 ml çeşme suyu eklendikten sonra otoklava bırakıldı. Daha sonra ekim yapıp inkübasyona bırakılan örneklerin üst sıvısından enzim aktivite tayinlerine bakıldı.

#### **3.9.10. $\alpha$ -Amilaz Üretimi Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisinin**

##### **İncelenmesi**

SSF besiyerleri hazırlandıktan sonra besiyeri hacminin % 1'i olacak şekilde karbon kaynaklarından; glukoz, galaktoz, fruktoz, laktoz, sukroz ve maltoz SSF besiyerlerine eklendi. Daha sonra ekim yapıp inkübasyona bırakılan örneklerin üst sıvısından aktivite tayini yapıldı.

#### **3.9.11. $\alpha$ -Amilaz Üretimi Üzerine Metal Tuzlarının Etkisinin İncelenmesi**

SSF besiyerleri hazırlandıktan sonra besiyeri hacminin % 0.1'i olacak şekilde metal iyonlarından  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ve  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  SSF besiyerlerine eklendi. 10 ml saf su ilave edilip sterilizasyon ve ekim yapıldı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. $\alpha$ -Amilaz Üretimi İçin Uygun Substratın Belirlenmesi

Çalışmamızda SSF besiyeri için pirinç kabuğu, buğday kepeği, mercimek kabuğu, arpa kabuğu, pamuk sapı ve öğütülmüş mısır küspesi kullanıldı. Yapılan aktivite ölçümleri sonucu en yüksek enzim sentezinin pirinç kabuğu içeren SSF ortamında gerçekleştiği belirlendi (Çizelge 4.1.).

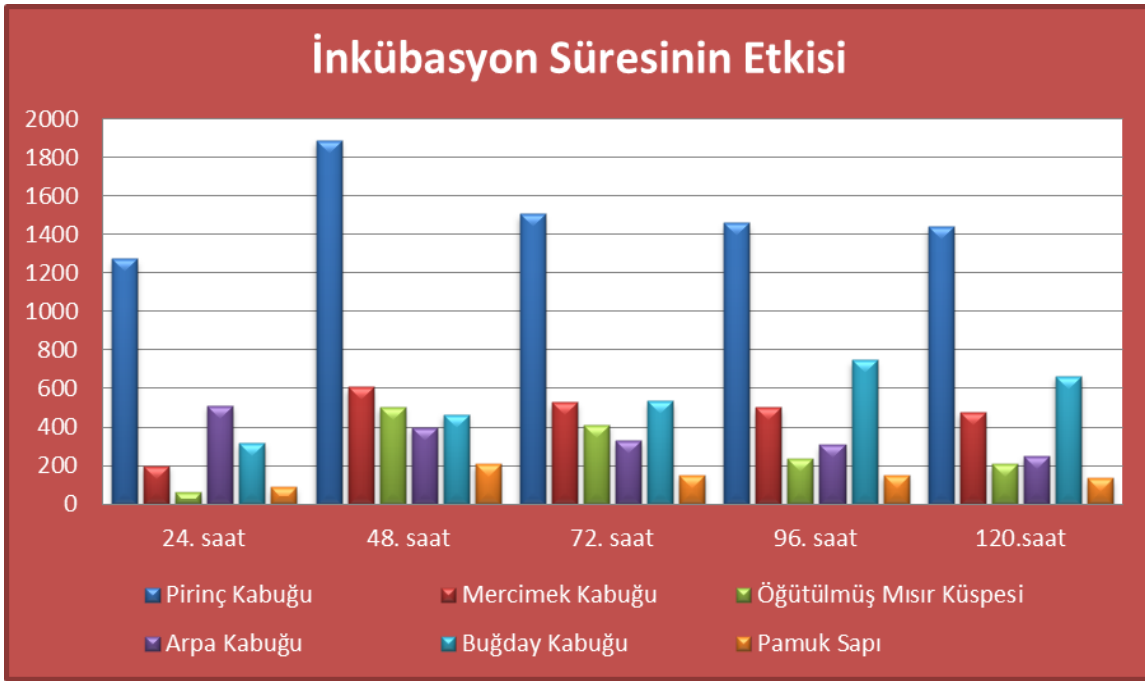
Saat	Substratlar					
	PK	MK	ÖMK	AK	BK	PS
	Amilaz Üretimi (U/mg)					
24	1273.5	199.0	62.7	511.2	317.3	89.6
48	1890.6	608.1	505.0	398.4	465.5	207.9
72	1506.5	529.0	412.8	331.7	535.9	152.5
96	1460.7	500.4	236.3	308.6	749.3	150.4
120	1439.9	478.5	209.2	247.1	665.9	134.9

**Çizelge 4.1.** Enzim üretimi üzerine substratın etkisi. PK: Pirinç Kabuğu, MK: Mercimek Kabuğu, ÖMK: Öğütülmüş Mısır Küspesi, AK: Arpa Kabuğu, BK: Buğday Kepeği (kontrol), PS: Pamuk Sapı

Farklı tarımsal atıkların bulunduğu SSF ortamında *B.licheniformis* ATCC 14580'nin 120. saat'e kadar üretilmesiyle ilgili sonuçlara göre maksimum  $\alpha$ -amilaz üretimi 48. saatte 1890.6 U/mg olarak pirinç kabuğunun bulunduğu ortamda elde edilmiştir. En yüksek aktivite pirinç kabuğunda elde edildiği için bundan sonraki çalışmalarımızda katı substrat olarak pirinç kabuğu kullanıldı. Aynı inkübasyon süresi için en düşük üretim 207.9 U/mg ile pamuk sapında elde edilmiş olup genel olarak en düşük enzim üretimi ise 24. saatte 62.7 U/mg ile öğütülmüş mısır küspesinde elde edilmiştir.

### 4.2. $\alpha$ -Amilaz Üretimi İçin Uygun İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi

Çalışmamızda enzim üretimi üzerine inkübasyon süresinin etkisini tespit etmek için hazırlanan örnekler inkübasyona bırakıldı. 24. saatten 120. saate kadar 24 saatte bir enzim aktivitesine bakıldı.  $\alpha$ -Amilaz için en uygun inkübasyon süresi 48. saat (1890.6 U/mg) olarak pirinç kabuğunda tespit edildi ve bu saatten sonra enzim üretiminde düşüş meydana geldiği gözlemlendi (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1.  $\alpha$ -Amilaz üretimi üzerine inkübasyon süresinin etkisi

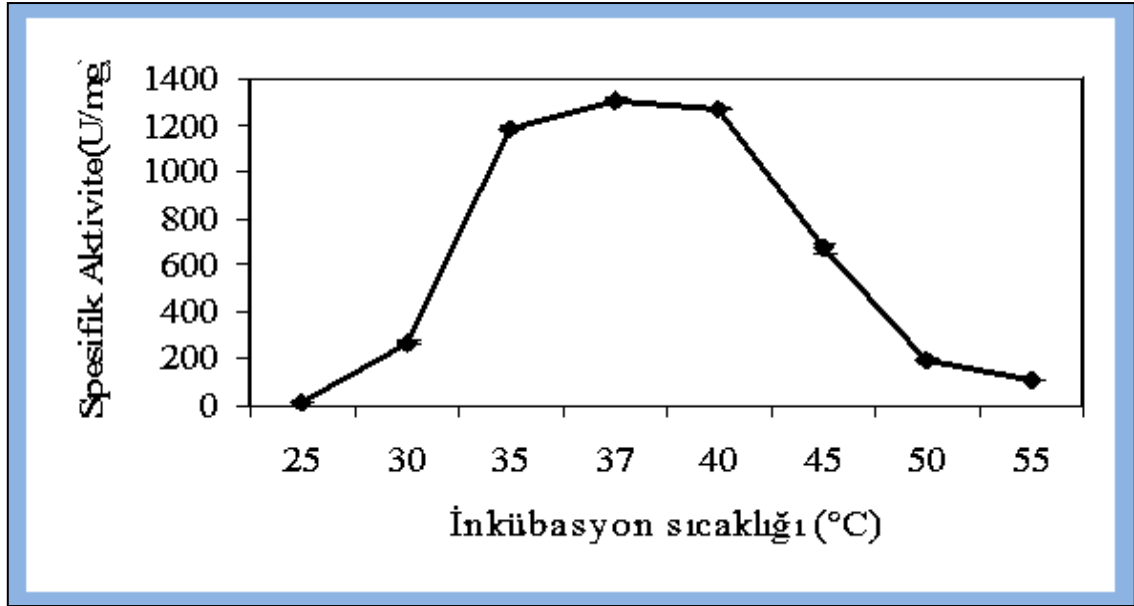
Aynı şekilde mercimek kabuğu, öğütülmüş mısır küspesi ve pamuk sapı da en yüksek enzim üretimlerini 48. saatte gerçekleştirmişlerdir. Bunun yanı sıra arpa kabuğu 24. saat, buğday kepeği ise 96. saatte en yüksek enzim üretimlerini gerçekleştirmişlerdir. En düşük enzim üretimi ise 24. saatte öğütülmüş mısır küspesinde elde edilmiştir.

### 4.3. $\alpha$ -Amilaz Üretimi Üzerine İnkübasyon Sıcaklığının Etkisi

İnkübasyon sıcaklığının  $\alpha$ -amilaz üzerine etkisini belirlemek için ekim yaptığımız pirinç kabuğu içeren SSF besiyerleri 25, 30, 35, 37, 40, 45, 50 ve 55°C de



inkübasyona bırakıldı.  $\alpha$ -Amilaz için en uygun üretim sıcaklığı 37°C (1304.39 U/mg) olarak tespit edildi (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2.  $\alpha$ -Amilaz üretimi üzerine inkübasyon sıcaklığının etkisi

$\alpha$ -Amilaz için optimum inkübasyon sıcaklığı 37°C olarak tespit edilmiş ve sıcaklığın yükselmesine paralel olarak enzim üretiminde düşüş meydana gelmiştir.

#### 4.4. $\alpha$ -Amilaz Üretimi İçin Optimum Ekstraksiyon ortamının Belirlenmesi

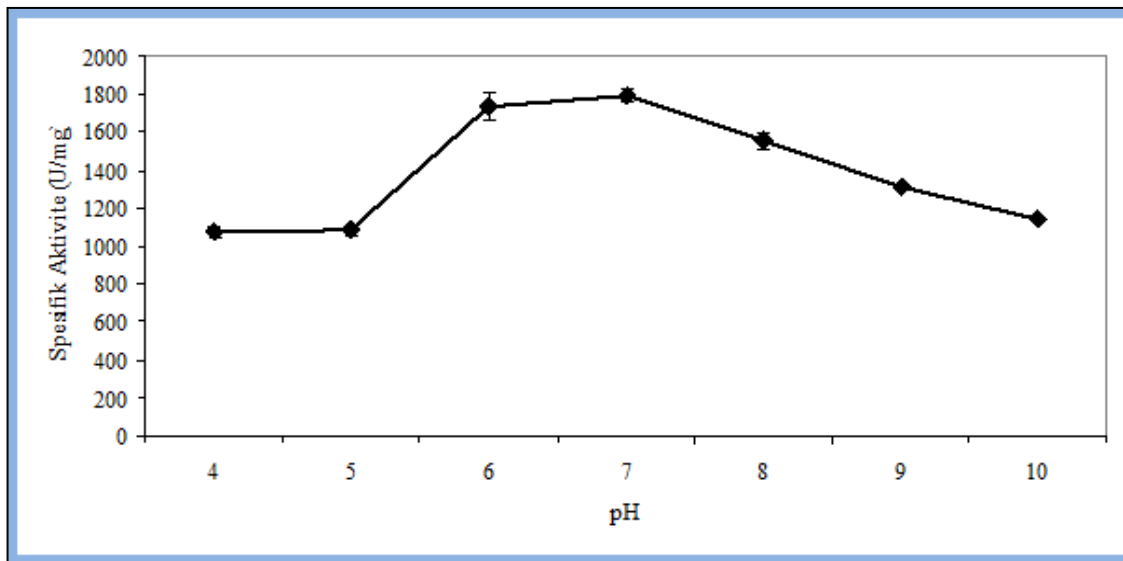
Ekstraksiyon ortamının  $\alpha$ -amilaz üzerine etkisini belirlemek için pirinç kabuğu içeren SSF besiyerine bakteri ekimi yapıldı. 48 saat'lik inkübasyondan sonra 10 ml çeşme suyu, % 1 TritonX100, % 1 Tween 40, % 0.5 NaCl, % 1 SDS, 10 ml saf su ilave edilerek 30 dk sonra enzim aktivite tayinine bakıldı. Enzim için en uygun ekstraksiyon ortamının % 0,5'lik NaCl olduğu tespit edildi. En düşük üretim ise pH 7.0 fosfat tamponunda elde edildi (Çizelge 4.2.).

Ekstrasyon Medyumu (10ml)	Spesifik Aktivite (U/mg)
<b>Çeşme suyu (kontrol)</b>	<b>1531.3±27.1</b>
Saf su	1486±14.0
NaCl (%0.5)	1832.9±63.7
Tampon (pH:7.0)	896.5±40.9
SDS (%1)	1316.5±27.5
TweenX100 (%1)	1406.3±34.1
Triton-40 (%1)	1250.2±9.0

**Çizelge 4.2.**  $\alpha$ -Amilaz üretimi üzerine ekstraksiyon ortamının etkisi

#### 4.5. $\alpha$ -Amilaz Üretimi İçin Optimum pH'nın Belirlenmesi

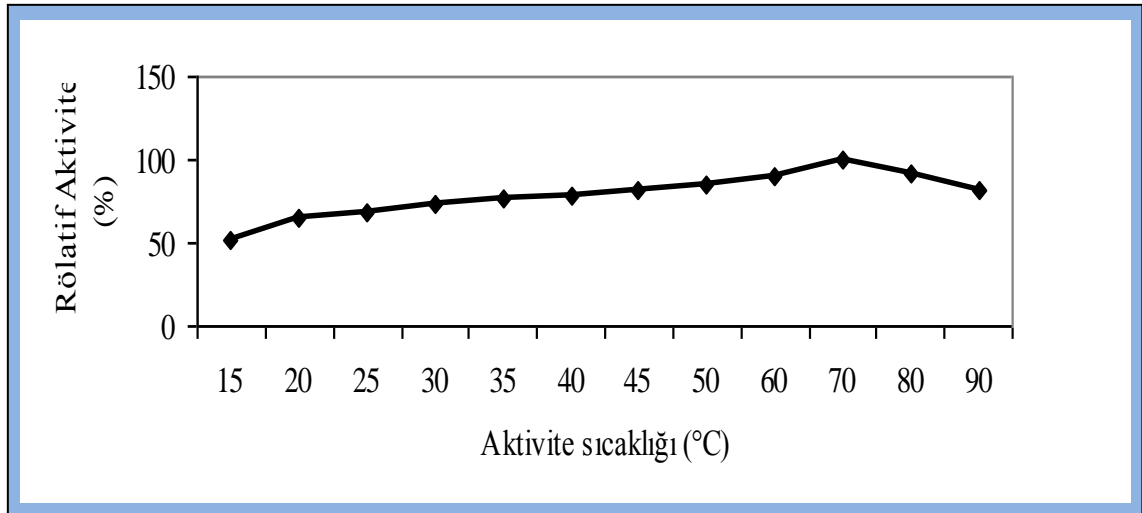
$\alpha$ -Amilaz üzerine başlangıç pH'sının etkisini belirlemek için çeşme suyu kullanıldı. Çeşme suyunun pH'sı pH 4.0'dan pH 10.0'a kadar 0.1M HCl ve 0.1M NaOH ile ayarlanarak pirinç kabuğu içeren SSF besiyerlerine hazırladığımız farklı pH'lardaki çeşme suyundan 10'ar ml ilave edildikten sonra besiyerleri otoklavlanıp bakteri ekimi yapıldı. Örnekler 37°C'de inkübe edildikten sonra üst sıvı alınarak enzim aktivite tayini yapıldı.  $\alpha$ -Amilaz için optimum pH değeri pH 7.0 (1796.235 U/mg) olarak tespit edildi (Şekil 4.3.).



**Şekil 4.3.**  $\alpha$ -Amilaz üretimi üzerine başlangıç pH'sının etkisi

#### 4.6. $\alpha$ -Amilazın Aktivite Sıcaklığının Belirlenmesi

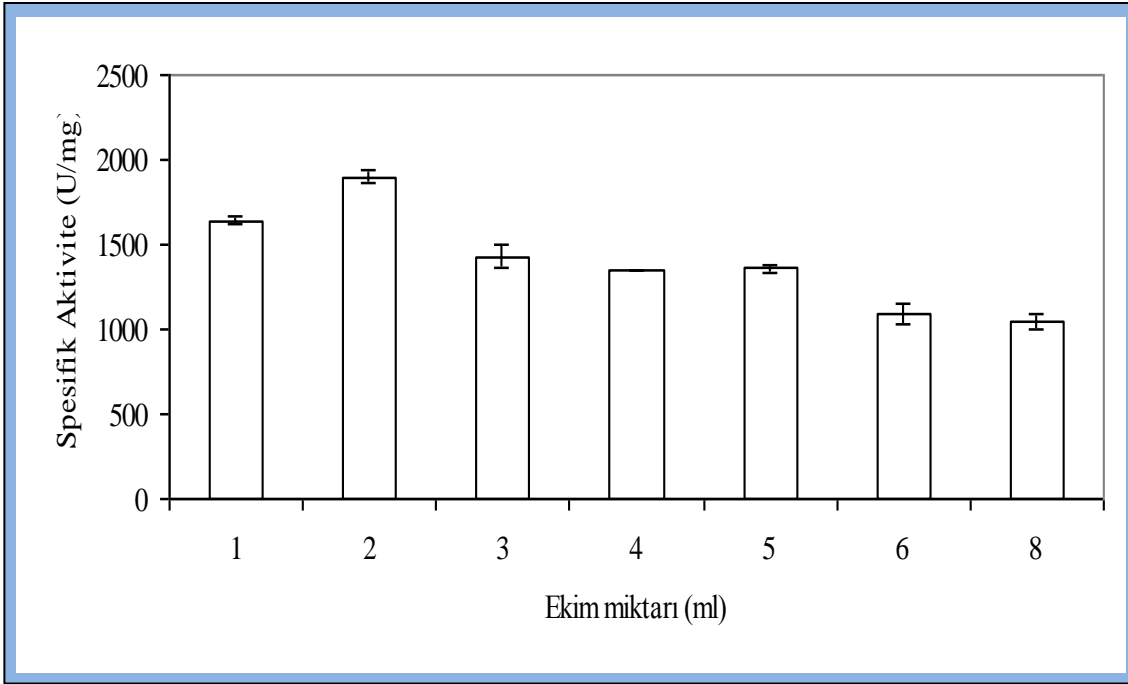
$\alpha$ -Amilazın aktivite sıcaklığını tespit etmek için rekasiyon başlatıldıktan sonra örnekler 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80 ve 90°C sıcaklık aralıklarında 30 dakika inkübe edildikten sonra aktivite tayini yapıldı. Sonuç olarak enzim için optimum aktivite sıcaklığı 70°C olarak tespit edildi (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4.  $\alpha$ -Amilaz için optimum aktivite sıcaklığı

#### 4.7. $\alpha$ -Amilaz İçin Uygun İnokülüm Hacminin Belirlenmesi

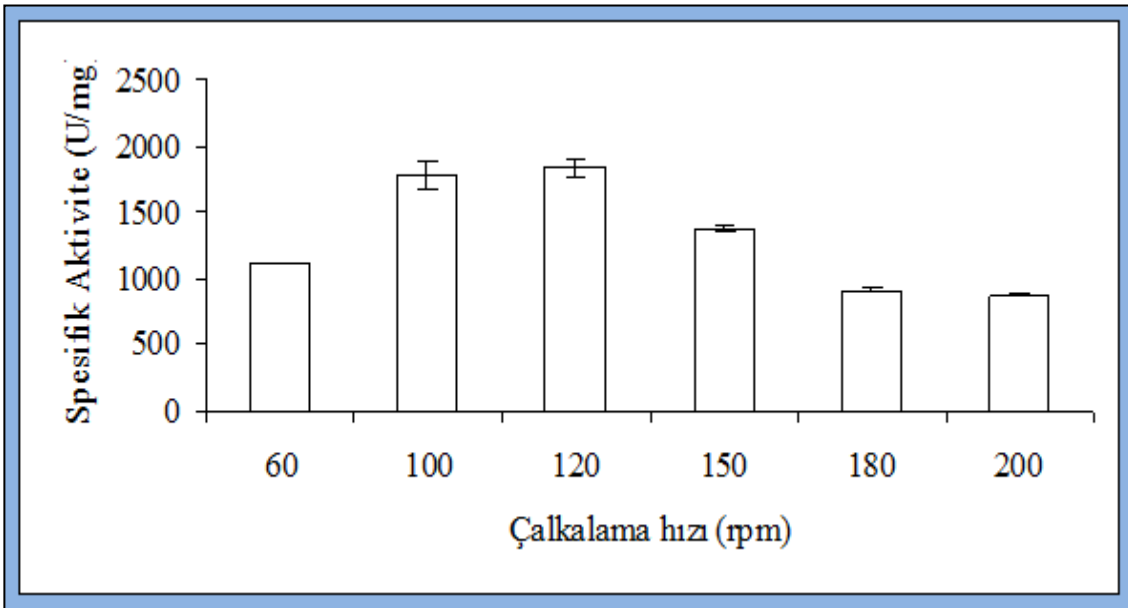
Pirinç kabuğunun substrat kaynağı olarak kullanıldığı SSF besiyerine, besi yeri hacminin % 10, 20, 30, 40, 60 ve 80'i olacak şekilde 1000  $\mu$ l'den 8000  $\mu$ l'ye kadar değişen miktarlarda bakteri ekimi yapıldıktan sonra örnekler inkübasyona bırakıldı. Daha önceden belirlediğimiz optimum inkübasyon süresi olan 48. saatte örneklerin üst sıvısı alınarak aktivite tayini yapıldı.  $\alpha$ -Amilaz için optimum ekim miktarı 2 ml (1901.096 U/mg) olarak belirlendi (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5.  $\alpha$ -Amilaz için uygun ekim miktarı

#### 4.8. $\alpha$ -Amilaz Üretimi İçin Optimum Çalkalama Hızının Belirlenmesi

Çalkalama hızının enzim üretimi üzerine etkisini belirlemek için pirinç kabuğu içeren SSF besiyerleri bakteri ekiminden sonra sırasıyla 60, 100, 120, 150, 180 ve 200 rpm farklı çalkalama hızlarında inkübasyona bırakıldı.  $\alpha$ -Amilaz için en uygun çalkalama hızı 120 rpm (1836.55 U/mg) olarak belirlendi (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6.  $\alpha$ -Amilaz için optimum çalkalama hızı

#### 4.9. $\alpha$ -Amilaz Üretimi Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi

Azot kaynaklarının  $\alpha$ -amilaz üzerine etkilerini belirlemek için pirinç kabuğunun substrat kaynağı olarak kullanıldığı besiyerine, besiyeri hacminin % 1'i kadar azot kaynaklarından kazein, pepton, tripton, yeast ekstrakt, beef ekstrakt amonyum nitrat, amonyum sülfat, amonyum klorür eklendikten sonra 10 ml çeşme suyu ilave edilerek hazırlanmış olan örnekler otoklava bırakıldı. Daha sonra hazırlanan besiyerlerine bakteri ekimleri yapılarak inkübasyona bırakıldı. 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda üst sıvı alınarak aktivite tayini yapıldı. Sonuç olarak tripton, amonyum nitrat, amonyum sülfat ve amonyum klorürün enzim üretimini çok küçük miktarda inhibe ettiği, kazein, pepton, yeast ekstrakt ve beef ekstraktın ise enzim üretimini büyük oranda inhibe ettiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.3.)

Azot kaynağı (%1)	Spesifik Aktivite (U/mg)
<b>*Kontrol</b>	<b>1458.1±13.6</b>
<b>Kazein</b>	<b>840.3±8.4</b>
<b>Pepton</b>	<b>959.4±17.7</b>
<b>Tripton</b>	<b>1386.3±19.9</b>
<b>Yeast ekstrakt</b>	<b>914.3±15.6</b>
<b>Beef ekstrakt</b>	<b>995.1±9.9</b>
<b>Amonyum nitrat</b>	<b>1414.5±17.2.7</b>
<b>Amonyum sülfat</b>	<b>1323.1±21.4</b>
<b>Amonyum klorür</b>	<b>1316.1±28.3</b>

Çizelge 4.3. Enzim üretimi üzerine azot kaynaklarının etkisi

#### 4.10. $\alpha$ -Amilaz Üretimi Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisi

Karbon kaynaklarının  $\alpha$ -amilaz enzimi üzerine etkilerini belirlemek için pirinç kabuğunun substrat kaynağı olarak kullanıldığı besiyerine, besiyeri hacminin % 1'i kadar karbon kaynaklarından glukoz, galaktoz, fruktoz, maltoz, laktoz ve sukroz eklendikten sonra ekimi yapılan besiyerleri inkübasyona bırakıldı. 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda üst sıvı alınarak aktivite tayini yapıldı.

#### 4. BULGULAR

Sonuç olarak laktozun enzim üretimini % 50 civarında inhibe ettiği, glukoz, galaktoz, fruktoz, maltoz ve sukrozun ise  $\alpha$ -amilaz üretimini büyük oranda inhibe ettiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.4.)

Karbon kaynağı (%1)	Spesifik Aktivite (U/mg)
<b>*Kontrol</b>	<b>1403±12.8</b>
Glikoz	96.7±18.4
Galaktoz	84.9±51.7
Fruktoz	11.6±3.4
Maltoz	276.6±29.1
Laktoz	715.5±7.1
Sukroz	403.5±36.8

Çizelge 4.4. Enzim üretimi üzerine karbon kaynaklarının etkisi

#### 4.11. $\alpha$ -Amilaz Üretimi Üzerine Metal Tuzlarının Etkisi

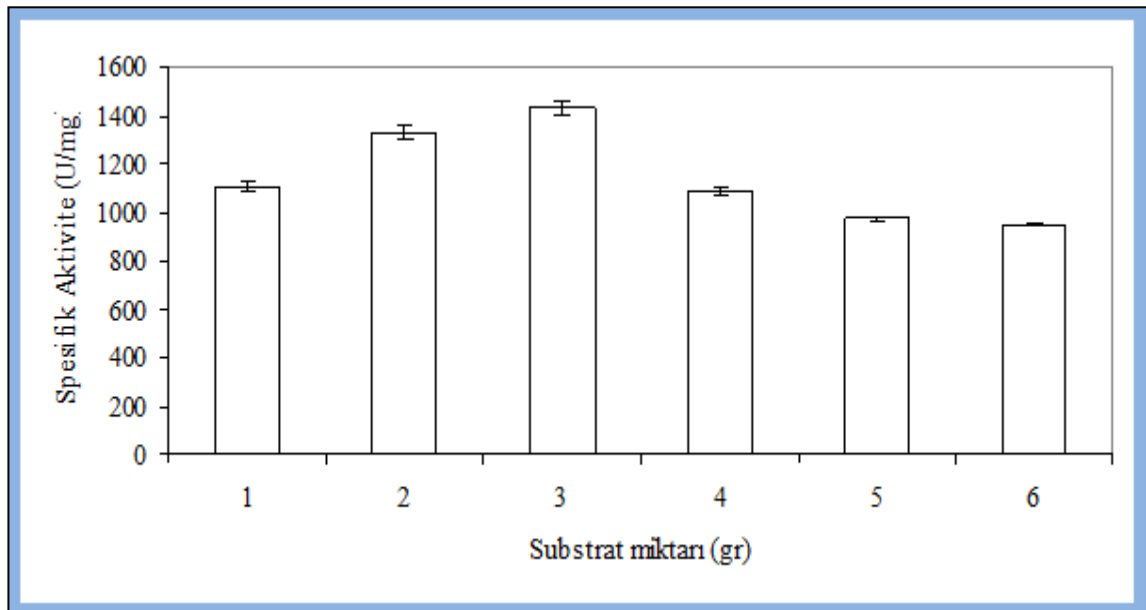
Metal tuzlarının  $\alpha$ -amilaz üzerine etkilerini belirlemek için pirinç kabuğunun substrat kaynağı olarak kullanıldığı besiyerine, besiyeri hacminin % 0,1'i kadar metal tuzlarından  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $CaCl_2$ ,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  ve  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 'nun SSF'te homojen bir şekilde dağılması için 10 ml saf su içinde çözünmesi sağlandıktan sonra besiyerine ilave edilerek otoklava alındı. Daha sonra bakteri ekimi yapılarak besiyerleri inkübasyona alındı. 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda üst sıvı alınarak aktivite tayini yapıldı. Sonuç olarak  $MgSO_4$ 'ün enzim üretimini arttırdığı,  $CaCl_2$ 'nin enzim üretimini eser miktarda azalttığı,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  ve  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 'nun ise  $\alpha$ -amilaz üretimini büyük oranda inhibe ettiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.5.).

Karbon kaynağı (%1)	Spesifik Aktivite (U/mg)
<b>*Kontrol</b>	<b>1399.7±2.3</b>
MgSO <sub>4</sub>	1553.7±17.1
ZnSO <sub>4</sub>	104.8±5.0
CaCl <sub>2</sub>	1357.6±24.6
CuSO <sub>4</sub>	85.8±8.0
FeSO <sub>4</sub>	282.7±21.8

Çizelge 4.5. Enzim üretimi üzerine metal tuzlarının etkisi

#### 4.12. $\alpha$ -Amilaz Üretimi İçin Uygun Substrat Miktarının Belirlenmesi

SSF besiyerine, besiyeri hacminin % 10, 20, 30, 40, 50 ve 60'ı olacak şekilde sırasıyla 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 gr pirinç kabuğu ilave edildi. Üzerine 10 ml çeşme suyu eklendikten sonra otokolava bırakıldı. Ekim işlemlerinden sonra yapılan aktivite tayini sonucunda enzim için en iyi aktivite 3 gr pirinç kabuğu içeren besiyerinde (1430.157 U/mg) tespit edildi (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7.  $\alpha$ -Amilaz için uygun substrat miktarı





## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Moleküler biyoloji ve gen teknolojisi alanlarında kaydedilen büyük gelişmeler, biyoteknolojideki hızlı değişim ve ilerleyişin tetikleyicisi olmuş ve bu teknoloji, giderek daha fazla sayıda sanayi ve hizmet sektörünü kapsar ve etkiler hale gelmiştir. Biyoteknolojik gelişmelere paralel olarak enzimlerin kullanım alanları ve önemleri de her geçen gün artmaktadır. Hücrelerde oldukça önemli metabolik görevleri olan enzimler, biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen makromoleküllerdir ve çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere gündelik ve ekonomik hayata girmiştir. Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Çünkü mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmaması, daha stabil ve ucuz olması ve fazla miktarda elde edilebilmeleri gibi avantajları vardır.

$\alpha$ -Amilaz önemli endüstriyel enzimlerden biridir. Nişastanın sıvılaştırılması, alkol üretimi, kağıt sanayi, tekstil sanayi, deterjan sanayi, fırıncılık ve sağlık sektörü gibi pek çok alanda kullanılır. Pek çok organizma ekstraselüler amilaz üretme yeteneğindedir ancak bu organizmaların pek azı doğal nişastayı parçalama yeteneğinde olan amilazları üretebilir. Bu nedenle etkili doğal nişasta sakkarafikasyonu için yeni enzim üreticilerine ihtiyaç duyulmaktadır (Sasaki ve ark. 1986). Çalışmamızda *Bacillus licheniformis* ATCC 14580'den  $\alpha$ -amilaz üretimi üzerine bir takım parametrelerin etkisini araştırarak optimum koşulları belirlemeye çalıştık.

Çalışmada uygun substratı belirlemek için SSF besiyerinde substrat kaynağı olarak pirinç kabuğu, buğday kepeği, mercimek kabuğu, öğütülmüş mısır küspesi, arpa kabuğu ve pamuk sapı kullanıldı. Yapılan enzim aktivite tayinleri sonucunda  $\alpha$ -amilaz için en uygun substratın pirinç kabuğu olduğu tespit edildi.

Karataş ve ark. (2012) tarafından *Bacillus licheniformis* ZB-05 bakterisinde SSF yöntemi kullanılarak amilaz ve proteaz üretimi üzerine 8 ayrı tarımsal bitki atığının test edildiği bir çalışmada en iyi katı substratın pirinç kabuğu olduğunu tespit etmişlerdir ( $\alpha$ -amilaz için 443 U/g, proteaz için 469 U/g). % 2 oranındaki çözünür nişastanın  $\alpha$ -amilaz üretimini arttırdığı gözlenirken % 1 oranındaki maltozun ise proteaz üretimini arttırdığı tespit edildi.

Çalışmada  $\alpha$ -amilaz için optimum inkübasyon süresi 48. saat olarak belirlendi. 48. saatten sonra  $\alpha$ -amilaz üretiminde düşüş meydana gelmiştir. Mikrobiyal büyüme, ortamda besin tükendiği için durgunluk evresine girer ve sekonder metabolitlerin üretimi başlayarak, enzim sentezi ve aktivitesi düşüş gösterir (Francis ve ark. 2002). Ayrıca besiyerindeki diğer bileşikler ile etkileşimden dolayı meydana gelen enzim denatürasyonu yüzünden de enzim sentezi ve aktivitesi azalmaktadır (Ramesh ve Lonsane 1987).

Baysal ve ark. (2003) Diyarbakır-Çermik sıcak su kaynağından izole ettikleri termotoleran *Bacillus subtilis* bakterisinden SSF tekniğiyle  $\alpha$ -amilaz elde etmişlerdir. Çalışmada buğday kepeği (WB) ve pirinç kabuğu (RH) substrat olarak kullanılmış ve enzim üretimi için optimum şartlar belirlenmeye çalışılmıştır. Yaklaşık inkübasyon süresi, nem seviyesi, parçacık büyüklüğü ve inokülüm konsantrasyonunu belirlemiştir. Maksimum ürün miktarı buğday kepeği ve pirinç kabuğunda sırasıyla 159.520 U/g ve 21.760 U/g, 0.1M pH 7 fosfat tamponunda % 30 nem seviyesi ile 24. ve 48. saatlerde elde edilmiştir.

Çalışmamızda optimum inkübasyon sıcaklığını belirlemek için ekim yaptığımız pirinç kabuğu içeren SSF besiyerleri 25, 30, 35, 37, 40, 45, 50 ve 55°C de inkübasyona bırakıldı.  $\alpha$ -Amilaz için optimum inkübasyon sıcaklığı 37°C olarak belirlendi.

SSF kültürlerinde üretim sıcaklığı fermentasyonda kullanılan mikroorganizmanın büyüme kinetiklerine göre değişiklik göstermektedir. (Lonsane ve ark. 1985). Ramesh ve Lonsane (1989) substrat olarak buğday kepeği kullanarak *Bacillus licheniformis*' ten  $\alpha$ -amilaz üretmişler ve optimum üretim sıcaklığını 35°C olarak tespit etmişlerdir. Krishna ve Chandrasekaran (1996) substrat kaynağı olarak muz kabuğu kullandıkları SSF besiyerlerinde *Bacillus subtilis*' ten  $\alpha$ -amilaz üretmişler ve optimum üretim sıcaklığının 35°C olduğunu tespit etmişlerdir.

Rajagopalan ve Krishnan (2008) *Bacillus subtilis* KCC103'ten  $\alpha$ -amilaz üretmişler ve optimum inkübasyon süresini 48.saat, optimum inkübasyon sıcaklığını 37°C olarak tespit etmişlerdir.

Bu çalışmada  $\alpha$ -amilaz üretimi için optimum ekstraksiyon ortamı % 0.5'lik NaCl olarak tespit edildi.

Çalışmamızda enzimin optimum pH'sını belirlemek için ekim yaptığımız pirinç kabuğu içeren SSF besiyerleri pH 4.0-pH 10.0 aralıklarında inkübasyona bırakıldı. Enzim için optimum pH'nın 7.0 olduğu tespit edildi.

Katı substratın doğası pH gibi parametrelerin ölçümünde zorluk yaratır (Nigam ve Singh 1994). Çünkü pH elektrotları nemli katıların pH' sını ölçme yeteneğinde değildir (Lonsane ve ark. 1992).

Thippeswamy ve ark. (2006) endüstriyel atıklardan izole edilen bakteriyel suşu *Bacillus* olarak tanımlamışlar, suştan elde edilen termostabil ekstrasellüler amilaz kısmen saflaştırılmış ve enzim için optimum sıcaklık 60°C ve pH 6.5 olarak tespit edilmiştir.

Çalışmamızda enzim aktivasyon sıcaklığını belirlemek için reaksiyon başlatıldıktan sonra örnekler 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80 ve 90°C'de inkübasyona bırakıldı.  $\alpha$ -Amilaz için uygun aktivite sıcaklığı 70°C olarak belirlendi.

Shukla ve Kar (2006) *Bacillus licheniformis* ve *Bacillus subtilis*'ten elde ettikleri  $\alpha$ -amilazın 90°C ve 70°C'de, Anto ve ark. (2006) SSF tekniğiyle *Bacillus cereus* MTCC1305'ten elde ettikleri  $\alpha$ -amilazın 55°C'de, Tiwari ve ark. (2007) termofilik *Penicillium rugulosum*'dan elde ettikleri termostabil  $\alpha$ -amilazın 57°C'de ve Michelin ve ark. (2010) *Paecilomyces variotii*'den elde ettikleri termostabil  $\alpha$ -amilazın 60°C'de maksimum aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Çalışmada  $\alpha$ -amilaz için uygun inokülüm hacmini belirlemek için SSF besi yerine 1000  $\mu$ l'den 8000  $\mu$ l'ye kadar değişen miktarlarda bakteri ekimi yapıldıktan sonra örnekler inkübasyona bırakıldı. Yapılan aktivite tayini sonucunda  $\alpha$ -amilaz için optimum ekim miktarı 2 ml olarak belirlendi.

Baysal ve ark. (2003) Diyarbakır-Çermik sıcak su kaynağından izole ettikleri termotoleran *Bacillus subtilis* bakterisinden SSF tekniğiyle  $\alpha$ -amilaz elde etmişlerdir. Çalışmada buğday kepeği (WB) ve pirinç kabuğu (RH) substrat olarak kullanılmış ve enzim üretimi için optimum şartlar belirlenmeye çalışılmıştır. Partikül büyüklüğü ve inokülüm konsantrasyonunu buğday kepeği ve pirinç kabuğunda sırasıyla 1000  $\mu$ m, % 20 ve 500  $\mu$ m, % 15 olarak tespit etmişlerdir.

Çalışmada optimum çalkalama hızını belirlemek için SSF besiyerine bakteri ekimi yapıldıktan sonra sırasıyla 60, 100, 120, 150, 180 ve 200 rpm çalkalama hızlarında inkübasyona bırakıldı. Yapılan aktivite tayini sonucunda  $\alpha$ -amilaz için optimum çalkalama hızı 120 rpm olarak belirlendi.

Tanyıldızı ve ark. (2007) *Bacillus amyloliquefaciens*'ten SSF tekniğiyle  $\alpha$ -amilaz elde etmeye çalışmışlardır. En iyi enzim aktivitesini elde etmek için hayvan yemi olarak kullanılan ve oldukça ucuz olan mısır küspesini (CGM), yedi farklı konsantrasyonda incelemiştirler. 5-40 g/L arasında değişen miktarlarda kullanılan CGM'de en iyi enzim aktivitesini 30 g/L'de bulmuşlardır. Çalkalama hızının enzim üretimi üzerine etkisini incelemişler ve 100-150-200 rpm çalkalama hızlarından en iyi etkiyi 150 rpm olarak tespit etmişlerdir.

Çalışmada azot kaynaklarının enzim üzerine etkisini belirlemek için SSF besi yerine besiyeri hacminin % 1'i kadar azot kaynaklarından kazein, pepton, tripton, yeast ekstrakt, beef ekstrakt amonyum nitrat, amonyum sülfat, amonyum klorür eklendikten sonra 10 ml çeşme suyu ilave edilerek hazırlanmış olan örnekler otoklava bırakıldı. Daha sonra hazırlanan besiyerlerine bakteri ekimleri yapılarak inkübasyona bırakıldı. 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda yapılan aktivite tayini sonucunda kullanılan azot kaynaklarının amilaz üretimini belirli oranlarda inhibe ettiği tespit edildi.

Ray ve ark. (2008) *Bacillus brevis* MTCC 7521'den  $\alpha$ -amilaz üretimi üzerine karbon ve azot kaynaklarının etkisini araştırmışlardır. % 1 oranındaki karbon kaynaklarından çözünebilir nişasta, patates nişastası, manyok kökü nişastası, manyok kökü unu, buğday unu, tatlı patates nişastası ve tatlı patates unu kullanmışlar ve maksimum aktiviteyi patates nişastasında elde etmişlerdir. % 1 oranındaki azot kaynaklarından et özütü, maya özütü, pepton, kazein, amonyum klorid, asparajin, üre, amonyum sülfat, potasyum nitrat, amonyum molibdat ve amonyum nitrat kullanmışlar ve en iyi aktiviteyi et özütünde elde etmişlerdir.

Sodhi ve ark. (2005) SSF yöntemiyle *Bacillus* sp. PS-7'den  $\alpha$ -amilaz üretme çalışmalarında % 1 oranındaki karbon ve azot kaynaklarından en iyi azot kaynağı olarak soyayı ve en iyi karbon kaynağı olarak glukozu tespit etmişlerdir.

Yaptığımız çalışmada karbon kaynaklarının enzim üzerine etkisini belirlemek için SSF besiyerine besiyeri hacminin % 1'i kadar karbon kaynaklarından glukoz,

galaktoz, fruktoz, maltoz, laktoz ve sukroz eklendikten sonra ekimi yapılan besiyerleri inkübasyona bırakıldı. 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda yapılan aktivite tayini sonucunda kullanılan karbon kaynaklarının amilaz üretimini belirli oranlarda inhibe ettiği tespit edildi.

Sankaralingam ve ark. (2012) yapmış oldukları bir çalışmada SmF yöntemiyle *Bacillus licheniformis*'ten  $\alpha$ -amilaz üretimi üzerine bir takım parametrelerin etkisini araştırmışlar. Çalışmada  $\alpha$ -amilaz üretimi için optimum inkübasyon süresinin 48.saat, optimum sıcaklığın 30°C ve optimum pH'nın 7.0 olduğu saptanmıştır. Maximum amilaz üretimi üzerine farklı karbon kaynaklarının etkisi incelenmiş olup en yüksek amilaz miktarı laktoz içeren ortamda elde edilmiştir.

Yaptığımız çalışmada metal tuzlarının enzim üzerine etkisini belirlemek için SSF besiyerine besiyeri hacminin % 0,1'i kadar metal tuzlarından  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $CaCl_2$ ,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  ve  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 'nun SSF'te homojen bir şekilde dağılması için 10 ml saf su içinde çözünmesi sağlandıktan sonra besiyerine ilave edilerek otoklava alındı. Daha sonra hazırlanan besiyerlerine bakteri ekimleri yapılarak inkübasyona bırakıldı. 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda yapılan aktivite tayini sonucunda kullanılan metal tuzlarından  $MgSO_4$ 'ün enzim üretimini arttırdığı,  $CaCl_2$ 'nin enzim üretimini eser miktarda azalttığı,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  ve  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 'nun ise  $\alpha$ -amilaz üretimini büyük oranda inhibe ettiği tespit edilmiştir.

Lin ve ark. (1998) *Bacillus* sp. TS-23  $\alpha$ -amilazının aktivitesini 1 mM konsantrasyonda  $Hg^{+2}$ ,  $Pb^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  ve  $Cu^{+2}$  metallerinin inhibe ettiği,  $Ca^{+2}$  un ise arttırdığı; Goyal ve ark. (2005) *Bacillus* sp. I-3  $\alpha$ -amilazının  $FeSO_4$ ,  $CuSO_4$  ve  $MnSO_4$  varlığında aktivitesinin arttığını,  $HgCl_2$  ve EDTA varlığında da inhibe olduğunu rapor etmişlerdir. Her iki araştırmacı da enzim aktivitesinin metal iyonları tarafından etkilendiğini ve maksimum aktivite için kofaktör olarak metal iyonlarına ihtiyaç duyduğu için enzimi metalloprotein olarak adlandırmışlardır. Ayrıca EDTA' nın enzim aktivitesini inhibe etmesinin de bu durumu desteklediğini belirtmişlerdir.

Çalışmamızda SSF besiyerine sırasıyla 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 gr pirinç kabuğu ilave edildi. Üzerine 10 ml çeşme suyu eklendikten sonra otokolava bırakıldı. Ekim işlemlerinden sonra yapılan aktivite tayini sonucunda enzim için en iyi aktivite 3 gr pirinç kabuğu içeren besiyerinde tespit edildi.

Enzimlerin küresel pazardaki payı her geçen gün artmakta olup 2015 yılında yaklaşık olarak 4 milyar doları bulacağı tahmin edilmektedir. Yaptığımız çalışmada amilaz aktivitesi üzerine etki eden parametrelerin tespit edilen optimum değerlerinin kullanılmasıyla enzim aktivitesinde artış sağlanabileceği belirlenmiştir. Bu bağlamda yapılacak kapsamlı çalışmalar sonucunda gerek enzim verimi gerekse de endüstrideki kullanım alanları daha da arttırılabilir.

## 6. KAYNAKLAR

Abe, J.I., Bergmann, F.W., Obata, K., Hizukuri, S. 1988. Production of the raw starch digesting amylase of *Aspergillus* sp. K-27. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 27: 447-450.

Aiyer, P.V. 2005. Amylases are widely distributed and are one of the most studied enzymes. These enzymes have wide scale application ranging from textile to effluent treatment. *African Journal of Biotechnology*, 13: 1525-1529.

Akcan, N. 2009. Bazı *Bacillus* türlerinin ekstrasellüler enzimlerinin araştırılması, Doktora Tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.

Alexander, M. 1977. *Introduction to Soil Microbiology*. John Wiley and Sons, Inc., New York.

Anonymous. 1988. *Handbook of amylases and related enzymes*. Edited by the Amylase Research Society of Japan, Pergamon Press, Oxford.

Anto, H., Trivedi, H., Patel, K. 2006. Alpha amylase production by *Bacillus cereus* MTCC 1305 using solid-state fermentation. *Food Technol. Biotechnol*, 44: 241-245.

Asgher, M., Asad, M.J., Rahman, S.U., Legge, R.L. 2007. A thermostable  $\alpha$ -amylase from moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *Journal of Food Engineering*, 79: 950-955.

Bahçeci, H. 2004. Tuz Gölü bakteri izolatlarının yağ asidi metil ester analizi ve hücre dışı enzimlerin karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Bailey, J.E and Ollis, D.F. 1977. *Biochemical engineering fundamentals: International student edition*, pp: 39-50.

Baysal, Z., Uyar, F., AYTEKİN, Ç. 2003. Solid state fermentation for production of  $\alpha$ -amylase by a thermotolerant *Bacillus subtilis* from hot spring water. *Process Biochemistry*, 38: 1665-1668.

Beck, J., Sauvage, E., Charlier, P., Marchand-Brynaert, J. 2008. 2-Aminopropane-1,2,3- tricarboxylic acid: synthesis and co-crystallization with the class A  $\beta$ -lactamase BS3 of *Bacillus licheniformis*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 18: 3764-3768.

Bischoff, K.M., Liu, S., Hughes, Sr. 2007. Cloning and characterization of a recombinant family endoglucanase from *Bacillus licheniformis* Strain B-41361. *Process Biochemistry*, 42: 1150-1154.

Berkeley, R.C.W., Logan, N. 1997. Principles and practise of clinical bacteriology: *Bacillus*, *Alicyelobacillus* and *Paenibacillus*, Ed: Emmerson, A.M., Hawkey, P.M., Gillespie, S.H., *Biotechnol.*, 45: 327-332.

Bernfeld, P. 1955. Enzymes of starch degradation and synthesis: *Adv. in Enzymology*, 12: 379-428.

Ciccarelli, F.D., Doerks, T., von Mering, C., Creevey, C.J., Snel, B., Bork, P. 2006. Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. *Science*, 311: 1283–1287.

Cohn, F. 1962. Studies on the biology of the Bacilli. Brock, T.D. *Milestones in Microbiology*. Prentice-Hall, p 49-56 , Englewood Cliffs, N.J.

Crabb, W.D., Mitchinson, C. 1997. Enzymes involved in the processing of starch to sugars. *Trends Biotechnology*, No. 15: 349-352.

Couto, S.R., Sanroman, M.A. 2006. Application of solid state fermentation to food industry. *Journal of Food Engineering*, 76: 291-302.

Cowan, D. 1996. *Industrial enzyme technology*. TIBTECH, 14: 177-178.

Çağatay M., 1976, *Bitki Biyokimyası*, A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları (A.Ü. Basımevi), 98-109.

Çetin, E.T. 1983. *Endüstriyel Mikrobiyoloji*, İstanbul Tıp Fakültesi Vakfı, Bayda Yayın, I. baskı, 2: 145-146.

Dong, G., Vieille, C., Savchenko, A., Zeikus, J.G. 1997. Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding extracellular amylase from *Pyrococcus furiosus* and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Appl Environ Microbiol*, (63) 35: 69–76.

Dönmez, S. 1986. *Gıda sanayinde kullanılan enzimler ve ülkemizdeki durumu* A.Ü.Z.F. Gıda Bilimi ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Ankara.

Ekşi, A. 1988. Meyve suyu durultma tekniği. *Gıda Teknolojisi Derneği Dergisi*, Yayın No: 9, Sayfa: 127. Ankara.

El-Tayeb, O., Mohammad, F., Hashem, A., Aboulwafa, M. 2007. Optimization of the industrial production of bacterial alpha amylase in Egypt. IV. Fermentor production and



characterization of the enzyme of two strains of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. African Journal of Biotechnology, 7(24): 4521-4536.

Francis, F., Sabu, A., Nampoothiri, K. M., Szakacs, G., Pandey, A. 2002. Synthesis of  $\alpha$ -amylase by *Aspergillus oryzae* in solid state fermentation. Journal of Basic Microbiology, 42: 320-326.

Gangadharan, D., Sivaramakrishnan, S., Nampoothiri, K.M., Sukumaran, R.K., Pandey, A. 2008. Response surface methodology for the optimization of  $\alpha$ -amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens*. Bioresource Technology, 99: 4597- 4602.

Goyal, N., Gupta, J.K. and Soni, S.K. 2005. A novel raw starch digesting thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch. Enzyme and Microbial Technology, 37 (7): 723-734.

Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., Chauhan, B. 2003. Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. Process Biochem. 38: 1599-1616.

Hamilton, L.M., Kelly, C.T., Fogarty, W.M. 1999. Production and properties of the raw starch-digesting amylase of *Bacillus* sp. IMD 435. Process Biochem, 35: 27–31.

Hasegawa, K., Kubota, M., Matsuura, Y. 1999. Roles of catalytic residues in  $\alpha$ -amylase as evidenced by the structures of the product-complexed mutants of a maltotetraose forming amylase. Protein Eng, 12: 819–24.

Hashemi, M., Razavi, S.H., Shojaosadati, S.A., Mousavi, S.M., Khajeh, K., 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, 3: 333–337.

Hayashida, S., Teramoto, Y. and Inoue, T. 1988. Production and characteristics of raw potato starch digesting  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* 65. Applied and Environmental Microbiology, Vol., 54 (6): 1516-1522.

He, L., Chen, W., Liu, Y. 2006. Production and partial characterization of bacteriocin like pepitdes by *Bacillus licheniformis* Zju12. Microbiological Research, 161: 321-326.

Holt, J.G. 1986. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G. Gram-positive bacteria other than Actino- mycetes. Williams & Williams, Baltimore, M.D.

Hölker, U., Höfer, M., Lenz, J. 2004. Biotechnological advantages of laboratory scale solid-state fermentation with fungi. Applied Microbiology and Biotechnology, 64: 175-186.

Igarashi, K., Hatada, Y., Hagihara, H., Saeki, K., Takaiwa, M., Uemura, T., Ara, K., Ozaki, K., Kawai, S., Kobayashi, T., Ito, S. 1998. Enzymatic properties of a novel liquefying  $\alpha$ -amylase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate and entire nucleotide and amino acid sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 3282-3289.

Ismaya, W.T., Hasan, K., Subroto, T., Soemitro, S., Natalia Dessy. 2012. Chromatography as the major tool in the identification and the structure-function relationship study of amylolytic enzymes from *Saccharomycopsis fibuligera* R64. *Chromatography - The Most Versatile Method of Chemical Analysis*, ISBN 978-953-51-0813-9.

Kalimuthu, K., Babu, Sr., Venkataraman, D., Bilal, M., Gurunathan, S. 2008. Biosynthesis of silver nanocrystals by *Bacillus licheniformis* colloids and surfaces. *B: Biointerfaces*, 65:150–153.

Kandra, L. 2003.  $\alpha$ -Amylases of medical and industrial importance. *Journal of Molecular Structure (Teochem)* 666-667 p. 487-498.

Karataş, H., Uyar, F., Tolan, V., Baysal, Z. 2012. Optimization and enhanced production of  $\alpha$ -amylase and protease by a newly isolated *Bacillus licheniformis* ZB-05 under solid-state fermentation. *Ann Microbiol*, DOI 10.1007/s13213-012-0443-6.

Khajeh, K., Hosseinkhani, S., Dabirmanesh, B. 2010. Purification and characterization of a thermostable phytate resistant  $\alpha$ -amylase from *Geobacillus* sp. LH8. *Int J Biol Macromol*, 46 :27–36.

Khemahkem, B., Dahech, I., Belghuith, K., Mejdoub, H., Fendri, I., Kammoun, R. 2013. Purification and characterization of a maltogenic amylase from Fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seeds using the Box Benkhen Design (BBD). *Industrial Crops and Products* 43: 334-339.

Kıran, Ö.E., Çömlekçioğlu, U., Dostbil, N., 2006. Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları. *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi* 9 (1): 12-19.

Krishna, C., Chandrasekaran, M. 1996. Banane waste as substrate for  $\alpha$ - amylase production by *Bacillus subtilis* CBTK 106 under solid state fermentation. *Microbial Biotechnology*, 46: 106-111.

Kumar, M.D.J., Kalaichelvan, P.T., Kumaran, B., Amutha, B., Jayanthisiddhuraj, Devi, D.M. 2012. Purification and characterization of  $\alpha$ -amylase and  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus* sp. MNJ23 produced in a concomitant medium. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 12 (5): 566-573.

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., Singh, S. 2005. Amylase production in solid state fermentation by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100: 168-171.

Lehninger, A.L. 1987. *Biochemistry*, Vol II. Edit.Tehnica, Bucuresti., p: 473-503.

Lin, L. L., Chyau, C.C., and Hwei H. W., 1998. Production and properties of a raw starch degrading amylase from the thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. TS-23, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 28: 61-68.

Liu, M., Liu, F. 2008. Expression of recombinant *Bacillus licheniformis* xylanase A in *Pichia pastoris* and xylooligosaccharides released from xylans by it. *Protein Expression and Purification*, 57: 101–107.

Lonsane, B.K., Ghildyal, N.P., Budiartman, S., Ramakrishna S.V. 1985. Engineering aspects of solid state fermentations. *Enzyme and Microbial Technology*, 7: 258-265.

Lonsane, B.K., Castaneda, G.S., Raimbault, M., Roussos, S., Viniegra, G., Ghildyal, N.P., Ramakrishna, M., Krishnaiah, M.M. 1992. Scale up strategies for solid state fermentation systems. *Process Biochemistry*, 27: 259-273.

Madigan, T.M., Martinko, J.M., Stahl, D.A., Clark, D.P. 2011. *Brock Biology of microorganisms*, pp: 421.

Maldonado, H.G., Lopez, O. P. 1995. Amylolytic enzymes and products derived from starch. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35: 373-403.

Marlida, Y., Saari, N., Hassan, Z., Radu, S. 2000. Improvement in raw sago starch degrading enzyme production from *Acremonium* sp. endophytic fungus using carbon and nitrogen sources. *Enzyme and Microbial Technology*, 27: 511-515.

Matsubara, T., Ammar, Y. B., Anindyawati, T., Yamamoto, S., Ito, K., Iizuka, M., Minamiura, N. 2004. Molecular cloning and determination of the nucleotide sequence of raw starch digesting  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus awamori* KT-11. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 37 (4): 429-438.

Menevşe, A., Menevşe, S. 1982. *Temel Biyokimya, A.İ.T.İ.A., Gazetecilik ve Halkla İlişkiler Yüksek Okulu Basımevi, Ankara, 144.*

Michelin, M., Silva, T. M., Benassi, V. M., Peixoto-Nogueira, S. M., Moraes, L.A., Leão, J. M., Jorge, J. A., Terenzi, H. F., Polizeli, M. L. 2010. Purification and characterization of a thermostable  $\alpha$ -amylase produced by the fungus *Paecilomyces variotii*. Carbohydrate Research, 345: 2348–2353.

Morita, H., Fukuoka, Y.F. 1997. High specific activity of raw-starch digesting glucoamylase producing *Rhizopus* sp. A-11 in liquid culture. Starch, 49: 293-296.

Mukherjee, A.K., Borah, M., Rai, S.K. 2009. To study the influence of different components of fermentable substrates on induction of extracellular  $\alpha$ -amylase synthesis by *Bacillus subtilis* DM-03 in solid state fermentation and exploration of feasibility for inclusion of  $\alpha$ -amylase in laundry detergent formulations. Biochemical Engineering Journal, 43: 149-156.

Nagasaka, Y., Muraki, N., Kimura A., Suto M., Yokota A., Tomita F. 1995. Cloning of *Corticium rolfii* glucoamylase cDNA and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Applied Microbiology and Biotechnology, 44: 451- 458.

Nelson, D.L., Cox, M.M. 2005. Lehninger Principles of Biochemistry, Sayfa: 248

Nigam, P., Singh, D. 1994. Solid-state (substrate) fermentation systems and their applications in biotechnology. Journal of Basic Microbiology, 34: 405-423.

Niu, D., Zuo, Z., Shi, G.Y, Wang, Z.X. 2009. High yield recombinant thermostable  $\alpha$ -amylase production using an improved *Bacillus licheniformis* system. Microbial Cell Factories, doi: 10.1186/1475-2859-8-58.

Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C.R., Nigam, P. 1999. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. Current Science, 77: 149-162.

Pandey, A., Soccol, C.R., Mitchell, D. 2000. New developments in solid state fermentation; Bioprocesses and Products. Process Biochemistry, 35: 1153–1169.

Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C.R., Soccol, V.T., Singh, D., Mohan, R. 2000. Advances in microbial amylases. Biotechnol Appl Biochem, 31: 135–52.

Pandey, A. 2003. Solid state fermentation. Biochemical Engineering Journal, 13: 81-84.

Pandey A, C.R., Soccol, J.A.R., Leon, Nigam, P. 2004. Solid-state fermentation in biotechnology. New Delhi: Asiatech Publishers Inc.

Pandey, A. S., Ramachandran, S., Webb, C. 2005. Enzyme Technology, New Delhi: Asiatech Publishers Inc., 15: 349-352.

Perez-Guerra, N., Torrado- Agrasar, A., Lopez-Macias, C., Pastrana, L. 2003. Main characteristics and applications of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Environmental Agricultural and Food Chemistry*, No. 2(3).

Pignatelli, M., Moya, A., Tamames, J. 2009. Env. DB, a database for describing the environmental distribution of prokaryotic taxa. *Environ. Microbiol. Rep.*, 1: 191– 197.

Qihe, C., Guoqing, H., Jinling, W. 2007. Acid shock of elastase-producing *Bacillus licheniformis* ZJUEL31410 and its elastase. *Characterization evaluation of Food Engineering*, 80: 490–496.

Rahardjo, Y.S.P., Korona, D., Haemers, S., Weber, F.J., Tramper, J., Rinzema, A. 2004. Limitations of membrane cultures as a model solid-state fermentation system. *Letters in Applied Microbiology*, 39: 504–508.

Rahardjo, Y.S.P., Weber, F.J., Haemers, S., Tramper J., Rinzema, A. 2005. Aerial mycelia of *Aspergillus oryzae* accelerate  $\alpha$ -amylase production in a model solid state-fermentation system. *Enzyme and Microbial Technology*, 36: 900-902.

Rajagopalan, G., Krishnan, C. 2008. Optimization of medium and process parameters for a constitutive  $\alpha$ -amylase production from a catabolite derepressed *Bacillus subtilis* KCC103. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 83: 654-661.

Ramesh, M.V., Lonsane, B.K.. 1987. Solid state fermentation for production of  $\alpha$ -amylase by *Bacillus megaterium* 16M. *Biotechnology Letters*, 5: 323-328.

Ramesh, M.V., Lonsane, B.K. 1989. Solid state fermentation for production of higher titres of thermostable alpha amylase with two peaks for ph optima by *Bacillus licheniformis* M 27. *Biotechnology Letters*, 1: 49-52.

Ray, R.C., Kar, S., Nayak, S., Swain, M.R. 2008. Extracellular  $\alpha$ -amylase production by *Bacillus brevis* MTCC7521. *Food Biotechnology*, 22: 234-246.

Riaz, A., Anwar, A., Iqbal, S., Qader UI, S.A. 2009. Immobilization of a thermostable  $\alpha$ -amylase on calcium alginate beads from *Bacillus subtilis* KIBGE-HAR. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(3): 2883-2887.

Sankaralingam, S., Kumar, C., Shankar, T., Ramasubburayan, R., Prakash, S. 2012. Optimization of culture conditions for the production of amylase from *Bacillus licheniformis* on submerged fermentation. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 12(11): 1507-1513.

Sarıkaya, E. 1995.  $\alpha$ -Amilaz üreten bazı *Bacillus* suşlarının gelişme parametreleri, enzim özellik ve üretim koşullarının optimizasyonu. Doktora Tezi, AÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Sarıkaya, E., Higasa, T., Adachi, M., Mikami, B. 2000. Comparison of degradation abilities of  $\alpha$ - and  $\beta$ -amylases on raw starch granules. *Process Biochemistry*, 35: 711-715.

Sasaki H., Kurosawa, K., Takao, S. 1986. Screening of microorganisms for raw starch saccharifying enzyme production. *Agricultural Biology and Chemistry*, 50: 1661-1664.

Sharma, A., Satyanarayana, T. 2013. Microbial acid-stable  $\alpha$ -amylases: Characteristics, genetic engineering and applications, *Process Biochemistry*, 48: 201–211.

Shukla, J., Kar, R. 2006. Potato peel as a solid state substrate for thermostable amylase production by thermophilic *Bacillus* isolates . *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 22: 417–422.

Singhania, R.R., Patel, A.K., Soccol, C.R., Pandey, A. 2009. Recent advances in solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 44: 13-18.

Sodhi, H. K., Sharma, K., Gupta, J. K., Soni, S. K. 2005. Production of a thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* PS-7 by solid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production. *Process Biochemistry*, 40: 525-534.

Swinkels, J.J.M. 1985. Composition and properties of commercial native starches. *Starch*, 37: 1-5.

Switzer Blum, J., BurnsBindi, A., Buzzelli, J., Stolz, J.F., Oremland, R.S. 1998. *Bacillus arsenicoselenatis*, sp.nov. and *Bacillus selenitireducens*, sp.nov.: two haloalkaliphiles from Mono Lake, California that respire oxyanions of selenium and arsenic. *Arch. Microbiol.*, 171: 19–30.

Taniguchi, H., Honda, Y. 2009. Ishikawa Prefectural University, Nonoichi, Elsevier Inc. All rights reserved. Defining Statement, 159-179.

Tanyıldızı, M.S., Özer, D., Elibol, M. 2007. Production of bacterial  $\alpha$ -amylase by *Bacillus amyloliquefaciens* under solid substrate fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 37: 294-297.

Telefoncu, A. 1997. Enzimlerin Endüstriyel Uygulamaları. Marmara Araştırma Merkezi Lisans Üstü Yaz Okulu (E.M.T.U) 21-27 Eylül , Aydın. 1: 5-8.

Thippeswamy, S., Girigowda, K., Mulimani, V.H. 2006. Isolation and identification of  $\alpha$ -amylase producing *Bacillus* sp. from dhal industry waste. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 43: 295-298.

Tiwari, K.L., Joadhav, S.K., Fatima, A. 2007. Culture condition for the production of thermostable amylase by *Penicillium rugolosum*. *Global Journal of Biotechnology/Biochemistry*, 2: 21-24.

Vishnu, C., Navenna, B. J., Altaf, MD., Venkateshwear, M., Reddy, G. 2006. Amylopullulanase a novel enzyme of *L. amylophilus* GV6 in direct fermentation of starch to L(+) lactic acid. *Enzyme Microb Technol*, 38: 545–550.

Vihinen, M., Mantsala, P. 1989. Microbial amylolytic enzymes. *Cri Rev Biochem Mol Biol*, 24: 329–418.

Wiesman, A. 1987. *Handbook of enzyme biotechnology*. Second Edition. Chapter 3. The application of enzymes in industry, 274-373.

Windish, W.W., Mhatra, N.S. 1965. Microbial amylase. *Advanture Applied Microbial*, 7: 273-304.

Winkelmann, G., Antranikian, G. 1992. Microbial degradation of starch, *Microbial degradation of natural products*, p 27–56. Weinheim, Germany.

Wu, D., Hugenholtz, P., Mavromatis, K., Pukall, R., Dalin, E., Ivanova, N.N., Kunin, V., Goodwin, L., Wu, M., Tindall, B.J., Hooper, S.D., Pati, A., Lykidis, A., Spring, S., Anderson, I.J., D’Haeseleer, P., Zemla, A., Singer, M., Lapidus, A., Nolan, M., Copeland, A., Han, C., Chen, F., Cheng, J.F., Lucas, S., Kerfeld, C., Lang, E., Gronow, S., Chain, P., Bruce, D., Rubin, E.M., Kyrpides, N.C., Klenk, H.P., Eisen, J.A. 2009. A phylogeny-driven genomic encyclopaedia of Bacteria and Archaea. *Nature*, 462: 1056–1060.

Yenson, M. 1981. *İnsan Biyokimyası*, İst. Üniv. Tıp Fakültesi Biyokimya Kürsüsü, 143-145.

[<https://www.bio.cmu.edu/courses/03231/psetF04/pset9/pset9ans.html>] Erişim Tarihi 02.06.2013

[<https://www.hekimce.com/index.php?kiid=1039>] Erişim Tarihi 02.06.2013





## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı** : Emrah DEMİRAY

**Doğum Yeri** : Diyarbakır

**Doğum Tarihi** : 20/10/1986

**Medeni Hali** : Bekar

**Yabancı Dili** : İngilizce

### Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

**Lise** : Ziya Gökalp Lisesi-2003.

**Lisans** : Dicle Üniversitesi/Fen Edebiyat Fakültesi/Biyoloji Bölümü-2010

**Yüksek Lisans** : Dicle Üniversitesi/Fen bilimleri Enstitüsü-2013