

**T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TERMOFİLİK *Anoxybacillus sp.* AH1'de α -AMİLAZ
ENZİMİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

Ömer ACER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DİYARBAKIR
HAZİRAN- 2010**

**T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TERMOFİLİK *Anoxybacillus sp.* AH1'de α -AMİLAZ
ENZİMİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

Ömer ACER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN: Prof. Dr. Kemal GÜVEN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI


**DİYARBAKIR
HAZİRAN-2010**

T.C
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DIYARBAKIR


Ömer ACER tarafından yapılan “ Termofilik *Anoxybacillus sp.* AH1’de α -Amilaz Enzimi Üzerine Çalışmalar” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyesinin

Ünvanı Adı Soyadı

Başkan : Prof. Dr. Kemal GÜVEN (Danışman) 

Üye : Doç. Dr. Fikret UYAR 

Üye : Doç. Dr. Sait ERDOĞAN 

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

...../...../ 2010

Prof. Dr. Hamdi TEMEL

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

(MÜHÜR)

ÖZ

Bu çalışmada Dargeçit (Mardin) sıcak su kaplıcalarından izole edilen termofilik *Anoxybacillus sp.* AH1'de biyoteknolojik öneme sahip olan α -amilaz enziminin bazı özelliklerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Anoxybacillus sp. AH1 NB besiyerinde üretildi ve değişik inkübasyon sürelerinde α -amilaz aktivitesi ölçüldü. Maksimum enzim üretimi 12–24 saatleri arasında tespit edildi.

pH ve sıcaklık etkisi sırasıyla pH 4.0–11.0 ve 30–90 °C'de hem ham enzimde hemde kısmi olarak saflaştırılan enzimde araştırıldı. Enzimin optimum pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla 7.0 ve 60 °C olarak bulundu.

Enzim üretimi üzerine değişik besiyerlerinin, % 1'lik farklı azot ve % 0.5-% 1 oranlarında farklı karbon kaynaklarının ve nişastaların etkisi incelendi. Maksimum enzim üretimi NB1 besiyerinde elde edildi. En iyi azot kaynağı pepton ve beef ekstrakt, en iyi karbon kaynağı ise % 0.5 oranlarındaki maltoz, glukoz ve laktoz olarak belirlendi. Ayrıca % 0.5 ve % 1 oranlarındaki patates nişastasının ve % 1 oranında çözünebilir nişastanın enzim üretimini arttırdığı tespit edildi.

Enzim üretimi üzerine çeşitli konsantrasyonlarda CaCl_2 'nin etkisi araştırıldı. CaCl_2 varlığında enzim üretiminin arttığı tespit edildi. Maksimum enzim üretimi 20 mM'da elde edildi.

Anoxybacillus sp. AH1'de α -amilaz kısmi olarak saflaştırıldı ve enzim aktivitesi üzerine bazı kimyasalların, metallerin, metal şelatörlerin ve deterjanların etkisi incelendi.

MgCl_2 (8 mM'da % 41) ve CaCl_2 'nin (8 mM'da % 70) α -amilaz aktivitesini belirli oranlarda arttırdığı, ZnCl_2 (0.5 mM'da % 85 ve 1 mM'da % 93), CuCl_2 'nin

(0.5 mM'da % 76 ve 1 mM'da % 100) ve metal şelatörleri olan EDTA (10 mM'da % 63) ve 1,10-phenanthroline'nin (10 mM'da % 22) ise yüksek oranda inhibe ettiği tespit edildi. β -mercaptoethanol (10 mM'da % 64) ve DTT'nin (10mM'da % 100) α -amilaz aktivitesini geniş ölçüde arttırdığı, PCMB (4mM'da % 52) ve PMSF'nin (4mM'da % 60) ise enzim aktivitesini belirli oranlarda inhibe ettiği tespit edildi. Iodaacetamide ve N-ethylmaleimide'nin enzim aktivitesini çok az etkilediği görüldü. Enzim aktivitesinin çeşitli deterjanlar varlığında arttığı; fakat üre tarafından güçlü bir şekilde inhibe edildiği tespit edildi.

K_m ve V_{max} gibi kinetik parametreleri α -amilazın % 0.5-% 3 (w/v) oranlarında tamponda hazırlanan çözünabilir nişasta ile inkübasyona bırakılarak hesaplandı. K_m ve V_{max} değerleri Lineweaver–Burk plot'a göre sırasıyla 0.102 mM ve 0.929 μ mol/dk. olarak hesaplandı.

Enzimin 45 °C'nin üzerindeki sıcaklıklara duyarlı olduğu ve termal stabilitesinin gliserol ve sorbitol tarafından artırıldığı belirlendi. % 30 gliserol varlığında enzimin 55 °C ve 60 °C' de 120 dakika sonunda orijinal aktivitesini sırasıyla % 99 ve % 85 oranında koruduğu tespit edildi.

Enzimin elektroforetik analizi nondenatüre poliakrilamid jel elektroforezi ile yapıldı.

Anahtar Kelimeler:, *Anoxybacillus sp.* AH1, Biyoteknoloji, α -amilaz enzim üretimi, enzim karakterizasyonu

ABSTRACT

The purpose of this study was some properties of biotechnologically important α -amylase enzyme produced by thermophilic *Anoxybacillus sp.* AH1 isolated from Dargeçit (Mardin) hot springs examined.

Anoxybacillus sp. AH1 was grown on NB medium and α -amylase activity was measured at different incubation time. Maximum enzyme production was determined 12-24 hours.

The effect of pH and temperature on the α -amylase activity was tested pH 4.0-11.0 and 30-90 °C both crude enzyme and partially purified enzyme respectively. The optimum pH and temperature for enzyme were found as 7.0 and 60 °C respectively.

The effect of different medium, different nitrogen sources in 1% ratios and different carbon sources and starches in 0.5 % and 1% ratios on the production of α -amylase was investigated. Maximum enzyme production observed on NB1 medium. The best nitrogen source was determined as pepton and beef extract, While The best carbon source was determined as maltose, glucose and lactose in % 0.5 ratios. Enzyme production was also enhanced in the presence of potato starch in % 0.5 and % 1 ratios and soluble starch in % 1 ratios.

The effect of various concentration of CaCl_2 on the enzyme production was examined. The enzyme production was increased in the presence of CaCl_2 . Maximum enzyme production was achieved at the presence of 20 mM CaCl_2 .

α -Amylase in *Anoxybacillus sp.* AH1 was partially purified and the effect of some chemicals, metals and metal chelators and detergents on the enzyme activity was studied.

MgCl₂ (% 41 at 8 mM) and CaCl₂ (% 70 at 8 mM) were found to increase α -amylase activity at certain rates, while ZnCl₂ (% 85 at 0.5 mM and % 93 at 1 mM), CuCl₂ (% 76 at 0.5 mM and % 100 at 1 mM) and the metal chelators EDTA (% 63 at 10 mM) and 1,10-phenanthroline (% 22 at 10 mM) inhibited the enzymatic activity at high rates. β -Mercaptoethanol (% 64 at 10 mM) and DTT (more than % 100 at 10 mM) were found to enhance α -amylase activity great extent, while PCMB (% 52 at 4 mM) and PMSF (% 60 at 4 mM) inhibited the enzymatic activity at certain rates. Iodoacetamide and N-ethylmaleimide were found to have a little effect on the enzyme activity. The enzyme activity was found to increase in the presence of various detergents, while significantly inhibited by the concentrations of urea.

The kinetic parameters such as K_m and V_{max} were determined by the incubating the α -amylase with various concentrations of soluble starch ranging from % 0.5 to % 3 (w/v) in buffer. K_m and V_{max} were calculated from Lineweaver-Bulk plot. as 0.102 mM and 0.929 μ mol/min. respectively.

The enzyme was found to be sensitive to above 45 °C and the thermal stability was enhanced by glycerol and sorbitol. It was determined enzyme retained % 99 and % 85 original activity at 55 °C and 60 °C respectively after 120 minutes In the presence of % 30 glycerol.

The enzyme electrophoretic analysis was performed by Nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis.

Key Words: *Anoxybacillus sp.* AH1, Biotechnology, α -amylase, enzyme production, enzyme characterization

TEŞEKKÜR

Öncelikle çalışmalarım sırasında benden hiçbir yardımını esirgemeyen, bana büyük emeği geçen, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak beni yönlendiren danışman hocam sayın **Prof. Dr. Kemal GÜVEN**'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hem Deneysel aşamalarda hemde hesaplamalarda benden bilgi ve becerisini esirgemeyerek çalışmalarına katkıda bulunan Sayın **Arş. Gör. Fatma MATPAN BEKLER**'e teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel aşamalarda bilgi ve deneyimlerini paylaşan ve bazı kimyasalların temininde yardımcı olan sayın **Dr. Reyhan GÜL GÜVEN**'e teşekkürlerimi sunarım.

Deneylerimin spektrofotometrik ölçümlerinde Biyokimya Laboratuvarı'nın imkânlarından faydalanmamı sağlayan sayın **Prof. Dr. Çetin AYTEKİN, Doç. Dr. Zübeyde BAYSAL** ve **Dr. M. Hüseyin ALKAN**'a teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım sırasında yardım ve desteğini gördüğüm değerli yüksek lisans arkadaşım **Alevcan KAPLAN**'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarına yapmış olduğu katkılardan dolayı değerli arkadaşım **Hamşi PİRİNÇÇİOĞLU**'na teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında manevi desteğini gördüğüm sayın **Arş. Gör. Özlem DEMİRCİ**'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Aynı laboratuvarı paylaştığımız yüksek lisans ve doktora arkadaşlarıma ve Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Komisyonunun projemize vermiş olduğu destekten dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca her türlü maddi ve manevi desteğini gördüğüm ve her zaman yanımda olduklarını hissettiren mükemmel aileme en içten şükranlarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
ŞEKİLER DİZİNİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
KAYNAKLAR.....	5
KAYNAK ARAŞTIRMASI	
2.1. Biyoteknoloji.....	7
2.2. Enzimler	8
2.2.1. İntraselüler Enzimler.....	11
2.2.2. Ekstraselüler Enzimler.....	11
2.3. Amilazlar.....	12
2.3.1. β -Amilazlar (α -1,4-glucan maltohidrolaz, EC 3.2.1.2).....	13
2.3.2. γ -Amilazlar (exo-1,4- α -D-glucan glucanohydrolase EC 3.2.1.3).....	13
2.3.3. α -Amilazlar (endo-1,4- α -D-glucon glucohydrolase, EC 3.2.1.1).....	13
2.3.3.1. α -Amilaz Kaynakları.....	14
2.4. Nişasta.....	14
2.4.1. Nişastanın Enzimatik Hidrolizi.....	16
2.5. α -Amilazın Endüstriyel Kullanım Alanları.....	17
2.5.1. α -Amilazın Deterjan Endüstrisinde Kullanımı.....	18

2.5.2. α -Amilazın Tekstil Endüstrisinde Kullanımı.....	18
2.5.3. α -Amilazın Nişastanın Sıvılaştırılmasında ve Şekerlendirilmesinde Kullanımı.....	19
2.5.4. α -Amilazın Kağıt Endüstrisinde Kullanımı.....	20
2.5.5. α -Amilazın Tıpta Kullanımı.....	20
2.5.6. α -Amilazın Fırıncılıkta Kullanımı.....	20
2.6. Termofilik Mikroorganizmalar ve Enzimlerinin Biyoteknolojide Kullanılması.	21
2.6.1. Termostabil Amilazlar.....	24
2.7. <i>Anoxybacillus</i> Cinsi.....	26
2.8. Önceki Çalışmalar.....	27
KAYNAKLAR.....	36

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Biyolojik Materyal.....	45
3.2. Kimyasal Maddeler.....	45
3.2.1. Karbon Kaynakları.....	45
3.2.2. Nişastalar.....	45
3.2.3. Azot Kaynakları.....	45
3.2.4. Besiyeri Maddeleri.....	45
3.2.5. Kimyasallar.....	46
3.2.6. Deterjanlar.....	46
3.2.7. Elektroforetik Maddeler.....	46
3.3. Besiyerleri.....	46
3.3.1. Sıvı Besiyerleri.....	46

3.3.2. Katı Besiyeri.....	47
3.4. Tamponlar.....	47
3.5. Kullanılan Aletler.....	48
3.6. Bakteri Üretimi.....	48
3.7. Enzim Eldesi.....	49
3.8. α -Amilaz Enzimi Aktivite Tayini.....	49
3.9. Enzim Üretimi Üzerine Değişik İnkübasyon Sürelerinin Araştırılması.....	50
3.10. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi.....	50
3.11. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	50
3.12. Enzim Üretimi Üzerine Değişik Besiyerlerinin Etkisi.....	51
3.13. Enzim Üretimi Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisinin Araştırılması.....	51
3.14. Enzim Üretimi Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisinin Araştırılması.....	51
3.15. Enzim Üretimi Üzerine Nişastaların Etkisinin Araştırılması.....	52
3.16. Enzim Üretimi Üzerine CaCl_2 'nin Etkisinin Araştırılması.....	52
3.17. Protein Miktar Tayini.....	52
3.18. Enzimin Kısmi Olarak Saflaştırılması.....	53
3.19. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasal Maddelerin Etkisi.....	54
3.20. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metal ve Şelatör Maddelerin Etkisi.....	54
3.21. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Deterjanların Etkisi.....	55
3.22. Enzimin Kinetik Parametrelerinin Hesaplanması.....	55
3.23. Enzimin Sıcaklık Stabilitesinin Saptanması.....	55
3.24. Gliserol ve Sorbitolun Enzimin Sıcaklık (Termal) Stabilitesine Olan Etkisinin Araştırılması.....	56

3.25. Gliserolun Enzimin Sıcaklık Stabilitesi Üzerine Koruyucu Etkisinin Araştırılması.....	56
3.26. Elektroforez.....	57
3.26.1. Nondenatüre Poliakrilamid Jel Elektroforezi (Laemmli, 1977).....	57
3.26.2. Jelin Hazırlanması.....	57
3.26.3. Elektroforez İşlemi.....	58
KAYNAKLAR.....	60

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. BULGULAR

4.1.1. Değişik İnkübasyon Sürelerinin Enzim Üretimi Üzerine Etkisi.....	61
4.1.2. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi.....	61
4.1.3. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	62
4.1.4. Enzim Üretimi Üzerine Değişik Besiyerlerinin Etkisi.....	62
4.1.5. Enzim Üretimi Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi.....	62
4.1.6. Enzim Üretimi Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisi.....	63
4.1.7. Enzim Üretimi Üzerine Nişastaların Etkisi.....	63
4.1.8. Enzim Üretimi Üzerine CaCl ₂ 'nin Etkisi.....	64
4.1.9. Enzimin Kısmi Olarak Saflaştırılması.....	64
4.1.10. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasal Maddelerin Etkisi.....	65
4.1.11. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metallerin ve Metal Şelatörlerin Etkisi.....	66
4.1.12. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Deterjanların Etkisi.....	67
4.1.13. Enzimin Kinetik Parametrelerinin Hesaplanması.....	67
4.1.14. Enzimin Sıcaklık Stabilitesinin Saptanması.....	67

4.1.15. Gliserol ve Sorbitolun Enzimin Sıcaklık (Termal) Stabilitesine Olan Etkisi.	68
4.1.16. Gliserolun Enzimin Sıcaklık Stabilitesi Üzerine Koruyucu Etkisi.....	69
4.1.17. α-Amilazın Elektroforetik Analizi.....	69
4.2. TARTIŞMA.....	71
4.3. ŞEKİLLER.....	85
KAYNAKLAR.....	94
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	99
KAYNAKLAR.....	103
ÖZGEÇMİŞ.....	104

ÇİZELGELERİN DİZİNİ

Çizelge 2.1. Enzimlerin Sınıflandırılması

Çizelge 2.2. Biyoteknolojik Öneme Sahip Bazı Enzimler ve Kullanım Alanları

Çizelge 2.3. Bazı Ekstremozimler ve Uygulama Alanları

Çizelge 2.4. Bazı Mikrobiyal Termostabil Amilaz Kaynakları

Çizelge 4.1. Kısmi saflaştırma tablosu

Çizelge 4.2. α -Amilaz aktivitesi üzerine bazı kimyasal maddelerin etkisi

Çizelge 4.3. α -Amilaz aktivitesi üzerine bazı metal ve şelatörlerin etkisi

ŞEKİLLERİN DİZİNİ

Şekil 2.1. Nişastanın amiloz formu

Şekil 2.2. Nişastanın amilopektin formu

Şekil 2.3. Nişastanın amilaz tarafından hidrolizi

Şekil 4.1. α -Amilaz üretimi üzerine inkübasyon sürelerinin etkisi

Şekil 4.2. α -Amilaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

Şekil 4.3. α -Amilaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Şekil 4.4. α -Amilaz üretimi üzerine değişik besiyerlerinin etkisi

Şekil 4.5. α -Amilaz üretimi üzerine azot kaynaklarının etkisi

Şekil 4.6. α -Amilaz üretimi üzerine karbon kaynaklarının etkisi

Şekil 4.7. α -Amilaz üretimi üzerine nişastaların etkisi

Şekil 4.8. α -Amilaz üretimi üzerine CaCl_2 'nin etkisi

Şekil 4.9. α -Amilaz aktivitesi üzerine ürenin etkisi

Şekil 4.10. α -Amilaz aktivitesi üzerine % 0.5'lik deterjanların etkisi

Şekil 4.11. Lineweaver–Burk plot α -amilaz K_m ve V_{max} grafiği

Şekil 4.12. Zamana bağlı α -amilaz sıcaklık stabilite tayini

Şekil 4.13. Gliserol ve sorbitolun α -amilaz sıcaklık stabilitesine etkisi

Şekil 4.14. % 30'luk gliserolün α -amilaz sıcaklık stabilitesine etkisi

Şekil 4.15. Nondenatüre Poliakrilamid Jel Elektroforezi

SİMGELER ve KISALTMALAR

NB; Nutrient Broth

DNS; 3,5 dinitro salisilik asit

FCR; Folin reaktifi

DTT; Dithiothreiol

PMSF; Phenylmethylylsulfonyl fluoride

EDTA; Etilen diamin tetra asetik asit

PCMB; p-chloromercuribenzoic acid

TEMED; Tetrametil etilen daimin

SDS; Sodyum dodesil sülfat

Rpm; Devir/dakika

APS; Amonyum persülfat

BFB; Brom Fenol Blue

LB; Laura Broth

Km; Michaelis-Mentensabiti (mM)

Vmax; Maksimum hız ($\mu\text{mol/ dk}$)

1. GİRİŞ

Enzimlerin birçok uygulamadaki rolü, uzun zamandan beri bilinmekte olup kullanımını oldukça eskiye dayanmaktadır¹. Enzimler, fonksiyonları ve özellikleri anlaşılmadan uzun süre önce kullanılmaya başlanmıştır². Mikroorganizmalar tarafından üretilen enzimler ilk olarak ekmek, bira, peynir ve alkol üretimi gibi işlemlerde kullanılmıştır¹. O dönemlerde enzimler, daha saf ve daha iyi karakterize edilmiş bir biçimde kullanılamamıştır³.

19. yüzyılın başlamasıyla enzimlerin fermantasyon prosesindeki potansiyelleri anlaşılmıştır. 1860'ta Louis Pasteur enzimlerin fermantasyonda temel olduğunu anlamış fakat enzimlerin katalitik özelliklerinin maya hücreleriyle ayrılmaz bir şekilde bağlantılı olduğunu iddia etmiştir. 1897'de Yunan kimyacı Edward Buchner, enzimlerin bu hücrelerden bağımsız olarak şekerleri, alkol ve karbondioksite fermente ettiğini bulmuştur. Bu önemli başarı enzimlerin hücrelerden bağımsız olarak işlev görebileceklerinin ilk göstergesi olmuştur. 1926'da Amerikalı biyokimyacı J.B. Sumner ilk kez kristalize formda üreaz enzimini elde etmiştir. 1930–1936 yılları arasında ilk olarak pepsin, tripsin ve kimotripsin gibi protein yapısında olan enzimler dikkatli bir şekilde kristalize edilmiştir. 1980'e kadar bütün enzimlerin protein olduğuna inanılıyordu fakat günümüzde tüm enzimlerin protein yapısında olmadığı bilinmektedir. Aynı zamanda enzim olarak ta görev yapabilen RNA moleküllerinin yapısında protein bulunmadığı bilinmektedir². Modern biyoteknolojinin gelişmesiyle beraber, son 40 yılda enzim endüstrisi büyük ilerleme kaydetmiştir. Bu sayede endüstriyel öneme sahip olan enzimlerin, daha saf, ucuz ve bol miktarda üretimine olanak sağlanmıştır³. Enzimlerle ilgili daha fazla bilgi edinilmesi ve enzimlerin saflaştırılması, enzimlerin uygulama alanlarını da büyük

ölçüde artırmıştır. Termostabil enzimlerin kullanılabilirliği de endüstriyel uygulamalara yeni birçok imkan kazandırmıştır¹.

Enzimler, canlı hücreler tarafından sentezlenen, protein yapısında olan ve biyolojik aktiviteye sahip olan moleküllerdir⁴. Kendileri hiçbir değişikliğe uğramadan reaksiyon oranlarını yükseltirler. Küçük mikroorganizmalardan insanlara kadar doğadaki tüm canlılarda mevcuttur. Hücre içi, stoplazma, mitokondri, doku ve vücut sıvıları gibi yapılara yerleşmişlerdir². Canlılar, binlerce çeşit enzim ihtiva etmeleri ve hayatsal olayları bu enzimler sayesinde düzenlemek suretiyle yaşamlarını devam ettirmektedirler⁴.

Endüstriyel enzimlerin dünya genelindeki kullanımı, 1995'te 1 milyar dolar iken, 2000 yılında 1,5 milyar Dolara ulaşmıştır³. Dünya enzim endüstrisindeki kullanım alanının %29'unu gıda sektörü, %15'ini hayvan yemi sektörü ve %56'sını genel teknik alanları oluşturmaktadır.⁵

Enzim teknolojisi; ekonomik, etkili ve biyoteknolojik tekniklere olan büyük ihtiyaç nedeniyle ilerleme kaydetmiştir. Biyoteknoloji sayesinde, yeni tür enzimlerin büyük ölçeklerde ve ekonomik olarak üretilmesi mümkün olmuştur. Buna göre bir enzimin herhangi bir endüstri alanında kullanılabilirliği; maliyet bakımından ucuz olmasını, çok farklı alanlarda kullanılabilme özelliğinde olmasını ve en önemlisi de enzimin alerjik ya da toksik etkiye sahip olmamasını gerektirmektedir⁶.

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler, genelde mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bunun nedeni mikroorganizma kaynaklı enzimlerin, bitkisel ve hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olmaları, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, fazla miktarda elde edilebilmeleridir. Bugün endüstride kullanılan enzimlerin çoğu mikrobiyal kökenli

olduğu için, endüstriyel enzimlerin kullanımında, mikroorganizma kullanımı artmıştır⁷.

Sıcak su kaplıcıklarından elde edilen sıcaklığa dayanıklı termofil bakterilerin biyoteknolojik kullanımı son yıllarda büyük önem kazanmıştır. Bu mikroorganizmalar ekstrem şartlarda benzersiz biyokatalizörler üretirler. Bu mikroorganizmalarca üretilen enzimler deterjan, gıda, tekstil, sağlık, Moleküler Biyoloji (PCR), kozmetik gibi birçok endüstri alanında kullanılmaktadır⁸.

Termofilik mikroorganizmalardan izole edilen termostabil enzimler, içsel stabilitelelerinden kaynaklı olarak birçok ticari uygulama alanına sahip olmuştur¹. Bu mikroorganizmalarca üretilen enzimler, yüksek sıcaklıklarda denatüre olmadıkları için büyük ilgi çekmektedir⁹.

Mikrobiyal enzimlerin dünya genelindeki kullanım oranının % 25'ini alkalın proteazlar, % 21'ini diğer proteazlar, % 10'unu rennin, % 3' ünü lipaz, % 3'ünü diğer karbonhidrazlar, % 10'unu analitik ve eczacılıkta kullanan enzimler ve % 18'ini amilazlar oluşturmaktadır.¹⁰

Amilazlar dekstrin, oligosakkarid ve glukoz molekülleri gibi farklı ürünler elde etmek için, nişastayı parçalayan endüstriyel öneme sahip enzimler arasındadır¹¹. Gıdadan fermantasyona, tekstilden kağıt endüstrisine kadar geniş uygulamalarla, günümüz biyoteknolojisinde önemli bir yere sahiptir. Bu enzimler, bitiki, hayvan ve mikrobiyal kökenli olmakla beraber, endüstriyel kullanımlarda mikrobiyal enzimler tercih edilmektedir. Günümüzde ticari olarak birçok mikrobiyal amilaz mevcut olup, nişasta endüstrisinde kimyasal hidrolizin yerini almıştır¹².

Endüstriyel enzimlerin bir sınıfını oluşturan α -amilazlar, dünya enzim marketinin yaklaşık %25'ini oluştururlar¹³. α -Amilazlar, nişastadaki glikozidik

bağları rastgele yerlerinden hidroliz eden endoamilazların bir üyesidirler¹⁴. α -Amilaz ((1,4) α -glukan, glukanhidroksilaz, E.C 3.2.1.1), nişastayı diğer amilazlar için kullanılabilir duruma getirmek suretiyle, nişasta konversiyon teknolojisinde anahtar rol oynamaktadır¹³. Mikrobiyal α -amilazlar, nişasta hidrolizinin yanı sıra kimya, tekstil, eczacılık, gıda, deterjan gibi endüstrilerde de kullanılmaktadır¹¹.

Bu çalışmanın amacı, Mardin ili Dargeçit sıcak su kaplıcasından izole edilen, 16S rRNA, morfolojik ve fizyolojik analizler sonucunda tanımlanan *Anoxybacillus* sp. AH1 tarafından salgılanan α -amilaz enzimi üzerinde bazı çalışmalar yapmaktır. Biyoteknolojik açıdan önemli enzimler, hem sağlık hem de endüstri alanında uygulama alanı bulmaktadır. Bu açıdan, enzimlerin daha ekonomik şartlarda üretimi, karakterize edilmesi ve özelliklerinin bilinmesi bu alanlara önemli katkı sağlayacaktır. Bu çalışma, hem bu bölgedeki kaplıcaların az çalışılmış olması hem de *Anoxybacillus* sp.'de yapılan ilk α -amilaz çalışmalarından biri olması açısından önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

1. Haki, G.D.; Rakshit, S.K. *Developments of industrially important thermostable enzymes: a review, Bioreosurce Techonology*, **2003**, 89, 17-34
2. Pandey A.; Webb, C.; Soccol, C.R. *Enzyme Technology, Spirenger*, **2008**
Erişim: <http://books.google.com.tr> (19.03.2010)
3. Kirk, O.; Borchert, T.V.; Fuglsang, C.C. *Industrial enzyme applications, Current Opinion in Biotechnolog*, **2002**, 13, 345-351
4. Güzükara, M.E. *Biyokimya, Nobel Tıp Kitapevleri, Ankara*, **1997**
5. Schallmeyer, M.; Singh, A.; Ward, O.P. *Developments in the use of Bacillus species for industrial production, Can J. Microbiol.* **2004**, 50, 1-17
6. Wiseman, A. *The application of enzymes in undustry, Handbook of Enzymes Biotechnology, Second Edition* **1987**, Chapter 3. P. 274-373
7. Kiran, Ö.E.; Çömlekçioğlu, U.; Dostbil, N. *Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstride kullanım alanları, KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, **2006**, 9 (1)
8. van der Burg, D. *Extremophiles as a source for novel enzymes, current opinion in Microbiology*, **2003**, 6, 213-218.
9. Cordeiro, C.A.M.; Martins, M.L.L.; Luciano, A.B. *Production and Properties of α -Amylase From Thermophilic Bacillus sp. Brazilian Journal of Microbiology*, **2002**, 33, 57-61
10. Rao, M.B.; Tanksale, M.S.G.; Deahpande, V.V. *Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases, Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **1998**, 62 (3)
11. Mukherjee, A.K.; Borah, M.; Rai, S.K. *To study the influence of different components of fermentable substrates on induction of extracellular_ amylase*

synthesis by Bacillus subtilis DM-03 in solid-state fermentation and exploration of feasibility for inclusion of α -amylase in laundry detergent formulations, Biochemical Engineering Journal, 2009, 43, 149-156.

12. Gupta, R.; Gigras, P.; Mohapatra, H.; Goswami, V.K.; Chauhan, B. *Microbial α -amylases: a biotechnological perspective, Process Biochemistry, 2003, 38, 1599-1616.*

13. Sidhu, G.S.; Sharma, P.; Chakrabarti, T.; Gupta, J.K. *Strain improvement for the production of a thermostable α -amylase, Enzyme and Microbial Technology, 1997, 21, 525-530*

14. Shafiei, M.; Ziaee, A.A.; Amoozegar, M.A. *Purification and biochemical characterization of a novel SDS and surfactant stable, raw starch digesting, and halophilic α -amylase from a moderately halophilic bacterium, Nesterenkonia sp. strain F, Process Biochemistry, 2010, 45, 694-699*

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Biyoteknoloji

Biyoteknoloji, biyolojik ajanlar kullanılarak bilimsel ve mühendislik ilkelerinin yeni ürünler elde etmek üzere kullanılmasıdır¹. Biyoteknoloji, canlı hücrelerden (mikroorganizmalar, bitki ve hayvan hücreleri veya dokuları) elde edilen enzimler veya organeller tarafından gerçekleştirilen biyolojik reaksiyonlar ile uğraşır². Modern biyoteknoloji; genetik mühendisliği, rekombinant mikroorganizmalar, bitki ve hayvan hücreleri, hibridoma teknolojisi, nanobiyoteknoloji, protein mühendisliği, transgenik bitki ve hayvanlar, organ ve doku mühendisliği, immünojenik tayarlar, genomik gibi daha birçok alanı kapsamaktadır. Biyoteknoloji; sağlık hizmetleri, gıda üretim ve süreci, tarım, ormancılık, materyal ve kimyasalların üretimi gibi alanlarda da etkili olmaktadır¹.

Modern biyoteknoloji; bilimsel, medikal ve endüstriyel çevrelerde, teknolojik uygulamaları geniş ölçüde kullanarak değişik birçok ürün sağlamaktadır. Aynı zamanda biyoteknoloji, büyük ölçüdeki buluşları ve ticari alandaki öneminden dolayı sosyal ve ekonomik bilimlerin araştırma alanları için de model olmaktadır³. Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, enzimlerin kullanım alanının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle biyoteknolojinin endüstriyel enzimlerle ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar daha da önem kazanmaktadır. Özellikle son yıllarda stratejik alan şeklinde değerlendirilen rekombinant DNA teknolojisinden yararlanılarak enzim üretimi büyük boyutlara ulaşmış ve kullanımı giderek yaygınlaşmıştır⁴.

Çizelge 2.1. Biyoteknolojik Öneme Sahip Bazı Enzimler ve Kullanım Alanları¹

ENZİM	SUBSTRAT	KATALİZE EDİLEN REAKSİYON	KULLANIM ALANI
Proteaz	protein	Proteoliz	Deterjan, gıda, eczacılık, kimyasal sentez,
Lipaz	katı ve sıvı yağ	Yağları, yağ asiti ve gliserole hidrolize eder	Yağ esaslı kirlerin giderilmesi, gıda
Karbohidraz	karbonhidrat	Karbonhidratların şekerlere yıkımı	Gıda, hayvan yemi, kağıt, şeker, tekstil, deterjan
Pektinaz	pektin	Meyve suyu ekstraksiyonu	Gıda, meşrubat
Selüloz	selüloz	Selülozun hidrolizi	Tekstil, deterjan, hayvan yemi
Amilaz	polisakkarid	Nişastanın şekere yıkımı	Gıda

2.2. Enzimler

Enzimler, kimyasal reaksiyonları fevkalade bir özgüllikle katalizleyen ve tepkime oranlarını yükselten genelde protein yapısında olan moleküllerdir⁵. Tepkimelerde katalizör görevi görerek, kendileri değişikliğe uğramadan hücrede meydana gelen binlerce tepkimenin hızını ve özgülüğünü düzenlerler^{6,7}. Bu reaksiyonlar yaşayan tüm organizmaların metabolizmalarının temelini oluşturur ve endüstriyel alanlar için mükemmel fırsatlar doğurur⁵. Enzimler bugün hücrelerden

çıkmiş ve artık çeşitli bakımlardan günlük ve ekonomik hayata girmiştir. Bugün ekmek bira ve peynir üretimi gibi ekonomik sahalarda, temizlik alanları gibi günlük yaşamda ve bir sağlık alanı olan tıpta, teşhis ve tedavide enzimler büyük rol oynamaktadır. Enzimler yalnız tıpta değil diğer birçok alanda da önem kazanmıştır. Bu gün enzimlerin kimya endüstrisinde, gıda prosesinde, ziraatte ve hatta biyolojik savaşta pek çok kullanım alanları bulunmaktadır⁸.

Çizelge 2.2. Enzimlerin Sınıflandırılması⁹

Enzimler	Kaynaklar
1. Oksidoreduktazlar	
Glukoz Oksidaz	<i>Aspergillus niger</i>
Katalaz	<i>Aspergillus niger, Micrococcus lysodeictius</i>
Pironoz-2-oksidad	<i>Polypoms obtusus</i>
2. Transferazlar	
3. Hidrolazlar	
Bakteriyel α -amilaz	<i>Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus</i>
Fungal α -amilaz	<i>Aspergillus oiyzae, Aspergillus niger</i>
Glukoamilaz	<i>Aspergillus niger, Aspergillus awamori, Endomycopsis sp., Rhizopus sp.</i>

β -Glukonaz (licheninase)	<i>Bacillus subtilis, Bacillus amyloliquefaciens</i>
Selulaz kompleks	<i>Trichodenna reese,</i> <i>Aspergillus niger</i>
α -1,3-Glukonaz	<i>Trichoderma harzianum</i>
Dekstranaz	<i>Penicillium funiculosuni</i>
Hemiselulaz	<i>Bacillus subtilis, Aspergillus niger</i>
Pullulanaz	<i>Bacillus sp.</i>
α -Galaktosidaz	<i>Aspergillus niger, Mortierella vinacea</i>
İnvertaz	<i>Yeast</i>
Laktaz	<i>Kluyveromyces fragilis</i>
Bakteriyel nötral proteaz	<i>Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus subtilis</i>
Bakteriyel alkalın proteaz	<i>Bacillus licheniformis, Bacillus subtilis,</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Fungal proteaz	<i>Aspergillus niger</i>
Rennet	<i>Mucor miehei, Mucor Pusillus</i>
Streptokinaz	<i>Streptococcus sp.</i>
L-Asparaginaz	<i>Envinio carotövora</i>
Urikaz	<i>Bacillus fastidiosus</i>

Fungal pektinaz kompleks	<i>Aspergillus niger, Trichoderma reesei</i>
4. Liyazlar	
Fungal pektinaz kompleks	<i>Aspergillus niger</i>
5. izomerazlar	
Glukoz izomeraz	<i>Bacillus coagulans, Actihoplanes missouriensis, Streptomyces sp.</i>
6. Ligazlar	

2.2.1. İntraselüler Enzimler

İntraselüler enzimler, sitoplazmaya dağılmış olarak bulunan ribozomlarda sentezlenirler. Genelde bu enzimlerin substratları şekerler, aminoasitler, karboksilik asit gibi küçük molekül ağırlığına sahip, hücre zarından geçebilme yeteneğinde olan moleküllerdir⁹.

2.2.2. Ekstraselüler Enzimler

Ekstraselüler enzimler, besiyeri ve hücre yapılarının dış kısmı ile bağlantı halinde olan enzimler olarak tanımlanır.

Escherichia coli gibi gram-negatif bakterilerde proteinler iç ve dış membran arasındaki periplazmik boşluk arasında kalırlar. Çünkü gram-negatif bakteri duvarları, gram-pozitif bakterilerde bulunmayan bir dış membrana sahiptirler. Gram-pozitif bakterilerde ise enzimler doğrudan besiyerine salgılanırlar. İntraselüler

enzimlerin aksine, ekstraselüler enzimlerin stabilitesi yüksek olup, çevre koşullarında aktivitelerini uzun süre koruyabilirler¹⁰.

2.3. Amilazlar

Amilazlar; nişasta moleküllerinin hidrolizini gerçekleştirerek dekstrin, oligosakkarid ve glukoz gibi daha küçük ürünlere parçalayan biyoteknolojik uygulamalar için oldukça önemli bir yere sahip olan hidrolitik enzimler arasındadır^{11,12,13}.

Amilazlar bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar gibi birçok kaynaktan elde edilebildiği halde mikrobiyal kaynaklı enzimler endüstriyel uygulamalarda daha çok tercih edilmektedir^{19,41}. Amilaz üretimi için mikroorganizma kullanımının temel avantajları, ekonomik olarak büyük oranda üretim kapasitesi ve bu canlılardaki enzimlerin istenilen karakteristik özellikleri taşımasıdır¹².

Amilazların tarihi, 1811'de Kirchoff tarafından nişastayı parçalayan ilk enzimin bulunmasıyla başlamıştır. Bunu takiben sindirim amilazları ve malt amilazları bulunmuştur. Daha sonra 1930'da Ohlsson malttaki sindirimsel enzimlerin nişastayı parçalaması sonucu oluşan şekerlere göre amilazları, α -amilaz ve β -amilaz olarak iki sınıfa ayırmayı ileri sürmüştür¹².

Amilazlar, nişastayı hidroliz biçimine göre endoamilazlar ve ekzoamilazlar şeklinde sınıflandırılabilir¹⁴.

Endoamilazlar, nişasta moleküllerinin iç kısımlarındaki glikozidik bağları rastgele yerlerinden hidroliz ederler. Bu da zincir uzunlukları birbirinden farklı olan oligosakkaritlerin oluşmasına yol açar. α -amilaz (EC 3.2.1.1) bu gruba dahildir^{12,14,15}.

Ekzoamilazlar, nişastanın indirgen olmayan uçlarından itibaren glikozidik bağları dikkatli bir şekilde kırarlar. Glukoamilazlar (EC 3.2.1.3), β -amilazlar (EC 3.2.1.2) ve glikozidazlar (EC 3.2.1.2) bu gruba dahildir^{14,15}.

2.3.1. β -Amilazlar (α -1,4-glucan maltohidrolaz, EC 3.2.1.2)

β -amilaz, ekzo tip bir enzim olup amiloz ve amilopektin moleküllerini redükte olmayan uçlarından keserek maltoza indirgerler¹⁵.

2.3.2. γ -Amilazlar (exo-1,4- α -D-glucan glucohydrolase EC 3.2.1.3)

γ -Amilazlar, amiloz ve amilopektin moleküllerini redükte olmayan uçlarından keserek glukoz, maltoz, maltotrioz ve oligomaltoz oluşumuna neden olurlar. Aynı zamanda bazı γ -Amilazlar, amilopektin moleküllerinin 1,6- α -glikozidik bağlarını da hidroliz edebilmektedir¹⁵.

2.3.3. α -Amilazlar (endo-1,4- α -D-glucon glucohydrolase, EC 3.2.1.1)

α -Amilaz, nişasta molekülündeki α -1,4 glikozidik bağlarını yıkarak glukoz, oligomaltoz ve dekstrin oluşumunu sağlayan endo tip, glukohidrolazlar sınıfına ait, genelde ekstraselüler olan biyoteknolojik öneme sahip olan enzimler arasındadır^{15,16,17,18,19}. Günümüzde ticari olarak birçok α -amilaz enzimi mevcut olup nişasta endüstrisinde kimyasal hidrolizin yerini almışlardır^{17,20}. α -Amilaz kağıt, gıda, tekstil, ekmek, deterjan, kimya, eczacılık, şurup üretimi gibi endüstriyel uygulamalarda geniş ölçüde kullanılmaktadır^{11,18,21}.

2.3.3.1. α -Amilaz Kaynakları

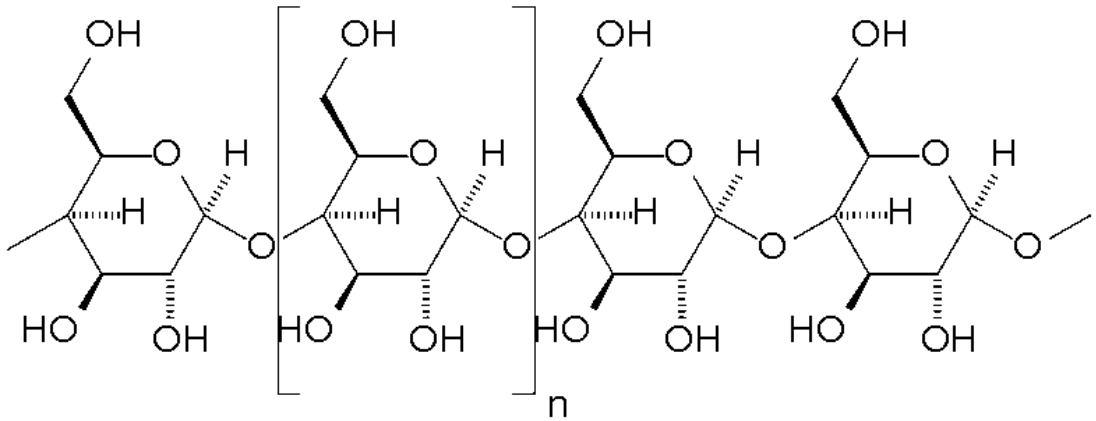
α -Amilaz, karbonhidrat metabolizmasının baskın rol oynadığı bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir. Bitki ve mikroorganizma kökenli amilazlar yüzyıllardan beri gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Mikroorganizma kökenli amilazlar (bakteriyel ve fungal amilazlar), ekonomik açıdan daha uygun olmaları, üretimleri için daha az yer ve zamana gereksinim duyulması ve optimizasyon ve modifikasyon işlemlerinin kolay olması avantajlarından dolayı endüstriyel uygulamalarda kullanılmaktadır. Bakteriler arasında *Bacillus sp.* termostabil amilaz üretimi için geniş ölçüde kullanılmaktadır. *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis* ve *B. amyloliquefaciens* bilinen iyi α -amilaz üreticisidirler. Benzer şekilde fungilerden de *Aspergillus* cinsinden α -amilaz üretimi için geniş ölçüde yararlanılmaktadır²².

2.4. Nişasta

Nişasta; bitkilerde fazla miktarda bulunan, soğuk suda çözünmeyen bir depo polisakkarittir. İnsanlar için besin kaynağı olarak kullanılan nişasta; doğada, patates, pirinç, mısır, buğday gibi hububatlarda bol miktarda bulunur. Genelde her yerde mevcut olduğundan kolayca ulaşılabilir ucuz bir enerji kaynağıdır. Bu bağlamda gıda endüstrisinde geniş ölçüde kullanılmaktadır. Nişasta, gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan glukoz, fruktoz ve maltoz gibi şuruplarının üretiminde de kullanılmaktadır^{14,23,24,25}.

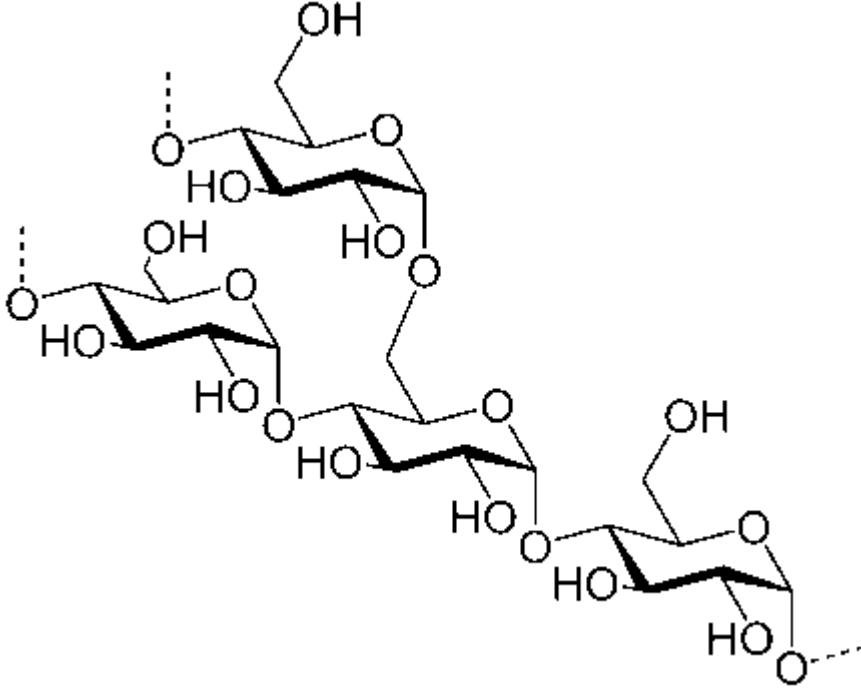
Nişasta, amiloz ve amilopektin olmak üzere iki tane glukoz polimerinden oluşmaktadır. Amiloz, glukoz ünitelerinin birbirlerine α -1,4 glikozidik bağlarla

bağlanması sonucu oluşmuş lineer, dallanma göstermeyen bir depo polisakkarittir (Şekil 2.1). Suda çözünmez fakat hidrat formundan dolayı su alarak miseller haline gelebilir. Molekül ağırlığı, birkaç yüz ile birkaç bin dalton arasında değişir. Amiloz, nişasta molekülünde %15–25 oranında bulunmaktadır^{23,25,26,27}.



Şekil 2.1. Nişastanın amiloz formu²⁸

Amilopektin, α -1,4 bağlarına ek olarak α -1,6 glikozidik bağlarını da içermektedir (Şekil 2.2). Amilozda olduğu gibi düz zincir α -1,4 glikozidik bağlarından kaynaklanmaktadır. Dallanma ise glukoz ünitelerinin α -1,6 glikozidik bağlarıyla bağlanmasından kaynaklanmaktadır. Glikoz ünitelerinin her 16–27 glikozidik bağlarla bağlanması sonucu bir dallanma noktası oluşmaktadır. Amilozun aksine suda çözünme özelliğine sahiptir. Nişasta molekülünde %75–85 oranında bulunup molekül ağırlığı 1 000 000 daltona kadar ulaşmaktadır. Amilopektin molekülünün tamamı yaklaşık olarak 2 000 000 glikoz ünitelerinde oluşmaktadır. Bu da amilopektini doğada var olan en uzun molekül yapmaktadır^{23,25,26,27}.

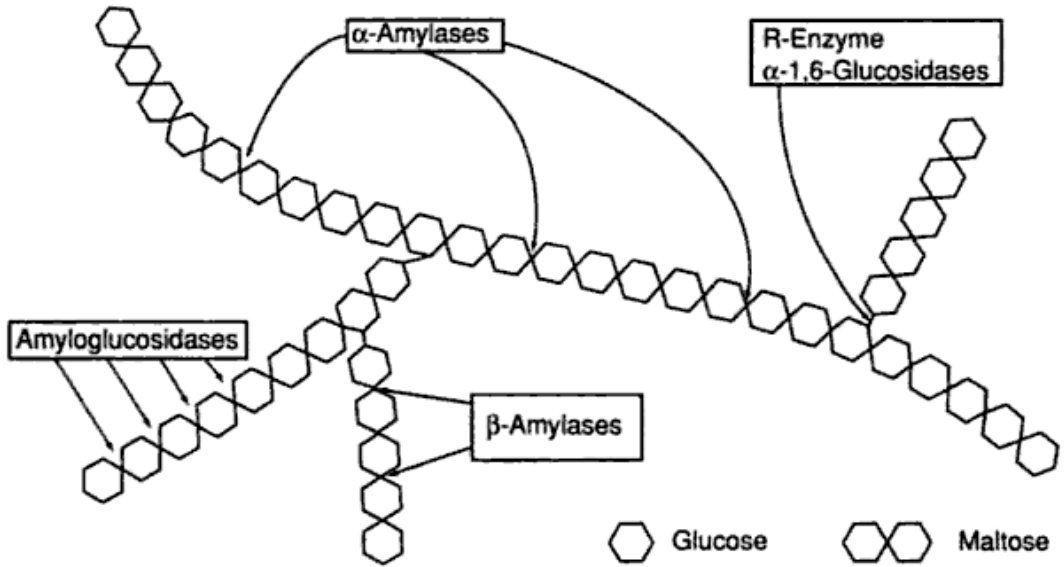


Şekil 2.2. Nişastanın amilopektin formu²⁹

2.4.1. Nişastanın Enzimatik Hidrolizi

Nişasta, kompleks bir yapıya sahip olduğu için, nişasta moleküllerinin oligosakkaritlere, maltoz ve glukoz gibi daha küçük şekerlere depolimerizasyonu, uygun enzim kombinasyonlarını gerektirir. Bir endoamilaz olan α -amilaz, nişasta polimerinin iç bölgesinde bulunan α -1,4 glikozidik bağlarını rastgele yerlerinden keserek lineer ya da α -limit dekstrin gibi dallanmış şekilde oligosakkaritlerin oluşumunu sağlar. Ekzoamilaz enzimlerden olan β -amilaz α -1,4 glikozidik bağlarını, glukoamilaz ve α -glukozidaz enzimleri, nişastanın hem α -1,4 hem de α -1,6 glikozidik bağlarını redükte olmayan uçlarından keserek daha belirgin ve küçük

oligosakkaritlerin oluşumuna yol açar. β -amilazın nişastayı hidrolizi sonucu maltoz, glukoamilazın nişastayı hidrolizi sonucu glukoz oluşur. α -glukozidaz, β -anomerik konfigürasyonuna sahip olan glukoz oluşumuna yol açan glukoamilazın aksine oligosakkaritlerin α -1,4 glikozidik bağlarını hidrolizleyerek α -anomerik konfigürasyonuna sahip olan glukoz oluşmasına yol açar^{23,25}.



Şekil 2.3. Nişastanın amilaz tarafından hidrolizi³⁰

2.5. α -Amilazın Endüstriyel Kullanım Alanları

Amilazlar, günümüz biyoteknolojisinde en önemli enzimlerden biridir. Özellikle nişastayı temel alan endüstriler için en önemli hidrolitik enzimler arasındadır. Amilazlar, gıda, deterjan, tekstil, kağıt, ilaç, fermantasyon, nişastanın

glukoz ve maltoz şuruplarına dönüştürülmesi gibi geniş endüstri alanlarında kullanılmaktadır. Günümüzde ticari olarak birçok mikrobiyal amilaz mevcut olup, nişasta endüstrisinde kimyasal hidrolizin yerini almışlardır^{11,12,18,20,26}.

2.5.1. α -Amilazın Deterjan Endüstrisinde Kullanımı

Enzim içeren deterjanlar, içermeyenlere oranla daha yumuşak bir yapıya sahiptir. Daha önceleri otomatik bulaşık makinelerinde kullanılan deterjanlar çok sert bir yapıya sahipti. Bu deterjanlar, hassas çin porselenleri ve tahta sofrta takımları gibi bulaşıklar için uygun bir yapıya sahip değildi. Buda deterjan endüstrilerinin daha etkili çözümler araştırmalarına yol açmıştır. Düşük ve ortalama sıcaklıklarda çamaşır yıkama işlemi oldukça yaygın olmakla beraber, nişasta içeren giysi ve porselen lekelerinin giderilmesi, tüketiciler için giderek artan bir problem haline gelmektedir. Nişastanın çözünürlüğü yüksek oranda sıcaklığa bağlıdır. Bu durum da α -amilazın deterjanların içeriğinde kullanımını arttırmaktadır. α -Amilaz, toz deterjanlarda 1975'ten beri kullanılmaktadır. Günümüzde sıvı deterjanların %90'ında α -amilaz enzimi mevcut olup bulaşık makinesi deterjanları için α -amilaz talebi de giderek artmaktadır^{12,26}.

2.5.2. α -Amilazın Tekstil Endüstrisinde Kullanımı

Tekstil endüstrisinde dokuma sırasında ipliklerin sağlam ve düzgün olması ve kopmaması için iplikler nişasta içeren bir çözelti ile muamele edilmektedir. Bu işleme haşılama adı verilir. Bu işlem için nişasta oldukça uygun bir materyaldir. Çünkü nişasta dünyanın birçok bölgesinde mevcut olup ucuz olarak elde edilebilen bir maddedir ve uzaklaştırılması da kolaydır. Kumaş dokunduktan sonra, kumaştaki

fazla nişastanın uzaklaştırılması gerekir. Bu işleme de haşıl alma adı verilmektedir. Haşıl alma işleminde α -amilaz kullanılmaktadır. α -Amilaz, bu işlemi oldukça seçici bir şekilde yapmaktadır ve kumaştaki ipliklere her hangi bir etki yapmamaktadır^{12,31,32}.

2.5.3. α -Amilazın Nişastanın Sıvılaştırılmasında ve Şekerlendirilmesinde Kullanımı

Endüstrideki α -amilaz marketinin temeli, nişastayı fruktoz ve glukoz gibi hidrolizatlara ayırmaktır¹². Bu işlemler sonucunda nişasta; fruktoz, glukoz, maltoz veya oligosakkarid şuruplarına dönüştürülmektedir. Bu şuruplar daha sonra fermantasyon şurubu olarak çeşitli kimyasal maddelerin üretiminde kullanılmaktadır (etanol, lizin ve sitrik asit vs.)³³. Yüksek fruktozlu mısır şurupları yüksek tatlandırıcılık özelliklerinden dolayı meşrubat sanayisinde alkolsüz içecekleri tatlandırmak için büyük ölçüde kullanılmaktadırlar¹².

Nişastanın işlenmesi sıvılaştırma ve şekerlendirme olmak üzere iki adımdan oluşmaktadır^{33,34}. Genelde nişastanın sıvılaştırılması aşaması, nişastanın yüksek sıcaklıklarda jelatinasyonunu ve ortama α -amilaz eklenerek kısmen hidrolizini kapsamaktadır. Şekerlendirme aşaması ise sıvılaştırılan nişastanın daha küçük şekerlere en sonunda glukoz veya maltoza dönüştürülmesini kapsamaktadır. Glukoz şurubu (% 95 ile % 96 glukoz) üretiminde pullulanaz ve glukoamilaz enzimleri kullanılırken, maltoz şurubu (% 80 ile % 85 maltoz) üretiminde ise pullulanaz ve β -amilaz kullanılmaktadır³³.

2.5.4. α -Amilazın Kağıt Endüstrisinde Kullanımı

Kâğıt endüstrisinde kâğıdın işlenmesi için, kâğıt nişastayla muamele edilir. Bu da işlem esnasında, kâğıdı mekanik hasarlardan korur. Bu işlem kâğıda sertlik ve dayanıklılık vererek kâğıdın daha kaliteli olmasını sağlar. Ayrıca nişasta ile muamele kâğıdın silinebilirliğini artırır ve kâğıdın iyi kaplanmasına da yardımcı olur. Kâğıtla muamele edilen doğal nişastanın viskozitesi yüksek olduğu için fazla olan nişasta α -amilaz kullanılarak uzaklaştırılır^{12,31}.

2.5.5. α -Amilazın Tıpta Kullanımı

Amilaz pankreas, tükürük bezleri ve bazı tümörlerden (örn. akciğer) salgınmaktadır. Kandaki amilazın genellikle üçte biri pankreas, üçte ikisi ise tükürük bezleri kaynaklıdır. Dolaşıma giren amilaz esas olarak böbrekler aracılığıyla vücuttan atılmaktadır. Yüksek kan amilaz düzeyi pankreatitte meydana gelir. Ayrıca karın ağrısıyla ortaya çıkan bazı acil hastalıklarda, şiddetli şeker komasında, kabakulakta, morfin enjeksiyonundan sonra da amilaz düzeyleri bir miktar yükselebilmektedir. Amilaz değerinde düşüklüğün bir klinik önemi yoktur³⁵.

2.5.6. α -Amilazın Fırıncılıkta Kullanımı

Ekmek endüstrisi, enzimleri daha kaliteli ürünler elde etmek için yüzyıllardan beri kullanmaktadır. Bu enzimler ekmeğin daha hacimli olmasını, renginin daha güzel gözükmemesini, daha iyi kızarmasını, daha lezzetli olmasını ve ekmek içinin daha yumuşak olmasını sağlamaktadırlar. Günümüzde pullulanaz, pentonaz, selülaz, glukooksidaz, lipoksijenaz gibi birçok enzim çeşitli amaçlarla ekmek endüstrisinde kullanılmakta; fakat hiçbiri α -amilazın yerini dolduramamaktadır. α -Amilaz enzimi

ekmekçilikte, ekmeğin bayatlamasını geciktirmesinden ve raf ömrünü uzatmasından (2-3 gün) dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır^{12,31,32}.

2.6. Termofilik Mikroorganizmalar ve Enzimlerinin Biyoteknolojide Kullanılması

Termofilik mikroorganizmalar, yüksek sıcaklıklarda (60 ve 108 °C) yaşamaya adapte olmuş canlılardır. Genelde yüksek sıcaklıklardaki karasal ve deniz habitatlarından izole edilmektedir. Jeotermal ve volkanik olarak ısınmış hidrotermal ağız sistemleri, nötral sıcak su kaplıcaları ve deniz altı hidrotermal ağızları gibi alanlarda yayılış göstermektedirler²⁵.

Diğer tüm canlılar gibi, mikroorganizmalar da hayatta kalmak için bulunduğu çevreye uyum sağlamak zorundadırlar. Termofiller termostabil, denatürasyona ve proteolize karşı dirençli proteinler içerirler. Şaperon olarak bilinen bu tür özelleşmiş proteinler, denatürasyon sonrası proteinlerin katlanarak doğal yapılarını ve fonksiyonlarını geri kazanmalarını sağlar. Termofilik mikroorganizmaların hücre duvarı satüre edilmiş yağ asitlerinden oluşmaktadır. Bu yağ asitleri, hücre için hidrofobik bir ortam oluşturarak yüksek sıcaklıklara karşı hücrelere dirençlilik kazandırmaktadır³⁶. Deneysel çalışmalar hidrofobik interaksiyonların termofilik proteinlerin stabilizasyonunda önemli bir rol oynadığını ortaya çıkarmıştır. Sıcaklığa dirençli proteinler hidrofobik interaksiyonlarla dimer oluşturarak termal hidrolize karşı daha dirençli hale geçmektedirler. Bütün bunlara ek olarak sıcaklığa dirençli proteinler disülfid bağları, aromatik interaksiyonlar, hidrojen bağları, elektrostatik gibi mekanizmalarla yüksek sıcaklıklara karşı direnç göstermektedirler³⁷. Termofilik mikroorganizmaların yüksek sıcaklıklarda üretimi kontaminasyon riskini ve

vizkositeyi azaltır. Bu özellikler karışım yapmayı kolaylaştırır ve yüksek derecede substrat çözünürlüğüne yol açtığı için teknik ve ekonomik açıdan oldukça ilgi çekicidirler^{38,39}.

Termofilik ve hipertermofilik enzimler (termozimler) ekstremozimlerin bir üyesidirler. Ekstremozim grubu enzimler; yüksek sıcaklık, yüksek tuz seviyelerinde, yüksek alkali koşullarında ve basınç, yüksek asidite gibi diğer ekstrem koşullar altında işlev gösterebilirler^{27,33,40,41}. Termofilik mikroorganizmalar, hem termoaktif hem de termostabil olan ilginç enzimlerin kaynağıdır. Bu mikroorganizmalardan izole edilen enzimler eşsiz özelliklere sahiptir. Bu enzimler, oldukça termostabil olup genelde deterjan, organik çözücüler, kaotrapik gibi kimyasallar ajanlar ile ekstrem pH değerlerine karşı oldukça dirençlidirler⁴¹. Termofilik enzimler, endüstrinin birçok alanındaki uygulanabilirliği ile mezofilik enzimlerin ve kimyasalların yerini alabilecek potansiyele sahiptir. Bu durum optimizasyon prosesleri için yeni pencereler açmaktadır. Termoenzimlerin fonksiyonları, stabiliteyi arttırmak için örnek teşkil edebilir ve termoenzimlerin stabilitesinin daha iyi anlaşılması, diğer enzimleri stabilize edebilmek için yeni yöntemler bulmaya yardımcı olabilir. Bu mikroorganizmalardan elde edilen enzimler; gıda, kimyasal, eczacılık, kağıt ve atık arıtma endüstrileri gibi alanlarda önemli rol oynamaktadır³⁸.

Çizelge 2.3. Bazı Ekstremozimler ve Uygulama Alanları⁴²

Ekstremofil	Enzim	Biyoteknolojik Uygulamalar
Termofil (55-113 °C)	Amilazlar Ksilanazlar Proteazlar DNA polimerazlar	Tatlandırıcılar için glukoz ve fruktoz Kağıt beyazlatma Fırıncılık, bira, deterjan Genetik mühendisliği
Psikofil (-2-20 °C)	Proteazlar Dehidrogenazlar Amilazlar	Peynir olgunlaştırılması, süt üretimi, Biyosensörler Deterjanlarda polimer degradasyonu
Asidofil (p <3)	Sülfür oksidaz	Kömür desülfürizasyonu
Alkalifil (pH>8)	Selülazlar	Deterjanlarda polimer degradasyonu
Halofil (2-5 M NaCl)	-	Poli (α -glutamik asit) (PGA) üretimi Poli (β -hidroksi butirik asit) (PHB) üretimi
Barofil (Yüksek basınç)	Tüm mikroorganizmalar	Jellerin ve nişasta granüllerinin oluşturulması
Metalofil (Yüksek metal konsantrasyonu)	Tüm mikroorganizmalar	Maden cevheri elde edilmesi Biyomineralizasyon

2.6.1. Termostabil Amilazlar

Endüstriyel uygulamalardaki ağır şartlara karşı dayanıklı enzim bulma ihtiyacı günden güne artmaktadır⁴³. Termostabil α -amilazlar, ağır endüstriyel şartlar altındaki kullanılabilirliği ile endüstriyel uygulamalar için büyük önem arz etmektedir⁴⁴. Termostabil amilazların endüstriyel uygulamalardaki avantajları, kontaminasyon riskini azaltmaları, difüzyon oranını yükseltmeleri, denatüre edici ajanlara, çözücülere ve proteolitik enzimlere karşı dirençli olmalarıdır⁴⁵. α -Amilaz, nişastanın jelatinasyonunda 100-110 °C ve sıvılaştırılmasında 80-90 °C gibi yüksek sıcaklıklarda aktivite göstermelidir. Bu yüzden daha fazla termofil ve termostabil amilazlar bulmak için, araştırmalara gereksinim duyulmaktadır^{45,46}.

Çizelge 2.4. Bazı Mikrobiyal Termostabil Amilaz Kaynakları³⁶ (Haki ve Rakshit 2003'den modifiye edilmiştir).

Enzim	Organizma
α -amilaz	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
	<i>Bacillus licheniformis</i>
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
	<i>Bacillus subtilis</i>
	<i>Lactobacillus manihotivorans</i>
	<i>Myceliophthora thermophila</i>
	<i>Pyrococcus furiosus</i>
	<i>Pyrococcus woesei</i>
	<i>Staphylothermus marinus</i>

Sulfolobus solfataricus

Thermococcus aggregans

Thermococcus celer

Thermococcus fumicolans

Thermococcus hydrothermalis

Thermomyces lanuginosus

Thermococcus profundus

β -amilaz

Bacillus circulans

Bacillus cereus

Bacillus sp.

Clostridium thermosulphurogenes

Clostridium thermosulfurogenes

2.7. *Anoxybacillus* Cinsi

Anoxybacillus cinsine ait üyeler, daha önce *Bacillus* cinsi içerisinde bulunmaktaydı. Bu cins ilk kez 2000 yılında Pikuta ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Tanımlanan tüm *Anoxybacillus* türlerinin genel olarak termofil, gram-pozitif, spor oluşturan basil şekilli bakteriler olduğu belirlenmiştir^{47,48,49,50}. Son zamanlarda *Anoxybacillus* cinsi, *Anoxybacillus pushchinoensis*, *Anoxybacillus flavithermus*, *Anoxybacillus gonensis*, *Anoxybacillus contaminans*, *Anoxybacillus voinovskiensis*, *Anoxybacillus ayderensis*, *Anoxybacillus kestanbolensis*, *Anoxybacillus kamchatkensis*, *Anoxybacillus amylolyticus*, *Anoxybacillus rupiensis* ve *Anoxybacillus bogrovensis* olmak üzere 11 türe ayrılmıştır. Ayrıca *Anoxybacillus kamchatkensis* türünün alt türü olan *Anoxybacillus kamchatkensis subsp. asaccharedens* Gül-Güven ve arkadaşları tarafından 2007'de Batman sıcak su kaplıcalarından izole edilmiştir⁵⁰. Pikuta ve ark. (2000) Tarafından tanımlanan ilk *Anoxybacillus* cinsi olan *A. Pushchinoensis* türünün güçlü bir şekilde anaerobik olduğu tespit edilmiştir. Daha sonra Pikuta ve ark. (2003) bu cinsin üyelerini aerotolerant anaerobe ve fakültatif anaerobe şeklinde tanımlamışlardır. Her ne kadar Pikuta ve ark. (2000) bu cinsi oksijensiz *Bacillus* anlamına gelen *Anoxybacillus* şeklinde adlandırmış olsa da bu cinsin tanımlanan birçok türünün aerobik olarak iyi bir şekilde gelişebildiği ve hatta bazı türlerin sadece bazı özel şartlarda anaerobik olduğu belirlenmiştir⁵¹.

2.8. Önceki Çalışmalar

Mamo ve ark.⁵² (1999) Termofilik *Bacillus subtilis* WN11'den Amy1 ve Amy2 olarak adlandırılan iki α -amilazın üretimini ve saflaştırılmasını gerçekleştirmişlerdir. Maksimum enzim üretimini 48. saatte tespit etmişlerdir. Enzimlerin molekül ağırlıklarını sırayla 76 ve 53 kDa. olarak bulmuşlardır. Her iki enzimin de aktivite gösterdiği optimum sıcaklığı 75 ile 80 °C arasında bulup enzimlerin 80 °C'de 4 saat önkübasyon sonrası orijinal aktivitesinin %50'sini koruduğunu bulmuşlardır. Her iki enzimin aktivite gösterdikleri optimum pH'yı 5.5 olarak belirleyerek 5.5 ile 9.0 pH aralıklarında enzimlerin stabil olduklarını tespit etmişlerdir. Her iki enzim aktivitesinin Hg^{2+} , Cu^{2+} ve Fe^{2+} varlığında inhibe olduğunu fakat, Zn^{2+} varlığında enzim aktivitelerinde inhibisyon olmadığını gözlemlemişlerdir.

Hamilton ve ark.⁵³ (1999) *Bacillus sp.* IMD 435'te α -amilaz üretimi üzerine çalışmışlardır. Karbon kaynağı olarak % 4'lük laktoz ve azot kaynağı olarak ta % 2'lik yeast ekstrakt içeren besiyerlerinde maksimum α -amilaz aktivitesi tespit etmişlerdir. Laktozlu ortamda α -amilaz üretimi fazla olmasına rağmen bakteri üretiminin az olduğunu ve kısmi olarak saflaştırılan enzimde maksimum amilaz aktivitesini pH 6.0' da ve 65 °C' de tespit etmişlerdir.

Aguilar ve ark.⁵⁴ (2000) *Lactobacillus manihotivorans*'dan ekstraselüler α -amilaz enziminin saflaştırmasını ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Enzimin molekül ağırlığını 135 kDa. optimum sıcaklığını 55 °C ve optimum pH'sını 5.5 olarak belirlemişlerdir. Enzimin pH 5.0 ile 6.0'da iyi stabilite gösterdiğini fakat

sıcaklığa karşı hassas olduğunu gözlemlemişlerdir. Enzimin 55 °C’de 1 saat inkübasyon sonrası aktivitesini kaybettiğini ve enzimin çözünebilir nişasta varlığında inkübasyona bırakıldığında termal stabilitesinin arttığını bulmuşlardır. Enzimin Km değerini, 3.44 mg/ml olarak bulmuşlardır. Al³⁺, Fe³⁺, Hg²⁺ (10 mM) iyonlarının varlığında α-amilazın hemen hemen tüm aktivitesini kaybettiğini tespit etmişlerdir.

Cordeiro ve ark.⁴⁰ (2002) Termofilik *Bacillus sp.* SMA-2’den α-amilaz üretimini ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Maksimum amilaz üretimini 48. saatte çözünebilir nişasta içeren kültür ortamında elde etmişlerdir. Enzimin optimum sıcaklığını 70 °C, optimum pH’sını 7.5 olarak belirlemişlerdir. Enzimin 50 °C’de 2 saat sonunda stabil kaldığını, 60 °C, 70 °C ve 90 °C’de sırasıyla aktivitesinin % 4, % 13 ve % 38’ ini kaybettiğini tespit etmişlerdir. Ham enzimin pH 7.0’da 24 saat inkübasyonu sonucu aktivitesinin % 5’ini kaybettiğini bulmuşlardır. Enzimin Co²⁺, Cu²⁺, Ba²⁺ tarafından güçlü bir şekilde inhibe edilirken, Ca²⁺, Mg²⁺, Ni²⁺ Sr²⁺ ve Mn²⁺ iyonlarından daha az etkilendiğini tespit etmişlerdir.

Burhan ve ark.⁴⁶ (2003) Termostabil ve alkalın olan α-amilaz üreten *Bacillus sp.* ANT-6’yı topraktan izole etmişlerdir. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığı, 80 °C, pH’yı da 10.5 olarak tespit etmişlerdir. Kısmi olarak saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı 94500 Da. olarak bulmuşlardır. Enzimin alkalın pH değerlerinde (9,5-13.0) oldukça stabil olduğunu ve 100 °C’de aktivitesinin % 85,5 oranında koruduğunu bulmuşlardır. CaCl₂ ve PMSF’nin enzim aktivitesinin artmasına yol açtığını, Zn, Na, Na-sulphide, EDTA, Ürea ve SDS’nin enzim aktivitesinin azalmasına neden olduğunu tespit etmişlerdir.

Baysal ve ark.⁵⁵ (2003) Sıcak su kaplıcalarından izole edilen *Bacillus subtilis*'te α -amilaz üretimi üzerine bazı karbon kaynakları, azot kaynakları ve deterjanların etkisini araştırmışlardır. Karbon kaynaklarından mısır nişastası, sükröz, fruktoz ve galaktozda diğer karbon kaynaklarına oranla daha fazla α -amilaz üretiminin olduğunu saptamışlardır. Azot kaynaklarından da lizin ve metioninde daha fazla α -amilaz üretimi tespit etmişlerdir. Amilaz üretimini arttırmak için ortama belirli yüzdelerde çözünebilir nişasta ve yeast ekstrakt eklemişlerdir. Çözünebilir nişastada % 3.5, yeast ekstraktta % 1.5 oranlarında enzim üretiminin maksimuma ulaştığını tespit etmişlerdir.

Konsula ve ark.⁵⁶ (2004) Ilımlı termofilik *Bacillus subtilis*'ten ekstraselüler termostabil α -amilaz üretimini gerçekleştirmişlerdir. Maksimum amilaz üretimini 40 °C'de düşük oranda nişasta içeren ortamda elde etmişlerdir. Enzimin, maksimum aktivitesini 135 °C' de ve pH 6.5'ta gösterdiğini bulmuşlardır.

Das ve ark.²¹ (2004) *Bacillus subtilis* DM-03'ten termostabil, alkali, ekstraselüler olan α -amilaz enziminin saflaştırmasını ve biyokimyasal karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Saflaştırılan enzimin molekül ağırlığını 42.8 kDa., optimum sıcaklığını 52-55 °C, optimum pH'sını da 9.0 olarak bulmuşlardır. Karbon kaynağı olarak çözünebilir nişasta, azot kaynağı olarak da Amonyum klorürde maksimum amilaz üretimini tespit etmişlerdir. Enzimin, 95 °C'de 10 dakika sonunda aktivitesinin % 60'ını kaybettiğini saptamışlardır. PMSF, SDS, Üre ve EDTA varlığında enzimin aktivite kaybına uğradığını tespit etmişlerdir.

Aiyer⁵⁷ (2004) *Bacillus licheniformis* SPT 27'de ekstraselüler α -amilaz üretimi üzerine karbon ve azot kaynaklarının etkisini araştırmışlardır. Nişasta varlığında amilaz üretiminin arttığını, Şekerlerden fruktoz, azot kaynaklarından da pepton ve amonyum hidrojen fosfatın amilaz üretimini diğer şeker ve azot kaynaklarına oranla daha fazla arttırdığını tespit etmişlerdir.

Goyal ve ark.²⁴ (2005) Sıcak su kaplıcalarından yeni izole edilen *Bacillus sp.* I-3'ten termostabil α -amilaz üretmişlerdir. Maksimum enzim üretimini 48. saatte tespit etmişlerdir. Kısmi olarak saflaştırdıkları enzimin 70 °C'de ve pH 7.0'de maksimum aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. 10 mM CaCl₂.2H₂O varlığında enzimin 70 °C'de 3.5 saat sonrasında aktivitesinin % 90'mından fazlasını koruduğunu saptamışlardır.

Najafi ve ark.¹⁷ (2005) Termofilik *Bacillus subtilis* AX20'den α -amilaz enziminin saflaştırılmasını ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Enzimin molekül ağırlığını 149 kDa., optimum sıcaklığını 55 °C ve optimum pH'sını da 6.0 olarak bulmuşlardır. Enzim, Hg²⁺, Ag²⁺ ve Cu²⁺ tarafından inhibe edildiğini, EDTA'da etkilenmediğini tespit etmişlerdir.

Sajedi ve ark.⁵⁸ (2005) *Bacillus sp.* KR-8104'ten ekstraselüler α -amilaz enzimini saflaştırmışlardır. Maksimum α -amilaz üretimini 60-65. saatlerde belirlemişlerdir. Enzimin molekül ağırlığını 59 kDa., enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH değerini 4.0-6.0 ve optimum sıcaklığını 75-80 °C olarak

belirlemişlerdir. Ca^{2+} ve EDTA'nın enzim aktivitesini ve termal stabilitesini etkilemediğini tespit etmişlerdir.

Poli ve ark.⁴⁸ (2006) Antartica'daki geotermal su kaynaklarından izole ettikleri *Anoxybacillus amylolyticus* sp.'den α -amilaz üretimini ve kısmi olarak saflaştırmasını gerçekleştirmişlerdir.

Ezeji ve Bahl⁵⁹ (2006) *Geobacillus thermodenitrificans* HRO10'dan α -amilaz enzimini saflaştırmışlardır. Enzimin molekül ağırlığını 58 kDa, optimum sıcaklığını 80 °C, optimum pH değerini 5.5 olarak belirlemişlerdir. Ca^{+} varlığında enzimin 70 °C'de 1 saat sonunda orijinal aktivitesinin % 92'den fazlasını koruduğunu ve enzimin EDTA tarafından güçlü bir şekilde inhibe edildiğini tespit etmişlerdir.

Khajeh ve ark.⁶⁰ (2006) *Bacillus licheniformis* ve *Bacillus amyloliquefaciens* tarafından salgılanan α -amilazların gliserol ve sorbitol varlığında termostabilitelelerinin arttığını tespit etmişlerdir.

Asgher ve ark.¹¹ (2007) Termofilik *Bacillus subtilis* JS-2004'ten termostabil α -amilaz üretmişlerdir. Bakterinin ürediği ortama kalsiyum, yeast ekstrakt ve glukoz ilave ederek bu maddelerin bakterinin üremesine ve enzim üretimine olan etkilerini araştırmışlardır. Maksimum enzim üretimini 72 U/ml olarak 48. saatte pH 7.0'da ve 50 °C'de elde etmişlerdir. Kalsiyum ve yeast ekstrakt ilavesinin mikrobiyal büyümeyi ve enzim üretimini arttırdığını, % 1'lik glukozun ise

azalttığını gözlemlemişlerdir. Ham enzimde optimum sıcaklığı 70 °C, optimum pH'yı 8.0 olarak bulmuşlardır. Enzimin 60 °C ve 70 °C'de 1 saat sonunda oldukça stabil olduğunu, 80 °C'de aktivitesinin % 12'sini, 90 °C'de ise aktivitesinin % 48'ini kaybettiğini tespit etmişlerdir. Enzim aktivitesinin Ca²⁺ varlığında arttığını, Co²⁺, Cu²⁺ ve Hg²⁺ tarafından güçlü bir şekilde inhibe edildiğini fakat Mg²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺, Fe²⁺ ve Mn²⁺ iyonlarından daha az etkilendiğini belirlemişlerdir.

Saxena ve ark.⁴⁵ (2007) *Bacillus sp.* PN5'ten oldukça termostabil ve alkalın olan α -amilaz enzimini üretmişlerdir. Kısmi olarak saflaştırdıkları enzimi karakterize etmeye çalışmışlardır. (%) 0.6 nişasta, 0.5 pepton, 0.3 yeast ekstrakt içeren besiyerinde 60 °C'de pH 7.0'da 60 saat inkübasyon sonrası 65.23 U/ml amilaz üretmişlerdir. Maksimum amilaz aktivitesini pH 10.0'da ve 90 °C'de tespit etmişlerdir. Enzimin pH 10'da 1 saat öninkübasyon sonrası aktivitesinin % 80'ini koruduğunu, 105 °C'de % 65 oranında aktivite gösterdiğini ve 80 °C ile 100 °C arasındaki sıcaklıklarda 1 saat inkübasyon sonrası % 100 stabilite gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Rao ve ark.⁶¹ (2007) *Geobacillus thermoleovorans*'dan saflaştırdıkları α -amilazın molekül ağırlığını 26 kDa., optimum sıcaklığını 100 °C ve optimum pH değerini 8.0 olarak tespit etmişlerdir. Mg²⁺'un enzim aktivitesini arttırdığını, N-Ethylmaleimide, EDTA ve PMSF'nin enzim üzerine kısmen inhibisyon etkisi gösterdiklerini belirlemişlerdir.

Arikan⁴¹ (2008) Termofilik *Bacillus sp.* A3-15'ten termostabil ve alkalın olan α -amilaz enzimini üretmişlerdir. Kısmi olarak saflaştırılan enzimde optimum aktivite pH 11.0 ve 70 °C olarak bulunmuştur. Enzimin molekül ağırlığı nişastalı SDS-PAGE elektroforezi yapılarak bulunmuş olup 86 ve 60 kDa. molekül ağırlıklarında bağımsız iki band elde etmişlerdir. Enzimin pH 10.0 ile 11.5 alkalın pH aralıklarında % 95 oranında aktif olduğunu ve 100 °C'de 30 dakika öninkübasyon sonrası orijinal aktivitesini % 96 oranında koruduğunu tespit etmişlerdir. 5 mM CaCl₂ varlığında enzim aktivitesinde % 30 artış tespit etmişlerdir. Enzimin 5 mM EDTA, ZnCl₂, NaCl₂, Na-sülfid, 3mM PMSF, Üre, SDS tarafından inhibe edildiğini ve pH 10.0 ile 11.0 aralığında ve 60 °C'de 24 saat sonra yaklaşık % 70 oranında stabil kaldığını tespit etmişlerdir.

Liu ve ark.⁶² (2008) Yeni izole edilen *Bacillus sp.* YX-1'den α -amilaz enziminin üretimini, saflaştırılmasını ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Maksimum amilaz aktivitesini 45 °C' de 44. saatte tespit etmişlerdir. Saflaştırılan Enzimin molekül ağırlığını SDS-PAGE elektroforezi yapılarak 56 kDa., enzimin maksimum aktivitesini pH 5.0'da gösterdiğini ve pH 4.5 ile 11.0 arasında stabilite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Enzimin optimum sıcaklığını ise 40-50 °C arasında bulmuşlardır. Farklı nişasta çeşitleri substrat olarak kullanmışlar ve en iyi enzim aktivitesini mısır nişastasında bulmuşlardır.

Ben Abdelmalek-Khedher ve ark.⁶³ (2008) *Sclerotinia sclerotiorum*'dan elde ettikleri ve saflaştırdıkları α -amilazın molekül ağırlığını 43 kDa., optimum sıcaklığını 55 °C ve optimum pH değerini, 4.0 olarak belirlemişlerdir. Enzimin Km

ve Vmax değerlerini sırasıyla 1.66 mg/ml ve 0.1 micromol glucose x min⁻¹ x ml⁻¹ olarak belirlemişlerdir. Enzimin Cu²⁺ tarafından güçlü bir şekilde inhibe edildiğini, DTT ve β-mercaptoethanolun enzim aktivitesini güçlü bir şekilde arttırdığını tespit etmişlerdir.

Prakash ve ark.⁶⁴ (2009) *Chromohalobacter sp.* TVSP 101'den termostabil, halotolerant ve alkali-stabil olan ekstraselüler α-amilaz enziminin üretimini, saflaştırılmasını ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Maksimum amilaz üretimini, pH 9.0'da ve 37 °C'de % 20 NaCl, % 15 KCl ve karbon kaynağı olarak % 0.5'lik pirinç unu, azot kaynağı olarak ta % 0.5 tripton varlığındaki ortamda elde etmişlerdir. Ortama 50 mM CaCl₂ ilavesinin enzim üretimini % 29 oranında arttırdığını belirlemişlerdir. Amilaz1 ve amilaz2 olarak adlandırılan iki enzim saflaştırdıktan sonra molekül ağırlıklarına bakmışlar ve sırasıyla 72 kDa. ve 62 kDa. olarak tespit etmişlerdir. Her iki enzimin de maksimum aktivitesini pH 9.0'da ve 60 °C'de gösterdiklerini bulmuşlardır.

Shafiei ve ark.¹⁹ (2010) *Nesterenkonia sp.* strain F'den salgılanan α-amilaz enziminin saflaştırılmasını ve biyokimyasal karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Enzimin molekül ağırlığını yaklaşık 100-106 kDa., optimum sıcaklığını 45 °C, optimum pH'sını 7.5 olarak tespit etmişlerdir. Fe³⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, ve Al³⁺ iyonlarının amilaz aktivitesini oldukça inhibe ettiğini fakat enzim aktivitesini Ca²⁺ tarafından arttırıldığını saptamışlardır. EDTA'nın enzim üzerinde inhibisyon etkisi oluştururken PMSF ve β-mercaptoethanol'un enzim üzerinde inhibisyon etkisi oluşturmadığını tespit etmişlerdir. % 0.5 SDS, % 2 Triton X-100, Tween 80, Tween

20 deterjanlarına karşı enzimin oldukça stabil olduğunu bulmuşlardır. Çözünebilir nişasta kullanılarak enzimin Km değeri 4.5 mg/ml olarak bulunmuştur.

Asoodeh ve ark.⁶⁵ (2010)

Termofilik *Bacillus sp. Ferdowsicous*'dan α -amilaz enziminin saflaştırılmasını ve biyokimyasala karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Enzimin molekül ağırlığını 53 kDa. olarak tespit etmişlerdir. Enzimin aktivite gösterdiği optimum pH değerini 4.5 olarak bulmuşlar ve enzimin 3.5 ile 7.0 pH değerlerinde stabil olduğunu belirlemişlerdir. Enzimin aktivite gösterdiği optimum sıcaklığını 70 °C olarak tespit etmişler ve enzimin 75 °C'de 45 dakika sonunda aktivitesinin % 75'ini koruduğunu saptamışlardır. Enzim aktivitesinin EDTA ve Zn^{2+} tarafından azaltıldığını, Mg^{2+} , Ca^{2+} , PMSF, Triton X-100 ve β -mercaptoethanol' un enzim aktivitesini arttırdığını bulmuşlardır.

Mollania ve ark.⁶⁶ (2010) termofilik *Geobacillus sp. LH8*'den salgılanan α -amilaz enziminin saflaştırılmasını ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Enzimin molekül ağırlığını 52 kDa., optimum sıcaklığını 80 °C ve optimum pH değerini 5.0-7.0 olarak belirlemişlerdir. Ca^{2+} varlığının enzim aktivitesini arttırdığını, EDTA'nın ise inhibe ettiğini bulmuşlardır. Enzimin Km değerini 3mg/ml, Vmax değerini ise 6.5 μ mol/min olduğunu tespit etmişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Gavrilescu, M.; Chisti, Y. *Biotechnology a sustainable alternative for chemical industry*, *Biotechnology Advances*, **2005**, 23, 471–499
2. Özdemir, S. *Musa textillis (Muz) Kabuğu Kullanılarak Katı-Faz Fermantasyon Tekniği İle (SSF) Bacillus sp. 'de α -Amilaz Üretilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır, **2004**
3. Falciola, L. *Searching biotechnology information: A case study*, *World Patent Information*, 2009, 31, 36-47
4. Kıran Ö.E.; Çömlekçioğlu, U.; Dostbil, N. *Zeytinli İlçası (Kahramanmaraş)'ndan Termofil Alkalifilik Amilolitik Bacillus sp. Suşlarının İzolasyonu ve Amilaz Üretme Yetenekleri Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi*, *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, **2003**, 6(2), 41-48.
5. van Beilen, J.B.; Li, Z. *Enzyme technology: an overview*, *Current Opinion in Biotechnology*, **2002**, 13, 338-344
6. Pandey A.; Webb, C.; Soccol, C.R. *Enzyme Technology*, Springer, **2008**
Erişim: <http://books.google.com.tr> (19.03.2010)
7. Karademir A.; Akgül M.; Tutuş A. *Kağıt Endüstrisinde Enzim Kullanımına Genel Bir Bakış: Enzimlerin Kabuk Soyma, Liflerin Modifikasyonu, Çözünebilir Kağıt Hamuru ve Selüloz Üretiminde Kullanımı (Bölüm 1)*, *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, **2002**, 5 (1)
8. Gözükara, M.E. *Biyokimya*, Nobel Tıp Kitapevleri, Ankara, **1997**
9. Tatar, S. *Termofil Moderately Halofilik Bacillus Sp. Suşlarından Amilaz Enzimi Üretimi Ve Endüstriyel Kullanım Olanaklarının Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, **2007**

10. Özşahin, A.D. *Kahramanmaraş İli Kağıt Fabrikaları Çevresinden İzolasyonu Yapılan Bacillus sp. Suşlarından Elde Edilen Selüloz Enziminin Karakterizasyonu ve Biyoteknolojide Kullanılabilirliğinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı, Kahramanmaraş, **2006**

11. Asgher, M.; Asad, M.J.; Rahman, S.U.; Legge, R.L. *A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic Bacillus subtilis strain for starch processing*, *Journal of Food Engineering* , **2007**, 79, 950–955

12. Gupta, R.; Gigras, P.; Mohapatra, H.; Goswami, V.K.; Chauhan, B. *Microbial α -amylases: a biotechnological perspective*, *Process Biochemistry*, **2003**, 38, 1599-1616

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

14. Liu, B.; Wang, Y.; Zhang, X. *Characterization of recombinant maltogenic amylase from deep sea thermophilic Bacillus sp. WPD616*, *Enzyme and Microbial Technology*, **2006**, 39, 805-810

15. Hsieh, M.-S.; Yin, L.-j.; Jiang, S.-T. *Purification and characterization of the amylase from a small abalone Hliotis sieboldii*, *Fisheries Science*, **2008**, 74, 425-432

16. Chi, M.-C.; Chen, Y.-H.; Wu, T.-J.; Lo, H.-F.; Lin, L.-L. *Engineering of a truncated α -amylase of Bacillus sp. strain TS-23 for the simultaneous improvement*

of thermal and oxidative stabilities, Journal of Bioscience and Bioengineering, **2010**, 109, 531-538

17. Najafi, M.F.; Deobagkar, D.; Deobagkar, D. *Purification and characterization of an extracellular α -amylase from Bacillus subtilis AX20, Protein Expression and Purification*, **2005**, 41, 349-354

18. Nazmi, A.R.; Reinisch, T.; Hinz, H.J. *Ca-binding to Bacillus licheniformis α -amylase (BLA), Archives of Biochemistry and Biophysics*, **2006**, 453, 18-25

19. Shafiei, M.; Ziaee, A.-A.; Amoozegar, M.-A. *Purification and biochemical characterization of a novel SDS and surfactant stable, raw starch digesting, and halophilic α -amylase from a moderately halophilic bacterium, Nesterenkonia sp. strain F, Process Biochemistry*, **2010**, 45, 694-699

20. Kunamneni, A.; Permaul, K.; Singh, S. *Amylase production in Solid state fermentation by the thermophilic fungus Thermomyces lanuginosus, Journal of Bioscience and Bioengineering*, **2005**, 100, 168-171

21. Das, K.; Doley, R.; Mukherjee A.K. *Purification and Biochemical characterization of a thermostable, alkaliphilic, extracellular α -amylase from Bacillus subtilis DM-03, a strain isolated from the traditional fermented food of India, Biotechnol. Appl. Biochem.*, **2004**, 40, 291-298

22. Sivaramakrishnan, S.; Gangadharan, D.; Nampoothiri, K.M.; Soccol, C.R.; Pandey, A. *α -Amylases from Microbial Sources – An Overview on Recent Developments, Food Technol. Biotechnol*, **2006**, 44 (2) 173–184

23. van der Maarel, M.J.E.C.; van der Veen, B.; Uitdehaag, J.C.M.; Leemhuis, H.; Dijkhuizen, L. *Properties and application of starch-converting enzymes of the α -amylase family*, *Journal of Biotechnology*, **2002**, 94, 137-155
24. Goyal, N.; Gupta, J.K.; Soni, S.K. *A novel raw starch digesting thermostable α -amylase from Bacillus sp. 1-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch*, *Enzyme and Microbial Technology*, **2005**, 37, 723-734
25. Bertoldo, C.; Antranikian, G. *Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria*, *Current Opinion in Chemical Biology*, **2002**, 6, 151-160
26. Nielsen, J.E.; Borchert, T.V. *Protein engineering of α -amylase*, *Biochimica et Biophysica Acta*, **2000**, 1543, 253-274
27. Niehaus, F.; Bertoldo, C.; Kahler, M.; Antranikian, G. *Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application*, *Appl Microbiol Biotechnol*, **1999**, 51, 711-729
28. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Amiloz>, 25.02.210
29. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Ni%C5%9Fasta>, 25.02.210
30. Uhlig, H.; Linsmaier-Bednar, E.M. *Industrial Enzymes and Their Applications*, *Wiley IEEE*, **1998**
31. Singh, S.; Permaul, K. *Application Of Thermostable α -Amylase From Thermomyces Lanuginosus Atcc 58157 To Nutritionally Enhance Starch Based Food by Thiriloshani Padayachee*, Doktora Tezi, Department of Biotechnology Faculty of Engineering, Science and the Built Environment Durban University of Technology, Durban, **2006**,

32. Kiran, Ö.E.; Çömlekçioğlu, U.; Dostbil, N. *Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstride kullanım alanları, KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, **2006**, 9 (1)
33. Vieille, C.; Zeikus, G.J. *Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability, Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **2001**, 65 (1), 1-43
34. Aiyer, P.V. *Amylases and Their Applications, African Journal of Biotechnology*, **2005**, 4 (13), 1525–1529
35. Amilaz, **2005**, Erişim: [http:// www.hekimce.com](http://www.hekimce.com) , 26.02.2010
36. Haki, G.D.; Rakshit, S.K. *Developments of industrially important thermostable enzymes: a review, Bioreosurce Techonology*, **2003**, 89, 17-34
37. Kumar, H.D.; Nussinov, R. *How Do Thermophilic Proteins Deal with Heat? A Review. Cellular and Molecular Life Sciences*, **2001**, 58, 1216-1233
38. Bruins, M.E.; Janssen, A.E.M.; Boom, R.M. *Thermozymes and Their Applications a Review of Recent Literature and Patents, Applied Biochemistry and Biotechnology*, **2001**, 90, 155-186
39. Turner, P.; Mamo. G.; and Karlsson, E.N. *Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining, Microbial Cell Factories* **2007**, vol. 6:9
40. Cordeiro, C.A.M.; Martins, M.L.L.; Luciano, A.B. *Production And Properties Of A-Amylase From Thermophilic Bacillus Sp. Brazilian Journal of Microbiology*, **2002**, 33, 57-61
41. Arıkan, B. *Highly thermostable, thermophilic, alkaline, SDS and chelator resistant amylase from a thermophilic Bacillus sp. isolate A3-15, Bioresource Technology*, **2008**, 99, 3071-3076

42. Demirjian, D.C.; Moris-Varas, F.; Cassidy, C.S. *Enzymes from extremophiles*, *Current Opinion in Chemical Biology* **2001**, 5, 144–151
43. van der Burg, D. *Extremophiles as a source for novel enzymes*, *current opinion in Microbiology*, **2003**, 6, 213-218.
44. Regulapati, R.; Malav, P.M.; Gummadi, S.N. *Production of Thermostable α -amylase by Solid State Fermentation-A Review*, *American Journal of Food Technology*, **2007**, 2 (1), 1-11.
45. Saxena, R.K.; Dutt, K.; Agarwal, L.; Nayyar, P. A. *highly thermostable and alkaline amylase from a Bacillus sp. PN5*, *Bioresource Technology*, **2007**, 98, 260-265
46. Burhan, A.; Nisa, Ü.; Gökhan, C.; Ömer, C.; Ashabil, A.; Osman, G. *Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic Bacillus sp. isolate ANT-6*, *Process Biochemistry*, **2003**, 38, 1397-1403
47. Gül-Güven, R. *Sıcak Su Kaplıcalarıdan Bakteri İzolasyonu Tanımlanması ve Alicyclobacillus Acidocaldarius Subsp. Rittman11'nin β -Galaktozidaz Enziminin Saflaştırılması*, Doktora Tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır, **2007**
48. Poli, A.; Esposito, E.; Lama, L.; Orlando, P.; Nicolaus, G.; Appolonia, F.; Gambacorta, A.; Nicolaus, B. *Anoxybacillus amylolyticus sp. nov., a thermophilic amylase producing bacterium isolated from Mount Rittmann (Antarctica)*, *Systematic and Applied Microbiology*, **2006**, 29, 300-307

49. Gul-Guven, R.; Guven, K.; Poli, A.; Nicolaus, B. *Anoxybacillus kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* subsp. nov.; a thermophilic bacterium isolated from a hot spring in Batman, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **2008**, 54, 327-334
50. Poli A.; Romano, I.; Cordella, P.; Orlando, P.; Nicolaus, B.; Berrini, C.C. *Anoxybacillus thermarum* sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from thermal mud in Euganean hot springs, Abano Terme, Italy, *Extremophiles*, **2009**, 13, 867-874
51. Derekova, A.; Sjolholm, C.; Mandeva, R.; Kambourova, M. *Anoxybacillus rupiensis* sp. Nov., a novel thermophilic bacterium isolated from Rupi basin (Bulgaria), *Extremophiles*, **2007**, 11, 577–583
52. Mamo, G.; Gessesse, A. Purification and characterization of raw-starch digesting thermostable α -amylase from a thermophilic *Bacillus*, *Enzyme and Microbial Technology*, **1999**, 25, 433-438
53. Hamilton, L.M.; Kelly, C.T.; Fogarty, W.M. Production and properties of the raw starch-digesting α -amylase of *Bacillus* sp. IMD 435, *Process Biochemistry*, **1999**, 35, 27-31
54. Aguilar, G.; Morlon-Guyot, J.; Trejo-Aguilar, B.; Guyot, J.P. Purification and characterization of extracellular α -amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010^T, amylolytic lactic acid bacterium, *Enzyme and Microbial Technology*, **2000**, 27, 406-413
55. Baysal, Z.; Uyar, F.; Aytakin, Ç. Production of α -amylase by thermotolerant *Bacillus subtilis* in the presence of some carbon, nitrogen containing compounds and surfacants, *Annals of Microbiology*, **2003**, 53 (3), 323-328

56. Konsula, Z.; Liakopoulou-Kyriakides, M. *Hydrolysis of starches by the action of α -amylase from Bacillus subtilis*, *Process Biochemistry*, **2004**, 39, 1745-1749
57. Aiyer, P.V.D. *Effect of C:N ratio on alpha amylase production by Bacillus licheniformis SPT 27*, *African Journal of Biotechnology*, **2004**, 3 (10), 519-522
58. Sajedi, R.H.; Naderi-Manesh, H.; Khajeh, K.; Ahmadvand, R.; Ranjbar, B.; Asoodeh, A.; Moradian, F. *A Ca-independent α -amylase that is active and stable at low pH from the Bacillus sp. KR-8104*, *Enzyme and Microbial Technology*, **2005**, 36, 666-671
59. Ezeji, T.C.; Bahl, H. *Purification, characterization, and synergistic action of phytate-resistant α -amylase and α -glucosidase from Geobacillus thermodenitrificans HRO10*, *Journal of Biotechnology*, **2006**, 125, 27–38
60. Khajeh, K.; Shokri, M.M.; Asghari, S.M.; Moradian, F.; Ghasemi, A.; Sadeghi, M.; Ranjbar, B.; Hosseinkhani, S.; Gharavi, S.; Naderi-Manesh, H. *Acidic and proteolytic digestion of α -amylases from Bacillus licheniformis and Bacillus amyloliquefaciens: Stability and flexibility analysis*, *Enzyme and Microbial Technology*, **2006**, 38, 422-428
61. Rao, J.L.U.M.; Satyanarayana, T. *Purification and Characterization of a Hyperthermostable and High Maltogenic α -Amylase of an Extreme Thermophile Geobacillus thermoleovorans*, *Appl Biochem Biotechnol*, **2007**, 142, 179–193
62. Liu, X.D.; Xu, Y. *A novel raw starch digesting α -amylase from a newly isolated Bacillus sp. YX-1: Purification and characterization*, *Bioresource Technology*, **2008**, 99, 4315-4320

63. Ben Abdelmalek-Khedher, I.; Urdaci, M.C.; Limam, F.; Schmitter J.M.; Marzouki, M.N.; Bresollier, P. *Purification, characterization, and partial primary sequence of a major-maltotriose-producing alpha-amylase, ScAmy43, from Sclerotinia sclerotiorum*, *J Microbiol Technol*, **2008**, 18 (9), 1555-63
64. Prakash, B.; Vidyasagar, M.; Madhukumar, M.S.; Muralikrishna, G.; Sreeramulu K. *Production, Purification, and characterization of two extremely halotolerant, thermostable, and alkali-stable α -amylases from Chromohalobacter sp. TVSP 101*, *Process Biochemistry*, **2009**, 44, 210-215
65. Asoodeh, A.; Chamani, J.K.; Lagzian, M. *A novel thermostable, acidophilic α -amylase a new thermophilic “ Bacillus sp. Ferdowsicus” isolated from Ferdows hot mineral spring Iran: Purification and biochemical characterization*, *International Journal of Biological Macromolecules*, **2010**, 46, 289–297
66. Mollania, N.; Khajeh, K.; Hosseinkhani, S.; Dabirmanesh, B. *Purification and characterization of a thermostable phytate resistant α -amylase from Geobacillus sp. LH8*, *International Journal of Biological Macromolecules*, **2010**, 46, 27–36

3. MATERİYAL ve METOD

3.1. Biyolojik Materyal

Çalışmalarımızda biyolojik materyal olarak Dargeçit sıcak su kaplıcalarından izole edilen *Anoxybacillus sp.* AH1 kullanılmıştır.

3.2. Kimyasal Maddeler

3.2.1. Karbon Kaynakları

Maltoz, laktoz ve fruktoz Sigma'dan, glukoz, gliserol ve sükröz Merck'ten, galaktoz Difco'dan temin edilmiştir.

3.2.2. Nişastalar

Çözünebilir nişasta Sigma'dan, Patates nişastası Arı'dan, mısır ve buğday nişastaları Carrefour'dan temin edilmiştir.

3.2.3. Azot Kaynakları

Tripton Sigma'dan, Üre, yeast ekstrakt, Amonyum klorür ve Amonyum sülfat Merck'ten, beef ekstrakt Acumedia'dan, pepton Oxoid'den ve kazein Sigma'dan temin edilmiştir.

3.2.4. Besiyeri Maddeleri

Nutrient Broth ve Agar Merck'ten temin edilmiştir.

3.2.5. Kimyasallar

CaCl₂, EDTA, CuCl₂ ve Ürea Merck Darmstadt'dan; MgCl₂ Kimetsan'dan ; ZnCl₂ LACHEMA'dan temin edilmiştir.

p-Chloromercuribenzoate (PCMB), Dithiothreitol (DTT), N-Ethylmaleimide (NEM), 1-10 Phenanthroline monohydrate ve İodoacetamide (IAA) Sigma'dan; Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) Fluka Bichemica'dan; β-Mercaptoethanol Merck Schuchardt'dan temin edilmiştir.

3.2.6. Deterjanlar

Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) ve Tween 40 Merck'ten TritonX-100 Sigma'dan ve Bingo ticari olarak temin edilmiştir.

3.2.7. Elektroforetik Maddeler

Tris-Base[Tris(hydroxymetyl) amino methane], akrilamid, N-N-Metilen bisakrilanid, TEMED (N-N'-N'-N'-Tetrametiletlen diamin), APS (Amonyum persülfat), standart proteinler (ticari α-amilaz) ve Glisin Sigma Chemical Co., St. Louis 'den, Coomassie Brilliant Blue R-250 Rio-Rad ' dan, BFB (Brom Fenol Blue), SDS (Sodyum dodesil sülfat), ve Gliserol Merck' ten temin edildi.

3.3. Besiyerleri

3.3.1. Sıvı Besiyerleri

NB1 Besiyeri

8 g NB çeşme suyu ile 1000 ml'ye tamamlanıp otoklavlandı.

BM1 Besiyeri

2 g beef ekstrakt, 2 g pepton ve 1 g NaCl saf su ile 1000 ml' ye tamamlanıp otoklavlandı.

BM2 Besiyeri

20 g çözünebilir nişasta, 2 g yeast ekstrakt, 10 g beef ekstrakt, 0.2 g CaCl₂ ve 0.1 g MgSO₄.7H₂O saf su ile 1000 ml' ye tamamlanıp otoklavlandı.

BM3 Besiyeri

2 g yeast ekstrakt, 10 g beef ekstrakt, 0.2 g CaCl₂ ve 0.1 g MgSO₄.7H₂O saf su ile 1000 ml' ye tamamlanıp otoklavlandı.

LB Besiyeri

10 g tripton, 5 g yeast ekstrakt, 5 g NaCl ve 1000 µl NaOH saf su ile 1000 ml' ye tamamlanıp otoklavlandı.

NB2 Besiyeri

8 g NB saf su ile 1000 ml' ye tamamlanıp otoklavlandı.

3.3.2. Katı Besiyeri

8 g Nutrient Broth besi yerine 15 g agar ilave edilip çeşme suyuyla 1000 ml' ye tamamlanıp otoklavlandı.

3.4. Tamponlar

- pH: 4.0-5.5 tamponlarını hazırlamak için; 0.1 M sitrik asit hazırlandı.
- pH:6 ve pH:6.5, tamponlarını hazırlamak için 0.1 M sodyum fosfat hazırlandı.
- pH: 7.0-9.0 tamponlarını hazırlamak için 0.1 M tris-HCl hazırlandı.
- pH:9.5-11.0 tamponlarını hazırlamak için 0.1 M glisin-NaOH hazırlandı.

3.5. Kullanılan Aletler

Steril Kabin	(Telstar AV-100)
Soğutmalı Santrifüj	(Sigma Christ 2K15)
Spektrofotometre	(UV mini 1240 SHIMADZU)
Etüv	(Heraus)
Magnetik Karıştırıcı	(Stuart)
Etüv	(Heraus)
Deep-Freeze	(Harris, -95 °C)
Vorteks	(VWR INTERNATIONAL)
Çalkalayıcı	(P SELECTA UNITRONIC OR)
pH metre	(METLER TOLEDO MP220)
İnkübatör	(Sanyo)
Hassas Terazî	(GEG, AVERY)
Otoklav	(HICLAVE HV-50L)
Su Banyosu	(Grant 6G, -20, +100 °C)
Sterilizatör	(Heraus)

3.6. Bakteri Üretimi

Katı besiyerinden, çeşme suyuyla hazırlanmış NB sıvı besiyerine platin öze yardımıyla ekim yapıldı. Çalkalayıcıda 60 °C' de 120 rpm çalkalama hızıyla 24 saat inkübasyona bırakıldı.

3.7. Enzim Eldesi

Çeşme suyuyla hazırlanmış NB besi yerinde 24 saat inkübasyon sonunda besiyeri 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek elde edilen üst sıvı enzim deneylerinde kullanıldı.

3.8. α -Amilaz Enzimi Aktivite Tayini

α -Amilaz aktivite tayini Bernfeld (1955) yöntemine göre yapıldı. Bu yöntemde göre 100 μ l üst sıvı (enzim çözeltisi) ile % 0.5' lik nişasta çözeltisi (0.1 M Tris-HCl (pH 7.0) tamponunda çözülerek hazırlandı.) 60 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda 400 μ l DNS ayırıcı ilave edildi ve renk reaksiyonunun gerçekleşmesi için 5 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. DNS, yüksek sıcaklıkta indirgen şeker uçlarıyla tepkimeye girerek renk oluşmasını sağlar. Daha sonra 3 ml saf su ile seyreltme yapıldı ve 489 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapıldı.

Bernfeld Reaktifinin Hazırlanışı

Bir beherde 20 g 3,5 dinitro salisilik asit (DNS) 400 ml saf su içerisinde çözüldü. Diğer bir beherde 32 g NaOH 300 ml saf suda çözünerek yavaş yavaş 3,5 dinitro salisik (DNS) asit üzerine eklendi. Bir süre sıcak su banyosunda bekletildi. Daha sonra karışıma 600 g Na-K tartarat azar azar eklendi. Hacim saf su ile 2000 ml'ye tamamlanarak α -amilaz enzim aktivite tayininde reaksiyon durdurucu olarak kullanıldı¹.

3.9. Enzim Üretimi Üzerine Değişik İnkübasyon Sürelerinin Araştırılması

100 ml'lik erlenlerde 25 ml sıvı besiyerleri (pH 7.5) hazırlanarak her birine 1000 µl bakteri ekimi yapıldı ve bakterinin ürediği optimum sıcaklık olan 60 °C'de inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 3-72. saatleri sonunda Bernfeld (1955) yöntemine göre α-amilaz aktivite tayini yapıldı.

3.10. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

Enzim olarak NB besiyerinden elde edilen ham ekstrakt ve Amonyum Sülfat çöktürmesi ve diyaliz tekniği kullanılarak kısmi saflaştırma ile elde edilen enzim çözeltisi ayrı ayrı kullanıldı. Substrat olarak kullanılan çözünebilir nişasta % 0.5'lik olacak şekilde sırasıyla 0.1 M sitrik asit (pH 4.0- 5.5), 0.1 M sodyum fosfat (pH 6.0 ve 6.5), 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0-9.0), 0.1 M glisin-NaOH (pH 9.5-11.0) tamponlarında ayrı ayrı hazırlandı. Daha sonra Bernfeld yöntemine göre enzimin aktivite tayini yapıldı. En yüksek absorbans değerinin elde edildiği pH değeri 100 kabul edilerek diğer pH değerleri buna göre oranlandı ve rölatif enzim aktivitesi saptandı².

3.11. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Enzim kaynağı olarak NB besiyerinden elde edilen ham ekstrakt ve Amonyum Sülfat çöktürmesi ve diyaliz tekniği kullanılarak kısmi olarak saflaştırılmış enzim çözeltisi kullanıldı. Daha sonra 30 °C-90 °C aralığında Bernfeld yöntemine göre enzim aktivite tayinine bakıldı. En yüksek absorbans değerinin elde

edildiği sıcaklık değeri 100 kabul edilerek diğer sıcaklık değerleri buna göre oranlandı ve rölatif enzim aktivitesi saptandı².

3.12. Enzim Üretimi Üzerine Değişik Besiyerlerinin Etkisi

Enzim üretimi üzerine değişik besiyerlerinin etkisinin araştırılması için bakteri NB1, NB2, BM1, BM2, BM3, LB ve NB+%2 çözünebilir Nişasta besiyerlerinde üretildi. 18 saatlik inkübasyon sonrası besiyerleri 10 000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve α -amilaz aktivite tayini yapıldı.

3.13. Enzim Üretimi Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisinin Araştırılması

NB sıvıbesiyerine besiyeri hacminin % 1'ini oluşturacak şekilde azot kaynaklarından, tripton, beef ekstrakt, yeast ekstrakt, pepton, üre, amonyum sülfat, amonyum klorür ve kazein eklendikten sonra otoklavlandı. Daha sonra ekim yapıp 18 saat inkübasyona bırakılan örneklerin üst sıvısından Bernfeld yöntemine göre α -amilaz aktivitesine bakıldı.

3.14. Enzim Üretimi Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisinin Araştırılması

Karbon kaynağı olarak NB sıvı besiyerinin % 0.5 ve % 1'ini oluşturacak şekilde iki ayrı konsantrasyonda karbon kaynaklarından, glukoz, galaktoz, maltoz, laktoz, fruktoz, sükroz ve gliserol tartılarak 30 dakika UV'ye tutuldu. Daha sonra, hazırlanıp otoklavlanan NB besiyerine karbon kaynakları, steril kabinde alevin yanında teker teker eklendi ve ekim yapıldı. 18 saat inkübasyona bırakılan örneklerin üst sıvısından Bernfeld yöntemine göre α -amilaz aktivitesine bakıldı.

3.15. Enzim Üretimi Üzerine Nişastaların Etkisinin Araştırılması

Enzim üretimine nişastaların etkisini saptamak için NB besiyerine % 0.5 ve % 1 oranında çözünebilir nişasta, patates nişastası, buğday nişastası ve mısır nişastası eklenerek otoklavlandı. Daha sonra ekim yapıp 18 saat inkübasyona bırakılan örneklerin üst sıvısından Bernfeld yöntemine göre α -amilaz aktivitesine bakıldı.

3.16. Enzim Üretimi Üzerine CaCl_2 'nin Etkisinin Araştırılması

Enzim üretimi üzerine kalsiyumun etkisini araştırmak için saf suyla hazırlanan NB besi yerlerine toplam hacimde 10 mM, 20 mM, 40 mM, 100 mM, 200 Mm ve 300mM olacak şekilde CaCl_2 eklenerek otoklavlandı. Daha sonra ekim yapıp 18 saat inkübasyon sonrası örneklerin üst sıvısı alınarak α -amilaz aktivite tayini yapıldı.

3.17. Protein Miktar Tayini

Protein miktar tayini Lowry yöntemi baz alınarak yapıldı³. Tüplere 450 μl saf su, 50 μl enzim çözeltisi ve 5 ml alkalın çözeltisi eklendi ve 40 °C'de 15 dakika bekletildi. Daha sonra tüplerin her birine 1:1 oranında seyreltilmiş FCR (Folin reaktifi) ilave edilerek 30 dakika karanlıkta bekletildikten sonra 660 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapıldı. Konsantrasyonunu bilmediğimiz örneklerin protein miktarını hesaplamak için Bovin Serum Albumin'den (BSA) bir seri standart çözelti hazırlandı (1mg/ml). Örneklerin protein miktarı BSA eğrisi standart alınarak hesaplandı.

Alkalın Çözeltisinin Hazırlanışı

Alkalın çözeltisi hazırlamak için, % 4 Na_2CO_3 , % 4 Na-K tartarat ve % 2 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ayrı ayrı hazırlandı. Bir beherde 100 ml % 4 oranında Na_2CO_3

hazırlandı. Daha sonra % 4'lük Na₂CO₃ ve % 2'lik CuSO₄.5H₂O'dan 1'er ml eklenerek karıştırıcıda karışmaları sağlandı. Alkalın çözeltisi protein miktar tayini için kullanıldı.

3.18. Enzimin Kısmi Olarak Saflaştırılması

Çöktürme ve diyaliz için NB sıvı besiyeri (pH 7.5) hazırlanarak otoklavlandı. Sonra ekim yapılarak bakterinin ürediği optimum sıcaklıkta (60 °C) inkübasyona bırakıldı. 18 saat inkübasyon sonrası besiyeri 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek bakteriler kültürden uzaklaştırıldı ve üst sıvı temiz bir behere aktarıldı. Daha sonra sırasıyla % 75, % 80 ve % 90'lık amonyum sülfat çöktürmeleri denendi ve karıştırıcıda +4 °C'de 1 gece bekletildi. Soğuk çöktürme ortamından alınan örnekler +4 °C' de 15.000 rpm' de 20 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Dipte toplanan enzim çökeltisi 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0) tamponunda çözüldü ve elde edilen hacim belirlendi. Daha sonra % 20'lik etil alkolde 30 dk. kaynatılan ve saf su ile tekrar kaynatılarak temizlenen diyaliz hortumu içerisine çöktürme sonrası elde edilen sıvılar ayrı ayrı bırakıldı. Diyaliz hortumu içerisindeki Örnekler 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0) tamponunda tuzdan arındırmak amacıyla +4 °C'de magnetik karıştırıcı üzerinde 1 gece inkübasyona bırakıldı. Diyaliz işlemi sonunda elde edilen hacimler tek tek ölçüldü. Elde edilen sıvı ependorflara bırakılarak -20 °C' de saklandı. Diyaliz öncesi ve diyaliz sonrası Lowry yöntemine göre protein miktar tayini ve amilaz aktiviteleri ayrı ayrı ölçüldü. Tüm karakterizasyon işlemleri % 80 amonyum sülfat çöktürmesi ve sonrasında diyaliz yapılan örnekler kullanılarak gerçekleştirildi.

3.19. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasal Maddelerin Etkisi

Kısmi olarak saflaştırılan enzimde bazı kimyasal inhibitörlerin etkisini araştırmak için inhibitör madde olarak PMSF (1–10 mM), N-ethylmaleimide (1-10 mM), Iodoacetamide (1-10 mM), β -Merkaptoetanol (1-10 mM), DTT (1 -10 mM), PCMB (0.25-4 mM) ve üre (0.1-2 M) kullanıldı. Bu inhibitörlerden PMSF ve N-ethylmaleimide etanolde (Ayrıca bu maddeler etanolde hazırlandığı için aynı orandaki etanolün enzim aktivitesine olan etkisi araştırıldı), Iodoacetamide, β -Merkaptoetanol, DTT, PCMB ve üre 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0) tamponunda hazırlandı.

Deney tüplerine 50 μ l enzim ve uygun konsantrasyonlarda inhibitör madde ilave edilerek 15 dakika inkübasyona bırakıldı. inkübasyon işleminden sonra Bernfeld yöntemine göre aktivite tayini gerçekleştirildi.

3.20. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metal ve Şelatör Maddelerin Etkisi

Kısmi olarak saflaştırılan enzimde bazı metallerin enzim aktivitesine etkisini araştırmak için, EDTA (1-20 mM), 1,10-phenantroline (1-10 mM), CaCl_2 (1-10 mM), CuCl_2 (0.05-1 mM), ZnCl_2 (0.05-2 mM) ve MgCl_2 (1-10 mM) kullanıldı. 1,10-phenanthroline metanolde (Ayrıca 1,10-phenanthroline metanolde hazırlandığı için aynı orandki metanolün enzim aktivitesine olan etkisi araştırıldı), diğer metaller ve EDTA 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0) tamponunda hazırlandı.

Deney tüplerine 50 μ l enzim ve uygun konsantrasyonlarda metal maddeleri ilave edilerek 15 dakika inkübasyona bırakıldı. inkübasyon işleminden sonra Bernfeld yöntemine göre α -amilaz aktivite tayini gerçekleştirildi.

3.21. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Deterjanların Etkisi

Kısmi olarak saflaştırılan enzimin aktivitesi üzerine bazı deterjanların etkisini araştırmak için % 0.5 oranında SDS, Tween-40, TritonX-100 ve içeriğinde enzim ihtiva etmeyen ticari olarak temin edilen BİNGO kullanıldı. Bu deterjanlar 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0) tamponunda hazırlandı. Deney tüplerine 50 µl enzim ve uygun konsantrasyonlarda deterjan maddeleri ilave edilerek 15 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon işleminden sonra Bernfeld yöntemine göre aktivite tayini gerçekleştirildi.

3.22. Enzimin Kinetik Parametrelerinin Hesaplanması

K_m ve V_{max} kinetik parametrelerinin araştırılması için 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0) tamponunda % 0.5, % 1, % 2 ve % 3 oranlarında çözünebilir nişasta hazırlandı. Deney tüplerine kısmi olarak saflaştırılan 50µl enzim solüsyonu ve hazırlanan konsantrasyonlardaki 200µl nişasta solüsyonu karıştırılarak optimum aktivitenin elde edildiğ i sıcaklıkta 30 dakika süreyle inkübasyon gerçekleştirildi ve Bernfeld yöntemine göre aktivite tayini yapıldı. K_m ve V_{max} değerleri Lineweaver–Burk plot'a göre hesaplandı⁴.

3.23. Enzimin Sıcaklık Stabilitesinin Saptanması

Kısmi saflaştırma ile elde edilen α-amilaz enziminin sıcaklık stabilitesinin (termal stabilite) saptanması için 45 °C, 50 °C ve 55 °C sıcaklık değerlerinde sadece enzim kullanılarak 20-120 dakika aralığında ön inkübasyon işlemi gerçekleştirildi. Ön inkübasyon işleminden sonra 50 µl enzim ve 200 µl substrat karışımı kalan enzim aktivitesini saptamak için enzimin aktivite gösterdiğ i optimum sıcaklıkta 30 dakika

inkübasyona bırakıldı. Ön inkübasyon yapılmadan hazırlanmış enzim+substrat karışımı başlangıç enzim aktivitesinin saptanması için optimum aktivitenin elde edildiği sıcaklıkta analiz edildi ve spektrofotometrede elde edilen değer 100 olarak (orijinal aktivite) kabul edildi. Ön inkübasyon sonucu elde edilen değerler (kalan enzim aktivitesi), orijinal aktivite ile karşılaştırılarak kalan rölatif enzim aktivitesi bulundu².

3.24. Gliserol ve Sorbitolun Enzimin Sıcaklık (Termal) Stabilitesine Olan Etkisinin Araştırılması

Enzimin termal stabilitesini arttırmaya yönelik çalışmalarda, gliserol ve sorbitolden hangisinin ve hangi konsantrasyonda kullanılacağı için saptanması için gliserol ve sorbitol, enzim karışımında % 1, % 2, % 5, % 10, % 20, % 30 ve % 40 olacak şekilde ayrı ayrı enzimle beraber 60 °C'de 30 dakika ön inkübasyona bırakıldı. Daha sonra kalan enzim aktivitesini hesaplanması için α -amilaz aktivitesine bakıldı. Kalan aktivitenin hesaplanması amacıyla Analiz sonuçları orijinal enzim aktivitesiyle karşılaştırıldı.

3.25. Gliserolun Enzimin Sıcaklık Stabilitesi Üzerine Koruyucu Etkisinin Araştırılması

Enzimin termal stabilitesini arttırmak için 55 °C, 60 °C ve 65 °C sıcaklık değerlerinde enzim ve % 30 oranındaki gliserol karışımına 20, 40, 60, 80, 100 ve 120 dakikalık ön inkübasyon işlemi gerçekleştirildi. Ön inkübasyon işleminden sonra enzim+gliserol karışımına 200 μ l substrat eklendi ve kalan enzim aktivitesini saptamak için enzim aktivite tayini gerçekleştirildi.

3.26. Elektroforez

3.26.1. Nondenatüre Poliakrilamid Jel Elektroforezi⁵

Çözeltiler:

% 30 akrilamid / % 0,8 bis akrilamid : 30 g akrilamid, 0,8 g bis akrilamid saf su ile 100 ml'ye tamamlandı ve filtre edilerek koyu renkli şişede 4 °C 'de saklandı.

1.5 M Tris.HCl pH 8,8: 54,45 g Tris-base 150 ml'ye tamamlandı, 1N HCl ile pH 8.8'e ayarlandı, hacim saf su ile 300 ml 'ye tamamlanarak filtre edildi ve 4 °C'de saklandı.

0.5 M Tris. HCl pH 6,8: 6 g Tris-base 60 ml saf suda çözüldü, 1N HCl ile pH 6,8'e getirildi, hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak filtre edildi ve 4 °C'de saklandı.

% 10'luk APS (amonyum per sülfat) : 0,1 g APS saf su ile 1 ml'ye tamamlandı. Taze olarak hazırlanmalıdır.

Elektroforez tamponu: 3 g Tris, 14,4 g glisin, 0.1 g SDS, 1000 ml saf su ilave edilerek hazırlandı ve 4 °C'de saklandı.

İz boya (örnek boya) : 7 ml 0,1M Tris. HCl pH 6.8 , 3,6 ml gliserol, 1,2 mg BFB ile 10 ml saf su ilave edildi. 1'er ml olacak şekilde, ependorflara kondu ve -70 °C'de saklandı.

% 10'luk SDS: 0,1 g SDS saf su ile 1 ml'ye tamamlandı.

% 3'lük nişasta: 0.3g nişasta 0,1 M Tris. HCl pH 8 ile 10 ml'ye tamamlandı.

İyot solüsyonu: 14 mM KI ve 10m M I₂ saf su ile 50 ml'ye tamamlandı.

3.26.2. Jelin Hazırlanması

Çalışmalarımızda % 10' luk jel kullanıldı. Ayırma jeli için, 3,3 ml akrilamid / bis akrilamid, 1,35 ml 0,1 M Tris. HCl (pH 8.8), 4,8 ml saf su, 75 µl % 10 'luk APS

(Amonyum per sülfat), 7.5µl % 10'luk SDS, 660 µl % 3' lük nişasta ve 10 µl TEMED' den oluşan ayırma jeli buz içerisinde ve sürekli magnetik karıştırıcı ile karıştırılarak hazırlandı.

Konsantrasyon jeli için, 520µl akrilamid/bis akrilamid, 1 ml 0,1 M Tris. HCl (pH 6.8) , 20 µl % 10 'luk APS, 4µl TEMED, 4µl % 10'luk SDS ve 2.44 ml saf sudan oluşan karışım hazırlandı. İşlemler buz içersinde ve karıştırılarak yapıldı.

İki cam levha arasına 6 cm yükseklikte ayırma jeli döküldü, üzerine pastör pipetiyle, su ile doyurulmuş izopropanol konarak hava ile temasının kesilmesi sağlandı. Oda ısısında 30-60 dakika polimerizasyon gerçekleşti. Polimerizasyon gerçekleştikten sonra izopropanol distile su ile yıkandı. Kuyucukların oluşması için tarak yerleştirilerek konsantrasyon jeli döküldü. Hava ile temasını kesmek için, üzerine izopropanol ilave edildi.

3.26.3. Elektroforez İşlemi

Standart protein olarak, ticari alfa-amilaz (0,005 g/ml)'dan 15 µl alındı. Farklı ependorflar içerisine konulup üzerlerine 15'er µl iz boya eklendi. Elektroforez yapılacağı zaman jelin üzerindeki su alındı. Çöktürme ile diyaliz işlemlerinden sonra elde edilen sıvılardan 50 µl numuneden alınarak her biri farklı ependorflara konularak üzerlerine 20 µl iz boya, eklendi. Numunelerin +4 °C'de 10.000 rpm'de 10 dakikalık santrifüjden sonra üst sıvılardaki enzim çözeltisinden (Sırasıyla NB besi yerinden elde edilen enzim solüsyonu, % 1'lik nişastalardan çözünebilir nişasta ve patates nişastası, azot kaynaklarından % 1'lik pepton) 40 µl numuneden alındı ve her biri farklı ependorflara konularak üzerlerine 15 µl iz boya, eklendi. Örnekler kuyucuklara sırasıyla konuldu. 1.00 mm'lik jele 250V (40 mA) akım verildi,

yaklaşık 2 saat sonra elektroforez işlemi tamamlandı. Camlar arasındaki jel çıkarıldıktan sonra, 1 saat 0.1 M Tris. HCl (pH 7)' de bekletildi. Sonra tampon çözeltisi dökülüp nişastalı jel üzerine iyot solüsyonu eklenip yarım saat sonra incelemeye alındı⁵.

KANAKLAR

1. Bernfeld, P. *Enzymes carbohydrate metabolism, In Methods In Enzymology, Academic Pres, 1955, 17, 149-158*
2. Burhan, A.; Nisa, Ü.; Gökhan, C.; Ömer, C.; Ashabil, A.; Osman, G. *Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic Bacillus sp. Isolate ANT-6, Procces Biochemistry, 2003, 38, 1397-1403*
3. Lowry, O.H.; Rosebrought, N.J.; Farr, A.L. *Protein measurement with the folin phenol reagent, J. Biol. Chem. 1951, 193, 265-275*
4. Shafiei, M.; Ziaee, A.A.; Amoozegar, M.A.; *Purification and biochemical characterization of a novel SDS and surfactant stable, raw starch digesting, and halophilic α -amylase from a moderately halophilic bacterium, Nesterenkonia sp. strain F, Process Biochemistry, 2010, 45, 694-699*
5. Laemmli, U.K. *Nature, 1977, 227, 680-685*

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. BULGULAR

4.1.1. Değişik İnkübasyon Sürelerinin Enzim Üretimi Üzerine Etkisi

3-72. saatlerde kültüre alınan bakterilerde zamana bağlı enzim üretimi araştırılmıştır. İnkübasyon sürelerinden sonra elde edilen üst sıvı ile bakteri OD (optik density)'si ölçülüp hem α -amilaz aktivite tayini hem de protein miktar tayini yapılarak spesifik aktivite (U/mg) tespit edilmiştir. Enzim aktivitesinin 3.saaten itibaren 12.saate kadar arttığı, ancak 12- 24 saatler arasında göreceli bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. 24. saatten sonra enzim aktivitesinde düşüş tespit edilmiştir. Maksimum enzim aktivitesi 12–24. saatler arasında elde edilmiştir. Enzimin spesifik aktivite değerleri 3,12,18,24 saatlerinde sırasıyla 373,5 U/mg, 1808,8 U/mg, 1834,4U/mg, 1874,8 U/mg olarak tespit edilmiştir. Bakteri OD'sinde ise 24. saate kadar bir artış gözlenirken 24. saatten sonra göreceli bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 4.1).

4.1.2. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

Anoxybacillus sp. AH1'e ait α -amilazın optimum pH değerinin saptanması için sırasıyla 0.1 M sitrik asit (pH 4.0-5.5), 0.1 M sodyum fosfat (pH 6.0 ve 6.5), 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0-9.0) ve 0.1 M glisin-NaOH (pH 9.5-11.0) olmak üzere üç ayrı tampon sistemi kullanılmıştır. α -amilaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi hem ham ekstrakta hemde kısmi saflaştırma ile elde edilen enzim solüsyonunda test edilmiştir. Enzimin aktivite gösterdiği optimum pH değeri 7.0 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.2).

4.1.3. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

α -Amilaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi hem ham ekstrakt hemde kısmi olarak saflaştırılan enzim solüsyonlarında araştırılmıştır. Üst sıvı (supernatant)'da ve kısmi saflaştırılan enzim solüsyonlarında 30°C ile 90 °C aralığı test edilmiştir. Enzimin aktivite gösterdiği optimum sıcaklık değeri 60 °C olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.3).

4.1.4. Enzim Üretimi Üzerine Değişik Besiyerlerinin Etkisi

Enzim üretimi üzerine değişik besiyerlerinin etkisinin araştırılması için bakteri, içerikleri farklı NB1, NB2, BM1, BM2, BM3, NB+%2 çözünebilir nişasta ve LB besiyerlerinde üretilip 18 saatlik inkübasyon sonrası besiyerleri santrifüj edilerek üst sıvıda α -amilaz aktivite tayini yapılmıştır. Analiz sonuçlarına göre α -amilaz aktivite sıralaması NB1 > BM2 > NB+ % 2 nişasta > BM3 > LB > NB2 > BM1 şeklinde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.4).

4.1.5. Enzim Üretimi Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi

NB besiyerlerine % 1 oranında azot kaynaklarından tripton, beef ekstrakt, yeast ekstrakt, pepton, üre, amonyum sülfat, amonyum klorür ve kazein eklenmiş ve 18 saat inkübasyon sonrası besiyerleri santrifüj edilerek üst sıvıda α -amilaz aktivite tayinine bakılmıştır. Kontrolle (1677,3 U/mg) karşılaştırıldığında, peptonda (2054,1 U/mg) ve beef ekstraktta (1716,3 U/mg) daha yüksek aktivite tespit edilmiştir. Tripton (346,3 U/mg), yeast ekstrakt (899,3 U/mg), üre (827,8), amonyum sülfat (456,3 U/mg), amonyum klorür (841,4 U/mg) ve kazeinde (1001 U/mg) ise kontrole göre daha düşük bir aktivite elde edilmiştir (Şekil 4.5). En yüksek aktivite pepton

(2054,1 U/mg), en düşük aktivite ise tripton (346,3 U/mg) kaynaklarında elde edilmiştir.

4.1.6. Enzim Üretimi Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisi

Karbon kaynakları olarak NB besiyerlerine %0.5 ve %1 oranında glukoz, galaktoz, maltoz, laktoz, fruktoz, sükroz ve gliserol eklenerek inkübasyon sonrası α -amilaz aktivite tayini yapılmıştır. Kontrole karşılaştırıldığı zaman % 1'lik karbon kaynaklarının hepsinde daha düşük aktivite elde edilmiştir. Bununla beraber % 0.5 oranındaki karbon kaynaklarında kontrole (1582.3 U/mg) göre, maltoz (1862.9 U/mg) glukoz (1727.9 U/mg), ve laktozda (1662.1 U/mg) enzim aktivitesinde bir artış gözlenmiştir. Diğer % 0.5'lik karbon kaynaklarında kontrole göre enzim aktivitesinde düşüş görülmüştür. En düşük aktivite ise 125,8 U/mg değeri ile gliserolde elde edilmiştir (Şekil 4.6).

4.1.7. Enzim Üretimi Üzerine Nişastaların Etkisi

NB besiyerlerine % 0.5 ve % 1 konsantrasyonlarında çözünebilir nişasta, patates nişastası, mısır nişastası ve buğday nişastası eklenerek inkübasyon sonrasında üst sıvıda α -amilaz aktivite tayini gerçekleştirilmiştir. % 0.5'lik nişastalardan sadece patates nişastasında (2668,4 U/mg) kontrole (1461,6 U/mg) karşılaştırıldığında enzim aktivitesinde yüksek bir artış görülmüştür. Buğday ve mısır nişastalarında ise enzimin aktivitesinin azaldığı saptanmıştır. %1'lik nişastalardan çözünebilir nişasta (2051,9 U/mg) ve patates nişastalarında (3627 U/mg) kontrole (1461,6 U/mg) göre enzim aktivitesinde yüksek bir artış gözlenmiş olup %1'lik mısır ve buğday nişastalarında ise aktivite gözlenmemiştir (Şekil 4.7).

4.1.8. Enzim Üretimi Üzerine CaCl₂'nin Etkisi

Saf suyla hazırlanmış NB besiyerlerine toplam hacimde 10 mM, 20 mM, 40 mM, 100 mM, 200 mM ve 300 mM olacak şekilde CaCl₂ eklenerek inkübasyon sonrası α -amilaz aktivite tayini yapılmıştır. 10 mM, 20 mM, 40 mM ve 100 mM'daki konsantrasyonlarda kontrole oranla enzim aktivitesinde artış gözlenmiştir. En yüksek enzim aktivitesi 20 mM (2360,6 U/mg), en düşük ise 300 mM (101,3 U/mg) konsantrasyonlarında elde edilmiştir (Şekil 4.8).

4.1.9. Enzimin Kısmi Olarak Saflaştırılması

Çöktürme ve diyaliz için NB sıvibesiyeri (pH 7.5) hazırlanarak otoklavlanmıştır. Daha sonra ekim yapılarak bakterinin ürettiği optimum sıcaklıkta (60 °C) inkübasyona bırakılmıştır. 18 saat inkübasyon sonrası besi yeri 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek bakteriler kültürden uzaklaştırılmış ve üst sıvı temiz bir behere aktarılmıştır. Daha sonra % 80'lik amonyum sülfat çöktürmesi yapılmış ve karıştırıcıda +4 °C'de 1 gece bekletilmiştir. Soğuk çöktürme ortamından alınan örnekler +4 °C'de 15.000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Dipte toplanan enzim çökeltisi 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0) tamponunda çözülmüş ve elde edilen hacim belirlenmiştir. Daha sonra % 20'lik etil alkolde 30 dk. kaynatılan ve saf su ile tekrar kaynatılarak temizlenen diyaliz hortumu içerisine çöktürme sonrası elde edilen sıvılar bırakılmıştır. Diyaliz hortumu içerisindeki örnekler 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0) tamponunda tuzdan arındırmak amacı ile +4 °C'de magnetik karıştırıcı üzerinde 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. Diyaliz işlemi sonunda elde edilen hacimler ölçülmüş, diyaliz öncesi ve diyaliz sonrası Lowry yöntemine göre protein miktar tayini ve amilaz aktiviteleri belirlenmiştir. Tüm karakterizasyon

işlemleri % 80 amonyum sülfat çöktürmesi ve sonrasında diyaliz yapılan örnekler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ham ekstraktta enzimin 1mg'daki spesifik aktivite değeri 1539 u/mg, verim % 100, saflaştırma katsayısı 1 iken diyaliz sonrasında spesifik aktivite 6937 U/mg, verim % 30.4 ve saflaştırma katsayısı 4.5 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.1).

4.1.10. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasal Maddelerin Etkisi

Anoxybacillus sp. AH1 NB besiyerinde üretilerek 18. saatte besiyeri 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Elde edilen üst sıvı (süpernatant) enzim aktivite tayininde kullanılmak üzere çöktürme ve diyaliz işlemlerine tabi tutulmuştur. Kısmi olarak saflaştırılan enzimde bazı kimyasal maddelerin etkisinin araştırılması amacı ile DTT, β -mercaptoethanol, PMSF, PCMB, N-ethylmaleimide ve Iodoacetamide maddelerinden 1-10 mM, PCMB'den 0,25-4 mM ve üreden 0.1-2 M arasındaki konsantrasyonlar kullanılmıştır. Belirlenen konsantrasyonlardaki kimyasallar ve enzim solüsyonu 15 dakika muamele edilmiştir.

Analiz sonuçlarının kontrol ile karşılaştırılması sonucunda DTT ve β -mercaptoethanol'un enzim aktivitesini oldukça fazla arttırdıkları saptanmıştır. 10 mM'da DTT'nin enzim aktivitesini % 106, β -mercaptoethanol'un ise % 64 oranında arttırdığı tespit edilmiştir. PCMB (p-Chloromercuribenzoic acid) ve PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride)'nin enzim aktivitesi üzerinde güçlü bir şekilde inhibisyon etkisi oluşturdukları saptanmıştır. 4 mM'da PCMB ve PMSF'nin enzim aktivitesini sırasıyla % 52 ve % 60 oranlarında inhibe ettikleri tespit edilmiştir. N-ethylmaleimide ve iodoacetamide'nin enzim aktivitesini az miktarda etkiledikleri

bulunmuştur. 1 mM'da inhibisyon oranları sırasıyla % 11 ve % 19 olarak saptanmış olup diğer konsantrasyonlarda bir etki gözlenmemiştir (Çizelge 4.2).

Üre enzim aktivitesinde güçlü bir şekilde inhibisyona neden olmuştur. 2 M üre varlığında enzim aktivitesinin % 91 oranında inhibisyona uğradığı tespit edilmiştir (Şekil 4.9).

4.1.11. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metallerin ve Metal Şelatörlerin Etkisi

Kısmi olarak saflaştırılan enzimde bazı metal ve metal şelatörlerin etkisini saptamak için CaCl_2 ve MgCl_2 maddelerinden 1-8 mM, CuCl_2 'den 0.05-1 mM, ZnCl_2 'den 0.05-2 mM, EDTA'dan 1-10 mM, 1-10 phenanthroline'den 1-10 mM kullanılmıştır. Enzim solüsyonu bu maddelerle 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Analiz sonuçlarının kontrol ile karşılaştırılması sonucunda CaCl_2 ve MgCl_2 'nin enzim aktivitesinde artışa yol açtığı görülmüştür. 8 mM CaCl_2 enzim aktivitesinin % 70, 8 mM MgCl_2 ise enzim aktivitesinin % 41 oranında artmasına yol açmışlardır. CuCl_2 ve ZnCl_2 enzim aktivitesini güçlü bir şekilde inhibe etmişlerdir. CuCl_2 0.5 mM'da enzim aktivitesini % 76 oranında inhibe ederken, 1 mM'da enzimi tümüyle inhibe etmiştir. ZnCl_2 ise enzim aktivitesini 0.5 mM'da % 85, 1 mM'da % 93 oranında inhibe ederken, 2 mM'da enzim aktivitesini tümüyle inhibisyona uğratmıştır. Metal şelatörleri olan EDTA ve 1,10-phenanthroline enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi göstermiştir. 10 mM EDTA enzimi % 63, 10 mM 1,10-phenanthroline ise % 22 oranında inhibe etmiştir (Çizelge 4.3).

4.1.12. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Deterjanların Etkisi

Kısmi olarak saflaştırılan enzimde bazı deterjanların etkisini saptamak amacıyla % 0.5 oranında deterjan çözeltileri ile enzim çözeltisi 15 dk. inkübasyona bırakılmış ve daha sonra α -amilaz aktivite tayini yapılmıştır. Deterjan olarak SDS, Tween-40, TritonX-100 ve içeriğinde enzim bulunmayan ticari Bingo kullanılmıştır. Analiz sonuçlarının orijinal enzim aktivitesiyle karşılaştırılması sonucunda enzim aktivitesini, SDS'nin % 28, Tween-40' ın % 38, Triton X-100' ün % 26 ve Bingonun % 5 oranında arttırdıkları tespit edilmiştir (Şekil 4.10).

4.1.13. Enzimin Kinetik Parametrelerinin Hesaplanması

Km ve Vmax kinetik parametreleri için 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0) tamponunda % 0.5, % 1, % 2 ve % 3 oranlarında çözünebilir nişasta hazırlanmıştır. Bu oranlarda hazırlanan nişastalar α -amilaz aktivite tayinininde substrat olarak kullanılmış ve Km ve Vmax değerleri Lineweaver–Burk plot'a göre hesaplanmıştır. Bu hesaplamalar göre α -amilazın Km değeri 0.102 mM, Vmax değeri de 0.929 μ mol/dk. olarak bulunmuştur (Şekil 4.11).

4.1.14. Enzimin Sıcaklık Stabilitesinin Saptanması

Kısmi saflaştırma ile elde edilen α -amilazın sıcaklık stabilitesinin (termal stabilite) saptanması için 45 °C, 50 °C ve 55 °C sıcaklık değerlerinde sadece enzim kullanılarak 20, 40, 60, 80, 100 ve 120 dakikalık ön inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra kalan enzim aktivitesinin saptanması için enzimin aktivite gösterdiği optimum sıcaklıkta (60 °C) aktivite tayini yapılmıştır. Analiz sonuçlarının kontrol ile karşılaştırılması sonucunda kalan enzim aktiviteleri

hesaplanmıştır. Buna göre 45 °C’de 120 dakika sonunda kalan enzim aktivitesi % 97 olarak saptanmıştır. 50 °C’de 20. dakikaya kadar kalan enzim aktivitesi % 99 olarak hesaplanırken bu zamandan sonra enzim aktivitesinde bir düşüş gözlenmeye başlanmıştır. 40. dakikada bu değer % 90, 60. dakikada % 78, 80. dakikada % 74, 100. dakikada % 65 ve 120. dakikada % 52 olarak tespit edilmiştir. 55 °C’ de ise kalan enzim aktivitesi 20. dakikada % 26 ve 120. dakikada ise % 6 olarak saptanmıştır (Şekil 4.12).

4.1.15. Gliserol ve Sorbitolun Enzimin Sıcaklık (Termal) Stabilitesine Olan Etkisi

Enzimin termal stabilitesini arttırmaya yönelik çalışmalarda, gliserol ve sorbitolden hangisinin ve hangi konsantrasyonda kullanılacağına saptanması için gliserol ve sorbitol, enzim karışımında % 1, % 2, % 5, % 10, % 20, % 30 ve % 40 konsantrasyonlarda olacak şekilde enzimle beraber 60 °C’ de 30 dakika ön inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra kalan enzim aktivitesini hesaplanması için α -amilaz aktivitesine bakılmıştır. Analiz sonuçlarının kontrol ile karşılaştırılması sonucunda kalan enzim aktiviteleri hesaplanmıştır. Kontrolle karşılaştırıldığında, % 30 ve % 40 oranlarındaki gliserolde sırasıyla kalan enzim aktivitesi % 110 ve % 112 olarak saptanmış olup diğer konsantrasyonlarda kontrolden daha düşük değerler elde edilmiştir. % 30 ve % 40 sorbitolde kalan enzim aktivitesi sırasıyla % 86 ve % 112 olarak hesaplanmıştır. Diğer konsantrasyonlarda kontrolden daha düşük değerler elde edilmiştir (Şekil 4.13).

4.1.16. Gliserolün Enzimin Sıcaklık Stabilitesi Üzerine Koruyucu Etkisi

Gliserol ve sorbitolün değişik sıcaklıklarda ve zaman aralıklarında enzimin sıcaklık stabilitesine olan etkisini saptadıktan sonra % 30 oranında gliserol enzimle karıştırılarak 55 °C, 60 °C ve 65 °C'deki sıcaklık değerlerinde 20, 40, 60, 80, 100 ve 120 dakikalık sürelerle ön inkübasyona bırakılmıştır. Kalan enzim aktivitesinin saptanması için enzimin aktivite gösterdiği optimum sıcaklıkta (60 °C) α -amilaz aktivitesine bakılmıştır. Analiz sonuçlarının kontrol ile karşılaştırılması sonucunda kalan enzim aktiviteleri hesaplanmıştır. Gliserolle muamele edilen enzimde 55 °C'de 120 dakika sonundaki kalan aktivite % 99 olarak saptanmıştır. 60 °C'de 40. dakikada kalan enzim aktivitesi % 99, 120. dakikada ise % 85 olarak saptanmıştır. 65 °C'de ise 60 dakika sonunda enzimin tüm aktivitesini kaybettiği tespit edilmiştir (Şekil 4.14).

4.1.17. α -Amilazın Elektroforetik Analizi

α -Amilazın elektroforetik analizi için kuyucuklara sırasıyla standart protein olarak kullanılan ticari α -amilaz, NB besiyerinden elde edilen enzim solüsyonu, diyaliz sonrası enzim solüsyonu, % 1'oranındaki nişastalardan çözünebilir nişasta ve patates nişastası ve % 1 oranındaki azot kaynaklarından peptondan elde edilen enzim solüsyonları yüklenerek paralel olarak elektroforetik işleme tabi tutulmuşlardır. Şekil 4.15'de elektroforeze tabi tutulan nişastalı jelin, elektroforez işleminden sonra üzerine iyodür çözeltisi dökülmüş ve bu işlemde sonra koyu menekşe rengine dönüştüğü ve ticari α -amilaz ile jele uygulanan örneklerin ilerledikleri kuyucuklarda %3'lük nişastalı jelin parçalandığı görülmektedir. Bu durum α -amilazın varlığını göstermektedir. *Anoxybacillus sp.* AH1'den elde edilen α -amilazın molekül ağırlığı,

58 kDa. olan ticari α -amilazın molekül ağırlığından daha büyük olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.15).

4.2. TARTIŞMA

Çalışmamızda bakterinin 3–72. saatlerdeki inkübasyon sürelerinde zamana bağlı α -amilaz aktivite tayini yapılmıştır. Şekil 4.1’de görüldüğü gibi maksimum enzim üretiminin 12-24. saatlerde tespit edilmiştir. Bakteri üretiminin hızlı olduğu dönemde enzim üretiminin de fazla görülmüştür. Bakteri üreme hızında düşüş gözlenmesiyle birlikte enzim üretiminde de azalma gözlenmeye başlanmıştır. Liu ve Xu⁸ (2008) logaritmik fazda ortamda yeterince substrat bulunmasının enzim üretimini indüklediğini, ortamdaki substratların azalmasıyla beraber enzim üretiminde de azalma olduğunu belirtmişlerdir.

Mamo ve ark.¹ (1999) *Bacillus sp.* IMD 435’ten maksimum α -amilaz üretimini 48. saatte tespit etmişlerdir.

Hamilton ve ark.² (1999) *Bacillus sp.* IMD 435’te maksimum α -amilaz aktivitesini 41. saatte elde etmişlerdir.

Cordeiro ve ark.³ (2002) çözünebilir nişasta içeren kültür ortamında termofilik *Bacillus sp.* SMIA-2’nin 48. saatte en yüksek α -amilaz aktivitesi gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Goyal ve ark.⁴ (2005) *Bacillus sp.* 1-3’ten elde ettikleri termostabil α -amilaz üretimini 48. saatte en yüksek değerde belirlemişlerdir.

Sajedi ve ark.⁵ (2005) *Bacillus sp.* KR-8104’te maksimum α -amilaz üretimini 60-65 saatleri arasında tespit etmişlerdir.

Asgher ve ark.⁶ (2007) patates nişastasını içeren kültür ortamında termofilik *Bacillus subtilis* JS-2004’te maksimum α -amilaz aktivitesini 48. saatte tespit etmişlerdir.

Matpan⁷ (2007) Diyadin (Ağrı) sıcak su kaplıcalarından izole ettiği ve DV3 olarak adlandırdığı termofilik bakteride maksimum α -amilaz üretimini 24. saatte tespit etmiştir.

Liu ve ark⁸. (2008) *Bacillus sp.* YX-1'de maksimum α -amilaz üretimini 44. saatte tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda enzimin aktivite gösterdiği optimum pH değerini bulmak için pH 4.0-11.0 aralığında α -amilaz aktivitesi test edilmiştir. Şekil 4.2'de görüldüğü gibi enzimin optimum pH değeri 7.0 olarak tespit edilmiştir. Enzim pH 6.0-8.0 aralığında yüksek aktivite gösterdiğinden dolayı çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılma potansiyeline sahiptir. Goyal ve ark.⁴ (2005) nişastanın sıvılaştırılması işleminin genelde pH 7.0 dolaylarında gerçekleştirildiğini belirtmişlerdir.

Goyal ve ark.⁴ (2005) *Bacillus sp.* 1-3'ten kısmi olarak saflaştırdıkları α -amilazın optimum pH değerini 7.0 olarak tespit etmişlerdir.

Shafiei ve ark.⁹ (2010) *Nesterenkonia sp.* Strain F tarafından salgılanan α -amilazın optimum pH değerini 7.5 olarak tespit etmişlerdir.

Asgher ve ark.⁶ (2007) Termofilik *Bacillus sp.*'de maksimum α -amilaz aktivitesini pH 8.0'da tespit etmişlerdir.

Chakraborty ve ark.³² (2000) *Bacillus stearothermophilus*'den elde ettikleri α -amilaz enziminin optimum pH değerini 7.0 olarak tespit etmişlerdir.

Cordeiro ve ark.³ (2002) Termofilik *Bacillus sp.* tarafından üretilen α -amilazın aktivite gösterdiği optimum pH değerini 7.5 olarak bulmuşlardır.

Matpan⁷ (2007) Diyadin (Ağrı) sıcak su kaplıcalarından izole ettiği ve DV3 olarak adlandırdığı termofilik bakteride maksimum α -amilaz aktivitesini pH 7.0'da elde etmiştir.

Ezeji ve Bahl¹⁰ (2006) *Geobacillus thermodinitrificans* tarafından salgılanan α -amilazın optimum pH değerini 6.5-7.5 olarak tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda enzimin aktivite gösterdiği optimum sıcaklık değerini bulmak için 30-90 °C arasında α -amilaz aktivitesine bakılmıştır. Şekil 4.3'te görüldüğü gibi enzimin optimum sıcaklığı 60 °C olarak tespit edilmiştir. Enzimin yüksek sıcaklıklarda aktivite göstermesi endüstrinin çeşitli alanlarında kullanılabilme potansiyelini göstermektedir.

Bolton ve ark.¹¹ (1997) *Bacillus flavothermus*'dan elde ettikleri ve saflaştırdıkları α -amilazın aktivite gösterdiği optimum sıcaklığını 60 °C olarak belirlemişlerdir.

Hamilton ve ark.² (1999) *Bacillus sp.* IMD 435'te maksimum α -amilaz aktivitesini 65 °C'de belirlemişlerdir.

Hashim ve ark.³⁵ (2005) *Bacillus halodurans* LBK 34'ten elde ettikleri α -amilazın aktivite gösterdiği optimum sıcaklığını 60 °C olarak tespit etmişlerdir.

Ezeji ve Bahl¹⁰ (2006) *Geobacillus thermodinitrificans* tarafından salgılanan α -amilazın aktivite gösterdiği optimum sıcaklığı 55 °C olarak tespit etmişlerdir.

Asgher ve ark.⁶ (2007) termofilik *Bacillus subtilis*'den salgılanan α -amilazın aktivite gösterdiği optimum sıcaklığı 70 °C olarak belirlemişlerdir.

Najafi ve ark.¹² (2005) *Bacillus subtilis* AX20 tarafından salgılanan α -amilazın aktivite gösterdiği optimum sıcaklığını 55 °C olarak bulmuşlardır.

Çalışmamızda enzim üretimi üzerine değişik besiyerlerinin etkisi araştırılmıştır. Bunun için içerikleri farklı olan NB1, NB2, BM1, BM2, BM3, LB ve NB+%2 znebilir Nişasta besiyerleri kullanılmıştır. Şekil 4.4'te görülmekte olan

analiz sonuçlarına göre NB1 besiyerinde α -amilaz üretimi en yüksek değerde tespit edilmiştir. Bu durum NB1 besiyeri içeriğinin α -amilaz üretimi için yeterli olabileceği şeklinde açıklanabilir. Besiyerlerinden elde edilen α -amilaz aktivite sıralamasının NB1 > BM2 > NB+ % 2 nişasta > BM3 > LB > NB2 > BM1 şeklinde olduğu tespit edilmiştir.

Saxena ve ark.¹⁶ (2007) *Bacillus sp.* PN5'ten α -amilaz üretmeye çalışmışlardır. Enzim üretimi için en iyi kültür ortamını (%) 0.6 nişasta, 0.5 pepton, 0.3 yeast ekstrakt içeren besiyeri olarak tespit etmişlerdir.

Cordeiro ve ark.³ (2002) termofilik *Bacillus sp.* SMA-2'den α -amilaz üretimini ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Maksimum α -amilaz üretimini çözünebilir nişasta içeren kültür ortamında elde etmişlerdir.

Çalışmamızda α -amilaz üretimi üzerine azot kaynakları, karbon kaynakları, nişastaların ve kalsiyumun etkisi incelendi.

Enzim üretimi üzerine azot kaynaklarının etkisini incelemek için NB besiyeri ortamına % 1 oranında azot kaynakları eklenerek α -amilaz aktivite tayinine bakılmıştır. Şekil 4.5'de görüldüğü gibi azot kaynaklarından pepton ve beef ekstraktta kontrole göre daha yüksek aktivite elde edilmiştir. En yüksek α -amilaz aktivitesi 2054,1 U/mg değeriyle peptonda, en düşük aktivite ise 346,3 U/mg değeriyle triptonda elde edilmiştir. Azot kaynaklarında tespit edilen α -amilaz aktivite sıralaması pepton > beef ekstrakt > kontrol > kazein > yeast ekstrakt > amonyum klorür > üre > amonyum sülfat > tripton şeklindedir. Enzim aktivitesinin pepton ve beef ekstraktta artması, bakterinin bu azot kaynaklarını kullanarak enzim sentezini arttırdığı şeklinde düşünülebilir.

Çalışmamızda enzim üretimi üzerine çeşitli karbon kaynakları ve nişastaların etkisini araştırmak için NB besiyerlerine % 0.5 ve % 1 oranında karbon kaynakları ve nişasta çeşitleri eklenerek α -amilaz aktivite tayinine bakılmıştır. Şekil 4.6'da görüldüğü gibi % 0.5'lik karbon kaynaklarından maltoz, glukoz ve laktozda kontrole göre daha yüksek değerler elde edilmiştir. Karbon kaynakları içerisinde en yüksek α -amilaz aktivitesi 1862,9 U/mg değeriyle % 0.5 oranındaki maltozda, en düşük aktivite ise 62,9 U/mg değeriyle % 1 oranındaki gliserolde tespit edilmiştir.

Şekil 4.7' de görüldüğü gibi nişastalardan % 1'lik çözünebilir nişastada ve % 0.5 ve % 1'lik patates nişastalarında kontrole göre daha yüksek değerler elde edilmiştir. Nişastalar arasından en yüksek α -amilaz aktivitesi 3627 U/mg değeriyle % 1'lik patates nişastasında elde edilmiştir. % 1'lik buğday ve mısır nişastasında ise aktivite tespit edilmemiştir. Enzim aktivitesinin sayılan karbon ve nişasta kaynaklarında artması, bakterinin bu kaynakları kullanarak enzim sentezini arttırdığı şeklinde düşünülebilir.

Aiyer¹³ (2004) *Bacillus licheniformis* SPT 27'de α -amilaz üretmeye çalışmış ve enzim üretimi üzerine azot ve karbon kaynaklarının etkisini araştırmıştır. Maksimum α -amilaz aktivitesini % 1'lik azot kaynaklarından pepton ve amonyum hidrojen fosfatta, % 1'lik karbon kaynaklarından fruktozda ve % 1 oranında eklenen nişastalarda ise *Amarantus peniculatus* ve patates nişastasında elde etmiştir.

Das ve ark.¹⁴ (2004) *Bacillus subtilis* DM-03 tarafından salgılanan α -amilazda karbon ve azot kaynaklarının etkisini araştırmışlardır. En yüksek aktiviteyi azot kaynaklarında sırasıyla NH₄Cl, KNO₃ ve peptonda, karbon kaynaklarında ise çözünebilir nişastada elde etmişlerdir.

Hamilton ve ark.² (1999) *Bacillus sp.* IMD 435'te α -amilaz üretimi üzerine % 1.2' lik azot ve karbon kaynaklarının etkisini araştırmışlardır. Azot kaynaklarında en yüksek α -amilaz aktivitesini yeast ekstrakta, karbon kaynaklarında ise sırasıyla laktoz ve çözünebilir nişastada elde etmişlerdir.

Konsoula ve Liakopoulou-Kyriakides¹⁵ (2007) *Bacillus subtilis*'ten α -amilaz ve β -galaktozidaz enzimleri üzerine % 0.2 oranında azot ve karbon kaynaklarının etkisini araştırmışlardır. Maksimum α -amilaz aktivitesini azot kaynaklarından yeast ekstrakta, karbon kaynaklarında çözünebilir nişastada elde etmişlerdir.

Saxsena ve ark.¹⁶ (2007) *Bacillus sp.* PN5'te α -amilaz üretimi üzerine karbon ve azot kaynaklarının etkisini araştırmıştır. En iyi α -amilaz üretimini, Karbon kaynaklarından çözünebilir nişastada, azot kaynaklarında ise pepton, beef ekstrakt ve yeast ekstrakta elde etmişlerdir.

Enzim üretimi üzerine CaCl_2 'nin etkisini araştırmak için saf suyla hazırlanan NB besiyerlerine 10mM, 20 mM, 40 mM, 100 mM, 200 mM ve 300 mM oranlarındaki CaCl_2 eklenerek inkübasyon sonrası üst sıvıda α -amilaz aktivite tayini yapılmıştır. Şekil 4.8'de görüldüğü gibi 10 mM, 20 mM, 40 mM ve 100 mM'da kontrole göre daha yüksek enzim aktiviteleri elde edilmiştir. CaCl_2 konsantrasyonlarında en yüksek α -amilaz aktivitesi 2360,6 U/mg değeriyle 20 mM'da, en düşük değer ise 101,3 U/mg değeriyle 300 mM'da elde edilmiştir. enzim aktivitesinin ortama CaCl_2 eklendiğinde artması bakterinin enzim sentezi sırasında CaCl_2 'yi kullanarak enzim sentezini arttırması ile açıklanabilir.

Prakash ve ark.¹⁷ (2009) *Chromohalobacter sp.* TVSP 101'de ortama 50 mM CaCl_2 eklenmesinin α -amilaz üretiminin % 29 oranında arttırdığını tespit etmişlerdir.

Asgher ve ark.⁶ (2007) *Bacillus subtilis* JS-2004'te α -amilaz enzimini üretmişler ve ortama 10 mM kalsiyum ve yeast ekstrakt eklenmesinin hem enzim üretimini hem de bakteri üretimini indüklediğini belirlemişlerdir.

Çalışmamızda kısmi olarak saflaştırılan enzimde bazı kimyasal maddeler, metallere, metal şelatörleri, üre ve bazı deterjanların etkisi incelenmiştir. Çizelge 4.2'de bazı kimyasal maddelerin enzim aktivitesine olan etkileri görülmektedir. –SH grubu içeren DTT ve β -mercaptoethanol gibi ajanların enzim aktivitesini oldukça arttırdığı tespit edilmiştir. 10 mM'da DTT enzim aktivitesinde % 106 oranında, β -mercaptoethanol % 64 oranında artışa neden olmuştur. Bu da enzimin aktif merkezinde sülfhidril içeren grupların bulunduğunu göstermektedir. PCMB (p-chloromercuribenzoic acid) enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi göstermiştir. PCMB 4 mM'da enzim aktivitesini % 52 oranında inhibe etmiş olup bu durum enzimin aktif bölgesinde sistein bulunduğunu göstermektedir. Iodoacetamide ve N-ethylmaleimide enzim aktivitesini çok az etkilemişlerdir. Serin inhibitörü olan PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride) enzim aktivitesini büyük oranda inhibe etmiştir. 4 mM'da % 60 oranında inhibisyona yol açmıştır. Bu inhibisyon enzimin katalitik aktivitesinde sistein yanında serin aminoasidinin de etkili olduğunu göstermektedir. Şekil 4.9'da görüldüğü gibi üre enzim aktivitesini güçlü bir şekilde inhibisyona uğratmaktadır. 2 M ürede enzim aktivitesi % 91 oranında inhibisyona uğramıştır.

Çizelge 4.3'de bazı metal ve metal şelatörlerinin enzim aktivitesine olan etkileri görülmektedir. CaCl_2 ve MgCl_2 enzim aktivitesinde artışa yol açmıştır. 8 mM CaCl_2 enzim aktivitesini % 70, 8 mM MgCl_2 ise enzim aktivitesinin % 41 oranında artmasına sebep olmuştur. CuCl_2 ve ZnCl_2 enzim aktivitesini güçlü bir

şekilde inhibe etmişlerdir. CuCl_2 0.5 mM'da enzim aktivitesini % 76 oranında inhibe ederken, 1 mM'da enzimi tümüyle inhibe etmiştir. ZnCl_2 ise enzim aktivitesini 0.5 mM'da % 85, 1 mM'da % 93 oranında inhibisyona uğratmıştır. Metal şelatörleri olan EDTA ve 1,10-phenanthroline enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi göstermiştir. 10 mM EDTA enzimi % 63, 10 mM 1,10-phenanthroline ise % 22 oranında inhibe etmiştir. Bu durum çalıştığımız enzimin bir metaloenzim olduğu şeklinde açıklanabilir.

Şekil 4.10'da % 0.5 oranındaki deterjanların enzim aktivitesi üzerine etkileri görülmektedir. Kontrolle karşılaştırıldığı zaman Bingoda enzim aktivitesinde fazla değişiklik gözlenmezken, enzim aktivitesini SDS % 28, Tween-40 % 38, Triton X-100 % 26 oranında arttırmıştır.

Das ve ark.¹⁴ (2004) *Bacillus subtilis* DM-03'ten saflaştırdıkları α -amilaz aktivitesi üzerine bazı metal iyonların ve kimyasal maddelerin etkisini incelemişlerdir. Enzimin 1,5 mM oranında PMSF ile etkileşmesi sonucu tüm aktivitesini kaybettiğini tespit etmişlerdir. Enzimin 1 mM EDTA'da neredeyse tüm aktivitesini kaybettiğini, 80 mM SDS ve 8 M ürenin enzim aktivitesini tamamen inhibe ettiğini bulmuşlardır.

Arikan ve ark.¹⁸ (2008) termofilik *Bacillus sp.*'den elde ettikleri ve kısmi olarak saflaştırdıkları α -amilazda 3 mM PMSF'de % 10, 5 mM EDTA'da % 5,5, 5 mM ZnCl_2 'de % 18, 8M ürede % 80, % 1 SDS' de % 18 oranında inhibisyon, 5mM CaCl_2 'de ise % 30 aktivite artışı tespit etmişlerdir.

Rao ve Satyanarayana³⁴ (2007) termofilik *Geobacillus thermoleovarans*'dan saflaştırdıkları α -amilazda, Mg^{2+} 'nin enzim aktivitesini arttırdığını, N-

ethylmaleimide, EDTA ve PMSF'nin enzim üzerine kısmen inhibisyon etkisi gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Shafiei ve ark.⁹ (2010) *Nesterenkonia sp.* strain F'den elde ettikleri ve saflaştırdıkları α -amilazda, β -mercaptoethanol ve PMSF'nin enzim üzerinde inhibisyon etkisi saptamamışlardır. Ca^{2+} 'nin enzim aktivitesini arttırdığını, Cu^{2+} , Zn^{2+} ve EDTA'nın enzimi güçlü bir şekilde inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. Enzimin % 0.5'lik SDS ve % 2'lik Triton X-100 deterjanlarına karşı oldukça dayanıklı olduğunu bulmuşlardır.

Tatar²³ (2007) *Bacillus sp.*'den elde ettiği α -amilazın 1,10-Phenantrolin, EDTA, PMSF ve $ZnCl_2$ ile etkileşimi sonucu kısmen inhibisyona uğradığını, SDS ve Triton X-100 deterjanlarına karşı oldukça dayanıklı olduğunu belirlemiştir.

Srivastava¹⁹ (1987) *Bacillus stearothermophilus*'dan elde edip saflaştırdığı α -amilazda, Ca^{2+} varlığında enzim aktivitesinde artış tespit etmiştir. Mg^{2+} ve Zn^{2+} varlığında enzimin kısmen inhibe olduğunu fakat PCMB ve EDTA'nın enzimi güçlü bir şekilde inhibe ettiğini tespit etmiştir.

Ivanova ve ark.²⁰ (1993) *Bacillus licheniformis* 44MB82-A'dan izole ettikleri ve saflaştırdıkları α -amilazda, EDTA'nın güçlü bir şekilde inhibisyona yol açtığını ve iodoacetamide varlığında enzimde inhibisyon olmadığını tespit etmişlerdir.

Ben Abdelmalek-Khedher ve ark.²¹ (2008) *Sclerotinia sclerotiorum*'dan elde ettikleri ve saflaştırdıkları α -amilazda, DTT ve β -mercaptoethanol'un enzim aktivitesini güçlü bir şekilde arttırdığını, Cu^{2+} varlığında ise enzimin güçlü bir şekilde inhibe olduğunu tespit etmişlerdir.

Negi ve Banerjee²² (2009) *Aspergillus awamori*'den elde edilen amilazda, 1 mM oranındaki Ca²⁺ ve Mg²⁺, % 0.25'lik β-mercaptoethanol ve % 0.03 TritonX-100 ve SLS varlığında enzim aktivitesinde artış tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda kısmi olarak saflaştırılan enzimin Km ve Vmax değerlerinin hesaplanması için % 0.5-3 oranlarında hazırlanan çözünebilir nişastalar α-amilaz aktivite tayininde substrat olarak kullanılmış ve enzimin Km ve Vmax değerleri Lineweaver–Burk plot'a göre hesaplanmıştır. Buna göre enzimin Km ve Vmax değerleri sırasıyla 0.102 mM ve 0.929 µmol/dk. olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.11). Vmax Enzim katalizli bir reaksiyonda ulaşılan maksimum hızı ifade eder. Km ise maksimum hızın yarısına ulaşılan substrat derişimidir. Bir enzimin Km değeri onun substratına olan ilgisini göstermektedir. Eğer enzimin substratına olan ilgisi fazla ise Km değeri küçüktür. Çünkü düşük substrat konsantrasyonlarında bile enzim ile substrat ES kompleksi yapıyor demektir²⁴. Çalıştığımız enzimin Km değerinin düşük olması enzimin substrata olan ilgisinin yüksek olduğunu göstermektedir.

Colak ve ark.²⁵ (2008) termofilik *Anoxybacillus gonensis* A4'ten salgılanan amilazın Km ve Vmax değerlerini sırasıyla 1.88 mg/ml ve 0.54 U/mg olarak tespit etmişlerdir.

Mollania ve ark.²⁶ (2010) *Geobacillus sp.* LH8'den elde edilen α-amilazın Km değerini 3 mg/ml, Vmax değerini de 6.5 µmol/min olarak bulmuşlardır.

Ezeji ve Bahl¹⁰ (2006) *Geobacillus thermodenitrificans* HRO10'dan saflaştırdıkları α-amilazın Km ve Vmax değerlerini sırasıyla 3.05 mg/ml ve 7.35 U/ml olarak hesaplamışlardır.

Shafiei ve ark.⁹ (2010) *Nesterenkonia sp.*'den elde edilen ve saflaştırılan α -amilazın Km ve Vmax değerlerini sırasıyla 4.5 mg/ml ve 1.18 mg/ml/min olarak hesaplamışlardır.

Bu çalışmada kısmi olarak saflaştırılan enzimde zamana bağlı sıcaklık stabilitesinin araştırılması için 45 °C, 50 °C ve 55 °C sıcaklık değerlerinde sadece enzim kullanılarak 20 ile 120 dakika arasında ön inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra α -amilaz aktivite tayini yapılmıştır. Şekil 4.12'de görüldüğü gibi sadece enzim kullanılarak yapılan sıcaklık stabilite analizinde 45 °C'de 120 dakika sonunda enzimin oldukça stabil olduğu ve kalan enzim aktivitesi % 97 olarak tespit edilmiştir. 50°C'de enzim 60 dakika sonunda % 78 oranında aktivite gösterirken 120 dakika sonunda ise kalan enzim aktivitesi % 52 olarak hesaplanmıştır. 55 °C'de ise 120 dakika sonunda kalan enzim aktivitesi % 7 olarak tespit edilmiştir. *Anoxybacillus sp.* AH1 termofilik bir bakteri olup optimum üreme sıcaklığı 60 °C, ürettiği α -amilazın optimum sıcaklığı da 60 °C olarak belirlenmiştir. Buna karşın bu bakteri tarafından üretilen α -amilazın 45 °C'nin üzerindeki sıcaklıklara karşı hassas olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma bu bakteri türlerinde yapılan ilk α -amilaz çalışmalardan biridir. Bu durumun nedeni daha ileriki çalışmalarda ve diğer *Anoxybacillus* türlerinde de araştırılmalıdır.

Çalışmamızda enzimin sıcaklığa karşı dayanıklılığını arttırmak için öncelikle gliserol ve sorbitolun enzimin sıcaklık stabilitesine olan etkisi araştırılmıştır. Bunun için enzim, 60 °C'de 30 dakika boyunca gliserol ve sorbitolle ayrı ayrı ön inkübasyona bırakılmış ve sonrasında α -amilaz aktivitesine bakılmıştır.

Şekil 4.13'de gliserol ve sorbitolun enzimin sıcaklık stabilitesine olan etkileri görülmektedir. Kontrolle karşılaştırıldığında, % 30 ve % 40 oranlarındaki

gliserolde sırasıyla kalan enzim aktivitesi % 110 ve % 112 olarak saptanmış olup diğer konsantrasyonlarda kontrolden daha düşük değerler elde edilmiştir. % 30 ve % 40 sorbitolde kalan enzim aktivitesi sırasıyla % 86 ve % 112 olarak hesaplanmıştır. Diğer konsantrasyonlarda kontrolden daha düşük değerler elde edilmiştir. Bu yüzden enzimin termostabilitesini arttırmaya yönelik çalışmalarda % 30 gliserol kullanılmıştır.

Gliserolun enzim sıcaklık stabilitesine olan etkisinin araştırılması için, 55 °C, 60 °C ve 65 °C sıcaklık değerlerinde enzim ve % 30 oranındaki gliserol karışımı 20 ile 120 dakika arasında ön inkübasyona bırakılmıştır. Şekil 4.14’de görüldüğü gibi % 30 oranında gliserolle muamele edilen enzimin 55 °C ve 60 °C’de 120 dakika sonunda kalan aktiviteleri sırasıyla % 99 ve % 85 olarak tespit edilmiştir. 65 °C’ de ise 60 dakika sonunda enzimin tüm aktivitesini kaybettiği belirlenmiştir.

Cordeiro ve ark.³ (2002) termofilik *Bacillus sp.*’den elde ettikleri α -amilazın 50 °C’ de 2 saat sonunda tüm aktivitesini koruduğunu, 60 °C, 70 °C ve 90 °C’de aktivite kaybına uğradığını tespit etmişlerdir.

Asgher ve ark.⁶ (2007) termofilik *Bacillus JS-2004*’ten elde ettikleri α -amilazın 60 °C ve 70 °C’ de 1 saat sonunda oldukça stabil olduğunu, 80 °C ve 90 °C’de ise enzim aktivitesinde düşüş olduğunu gözlemlemişlerdir.

Aguilar ve ark.²⁷ (2000) *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010^T bakterisinden elde ettikleri ekstraselüler α -amilazın substrat olmadan 40 °C’den daha yüksek sıcaklıklara karşı duyarlı olduğunu tespit etmişlerdir. Enzimin 50 °C’ de 60 dakika sonunda kalan aktivitesini % 70 olarak hesaplamışlar ve enzimin 55 °C’ de 60 dakika sonunda tüm aktivitesini kaybettiğini saptamışlardır.

Bernhardsdotter ve ark.²⁸ (2005) *Bacillus sp.* L1711'den saflaştırdıkları α -amilazın 55 °C'de 1 saat sonunda tüm aktivitesini kaybettiğini tespit etmişlerdir.

Khajeh ve ark.³¹ (2006) termofilik *Bacillus licheniformis* ve mezofilik *Bacillus amyoliguefaciens*'den salgılanan iki ayrı α -amilazın termostabilitesinin gliserol ve sorbitol varlığında arttığını tespit etmişlerdir.

Cordt ve ark.²⁹ (1994) *Bacillus licheniformis*'ten elde ettikleri α -amilazda, gliserol ve sorbitolun enzimin termostabilitesini arttırdığını tespit etmişlerdir.

Graber ve Combes³⁰ (1989) gliserol ve sorbitol gibi poliollerin fungal α -amilazda termostabiliteyi arttırdığını tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda *Anoxybacillus sp.* AH1 tarafından salgılanan α -amilazın elektroforetik analizi yapılmıştır. Şekil 4.15'de α -amilazın molekül ağırlığı 58 kDa.'dan daha büyük olduğu görülmektedir.

Asodeh ve ark.³³ (2010) Termofilik *Bacillus sp.* Ferdowsicous tarafından salgılanan α -amilazın molekül ağırlığını yaklaşık olarak 53 kDa. olarak hesaplamışlardır.

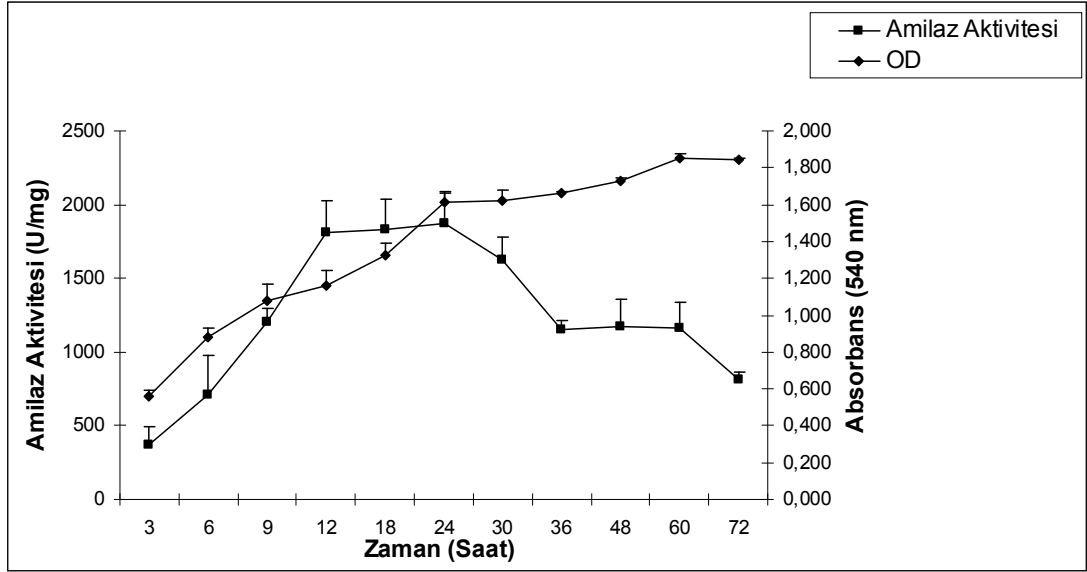
Liu ve Xu⁸ (2008) *Bacillus sp.* YX-1 tarafından salgılanan α -amilazın molekül ağırlığını yaklaşık olarak 56 kDa. olarak hesaplamışlardır.

Shafiei ve ark.⁹ (2010) *Nesterenkonia sp.* strain F'den elde ettikleri ve saflaştırdıkları α -amilazın molekül ağırlığını 100-106 kDa olarak hesaplamışlardır.

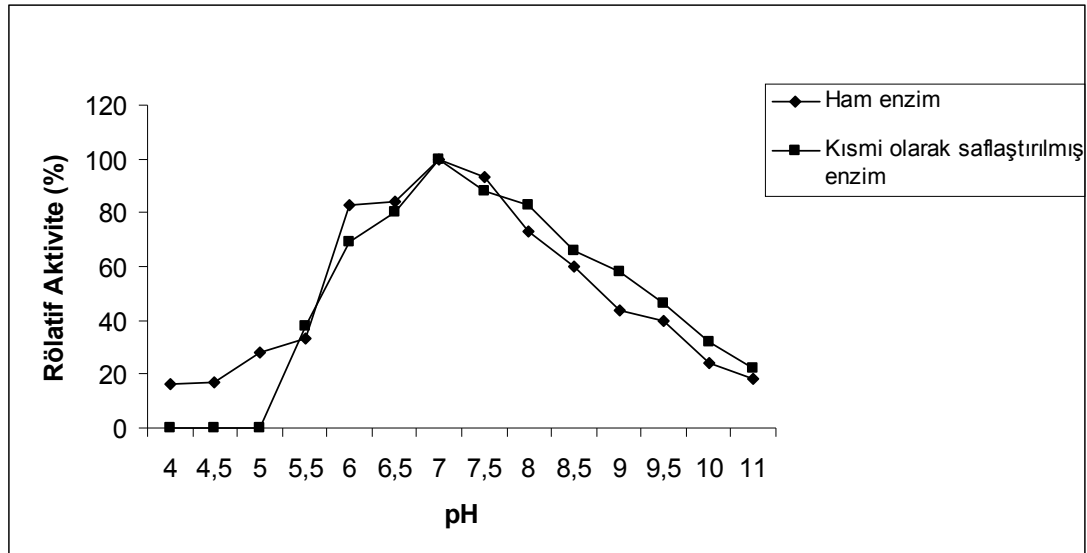
Sajedi ve ark.⁵ (2005) *Bacillus sp.* KR-8104'ten salgılanan α -amilazın molekül ağırlığını yaklaşık olarak 59 kDa. olarak hesaplamışlardır.

Aguilar ve ark.²⁷ (2000) *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010^T tarafından salgılanan α -amilazın moleköl ağırlığını yaklaşık olarak 135 kDa. olarak hesaplamışlardır.

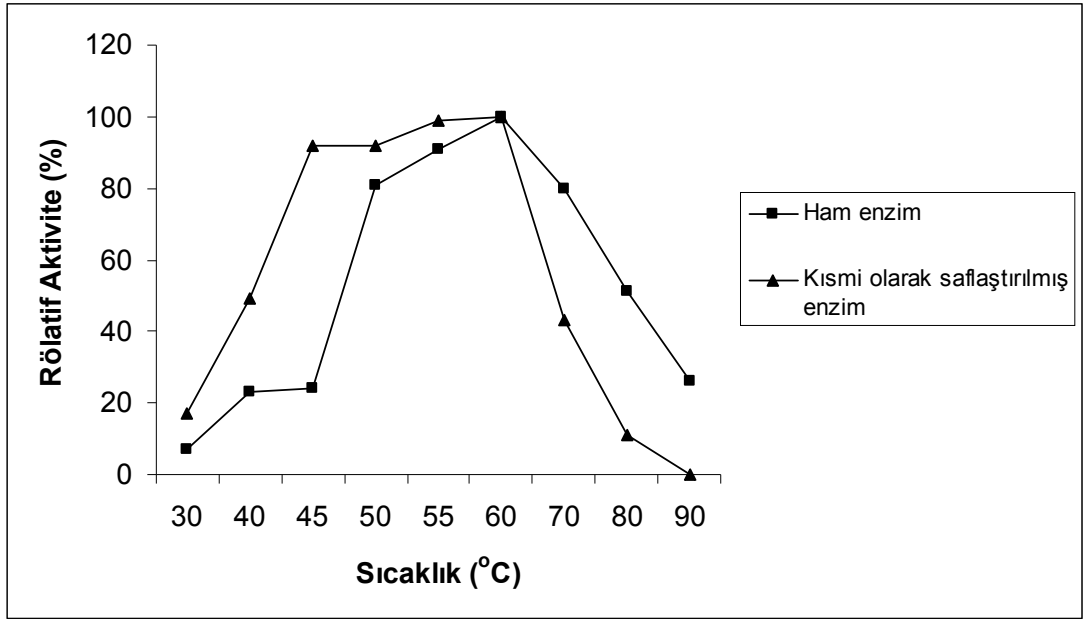
4.3. ŞEKİLLER



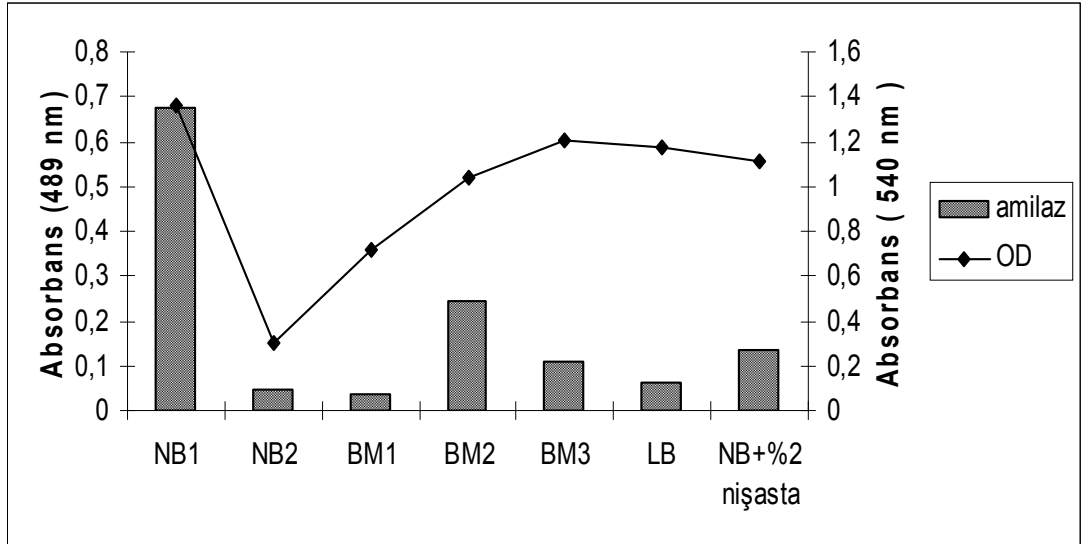
Şekil 4.1. α -Amilaz üretimi üzerine inkübasyon sürelerinin etkisi



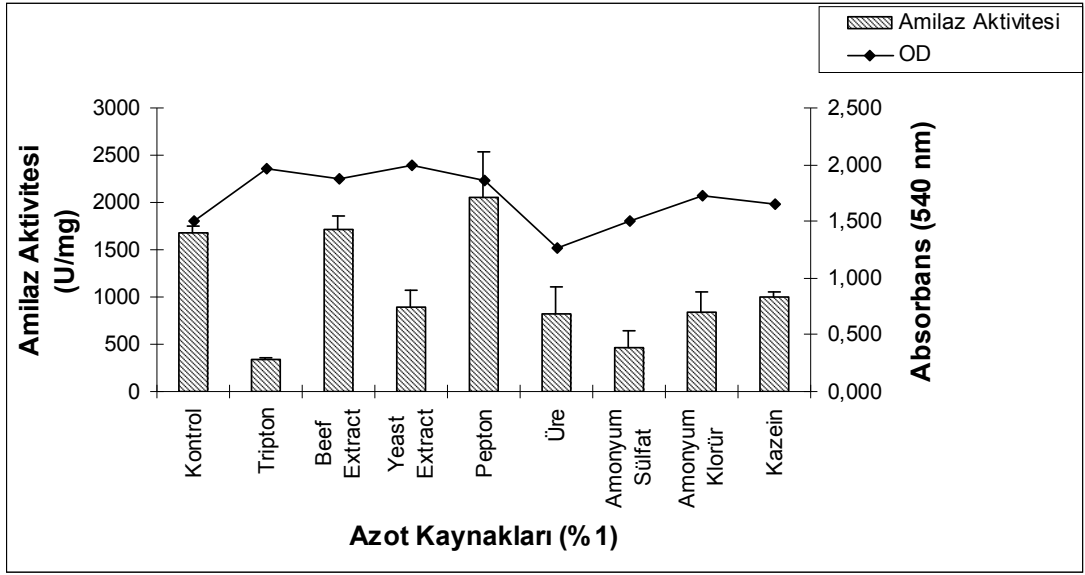
Şekil 4.2. α -Amilaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi



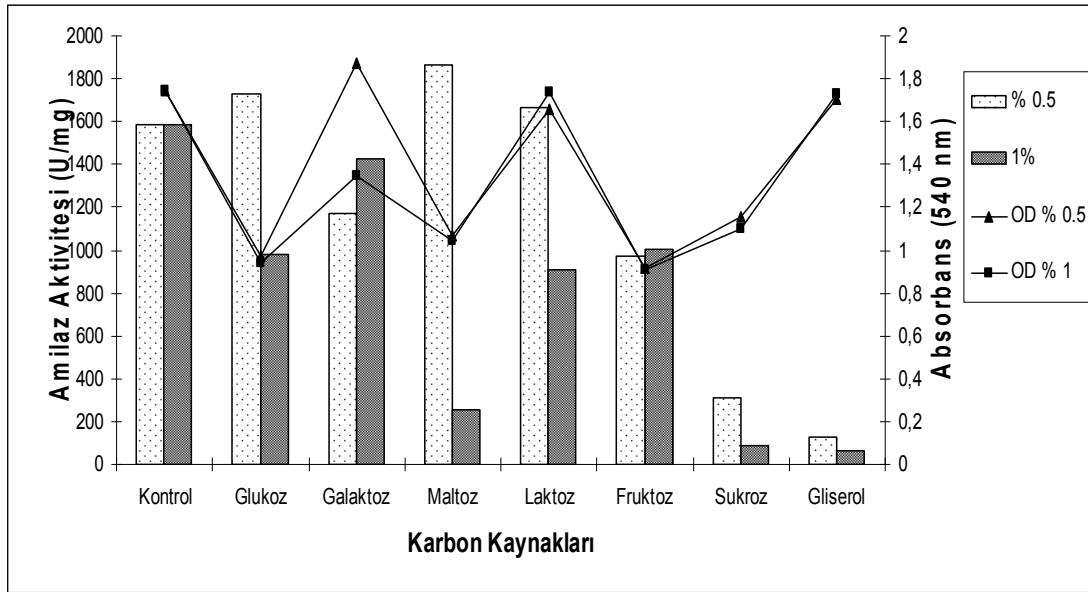
Şekil 4.3. α -Amilaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi



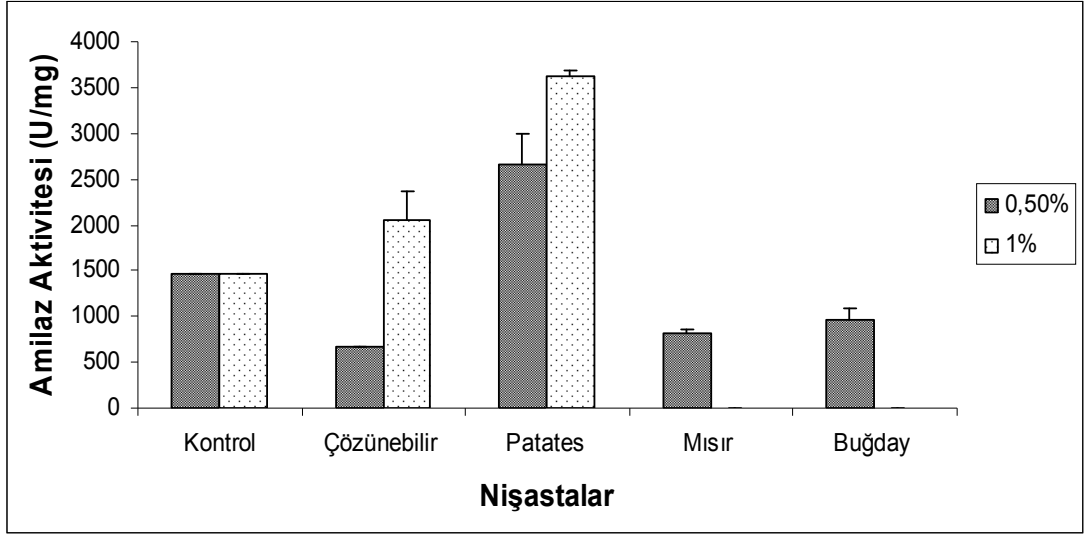
Şekil 4.4. α -Amilaz üretimi üzerine değişik besiyerlerinin etkisi



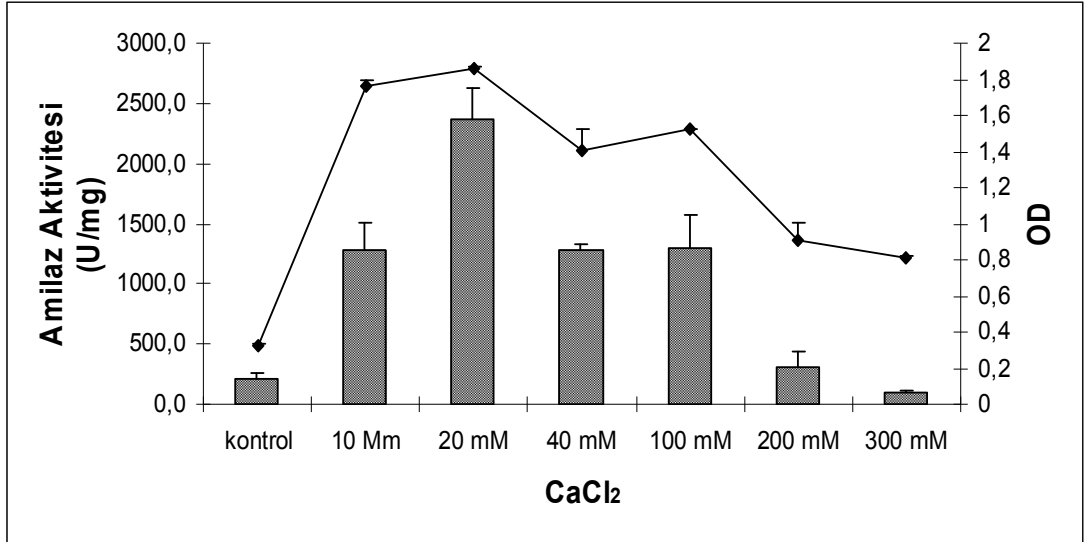
Şekil 4.5. α-Amilaz üretimi üzerine azot kaynaklarının etkisi



Şekil 4.6. α-Amilaz üretimi üzerine karbon kaynaklarının etkisi



Şekil 4.7. α -Amilaz üretimi üzerine nişastaların etkisi



Şekil 4.8. α -Amilaz üretimi üzerine CaCl₂'nin etkisi

Çizelge 4.1. Kısmi saflaştırma tablosu

Saflaştırma Adımı	Total Aktivite (U)	Total Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Saflaştırma Katsayısı	Verim (%)
Ham Ekstrakt	20551	13.35	1539	1	100
Presipitasyon & Diyaliz	6243	0.90	6937	4.5	30.4

Çizelge 4.2. α -Amilaz aktivitesi üzerine bazı kimyasal maddelerin etkisi

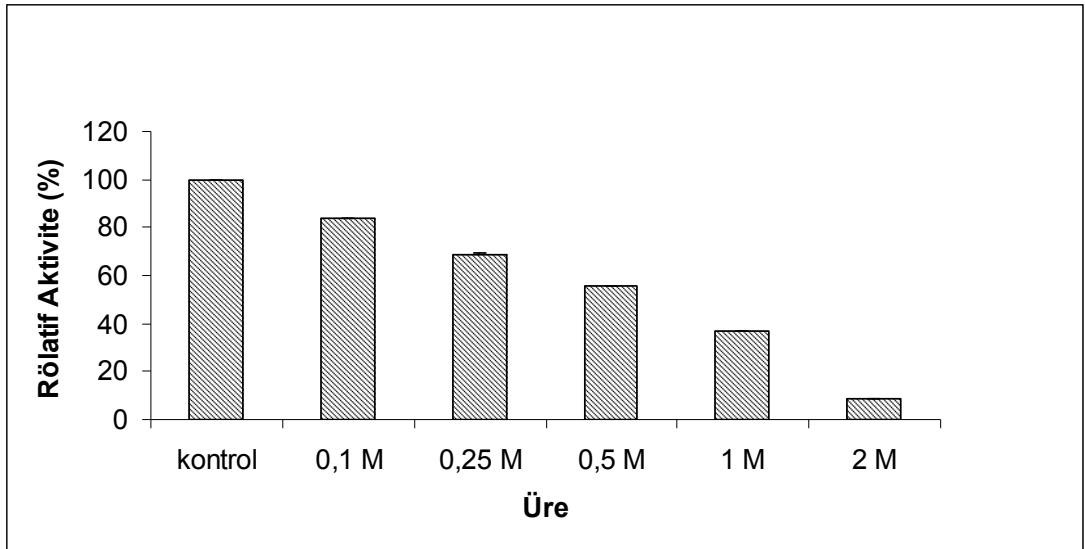
Kimyasallar	Kalan Aktivite Miktarı (%)					
	0.25 mM	0.5 mM	1 mM	2 mM	4 mM	10 mM
DTT	-	-	102	118	124	206
β-mercaptoethanol	-	-	120	121	144	164
PMSF	-	-	51	50	40	37
PCMB	93	86	78	77	48	-
N-ethylenmaleimide	-	-	89	ND	ND	ND
Iodoacetamide	-	-	81	ND	ND	ND

ND: Enzim aktivitesi üzerine herhangi bir etki görülmediğini gösterir

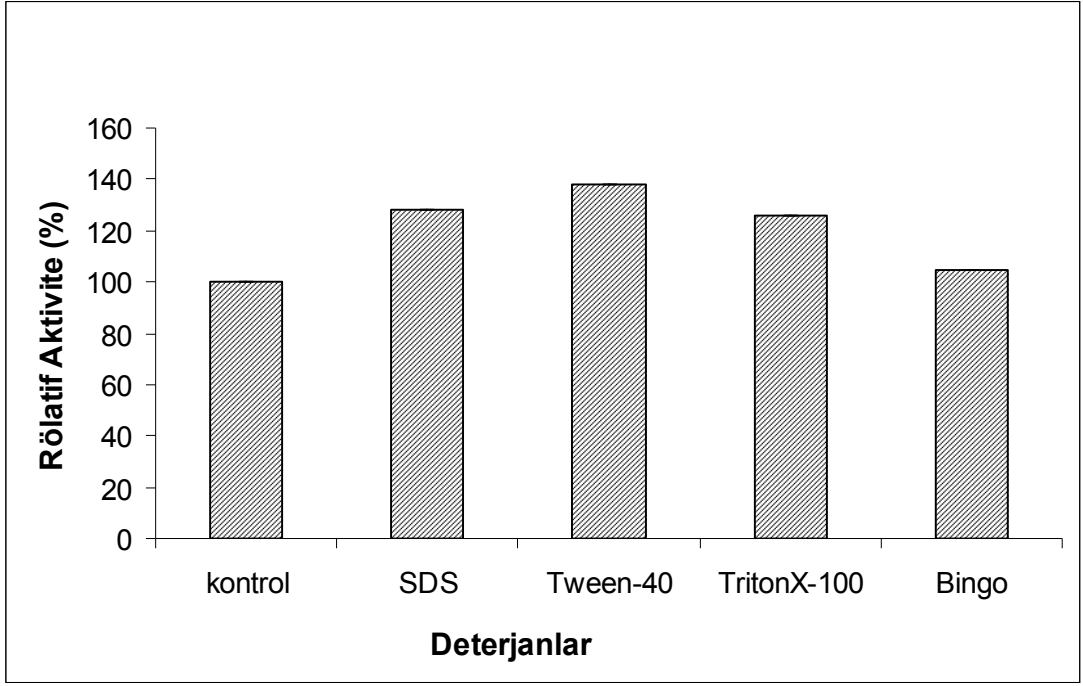
-: Denenmeyen konsantrasyonları gösterir

Çizelge 4.3. α -Amilaz aktivitesi üzerine bazı metal ve şelatörlerin etkisi

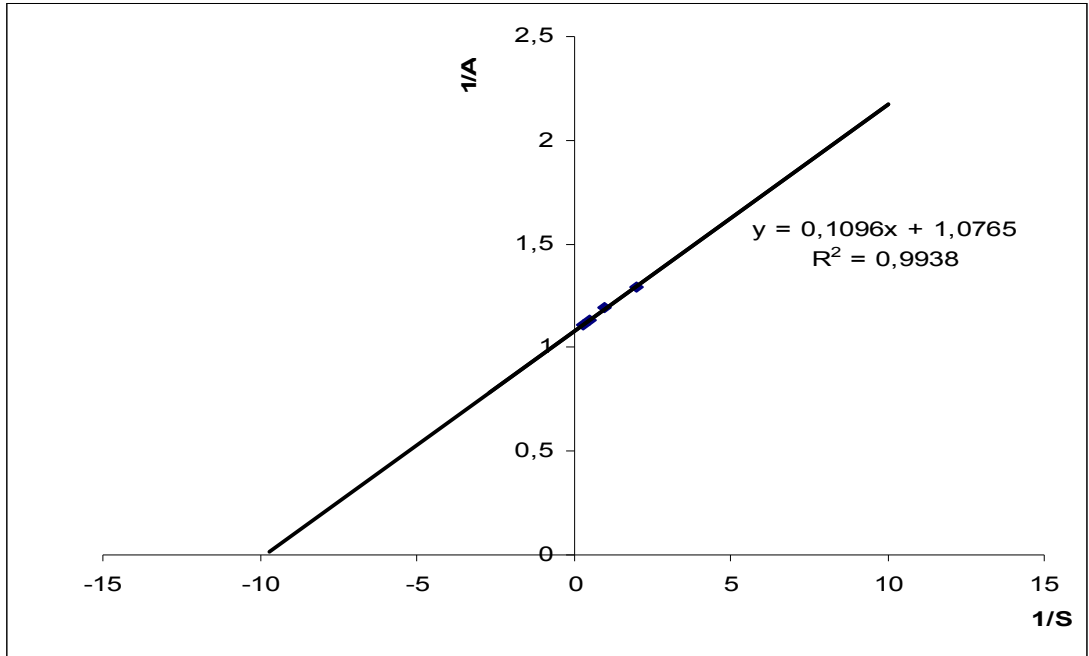
Metal ve Şelatörler	Kalan Aktivite Miktarı (%)							
	0.05 mM	0.1 mM	0.5 mM	1 mM	2 mM	4 mM	8 mM	10 mM
CaCl ₂	-	-	-	146	152	159	170	-
MgCl ₂	-	-	-	109	121	133	141	-
CuCl ₂	65	62	24	0	-	-	-	-
ZnCl ₂	74	32	15	7	0	-	-	-
EDTA	-	-	-	88	58	57	53	37
1-10 phenanthroline	-	-	-	99	97	87	-	78



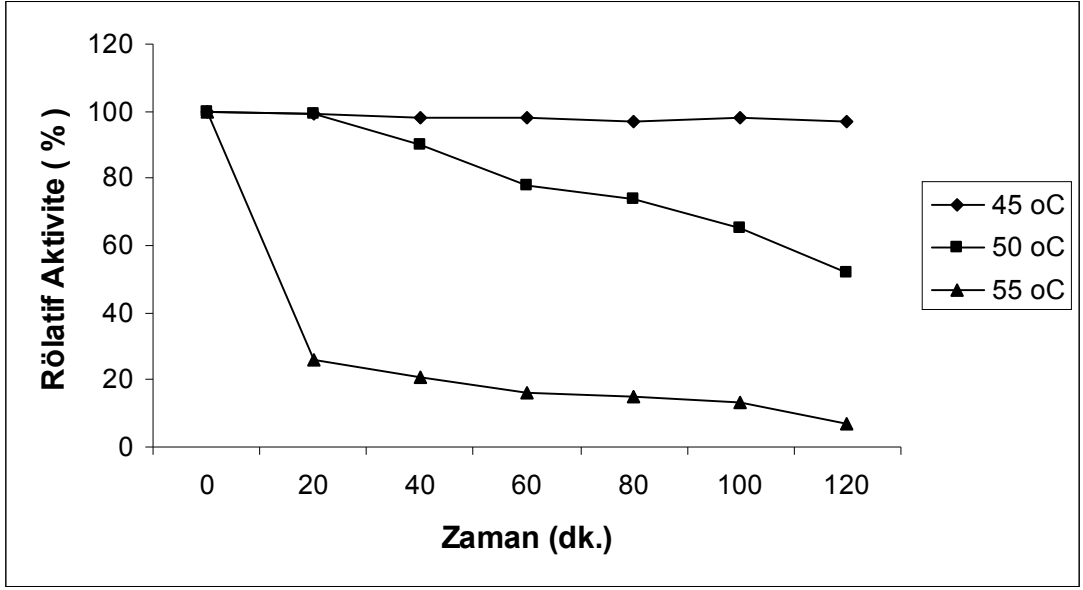
Şekil 4. 9. α -Amilaz aktivitesi üzerine ürenin etkisi



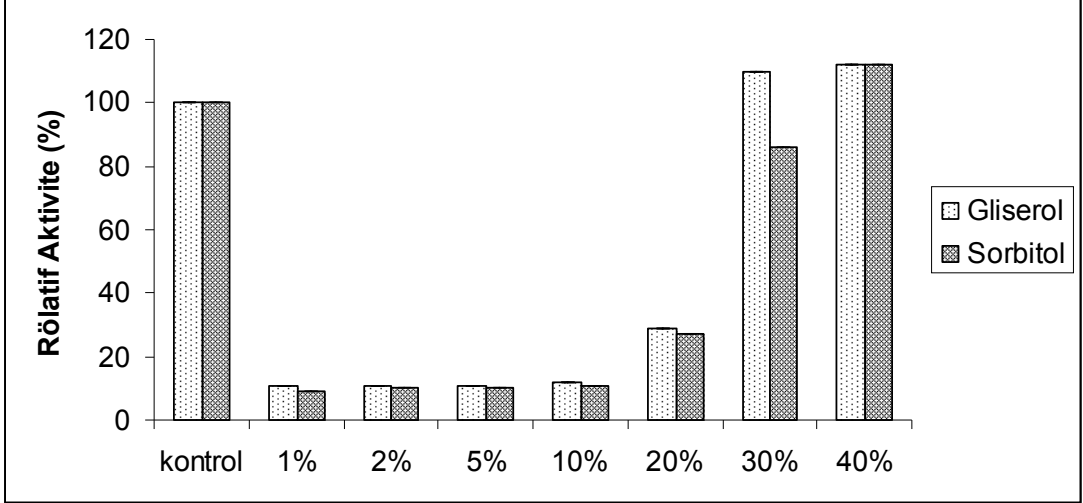
Şekil 4. 10. α -Amilaz aktivitesi üzerine % 0.5'lik deterjanların etkisi



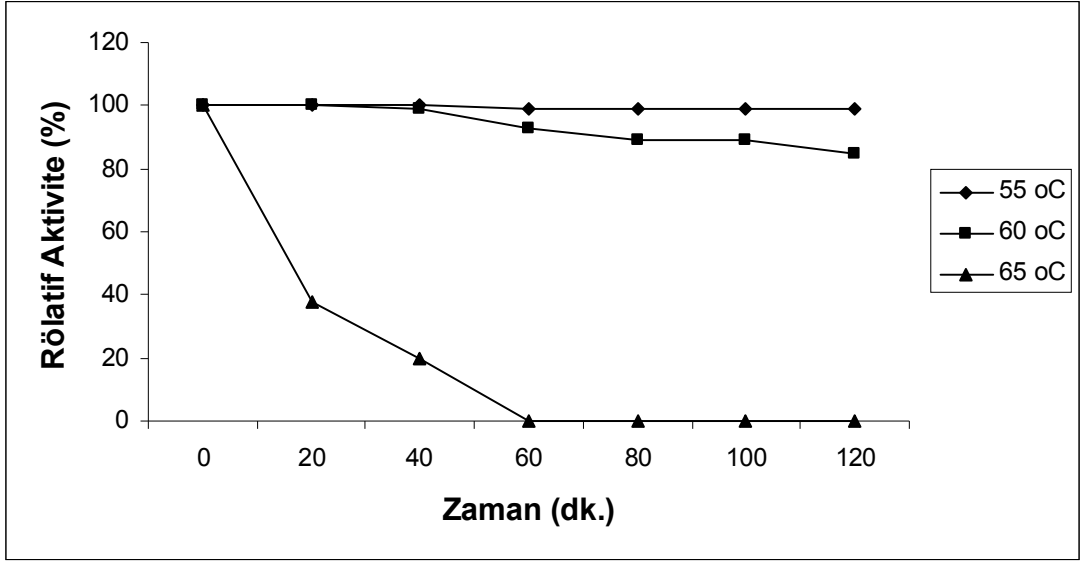
Şekil 4.11. Lineweaver–Burk plot α -amilaz K_m ve V_{max} grafiği



Şekil 4.12. Zamana bağlı α -amilaz sıcaklık stabilite tayini



Şekil 4.13. Gliserol ve sorbitolun α -amilaz sıcaklık stabilitesine etkisi



Şekil 4.14. % 30'luk gliserolün α -amilaz sıcaklık stabilitesine etkisi



Şekil 4.15. Nondenatüre Poliakrilamid Jel Elektroforezi

KAYNAKLAR

1. Mamo, G.; Gessesse, A. *Purification and characterization of raw-starchdigesting thermostable α -amylase from a thermophilic Bacillus*, *Enzyme and Microbial Technology*, **1999**, 25, 433-438
2. Hamilton, L.Y.; Kelly, C.T.; Fogarty, W.M. *Production and properties of the raw starch-digesting α -amylase of Bacillus sp. IMD 435*, *Procces Biochemistry*, **1999**, 35, 27-31
3. Cordeiro, C.A.M.; Martins, M.L.L.; Luciano, A.B. *Production and properties of α -amylase from Thermophilic Bacillus sp.*, *Brazilian Journal of Microbiology*, **2002**, 33, 57-61
4. Goyal, N.; Gupta, J.K.; Soni, S.K. *A novel raw starch digesting thermostable α -amylase from Bacillus sp. 1-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch*, *Enzyme and Microbial Technology*, **2005**, 37, 723-734
5. Sajedi, R.H.; Naderi-Manesh, H.; Khajeh, K.; Ahmadvand, R.; Ranjbar, B.; Asoodeh, A.; Moradian, F. *A Ca-independent α -amylase that is active and stable at low pH from the Bacillus sp. KR-8104*, *Enzyme and Microbial Technology*, **2005**, 36, 666-671
6. Asgher, M.; Asad, M.J.; Rahman, S.U.; Legge, R.L. *A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic Bacillus subtilis strain for starch processing*, *Journal of Food Engineering* , **2007**, 79, 950–955
7. Matpan F. *Diyadin (Ağrı) Sıcak Su Kaynaklarından Bakteri İzolasyonu ve Bazı Enzimleri Üzerinde Çalışmalar*, Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır, **2007**

8. Liu, X.D.; Xu, Y. *A novel raw starch digesting α -amylase from a newly isolated Bacillus sp. YX-1: Purification and characterization*, *Bioresource Technology*, **2008**, 99, 4315-4320
9. Shafiei, M.; Ziaee, A.A.; Amoozegar, M.A. *Purification and biochemical characterization of a novel SDS and surfactant stable, raw starch digesting, and halophilic α -amylase from a moderately halophilic bacterium, Nesterenkonia sp. strain F*, *Process Biochemistry*, **2010**, 44, 694–699
10. Ezeji, T.C.; Bahl, H. *Purification, characterization and synergistic action of phytate resistant α -amylase and α -glucosidase from Geobacillus thermodenitrificans HRO10*, *Journal Biotechnology*, **2006**, 125, 27-38
11. Bolton, D.J.; Kelly, C.T.; Fogarty, M.W. *Purification and characterization of α -amylase of Bacillus flavothermus*, *Enzyme and Microbial Technology*, **1997**, 20, 340-343
12. Najafi, M.F.; Deobagkar, D.; Deobagkar, D. *Purification and characterization of an extracellular α -amylase from Bacillus subtilis AX20*, *Protein Expression and Purification*, **2005**, 41, 349-354
13. Aiyer, P.V.D. *Effect of C:N ratio on alpha amylase production by Bacillus licheniformis SPT 27*, *African Journal of Biotechnology*, **2004**, 3 (10), 519-522
14. Das, K.; Doley, R.; Mukherjee A.K. *Purification and Biochemical characterization of a thermostable, alkaliphilic, extracellular α -amylase from Bacillus subtilis DM-03, a strain isolated from the traditional fermented food of India*, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **2004**, 40, 291-298

15. Konoula, Z.; Liakopoulou-Kyriakides, M. *Co-production of α -amylase and β -galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates*, *Bioresource Technology*, **2007**, 98, 150-157
16. Saxena, R.K.; Dutt, K.; Agarwal, L.; Nayyar, P. *A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5*, *Bioresource Technology*, **2007**, 98, 260-265
17. Prakash, B.; Vidyasagar, M.; Madhukumar, M.S.; Muralikrishna, G.; Sreeramulu K. *Production, Purification, and characterization of two extremely halotolerant, thermostable, and alkali-stable α -amylases from *Chromohalobacter* sp. TVSP 101*, *Process Biochemistry*, **2009**, 44, 210-215
18. Arikan, B. *Highly thermostable, thermophilic, alkaline, SDS and chelator resistant amylase from a thermophilic *Bacillus* sp. isolate A3-15*, *Bioresource Technology*, **2008**, 99, 3071-3076
19. Srivastava R.A.K. *Purification and chemical characterization of thermostable amylases produced by *Bacillus stearothermophilus**, *Enzyme and Microbial Technology*, **1987**, 9, 749–754
20. Ivanova, V.N.; Dobрева, E.P.; Emanuilova, I. *Purification and characterization of a thermostable alpha-amylase from *Bacillus licheniformis**, *Journal of Biotechnology*, **1993**, 28, 277-289
21. Ben Abdelmalek-Khedher, I.; Urdaci, M.C.; Limam, F.; Schmitter J.M.; Marzouki, M.N.; Bresollier, P. *Purification, characterization, and partial primary sequence of a major-maltotriose-producing alpha-amylase, ScAmy43, from *Sclerotinia sclerotiorum**, *J Microbiol Technol*, **2008**, 18 (9), 1555-63

22. Negi, S.; Banerjee, R. *Characterization of amylase and protease produced by Aspergillus awamori in a single bioreactor, Food Research International*, **2009**, 42, 443-448
23. Tatar, S. *Termofil Moderately Halofilik Bacillus Sp. Suşlarından Amilaz Enzimi Üretimi Ve Endüstriyel Kullanım Olanaklarının Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, **2007**, Adana
24. Gözükar, M.E. *Biyokimya*, Nobel Tıp Kitapevleri, Ankara, **2001**
25. Colak, A.; Col, M.; Canakci, S.; Belduz, AO.; Omarov, I. *Investigation of extracellular highly thermostable starch hydrolyzing activity from a novel thermophilic bacterium Anoxybacillus gonensis A4, Asian Journal of Chemistry*, **2008**, 20 (2), 1577-1587
26. Mollania, N.; Khajeh, K.; Hosseinkhani, S.; Dabirmanesh, B. *Purification and characterization of a thermostable phytate resistant α -amylase from Geobacillus sp. LH8, International Journal of Biological Macromolecules*, **2010**, 46, 27–36
27. Aguilar, G.; Morlon-Guyot, J.; Trejo-Aguilar, B.; Guyot, J.P. *Purification and characterization of an extracellular α -amylase produced by Lactobacillus manihotivorans LMG 18010^T, an amylotic lactic acid bacterium, Enzyme and Microbial Technology*, **2000**, 27, 406-413
28. Bernhardsdotter, E.C.M.J.; Ng, J.D.; Garriott, O.K.; Pusey, M.L. *Enzymatic properties of an alkaline chelator-resistant α -amylase from an alkaliphic Bacillus sp. isolate L1711, Process Biochemistry*, **2005**, 40, 2401-2408
29. Cordt, S.; Hendrickx, M.; Maesmans, G.; Tobbac, P. *The influence of polyalcohols and carbohydrates on the thermostability of α -amylase, Biotechnology and Bioengineering*, **1994**, 43, 107-114

30. Graber, M.; Combes, D. *Effect of polyols on fungal alpha-amylase thermostability*, *Enzyme and Microbial Technology*, **1989**, 11, 673-677
31. Khajeh, K.; Shokri, M.M.; Asghari, S.M.; Moradian, F.; Ghasemi, A.; Sadeghi, M.; Ranjbar, B.; Hosseinkhani, S.; Gharavi, S.; Naderi-Manesh, H. *Acidic and proteolytic digestion of α -amylases from *Bacillus licheniformis* and *Bacillus amyloliquefaciens*: Stability and flexibility analysis*, *Enzyme and Microbial Technology*, **2006**, 38, 422-428
32. Chakraborty, K.; Bhattacharyya, Sen, S.K. *Purification and Characterization of a Thermostable α -amylase from *Bacillus stearothermophilus**, *Folia Microbiol*, **2000**, 45 (3), 207-210
33. Asoodeh, A.; Chamani, J.K.; Lagzian, M. *A novel thermostable, acidophilic α -amylase a new thermophilic “*Bacillus sp. Ferdowsicus*” isolated from Ferdows hot mineral spring Iran: Purification and biochemical characterization*, *International Journal of Biological Macromolecules*, **2010**, 46, 289–297
34. Rao, J.L.U.M.; Satyanarayana, T. *Purification and Characterization of a Hyperthermostable and High Maltogenic α -Amylase of an Extreme Thermophile *Geobacillus thermoleovorans**, *Appl Biochem Biotechnol*, **2007**, 142, 179–193
35. Hashim, S.O.; Delgado, O.D.; Martinez, M.A.; Kaul, R.-H.; Mulaa, F.J.; Mattiasson, B. *Alkaline active maltohexaose-forming α -amylase from *Bacillus halodurans* LBK 34*, *Enzyme and Microbial Technology*, **2005**, 36, 139-146

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Termofillerin 1970’de Brock tarafından keşfinden beri termofilik ve hipertermofilik mikroorganizmalar, çalışma alanlarının ana hedeflerinden biri haline gelmiştir. Benzersiz özelliklerinden dolayı bu mikroorganizmalara olan ilgi gitgide artmaktadır. Bu mikroorganizmalardan elde edilen enzimler (termoenzimler) sıcaklık, kimyasal ve pH stabilitesi gibi eşsiz özelliklere sahiptir¹.

Çalışmamızda α -amilaz üretimi için en iyi inkübasyon süresi 12-24 saatleri arasında tespit edilmiştir.

Enzimin optimum pH değerini belirlemek için pH 4.0-11.0 aralığında yapılan aktivite tayini sonucunda enzimin aktivite gösterdiği optimum pH değeri 7.0 olarak tespit edilmiştir.

Enzimin optimum sıcaklık değerini belirlemek için 30–90 °C arasında yapılan aktivite tayini sonucunda enzimin aktivite gösterdiği optimum sıcaklık değeri 60 °C olarak tespit edilmiştir.

Çalışmamızda enzim üretimi üzerine değişik besi yerlerinin etkisi incelendi ve analiz sonuçlarına göre NB1 besiyerinde α -amilaz aktivitesi en yüksek değerde saptanmıştır.

% 1 oranındaki azot kaynaklarının enzim üretimi üzerine etkisinin incelendiği çalışmamızda pepton ve beef ekstraktın enzim üretimini arttırdığı tespit edilmiştir.

% 0.5 ve % 1 oranında karbon kaynakları ve nişastaların enzim üretimi üzerine etkisinin incelendiği çalışmada % 0.5 oranındaki karbon kaynaklarından maltoz, glukoz ve laktozda enzim üretiminin arttığı, % 1 oranındaki karbon kaynaklarında ise enzim üretiminin artmadığı tespit edilmiştir. Nişastalardan, % 0.5

ve % 1 oranındaki patates nişastasında ve % 1 oranındaki çözünebilir nişastada enzim üretimi artmış olup en yüksek aktivite artışı % 1 oranındaki patates nişastasında elde edilmiştir.

Çalışmamızda saf suyla hazırlanan NB besiyerlerine 10-300 mM arasında değişen oranlarda CaCl_2 eklenerek enzim üretimi üzerine etkisi incelenmiş ve en yüksek değer 20 mM'da elde edilmiştir.

Amonyum sülfat çöktürmesi ve Diyaliz yapılarak enzim tek adımda kısmi olarak saflaştırılmış ve enzim aktivitesi üzerine bazı kimyasal maddeler, metal ve metal şelatörleri, üre ve bazı deterjanların etkisi incelenmiştir. SH grubu içeren DTT ve β -mercaptoethanol gibi ajanların enzim aktivitesini oldukça arttırdığı tespit edilmiştir. PCMB (p-chloromercuribenzoic acid) enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi göstermiştir. Bu durum enzimin aktif bölgesinde sistein bulunduğunu göstermektedir. Iodoacetamide ve N-ethylmaleimide enzim aktivitesini çok az etkilemişlerdir. Serin inhibitörü olan PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride) enzim aktivitesini büyük oranda inhibe etmiştir. Ayrıca ürenin enzim aktivitesini güçlü bir şekilde inhibisyona uğrattığı tespit edilmiştir.

Enzim aktivitesi üzerine bazı metal ve metal şelatörlerinin etkisine bakıldığı zaman CaCl_2 ve MgCl_2 'ün enzim aktivitesinde artışa yol açtığı, CuCl_2 ve ZnCl_2 'ün enzim aktivitesini güçlü bir şekilde inhibe ettiği tespit edilmiştir. Metal şelatörleri olan EDTA ve 1,10-phenanthroline enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi göstermiştir. Bu durum çalıştığımız enzimin bir metaloenzim olduğu şeklinde açıklanabilir.

% 0.5 oranında kullanılan çeşitli deterjanlarda (SDS, TritonX-100, Tween-40, Bingo) enzim aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda çözünebilir nişasta kullanılarak enzimin Km ve Vmax değerleri Lineweaver–Burk plot'a göre hesaplanmıştır. Buna göre enzimin Km ve Vmax değerleri sırasıyla 0.102 mM ve 0.929 µmol/dk. olarak hesaplanmıştır.

Kısmi olarak saflaştırılan enzimde yapılan termostabilite analizi sonucu, sadece enzim kullanılarak yapılan sıcaklık stabilite analizinde 45 °C' de 120 dakika sonunda enzimin oldukça stabil olduğu, 45 °C'nin üzerindeki sıcaklıklara karşı ise dayanıksız olduğu belirlenmiştir. Enzimin % 30 oranındaki gliserolde termostabilitesinin arttığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda gliserol ve sorbitolun enzimin termostabilitesini arttırdığı tespit edilmiştir.

Elektroforetik analiz sonucu α-amilazın molekül ağırlığının 58 kDa.'dan daha büyük olduğu belirlenmiştir.

Sıcak su kaynaklarından izole edilen *Anoxybacillus sp.* AH1'de salgılanan α-amilaz enziminin belirlenen optimum şartları ve karakterizasyonu endüstriyel kullanım potansiyelinin olduğunu göstermiştir. Enzim üretimini arttıran azot ve karbon kaynakları ve nişastaların tespitinin yanısıra maksimum enzim üretiminin çeşme suyunda ve 12-24 saatlerinde olması hem zaman hem de ekonomik açıdan avantajlı bir durumdur. Son yıllarda α-Amilaz, deterjanların içeriğinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda % 0.5 oranında kullanılan deterjanların α-amilaz aktivitesini arttırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca enzimin belirlenen özelliklerinden pH 6-8 aralığında ve 60 °C'de aktif olması yüksek sıcaklık gerektiren endüstriyel uygulamalarda kullanılabilir olduğunu göstermektedir. Bunun yanında

Anoxybacillus sp. AH1'in termofilik bir bakteri olması ve ürettiği α -amilaz enziminin 45 °C'nin üzerindeki sıcaklıklara karşı duyarlı olması bir dezavantajdır. Bu durumda enzime gliserol ilave edildiğinde daha yüksek sıcaklıklarda enzim aktiivtesini korumaya devam etmektedir. Bu çalışma *Anoxybacillus* türlerinde yapılan ilk α -amilaz çalışmalardan biridir. Bu yüzden Bu durumun nedeninin daha ileriki çalışmalarda ve diğer *Anoxybacillus* türlerinde de araştırılması uygun olacaktır. Ayrıca bu enzimin tam olarak saflaştırılıp bazı özelliklerinin ileri düzeyde araştırılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Bruins, M.E.; Janssen, A.E.M.; Boom, R.M. *Thermostzymes and Their Applications a Review of Recent Literature and Patents, Applied Biochemistry and Biotechnology*, **2001**, 90, 155-186

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Ömer ACER

Doğum Yeri: Derik

Doğum Tarihi: 28.12.1980

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum Ve Yıl)

Lise : Ziya Gökalp Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi 1996–2000

Lisans : Dicle Üniversitesi Eğitim Fakültesi
Biyoloji Öğretmenliği 2003–2008

Yüksek Lisans : Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji
Bölümü 2008- 2010