

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

**İNEK SÜTÜNDEN İZOLE EDİLEN *Bacillus* sp.' DEN PULLULANAZ VE
 α -AMİLAZ ENZİMLERİNİN ÜRETİMİ, BU ENZİMLERİN BAZI
OPTİMİZASYON KOŞULLARININ BELİRLENMESİ**

Ercan ÇINAR

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
(KİMYA ANA BİLİM DALI)**

DİYARBAKIR
EYLÜL- 2007

TEŞEKKÜR

Laboratuar çalışmalarında bana her türlü kolaylığı sağlayan Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof.Dr. Çetin AYTEKİN'e teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Yüksek Lisans çalışmamda bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak, ihtiyaç duyduğum her konuda yardımlarını esirgemeyen Danışman Hocam Sayın Doç.Dr. Zübeyde BAYSAL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalar aşamasında yardımlarını esirgemeyen Doç.Dr. Fikret UYAR, Yrd.Doç.Dr. Mehmet DOĞRU ve Arş.Gör. M.Hüseyin ALKAN'a yakın ilgi ve yardımlarından dolayı çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında manevi desteklerini esirgemeyen aileme ve arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddeler DÜAPK-06-FF-02 nolu proje ile karşılanmıştır. Bu vesile ile Dicle Üniversitesi Araştırma Fonu Koordinatörlüğü'ne teşekkür etmek isterim. Aynı zamanda Dicle Üniversitesi Kimya Bölümü Hocalarına yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
AMAÇ	v
ÖZET.....	vi
SUMMARY	vii
1.GİRİŞ	1
1.1. Enzim Üretimi	2
1.2. Biyoteknoloji.....	3
1.2.2. Biyoteknolojide Mikroorganizmaların Daha Fazla Tercih Edilmelerinin Nedenleri	3
1.3. α- Amilaz.....	4
1.4. Pullulanaz	4
1.4.1. Tip I Pullulanazlar	5
1.4.2. Tip II Pullulanazlar-Amilopullulanazlar.....	5
1.4.3. Neopullulanazlar	6
1.4.4. İzopullulanazlar	6
1.4.5. Tip III pullulanazlar.....	6
1.5. Amilaz ve Pullulanaz Enzimlerinin Genel Özellikleri ve Kullanım Alanları.....	7
1.5.1. α -Amilazların Ekmekçilikte Kullanımı	7
1.5.2. α -Amilazların ve Pullulanazların Nişastanın Şekerlendirilmesinde Kullanılması	8
1.5.3. α -Amilazların ve Pullulanazların Tekstil Endüstrisinde Kullanımı	8
1.5.4. α -Amilazların ve Pullulanazların Deterjan Endüstrisinde Kullanımı.....	8
1.5.5. α -Amilazların ve Pullulanazların Kağıt Endüstrisinde Kullanımı	9
1.6. Nişasta.....	9
1.7. α-Amilazlar (α-1,4 glukon glukonohidrolaz, EC 3.2.1.1) ve Etki Mekanizmaları	11
1.8. Pullulan.....	14
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	17
3. MATERYAL ve METOD.....	19
3.1.Kullanılan Kimyasallar	19
3.2. Kullanılan Cihazlar	19

3.3. Besiyerleri	19
3.3.1. Nutrient Broth Katı Besiyeri	19
3.3.2. Sıvı Besiyeri.....	20
3.4. Çözünür nişasta- Beef ekstrakt (SB) Besiyeri (Basal medium)	20
3.5. Çözeltiler	20
3.5.1. Tampon Çözeltiler	20
3.6. Alkalin Çözeltisi	20
3.7. Folin Reaktifi	20
3.8. Biyolojik Materyal	20
3.8.1. Gram Boyama	21
3.9. Enzim Üretimi	21
3.10. α-Amilaz Enzim Aktivite Tayini	22
3.11. Pullulanaz Enzim Aktivite Tayini	22
3.12. β-Galaktozidaz Enzim Aktivite Tayini	22
3.13. Proteaz Enzim Aktivite Tayini	22
3.14. Standart Eğrinin Hazırlanması	23
3.15. Protein Miktar Tayini	23
3.16. Uygun İnkübasyon Süresinin Saptanması	23
3.17. pH'nın Etkisi	23
3.18. Sıcaklığın Etkisi	24
3.19. Enzim Üretimi Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi	24
3.20. Enzim Üretimi Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisi	24
3.21. Enzim Üretimi Üzerine Farklı Nişastaların Etkisi	24
3.22. Enzim Üretimi Üzerine Farklı Unların Etkisi	24
3.23. Metal İyonlarının Etkisi	25
4. BULGULAR	26
4.1. <i>Bacillus</i> sp.'nin Salgıladığı Bazı Enzimler	26
4.2. Enzim Üretimi İçin Uygun İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi	26
4.3. Optimum pH	26
4.4. Optimum Sıcaklık	26
4.5. Enzim Üretimi Üzerine Farklı Azot Kaynaklarının Etkisi	27
4.6. Enzim Üretimi Üzerine Farklı Karbon Kaynaklarının Etkisi	27
4.7. Enzim Üretimi Üzerine Farklı Nişasta Kaynaklarının Etkisi	27
4.8. Enzim Üretimi Üzerine Farklı Unların Etkisi	27

4.9. Enzim Üretimi Üzerine Farklı Metal İyonlarının Etkisi.....	28
5. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	29
6. ŞEKİLER	34
7.TABLolar.....	38
8. KAYNAKLAR	42
9. ŞEKİL LİSTESİ.....	48
10. TABLO LİSTESİ.....	49
11.EKLER	50
12. ÖZGEÇMİŞ	52

AMAÇ

Son yıllarda biyoteknolojik alanlarda endüstriye yönelik enzim çalışmalarına büyük bir ilgi duyulmaktadır. Günümüzde sıvı (SmF) ve katı (SSF) faz fermantasyon teknikleri kullanılarak kağıt, tekstil, deterjan, meyve suyu, gibi endüstriyel alanlarda önemli bir yere sahip olan α -amilaz ve pullulanaz enzimlerinin üretimi, çevre kirliliği, iş gücü, zaman ve sermaye tasarrufu sağlayarak önem kazanmıştır.

Çalışmanın amacı inek sütünden izole edilmiş olan *Bacillus* sp. seçilerek bu mikroorganizmanın salgıladığı ekstrasellüler enzimleri belirlemektir. Daha sonra bu mikroorganizmanın en çok salgılamış olduğu enzimlerden α -amilaz ve pullulanazı daha fazla ve daha ekonomik olarak elde ederek enzimlerin bazı karakteristik özellikleri belirlenmiştir. Bu nedenle bu enzimler için optimum koşullarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

ÖZET

Günümüz biyoteknolojisinde enzimlerin kullanımını giderek önem kazanmaktadır. Bu enzimlerden α -amilaz ve pullulanaz önemli biyoteknolojik enzimler arasındadır. α -Amilazlar ve pullulanazlar, nişastanın hidrolizi için gıda, deterjan, tekstil, kağıt, bira ve alkol gibi endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır.

Çalışmada öncelikle süttten izole edilen ve Gram (+) *Basil* olduğu belirlenen mikroorganizmanın hangi ekstrasellüler enzimleri salgıladığı biyokimyasal yöntemlerle belirlendi. Bakteri üretimi SmF tekniği ile gerçekleştirildi ve buradan elde edilen üst sıvıdan α -amilaz, pullulanaz, β -galaktosidaz ve proteaz aktivite tayinleri yapıldı. Bu doğrultuda en iyi aktivite α -amilaz ve pullulanaz ile elde edildiği için daha sonraki çalışmalarda bu iki enzimin üretimi gerçekleştirildi.

Enzimler için uygun inkübasyon süresi, optimum pH ve optimum sıcaklık belirlendi. α -Amilazın inkübasyon süresi 48. saat, optimum pH: 6.8 ve optimum sıcaklığı 37 °C olarak bulundu. Pullulanaz için bu veriler 44. saat, pH: 6.4 ve 37 °C olarak belirlendi.

Farklı karbon ve azot kaynaklı substratların *Bacillus* sp.'de α – amilaz ve pullulanaz üretimi üzerine etkisi test edildi. Kullanılan karbon kaynaklı substratlardan nişastanın hem α – amilaz hem de pullulanaz üretimini, farklı azot kaynaklı substratlardan ise pepton, beef ekstrakt ve triptonun α – amilaz, peptonun ise pullulanaz üretimini artırdığı tespit edildi.

Enzimlerin üretimi üzerine farklı nişastaların ve unların etkisi incelenerek patates nişastası ve buğday ununun hem amilaz hem de pullulanaz üretimini artırdığı belirlendi.

Metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendiğinde, 10 mM Ca^{+2} , nin α -amilaz' ı %103, 50 mM Ca^{+2} , nin pullulanazı %105 aktive ettiği tespit edildi. 50 mM Mn^{+2} ve 10 mM Zn^{+2} , nin α -amilaz' ı sırasıyla %85.89 ve %71.25, 10 mM ve 50 mM Zn^{+2} ,nin pullulanazı %97.68 ve % 97.14 inhibe ettiği belirlendi.

Anahtar kelime: α -amilaz, pullulanaz, optimizasyon parametreleri, *Bacillus* sp.

SUMMARY

Use of enzymes has been attracted considerable interest specially in biotechnological applications. α -Amylase and pullulanase are important biotechnological enzymes that are used in industry such as in food, detergent, textile, paper and beer, etc.

In the present study, extracellular enzymes that are secreted by a microorganism, which is isolated from cow milk and identified as G (+) *Bacil*, were determined by biochemical methods. Bacteria was produced by Submerged Fermentation (SmF) process. α -Amylase, pullulanase, β -galactosidase and protease activity were done from supernatant. The best activity was observed in α -amylase and pullulanase and therefore, optimization of these enzymes was carried out for further studies.

Appropriate incubation time, optimum pH and optimum temperature were found to be 48 h, 6.8 and 37 °C for α -amylase and 44 h, 6.4 and 37 °C for pullulanase activity, respectively.

The effect of different nitrogen and carbon containing substrates on the production of these enzymes were tested in *Bacillus* sp. obtained results indicated that starch as a carbon containing substrate was caused to increase the α -amylase production while starch and pullulan increased pullulanase production. Nitrogen containing substrates such as pepton, beef extract and trypton were caused to increament in α -amylase production while pepton only caused to increament in pullulanase production.

Effect of various starches and flours on the production of enzymes were examined and the result showed that both potato starch and wheat flour were caused to increase in the production of these two enzymes.

Finally, the effect of metal ions on enzyme activity was tested. It was found that α -amylase was activated by %103 with 10 mM Ca^{+2} and pullulanase was activated by %105 with 50 mM Ca^{+2} . α -Amylase was inhibited by %85.89 and %71.25 with 50 mM Mn^{+2} and 10 mM Zn^{+2} , respectively. Pullulanase was inhibited by %97.68 and %97.14 with 10 mM and %50 mM Zn^{+2} , respectively.

Keywords: *α -amylase, pullulanase, optimization parameters, Bacillus sp.*

1.GİRİŞ

Enzimler hem hücre içi hem de hücre dışında biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen genellikle protein yapısında olan biyolojik makromoleküllerdir. Hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler artık çeşitli amaçlar için kullanılmak üzere günlük ve ekonomik hayata girmiştir. Bugün enzimler ekmek, bira, peynir vb. gıdalar ile çeşitli deterjan ve temizlik maddelerinin üretiminde yaygın bir şekilde kullanıldığı gibi, tıpta teşhis ve tedavide önemli roller oynamaktadır. Enzimlerin ayrıca kimya endüstrisinde ve biyolojik savaşta da kullanım alanı bulunmaktadır (**Bailey ve Ollis, 1997**).

Endüstrinin hemen hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bunun nedeni mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olmaları, istenmeyen yan ürünleri oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, düzenli ve fazla miktarlarda elde edilebilmeleridir. Yüksek yapılı bitkiler, vakuollerinde artık ürünler olarak bir nevi enzim inhibitörleri veya toksik yapılı maddeler depoladıkları ve bitkilerden enzim elde edilmesi sırasında bunlar da preparata karıştıkları için bitkisel enzimler endüstri ve klinikte enzim kaynağı olarak tercih edilmemektedir (**Wiseman, 1987**).

Enzimler katalizör olarak aşağıdaki özellikleri gösterirler;

- ❖ Dar sıcaklık (genellikle 20-40 °C) ve pH aralıklarında ılımlı koşullar altında kullanılırlar,
- ❖ Seçimlilikleri az ya da çok olarak değişebilmesine karşın, katalizlenen tepkimelerde stereoseçimli, substrat için yüksek seçimli olabilirler.
- ❖ Katalitik aktiviteleri, var olan substratlar, ürünler ve diğer bileşenlerin derişimleri ile önemli ölçüde etkilenebilir.

Üretim süresinin uzun olması, kararsız olmaları, yüksek fiyat, substrat seçimlilikleri, enzimlerin sentetik kimyada katalizör olarak kullanımlarında en önemli sorunlardır. Bununla birlikte, yeni endüstriyel gereksinimler, kimya ve biyolojideki yeni gelişmeler ile bu anlayış değişmektedir. Bunun farklı nedenleri vardır:

- ❖ Çeşitli enzimatik tepkimeler, doğal ya da doğal olmayan substratların stereoseçimli olarak ürünlere dönüştüğünü göstermektedir.
- ❖ Hem enzim tutuklanması ve kararlılığı için hem de proses ölçeklerinin büyütülmesi için yeni teknikler geliştirilmektedir.
- ❖ Rekombinant DNA teknolojisi, enzimlerin düşük maliyetle üretilmesi ve istenen özelliklere sahip enzim üretimine olanak sağlamaktadır.

Enzimleri kullanarak çok sayıda organik reaksiyon, örneğin kiral ara ürünlerin, şekerlerin, nükleotidlerin ve ilgili bileşenlerin dönüşümü; amino asitler, şekerler ve şeker fosfatları gibi fizyolojik aktif bileşenlerin sentezi; peptidlerin ve proteinlerin dönüşümü ve içinde klasik kimya yöntemlerinin de kullanılmak zorunda oldukları diğer dönüşümler gerçekleştirilebilir.

Günümüzde var olduğu tahmin edilen 25.000 enzimden yaklaşık olarak 4.000 tanesi Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (TUBMB) tarafından sınıflandırılmıştır. Çoğunluğu hidrolazlar, transferazlar ve oksidoredüktazlar olmak üzere yaklaşık 400 tanesi araştırmalar için ticari olarak üretilmektedir. Enzimler arasında hidrolazlar, endüstriyel alanda sıkça başvurulan ve kullanılan enzim sınıfıdır (**Kapucu, 2003**).

1.1. Enzim Üretimi

Enzimler hayvansal kaynaklar, bitkisel kaynaklar veya mikroorganizmalardan elde edilirler. Enzimler türlerine göre canlıların belirli hücrelerinde daha fazla bulunabildiği gibi yine türüne bağlı olarak hücrelerin belirgin kısımları da belirli enzimlerce zengindir. Enzimler hücrelerde çalıştıkları ortama göre hücre içi (intraseküller) ve hücre dışı (ekstraseküller) olmak üzere ikiye ayrılır;

- ❖ **Hücre dışı (ekstraseküller) enzimler:** Hücreler tarafından hücre dışına salgılanan enzimlerdir. Elde edilişleri kolay olduğundan endüstride kullanım alanları daha yaygındır.

❖ **Hücre içi (intraseküler) enzimler:** Hücre yapılarına sıkıca bağı olan ve dışarıya salgılanmayan enzimlerdir. Elde edilmeleri ve saflaştırılmaları için öncelikle hücre zarının parçalanması gerekmektedir (**Telefoncu, 1996**).

1.2. Biyoteknoloji

Biyoteknoloji, canlı hücrelerden (mikroorganizmalar, bitki ve hayvan hücrelerinden veya dokuları) elde edilen enzimler veya organeller tarafından gerçekleştirilen biyolojik reaksiyonlar ile uğraşır.

Biyoteknolojinin çalışma alanlarını dünyanın temel problemleri oluşturur. Örneğin; protein üretimi ve insan beslenmesinin garantiye alınması, hammadde ve enerji stoklarının daha verimli değerlendirilmesi, insan ve hayvan sağlığını koruyucu bileşiklerin üretilmesi, bitkilerin biyoteknolojik korunması, bulaşıcı ve salgın hastalıklar ile savaş, atık su arıtılması, çevre korunması ve atıkların yeniden değerlendirilmesi gibi.

Biyoteknolojik uygulamalarda çoğu kez çevreye zarar vermeyen teknikler kullanılır, enerji ihtiyacı azdır, yüksek basınç gerektirmez ve oda sıcaklığında veya daha düşük sıcaklıklarda reaksiyonlar gerçekleştirilir (**Telefoncu, 1996**).

1.2.1. Enzimlerin Biyoteknolojide Kullanımı

Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeni ile 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 yaygınlaşmıştır (**Kıran ve Çömlekçioğlu, 2003**).

1.2.2. Biyoteknolojide Mikroorganizmaların Daha Fazla Tercih Edilmelerinin

Nedenleri

- Yüksek düzeyde protein ihtiva ederler.
- Bitki ve hayvanlardan daha kolay ve hızlı çoğalırlar.
- Belirli bir miktar gıda üretimi için, başka kaynaklardan daha az alan isterler ve daha ucuza üretilebilirler

- Kontrol edilebilen şartlarda, fermantasyon reaktörü içinde sürekli kültür halinde üretilebildiğinden, üretimleri çevre ve iklim şartlarından etkilenmez (**Horikoshi, 1996; Beyatlı, 1996**).

1.3. α - Amilaz

Amilazlar nişasta moleküllerini hidrolizleyen enzimlerdir. Bu enzimler kağıt, tekstil, yiyecek endüstrisinde vb. endüstrilerde biyoteknolojik anlamda çok büyük öneme sahiptirler. Amilazlar mikroorganizmalar, bitkiler ve hayvanlardan elde edilmesine rağmen mikrobiyal enzimler genellikle yiyecek endüstrisinde ön sıraları almaktadır. Mikrobiyal amilazların büyük bir kısmı bugün ticari alanda kullanılmakta ve bu enzimler endüstriyel işlemlerle işlenen nişastayı kimyasal olarak hidrolizlerler (**Gupta ve ark., 2003, Windish ve ark., 1965, Pandey ve ark., 2000**).

Amilazlar (α -(1-4)-D-glukan, 4-glukan hidrolaz; EC 3.2.1.1.) doğada birçok organizma tarafından yaygın olarak sentezlenirler. Ticari olarak bakterilerden (*Bacillus subtilis*, *Bacillus diastaticus* gibi) ve mantarlardan (*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* gibi) üretilirler. Nişastadaki α -(1-4) glikozidik bağlarını hidrolizleyerek nişastayı daha küçük moleküllü ürünlere dönüştürürler (**Tauber, 1949; Wang, 1999**). Amilazların bir kısmı α -(1-6) bağlarına atak yapabilir fakat verimleri çok azdır (**Vihinen ve ark., 1989**). Bakteriyel kaynaklı α -amilazlar hidroliz ürünü olarak dekstrin oluştururlar ve sıvılaştırıcı enzim olarak isimlendirilirler. Fungal α -amilazlar ise tatlandırıcı enzimler olarak isimlendirilir ve hidroliz ürünü olarak disakkarid olan maltozu oluştururlar (**Tauber, 1949; Wang, 1999**).

1.4. Pullulanaz

Pullulanı hidroliz eden bu enzimler α -amilaz ailesi olarak da bilinirler (**Matzke ve ark., 2000**). Bu enzimlerin aynı genel özelliklere sahip olduğu bulunmuş ve substrat bağlanma bölgelerinin amilazlarla aynı olduğu gözlenmiştir. Buna ilaveten pullulanazın katalitik bölgesinde Asp ve Glu aminoasitlerinin katalitik aktiviteden sorumlu olduğu belirtilmiştir (**Kuriki ve Imanaka, 1999**). Asp-206, His-210 ve His-296'nın ise substrat bağlanma bölgesinde önemli olduğu bulunmuştur (**Kuriki ve Imanaka, 1991**). Pullulana ilaveten, pullulanı hidroliz eden enzimlerin diğer bazı polisakkaritleri de hidroliz ettiği

biyokimyasal çalışmalarla belirtilmiştir. Ancak substratın enzimatik hidroliziyle oluşan ürünlerin farklı olduğu belirtilmiştir.

Pullulanı hidroliz eden enzimlerin çeşitliliği, karbohidratların hidroliz mekanizması ve son ürünün farklılığı besin, kimya ve ilaç endüstrisinde büyük bir önem taşımaktadır (**Doman-Pytka ve Bardowski, 2004**).

Pullulanaz grubu enzimler kendi içinde çeşitlilik göstermektedir:

1.4.1. Tip I Pullulanazlar

Bu pullulanaz grubu gerçek pullulanazlar olarak bilinir. Pullulanaz ilk defa Wallenfels ve ark. (1966) tarafından *Aerobacter aerogenes*'ten elde edilmiştir. Tip I pullulanaz pullulanda α -(1-6)-D- glikozidik bağları hidrolizler. Bu enzimler suda çok çözünen, dallanmış siklodextrinlerin oluşumunu sağlar (**Saha ve Zeikus, 1989**). Bu grup enzimler sadece pullulanı değil nişastalı başka molekülleri de hidrolizler.

Tip I pullulanaz grubu enzimlerin, hem hücre içi hem de hücre dışı salgılanan enzim olabileceği belirtilmiştir (**Smith ve Salyers, 1989; Takizawa ve Murooka, 1985; Anderson, 1995**). Bu enzimler pH: 3.0-11.0 gibi geniş bir pH aralığında çalışırlar, endüstriyel substratlar olan maltoz, amiloz ve glikozun üretiminde kullanılırlar.

Tip I pullulanazların aynı zamanda fermantasyon esnasında buğdaya fungal amilaz veya glukoamilazla birlikte katılması sonucu düşük kalorili biralar elde edilir (**Saha ve Zeikus, 1989**).

1.4.2. Tip II Pullulanazlar-Amilopullulanazlar

Amilopullulanazlar (A_{paz}) tip II pullulanazlar olarak tanınırlar. Enzim muhtemelen Tip II pullulanaz özelliği göstermektedir. Çünkü hem nişasta hem de pullulan için yüksek aktivite göstermektedir. Amilopullulanazlar eşsiz biyokimyasal özelliklere sahiptirler. Çünkü bu enzimler nişasta vb. polisakkaritlerde hem α -(1-4) hemde α -(1-6) glikozidik bağları kırıldığından dolayı hem amilaz hem de pullulanaz aktivitesi gösterirler (**Ganghofner ve ark., 1998**).

A_{paz} bazı termofilik, ekstrem termofilik ve mezofilik bakterilerde bulunmuştur. Bu bakterilerin salgıladığı amilopullulanaz enzimi pullulanda, glikojende ve amilopektindeki α -(1-6) glikozidik bağları hidrolizlediği gibi nişasta, amiloz, amilopektin ve glikojende

α -(1-4) glikozidik bağlarını da hidrolizlemektedir. Hidroliz ürünü olarak glukoz, maltoz ve maltotiroz gibi küçük şekerler oluşur (**Bertolido ve Antranikian, 2002**).

Amilopullulanazların amilaz ve pullulanaz aktivitesinin aynı veya birbirine yakın pH ve sıcaklık aralıklarında olduğu belirtilmiştir. Bu grup enzimler pH: 5.0-9.6 gibi pH aralıklarında ve 50-105 °C gibi sıcaklık aralıklarında maksimum aktivite gösterirler (**Doman-Ptyka ve Bardowski, 2004**).

1.4.3. Neopullulanazlar

Neopullulanaz, pullulan 4-D-glukanohidrolaz (EC. 3.2.1.135) pullulanı panoza (6- α -D-glukozilmaltoz) hidrolizler (**Webb, 1992**). Neopullulanazın biyokimyası biraz ilginç olup, bu grup enzimler sadece α -(1-4)-glikozidik bağları hidrolizlemeyle kalmayıp, bazen dallanmış oligosakkaritlerde α -(1-6)-glikozidik bağları da hidrolizleyebilmektedir. Her glikozidik bağın hidrolizine neopullulanazın sadece bir aktif merkezinin katıldığı bildirilmiştir (**Kuriki ve ark. , 1991**).

Alkali ortamda aktivite gösteren neopullulanazlar özellikle çamaşır ve bulaşık detejanlarına temizleyici katkı maddesi olarak katılırlar (**Yamashita ve ark., 1997**). Buna ilaveten pullulanın degradasyonu sonucu oluşan panoz fazla tatlı olmayıp, ağız bakterileri tarafından fermente olmaz ve sukrozdan insolubl glukanın sentezini inhibe eder. Bundan dolayı panoz, dişlerin korunmasında da kullanılabilir (**Doman-Ptyka ve Bardowski, 2004**).

1.4.4. İzopullulanazlar

İzopullulanazlar (EC. 3.2.1.57) pullulan 4-glukanohidrolazlar olarak bilinirler. Bu enzimler pullulanda α -(1-4)-D-glikozidik bağları hidrolizleyerek izopanoz (6- α -maltozilglikoz) oluştururlar ve nişastayı hidrolizleyemezler Diğer bir özellikleri, bu grup pullulanazlar bakterilerde bulunmayıp sadece mantarlarda bulunurlar (*Aspergillus niger* ATCC 9642 gibi) (**Webb, 1992**).

1.4.5. Tip III pullulanazlar

Bu grup enzimler pullulanda α -(1-6) ve α -(1-4) glikozidik bağlara etki eder. Ancak hidroliz ürünü olarak maltotrioz, panoz ve maltoz oluşur. Aynı zamanda nişasta, amiloz ve

amilopektini hidrolizi sonucu başlıca ürün olarak maltoz ve maltotrioz verir (**Niehaus ve ark., 2000; Bertoldo ve Antranikian, 2002**). Tip III pullulanaz hidrolazların katalitik bölgesinde üç asidik amino asit artığı olarak iki Asp ve bir Glu artığı bulunur. Tip III pullulanaz hidrolaz hipertermofilik archea olan *Thermococcus aggregans* tarafından salgılanır (**Niehaus ve ark., 2000**).

1.5. Amilaz ve Pullulanaz Enzimlerinin Genel Özellikleri ve Kullanım Alanları

Amiloz, amilopektin, pullulan, glikojen ve maltooligosakkaridlerdeki α -(1-4), α -(1-6) glikozidik bağlarını hidrolizleyen geniş bir ailedirler.

Önemli bir polisakkarit olan nişastayı parçalarlar (**Yüceer, 2000**). Bir kısım mantar, maya, bakteri ve aktinomiçesler α -amilaz salgırlar. Bakteriyel ve mantar kaynaklı enzimler için endüstri sektörlerinde ağırlıklı bunlara başvurulur (**Pandey ve ark. 2000**).

Yüksek sıcaklığa dayanıklı α -amilazlar daha çok *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis* ve *B. amyloliquifaciens* gibi mikroorganizmalar tarafından salgılanmaktadır (**Bessler ve ark., 2003**).

1.5.1. α -Amilazların Ekmekçilikte Kullanımı

Ekmekçilikte çeşitli enzimler, yüzyıllardan beri yüksek kaliteli ürünlerin üretimi için kullanılmaktadır. Günümüzde proteaz, lipaz, ksilanaz, pullulanaz, selülaz, glukooksidaz, gibi enzim çeşitleri ekmek sanayiinde çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır.

Ekmekçilikte kullanılan enzimlerin büyük bir bölümü bakteriyel ve fungal kökenlidir.

Ekmekçilikte amilazların kullanılması:

- Fermantasyonun uyarılmasını,
- Hamurun viskozitesinin düşürülmesini,
- Ekmek hacminin artmasını,
- Ekmeğin iç yapısının düzgün görünümlü olmasını,
- Ekmek kabuğunun iyi renk almasını,
- Ekmeğin daha kaliteli kızarmasını,
- Ekmeğin bayatlamasının geciktirilmesini sağlar (**Gupta ve ark., 2003; Dağışan,1997**).

1.5.2. α -Amilazların ve Pullulanazların Nişastanın Şekerlendirilmesinde Kullanılması

Nişasta moleküllerinin amilaz ve pullulanaz enzimleri tarafından hidrolizi sonucu indirgen şekerler oluşur.

Bu şekerler arasında glukoz, maltoz ve maltotrioz, bulunmaktadır. Sıvı haldeki bu ürün, glukoz şurubu olarak da adlandırılmaktadır.

Nişastanın hidrolizi sonucu elde edilen glukoz şurubu, daha sonra glukoz izomeraz enzimi ile fruktoza dönüştürülebilmekte ve ürün olarak da fruktoz şurubu elde edilmektedir. Tat açısından fruktoz daha etkili olduğu için çeşitli gıda maddelerinde tatlandırıcı olarak fruktoz şurubu tercih edilmektedir (**Kıran ve Çömlekçioğlu, 2003; Gupta ve ark., 2003; Dağışan,1997; Telefoncu, 1996**).

1.5.3. α -Amilazların ve Pullulanazların Tekstil Endüstrisinde Kullanımı

B. subtilis ve *B. amyloliquefaciens* suşlarından derin fermantasyon yöntemi ile üretilen bu enzimlerin diğer bir özelliği çirilenmiş nişastayı oldukça kısa sürede parçalamalarıdır. Bu özelliklerinden dolayı yaklaşık 70-80 yıldır pamuklu dokuma sanayinde haşıl sökücü olarak kullanılmaktadırlar. Pamuklu ipliklerin dokuma işlemi sırasında torozlanarak kopmalarını önlemek için iplikler nişasta esaslı bir haşıl banyosundan geçirilip kurutulularak sağlamaştırılır.

Dokuma işleminden sonra ham bezi diğer işlemlere hazırlamak için bu nişasta kolasının alınması gerekmektedir. Haşıl sökme denilen bu işlem, beze zarar vermeden en kolay şekilde amilaz ve pullulanaz enzimleri kullanılarak yapılmaktadır (**Batum,1997**).

1.5.4. α -Amilazların ve Pullulanazların Deterjan Endüstrisinde Kullanımı

α - Amilazlar ve pullulanazlar nişasta içeren (örneğin patates, makarna, çikolata gibi) kir ve lekelerin temizlenmesine yardımcı olmaktadır.

Diğer taraftan bulaşık makineleri deterjanlarına amilaz ve pullulanaz katılarak nişasta içeren kurumuş yemek artıklarının çözünmesi sağlanabilmektedir (**Gupta ve ark.,2003; Batum,1997**). Beyazlatıcı olarak kullanılan deterjanlarda amilaz enzimi

oksidasyon sonucu stabilitesini kaybetmektedir. Bunu önlemek için son zamanlarda bilim adamları, gen mühendisliğinde oksidasyona duyarlı amino asitlerin yerini oksidasyona dayanıklı amino asitlerle değiştirerek enzimin stabilitesinin artmasını sağlamışlardır. *B. licheniformis* tarafından sağlanan α -amilazın 197. pozisyonunda bulunan metionin amino asidinin lösin amino asidi ile yer değiştirmesiyle enzimin oksidasyona dayanıklı olması sağlanmıştır (Gupta ve ark., 2003).

1.5.5. α -Amilazların ve Pullulanazların Kağıt Endüstrisinde Kullanımı

Kağıt endüstrisinde kağıdın işlenmesi için kağıt hamurunun nişastayla kirlenmesi gerekmektedir. Bu işlem kağıdın kalitesini artırır, kağıda sertlik ve dayanıklılık kazandırır, kağıdın güzel tabakalanmasını ve daha iyi silinebilirliğini sağlar.

Doğal nişastaların viskoziteleri kağıt kirlenmesi için çok fazladır. Bu nişastalar pullulanaz ve amilaz enzimleri kullanılarak ortamdaki uzaklaştırılır (Gupta ve ark., 2003).

1.6. Nişasta

Nişasta glukoz ünitelerinin C₁ oksijeniyle diğer glukoz ünitesine glikozidik bağla bağlandığı bilinen bir polimerdir. Nişasta iki tip molekülü içeren bir polimoleküldür.

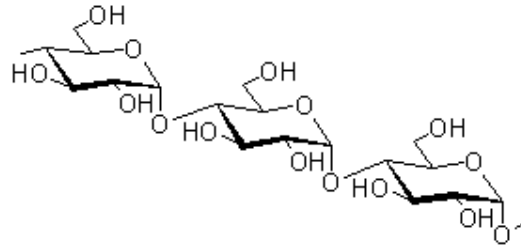
1)-Amiloz

2)-Amilopektin

Amiloz;

Amiloz, glukoz monomer birimlerinin α -(1-4) bağlantılarıyla ucuca eklenmesinden oluşur. Amiloz lineer bir moleküldür, ancak birbirini izleyen glukoz birimlerinin açılı olma eğiliminden dolayı bir sarmal oluşturur.

İki amiloz molekülü birbirine sarılarak bir çift sarmal da oluşturabilirler. Bu sarmalın iç yüzeyi hidrofobik olduğu için, içinde yer alan su molekülleri kolaylıkla daha hidrofobik moleküllerle yer değiştirebilir.



Şekil 1.1. Amilozun Genel Yapısı

Nişasta testinde kullanılan iyot molekülleri amiloz sarmallarının içine dizilince mavi bir renk oluşur. Amiloz sarmalları arasında oluşan hidrojen bağları yüzünden içinde çok az su barındıran yoğun bir yapı oluşur.

Amilopektin;

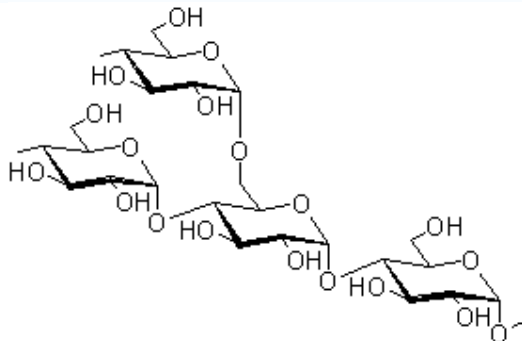
Amilozdan farklı olarak amilopektinde dallanma vardır, ama her 24-30 glukoz monomerinden birinde α -(1-6) bağlantısı ile bir yan zincir başlar. Amilopektinde dallanma noktalarından sonra birbirine paralel iki zincir birbirine sarılarak bir çift sarmal oluşturur. Amilopektin, bir çalı gibi, bir merkezden dallandıkça genişleyen bir şekle sahiptir.

Dallanmakta noktalarında molekül düzensizdir, iki dallanma noktası arasında ise çift sarmallar düzgün bir şekilde istiflenerek kristal bir yapı oluştururlar; bu yüzden mikroskopta nişasta taneciklerinde bu düzenli ve düzensiz bölgeler büyüme halkaları gibi görünür.

Bu moleküler yapısından dolayı amilopektin, nişasta taneleri olarak depolanmasını sağlayan sarmal şekilli olur. Hem amilopektin hem de amiloz glukozun polimerleridir, ve tipik bir amiloz polimeri 500-20.000 glukoz molekülünden, bir amilopektin molekülü ise yaklaşık bir milyon glukozdan oluşur.

Farklı bitki türlerinde, hatta aynı türün farklı anaçlarında (*cultivar*) amilozun amilopektine oranı değişir. Örneğin yüksek amilozlu mısır nişastasında % 85 oranında amiloz bulunurken, mumlu mısır türünde amilopektin oranı %99'dır.

Amilopektin sarmalları çoğu tahıl nişastasında sıkı bir şekilde istiflenmişken (A-tipi nişasta), patates ve muz gibi bazı bitkilerde daha aralıklı istiflenirler (B-tipi nişasta). Bitkilerde nişasta çok az su içeren tanecikler halinde depolanır, bu taneciklerin boyutları bitkiden bitkiye değişir.



Şekil 1.2. Amilopektinin Genel Yapısı

Nişasta suda çözünmez. Sindirilmesi hidroliz yoluyla olur, bu reaksiyonu katalizleyen amilaz enzimleri glukozlar arasındaki bağları keserler. Hayvan ve insanlar amilaz enzimlerine sahip olduklarından nişastayı sindirebilirler. Aynı zamanda yakıldığında enerji elde edilen moleküllerdir (**Marc ve ark., 2002**).

Farklı türdeki enzimlerin nişastanın hem sentezinde hem de hidrolizinde ilişkisi bulunmaktadır. Nişastanın yıkımı için temel olarak dört grup bulunmaktadır.

- 1)-Endo amilazlar
- 2)-Ekzo amilazlar
- 3)- Transferazlar
- 4)- Dallanmamış (debranching) enzimler

Endo amilazlar, amilopektin veya amilozlardaki şeker ünitelerini α -(1-4) glikozidik bağlarından kırarlar. Endo amilazlara en güzel örnek olarak α -amilaz verilebilir (**Pandey ve ark., 2000**).

İkinci enzim grubu olan ekzo amilazlar ise α -glukozidaz, glukozamilaz ve amiloglukozidaz gibi enzimler hem α -(1-4) hem de α -(1-6) glikozidik bağları kırar. β -amilaz gibi enzimler yalnızca β -(1-4) bağlarını kırar. Ekzo amilazların nişasta üzerinde etkisi sonucu yani nişastadaki hem amiloz hem de amilopektini hidrolizleyerek dextrin , maltoz veya yalnızca glukozu meydana getirirler (**Pandey ve ark. 2000**).

Diğer grup olan transferazlar ise yapısında bulunan amino asitler glikozidik bağa donör bir glikozidik akseptör olarak etkiyip donör molekül olan α -(1-4) bağını kırar. Bu gruba örnek olarak amilomaltaz ve siklodekstrin glukotransferaz verilebilir (**Takaha ve ark., 1999**).

Son enzim grubu olan dallanmamış (debranching) enzimlerde örnek olarak izoamilazlar ve pullulanazlar grubu enzimler verilebilir (**Takata ve ark. 1992**).

1.7. α -Amilazlar (α -(1-4) glukozidaz, EC 3.2.1.1) ve Etki Mekanizmaları

α -Amilazlar nişasta molekülündeki amiloz zincirlerinin α -(1-4) glikozidik bağlarına gelişi güzel saldırırlar (**Windish ve Mhatre, 1965**). İlk saldırının helezonlar arasına düşen α -(1-4) glikozidik bağlar olduğu kabul edilmektedir.

Böylece zincir daha küçük kısımlara ayrılır ve bu kısalmış parçalar yeniden enzimin etkisine uğrarlar (**Yenson, 1981**).

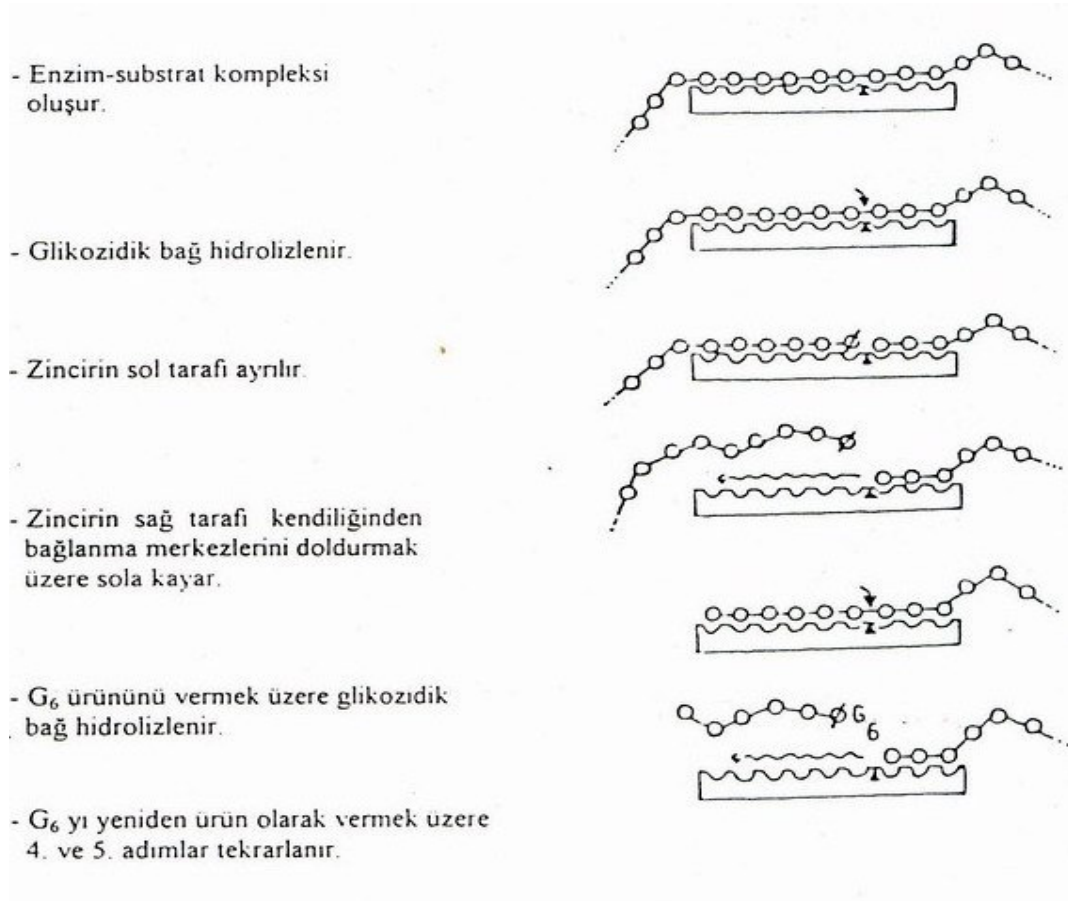
Nişastanın hidrolizi sonucunda ortaya çıkan ürünler α -optik konformasyonu gösterdiğinden bu enzimler α -amilazlar adını almıştır. Bu enzimler substratlarının i kısımlarındaki α -(1-4) bağlarına atak yaptıkları için bunlara endoamilazlar da denir (**Windish ve Mhatre, 1965**).

1963 yılına kadar, α -amilazın nişastayı rastgele hidrolizleyip, glukoz moleküllerine dönüştürdüğü düşünülürken, *B. subtilis* α -amilazlarının, amiloz üzerine etkisini konu alan bir çalışmada, maltotrioz (G3) ve maltoheksoz (G6)'un baskın olduğu bir karışımın ele geçtiği ortaya konmuştur (**Robyt, 1989**). Böylece α -amilazın nişasta üzerine etkisinin rastgele olmadığı ortaya konmuştur.

Bu mekanizmaya göre α -amilaz üzerinde 9 glukoz kalıntısının bağlanabileceği bağlanma merkezleri bulunur. α -(1-4) bağını hidrolizleyen aktif merkezin, 3-4 nolu glikoz kalıntılarının bağlandığı bağlanma merkezleri üzerinde kaldığı düşünülmektedir.

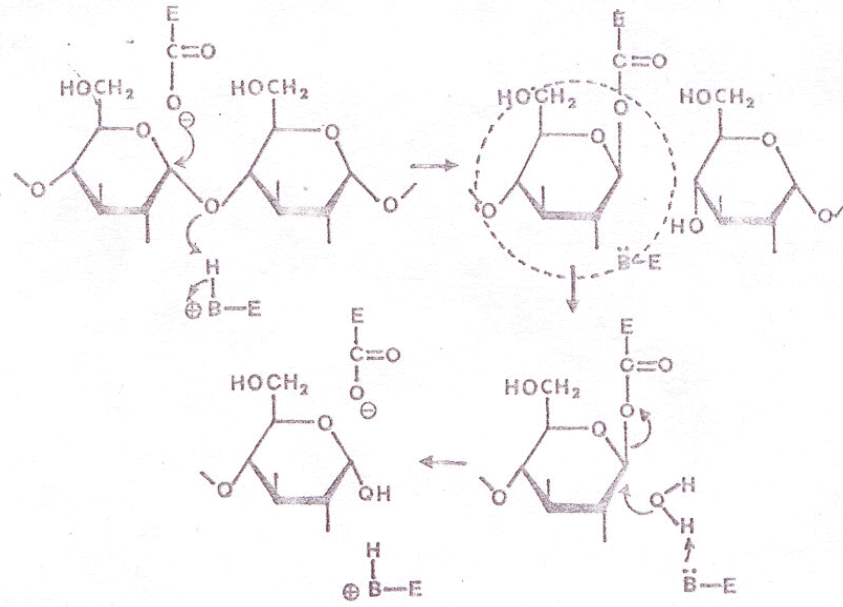
Buna göre, hidroliz işleminden sonra soldaki grup enzim üzerinden ayrılırsa, boşalan bağlanma merkezlerini doldurmak üzere, nişasta zinciri kendiliğinden sola doğru hareket eder, ürün olarak G6 oluşur. Hidrolizden sonra, zincirin sağ tarafı ayrılırsa, nişasta zinciri, boşalan bağlanma merkezlerini doldurmak üzere sağa doğru kayar ve ürün olarak G3 meydana gelir. Amilopektinden ise, benzer mekanizma ile maltoz (G1), maltodioz (G2), maltotrioz (G3), maltoheksoz (G6) meydana gelir (**Robyt, 1989**).

Etki mekanizması aşağıda grlmektedir:



Şekil.1.3. α -Amilazlar (α -(1-4) glukozidaz, EC 3.2.1.1) ve Etki Mekanizmaları

Robyt (1989) PPA (Porcine Pancreatic Amylase)'nın etki mekanizmasını, soğuk çözücü içerisinde 1-[¹³C] ile zenginleştirilmiş maltotetroz substratını kullanarak ¹³C-NMR ile ortaya çıkardı. Bu teknikler, β -karboksil asetal ester mevcudiyetini ortaya çıkardı. Bu da, α -(1-4) glikozidik bağının hidroliz mekanizmasında görev alan glikozil bir enzimin işlev gördüğünün kanıtıdır. Burada PPA için çifte bir kovalent bağ yer değişimi söz konusudur. Bu, enzimin aktif merkezinde bir karboksilat grubu, β -karboksil asetal vermek üzere α -(1-4) glikozidik bağının C-1 karbonuna atak yapar. Bu da hemiasetal hidroksil grubu için bir α -konfigürasyonuna sahip bir ürün vermek üzere su tarafından hidrolizlenir (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Kovalent Bağ İçeren α -(1-4) Glikozidik Bağın Hidrolizi Sonucu Çifte Yer Değişim Mekanizması

Bu kovalent mekanizmanın sadece PPA için gösterilmesine rağmen α -amilazların katalitik gruplarını içeren yapısal özelliklerinin korunması, hidroliz mekanizmasının farklı α -amilazlar için de benzer olduğunu desteklemektedir.

1.8. Pullulan

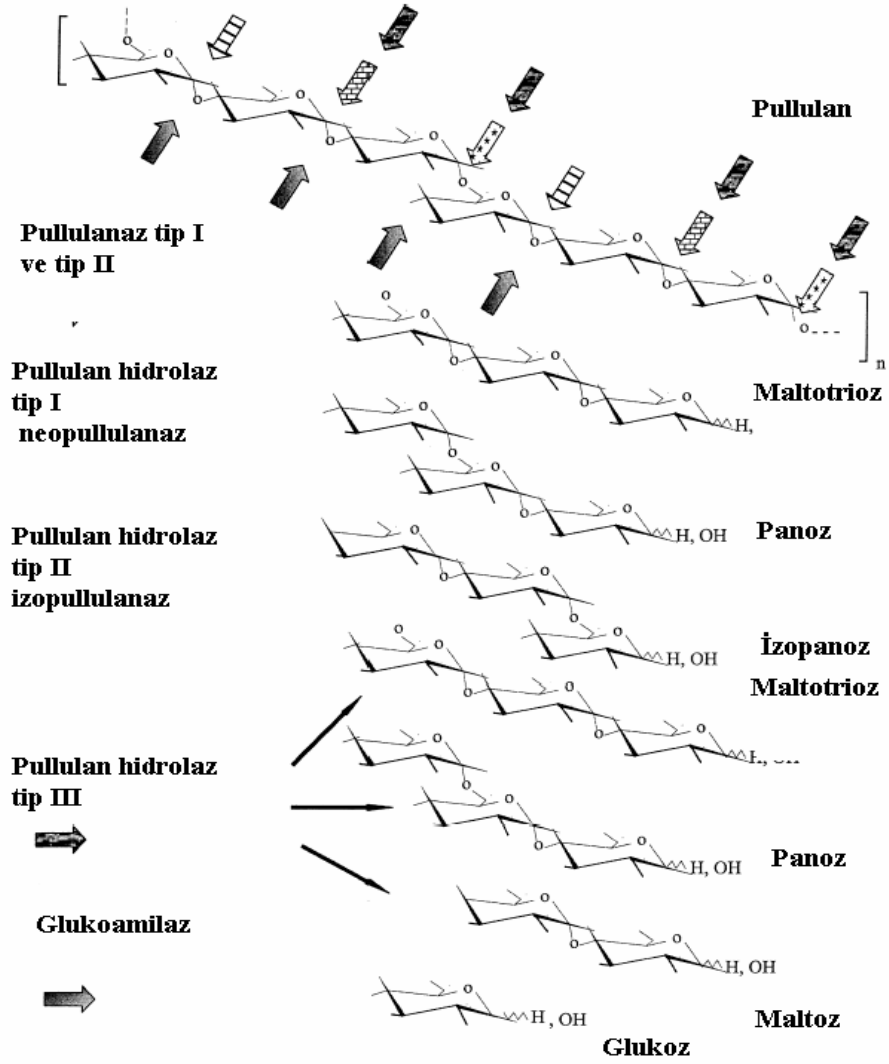
Pullulan, bir mantar olan *Aureobasidium pullulans* tarafından glukoz veya sukroz içeren besiyerinde sentezlenen bir polisakkarittir. *A. pullulans*' in bir çok türü bu polisakkaridi bol miktarda üretir.

Pullulan suda çözünen nötral bir glukan olup, lineer D-glukopiranozil birimleri içerir. Yapıda düzenli olarak bir α -(1-6)-D ve iki α -(1-4)-D bağlanmaları mevcuttur.

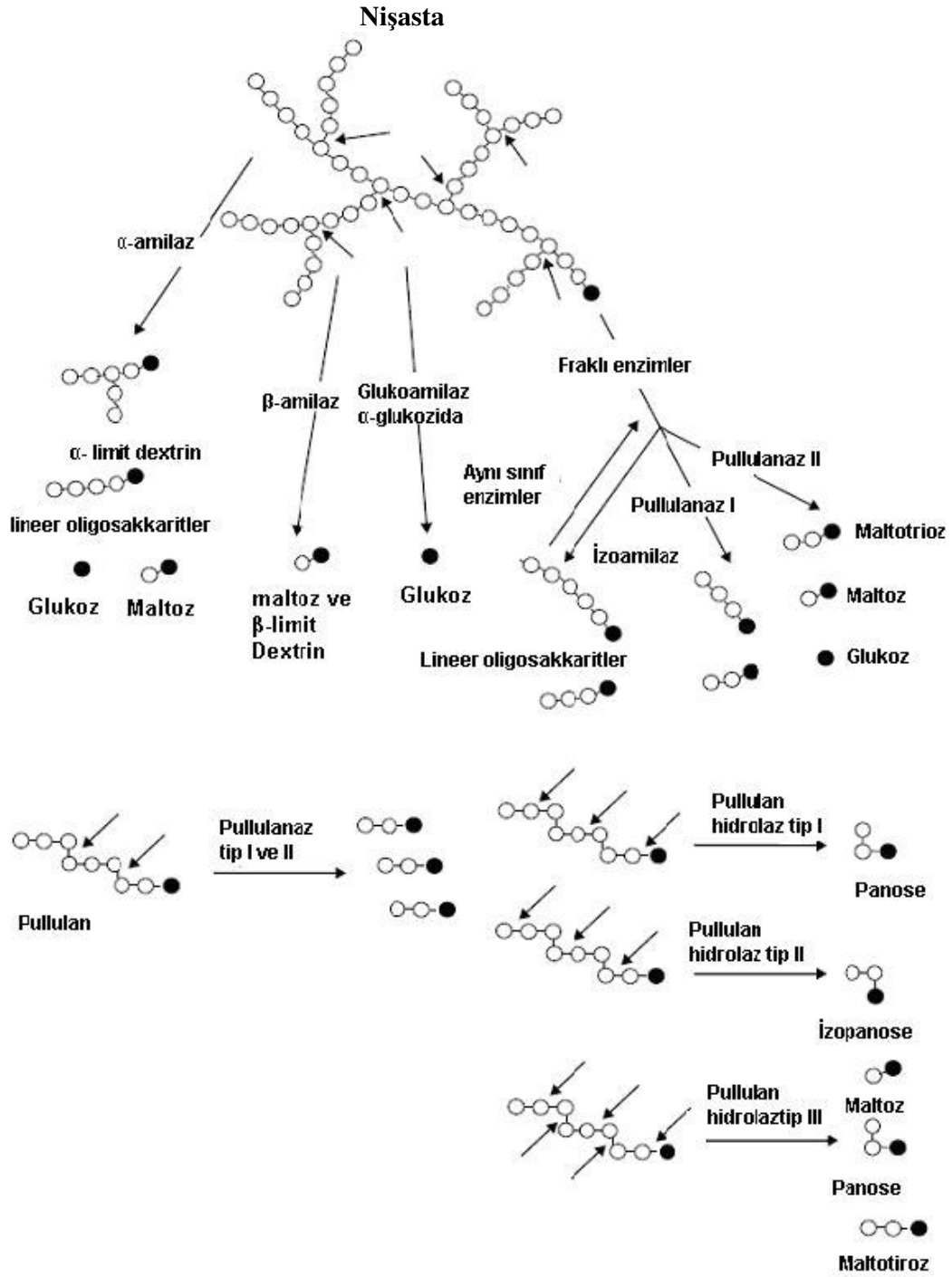
Pullulan molekülü nötral olup molekül ağırlığı 1.500-810.000 kDa arasında değişmektedir. Pullulan hem α -(1-6)-D hem de α -(1-4)-D- pullulanaz tarafından enzimatik olarak hidrolizlenir.

α -(1-6)-D-pullulanaz spesifik olarak α -(1-6)-D-glikopiranozid bağlarını kırar ve α -(1-4)-D-bağlarına etki etmez. α -(1-6)-D-pullulanaz tarafından pullulanın tamamen hidrolizi başlıca ürün olarak maltotrioz verir.

α -(1-4)-D- pullulanaz tarafından pullulanın hidrolizi başlıca ürün olarak izopanoz verir (**Doman-Pytka ve Bardowski, 2004**).



Şekil 1.5. Pullulanazın Pullulan Üzerine Etki Mekanizması



Şekil 1.6. α -Amilaz ve Pullulanazın Nişasta Üzerine Etkisi

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Ramachandra ve ark. (2004), COC (Coconu oil cake) substrat olarak kullanılarak *Aspergillus oryzae* tarafından α -amilaz üretimini rapor etmişlerdir. En yüksek enzim aktivitesini 30 °C 'de 72. saatte bulmuşlardır. Yine bu çalışmada, ortama % 2 oranında karbon kaynakları eklenmiş, nişasta ve glukozun kontrolden yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte maltozda enzim aktivitesinde düşme olduğu görülmüş ve sukrozun enzim aktivitesinde hiçbir etkisi olmadığı rapor edilmiştir. Eklenen %1'lik konsantrasyondaki azot kaynaklarından en yüksek artış peptonda görülmüş, en düşük enzim aktivitesi sodyum nitratta gözlemlenmiştir.

Amoozegar ve ark. (2003), nişasta'yı substrat olarak kullanarak *Halobacillus* sp. mikroorganizması tarafından α -amilaz üretimini incelemişlerdir. En yüksek enzim aktivitesinin 30 °C 'de 72. saatte olduğunu bulmuşlardır. Bu çalışmada da ortama % 0.5 oranında karbon kaynakları eklenmiş, enzim üzerine dekstrin ve nişastanın olumlu etkisi olduğunu göstermişlerdir. Burada glukoz'un enzim üretimi üzerine anlamlı bir etkisi olmadığını gözlemişlerdir.

Gomes ve ark. (2003), termofilik bakteri olan *Rhodothermus marinus* tarafından yüksek ısıya duyarlı α -amilaz ve pullulanaz üretimini rapor etmişlerdir. En yüksek enzim aktiviteleri pullulanaz için 75 °C'de 36. saatte, amilaz için ise 85 °C'de 45. saatte elde etmişlerdir. Bu çalışmada da % 2'lik karbon kaynaklarından α -amilaz için nişasta, mısır nişastası ve glikojen; pullulanaz için ise pullulan, glikojen ve mısır nişastasının kontrolden yüksek aktivite gösterdiği görülmüştür. Aynı şekilde sırasıyla hem pullulanaz için hem de α -amilaz için 6.5-7 pH aralığında yüksek aktivite belirlenmiştir.

Hernandez ve ark. (2006), farklı konsantrasyonlarda nişasta kaynaklı besi yerleri kullanarak *Aspergillus niger* tarafından α -amilaz üretimini sağlamışlardır. Bu çalışmada α -amilaz için en yüksek aktivite 30 °C'de 88. saatte bulunmuştur. %2'lik karbon kaynaklarından nişasta, azot kaynaklarından ise pepton ve NH_4NO_3 ile en yüksek aktivite gözlemlenmiştir.

Nair ve ark. (2007), *Bacillus cereus* ile yaptıkları çalışmada en yüksek pullulanaz aktivitesini 30 °C 'de 18. saatte bulmuşlardır. Çalışmada, karbon kaynaklarından nişasta,

pullulan ve maltodekstrinin enzim üretimini arttırdığını belirtmişlerdir. Enzim için sıcaklık aralığını 30-80 °C olarak belirlemişlerdir.

Konsoula ve ark. (2004), organik kaynaklı farklı substratlar kullanarak *Bacillus* sp. tarafından α -amilaz üretimini sağlamışlardır. Bu çalışmada en yüksek aktivite 40 °C 'de 48.saatte belirlenmiştir. En yüksek enzim üretimi karbon kaynaklarından nişasta, azot kaynaklarından pepton ve yeast ekstrakt ile belirlenmiştir. Farklı unların etkisi incelendiğinde un kaynaklarından mısır ve buğday unlarında en yüksek enzim üretimi elde edilmiştir. Bu çalışmada enzim aktivitesi üzerine metal iyonların etkisi de incelenmiş olup, Ca^{+2} ile en yüksek aktivite tespit edilmiştir.

Ramesh ve ark. (2001), çeşitli un kaynaklarını substrat olarak kullanıp *Clostridium thermosulfurogenes* tarafından yüksek sıcaklıkta aktivite gösteren pullulanaz üretimini rapor etmişlerdir. Bu çalışmada en yüksek aktiviteyi 60 °C 'de 24. saat olarak belirlemişlerdir. Un kaynaklarından patates unu, mısır unu ve çözümlü nişastada en yüksek aktivite gözlemlenmiştir.

Pederson ve ark. (2000), *Aspergillus oryzae*'de α -amilaz üretimine inorganik azot kaynaklı sodyum nitratın diğer amonyum tuzlarına oranla daha az etkisi olduğunu tespit etmişlerdir.

Konsoula ve ark. (2004), termofolik *Bacillus subtilis* varyetesinde maksimum aktiviteyi 135 °C'de ve pH 6.5'de elde etmişlerdir. Enzim termostabilitesinin hem kalsiyum hem de nişasta varlığında arttığını göstermişlerdir. Amilaz üretiminde en yüksek aktiviteyi %0.05 nişasta içeren besi yerinde elde etmişlerdir. %0,1'lik nişasta içeren besi yerinde enzim aktivitesinde %50 azalma olduğunu tespit etmişlerdir.

Messaoud ve ark. (2004), *Bacillus subtilis* US116 tarafından üretilen α -amilazın, nişastayı parçalaması sonucu maltoheptoz ve maltohekzoz oluştuğunu belirlemişlerdir. Saflaştırılmış enzimin optimum pH' ını 6 ve optimum sıcaklığını 65 °C'de elde etmişlerdir. Çalışmacılar enzimin molekül ağırlığını 60.000 dalton olarak bulmuşlardır.

3. MATERYAL ve METOD

3.1.Kullanılan Kimyasallar

CaCl₂, MnSO₄.H₂O, MgSO₄.7H₂O, ZnCl₂, NaCl, KCl, NH₄NO₃, NH₄Cl, (NH₄)₂ HPO₄, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, CH₃COOH, Na₂CO₃, Na-K Tartarat, Na₂WO₄.2H₂O, Na₂MoO₄.2H₂O, H₃PO₄, LiSO₄, Br₂, glukoz, amiloz, pullulan, nişasta, yeast ekstrakt, nutrient-broth, ve soluble starch, Merck'ten, o-nitrofenil-β-D-galaktopiranozid, trikloroasetik asit, azo kazein, sukroz, üre, glisin, tris-hidroksimetilaminometan Sigma'dan, pepton, tryptone, beef ekstrakt, agar Difco'dan, CuCl₂.5H₂O, NaOH, HCl Riedel Haen'dan temin edildi. Buğday nişastası, pirinç nişastası, mısır nişastası, patates nişastası, buğday unu, buğday unu ve kepeği karışımı, yedi tahıl unu karışımı, darı unu, arpa unu ve pirinç unu ticari olarak temin edildi.

3.2. Kullanılan Cihazlar

Spektrofotometre	Shimadzu UV -1240
Santrifüj	Sigma Christ 2K15
Çalkalamalı su banyosu	Julabo SW 23
Etüv	EN 400 Nuve
Sterilizatör	Binder
pH metre	Metler Toledo 540-K
Elektronik terazi	Sauter, Gecavery
Vorteks	Fisons Whirli Mixer
Mikropipet	Eppendorf
Magnetik karıştırıcı	Stuart
Deep-freeze	Sanyo Medical Freezer
Otoklav	Hiclave HV-50 L Hirayama

3.3. Besiyerleri

3.3.1. Nutrient Broth Katı Besiyeri

8 gr Nutrient Broth (NB), 16 gr agar 1000 mL saf suda çözünerek otoklavlandı.

3.3.2. Sıvı Besiyeri

8 gr NB 1000 ml saf suda çözünerek otoklavlandı.

3.4. Çözünür nişasta- Beef ekstrakt (SB) Besiyeri (Basal medium)

- %2 Çözünür nişasta
- %1 Beef ekstrakt
- %0.2 Yeast ekstrakt
- %0.02 CaCl₂
- %0.01 MgSO₄.7H₂O (pH; 7.0)

Otoklavlanarak hazırlandı.

3.5. Çözeltiler

3.5.1. Tampon Çözeltiler

- pH: 4.5; 5.0; 5.5; 6.0; 6.5 50 mM Asetat Tamponu
- pH: 6.0; 6.4 50mM Fosfat Tamponu
- pH: 7.0; 7.5; 8.0 50 mM Tris-HCl Tamponu

*Tampon çözeltileri hazırlanması Ek.1 kısmında verilmiştir.

3.6. Alkalin Çözeltisi

Alkalin çözeltilinin hazırlanması Ek.2 kısmında verilmiştir.

3.7. Folin Reaktifi

Folin reaktifinin hazırlanması Ek.3 kısmında verilmiştir.

3.8. Biyolojik Materyal

Çalışmada inek sütünden izole edilen *Bacillus* sp. biyolojik materyal olarak kullanıldı. Bu amaçla 5 mL inek sütü alınıp ağzı kapalı steril bir erlen de etüvde 15 dak. 80 °C'de bekletildi. 100 µL alınıp NB agara ekilip 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı.

Katı besi yerinde üreyen bakteriden toplu iğne ucu kadar alınıp öz yardımıyla 10 mL'lik steril tuz çözeltisinde süspansiyon haline getirildi. Buradan alınan 100 µL'lik örnek 1/1000 oranında seyreltilerek besiyerinde saf koloniler elde etmek için katı besiyerine ekildi. Saf olarak alınan bir koloni çoğaltıldı ve gram boyama yapıldı.

3.8.1. Gram Boyama

Jansiyen moru (Stok çözelti: 5 gr. Jansiyen moru, 100 mL %95' lik etil alkol. Kullanma solüsyonu: 10 mL stok jansiyen moru çözeltisi, 100 mL fenollü distile su); lugol (1 gr. İyot; 2 gr KI; 300 mL distile su); sulu fuksin (Stok çözelti: 3 gr bazik fuksin, 100 mL %95' lik etilalkol. Kullanma solüsyonu 10 mL stok bazik fuksin çözeltisi, 100 mL %5 fenollü distile su), etil alkol, su.

Steril öze ile alınan bakteri örneği lam üzerinde bir damla serum fizyolojik ile yayılır. Havada kurutulur, alevde fiske edilir. Lamın üzerine jansiyen moru dökülerek 2 dakika bekletilir. Daha sonra lugol dökülerek 1/2 dakika bekletildikten sonra ardından etil alkol (1/2 dak.) dökülür, sonra da saf su ile yıkanır. Lamın üzerine son olarak sulu fuksin dökülür. 1 dakika sonra lam yıkanır ve havada kurutulur.

Bakteriler mikroskopta incelenir. Hücre duvarındaki farklılıktan kaynaklanarak G (+) bakteriler mor, G (-) bakteriler pembe görünür.

3.9. Enzim Üretimi

α -Amilaz , pullulanaz ve β -galaktozidaz üretimleri için SB besiyeri, proteaz üretimi için NB besiyeri kullanıldı. SB besi yeri 121°C'de 15 dak. otoklavlanarak steril edildi.

100 ml'lik besi yerine 150 µL taze örnek ekilerek 0.8 absorbansa karşılık gelecek şekilde 37 °C'de üretildi. Buradan alınan 150 µL'lik örnek taze SB besiyerine ekilerek 37 °C' de 150 rpm'de inkübasyona bırakıldı. Belirli sürelerde alınan örnekler 5000 rpm'de 10 dak. santrifüjlenerek hücre ve spordan arındırıldı. Enzim aktivitesi ve optimizasyon çalışmaları için üst sıvı kullanıldı.

3.10. α -Amilaz Enzim Aktivite Tayini

α -Amilaz enzim aktivite tayini Bernfeld yöntemine göre yapıldı (**Bernfeld, 1955**). 150 μ L enzim çözeltisi ve 200 μ L %1'lik nişasta çözeltisi (0.1 M fosfat tamponu pH:6.8) 37 °C'de 25 dak. inkübe edildi. Daha sonra 400 μ L 3,5-dinitro salisilik asit çözeltisi katılarak 5 dak. kaynar su banyosunda tutuldu ve oda sıcaklığına geldiğinde 8mL saf su ilave edildi. Örneklerin absorbans değerleri 489 nm'de okundu.

Bir enzim ünitesi deney koşulları altında dakikada 1 μ mol maltoza ekivalent indirgen şeker oluşumunu sağlayan enzim miktarı olarak tanımlandı.

3.11. Pullulanaz Enzim Aktivite Tayini

500 μ L %1'lik pullulan (0.1 M fosfat.tamponu pH: 6.4) ile 150 μ L enzim çözeltisi 37 °C de 20 dak.inkübasyona bırakıldı. Açığa çıkan indirgen şeker miktarı 3,5-dinitro salisilik asit kullanılarak 489 nm'de okundu (**Miller, 1959**).

Bir pullulanaz ünitesi deney koşulları altında dakikada 1 μ mol glukozu ekivalent indirgen şeker oluşumunu sağlayan enzim miktarı olarak tanımlandı.

3.12. β -Galaktozidaz Enzim Aktivite Tayini

β -Galaktozidaz aktivitesi, 0.1 M sodyum fosfat tamponu içerisinde 6 mM o-nitro fenil- β -D-galaktopiranosidin (ONPG) hidrolizi sonucu ürün olarak açığa çıkan o-nitrophenol ile tespit edildi. 500 μ L substrat çözeltisi 200 μ L enzim ile 37 °C'de 30 dak. inkübasyona bırakıldı. 30 dak. öninkübasyondan sonra reaksiyon 1 M 500 μ L sodyum karbonat çözeltisi ile durduruldu ve 420 nm'de absorbans değerleri okundu (**Giacomini ve ark., 1992**).

Bir enzim ünitesi deney koşulları altında dakikada 1 μ mol o-nitrofenol oluşumunu sağlayan enzim miktarı olarak tanımlandı.

3.13. Proteaz Enzim Aktivite Tayini

Proteaz aktivitesi substrat olarak kullanılan azokazein hidrolizi sonucu oluşan tirozin miktarı ölçülerek tayin edildi. 1000 μ L %0.5'lik azokazein (0,1 M fosfat.tamponu pH: 7) ile 250 μ L enzim çözeltisi 37 °C de 30 dak.inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 2 mL

% 10 TCA (trikloroasetik asit) ilavesiyle 0 °C'de 15 dak. bekletilip sonrada 5000 rpm'de 10 dak. santrifüjlendi. Cam tüplere 1600 µL süpernatant alınıp 400 µL 1.8 N NaOH ilave edilerek 489 nm'de absorbans değerleri okundu (**Leighton ve ark., 1973**).

Bir enzim ünitesi deney koşulları altında dakikada 1 µmol tirozin oluşumunu sağlayan enzim miktarı olarak tanımlandı.

3.14. Standart Eğrinin Hazırlanması

Standart olarak amilaz için maltoz pullulanaz için glukoz eğrisi kullanıldı. Standart eğriyi çizmek için derişimi bilinen (5 mg/ml) maltoz ve glukoz 'dan bir seri standart çözeltiler hazırlandı. Okunan absorbans değerlerine karşılık standart eğri çizilerek numunelerin maltoz ve glukoz miktarları standart eğriden hesaplandı.

3.15. Protein Miktar Tayini

Hazırlanan tüplere farklı miktarlarda enzim çözeltisi konulduktan sonra toplam hacim saf su ile 500 µL' ye tamamlandı. Daha sonra tüplere 5 mL alkalın çözeltisi katılarak, 15 dakika 40 °C su banyosuna bırakıldı.Sonra üzerine 500 µL Folin reaktifi (1:1) katılarak 30 dakika sonra 660 nm'de absorbans değerleri okundu (**Lowry ve ark., 1951**). Okunan değerlere karşı standart eğri çizildi. Standart eğriden yararlanılarak protein miktar içerikleri hesaplandı.

3.16. Uygun İnkübasyon Süresinin Saptanması

SB besiyerine mikroorganizma ekimi yapıldıktan sonra 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Daha sonra besiyerinden 12; 16; 20; 24; 36; 40; 44; 48 ve 52. saatlerde 1mL örnek alınıp santrifüjlenerek aktivite tayini yapıldıktan sonra uygun inkübasyon süresi belirlendi.

3.17. pH'nın Etkisi

Enzimlerin aktivitesi üzerine pH etkisini incelemek için 50 mM konsantrasyonlarında asetat tamponu (pH; 4.5-5.5) 50 mM Fosfat tamponu (pH;6.0-6.4) ve 50 mM Tris-HCl tamponu (pH; 7.0-8.0)kullanıldı.

3.18. Sıcaklığın Etkisi

α -Amilaz ve pullulanaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini incelemek için 20; 25; 30; 37; 40; 50; 55; ve 60 °C'lik sıcaklık aralıklarında üst sıvıdan aktivite tayini yapılarak bu iki enzim için optimum sıcaklık tespit edildi.

3.19. Enzim Üretimi Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi

SB besiyeri hazırlandıktan sonra yeast ekstrakt ve beef ekstrakt ortama bırakılmadan yerlerine % 2 oranında hazırlanan azot kaynaklarından trypton, pepton, glisin, üre, $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$, NH_4NO_3 bırakıldı . Ekim yapıldıktan sonra uygun inkübasyon süresine kadar bırakılan örneklerin her birine, süresi sonunda aktivite tayini yapıldı.

3.20. Enzim Üretimi Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisi

SB besiyeri hazırlandıktan sonra ortamda nişasta yerine % 2 oranında hazırlanan karbon kaynaklarından glukoz, amiloz, pullulan, sukroz, yine sadece % 2 nişasta bırakılarak ekim yapıldı. Daha sonra sonra uygun inkübasyon süresine kadar bırakılan örneklerin her birine, süresi sonunda aktivite tayini yapıldı.

3.21. Enzim Üretimi Üzerine Farklı Nişastaların Etkisi

SB besiyeri hazırlandıktan sonra çözümlü nişasta yerine % 2 oranında hazırlanan buğday nişastası, pirinç nişastası, mısır nişastası ve patates nişastası besiyeri yerine bırakıldı. Ekim yapıldıktan sonra sonra uygun inkübasyon süresine kadar bırakılan örneklerin her birine, süresi sonunda aktivite tayini yapıldı.

3.22. Enzim Üretimi Üzerine Farklı Unların Etkisi

SB besiyeri hazırlandıktan sonra ortama çözümlü nişasta bırakılmadan % 0.2 oranında hazırlanan buğday unu, buğday unu ve kepeği karışımı, yedi tahıl unu* karışımı, darı unu, arpa unu ve pirinç unu besiyeri yerine bırakıldı. Ekim yapıldıktan sonra sonra uygun inkübasyon süresine kadar bırakılan örneklerin her birine, süresi sonunda aktivite tayini yapıldı.

*Not: Yedi tahıl un karışımı Buğday unu, Yulaf unu, Çavdar unu, Mısır unu, Soya unu, Ayçiçeği içi ve Dark malt unu içermektedir.

3.23. Metal İyonlarının Etkisi

α -Amilaz ve pullulanaz üzerine metal iyonlarının farklı derişimlerinin etkisini incelemek için 5 mM, 10 mM ve 50 mM'lık CaCl_2 , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 , NaCl , KCl , $\text{CuCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ içeren SB besiyerinde ortamda bakteri üretildikten sonra üst sıvıdan aktivite tayini yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. *Bacillus* sp.'nin Salgıladığı Bazı Enzimler

SB besiyerinde üretilen mikroorganizma farklı sürelerde inkübasyona bırakılarak daha sonra santrifüjlendi. Üst sıvıdan α -amilaz, pullulanaz, β -galaktozidaz ve proteaz enzimleri için aktivite tayini yapıldı. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.1'de görölmektedir. Kullanılan mikroorganizma için en yüksek enzim aktivitesi α -amilaz ve pullulanaz enzimleri için bulunduğundan dolayı daha sonraki aşamalarda bu enzimlerin optimizasyon çalışmalarına gidildi .

4.2. Enzim Üretimi İçin Uygun İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi

SB besiyerine *Bacillus* sp. değişik inkübasyon sürelerinde 37 °C'de inkübasyona bırakıldı.12; 16; 20; 24; 36; 40; 44; 48 ve 52. saatlerde aktivite tayini yapıldı. α -Amilaz için en uygun inkübasyon süresi 48. saat pullulanaz için ise 44. saat bulundu (Şekil 4.1-Şekil 4.2).

4.3. Optimum pH

Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisini incelemek için 50 mM asetat tamponu (pH: 4.5 - 5.5), Fosfat tamponu(pH; 6.0-6.4) ve Tris-HCl tamponu (pH: 7.0 – 8.0) kullanıldı. En yüksek aktivite α -amilaz enzimi için pH: 6.8 'de pullulanaz enzimi için pH: 6.4'de tespit edildi (Şekil 4.3 – Şekil 4.4).

4.4. Optimum Sıcaklık

α -Amilaz ve pullulanaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi 20; 25; 30; 37; 40 ; 45; 50 ve 60 °C'lik sıcaklık aralıklarında çalışıldı. Aktivite tayinleri sonucu her iki enzim için optimum sıcaklık 37 °C olarak bulundu (Şekil 4.5 - Şekil 4.6).

4.5. Enzim Üretimi Üzerine Farklı Azot Kaynaklarının Etkisi

SB besiyerine ortamda başka azot kaynağı olmayacak şekilde organik azot kaynağı olarak % 2 oranında beef ekstrakt , pepton, tripton, üre, glisin, yeast ekstrakt, inorganik azot kaynağı olarak NH_4NO_3 ve $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ilave edildi. Organik azot kaynaklarından pepton, beef ekstrakt ve triptonun, inorganik azot kaynaklarından $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 'ün α -amilaz üretimini arttırdığı görüldü. Pullulanaz üretiminde organik azot kaynağı olarak peptonun enzim üretimini arttırdığı görülürken inorganik azot kaynaklarının anlamlı bir etkisi olmadığı gözlemlendi (Tablo 4.2 - Tablo 4.3).

4.6. Enzim Üretimi Üzerine Farklı Karbon Kaynaklarının Etkisi

SB besiyerlerine ortamda çözümlü nişasta olmayacak şekilde % 2 oranında glukoz, amiloz, pullulan, sukroz ve nişasta ilave edildi. Nişastanın hem α -amilaz, hemde pullulanaz üretimini, pullulanın ise pullulanaz aktivitesini anlamlı bir şekilde arttırdığı gözlemlendi (Tablo 4.4 - Tablo 4.5).

4.7. Enzim Üretimi Üzerine Farklı Nişasta Kaynaklarının Etkisi

Bu amaçla SB besiyerinde bulunması gereken nişastanın dışında ortama % 0.2'lik buğday nişastası, pirinç nişastası, mısır nişastası ve patates nişastası bırakıldı. Patates nişastasının hem α -amilaz, hemde pullulanaz aktivitesini arttırdığı belirlendi (Şekil 4.7 - Şekil 4.8).

4.8. Enzim Üretimi Üzerine Farklı Unların Etkisi

SB besiyerine %0.2 buğday unu, buğday unu ve kepeği karışımı, yedi tahıl un karışımı (buğday unu, yulaf unu, çavdar unu, mısır unu, soya unu, ayçiçeği içi ve dark malt unu), darı unu, arpa unu ve pirinç unu bırakıldı. Her iki enzimin üretimini buğday ununun arttırdığı belirlendi (Tablo 4.6- Tablo 4.7).

4.9. Enzim Üretimi Üzerine Farklı Metal İyonlarının Etkisi

Enzim üretimi üzerine farklı derişimlerdeki (5; 10 ve 50mM) metal iyonlarının etkisini incelemek için ortama CaCl_2 , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 , NaCl , KCl ve $\text{CuCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ilave edildi. Ca^{+2} 'nin 10 ve 50 mM derişimlerinin α -amilaz aktivitesini arttırdığı, 5 mM Cu^{+2} 'nin enzimi % 50.7, 50 mM Mn^{+2} 'nin % 85.89 ve 10 mM Zn^{+2} 'nin % 75.25 inhibe ettiği belirlendi.

Pullulanaz aktivitesinin ise 50 mM Ca^{+2} ile % 105 olduğu 50mM Mn^{+2} 'nin ve 10 ve 50 mM Zn^{+2} 'nin enzim aktivitesini anlamlı derecede düşürdüğü gözlemlendi (Tablo 4.8).

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Hem katı faz fermantasyon (SSF) hem de sıvı faz fermantasyon (SmF) teknikleriyle amilaz grubu enzimlerin üretimi çeşitli kimyasal faktörler tarafından etkilenmektedir. Çoğunlukla azot kaynağı, karbon kaynağı, sıcaklık, inkübasyon süresi, pH etkisi, metal iyonların varlığı ve üreme ortamı kompozisyonu gibi parametrelerin α -amilaz ve pullulanaz üretimi üzerine etkisi olduğu ve mikrobiyal metabolizmada bu fizikokimyasal parametrelerin önemli bir role sahip olduğu belirtilmektedir (**Pandey ve ark. 2000, Vihinen ark. 1989**).

Bu amaçla çalışmada inek sütünden izole edilip Gram(+) *Basil* olduğu belirlenen mikroorganizmanın öncelikle hangi enzimleri salgıladığı belirlendi. Bu enzimlerin α -amilaz, pullulanaz, β -galaktozidaz ve proteaz aktivite tayini yapıldı (Tablo 4.1). Elde edilen sonuçlara göre α -amilaz ve pullulanaz enzimleri için yüksek aktivite bulunmasından dolayı daha sonraki aşamalarda bu iki enzimin optimizasyonu yapıldı.

Bacillus sp.'nin α -amilaz ve pullulanaz enzimlerini hangi inkübasyon süresinde daha fazla salgıladığını bulmak için 12; 16; 20; 24; 36; 40; 44; 48 ve 52. saatlerde üst sıvılardan alınan örneklerde yapılan aktivite tayinlerinde α -amilaz için 48. saatte, pullulanaz için ise 44. saatte sırasıyla 0.382 U/mL ve 0.0990 U/mL değerlerine ulaştığı tespit edildi (Tablo 4.1; Şekil 4.1-Şekil 4.2). Her iki enzimin üretimi erken eksponental fazda başlamasına rağmen maksimum üretim post eksponental ve stasyoner büyüme fazı esnasında elde edildi.

B.cereus FDTA-13 kullanıldığında yapılan bir çalışmada pullulanaz enzimi için bu değer 12. saatte 1.6 U/mL olduğu bulunmuştur (**Nair ve ark., 2007**). *Bacillus* sp. ANT-6 tarafından α -amilaz için uygun inkübasyon süresi 24. saat, *Bacillus* sp. AN-7 ile pullulanaz için uygun inkübasyon süresi 48. saat olarak tespit edilmiştir (**Burhan ve ark., 2003; Kunammeni ve Singh, 2006**).

Enzimlerin üretimi pH ve sıcaklık gibi parametrelere bağlı olarak değişir. Enzimlerin protein yapısında olmasından dolayı, enzimin primer ve sekonder yapısını oluşturan aminoasitlerin iyonlaşması pH' tan etkilenir. Bu durum enzim aktivitesine de etki eder. pH' ta meydana gelen herhangi bir değişiklik proteinin konformasyonunda anlamlı değişikliklere yol açar (**Sharma ve ark., 2001**).

Çalışmada α -amilaz ve pullulanaz aktivitesi üzerine pH'ın etkisi **Şekil 4.3** ve **Şekil 4.4** 'te verilmektedir. Her iki enziminde geniş bir pH aralığında (pH: 5.5-8) aktivite

gösterdiği α -amilaz için optimum pH'ın pH: 6.8, pullulanaz için ise pH: 6.4 olduğu belirlendi.

α -Amilaz için pH: 5.0'de % 74, pH: 6.8' de %100 ve pH: 7.5'te % 97.64 pullulanaz için pH:5.0 'de % 28.82, pH: 6.4'te % 100, pH: 7.5' da %42.47 aktivite belirlendi.

Bacillus türü mikroorganizmaların α -amilaz için optimum pH değerlerinin pH: 3.5-12 olduğu bazı araştırmacılar tarafından bulunmuştur (**Konsula & Liakopoulou-Kyriakides 2004**). Vishnu ve ark. (2006) pullulanaz için optimum pH'yı pH: 6.5 olarak bulmuşlardır.

α -Amilaz ve pullulanaz üretiminde sıcaklığın etkisi organizmanın büyümesiyle ilgilidir. Mantar tipi mikroorganizmalar arasında amilaz üretimi çalışmaları çoğunlukla 25- 37 °C arasında bulunmaktadır (**Hayashida ve ark. 1988, Kundu ve ark. 1973**).

T. lanuginosus ve *Thormomonospora fusca* gibi mikroorganizmalarla yapılan çalışmalarda sırasıyla 50 ve 55 °C'de optimum sıcaklık elde edilmiştir (**Amanullah ve ark. 1999**). Vishnu ve ark. (2006) α -amilaz ve pullulanaz için optimum sıcaklık aralığını 15-55 °C olarak bulmuşken, Kunamneni ve Singh (2006) pullulanaz için optimum sıcaklığı 90 °C olarak bulmuştur. **Hernandez ve ark., (2006)** *Aspergillus niger* mikroorganizmasını ve nişastayı substrat olarak kullanıp α -amilazın 70 °C'de de aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir.

Bazı araştırmacılar pullulanaz grubu enzimlerin sıcaklığa karşı dayanıklılığını yapılarında bulunan prolin aminoasidi içeriğine bağlı olduğunu, prolin içeriğinin fazla olmasının hidrofobik etkileşimleri arttırdığını belirtmişlerdir (**Bertoldo ve ark., 1999**).

Şekil 4.5 ve **Şekil 4.6** sıcaklığın bir fonksiyonu olarak α -amilaz ve pullulanaz aktivitesini göstermektedir. Deney koşulları altında α -amilaz aktivitesinin 37 °C'de % 107.2, 70 °C'de % 71,3 olduğu belirlendi. Buna karşılık pullulanaz enziminin ise 37 °C'de % 124.9, 70 °C'de ise % 41.06 aktivite gösterdiği bulundu. Her iki enziminde 70 °C'de hala aktivite gösteriyor olması enzim yapısında yer alan aminoasitler arasındaki hidrofobik etkileşimler ile açıklayabiliriz.

Mikroorganizmalar büyüme ve metabolik aktivitelerini gerçekleştirebilmek için besin kaynağı olarak farklı substratlar kullanırlar. Daha sonra buna bağlı olarak metabolizmaları için gerekli olan bileşenleri üretirler. Organik azot kaynakları bu amaçla α -amilaz ve pullulanaz üretimi için yaygın bir şekilde tercih edilmektedir. Yeast ekstrakt gibi azot kaynağından yararlanarak *Halomonas meridiana*, *Bacillus* sp ve *Streptomyces* sp 'den α -amilaz üretimi sağlanmıştır (**McMahon ve ark 1999, Hamilton ve ark. 1999**,

Coronado ve ark. 2000). Diğer organik azot kaynaklarının da çeşitli mantar ve bakteriler tarafından enzim sekresyonunda etkili olduğu belirtilmiştir. Bu kaynakların amino gruplarının amilazın sentezi ve yıkımında görevli olduğu yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir (**Pedersen ve ark. 2000**). Torrando ve ark. (1998) *A. oryzae*'de amilaz üretimi için en iyi azot kaynağının NaNO_3 ve $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ olduğunu belirtmiştir. **Konsoula ve Kyriakides (2004)** α -amilaz için en iyi azot kaynaklarını tripton ve corn steep liquor olduğunu belirtmişlerdir. Başka bir çalışmada pullulanaz üretimi için yeast ekstraktın en iyi azot kaynağı olduğu belirtilmiştir (**Gomes ve ark 2003**).

Bacillus sp. tarafından üretilen α -amilaz ve pullulanaz enzimleri üzerine azot kaynaklarının etkisi SB besiyeri kullanılarak tayin edildi. Bu amaçla SB besiyerinden yeast ekstrakt ve beef ekstrakt çıkarılarak bunların yerine besiyeri ortamında derişimleri % 2 olacak şekilde sırasıyla üre, NH_4NO_3 , pepton, tripton, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, glisin, yine SB besiyerinden sadece beef ekstrakt çıkarılarak yeast ekstrakt, yeast ekstrakt çıkarılarak beef ekstrakt bırakılarak mikroorganizma 37 °C'de üretildi. Üst sıvıdan yapılan aktivite tayini sonucu **Tablo 4.2** ve **Tablo 4.3** 'de verilmektedir. α -Amilaz için organik azot kaynaklarından pepton için maksimum aktivite 0.224599, beef ekstrakt için 0.1432, tripton için 0.160539 U/mL olarak bulundu. Pullulanaz için ise peptonlu ortamda 0.042604 U/mL gibi bir değer elde edildi. Bu organik azot kaynaklarının enzim sekresyonunu artırdığını söyleyebiliriz. Ancak inorganik azot kaynakları ile anlamlı bir verim elde edilmedi.

Endüstriyel enzim üretiminde diğer bir önemli faktör besiyeri ortamında bırakılan karbon kaynaklarıdır. Bu amaçla α -amilaz ve pullulanazın maximum salgılandığı ortamı bulmak için *Bacillus* sp. farklı organik karbon kaynaklı besiyerlerinde üretildi.

Tablo 4.4 ve **Tablo 4.5** 'de %2 konsantrasyonda farklı karbon kaynaklarının varlığında α -amilaz ve pullulanaz üretimi için elde edilen veriler gösterilmektedir. α -Amilaz ve pullulanaz enzimlerinin üretimi glukoz gibi kolay metabolize olabilen şeker varlığında baskılandı. Buna karşın kullanılan karbon kaynakları arasında α -amilaz için nişastanın (0.039692 U/mL), pullulanaz için ise pullulanın (0.370042 U/mL) ve nişastanın (0.245565 U/mL) uygun karbon kaynaklı substrat olduğu bulundu.

α -Amilaz üretimi üzerine karbohidratların etkisini araştıran çalışmada glukozun enzim sentezini anlamlı derecede düşürdüğü gözlenmiştir. Çalışmacılara göre glukozun α -amilazın gen ekspresyonunu sağladığını ancak enzimin sekresyonunu arttırmadığı ifade edilmiştir (**de Souza Teodoro ve ark., 2000**). Erratt ve ark. (1984) α -amilaz üretiminin α -

1,4 glikozidik bağ içeren karbohidratlar ile (maltoz, nişasta gibi) indüklendiğini ancak glukozun enzim üretimini baskıladığını belirtmişlerdir.

Pandey ve ark. (2000) göre nişasta ve laktozun α -amilaz üretimini indüklediği belirtilmiştir. *R. marinus* ITI 990 basit ve kompleks karbonhidrat (2 g/L) içeren ortamda üretildiğinde amilaz ve pullulanaz için en yüksek aktivite maltoz ile bulunmuştur (**Gomes ve ark. 2003**).

Şekil 4.7 ve **Şekil 4.8** dallanmış polisakkarid içeren ortamlarda α -amilaz ve pullulanaz üretimi ile ilgili sonuçları içermektedir. Patates nişastası ile α -amilaz için 0.054989 U/mL, pullulanaz için 0.353556 U/mL maksimum aktivite gözlemlendi. Kompleks polisakkaridler ile enzim ekspresyonunun indüklendiği bazı çalışmacılar tarafından belirtilmiştir (**Bakshi ve ark., 1992**). Gomes ve ark. (2003) patates nişastası kullanarak α -amilaz ve pullulanaz için sırasıyla 22 nkat/mL ve 15 nkat/mL aktivite gözlemlerken en düşük aktiviteyi buğday nişastası ile (15 nkat/mL ve 13 nkat/mL) bulmuşlardır.

Çalışmada besiyeri ortamında bulunan nişastanın yerine nişasta içeren farklı substratların da bu enzimler üzerine etkisi araştırıldı. Bu amaçla ortama % 0.2 buğday unu, buğday unu ve kepeği karışımı, yedi tahıl unu karışımı, darı unu, arpa unu ve pirinç unu bırakılarak mikroorganizma üretildi, üst sıvıdan aktivite tayini yapıldı.

Tablo 4.6 ve **Tablo 4.7** 'de görüldüğü gibi her iki enzim üretimi için sadece buğday unu ile az bir artış gözlemlendi. Buğday ununun enzim biyosentezinde azda olsa indükleyici bir etkiye sahip olduğunu söyleyebiliriz. Yedi tahıl unu karışımı, darı unu, pirinç ununun ve arpa unu ile bir azalma gözlemlendi. *Clostridium thermosulfurogenes* SV2 ile yapılan bir çalışmada patates ununun hem β -amilaz hemde pullulanaz üretimini arttırdığı arpa ununun ise her iki enzim için uygun olmadığı belirtilmiştir (**Ramesh ve ark. 2001**).

Metal iyonları ve tuzların enzim aktivitesi üzerinde önemli bir rolü vardır. Bu metal iyonları enzimleri termal denatürasyona karşı korumakta ve enzimin yüksek sıcaklıklarda aktif konfügrasyonunun oluşumunda önemli bir rol oynamaktadırlar (**Hernandez ve ark., 2006**). Enzimlerin bir kısmı kararlılıklarını ve aktif yapılarını korumak için özellikle kalsiyum iyonları gibi metal iyonlarına ihtiyaç duyarlar. Bu iyonlar enzim molekülünün üzerinde spesifik bağlanma bölgelerine kuvvetlice bağlanırlar. Bağlanma bölgesi genellikle aspartil ve glutamil artıklarının negatif yüklü karboksilat yan gruplarından meydana gelir (**Sharma ve ark., 2001**).

α -Amilaz ve pullulanaz aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi standart deney koşulları altında yapıldı. Bu amaçla besiyeri ortamına derişimleri 5; 10 ve 50 mM olacak

şekilde metal çözeltileri katılarak, üst sıvıdan aktivite tayini yapıldı. Sonuçlar **Tablo 4.8'** de verilmektedir.

Amilaz aktivitesi 10 ve 50 mM Ca^{+2} varlığında sırasıyla %103, %100; iken Na^+ ve K^+ nın 10 ve 50 mM derişimlerinde yaklaşık %1' lik bir aktivite kaybı gözlendi. 50 mM Mn^{+2} ile %85.89 ve 10 mM Zn^{+2} ile %71.25'lik bir aktivite kaybı gözlendi. Asgher ve ark. (2007) yaptıkları bir çalışmada Ca^{+2} nin α -amilaz aktivitesini %117 arttırdığını, enzimin Mg^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} varlığında az etkilendiğini, Co^{+2} , Cu^{+2} ve Hg^{+2} , nin ise enzimi kuvvetli bir şekilde inhibe ettiğini belirtmişlerdir.

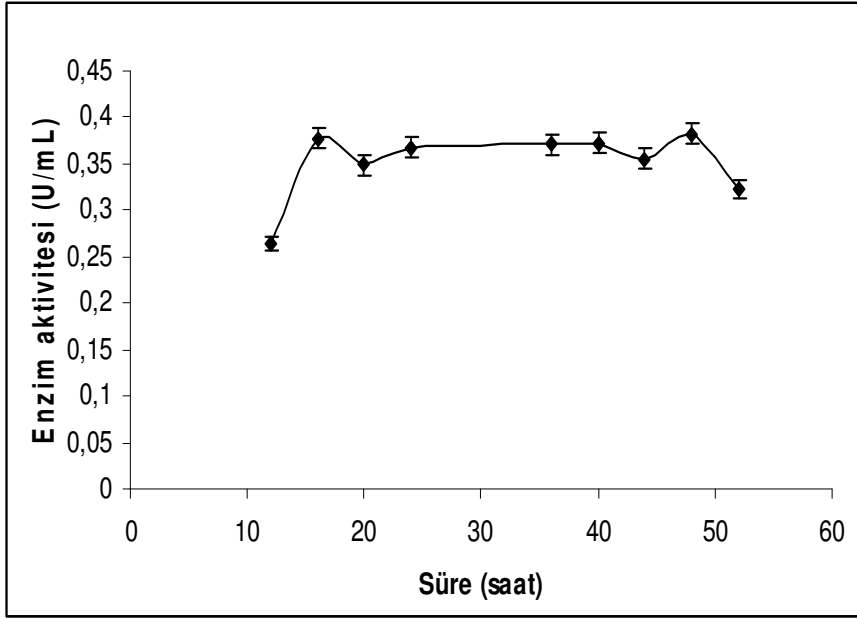
Pullulanaz aktivitesi için Ca^{+2} ile 50 mM'lık derişimde %105, Na^+ ve K^+ nın 50 mM'lık derişimlerde sırasıyla %41.07 ve % 49.11' lik bir aktivite kaybı gözlendi. 10 mM ve 50 mM'lık Zn^{+2} ' nin aktiviteyi %97.68 ve %97.14, 50 mM'lık Mn^{+2} nin ise %89.11 düşürdüğü gözlendi.

Bacillus sp. α -amilaz ve pullulanaz enzimlerinin özellikle Mn^{+2} ve Zn^{+2} tarafından gözlenen inhibisyonun proteine bağlı katyonlar ile bu metal katyonları arasındaki yarıştan kaynaklandığı söylenebilir. Bu da enzim aktivitesinde azalmaya yol açmış olabilir. *Bacillus* sp. AN-7 ile yapılan çalışmada 10 mM Ca^{+2} nin yanında Mn^{+2} nin pullulanaz aktivitesini stimule ettiği belirtilmektedir. Yine aynı çalışmada 10 mM Cu^{+2} , nin %30' luk bir aktivite kaybı oluşturduğu belirtilmiştir (Kunamneni ve Singh, 2006). Vishnu ve ark.(2006) 10 mM Zn^{+2} varlığında pullulanaz aktivitesinin tamamen yok olduğunu göstermişlerdir

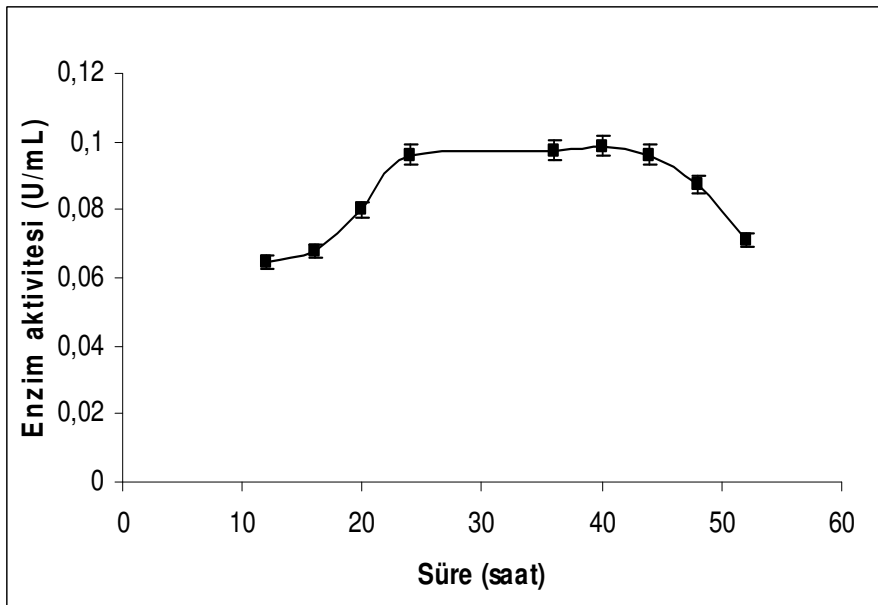
Ekonomik endüstriyel enzim uygulamalarında bakteriler tarafından salgılanan enzimler için uygun karbon ve azot kaynaklarının bulunması, optimum koşulların sağlanması önemli bir aşamadır. Yine özellikle pullulanaz grubu enzimler ve bunların biyosentezi üzerine moleküler çalışmalar mevcut olmasına rağmen enzim üretimi ile ilgili çalışmaların az olmasından dolayı endüstriyel uygulamaları yeterince yapılamamaktadır. Bu problemlerin bir çözüme de uygun üretici mikroorganizmanın bulunmasıdır.

Bu amaçla deneysel verilere göre çalışmada inek sütünden izole edilen *Bacillus* sp. tarafından salgılanan α -amilaz ve pullulanaz gibi ticari öneme sahip olan enzimler pahalı olmayan substratlarla üretilebilir. Unlarda bulunan protein, lipid ve lif gibi bileşenlerin de enzim biyosentezi için uygun olduğu söylenebilir. Buna ilaveten *Bacillus* sp.' nin yüksek sıcaklıklarda da aktivite gösterme kapasitesine sahip bir mikroorganizma olduğu söylenebilir.

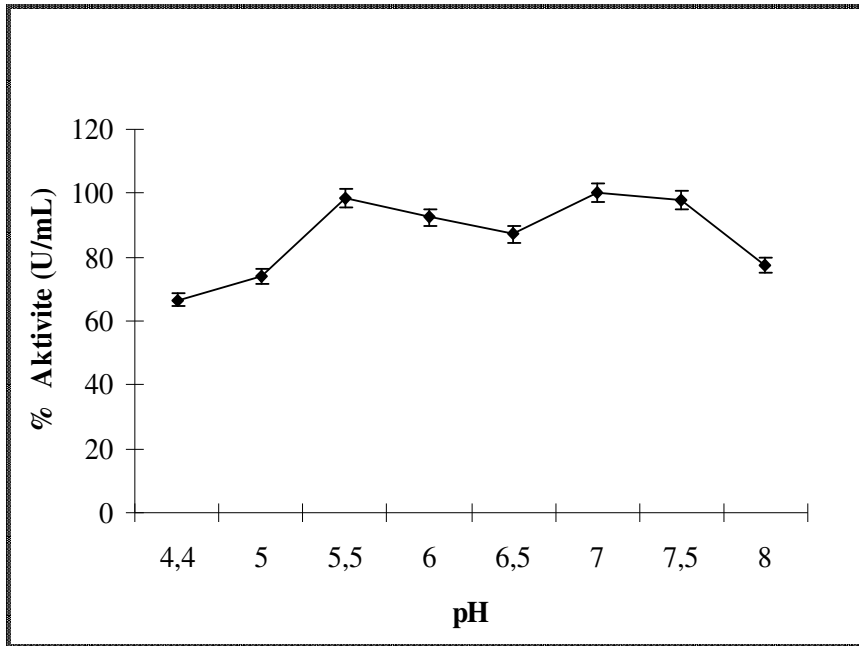
6. ŞEKİLER



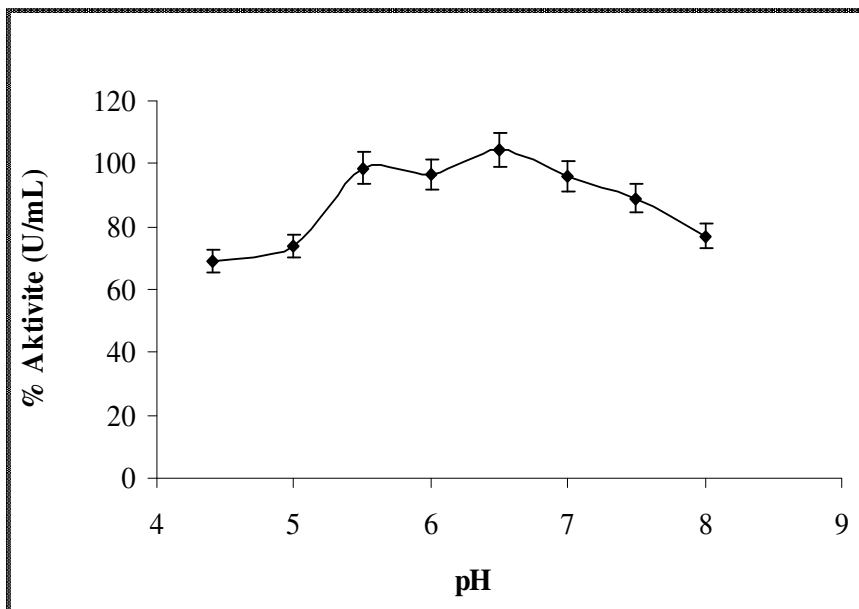
Şekil 4.1. α -Amilaz enzimi için uygun inkübasyon süresinin belirlenmesi



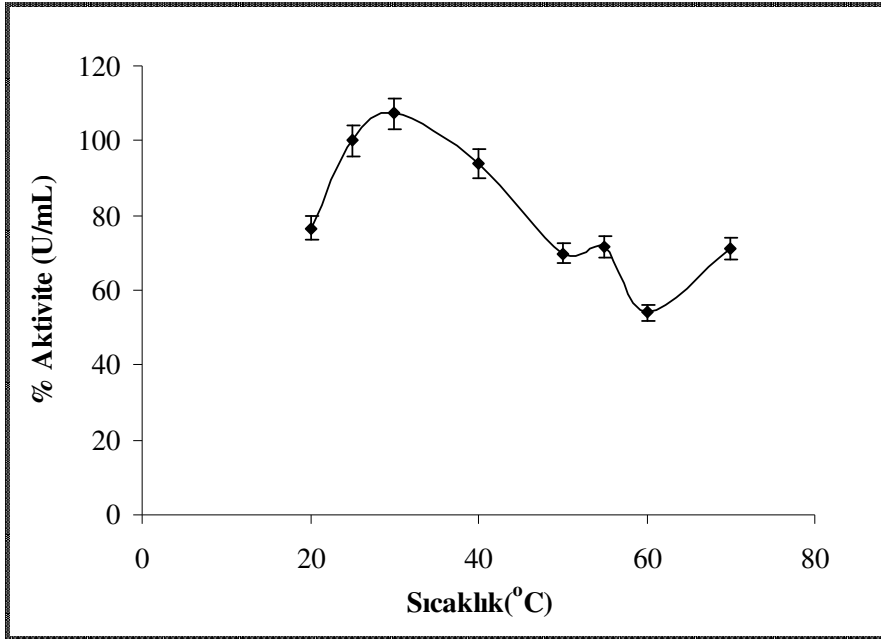
Şekil 4.2. Pullulanaz enzimi için uygun inkübasyon süresinin belirlenmesi



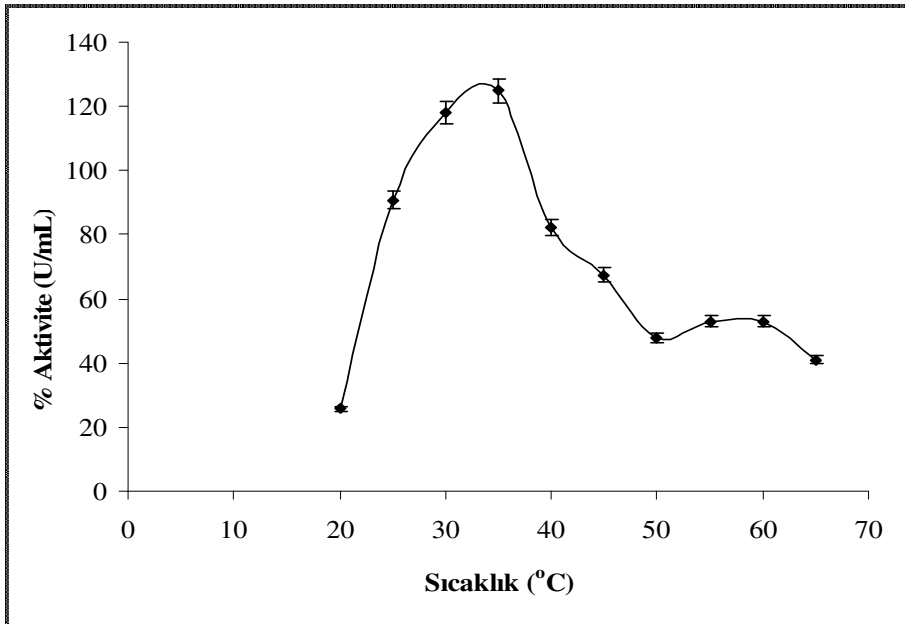
Şekil 4.3. α -Amilaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi



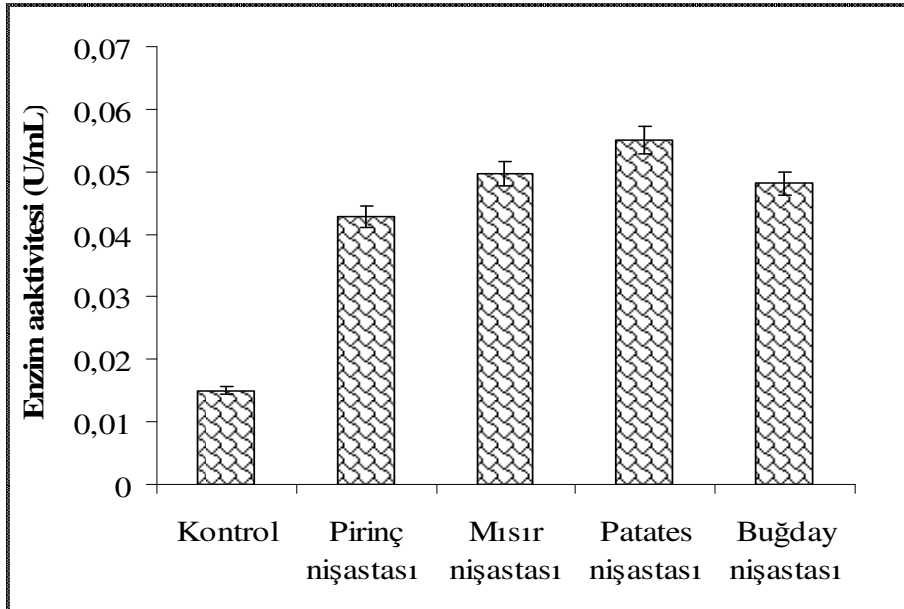
Şekil 4.4. Pullulanaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi



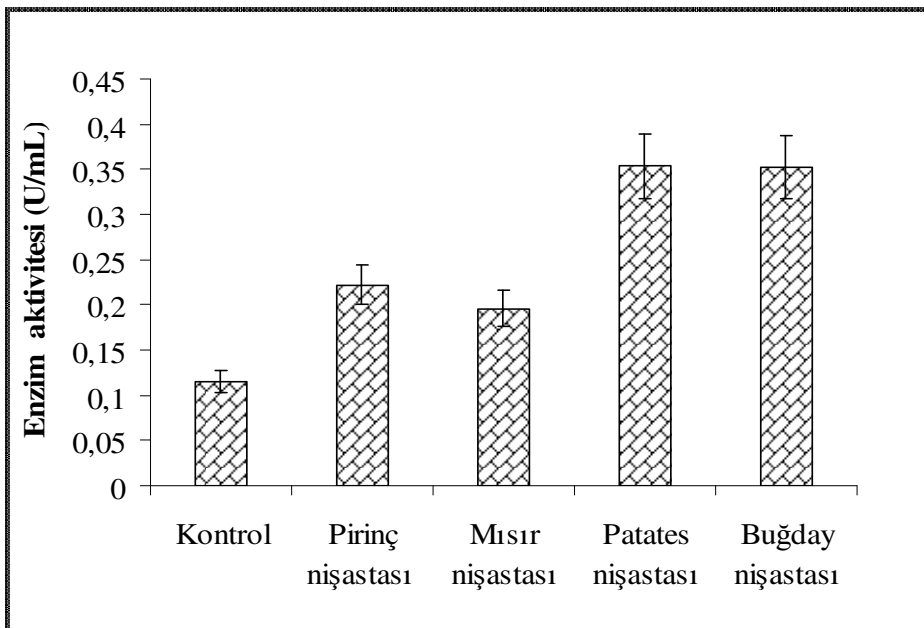
Şekil 4.5. α -Amilaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi



Şekil 4.6. Pullulanaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi



Şekil 4.7. α -Amilaz üretimi üzerine farklı nişastaların etkisi



Şekil 4.8. Pullulanaz üretimi üzerine farklı nişastaların etkisi

7.TABLolar

Tablo 4.1 *Bacillus* sp. tarafından salgılanan bazı enzimlerin aktivite tayin sonuçları

Süre (saat)	α -Amilaz (U/mL)	Pullulanaz (U/mL)	β -Galaktozidaz (U/mL)	Proteaz (U/mL)
12	0.264	0.064	0.00258	0.00183
16	0.377	0.067	0.00298	0.00198
20	0.349	0.080	0.00290	0.00188
24	0.368	0.096	0.00211	0.00214
36	0.371	0.089	0.00251	0.00169
40	0.372	0.090	0.00237	0.00152
44	0.222	0.099	0.00287	0.00183
48	0.382	0.087	0.00279	0.00194
52	0.323	0.071	0.00285	0.00194

Tablo 4.2. α -Amilaz üretimi üzerine farklı azot kaynaklarının etkisi

Farklı azot kaynakları(%2 w/v)	Amilaz Aktivitesi (U/mL)
Kontrol	0.014959
Üre	0.044748
NH ₄ NO ₃	0.040362
Beef ekstrakt	0.143269
Pepton	0.224599
Tripton	0.160539
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.066501
Glisin	0.042431
Yeast ekstrakt	0.076090

Tablo 4.3. Pullulanaz üretimi üzerine farklı azot kaynaklarının etkisi

Azot kaynakları(%2 w/v)	Pullulanaz Aktivitesi (U/mL)
Kontrol	0.014959
Üre	0.005518
NH ₄ NO ₃	0.017071
Beef ekstrakt	0.005034
Pepton	0.042604
Tripton	0.019105
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.016766
Glisin	0.011611
Yeast ekstrakt	0.010881

Tablo 4.4. α-Amilaz üretimi üzerine farklı karbon kaynaklarının etkisi

Karbonkaynakları(%2 w/v)	Amilaz Aktivitesi (U/mL)
Kontrol	0.014959
Glukoz	0.004324
Amiloz	0.014284
Pullulan	0.016983
Sukroz	0.019126
Nişasta	0.039692

Tablo 4.5. Pullulanaz üretimi üzerine farklı karbon kaynaklarının etkisi

Karbon kaynakları (%2 w/v)	Pullulanaz Aktivitesi (U/mL)
Kontrol	0.014959
Glukoz	0.059999
Amiloz	0.107749
Pullulan	0.370042
Sukroz	0.094256
Nişasta	0.245565

Tablo 4.6. α -Amilaz üretimi üzerine farklı unların etkisi

Farklı un kaynakları (%2 w/v)	Amilaz Aktivitesi (U/mL)
Buğday Unu	0.055729
Buğday unu ve kepeği	0.05175
Yedi Tahıl Un Karışımı	0.032217
Darı Unu	0.034551
Arpa Unu	0.047344
Pirinç Unu	0.033293

Tablo 4.7. Pullulanaz üretimi üzerine farklı unların etkisi

Farklı un kaynakları (%2 w/v)	Pullulanaz Aktivitesi (U/mL)
Buğday Unu	0.024418
Buğday Unu ve Kepeği	0.021629
Yedi Tahıl Un Karışımı	0.003808
Darı Unu	0.006646
Arpa Unu	0.009934
Pirinç Unu	0.01358

***Not: Yedi tahıl un karışımı Buğday unu, Yulaf unu, Çavdar unu, Mısır unu, Soya unu, Ayçiçeği içi ve Dark malt unu içermektedir

Tablo4.8. α -Amilaz ve pullulanaz aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi

Metal İyonları	Metal İyon Konsantrasyonu (mM)	α-Amilaz (%Aktivite)	Pullulanaz (%Aktivite)
Cu ⁺²	5	49.3	51.42
Cu ⁺²	10	60.85	54.64
Cu ⁺²	50	45.59	54.29
Ca ⁺²	5	99.02	90.54
Ca ⁺²	10	103	53.57
Ca ⁺²	50	100	105
Mn ⁺²	5	99.73	17.86
Mn ⁺²	10	94.71	18.03
Mn ⁺²	50	14.11	10.89
Mg ⁺²	5	97.8	81.07
Mg ⁺²	10	97.8	85
Mg ⁺²	50	98.54	62.32
Zn ⁺²	5	99.64	45.71
Zn ⁺²	10	28.75	2.32
Zn ⁺²	50	43.65	2.86
Na ⁺	5	97.88	95.36
Na ⁺	10	99.2	76.79
Na ⁺	50	99.82	58.93
K ⁺	5	98.23	96.42
K ⁺	10	99.82	41.07
K ⁺	50	99.64	50.89

8. KAYNAKLAR

ANDERSON K., 1995. Biochemical analysis of starch degradation by *Ruminobacter amylophilus* 70. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1488.

AMANULLAH A., Blair R., Nienow A.W., Thomas C.R., **1999.** Effect of agitation intensity on mycelial morphology and protein production in chemostat cultures of recombinant *Aspergillus oryzae*. *Biotechnol. Bioeng.* 62, 434.

AMOOZEGAR M.A., Malekzadeh F., Khursheed A. Malik.C., **2003.** Production of amylase by newly isolated moderate halophile, *Halobacillus sp.* strain MA-2. *Journal of Microbiological Methods.* 52, 353.

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

BAILEY J.E., OLLIS D.F., **1997.** Biochemical Engineering Fundamentals: International Student Edition. Chapter 1-7, p: 39-50.

BAKSHI A. , Patnaik P.R. , Gupta J.K., **1992.** Thermostable pullulanase from a mesophilic *Bacillus cereus* isolate and its mutant UV. *Bio. Technol. Lett.* 4, 689.

BATUM M., 1997. Marmara Araştırma Merkezi, Lisans Üstü Yaz Okulu (E.M.T.U) Enzim Mühendisliğinde Temel Konular ve Uygulamalar, Bölüm 14.

BERNFELD P., 1955. Amylases, α and β . In : Methods in Enzymology. New York: Academic Pres, 1,149

BERTOLIDO C., Duffner F., Jorgensen P., Antranikian G., **1999.** Pullulanase type I from *Fervidobacterium pennavorans* Ven5: cloning, sequencing and expression of the gene and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2084

BERTOLIDO C. , Antranikian G., **2002.** Starch –Hydrolyzing Enzymes from Thermophilic Archaea and Bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology* , 6, 151-160.

BERTOLIDO C. , Antranikian G., **2001.** Amylolytic Enzymes from Hyperthermophiles. *Methods in Enzymol.* 330, 269-289.

BESSLER C. , Schmitt J. , Mauurer K. , Schmid D.R., **2003.** Directed Evolution of a Bacterial Amylases: Toward Enhanced pH-Performance and Higher Specific Activity , *Protein Sci.* 12, 2141.

BEYATLI Y., 1996. Bioteknoloji ve Biyoprotein Üretimi, Kükem Yayınları. ANKARA, sayfa 11-12.

- BURHAN A.**, Nisa U. , Gökhan C. , Ömer C. , Ashabil A., Osman G., **2003**. Enzymatic properties of a novel thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkalophilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. *Process Biochemistry*. 38, 1397.
- CORONADO M.J.** Vargas C., Hofemeister J., Ventosa A., Nieto J.J., **2000**. Production and biochemical characterization of an α -amylase from the moderate halophile *Halomonas meridiana*. *FEMS Microbiol Lett*. 21, 111.
- DAĞAŞAN L.**, **1997**. Marmara Araştırma Merkezi, Lisans Üstü Yaz Okulu (E.M.T.U) Enzim Mühendisliğinde Temel Konular ve Uygulamalar, Bölüm 15,
- DE SOUZA TEODORO C.E.**, Martins M.L.L., **2000**. Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus* sp. *Brazilian J. Microbiol*. 31, 298.
- DOMAN-PYTKA M.**, Bardowski J., **2004**. Pullulan degrading enzymes of bacterial origin. *Critical Reviews in Microbiol*. 30, 107.
- ERRATT J.A.**, Douglas P.E., Moranelli F., Seligy V.L., **1984**. The induction of α -amylase by starch in *Aspergillus oryzae*: evidence for controlled mRNA expression. *Can. J. Biochem. Cell Biol*. 62, 678.
- FOGARTY W.M.**, **1983**. Microbial Enzymes and Biotechnology. Chapter 1: Microbial Amylases. Applied Science Publisher, p: 1-92.
- GANGHOFNER D.** , Kellermann J. , Staudenbauer W., Bronnenmeier K., **1998**. Purification and properties of an amylopullulanase. A glucoamylase, and an α -glucosidase in the amylolytic enzyme system of *Thermoanaerobacterium rhermosaccharoliticum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 62, 302.
- GIACOMINI A.**, Corich V., Ollero F.J., Squartini M., Kasai H., Yokota A., **1992**. Experimental conditions may affect reproducibility of the β -galactosidase assay. *FEMS Microbiol. Lett*. 100, 87.
- GOMES I.** , Gomes J. , Steiner W., **2003**. Highly thermostable amylase and pullulanase of the extreme thermophilic eubacterium *Rhodothermus marinus*: production and partial characterization. *Bioresource Technol*. 90, 207.
- GUPTA R.**, Gigras P., Mohapatra H., Goswami V.K., Chauhan B., **2003**. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective ; *Enzyme and Technology*, 38, 1599.
- HAMILTON L.M.**, Kelly C.T., Fogarty W.M., **1999**. Production and properties of the raw starch-digesting α -amylase of *Bacillus* sp. IMD 435. *Process Biochem*. 35, 27.
- HAYASHIDA S.**, Teramoto Y., Inoue T., **1988**. Production and characteristics of raw potato starch digesting α -amylase from *Bacillus subtilis* 65. *Appl Environ Microbiol*. 54, 1516.

- HERNANDEZ M.S.** , Rodriguez M.R. , Guerra N.P. , Roses R.P., **2006**. Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. *Journal of Food Engineering*. 73, 93.
- HORIKOSHI K.**, **1996**. Alkaliphiles-from an industrial point of view ; *FEMS Microbiology Reviews*, 18, 259.
- IKURA Y.**, Horikoshi K., **1987**. Effect of amino compounds on alkaline amylase production by alkalophilic *Bacillus sp.* *J. Ferment technol.*65, 707.
- KAPUCU, N.C.**, **2003**. Lipaz enziminin katalizlediği bir ester üretiminin süper kritik karbondioksitte incelenmesi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi.
- KIRAN E.Ö.**, Çömlekçiöğlü U., **2003**. Zeytin İlıcısı (Kahramanmaraş)’ndan termofil alkalifilik amilolitik *Bacillus sp.* suşlarının izolasyonu ve amilaz üretme yetenekleri üzerine azot kaynaklarının etkisi; *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, 6(2), 41.
- KONSULA Z.**, Liakopoulou-Kyriakides M., **2004**. Hydrolysis of starches by the action of an α -amylase from *Bacillus subtilis*. *Process Biochemistry*. 39, 1745.
- KUNAMNENI A.** , Singh S., **2006**. Improved High Thermal Stability of Pullulanase from a Newly Isolated Thermophilic *Bacillus sp.* AN-7. *Enzyme and Microbial Technology*, 39,1399.
- KUNDU A.K.**, Das S., Grupta T.K., **1973**. Influence of culture and nutritional conditions on the production of amylase by the submerged culture of *Aspergillus oryzea*. *J Ferment Technol.* 51, 142.
- KURIKI T.**, Imanaka T., **1999**. The concept of the α -amylase family: structural similarity and common catalytic mechanism. *J. Biosci. Bioeng.* 87, 557.
- KURIKI T.**, Takata H., Okada S., Imanaka T., **1991**. Analysis of the active center of *Bacillus stearothermophilus* neopullulanase. *J. Bacteriol.* 173, 6174.
- LEIGHTON T.J.**, Doi R.H., Warren R.A.J., Kelln R.A., **1973**. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* 76,103.
- LOWRY O.H.**, Rosebrough N.J., Farr A.L., **1951**. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265.
- MARC J.E.C.**, van der MAAREL, Bart van der V., Joost C.M., Dijkhuizen L., **2002**. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of Biotech.* 94, 137.
- MATZKE J.**, Hermaann A. , Shneider E., Schwartz M., **2000**. Gene cloning, nucleotide sequence and biochemical properties of acytoplasmic cyclomaltodextrinase

(neopullulanase) from *Alicyclobacillus acidocaldarius*, reclassification of a group enzymes. *FEMS Microbiol Lett.* 183, 55.

McMAHON H.E.M., Kelly C.T., Fogarty W.M., **1999**. High maltose producing amylyolytic system of a *Streptomyces sp.* *Biotechnol. Lett.* 21, 23.

MESSAOUD E.B., Ali B.M., Elleuch N., Masmoudi N.F., Bejar S., **2004**. Purification and properties of a maltaheptaose- and maltohexaose-forming amylase produced by *Bacillus subtilis US116* ; *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 34 ,662.

MILLER G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* 31, 426.

NAIR S.U., Singhal R.S. , Kamat M.Y. , **2007**. Enhanced production of pullulanase-type I using new isolate of *Bacillus cereus* FDTA 13 and its mutant. *Food Technol. Biotech.* 98, 856.

NIEHAUS F., Peters A., Groudieva T., Antranikian G., **2000**. Cloning, expression and biochemical characterization of a unique thermostable pullulan hydrolyzing enzyme from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus aggregans*. *FEMS Microbiology Letter.* 190, 223.

PANDEY A., Gangadharan D. , Sivaramakrishnan S. , Nampoothiri K.M., **2006**. Solid Culturing of *Bacillus amyloliquefaciens* for Alpha Amylase Production. Biotechnology Division, Regional Research Laboratory, CIR, 1330.

PANDEY A., Nigam P. , Soccol C.R. ,Soccol V.T. , Singh D. , Mohan R., **2000**. *Advances in Microbial Amylases.* 31,135.

PEDERSEN H., Nielsen J., **2000**. The influence of nitrogen sources on the α -amylase productivity of *Aspergillus oryzae* in continuous cultures. *Appl Microbiol Biotechnol.* 53, 278.

PEDERSON H., Nielsen J., **2000**. The influence of nitrogen sources on the α -amylase productivity of *Aspergillus oryzae* in continuous cultures ; *Microbial Biotechnol*, vol. 53 278.

RAMESH B. , Reddy P.R.M. , Seenayya G. , Reddy G., **2001**. Effect of various on the production of thermostable β -amylase and pullulanase by *Clostridium thermosulfurogenes* SV2. *Bioresource Technol.* 76, 169.

RAMACHANDRA S., Patel K.A., Nampoothiri M.K., Francis F., Nagy Y., Szakacs G., Pandey A., **2004**. Coconut oil cake-a potential raw material for the production of α -amylase ; *Bioresource Technology.* 39, 169.

ROBYT J.F., 1989. Mechanism and Product Specificity of α -Amylases. *Denpun* 36, 287.

- SAHA B.C.**, Zeikus J.G., **1989**. Novel highly thermostable pullulanase from thermophiles. *Trends in Biotechnol.* 7, 234.
- SHARMA A.K.**, Tiwari R.P., Hoondal G.S., **2001**. Properties of a thermostable and solvent stable extracellular lipase from a *Pseudomonas* sp. AG-8. *J. Basic Microbiol.* 6, 363.
- SMITH K.A.**, Salyers A.A., **1989**. Cell-associated pullulanase from *Bacteroides thetaiotaomicron*: Cloning, characterization, and insertional mutagenesis to determine role in pullulan utilization. *J. Bacteriol.* 171, 2116.
- TAKAHA T.**, Smith S.M., **1999**. The functions of 4- α - glucanotransferases and their use for production of cyclic glucans. *Biotechnol. Gnet. Eng. Rev.* 16,257.
- TAUBER H.**, **1949**. The Chemistry and Technology of Enzymes, John Wiley & Sons Inc.
- TAKATA H.**, Kuriki T., Okada S., Takesada Y., Lizuka M., Imanaka T., **1992**. Action neopullulanase. Neopullulanase catalyzes both hydrolysis and transglycosylation at alpha-(1-4) and alpha-(1-6) glucosidic linkages. *J. Biol. Chem.* 267,18447.
- TAKIZAWA N.**, Murooka Y., **1985**. Cloning of the pullulanase gene and over-production of pullulanase in *Escherichia coli* and *Klebsiella aerogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 294.
- TELEFONCU A.**, **1996**. Biyoteknoloji, s. 1-4, Ege Üniversitesi Fen- Edb. Fak. Yayınları No:159 İzmir,
- TORRADO A.**, Gonzeles M.P., Murado M.A., **1998**. pH regulation in solid state culture through the initial ration between oxidize and reduced sources of nitrogen. A model applicable to the amylase production by *Aspergillus oryzae*. *Biotechnology Techniques.* 12, 411.
- VIHINEN M.**, Mantsala P., **1989**. Microbial amylolytic enzymes. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 24,329.
- VISHNU C.**, Naveena B.J., Altaf MD., Venkateshwar M., Reddy G., **2006**. Amylopullulanase-A novel enzyme of *L. amylophilus* GV6 in direct fermentation of starch to L (+) lactic acid. *Enzyme and Microbial. Technol.* 38, 545.
- WANG N. S.** 1999. www.glue.umd.edu/nsw/ench485/lab5.htm, ‘‘ Experiment No:5 Starch Hydrolysis by Amylase’’
- WINDISH W.W.**, MHATRE N.S., **1965**. Microbial Amylase. *Adv. Appl. Microbiol.*, 7, 273.

WEBB E.C., 1992. Enzyme Nomenclature Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Academic Press. Orlando.

WISEMAN A., 1987. Handbook of Enzyme Biotechnology. Second Edition. Chapter 3. The application of enzymes in industry p. 274-373.

YABUKI M., Ono N., Hoshino K., Fukui S., **1977.** Rapid induction of α -amylase by non-growing mycelia of *Aspergillus oryzae*. *Appl Environ Microbiol.* 34, 6.

YAMASHITA M., Matsumoto D., Murooka Y., **1997.** Amino acid residues specific for the catalytic action towards α -1,6 glucosidic linkages in *Klebsiella pullulanase*. *J. Ferment. Bioengin.* 84, 283.

YENSON M., 1981. İnsan Biyokimyası. İstanbul Üniversitesi Tıp. Fak. Biyokimya Kürsüsü, sayfa:143-145

YÜCEER S., 2000. Buğday Nişastasının Hidrolizinde α -Amilaz Enziminin Aktivitesinin İncelenmesi , Yüksek Lisans Tezi, Yıldız teknik Üniversitesi, İstanbul.

9. ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1. Amilozun Genel Yapısı

Şekil 1.2. Amilopektinin Genel Yapısı

Şekil.1.3. α -Amilazlar (α -1,4 glukon glukonohidrolaz, EC 3.2.1.1) ve Etki Mekanizmaları

Şekil 1.4. Kovalent Bağ İçeren α -(1-4) Glikozidik Bağın Hidrolizi Sonucu Çifte Yer Değişim Mekanizması

Şekil 1.5. Pullulanazın Pullulan Üzerine Etki Mekanizması

Şekil 1.6. α -Amilaz ve Pullulanazın Nişasta Üzerine Etkisi

Şekil 4.1. α -Amilaz enzimi için uygun inkübasyon süresinin belirlenmesi

Şekil 4.2. Pullulanaz enzimi için uygun inkübasyon süresinin belirlenmesi

Şekil 4.3. α -Amilaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

Şekil 4.4. Pullulanaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

Şekil 4.5. α -Amilaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Şekil 4.6. Pullulanaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Şekil 4.7. α -Amilaz üretimi üzerine farklı nişastaların etkisi

Şekil 4.8. Pullulanaz üretimi üzerine farklı nişastaların etkisi

10. TABLO LİSTESİ

Tablo 4.1 *Bacillus* sp. tarafından salgılanan bazı enzimlerin aktivite tayin sonuçları

Tablo 4.2. α -Amilaz üretimi üzerine farklı azot kaynaklarının etkisi

Tablo 4.3. Pullulanaz üretimi üzerine farklı azot kaynaklarının etkisi

Tablo 4.4. α -Amilaz üretimi üzerine farklı karbon kaynaklarının etkisi

Tablo 4.5. Pullulanaz üretimi üzerine farklı karbon kaynaklarının etkisi

Tablo 4.6. α -Amilaz üretimi üzerine farklı unların etkisi

Tablo 4.7. Pullulanaz üretimi üzerine farklı unların etkisi

Tablo 4.8. α -Amilaz ve pullulanaz aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi

11.EKLER

Ek.1. Tampon Hazırlanması

pH: 4.5;50 mM Asetat tamponu

13.8 mL 50 mM asetik asit ve 6.2 mL 50 mM sodyum asetat saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.

pH: 5; 50 mM Asetat tamponu

7.4 mL 50 mM asetik asit ve 17.6 mL 50 mM sodyum asetat saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.

pH: 5.5; 50 mM Asetat tamponu

600 μ L 50 mM asetik asit ve 4.400 mL 50 mM sodyum asetat saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.

pH: 6; 50 mM Fosfat tamponu

6.15 mL 50 mM Na_2HPO_4 ve 43.85 mL 50 mM NaH_2PO_4 saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.

pH: 6.4; 50 mM Fosfat tamponu

13.25 mL 50 mM Na_2HPO_4 ve 36.75 mL 50 mM NaH_2PO_4 saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.

pH: 7; 50 mM Tris-HCl tamponu

23.3 mL 50 mM HCl ve 25 mL 50 mM Tris saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.

pH: 7.5; 50 mM Tris-HCl tamponu

19.98 mL 50 mM HCl ve 25 mL 50 mM Tris saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.

pH: 8; 50 mM Tris-HCl tamponu

14.6 mL 50 mM HCl ve 25 mL 50 mM Tris saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.

Ek.2. Alkalın Çözeltisinin Hazırlanması

% 4 Na₂CO₃

% 4 Na-K tartarat

% 2 CuSO₄

100 mL Na₂CO₃ üzerine 1 mL Na-K tartarat, 1 mL CuSO₄ ilave edilir.

Ek.3 Folin Reaktifinin Hazırlanması

500 mL'lik balona 100 gr Na₂WO₄.2H₂O, 25 gr Na₂MoO₄.2H₂O, 50 mL % 85'lik H₃PO₄, 100 mL derişik HCl ve 700 mL saf su bırakıldıktan sonra çözelti 10 saat sireyle yavaş yavaş bir şekilde geri soğutucu altında kaynatılır. 150 gr LiSO₄, 50 mL saf su ve birkaç damla Br₂ ilave edilir. Bromun aşırısını tutmak için soğutucusuz olarak 15 dakika kaynatılıp soğutulur. Hacim daha sonra 1000 mL'ye tamamlanır.

12. ÖZGEÇMİŞ

30 Ağustos 1979'da Diyarbakır'da doğdum. İlköğretimimi Adıyaman Cumhuriyet İlköğretim Okulu'nda, Ortaöğrenimini Şanlıurfa Atatürk Barajı Lisesi'nde tamamladım. Eylül 1998'te İnönü Üniversitesi Meslek Yüksek Okulu'nun İnşaat Bölümü'ne başladım. Ağustos 2000 yılında mezun oldum. Eylül 2001'de Dicle Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'ne başladım. Temmuz 2005 yılında mezun oldum. Eylül 2005'te Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans eğitimine başladım.