

156658

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Musa textilis* (MUZ) KABUĞU KULLANARAK KATI-FAZ FERMANTASYON
TEKNIĞİ İLE (SSF) *Bacillus sp.*'de α -AMİLAZ ÜRETİLMESİ**

Sadin ÖZDEMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

(BİYOLOJİ ANABİLİM DALI)

DİYARBAKIR
AĞUSTOS - 2004

T.C
DİCLE UNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DİYARBAKIR

Sadin ÖZDEMİR tarafından yapılan bu çalışma , jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir

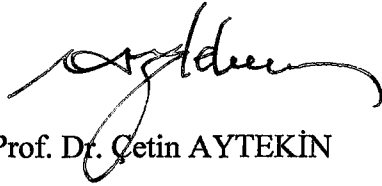
Jüri Üyesinin

<u>Ünvanı</u>	<u>Adı Soyadı</u>
Başkan: Doç.Dr.	Kemal GÜVEN
Üye :Yrd.Doç.Dr.	Zübeyde BAYSAL
Üye : Yrd.Doç.Dr.	Fikret UYAR



Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

16.09/2004



Prof. Dr. Çetin AYTEKİN

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

(MÜHÜR)



TEŞEKKÜR

Bu çalışma Dicle Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Ana Bilim Dalı Başkanı, sayın hocam Doç.Dr.Kemal GÜVEN danışmanlığında yapılmıştır.Çalışmam sırasında bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak ihtiyaç duyduğum her konuda yardımlarını esirgemeyen hocama teşekkürlerimi sunarım.

Deneyisel aşamada yardımlarını esirgemeyen, her zaman desteğini gördüğüm sayın Yrd. Doç.Dr.Fikrek UYAR'a ve Yrd.Doç Dr. Zübeyde BAYSAL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında yardımlarını gördüğüm Yrd. Doç. Dr. Sema Agüloğlu'na, Yrd. Doç. Dr. Veysel TOLAN'a, ve aynı laboratuvarı paylaştığımız yüksek lisans arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Elektroforez deneyi sırasında yardımlarını gördüğüm Yrd.Doç Dr. Göksel KIZIL'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez yazımı sırasında yardımlarını gördüğüm arkadaşım Süleyman DEMİR'e teşekkürlerimi sunarım.

Gerek çalışmalarım sırasında gerekse de tez yazımı sırasında manevi desteklerini esirgemeyen dayılarıma ve nişanlım Halime KANDEMİR'e teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar imkanı sağlayan D.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Dekanlığına ve Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
AMAÇ.....	V
ÖZET.....	VI
SUMMARY.....	VIII
1.GİRİŞ.....	1
1.1. Biyoteknoloji.....	1
1.2. Enzimlerin Biyoteknolojide Kullanımı.....	1
1.3.Biyoteknolojide Mikroorganizmaların Daha Fazla Tercih Edilmelerinin Nedenleri.....	4
1.4.Biyoteknolojide α -Amilaz'ın Kullanım Alanları.....	4
1.4.1 α -Amilazların Ekmekçilikte Kullanımı.....	5
1.4.2. α -Amilazların Nişastanın Şekerlendirilmesinde Kullanılışı.....	5
1.4.3. α -Amilazların Tekstil Endüstrisinde Kullanımı.....	5
1.4.4. α -Amilazların Deterjan Endüstrisinde Kullanımı.....	6
1.4.5. α -Amilazların Kağıt Endüstrisinde Kullanımı.....	6
1.4.6. α -Amilazın Tıpta Tanı Amacıyla Kullanımı.....	7
1.5.Bakteriyel Amilazlar.....	7
1.6. Termostabil Amilazlar.....	8
1.7.Nişasta.....	9
1.8. α -Amilazın Etki Mekanizması.....	9
1.9. <i>Bacillus</i>	12
1.10. SSF (Solid-State Fermentation)	13
1.11. SSF Tekniğinin Geliştirilmesinde Dikkat Edilmesi Gereken Etkenler	15
1. 12. Önceki Çalışmalar.....	16
2. MATERYAL VE METOD.....	21
2.1. Biyolojik Materyal.....	21
2.2. Kimyasal Maddeler.....	21
2.2.1. Azot kaynakları.....	21
2.2.2. Karbon kaynakları.....	21
2.2.3. Besi Yeri Maddeleri.....	21
2.2.4. Deterjanlar.....	21
2.2.5. Elektroforetik Maddeler.....	21

2.3. Besi Yerleri.....	21
2.3.1. Sıvı besi yeri (Nutrient Broth [NB])	21
2.3.2. Katı besi yeri.....	21
2.3.3. SSF besi yeri.....	22
2.4. Tamponlar	22
2.5. Kullanılan Aletler.....	22
2.6. Bakteri Üretimi.....	22
2.7. Enzim Eldesi.....	23
2.7.1. SSF besi yerinden.....	23
2.7.2. NB besi yerinden.....	23
2.8. Enzim Aktivite Tayini (Bernfeld Yöntemi)	23
2.8.1. Bernfeld Reaktifinin Hazırlanması.....	23
2.9. Enzim Aktivitesi Üzerine Farklı SSF Kaynakları Etkisinin Araştırılması.....	24
2.10. Enzim Aktivitesi Üzerine Değişik İnkübasyon Sürelerinin Araştırılması.....	24
2.11. Enzim Aktivitesi Üzerine Karbon Kaynakları Etkisinin Araştırılması.....	24
2.12. Enzim Aktivitesi Üzerine Azot Kaynakları Etkisinin Araştırılması.....	24
2.13. Optimum pH Tayini.....	25
2.14. Optimum Sıcaklık Tayini.....	25
2.15. 60 °C’de Zamana Bağlı Enzim Stabilite Tayini.....	25
2.16. Enzim Aktivitesi Üzerine Deterjanların Etkisinin Araştırılması.....	25
2.17..Elektroforez.....	25
2.17.1. Nondenatüre Poliakrilamid Jel Elektroforezi (Laemmli).....	25
2.17.1.1. Jelin Hazırlanması.....	26
2.17.1.2. Elektroforez İşlemi.....	27
3. BULGULAR.....	28
3.1.Farklı SSF Kaynaklarında <i>Bacillus sp.</i> ’de α -Amilaz Aktivitesi.....	28
3.2.Değişik İnkübasyon Sürelerinde α -Amilaz Aktivite Tayini.....	29
3.3.Farklı Karbon Kaynaklarında <i>Bacillus sp.</i> ’de α -Amilaz Aktivitesi.....	30
3.4.Farklı Azot Kaynaklarında <i>Bacillus sp.</i> ’de α -Amilaz Aktivitesi.....	31
3.5.Değişik pH Değerlerinde α -Amilaz Aktivite Tayini.....	32
3.6.Değişik Sıcaklık Aralıklarında α -Amilaz Aktivite Tayini.....	33
3.7.60 °C’de Zamana Bağlı Enzim Stabilite Tayini.....	34
3.8.% 0,2’lik Deterjanların α -Amilaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	35
3.9. α -Amilazın Elektroforetik Analizi.....	36

4.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	37
5.KAYNAKLAR.....	42
6.RESİMLER.....	48
7.ÖZGEÇMİŞ.....	50



AMAÇ

Özellikle son yıllarda, SSF tekniği kullanılarak diğer fermantasyon tekniklerine oranla daha fazla ürün elde edilmesiyle, bu fermantasyon metodu biyoteknolojide giderek önem kazanmaktadır.

Bu teknikte substrat olarak ticari önemi olmayan ve çevre kirlenmesine neden olan tarımsal sanayi artıklarının kullanılmasıyla, hem çevre kirliliğinin önüne geçilmiş oluyor, hem de ekonomik yönden daha az sermayenin kullanılması sağlanıyor.

Çalışmanın amacı, muz kabuğunu substrat olarak kullanarak SSF metoduyla endüstride oldukça fazla kullanım alanına sahip α - amilaz enzimini topraktan izole edilen *Bacillus sp.*'den daha fazla ve daha ekonomik olarak elde etmek ve enzimin bazı karakteristik özelliklerini belirlemektir.



ÖZET

Günümüzde, biyoteknolojide enzimlerin kullanımı giderek önem kazanmaktadır. Bu enzimlerden biri olan α -amilaz, önemli biyoteknolojik enzimler arasındadır. α - amilazlar, nişastanın hidrolizi için gıda, deterjan, tekstil, kağıt, bira ve alkol gibi endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır.

Muz, karpuz ve kavun kabuğu, buğday ve mercimek kepeği ve darı gibi farklı SSF kaynakları topraktan izole edilen *Bacillus sp.* tarafından substrat olarak kullanılarak α - amilaz aktivite oranları test edilmiştir. Enzim üretimi açısından en fazla olandan en az olana doğru muz kabuğu > karpuz kabuğu > mercimek kepeği > buğday kepeği > kavun kabuğu > darı olduğu tespit edilmiştir. Muz kabuğu üzerinde en yüksek aktivite görüldüğünden daha sonraki çalışmalarda muz kabuğu substrat olarak kullanıldı.

SSF metoduyla *Bacillus sp.* muz kabuğunu substrat olarak kullanarak değişik inkübasyon sürelerinde α - amilaz aktivitesi ölçülmüştür. İnkübasyon süresi 72. saat olarak uygun bulunmuştur.

SSF metoduyla *Bacillus sp.* muz kabuğunu substrat olarak kullanarak % 2'lik karbon kaynağı eklentisinin α - amilaz aktivitesi üzerine etkisine bakılmıştır. En yüksek aktivitenin nişasta en düşük aktivitenin ise glukoz ile olduğu tespit edilmiştir. Sukroz enzim aktivitesini etkilememiştir. Mannoza, galaktoza, arabinoza ve glukoz kontrolünden düşük çıkmıştır.

SSF metoduyla *Bacillus sp.* muz kabuğunu substrat olarak kullanarak % 10'luk azot kaynakları eklentisinin α - amilaz aktivitesi üzerindeki etkisine bakılmıştır. Amonyum sülfat, bacto casamino acid, bacto liver ve methionin kontrolünden yüksek çıkmıştır. NH_4Cl ve NH_4NO_3 kontrolünden düşük çıkmıştır. Ürede enzim aktivitesi görülmemiştir. En yüksek aktivitenin amonyum sülfat'ta olduğu tespit edilmiştir.

NB besiyerinde üretilen bakterinin süpernatantında α -amilaz enziminin bazı özellikleri incelenmiştir.

pH 4- 11 arasında α - amilaz aktivite tayini yapıldı. Optimum pH 6 olarak belirlendi.

25 °C ile 95 °C' arasında α - amilaz aktivite tayini yapıldı. Optimum sıcaklık 60 °C olarak belirlendi.

60 °C'de zamana bağlı enzim stabilite ölçümü için 30 ile 240 dakika arasında α - amilaz aktivite tayini yapıldı. 15-90 dakikaya kadar enzim aktivitesinde bir artış gözlemlendi. Sonra 90-240 dakika arasında enzim aktivitesinde bir azalış görüldü. Bununla birlikte 240 dakika sonunda enzim aktivitesinde bir değişimin olmadığı tespit edildi.

NB besi yerinin üst sıvısında, % 2'lik deterjanların (SDS, CHAPS, omo matik) enzim aktivitesi üzerine olan etkisi zamana bağı olarak 15 ile 90 dakikalık zaman aralığında test edilmiş, inhibisyon etkisi en fazla olandan en aza doğru SDS > Omo Matik > CHAPS şeklinde olduğu tespit edilmiştir.



SUMMARY

Recently, the usage of enzymes in biotechnology become to take importance. One of these enzymes α -amylase is among the important biotechnological enzymes. α -Amylases are used at industry such as food, detergent, textil, paper and beer for hidrolisis of starch.

The ratio of α -amylase activity was tested at different SSF sources such as banana, water melon and melon husk, wheat and lentil bran and maize used as subtrates by *Bacillus sp.* which is isolated from soil. The enzyme production from highest to the least is found as follows; banana husk > water melon husk > lentil bran > wheat bran > melon husk >maize. As the highest activity was seen with the banana husk, it was used as substrat in later studies.

By SSF process, *Bacillus sp.* using banana husk as substrat α -amylase activity has been determined at different incubation time. The appropriate incubation time has been found 72. hours.

By SSF process, *Bacillus sp.* using banana husk as substrat the effect of the addition of % 2 carbon sources on the α -amylase activity has been examined. The highest activity has been found at starch and the lowest one at glucose. Sucrose didn't effect the α -amylase activity. Glucose, mannose, galactose and arabinose were found to be lower than the control.

By SSF process, *Bacillus sp.* using banana husk as substrat the effect of the addition of % 10 nitrogen sources on the α -amylase activity has been examined. Amonium sulfate, bacto casamino acid, bacto liver and methionin are found higher than the control. NH_4Cl and NH_4NO_3 are found to be lower than the control. There was not seen any enzyme activity at urea. The highest enzyme activity has been observed at amonium sulfate.

Some properties of α -amylase were examined on the supernatant of *Bacillus sp.* grow on NB medium.

The α -amylase activity was tested between pH 4 -11. Optimum pH was found to be 6.

The α -amylase activity was tested between 25 °C to 95 °C. Optimum temperature was found to be 60 °C.

α -Amylase activity was carried out for determination of enzyme stability measurements over a period of time (30-240 minutes) at 60 °C. The enzyme activity was increased between 15-90 minutes. Then between the minutes 90 and 240 a decrease in the enzyme activity was observed. However there was no change in enzyme activity after 240 minutes.

The effects of 0.2 % detergents (SDS, CHAPS and Omo Matik) on enzyme activity over a period of time (15-90 minutes) were tested and the order of inhibition effect from most to least was found as SDS > Omo Matik > CHAPS.

1.GİRİŞ

1.1. Biyoteknoloji

Biyoteknoloji; modern, bilimsel metod ve tekniklerle bitki, hayvan ve mikroorganizma yapılarını kültür ortamında değiştirerek ve geliştirerek onlardan ürün elde edilmesidir. Biyoteknoloji özellikle sağlık , gıda ve çevre alanlarında çok önemli gelişmelere neden olmaktadır (Horikoshi, 1996).

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

Biyoteknolojinin çalışma alanları dünyanın temel problemlerini 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 uygulamalar çoğu kez çevreye zarar vermeyen teknikleri kullanır, enerji ihtiyacı azdır, yüksek basınç gerektirmez ve oda sıcaklığında veya daha düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilir. Çevreyi kirleten atıkların değerlendirilmesi ve mikroorganizmalar yardımı ile parçalanması da mümkündür (Telefoncu, 1995).

1.2.Enzimlerin Biyoteknolojide Kullanımı

Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği (Tablo-1.1) 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. Endüstriyel alanda kullanılan enzimler bitkisel, hayvansal ve mikroorganizma kökenli olmakla birlikte, ağırlıklı olarak mikroorganizmalardan temin edilmektedirler.

Mikrobiyal enzimlerin dünya genelinde yıllık kullanım değerlerine bakıldığında alkalın proteaz %25, diğer proteazlar %21, amilaz %18, rennin

%10, tripsin %3, lipaz %3 ve diğer karbonhidratları parçalayan enzimler %10 şeklinde bir dağılımla karşılaşmaktadır. Bu enzimlerin parasal olarak yüz milyonlarca dolar şeklinde tanımlanan ekonomik değeri vardır. 1985 yılında yapılan bir değerlendirmede, dünyadaki enzim satışının 450 milyon doları bulduğu belirtilmektedir. Bugün dünyadaki enzim satışında 2-3 kat artış olduğu bilinmektedir (Kıran ve ömlekçiođlu, 2003).



Tablo-1.1. Enzimlerin Biyoteknolojide Kullanım Alanları*

UYGULAMA ALANI	ENZİM
Yağların parçalanması ve interesterifikasyon	Lipazlar
Peynir üretimi	Rennin,pepsin
Sindirime yardımcı	Çeşitli proteazlar
Etin gevrekleştirilmesi	Papain
Biranın soğuğa dayanıklılığının artırılması	Papain, fisin, bromelain
Dericilik	Çeşitli proteazlar
Balık pres suyu viskozitesinin düşürülmesi	Tripsin, papain, fisin, pepsin
Nişasta hidrolizi	Amilaz(α ve β), pullulanaz
Sakaroz inversiyonu	İnvertaz
Meyve suyu, sirke ve şarap berraklaştırılması	Pektinazlar
Lezzet kontrolü	Nükleazlar
Besin maddesinden, istenmeyen ve toksik bileşiklerin uzaklaştırılması	Diğer hidrolitik enzimler
Oksidasyonun önlenmesi ve besin maddelerinde renk kontrolü	Oksidazlar
Amino asit üretimi	Pronoz, aminopeptidaz
Peynir atık suyu ve sütteki laktozun hidrolizi	Laktaz(β -galaktozidaz)
Selüloz hidrolizi	Selülaz
Dekstroz üretimi	Aminoglukozidaz
Amino asit rasemik karışımlarının ayrılması	Aminoaçilaz
Penisilin üretimi	Penisilin amidaz
Organik sentezler	Değişik enzimler
Sterilizasyon veya soğuk pastörizasyon	Katalaz
Glukozun fruktoza dönüştürülmesi	Glukoz izomeraz

* Telefoncu, 1995

1.3.Biyoteknolojide Mikroorganizmaların Daha Fazla Tercih Edilmelerinin Nedenleri

- Yüksek düzeyde protein ihtiva ederler.
- Bitki ve hayvanlarda daha kolay ve hızlı çoğalırlar.
- Belirli bir miktar gıda üretimi için, başka kaynaklardan daha az alan isterler ve daha ucuz üretilebilirler (Horikoshi, 1996; Beyatlı, 1996). Örneğin, 100 kg şekerden mayalar kullanarak 50 kg üretilebilir. Oysa bu miktar hayvanlarda süt olarak 12-13 kg, tavuk eti olarak 0,5 kg ve sığır eti olarak da 0,3-0,4 kg geçmemektedir.
- Dünyada bol biktarda bulunan çok çeşitli endüstri atıkları, bu mikroorganizmalar tarafından substrat olarak kullanılabilir. Böylece birçok atık maddenin değerlendirilmesi veya yok edilmesine de yardımcı olabilir.Örneğin, sülfite şurubundan maya üretildiğinde, BOİ'de (Biyolojik Oksijen İhtiyacı) ortalama %70-75 azalma sağlanır.Yani, çevre kirletme oranı %75 azalmış olur. Bunun yanı sıra, 1 ton sülfite şurubundan 13 kg (%50 protein ihtiva eden) maya elde edilerek, ekonomik bir fayda da sağlanabilir.Bu duruma göre, her gün 1500 ton atık madde olarak denize dökülen sülfite şurubundan günde 19.5 ton maya, 9.8 ton saf protein elde edilebilir ki, bu da yılda yaklaşık olarak 3.6 milyon kg saf protein eder.
- Kontrol edilebilen şartlarda fermantasyon reaktörü içinde sürekli kültür halinde üretilebildiğinden, üretimleri çevre ve iklim şartlarından etkilenmez (Beyatlı, 1996).

1.4.Biyoteknolojide α -Amilaz'ın Kullanım Alanları

Amilazlar, tüm nişastaları temel alan endüstriler için en önemli hidrolitik enzimler arasındadır. Günümüzde amilazlar, nişastanın hidrolizi için gıda, deterjan, tekstil, kağıt, bira , alkol ve ilaç gibi endüstriyel alanlarda kullanıma uygun bulunmuştur (Gupta ve ark., 2003; Konsula ve Liakopoulo, 2003; Kıran ve Çömlekçioğlu, 2003; Akkaya, 1999; Dağışan,1997; Telefoncu,1995). Bu bağlamda mikrobiyal amilazlar, nişastayı temel alan endüstrilerde tamamen kimyasal hidrolizlerin yerini almıştır.

1.4.1. α -Amilazların Ekmekçilikte Kullanımı

Ekmekçilikte çeşitli enzimler, yüzyıllardan beri yüksek kaliteli ürünlerin üretimi için kullanıldı. Günümüzde protein, lipaz, ksilanaz, pullulanaz, pentonaz, selülaz, glukooksidaz, lipoksidaz, gibi enzim çeşitleri ekmek sanayinde çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır ama hiçbirisi α -amilazın yerini tutamamaktadır. 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)

1.4.2. α -Amilazların Nişastanın Şekerlendirilmesinde Kullanılışı

Nişasta moleküllerinin amilaz enzimleri tarafından hidrolizi sonucuna bağlı olarak 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, 1995).

1.4.3. α -Amilazların Tekstil Endüstrisinde Kullanımı

B. subtilis ve *B. amyloliquefaciens* suşlarından derin fermantasyon yöntemi ile üretilen bu enzimin bu özelliği çirilenmiş nişastayı oldukça kısa sürede parçalamasıdır. Bu özelliğinden dolayı yaklaşık 70-80 yıldır pamuklu dokuma sanayinde haşıl sökücü olarak kullanılmaktadır. Pamuklu ipliklerin dokuma işlemi sırasında torozlanarak kopmalarını önlemek için iplikler nişasta

esaslı bir haşıl banyosundan geçirilip kurutularak sağlamlaştırılır. 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 enzimi kullanarak yapılmaktadır. Bu enzimde çalışma sıcaklığı 55 C°-75 C° dir.

Bacillus licheniformis suşlarından elde edilen amilazın özelliği çalışma sıcaklık aralığının 90-100 derece gibi yüksek ve pH çalışma aralığının da 5.0-7.5 gibi nispeten geniş olmasıdır. Diğer taraftan, kalsiyum bağımlılığı da *B. subtilis* veya *B. amyloliquifaciens* amilazlarına göre çok azdır. Bu özellikleri sayesinde yüksek sıcaklıklarda kısa sürede haşıl sökebilme yapılabilmektedir. Devamlı çalışan sistemlerde 70-80 derece banyodan çıkan bez, 100-110 derecedeki buhar banyosundan geçirilerek 1-2 dakika içinde haşıl sökülebilmektedir (Gupta ve ark., 2003 ; Batum,1997).

1.4.4. α -Amilazların Deterjan Endüstrisinde Kullanımı

α - Amilazlar nişasta içeren (örneğin patates, makarna, çikolata gibi) kir ve lekelerin temizlenmesinde yardımcı olmaktadır. Diğer taraftan bulaşık makineleri deterjanlarına amilaz 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 asidi'ni lösin amino asidi ile yer değiştirerek enzimin oksidasyona dayanıklı olması sağlanmıştır (Gupta ve ark., 2003).

1.4.5. α -Amilazların Kağıt Endüstrisinde Kullanımı

Kağıt endüstrisinde kağıdın işlenmesi için kağıt hamurunun nişastayla kirleşmesi gerekmektedir. Bu işlem kağıdın kalitesini artırır, kağıda sertlik ve dayanıklılık kazandırır, kağıdın güzel tabakalanmasını ve daha iyi silinebilirliğini sağlar. Doğal nişastaların viskoziteleri kağıt kirleşmesi için çok fazladır. Bu nişastalar amilaz enzimi kullanılarak ortamdan uzaklaştırılır (Gupta ve ark., 2003).

1.4.6. α -Amilazın Tıpta Tanı Amacıyla Kullanımı

Amilaz pankreas ve tükürük bezlerinde sentezlenir. Akut karın ağrılarının ayırıcı tanısında çok önemlidir. Akut pankreatitlerde çok yükselir. Akut böbrek yetmezliğinde amilaz değerleri normal üst değerın 5 katı veya üstünde değerlere çıkar. Oysa kronik böbrek hastalığında orta derecede artışlar söz konusudur. Ayrıca amilaz düzeyinde yükselme yapan nedenler şunlardır;

- Perfore peptik ülser
- Tükürük bezi hastalıkları
- Miyokard enfarktüsü
- Akut alkol intoksikasyonu
- Diabetik ketoasidoz'dir(Tokullugil ve ark. , 1998).

1.5. Bakteriyel Amilazlar

Bilim adamları, bakteriler tarafından üretilen enzimlerin sentezi ve salgılanması üzerinde uzun yıllardır yoğun bir şekilde çalışmaktadırlar. Bu çalışmalara rağmen, bu enzimlerden biri olan α -amilazın üretimi, salgılanması ve etki biçimi, bugüne kadar tam olarak aydınlatılmış değildir. α -Amilazın kolay test edilmesi, *Bacillus*'un genetiği ile ilgili bilgiler, enzimin sentez ve salgılanma düzeni üzerine olan çalışmalar için mükemmel modeller sağlamaktadır. Böylece çeşitli endüstriyel ürünlerin üretimi ve biyokimyasal işlemlerin anlaşılması için yardımcı bir çalışma alanı haline almaktadır. Bu durum gıda, tekstil ve sağlık alanında çalışan mikrobiyologlar, moleküler biyologlar, biyokimyacılar ve hekimlerin büyük ölçüde ilgisini çekmektedir (Agüloğlu, 1996).

Amilaz [α -(1 \rightarrow 4) glukon glukonohidrolaz], ilk kez nişasta gibi polikakkaritlerdeki α -(1 \rightarrow 4) glikozidik bağlarının hidrolizini katalizleyen enzim olarak tanımlanmıştır (Ramachandra ve ark., 2004; Gupta ve ark., 2003; Konsula ve Liakopoulou, 2003; Kandra, 2003; Ellaiah, 2002; Hamilton ve ark., 1999; Bolton ve ark., 1997).

α -Amilazlar için farklı substratlar bulunur. Bunlar arasında, başta doğada bol miktarda bulunan patates, buğday, mısır, pirinç gibi bitkilerden elde edilen, ham nişasta yer alır. Enzim substratını kullanarak önce dekstrine, son ürün olarak da glukoz, maltoz ve maltoz üniteleri içeren karbonhidratlara dönüştürür (Somers ve ark., 1995). Enzimin aktivite göstermesi için kofaktör gereklidir. Enzimlerin aktivite göstermesi için gerekli olan ve protein yapısında olmayan, genellikle

metal iyonlarından meydana gelmiş yan gruplara kofaktör denir (Gözükara, 1989). α -Amilaz aktivite gösterebilmek için kofaktör olarak kalsiyum iyonlarına ihtiyaç duymaktadır.

Nişastanın α -amilaz tarafından hidrolizi sonucu oluşan maltooligosakkaritler gıda, ilaç ve kimya endüstrilerinde önemli özelliklerinden dolayı kullanım alanı bulmuşlardır. Bunlar çocuklar ve yaşlılar için yüksek oranda besleyici gıdalar olup iyi çözünüp berrak solusyonlar oluşturmaktadır veya kalori eksikliği çeken kişilerde besin olarak kullanılmaktadır. Maltotetroz, besindeki nemin korunmasında, yapısının iyileştirilmesinde ve besin katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Kandra, 2003).

Bakteriyel amilazlar, substratları olan nişastayı hidrolizleme durumuna göre endo ve ekso amilazlar olmak üzere 2 gruba ayrılır: Bir endo amilaz olan α -amilaz (EC 3.2.1.1.), hidrolazlar sınıfının en önemli üyelerinden biridir, nişastadaki glikozidik bağlarını rastgele yerlerden hidrolizler. Bir ekso amilaz olan β -amilaz (EC 3.2.1.2.) ise, nişastanın indirgen olmayan ucundan başlayarak glikozidik bağlarını hidrolizler. Ayrıca bir glukoamilaz olan γ -amilaz (EC 3.2.1.3.) vardır ki bu, amilopektinin dallanma noktalarındaki glikozidik bağları kırar (Sinnot, 1990).

Besiyeri ortamında, bakterilerin protein, peptid ve pepton gibi organik maddelerin varlığında bakterinin bunları kullanarak ekzoenzim sentezini arttırdığı saptanmıştır. Bununla birlikte organik ve kompleks organik azot kaynaklarının inorganik azot kaynaklarına nazaran amilaz üretimini arttırdığı belirlenmiştir (Pederson ve Nielsen, 2000; Babu ve Satyanarayana, 1993). Yine besiyeri ortamında, farklı karbon kaynakları kullanılarak üretilen bakterilerde nişasta ve glukozun diğer şekerlere oranla α -amilaz üretimini arttırdığı belirlenmiştir (Ramachandra , 2004; Krishna ve Chandrasekanan, 1996).

1.6. Termostabil Amilazlar

Amilazlar, en önemli enzimler arasında olup günümüz biyoteknolojisinde büyük öneme sahiptirler. α -Amilazlar nişastanın jelatinasyonu (100°C - 110°C), sıvılaştırılması (80°C- 90°C), kağıt, tekstil ve deterjan endüstrisinde yüksek sıcaklıklarda aktif olmaktadır. Bu yüzden daha fazla termostabil ve termofil amilaz için araştırmalara gereksinim duyulmaktadır (Arıkan ve ark., 2003; Bolton ve ark., 1997).

Bacillus cinslerinin endüstriyel önemi olan termostabil amilaz ürettikleri bilinmektedir. Termofilik bir bakteri olan *Bacillus staerothermophilus* ticari önemi olan termostabil amilaz üretmektedir. Mezofilik bir bakteri olan *Bacillus licheniformis*'ten elde edilen amilazlar termostabildir (Arıkan ve ark.,2003; Kandra, 2003; Carmelo ve ark., 2002).

α -Amilaz termostabilitesini hem kalsiyumun hem de nişastanın arttırdığı görülmüştür (Konsula ve ark., 2003).

Bacillus sp. WN11 suşu tarafından salgılanan AmyI ve AmyII optimum 75°C ve 80°C'de aktivite göstermektedir (Mamo ve ark., 1999). *Bacillus sp. ANT-6* tarafından salgılanan α -amilaz optimum 80°C'de aktivite göstermektedir (Arıkan ve ark., 2003).

1.7.Nişasta

Nişastaya patates gibi yumrulu bitkilerde ve mısır, fasülye, buğday ve pirinç gibi tahıllarda daha çok rastlanmakla beraber, bütün bitki hücreleri nişasta yapma kabiliyetine sahiptir. Nişasta hücrede iki yapısal formda bulunmaktadır. Bunlardan birisi α -amiloz diğeri ise amilopektindir.

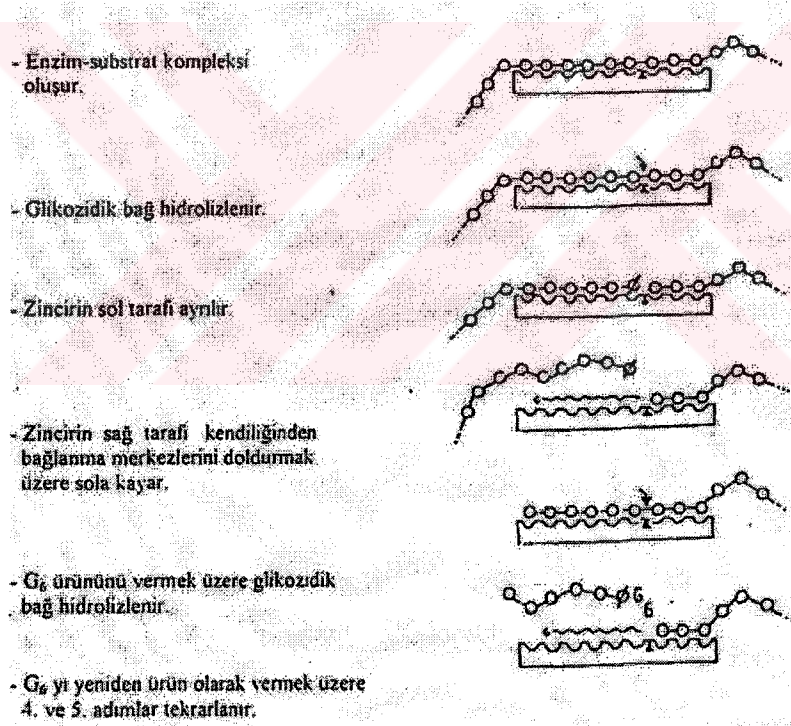
α -Amiloz dallanma göstermeden düz zincirler halinde uzamakta ve D-glukoz ünitelerinin $\alpha(1-4)$ bağı ile birbirine bağlanması sonucu meydana gelmiş bir depo polisakarittir. Molekül ağırlığı birkaç binden 500.000 daltona kadar değişmektedir. α -Amiloz suda çözünmez fakat su emerek miseller haline gelebilir ve iodin ile muamele edilirse mavi renk meydana gelir.

Amilopektin daha yüksek molekül ağırlığına sahip ve dallanma gösteren bir bitki depo polisakaritidir. Düz zincir amilozda olduğu gibi glukoz ünitelerinin $\alpha(1-4)$ bağı ile birbirine bağlanması ile uzamaktadır. Türden türe değişiklik göstermekle birlikte her 20 ile 30 glukoz ünitesinden sonra bir dallanma noktası ortaya çıkmaktadır. Amilopektindeki dallanma $\alpha(1-6)$ glikozidik bağı oluşması ile meydana gelmektedir. İodin ile kırmızı-menekşe renk verir (Gözükara, 1989).

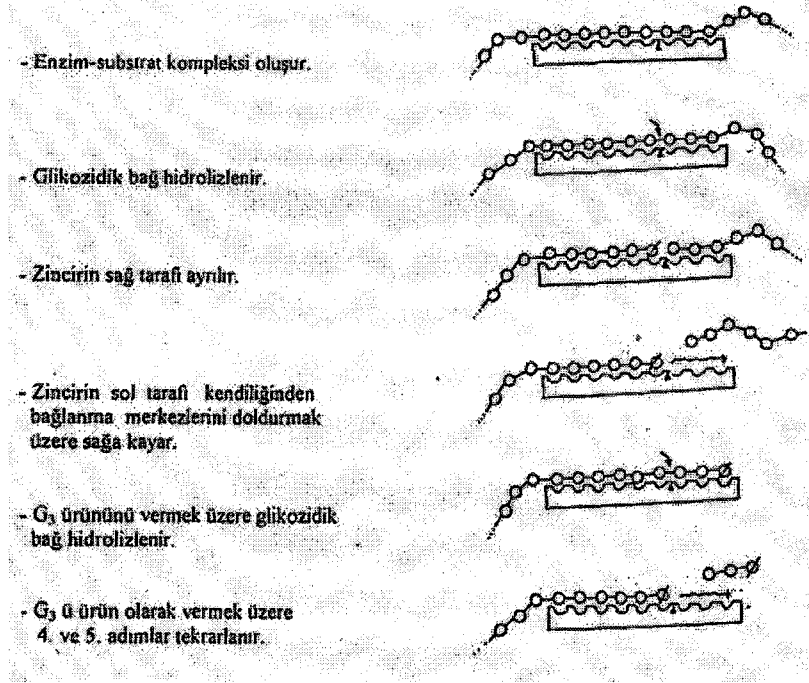
1.8. α -Amilazın Etki Mekanizması

1963 yılına kadar, α -amilazın nişastayı rastgele hidrolizleyip, glukoz moleküllerine dönüştürdüğü düşünülürken, *B. subtilis* α -amilazlarının, amilaz üzerine etkisini konu alan 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) bağımlı hidrolizleyen aktif merkezin, 3-4 nolu glukoz kalıntılarının bağlandığı bağlanma merkezleri üzerinde kaldığı durulmaktadır. 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. Hidrolizinden 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), maltodiyoz (G2), maltotrioz (G3), maltoheksoz (G6) meydana gelir (Robyt, 1989). Etki mekanizması Şekil 1- a ve 1- b' de görülmektedir.

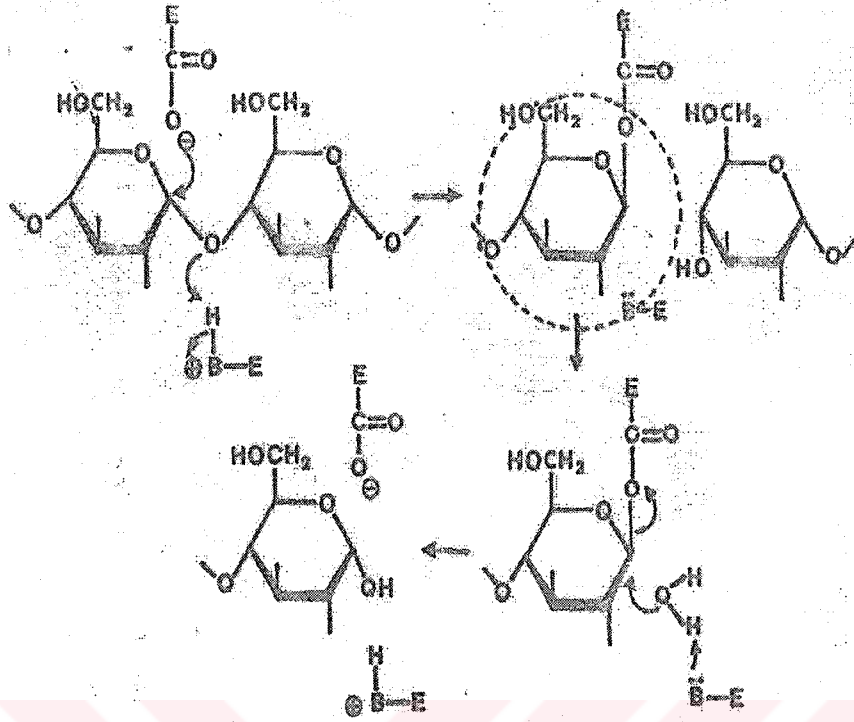


Şekil- 1.a: α -Amilazın etki mekanizması



Şekil- 1.b: α -Amilazın etki mekanizması

Robyrt (1989) PPA (Porcine Pancreatic Amylase)'nın etki biçimini, sıfırın altındaki soğuk çözücü içerisinde 1- $[^{13}C]$ ile zenginleştirilmiş maltotetroz substratını kullanarak ^{13}C -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 ki bu enzimin aktif merkezinde bir karboksilat grubu, β -karboksil asetal vermek üzere α -(1-4) glikozidik bağının 1. C'una atak eder. Bu da hemiasetal hidroksil grubu için bir α -konfigürasyonuna sahip bir ürün vermek üzere su tarafından hidrolizlenir (Şekil-1.c). Bu kovalent mekanizmanın sadece PPA için gösterilmesine rağmen α -amilazların katalitik gruplarını içeren yapısal özelliklerinin korunması, hidroliz mekanizmasının farklı α -amilazlar içinde benzer olduğunu destekliyor.



Şekil- 1.c: Kovalent bağ içeren α -(1-4) glikozit bağının PPA ile hidrolizi için çifte yerdeğişim değişim mekanizması

E enzime karşılık geliyor ve B elektrofilik katalitik gruba karşılık geliyor. Bir karboksilat anyonu β -karboksil asetal ester (daire içine alınan yapı) vermek üzere α -(1-4) bağlarını kıran karbon -1'e atak ediyor ki bunun sonucunda α -konfigürasyonuna sahip bir ürün vermek üzere hidrolizleniyor (Robyt, 1989).

1.9. *Bacillus*

Bacillaceae familyası içinde birçoğu saprofit olan gram pozitif, aerob, sporlu ve çomakçık şeklinde yapıya sahiptirler. Bazıları insan ve hayvanlar için patojendir (Bilgehan, 1986). *Bacillus* cinslerinin sporları doğada yaygın olup daha çok topraktan ve sudan izole edilmektedirler. *Bacillus* cinslerinin bazılarının termofilik, bazılarının ise mezofilik oldukları bilinmektedir. *Bacillus* cinsleri tarafından salgılanan enzimler, (α -amilaz, proteaz, ribonükleaz vb.) endüstriyel öneme sahip olup gıda, deterjan, tekstil, deri, kağıt, bira, alkol ve ilaç gibi endüstri dallarında yaygın olarak kullanılmaktadır. *Bacillus* cinsleri endüstriyel önemi olan alkalın, termofilik, termostabil ve şelatör dirençlilik özelliğine sahip enzimler üretirler (Arıkan ve ark., 2003; Bolton ve ark., 1997).

Bacillus cinslerinin SSF'de kültür için uygunluğu, yapılan çalışmalarda ispatlanmıştır (Babu ve Satyanarayana, 1996).

1.10. SSF (Solid-State Fermentation veya Katı Faz Fermantasyonu)

SSF tarihine bir göz attığımızda, M.Ö. 2600 yılından beri bilinmektedir. Mısırlılar tarafından ekmek yapımında kullanılırdı. SSF metoduyla koji adı verilen enzim preparasyonunun M.Ö. 1000 yılından beri yapıldığı bilinmektedir (Ooijkaas, 2000). Koji *A. oryzae* gibi mantarlar tarafından pirinç ezmesi ve diğer tahıllar üzerinde gelişen mantarlar tarafından üretilen enzim preparasyonlarıdır (Ooijkaas, 2000; Akkaya 1999).Koji metodu modern SSF teknolojisinde büyük tarihsel öneme sahiptir ve SSF'in öncü tipi olarak düşünülebilir. Bunlar günümüzde hala soya sosu endüstrisinde ve doğuya özgü bazı gıdaların fermantasyonunda starter kültür olarak kullanılmaktadır (Akkaya 1999). 20. yüzyılda ise Batı ülkeleri'nin SSF yöntemlerini pek önemsemediklerini görüyoruz. II.Dünya Savaşı süresince penisiline verilen önem ve bu maddenin gelişiminin SmF (Submerged Fermentation)'le olması, SSF metodunun arka planda kalmasına neden olmuştur. Ancak 1960-1970 yılları arasında SSF yöntemiyle mantar toksinlerinin üretiminin başarıldığı açıklandığında SSF büyük bir dönüm noktasına ulaştı. Maddi önemi olmayan ve geniş ölçüde çevre kirliliğine yol açan bu tarımsal artıkların, eşsiz bir teknikle protein bakımından zenginleştirilmiş sığır yemi olarak kullanılmasının sağlanması, kaydedilen bir sonraki büyük başarı olmuştur. Bu olay, dünya çapındaki araştırmacıların SSF ile ilgilenmelerine neden olmuştur. O dönemden beri SSF alanındaki çalışmalar hızla artmış ve özellikle son on yılda büyük gelişmeler sağlanmıştır (Pandey, 2003).

SSF (solid - state fermentation), serbest su akışının olmadığı nemli katı substratlarda, mikroorganizmaların büyümeleri olarak tanımlanır(Ooijkaas, 2000; Babu ve Satyanarayana, 1996). SSF'de nemin varlığına ihtiyaç duyulur ve katı partiküllerin kendi absorbladığı kompleks sıvı formları mevcuttur (Babu ve Satyanarayana, 1996). Fermantasyon süresince buharlaşma ve metabolik aktivite değiştiği için substratın nem seviyesi oldukça önemlidir(Baysal ve ark.,2002). Bütün biyolojik aktiviteler % 12 nem civarında durur. Bu % 12 nem SSF için en düşük nem seviyesi olarak kabul edilir (Babu ve Satyanarayana, 1996). SSF

metodunda nem miktarı substratın yapısının, özenekliliğinin ve yapışkanlığının değişmesine, buna ilaveten gaz hacminin ve diffüzyonun değişmesine neden olmaktadır (Babu ve Satyanarayana, 1996; Lonsane ve ark. 1990).

SSF'de serbest su akışı olmadığından en uygun mikroorganizmanın maya ve mantarlar olduğu söylenebilir. Bakterilerin yüksek miktarda su ihtiyacından dolayı, bunların SSF için uygun olmadıkları düşünülür. Bununla birlikte yapılan çalışmalarda, bakteri kültürleriyle SSF yöntemlerinde oldukça başarılı sonuçlar alınmıştır (Pandey 2003; Baysal ve ark., 2002 ; Babu ve Satyanarayana, 1995). Özellikle *Bacillus* cinslerinin SSF'de kültür için uygunluğu, yapılan çalışmalarda ispatlanmıştır. Bu, belki de *Bacillus* cinslerinin lifli yapı oluşturmalarından dolayı substrat partikülleri içersindeki sudan yararlanarak SSF metodunda yeterli üreme göstermelerini sağlayabilir (Babu ve Satyanarayana, 1996).

SSF metodunda katı substratların doğal yapısı son derece önemlidir. Substratlar genelde suda çözünmeyen selülozik polimerler ve nişastalı maddelerdir. Bunlar doğal oluşmuş maddeler olmalarına rağmen, rafine edilmediğinden bu maddelerin heterojenik doğası SSF metodunda organizmanın kinetik reaksiyonlarını kötü bir şekilde etkileyebilir(Babu ve Satyanarayana, 1996). SSF metodunda substrat, organizmaların sadece yeterli besinini sağlamıyor, aynı zamanda hücrelerin birbirine tutunmasını sağlıyor (Pandey 2003; Baysal ve ark., 2002 ; Babu ve Satyanarayana , 1995).

SSF, daha fazla üretim, basit teknik, düşük sermaye yatırımı,daha düşük kontaminasyon riski, düşük enerji gereksinimi, daha konsantre ürün alımı ve daha az atık su oluşturduğundan dolayı SmF, metoduna göre daha avantajlıdır (Babu Satyanarayana, 1995; Lonsane, 1990). Ayrıca SSF tarımsal atıkların değerlendirilmesi açısından da oldukça önemlidir (Pandey, 2003; Soccol ve ark., 2003).

1.11. SSF Tekniğinin Geliştirilmesinde Dikkat Edilmesi Gereken Etkenler

- Uygun Mikroorganizmanın Seçimi
- Uygun Substratın Seçimi
- Fizikokimyasal ve Biyokimyasal Parametreler
 - Parçacık büyüklüğü,
 - Ortamın başlangıçtaki nem miktarı,
 - pH,
 - Substratın kullanımdan önceki işlenişi,
 - Nispi nem,
 - İnkübasyon, havalandırma ve çalkalama sıcaklığı,
 - İnokulum miktarı ve süresi,
 - İz elementleri ile N,P gibi besinlerin ilavesi, karbon kaynağı ve indükleyicilerin eklenmesi
- Ürünün ekstresi
- Saflaştırılması (Pandey, 2003)

1.12.Önceki Çalışmalar

Ramachandra ve ark. (2004), COC (Coconat oil cake) substrat olarak kullanılarak *Aspergillus oryzae* tarafından α -amilaz üretimini rapor etmişlerdir. En yüksek enzim aktivitesini 30 °C 'de 72. saatte yakalamışlardır. Yine bu çalışmada, ortama % 2 oranında karbon kaynakları eklenmiş, nişasta ve glukozun kontrolden yüksek çıktığı görülmüştür. 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.

Soni ve ark. (2003), *Bacillus sp. SAI* ve *Aspergillus sp. AS-2*'de SSF yöntemiyle buğday kepeği üzerinde α -amilaz aktivitesi yakalamışlardır. Kullanılan bakteriyel α -amilaz buğday kepeği üzerinde 48. saatlik inkübasyondan sonra yüksek değerde görülmüştür. Enzim aktivitesi optimum 50 °C'de ve pH 6'da olduğu tespit edilmiştir. α -Amilazın yarı ömürlük süresi 50 °C'de 50 dakika, 60 °C'de 45 dakika, 65 °C'de 40 dakika, 70 °C'de 30 dakika ve 75 °C'de 15 dakika civarında bulunmuştur. CaCl₂'nin enzim aktivitesinde etkili olduğu bulunmuştur.

Baysal ve ark. (2002), buğday kepeği ve pirinç kabuğu üzerinde termotoleran *Bacillus subtilis*'i kullanarak SSF metoduyla α -amilaz üretimini göstermişlerdir. Buğday kepeğinde, pirinç kabuğuna nazaran daha yüksek bir aktivite gözlemlenmiştir. En yüksek enzim aktivitesini 24. saatte elde etmişlerdir.

Ellaïh ve ark. (2002), SSF metoduyla yeşil nohut kepeği, barbunya kepeği, mısır kepeği, mısır unu, arpa unu, soya unu ve pirinç kepeği gibi değişik substratlar kullanarak *Aspergillus sp. A3* tarafından glucoamilaz üretimini göstermişlerdir ve en yüksek aktiviteyi buğday kepeğinden elde etmişlerdir.

Haq ve ark. (2002), ekonomik bir besi yeri kullanarak *Bacillus licheniformis GCBU-8* tarafından α -amilaz üretimini tespit etmişlerdir. Bunun için; buğday kepeği, ayçiçeği unu, pamuk tohumu unu, soya fasulyesi unu, pirinç kabuğu ve pirinç kepeği kullanmışlardır. En iyi alfa-amilaz aktivitesini buğday kepeğinde yakalamışlardır.

Yeni seçilen fermantasyon ortamı 100 ml fosfat tamponunda (% w/v) % 1,25 buğday kepeği, %0,5 NB, % 1 pearl millet starch, % 0,5 laktoz, % 0,5 NaCl ve % 0,2 CaCl₂ konmaktadır. En yüksek aktivite bu fermantasyon ortamında elde edilmiştir.

Mulimani ve ark. (2000), SSF yöntemi ile *Gibberella fujikuroi* kullanarak değişik substratlar üzerinde α -amilaz üretmişlerdir. En yüksek aktiviteyi buğday kepeği üzerinde elde etmişlerdir. Ayrıca pirinç sapı ve pirinç kepeğinden de α -amilaz aktivitesi elde etmişler, bununla birlikte bunların karışımından elde edilen aktivitenin bunların tek tek kullanımından elde edilen aktiviteden daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. % 1 'lik karbon kaynakları ilavesinde en yüksek aktiviteyi laktozlu ortamda elde etmişlerdir. % 2,5 'lik azot kaynağı ilavesi yapmışlar ve en yüksek aktiviteyi amonyum sülfatlı ortamda elde etmişlerdir.

Krishna ve Chandrasekanan (1996), SSF yöntemiyle *Bacillus subtilis* CBTK 106 muz sapını substrat olarak kullanarak α -amilaz üretimini rapor etmişlerdir. Çalışmada parçacık büyüklüğünün, başlangıçtaki nem konsantrasyonunun, SSF ortamının pH'sının, inkübasyon sıcaklığının ve eklenen azot ve karbon kaynaklarının konsantrasyonlarının α -amilaz üretimi üzerine etkilerini incelemişlerdir. En uygun parçacık büyüklüğü 400 μ m, en uygun başlangıç nem konsantrasyonu % 70, en uygun SSF ortamının pH'sı 7, en uygun inkübasyon sıcaklığının 35 °C olduğunu rapor etmişlerdir. Azot kaynağı olarak % 1 'lik amonyum sülfat veya amonyum nitrat ve % 0,5'lik et özütü veya peptonun enzim sentezini uyardığı sonucuna varmışlardır. Karbon kaynağı olarak ise % 0,1'lik nişasta, maltoz, glukoz ve sukrozun enzim sentezini uyardığı sonucuna varmışlardır. Ayrıca % 1'lik NaCl ve KCl'nin enzim sentezini uyardığını da rapor etmişlerdir. En yüksek enzim aktivitesini 24. saat'te elde etmişlerdir. Bununla birlikte 24 saatten sonra enzim aktivitesinde bir azalmanın olduğunu tespit etmişlerdir.

Babu ve Satyanarayana (1995), SSF metodunda *Bacillus coagulans* B49 'la buğday kepeğinde termostabil α -amilaz üretimini rapor etmişlerdir. 24. saatten 120. saate kadar değişik inkübasyon sürelerinde aktivite tayini yapmışlardır ve en yüksek enzim aktivitesini 72. saatte elde etmişlerdir. 72. saatten sonra enzim aktivitesinde azalma görülmüştür.

Babu ve Satyanarayana (1995), SSF metoduyla *B. subtilis*, *B. polymyxa*, *B. mesentericus*, *B. vulgaris*, *B. megaterium* ve *B. licheniformis* tarafından α -amilaz üretimini rapor etmişlerdir.

Ramesh ve Lonsane (1991), SSF 'de *Bacillus licheniformis* M27 buğday kepeğinde değişik glukoz konsantrasyonlarının α -amilaz aktivitesi üzerine etkisine bakmışlar ve katabolik represyonun gerçekleşmediğini rapor etmişlerdir. En yüksek enzim aktivitesini % 20 glukoz konsantrasyonunda ve 72. saatte gözlemlemişlerdir. Ayrıca % 10'luk maltoz ve laktoz konsantrasyonlarında, 72. saatte kontrolden yüksek aktivite yakalamışlardır. Yine % 15 'lik glukoz konsantrasyonu içeren SSF metodunda % 0,2 'lik glukoz konsantrasyonu içeren SmF metoduna göre 15 kat daha fazla enzim aktivitesi yakalamışlardır.

Ramesh ve ark. (1990), *Bacillus licheniformis* M27 tarafından SSF yöntemiyle α -amilaz üretimi üzerine buğday kepeğinde nemin etkisine bakmışlar ve % 65 nem oranında ve 48. saatte en yüksek enzim aktivitesini yakalamışlardır.

Ramesh ve Lonsane (1987), topraktan izole ettikleri *Bacillus megaterium* 16M kullanılarak SSF metoduyla buğday kabuğu üzerinde α -amilaz üretimine tampon miktarının etkisi, pH'ın etkisi ve inkübasyon sıcaklığının etkisine bakmışlardır. En yüksek enzim aktivitesi pH 7 'de 24. saatte ve 2:1 oranında (buğday kepeği : tampon) elde etmişlerdir. Optimum enzim aktivitesini 70 °C ve pH 6 'da elde etmişlerdir.

Messaoud ve ark. (2004), *Bacillus subtilis* US116 tarafından üretilen α -amilazın, nişastayı parçalaması sonucu maltoheptoz ve maltoheksoz oluşmuştur. Saflaştırılmış enzimin optimum aktivitesini pH 6 ve 65 °C'de elde etmişlerdir. Enzimin yarı ömürlük süresi 70 °C'de 3 saat, 65 °C'de ise 5 saat civarında bulunmuştur. Bu enzimin molekül ağırlığı 60.000 dalton olarak bulunmuştur.

Kılıç ve Özbek (2004), mısır, pirinç ve buğday nişastasının enzimatik hidrolizi üzerinde sıcaklığın etkilerini *Bacillus sp.*, *A. oryzae* ve *Bacillus licheniformis* 'ten izole edilen ticari amilazlar üzerinde çalışmışlardır. α -Amilazın nişasta üzerindeki etkilerini 50-60 °C arasındaki sıcaklıklarda araştırmışlardır. Bu α -amilazlar içersinde *B. licheniformis*'ten elde edilen α -amilazın nişastanın hidrolizinde en etkili olduğu bulunmuştur. Bu enzim, en yüksek aktiviteyi 50-60 °C arasındaki sıcaklıklarda gösterdiğini belirtmişlerdir.

Arıkan ve ark. (2003), termostabil alkalın α -amilaz üreten *Bacillus sp. ANT-6* 'yı topraktan izole etmişlerdir. Bu enzim, pH 10,5 'de ve 80 °C 'de maksimum aktivite göstermiştir.

Kıran ve Çömlekçioğlu (2003), Zeytinli Ilıcası (Kahramanmaraş)'ndan su ve toprak örneklerinden 65 *Bacillus sp.* suşu izole edilmiştir. Bu suşların amilaz enzimi üretme yetenekleri araştırılmış ve buna göre en iyi aktivite gösteren tek bir suş seçilmiştir. İzole edilen *Bacillus sp. K-12* suşunun termofil, alkali amilaz üretme yeteneği araştırılmıştır. Kültür ortamının pH'sı 9.5, inkübasyon sıcaklığı ise 42 °C olarak belirlenmiştir. Pepton, maya özütü, et özütü ve amonyum sülfat içeren çeşitli azot kaynaklarının farklı konsantrasyonlarda, bu suşun amilaz enzimi üretme yeteneği üzerine etkisi incelenmiş, % 1,25 oranında maya özütü içeren kültür ortamında 48. saatte maksimum aktivite tespit edilmiştir.

Konsula ve ark. (2003), 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 görülmüştür.

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

Olesan ve ark. (2000), *Bacillus clausii BT-21*'den salgılanan α -amilazın molekül ağırlığını 101.000 dalton olarak bulmuşlardır.

Mamo ve ark. (1999), *Bacillus sp. WN11* suşu tarafından salgılanan AmyI ve AmyII diye adlandırılan değişik iki α -amilaz saflaştırmışlardır. Bunların sırasına göre molekül ağırlığı yaklaşık 76.000 ve 53.000 dalton olarak bulunmuştur. Her iki enzim de 75 °C ve 80°C 'de optimum aktivite göstermiştir.

Mc Tighe ve ark. (1995), alkofilik *Bacillus sp. IMD 370* tarafından salgılanan α -amilazın molekül ağırlığı yaklaşık olarak 159.000 dalton olarak bulmuşlardır.

Hamilton ve ark. (1999), *Bacillus sp. IMD 435*'de α -amilaz üretimini çalışmışlardır. Maksimum amilaz üretimi karbon kaynağı olarak % 4'lük laktoz ve azot kaynağı olarak % 2'lik yeast extract ihtiva eden bir besi yerinde elde etmişlerdir. Laktozlu ortamda amilaz üretimi fazla olmasına rağmen bakteri üretiminin az olduğu görülmüştür. Glukoz ve fruktoz ihtiva eden besi yerinde amilaz aktivitesinin görülmediğini rapor etmişlerdir.

Bolton ve ark. (1997), *Bacillus flavothermus* tarafından salgılanan α -amilazı saflaştırmışlar ve bu enzimin nişasta üzerinde maksimum aktiviteyi pH 5,5-6 ve 60 °C 'de olduğunu tespit etmişlerdir.

Agüloğlu (1996), değişik amino asit ve antibiyotiklerin *Bacillus subtilis* α -amilazının membrandaki sentezi ve salgılanması üzerine etkileri ve tripsinin α -amilaz üzerine olan proteolitik etkisini incelemiştir.

Schwermann ve ark. (1994), thermoasidofilik *Alicyclobacillus acidocaldarius ATCC 27009* suşundan α -amilaz üretimini tespit etmişlerdir. En yüksek enzim aktivitesini 75 °C'de ve pH 3'de elde etmişlerdir.

Anderson ve ark. (1983). termofil *Bacillus stearothermophilus 1518* tarafından salgılanan α -amilazın, nişasta pudingi içinde çok yüksek sıcaklıkta (143 °C) dirençli olduğunu belirtmişlerdir.

2. MATERYAL METOD

2.1. Biyolojik Materyal

Çalışmalarımızda biyolojik materyal olarak D.Ü.kampüsü toprak örneğinden izole edilen *Bacillus sp.* kullanıldı.

2.2. Kimyasal Maddeler

2.2.1. Azot kaynakları:

Bacto casamino acid ve bacto liver Difco'dan; amonyum sülfat, üre, NH₄Cl, NH₄NO₃ ve Methionin Merck Darmstag'dan temin edilmiştir.

2.2.2. Karbon kaynakları:

Nişasta, mannoz, glukoz, galaktoz, arabinoz ve sukroz Merck Darmstag'dan temin edilmiştir.

2.2.3. Besi Yeri Maddeleri:

Nutrient Broth OXOID'den ve agar ATABAY'dan temin edilmiştir.

2.2.4. Deterjanlar:

SDS, ve CHAPS (3-[(3 -Cholamido-propyl) – dimethylammonio] – propane-sulfonate), Merck Darmstag'dan, Omo Matik ticari olarak temin edilmiştir.

2.2.5. Elektroforetik Maddeler

Tris-Base[Tris(hydroxymetyl) amino methane], akrilamid, N-N-Metilen bisakrilanid, TEMED (N-N-N'-N'-Tetrametiletillen 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 Darmstag 'dan temin edildi.

2.3. Besi Yerleri

2.3.1. Sıvı besi yeri (Nutrient Broth [NB]) :

8 g NB ve distile su ile 1 litreye tamamlanıp otoklavlandı.

2.3.2. Katı besi yeri

8 g Nutrient Broth besi yerine 18 g agar ilave edilip distile su ile 1 litreye tamamlanıp otoklavlandı.

2.3.3. SSF besi yeri :

Muz kabukları kurutulduktan sonra bir blender yardımı ile parçalandı. Daha sonra 2000 µm'lik, 1500 µm'lik ve 1000 µm'lik eleklerde elendi. 1500 µm boyunda olanlar alındı. 1,5 g tartılıp üzerine 5 ml tampon (pH 8 Tris – HCl) eklenip (50 ml'lik erlenmayer içerisine) otoklavlandı .

2.4. Tamponlar

- Sitrik Asit tamponu: 0,1 M pH:4 pH:5 ve pH:6 hazırlandı.
- Tris-HCl tamponu: 0,1 M pH:7 , pH:8 ve pH:9 hazırlandı.
- Karbonat / Bikarbonat tamponu: 0,1 M pH:10,28 , pH: 10,83 hazırlandı.

2.5. Kullanılan Aletler:

- İnkübatör (Sanyo)
- Steril Kabin (Telstar AV-100)
- Spektrofotometre (Pharmaci 4 KB Novaspec II)
- Çalkalayıcı (Julobo)
- Soğutmalı Santrifüj (Sigma Christ 2K15)
- Vorteks (Stuart)
- Magnetik Karıştırıcı (Stuart)
- Deep-Freeze (Haris, -70 °C)
- Etüv (Heraus)
- Dijital Göstergeli Hassas Terazı (GEG, AVEY, 0,0001)
- Otoklav
- Su Banyosu (Grant 6G, -20, +100 °C)
- pH metre (Jenvay 3010, PCP J01 elektrod)
- Sterilizatör (Heraus)
- Blender (Waring)

2.6. Bakteri Üretimi:

NB (% 0,3 'lük nişasta) besi yerine, katı besi yerinden platin öze yardımıyla ekim yapıldı. Çalkalayıcıda 200 rpm'de 37 °C 'de 24 saat inkübe

edildi. 24 saat sonunda bu besi yerinden 1 ml alınarak önceden otoklavlanan SSF'ye ekim yapıldı.

2.7. Enzim Eldesi:

2.7.1. SSF besiyerinden :

24. saatten 144. saate kadar inkübasyon süresi sonunda SSF'li besi yeri üzerine 10ml pH 8 Tris- HCl tamponu eklendi. İyice karıştırıldı. Sonra steril gazlı bezle iyice süzöldükten sonra 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı enzim aktivite deneylerinde kullanıldı.

2.7.2. NB besiyerinden :

24 saat inkübasyon sonunda besi yeri 10.000 rpm 'de 5 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı enzim aktivite deneylerinde kullanıldı.

2.8. Enzim Aktivite Tayini (Bernfeld Yöntemi) :

Enzim aktivitesi Bernfeld yöntemiyle tespit edildi (Bernfeld, 1955). Bu yöntemde göre 100 µl enzim çözeltisi ve 200 µl % 0.5'lik nişasta çözeltisi (0,1 M pH 8 Tris-HCl tamponu içerisinde çözünmüş) 37 °C 'de 30 dakika inkübe edildi. Süre sonunda reaksiyonu durdurmak için, 400 µl DNS (3,5 dinitro salisilik asit) ilave edilerek 5 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. DNS düşük sıcaklıklarda indirgen şeker uçlarıyla reaksiyona girmediğinden, kaynar su banyosuna konuldu. 3,5 DNS sıcakta şekerlerin indirgen uçlarıyla reaksiyona girerek reaksiyonun durmasını sağladığı gibi aynı zamanda renk oluşumunu da sağlamaktadır. Daha sonra 3 ml distile su ile seyreltme yapılarak 489 nm 'de spektrofotometrik ölçüm yapıldı.

2.8.1. Bernfeld Reaktifinin Hazırlanması:

20 g 3,5 dinitro salisilik asit 400 ml distile su içinde çözöndü. Başka bir beherde 32 g / 300 ml NaOH çözeltisi magnetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Daha sonra yavaş yavaş 3,5 dinitro salsilik asit üzerine eklendi. Bir süre sıcak su banyosunda bekletildi. Sonra 600 g Na-K-Tartarat azar azar eklendi. Hacim saf su ile 2000 ml 'ye tamamlandı (Bernfeld, 1955).

2.9.Enzim Aktivitesi Üzerine Farklı SSF Kaynakları Etkisinin Araştırılması:

1500 µm boyunda olan muz kabuğu, karpuz kabuğu, kavun kabuğu, mercimek kepeği, buğday kepeği ve darı 1.5 g tartılıp her biri farklı 50 ml'lik erlenmayer içerisine konuldu. Üzerlerine 5 ml tampon (0,1 M pH 8 Tris- HCl) eklenip otoklavlandı.Daha sonra sıvı besiyerinden (NB) her birine 1'er ml bakteri ekimi yapıldı. Çalkalayıcıda 37 °C'de 200 rpm'de 72 saatlik inkübasyona bırakıldı. Sonra Bernfeld yöntemine göre α- amilaz aktivite tayini yapıldı.

2.10. Enzim Aktivitesi Üzerine Değişik İnkübasyon Sürelerinin Araştırılması:

1500 µm boyunda olan muz kabukları alındı. 1,5 g tartılıp üzerine 5 ml tampon (0,1 M pH 8 Tris – HCl) eklenip 6 farklı 50 ml'lik erlenmayer içerisine eklenip otoklavlandı. Daha sonra sıvı besiyerinden (NB) her birine 1'er ml bakteri ekimi yapıldı. Sonra 24. saatten 144. saate kadar her 24 saatlik süre sonunda Bernfeld yöntemine göre α-amilaz aktivite tayini yapıldı.

2.11. Enzim Aktivitesi Üzerine Karbon Kaynakları Etkisinin Araştırılması :

Nişasta, mannoz, glukoz, galaktoz, arabinoz ve sukroz 0.03 g (kuru ağırlığa göre % 2 oranında) tartılıp her biri ayrı ayrı steril tüplere konuldu. Her bir tüpün üzerine 1 ml steril tampon (0,1 M pH 8 Tris – HCl) ve sıvı besiyerinden 1 ml bakteri eklendi. Daha sonra bu 2 ml önceden otoklavladığımız SSF'ye ekim yapıldı. Çalkalayıcıda 37 °C'de 200 rpm'de 72 saatlik inkübasyona bırakıldı. Sonra Bernfeld yöntemine göre α- amilaz aktivite tayini yapıldı.

2.12. Enzim Aktivitesi Üzerine Azot Kaynakları Etkisinin Araştırılması :

1500 µm boyunda olan muz kabukları alındı. 1,5 g muz kabuğu ve 0.15 g (kuru ağırlığa göre % 10 oranında) bacto casamino acid, bacto liver, amonyum sülfat, üre, NH₄Cl ve NH₄NO₃ tartılıp her biri farklı 50 ml'lik erlenmayer içerisine konulup üzerine 5 ml tampon (0,1 M pH 8 Tris – HCl) eklenip otoklavlandı. Daha sonra 1ml bakteri ekimi yapıldı.

1,5 g 1500 µm boyunda olan muz kabukları tartılıp üzerine 4 ml tampon (0,1 M pH 8 Tris – HCl) eklenip (50 ml'lik erlenmayer içerisine) otoklavlandı. 0.15 g (kuru ağırlığa göre % 10 oranında) methionin ve 1ml steril tampon steril bir tüp içerisine konuldu. Sonra 1 ml bakteri eklendi ve SSF'ye ekim yapıldı.

Çalkalayıcıda 37 °C'de 200 rpm'de 72 saatlik inkübasyona bırakıldı. Sonra Bernfeld yöntemine göre α -amilaz aktivite tayini yapıldı.

2.13. Optimum pH Tayini:

Enzim olarak NB besi yerinden elde edilen üst sıvı kullanıldı. Substrat olarak kullandığımız nişasta % 0,5 'lik olacak şekilde sırasıyla sitrat asit (0,1 M pH 4, 5 ve 6), Tris-HCl (0,1 M pH 7, 8, ve 9) ve karbonat/bikarbonat (0,1 M pH 10, 11) tamponları içerisinde hazırlandı. Daha sonra Bernfeld yöntemine göre aktivite tayini yapıldı.

2.14. Optimum Sıcaklık Tayini:

Enzim olarak NB besi yerinden elde edilen üst sıvı kullanıldı. Daha sonra 25 °C 'den 5 °C'lik artan sıcaklık aralıklarıyla 95°C dereceye kadar Bernfeld yöntemine göre enzim aktivite tayini yapıldı.

2.15. 60 °C'de Zamana Bağlı Enzim Stabilite Tayini:

Enzim olarak NB besi yerinden elde edilen üst sıvı kullanıldı. Daha sonra 60 °C'de her 15 dakikalık aralıklarla 90. dakikaya kadar Bernfeld yöntemine göre enzim aktivite tayini yapıldı.

2.16. Enzim Aktivitesi Üzerine Deterjanların Etkisinin Araştırılması :

Enzim olarak NB besi yerinden elde edilen üst sıvı kullanıldı. % 0.5'lik deterjan çözeltileri hazırlandı (Kamini, 1998). Her bir tüpe 200 μ l deterjan çözeltisi, 200 μ l % 0.5'lik nişasta ve 100 μ l enzim çözeltisi ilave edildi. Sonra Bernfeld yöntemine göre, enzim aktivite tayini yapıldı.

2.17. Elektroforez

2.17.1. Nondenatüre Poliakrilamid Jel Elektroforezi (Laemmlı)

Çözeltiler:

% 30 Akrilamid / % 0,8 bis akrilamid : 30 g akrilamid, 0,8 g bis akrilamid saf su ile 100 ml 'ye tamamlanır, filtre edilir. Koyu renkli şişede 4 °C 'de saklanır.

1.5 M Tris.HCl pH 8,8: 54,45 g Tris-base 150 ml 'ye tamamlanır, 1N HCl ile pH 8.8'e getirilir hacim saf su ile 300 ml 'ye tamamlanır, filtre edilerek , 4 °C 'de saklanır.

0.5 M Tris. HCl pH 6,8: 6 g Tris-base 60 ml saf suda çözünür, 1N HCl ile pH 6,8 'e getirilir, hacim saf su ile 100 ml 'ye tamamlanır, filtre edilerek, 4 °C 'de saklanır.

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

Elektroforez Tamponu: 3 g Tris, 14,4 g glisin, 0.1 g SDS, 1000 ml saf su ilave edilerek hazırlanır. 4 °C 'de saklanır.

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 edilir. 1 'er ml olacak şekilde, ependorflara konarak -70 °C 'de saklanır.

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

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

İyot Solusyonu: 14mM KI ve 10mM I₂ saf su ile 50 ml'e tamamlanır.

2.17.1.1. Jelin Hazırlanması

Çalışmalarımızda % 10'luk jel kullanıldı. Ayırma jeli için, 3,3 ml akrilamid / bis akrilamid, 1,35 ml 0,1 M Tris. HCl (pH 8.8), 4.8 ml saf su, 75 µl % 10 'luk APS (Amonyum per sülfat), 7.5µl % 10'luk SDS, 660µl % 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 teması kesildi. Oda ısısında 30-60 dakika polimerizasyon gerçekleşti. Polimerizasyon gerçekleştikten sonra izopropanol distile su ile yıkandı. Kuyucukların oluşması için tarak yerleştirildi ve konsantrasyon jeli döküldü. Hava ile temasını kesmek için, üzerine izopropanol kondu. Oda sıcaklığında 30-45 dakika polimerizasyon gözlemlendi.

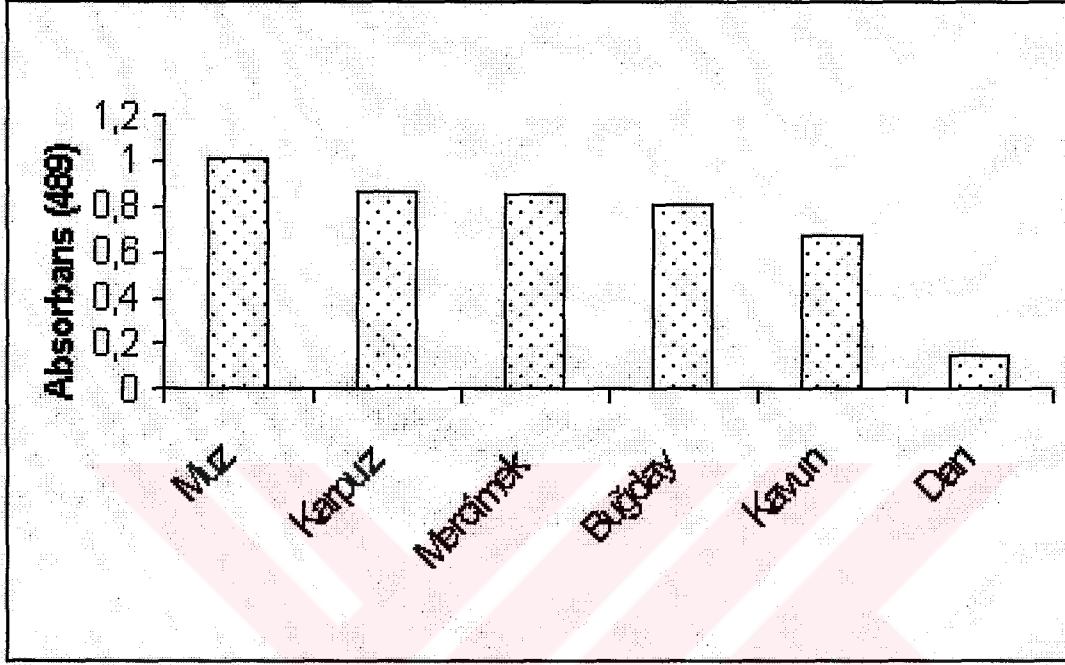
2.17.1.2. Elektroforez İşlemi

Standart protein, ticari alfa-amilaz (0,005 g / ml)'den 30 μ l ve 20 μ l alındı. Farklı ependorflar içerisine konulup üzerlerine 15'er μ l iz boya eklendi. Elektroforez yapılacağı zaman jelin üzerindeki su alındı. Numunelerin +4 °C'de 10.000 rpm'de 10 dakika'lık santrifüjden sonra üst sıvıdaki enzim çözeltisinden 40 μ l alıp bir ependorf içerisine konulup üzerlerine 15 μ l iz boya eklendi. Örnekler kuyucuklara konuldu. 1.00 mm'lik jele 40 mA akım verildi, ~2 saat sonra elektroforez işlemi tamamlandı. Camlar arasındaki jel çıkarıldıktan sonra, 1 saat 0.1 M Tris. HCl (pH 8)'de bekletildi. Sonra tampon çözeltisi dökülüp üzerine iyot solüsyonu eklenip yarım saat sonra incelemeye alındı (Laemmli, 1970; Matzka, 2000) .



3. BULGULAR

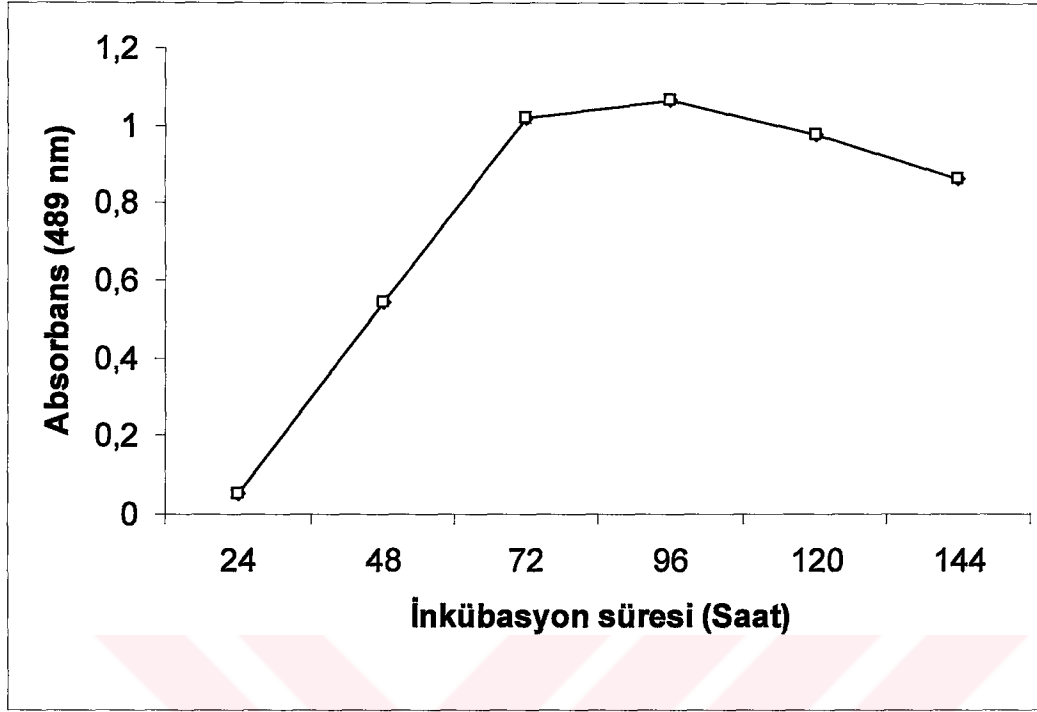
3.1. Farklı SSF Kaynaklarında *Bacillus sp.*'de α -Amilaz Aktivitesi



Şekil 3.1. Farklı SSF Kaynaklarında *Bacillus sp.*'de α -Amilaz Aktivitesi

Şekil 3-1'de görüldüğü gibi muz, mercimek, buğday, darı, karpuz ve kavun gibi farklı SSF kaynakları *Bacillus sp.* tarafından substrat olarak kullanılarak α -amilaz aktivite tayini yapılmış ve sırayla enzim üretimi açısından en fazla olandan en az olana doğru muz > karpuz > mercimek > buğday > kavun > darı olduğu tespit edilmiştir. En iyi sonuç muz kabuğu üzerinde elde edilmiş, en düşük sonuç ise darıda elde edilmiştir. Muz kabuğu üzerinde en yüksek aktivite yakalandığı için bundan sonraki çalışmalarımızda muz kabuğu substrat olarak kullanıldı.

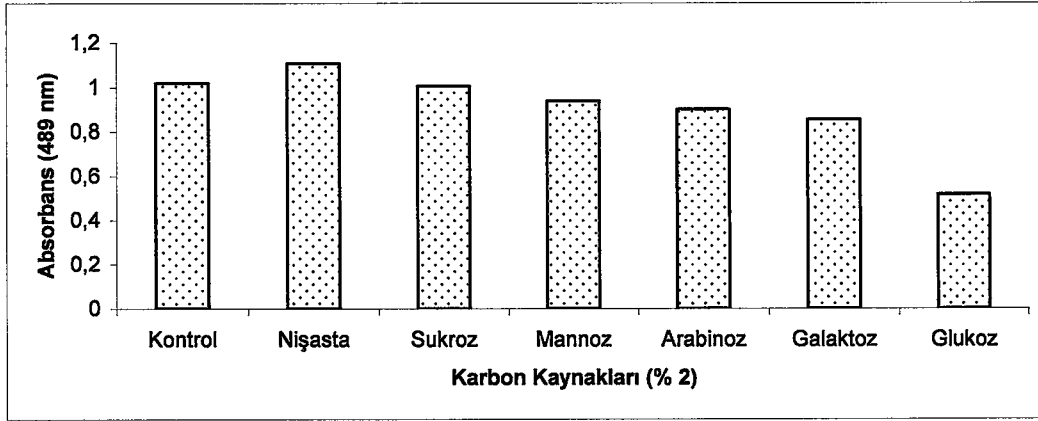
3.2. İnkübasyon Değişik Sürelerinde α -Amilaz Aktivite Tayini



Şekil 3.2. İnkübasyon Değişik Sürelerinde α -Amilaz Aktivite Tayini

Muz kabuğu üzerinde *Bacillus sp.* kullanarak değişik inkübasyon sürelerinde α -amilaz aktivite tayini yapılmıştır. Şekil 3-2’de görüldüğü gibi 24 ile 72. saatler arasında hızlı bir enzim aktivite artışı ve daha sonra 144. saate doğru gittikçe azalan bir eğilim göstermektedir. Bu yüzden inkübasyon süresi 72. saat olarak uygun görülmüştür.

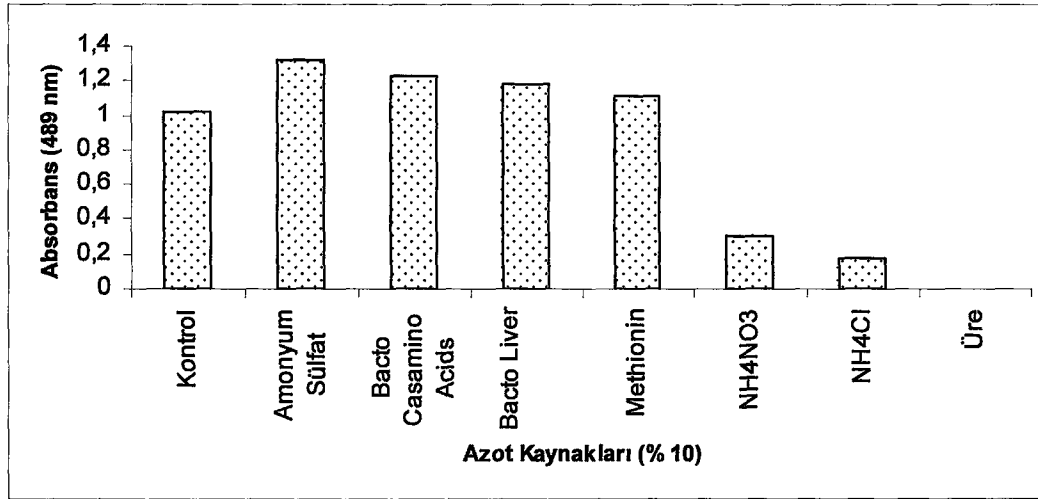
3.3. Farklı Karbon Kaynaklarında *Bacillus sp.*'de α -Amilaz Aktivitesi



Şekil 3.3. Farklı Karbon Kaynaklarında *Bacillus sp.*'de α -Amilaz Aktivitesi

Kuru ağırlığa göre farklı karbon kaynakları % 2 oranında eklenerek α -amilaz aktivite tayini yapılmıştır. Şekil3-3'de görüldüğü gibi kontrolle karşılaştırıldığında nişasta amilaz aktivitesini arttırmıştır. Sukroz kontrolle hemen hemen aynı çıkmıştır. Bununla birlikte mannoz, arabinoz, galaktoz ve glukoz kontrolden daha düşük bir aktivite göstermiştir. En yüksek aktivite nişastada en düşük aktivite glukozda elde edilmiştir.

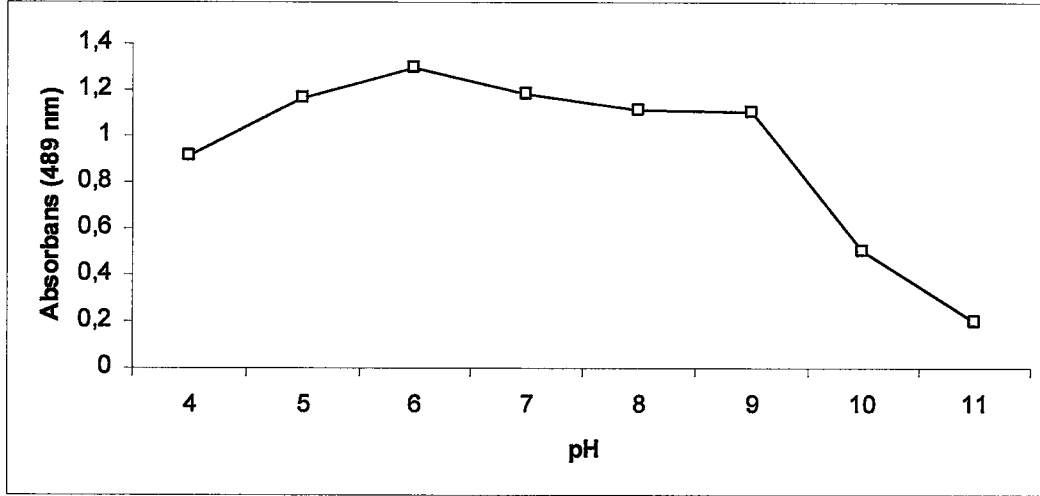
3.4. Farklı Azot Kaynaklarında *Bacillus sp.*'de α -Amilaz Aktivitesi



Şekil 3.4. Farklı Azot Kaynaklarında *Bacillus sp.*'de α -Amilaz Aktivitesi

Kuru ağırlığa göre farklı azot kaynakları % 10 oranında eklenerek α -amilaz aktivite tayini yapılmıştır. Şekil 3-4'de görüldüğü gibi kontrolle karşılaştırıldığında casamino acids, bacto liver, amonyum sülfat ve methionin kaynaklarında daha yüksek bir aktivite elde edilmiştir. Bunun yanında, NH₄Cl ve NH₄NO₃ kontrolden daha düşük bir aktivite göstermiştir. Üre'de ise aktivite görülmemiştir. En yüksek aktivite amonyum sülfatta en düşük aktivite NH₄Cl'de elde edilmiştir.

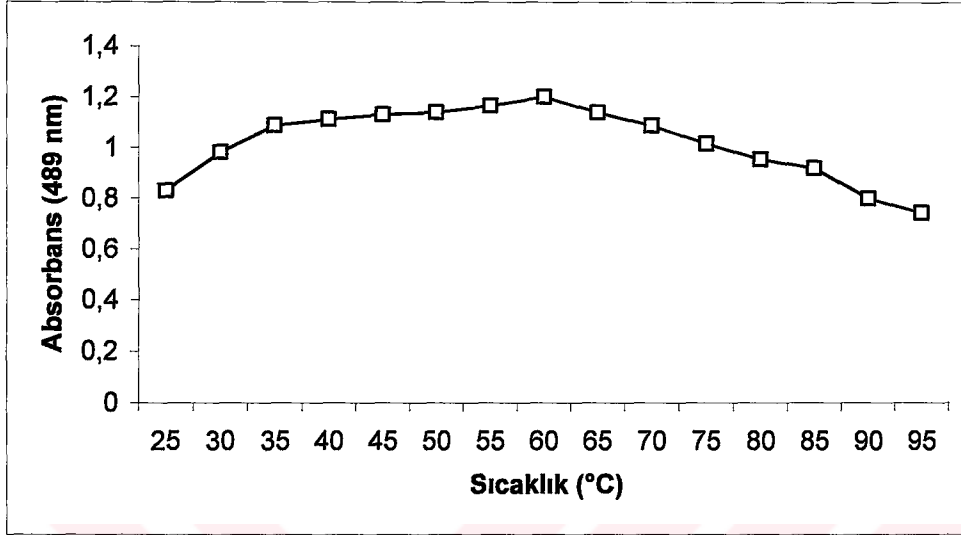
3.5. Değişik pH Değerlerinde α -Amilaz Aktivite Tayini



Şekil 3.5. Değişik pH Değerlerinde α -Amilaz Aktivite Tayini

NB (% 0,3'lük nişasta ihtiva eden) besiyerinde *Bacillus sp.* üretilerek 24. saatte besiyeri 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Üst sıvı (supernatant)'da pH 4 ile 11 aralığı test edilmiştir. Şekil 3-5'te görüldüğü gibi bu enzimin pH 4 ile 9 aralığında optimuma yakın aktivite gösterdiği görülmektedir. Optimum pH: 6 olarak tespit edilmiştir.

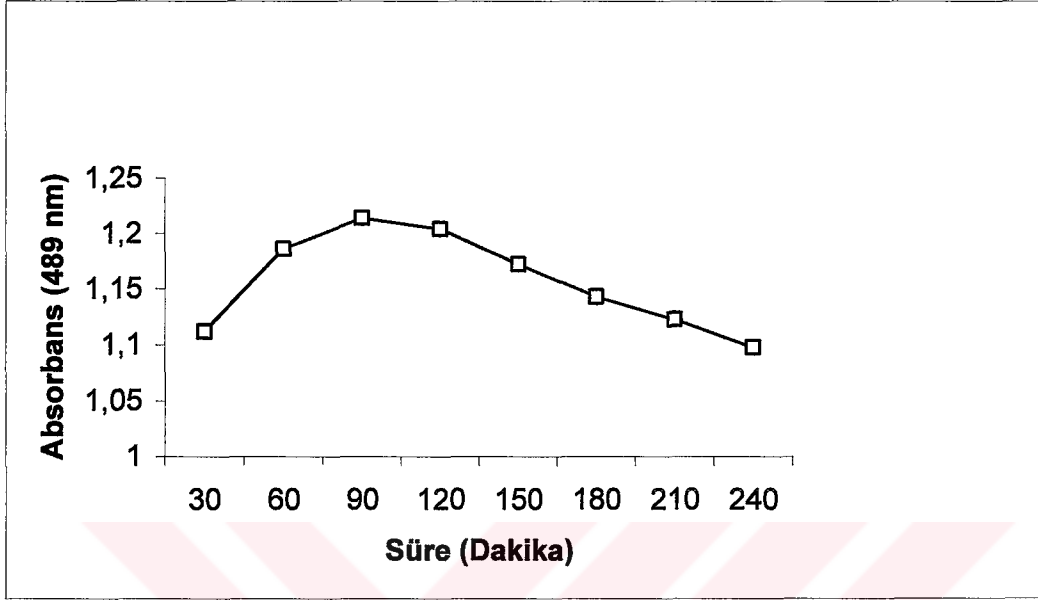
3.6. Değişik Sıcaklık Aralıklarında α -Amilaz Aktivite Tayini



Şekil 3.6. Değişik Sıcaklık Aralıklarında α -Amilaz Aktivite Tayini

NB (% 0,3'lük nişasta ihtiva eden) besiyerinde *Bacillus sp.* üretilerek 24. saatte besiyeri 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Üst sıvıda 25°C ile 95°C arasında α -amilaz aktivite testi yapıldı. Şekil 3-6'da görüldüğü gibi enzim 55°C - 65°C'de optimuma yakın aktivite gösterdiği görülmektedir. Optimum sıcaklık 60°C olarak tespit edilmiştir.

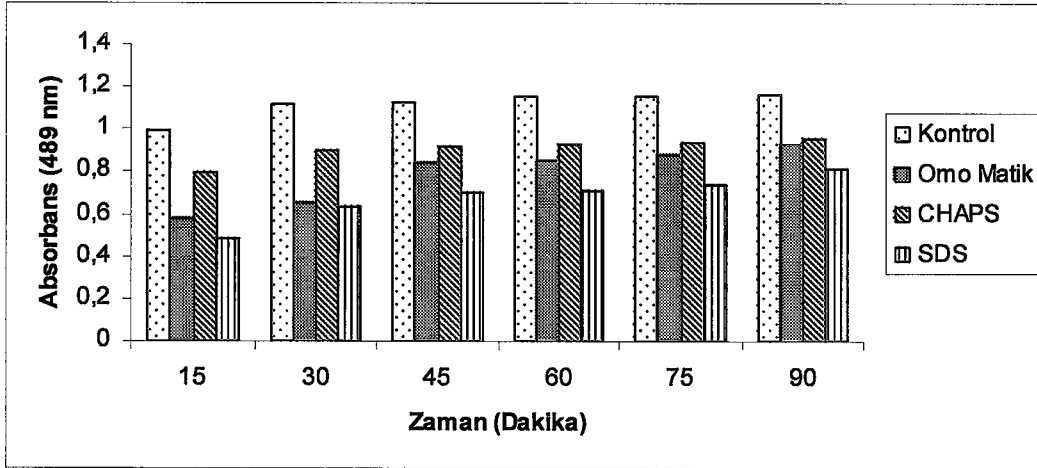
3.7. 60 °C'de Zamana Bağlı Enzim Stabilite Tayini



Şekil 3.7. 60 °C'de Zamana Bağlı Enzim Stabilite Tayini

NB (% 0,3'lük nişasta nişasta ihtiva eden) besiyerinde *Bacillus sp.* üretilerek 24. saatte besiyeri 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. 60°C'de zamana bağlı enzim stabilite ölçümü için 30 ile 240 dakika arasında α -amilaz aktivite testi yapıldı. Şekil 3-7'de görüldüğü gibi 30 dakika ile 90 dakika arasında enzim aktivitesinde bir artış gözlemlendi. 90 dakikadan sonra 240 dakikaya kadar olan zaman diliminde, enzim aktivitesinde dereceli bir azalma görülmektedir.

3.8. % 0,2'lik Deterjanların α -Amilaz Aktivitesi Üzerine Etkisi



Şekil 3.8. % 0,2'lik Deterjanların α -Amilaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

NB (% 0,3'lük nişasta ihtiva eden) besiyerinde *Bacillus sp.* üretilerek 24. saatte besiyeri 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Daha sonra % 2'lik deterjanların (SDS, Omo Matik ve CHAPS) enzim aktivitesi üzerine olan etkisi zaman bağı olarak 15 ile 90 dakikalık zaman aralığında α -amilaz aktivite tayinine bakılmış, Şekil 3-8'de görüldüğü gibi inhibisyon etkisi SDS > Omo Matik > CHAPS üzerinde olduğu görülmektedir.

3.9. α -Amilazın Elektroforetik Analizi:

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra yapılan incelemede *Bacillus sp.*'deki α – amilazın Resim-1'de görüldüğü gibi molekül ağırlığı 58.000 dalton'dan büyük olduğu tespit edildi.



4.TARTIŞMA SONUÇ

Krishna ve Chandrasekaran (1996), muz sapı ve buğday kepeği *Bacillus subtilis* CBTK 106 bakterisi tarafından substrat olarak kullanılarak SSF yöntemine göre α -amilaz üretimine bakmışlar ve muz sapında yaklaşık olarak buğday kepeğine oranla 2.76 kat daha fazla α -amilaz üretimi elde etmişlerdir.

Bu çalışmada ise muz, mercimek, buğday, darı, karpuz ve kavun *Bacillus sp.* bakterisi tarafından substrat olarak kullanılarak SSF yöntemine göre α -amilaz aktivitesi yapılmış ve enzim üretimi açısından en fazla olandan en az olana doğru Şekil-1'de görüldüğü gibi muz > karpuz > mercimek > buğday > kavun > darı olarak bulunmuştur. Bu bize muz kabuğunun *Bacillus sp.*'de α -amilaz üretimi için diğer substratlara nazaran daha uygun bir kaynak olduğunu göstermektedir.

SSF'de kullanılan başlıca substratlar pirinç, buğday, darı, mısır ve soya fasulyesidir. Bu çalışma ile muz kabuğunun da katı substrat olarak kullanılması büyük ölçüde endüstriyel enzimlerin üretilmesini ve ayrıca çevre sorunlarına yol açan bu atıkların, hem ekonomik hem de güvenli şekilde değerlendirilebileceğini göstermektedir.

Ramachandra ve ark. (2004), COC (Coconut oil cake) *Aspergillus oryzae* tarafından substrat olarak kullanılarak, SSF yöntemiyle en yüksek α -amilaz üretiminin 72. saatte olduğunu tespit etmişlerdir.

Mulimani ve ark. (2000), SSF yöntemiyle, *Gibberella fujikuroi* tarafından buğday kepeği substrat olarak kullanılarak en yüksek α -amilaz aktivitesinin 120. saatte elde edildiğini tespit etmişlerdir.

Babu ve Satyanarayana (1995), SSF yöntemiyle *Bacillus coagulans* B49 bakterisini kullanarak buğday kepeğinde 24. saatten 120. saate kadar değişik inkübasyon sürelerinde α -amilaz aktivite tayini yapmışlar, en yüksek enzim aktivitesini 72. saatte yakalamışlardır.

Bu çalışmada ise muz kabuğu üzerinde *Bacillus sp.* kullanılarak değişik inkübasyon sürelerinde α -amilaz üretiminin tespiti için aktivite tayini yapılmıştır. Sonuçta Şekil 3-2'de görüldüğü gibi 24. saat ile 72. saatler arasında hızlı artan bir enzim aktivitesi görülmüş ve daha sonra 144. saate doğru gittikçe azalan bir eğilim göstermektedir. Bu yüzden inkübasyon süresi 72. saat olarak tespit edilmiştir. Genelde SSF yönteminde alfa-amilaz üretiminin en fazla olduğu süre 24. saat ile 48. saatlerdir (Lonsane ve Ramesh , 1990).

Ramachandra ve ark. (2004), COC (Coconut oil cake) *Aspergillus oryzae* tarafından substrat olarak kullanılarak, SSF yöntemiyle % 2 şeker ilavesinden sonra özellikle nişastanın α -amilaz aktivitesini arttırdığı ve sukrozun enzim aktivitesinde hiçbir etkisinin olmadığını tespit etmişlerdir.

Mulimani ve arkadaşları, (2000) SSF yöntemiyle *Gibberella fujikuroi* tarafından buğday kepeği substrat olarak kullanılarak % 1'lik glukozun kontrolden düşük çıktığını tespit etmişlerdir.

Krishna ve Chandrasekanon (1996), muz sapı *Bacillus subtilis* CBTK 106 tarafından substrat olarak kullanılarak, SSF yöntemiyle % 0.1'lik nişasta eklentisinin α -amilaz sentezini uyardığını tespit etmişlerdir. Ayrıca glukoz ilavesinde α - amilaz aktivitesinin görülmediğini tespit etmişlerdir.

Bu çalışmada ise kuru ağırlığa göre karbon kaynakları % 2 oranında eklenerek α -amilaz aktivite tayinine bakılmıştır. Çalışmada Şekil 3-3'te görüldüğü gibi nişasta varlığında en yüksek aktivite elde edildi. Sukroz kontrolle yakın, bununla birlikte mannoz, arabinoz, galaktoz ve glukozun kontrole göre enzim üretimini düşürdüğü gözlemlendi. Yüksek aktivitenin sukroz ve nişastanın α -amilazla hidrojen bağı yapma özelliklerine sahip olmalarıyla açıklayabiliriz. Buna karşın, düşük molekül ağırlıklı şekerlerin represyondan dolayı α -amilaz sentezini yavaşlattığı düşünülmektedir (Baysal, 2003).

Ramachandra ve ark. (2004), COC (Coconut oil cake) *Aspergillus oryzae* tarafından substrat olarak kullanılarak SSF yöntemiyle azot kaynağı olarak % 1'lik amonyum sülfatın α -amilaz aktivitesini uyardığını tespit etmişlerdir.

Mulimani ve ark. (2000), SSF yöntemiyle *Gibberella fujikuroi* tarafından buğday kepeği substrat olarak kullanılarak azot kaynağı olarak % 2.5'lik amonyum sülfat ilavesinde en yüksek α -amilaz aktivitesi elde etmişlerdir.

Pederson ve Nielsen (2000), Babu ve Satyanarayana, (1993) besiyeri ortamında, bakterilerin protein, peptid ve pepton gibi bileşenleri kullanarak ekzo enzim sentezinin arttığı gözlemlenmiştir. Bununla birlikte organik ve kompleks azot kaynaklarının inorganik azot kaynaklarına nazaran amilaz üretimini arttırdığı belirlenmiştir.

Krishna ve Chandrasekanon, (1996) muz sapı *Bacillus subtilis* CBTK 106 tarafından substrat olarak kullanılarak SSF yöntemiyle azot kaynağı olarak % 1'lik amonyum sülfatın α -amilaz aktivitesini arttırdığını tespit etmişlerdir.

Bu çalışmada ise kuru ağırlığa göre farklı azot kaynakları % 10 oranında eklenerek α -amilaz aktivite tayinine bakılmıştır. Şekil 3-4'de görüldüğü gibi kontrolle karşılaştırıldığında casamino acids, bacto liver, amonyum sülfat ve methionin kaynaklarında daha yüksek bir aktivite elde edilmiştir. Bunun yanında NH_4Cl , NH_4NO_3 kontrolden daha düşük bir aktivite göstermiştir. Üre'de ise aktivite görülmemiştir. Casamino acid, bacto liver ve methioninde α -amilaz aktivitesinin daha yüksek çıkması, enzim sentezi sırasında bakterinin organik azot kaynaklarını kullanarak ekzoenzim sentezini artırması ile açıklanabilir.

Messaoud ve ark. (2004), *Bacillus subtilis US116* tarafından salgılanan α -amilazın optimum pH'sını 6 olarak tespit etmişlerdir.

Soni ve ark. (2003), *Bacillus sp. SAI* ve *Aspergillus sp. AS-2'* de SSF yöntemiyle elde ettikleri α -amilazın optimum pH'sını 6 olarak tespit etmişlerdir.

Hamilton ve ark. (1999), *Bacillus sp. IMD 435* tarafından salgılanan α -amilazın optimum pH'sı 6 olarak tespit edilmiştir.

Bolton ve ark. (1997), *Bacillus flavothermus* tarafından salgılanan α -amilazı saflaştırmışlar ve bu enzimin maksimum aktiviteyi pH 5.5-6'da gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Bacillus sp.'nin üretildiği NB ortamında α -amilaz aktivitesi 4 ile 11 aralığında test edilmiştir. Enzim Şekil 3-5'te görüldüğü gibi pH 4 ile 9 aralığında optimuma yakın aktivite gösterdiği görülmektedir. Optimum pH 6 olarak tespit edilmiştir. Enzim pH 6-9 aralığında yüksek aktivite gösterdiğinden çeşitli endüstri dallarında kullanılabilme potansiyeline sahiptir. Örneğin pH 9 gibi alkali ortamda yüksek aktiviteye sahip olduğundan deterjan sanayinde kullanılabileceği aşikardır.

Kılıç ve Özbek (2004), mısır, pirinç ve buğday nişastasının enzimatik hidrolizi üzerinde sıcaklığın etkilerini *Bacillus sp.*, *A. oryzae* ve *Bacillus licheniformis*'ten izole edilen ticari amilazlar üzerinde çalışmışlar ve optimum aktiviteyi 50-60 °C arasındaki sıcaklıklarda olduğunu tespit etmişlerdir.

Messaoud ve ark. (2004), *Bacillus subtilis US116* tarafından salgılanan α -amilazın optimum sıcaklığının 65 °C olduğunu tespit etmişlerdir.

Hamilton ve ark. (1999), *Bacillus sp. IMD 435* tarafından salgılanan α -amilazın optimum sıcaklığını 65 °C olarak tespit etmişlerdir.

Bolton ve ark (1997), *Bacillus flavothermus* tarafından salgılanan α -amilazın optimum sıcaklığını 60 °C olarak tespit etmişlerdir.

Bu çalışmada ise NB (% 0,3'lük nişasta ihtiva eden) besiyerinde 24 saat üretilen *Bacillus sp.*'nin üst sıvısında 25°C ile 95°C arasında α - amilaz aktivite testi yapıldı. Enzimin, Şekil 3-6'da görüldüğü gibi 55°C - 65°C'de optimuma yakın aktivite gösterdiği görülmektedir. Optimum sıcaklık, 60°C olarak tespit edilmiştir. Yüksek sıcaklıklara dayanıklı olduğundan enzim nişastanın şekerleştirilmesinde, deterjan sanayinde, kağıt sanayisinde ve tekstil sanayinde kullanılabilir.

Bacillus licheniformis mezofilik bir bakteridir (Kandra, 2003). Bu bakteriden salgılanan α - amilazın yüksek sıcaklıklarda aktiviteye sahiptir. Bizim çalıştığımız *Bacillus sp*' de mezofilik bir bakteri olmasına rağmen salgılanan α - amilaz benzer şekilde yüksek sıcaklıklarda aktivite göstermektedir.

Messaoud ve ark. (2004), *Bacillus subtilis US116* tarafından salgılanan α -amilazın yarı ömürlük süresini 70 °C'de 3 saat 65 °C'de 5 saat civarında olduğunu tespit etmişlerdir.

Soni ve ark. (2003), *Bacillus sp. SAI* ve *Aspergillus sp. AS-2*' de buğday kepeği üzerinde SSF yöntemiyle elde ettikleri α - amilazın yarı ömürlük süresini 50 °C'de 50 dakika, 65 °C'de 40 dakika, 70 °C'de 30 dakika ve 75 °C'de 15 dakika civarında olduğunu tespit etmişlerdir.

Bu çalışmada, 60°C'de zamana bağlı enzim stabilite ölçümü için 30 ile 240 dakika arasında α - amilaz aktivite testi yapıldı. Şekil 3-7'de görüldüğü gibi 30 dakika ile 90 dakika arasında enzim aktivitesinde bir artış gözlemlendi. 90 dakikadan sonra 240 dakikaya kadar olan zaman diliminde enzim aktivitesinde dereceli bir azalma görülmektedir. En yüksek aktivite 90. dakikada olup 240 dakika sonunda enzim aktivitesinde çok az bir kaybın olduğu görülmüştür.

% 2'lik deterjanların (SDS, omo matik ve CHAPS) enzim aktivitesi üzerine olan etkisi zamana bağlı olarak 15 ile 90 dakikalık zaman aralığında test edilmiştir. Şekil 3-8'de görüldüğü gibi SDS'de, kontrole göre, 15. dakikada % 51.5'lik bir inhibisyon görülürken 90. dakikada % 30.2'lik bir inhibisyon görülmüştür. CHAPS'da 15. dakikada, kontrole göre % 26.5'lik bir inhibisyon görülürken 90. dakikada % 17.3'lük bir inhibisyon görülmüştür. Omo Matik'te 15. dakikada kontrole göre % 41.6'lık bir inhibisyon görülürken 90. dakikada

% 20.2'lik bir inhibisyon görülmüştür. Sonuçta bakteriyal amilazın deterjanlar ile etkileşiminde, artan süre ile beraber önemli bir stabilite kazandıkları görülmüştür. Enzimin stabilite testi ve deterjanların etkisi üzerine yapılan testlerden görüleceği gibi ticari olarak deterjan sanayinde kullanılabileceği görülmektedir.

Messaoud ve ark (2004), *Bacillus subtilis US116* tarafından üretilen α -amilazın, molekül ağırlığını 60.000 dalton olarak bulmuşlardır.

Olesan ve ark. (2000), *Bacillus clausii BT-21*'den salgılanan α -amilazın molekül ağırlığını 101.000 dalton olarak bulmuşlardır.

Mamo ve ark. (1999), *Bacillus sp. WN11* suşu tarafından salgılanan AmyI ve AmyII diye adlandırılan değişik iki α -amilaz saflaştırmışlardır. Bunların sırasına göre molekül ağırlığını yaklaşık 76.000 ve 53.000 dalton olarak bulmuşlardır.

Mc Tighe ve ark (1995), alkofilik *Bacillus sp. IMD 370* tarafından salgılanan α -amilazın molekül ağırlığını yaklaşık olarak 159.000 dalton olarak bulmuşlardır.

Yaptığımız non-denatüre poliakrilamid jel elektroforezi deneyinde jel(pH 8.8) içerisine nişasta ekledik. Diğer taraftan elektroforez işlemi sonunda jelimizi iyot solüsyonu içerisine bıraktık. İyot solüsyonu nişasta ile mor renk oluşturduğu bilinmektedir. Bu prensipten yola çıkarak kuyucuklara yerleştirdiğimiz standart α -amilazlar ve *Bacillus sp.* amilazının (pH 6-9 optimuma yakın aktivite) ilerledikleri yerlerde kısmen nişasta parçalandığı için renk oluşumunu hafif açık ancak elektroforez işlemi sonunda standart amilazların ve *Bacillus sp.* amilazının bulunduğu yerler daha açık olduğu görüldü. Bu da, enzimin yer aldığı bant kısmında nişasanın parçalandığı ve iyotla boyanmanın söz konusu olmadığını göstermektedir. Resim-1'de standart amilazlar ile *Bacillus sp.* amilazını karşılaştırdığımızda enzimimizin molekül ağırlığının 58.000 dalton'dan daha ağır olduğunu tespit ettik.

5.KAYNAKLAR

AGÜLOĞLU S. ; Doktora Tezi, D.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, 1996

AKKAYA E.U. ; Bilim ve Teknik, p.74-80, 1999

ANDERSON J.E., ADAMS D.M., WALTER JR. W.M., Condition under which bacterial amylases survive ultrahigh temperature sterilization; Journal of Food Science, vol.48,1983

ARIKAN B., UNALDI N., CORAL G., ÇOLAK Ö, ASHABİL 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, vol. 38, p.1397-1403, 2003

BABU K.R., SATRANARAYANA T. Production of bacterial enzymes by solid state fermentation; Journal of Scientific Industrial Research, vol. 55 pp.464-467, 1996

BABU K.R., SATRANARAYANA T. α -Amylase production by thermophilic *bacillus coagulans* in solid state fermentation; Process Biochemistry, vol. 30, pp.305-309, 1995

BABU K.R., SATRANARAYANA T. Parametric optimization for extracellular alpha amylase production by thermophilic *Bacillus coagulans B49*; Folia Microbiol., vol. 38 (1) p. 77-80, 1993

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

BAYSAL Z., UYAR F., AYTEKİN Ç. Solid state fermentation for production of α -amylase by a thermotolerant *Bacillus subtilis* from hot-spring water ; Process Bioche., vol. 38 p,1665-1668 2002

BAYSAL Z., UYAR F., AYTEKİN Ç. Production of α -amylase by thermotolerant *Bacillus subtilis* in the presence of some carbon, nitrogen containing compounds and surfactants ; Annals of Microbiology, vol. 53 (3) p.323-328, 2003

BERNFELD P.; Enzymes carbohydrate metabolism, In Methods In Enzymology Academic Press, vol.17 p.149-158, 1955

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

BİLGEHAN H.; Özel Bakterioloji ve Bakteri Enfeksiyonları, Barış Yayınları Fakülteler Kitapevi, p. 317, 1986

BOLTON D.J., KELLY C.T., FOGORTY W.M. Purification and characterization of the α -amylase of *Bacillus flavothermus* ; Enzyme and Microbial Technology, vol. 20 p. 340-343, 1997

CARMELO V., FLÓRIDO A., VINHAS I., ROSEIRO J.C. Physiological responses of *Bacillus stearothermophilus* continuous culture to carbon source concentration and temperature shifts ; Process Biochemistry, vol. 38 p. 763-770, 2002

ELLAIAH P., ADINARAYANA K., BHAVANI Y., PADJAMA P., SRINIVASULUB. Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly *Aspergillus* species ; Process Bioche., vol. 38 p. 615-620, 2002

DAĞAŞAN L.; Marmara Araştırma Merkezi, Lisans Üstü Yaz Okulu (E.M.T.U) Enzim Mühendisliğinde Temel Konular ve Uygulamalar, Bölüm 15, 1997

GÖZÜKARA E.M.; Biokimya, Nobel Tıp Kitabevleri; s. 225, 577 ANKARA,1989

GUPTA R., GIGRAS P., MOHAPATRA H., GOSWAMÍ V.K., CHAUHAN B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective ; Enzyme and Technology, vol. 38 p. 1599-1616, 2003

HAQ I., ASHRAF H., JAVED I., QADEER M.A. Production of alpha amylase by *Bacillus licheniformis* using an economical medium; Bioresource Technology, vol. 35 p. 57-61, 2003

HAMILTON L.M., KELLY C.T., FOGARTY W.M. Production and properties of the starch-digesting α -amylase of *Bacillus sp. IMD 435*; Process Biochemistry, vol. 35 p. 27-31, 1999

HORIKOSHI K. Alkaliphiles-from an industrial point of view ; FEMS Microbiology Reviews, vol. 18 p. 259-270, 1996

KAMINI N.R., MALA J.G.S., PUVANAKRISHNAN R. Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake ; Process Biochemistry, vol. Pp. 505-511, 1998

KANDRA L. α -Amylases of medical and industrial importance; Journal of Molecular Structure(Teochem) 666-667 p. 487-498, 2003

KILIÇ APAR D., ÖZBEK B. α -Amylase inactivation by temperature during starch hydrolysis Process Biochemistry, vol.39, p. 1137-1144, 2004

KIRAN E.Ö., ÇÖMLEKÇİOĞLU U. Zeytin İlçası (Kahramanmaraş)'ndan termofil alkalifilik amilolitik *bacillus sp.* suşlarının izolasyonu ve amilaz üretme yetenekleri üzerine azot kaynaklarının etkisi; KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi, 6(2), s. 41-48, 2003

KONSULA Z., LIAKOPOULOU M. α -Amylase hidrolisis of starches by the action an α -amylase from *Bacillus subtilis* ; Process Biochemistry, vol.39 p. 1745-1749, 2003

KRISHA C. CHANDRASEKARAN M. Banana waste as substrate for α -amylase production by *Bacillus subtilis* (CBTK 106) under solid-state fermentation ; Microbial Biotechnol., vol. 46 p. 106-111 1996

LAEMMLI U.K., Nature, vol.227, p. 680-685, 1977

LONSANE B.K., RAMESH M.V. Production of bacterial thermostable α -amylase by solid-state fermentation: a potential tool for achieving economy in enzyme production and starch hydrolysis; Advances in Applied Microbiology, vol. 35 p.1-56, 1990

MAMO G., GESSESSE A., Purification and characterization of two raw- starch – digesting thermostable α -amylase from a thermophilic *Bacillus*; Enzyme and Microbial Technology, vol. 25 p. 433-438, 1999

MATZKA J.; FEMS Microbiology Proteins, vol.183 p.55-61, 2000

Mc TIGUE M.A., KELLY C.T., DOGLE E.M., FOGARTY W.M.; The alkaline amylase a alkalophilic *Bacillus sp. IMD 370* Enzyme and Microbial Technology, vol. 17 Issue 6 p. 570-573, 1995

MESSAOUD E.B., ALI B.M., ELLEUCH N., MASMOUDI N.F.,BEJAR S. Purification and properties of a maltaheptaose- and maltohexaose-forming amylase produced by *Bacillus subtilis US116* ; Enzyme and Microbial Technology, vol. 34 p. 662-666, 2004

MULIMANI V.H., PATIL G.N. α -Amylase production by solid state fermentation: a new practical approach to biotechnology courses ; Biochemical Education, vol.28 p. 161-163, 2000

OLESAN L.D., KRAGH K.M., ZIMMERMANN W.; Purification and characterisation of a malto-oligosaccharide forming amylase active at high pH from *B. Clausii BT-21* Carbohydrate Research, vol. 329 Issue 1, p.97-107, 2000

OOIJKAAS L.P., WEBER F.J. BUITELAAR R.M., TRAMPER J., RINZEMA A. Defined media and inert support: their potential as solid-state fermentation production systems ;Tibtech., vol.18 p.356-360, 2000

PANDEY A. Solid-state fermentation ; Bioche. Engineering Journal, vol. 13 p. 81-84, 2003

PEDERSON H., NIELSEN J. The influence of nitrogen sources on the α -amylase productivity of *Aspergillus oryzae* in continuous cultures ; Microbial Biotechnol., vol. 53 p. 278-281, 2000

RAMACHANDRA S., PATEL K.A., NAMPOOTHIRI M.K., FRANCIS F., NAGY Y., SZAKACS G., PANDEY A. Coconut oil cake-a potential raw material for the production of α -amylase ; Bioresource Technology, vol..39 p.169-174, 2004

RAMESH M.V., LONSANE B.K. Ability of a solid state fermentation technique to significantly minimize catabolic repression of α -amylase production by *Bacillus licheniformis M27* ; Microbial Biotechnol., vol.35 p. 591-593, 1991

RAMESH M.V., LONSANE B.K. Critical importance of moisture content of the medium in alpha-amylase production by *Bacillus licheniformis M27* in a solid-state fermentation system; Microbial Biotechnol., vol.33 p. 501-505, 1990

RAMESH M.V., LONSANE B.K. Solid -state fermentation for production of α -amylase by *Bacillus megaterium 16M*; Biotechnol. Letters, vol. 9 No: 5 p. 323-328,1987

ROBYT J.F. Mechanism and Product Specificity of α -Amylases, Denpun Kagaku, vol.36 p.287-301, 1989

SCHWERMANN B., PFAU K., LILIENSIEK B.,SCHLEYER M., FISCHER T., BAKKER E. Purification, properties and structural aspects of a thermoacidophilic alpha- amylase from *Alicyclobacillus-acidocaldarius* ATCC-27009-insght into acidostability of proteins ; European Journal of Biochemistry, vol. 226(3) p.981-991, 1994

SINNOTT M.L.; Catalytic Mechanisms of Enzymic Glycosyl Transfer, chem. Rev. vol. 990 p.1171-1202, 1990

SOCCOL C.R., LUCIANA P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil; Biochemical Engineering Journal, vol. 13 p.203-218, 2003

SONI K.S., KAUR A., GUPTA J.K. A solid state fermentation based bacterial α -amylase and fungal glucoamylase system and its suitability for hydrolysis of wheat starch Process Biochemistry, vol. 39 p. 185-192, 2003

SOMERS W.A.C., KOENEN P.H.M., ROIZE H.J., VISSER J., RIET K., ROMBOOTS F.M.; Isolation of α -amylase on Crosslinked Starch, Enzyme and Microbial Technology, vol.17 p. 56-62, 1995

TELEFONCU A.; Biyoteknoloji, s. 1-4, Ege Üniversitesi Fen- Edb. Fak. Yayınları No:159 İzmir, 1996

TOKULLUGİL A., GÜR E., DIRİCAN M., TUNCEL P., ULUKAYA E., ÖZYENER F., KURT A., CANGÜL H.; Klinik Biyokimya, bölüm 12, p. Nobel & Güneş Tıp Kitabevi s. 180, 1998



6. RESİMLER

Kuyucuklar: 1 2 3 4 5 6 7 8 9



Resim 1: NB besi yerinde 24 saat 37 °C 200 rpm’de üretilen *Bacillus sp.*’nin üst sıvı elektroforez bant profilleri.

Soldan sağa sırayla: 0.005g / ml’lik ticari α -amilaz (58.000 Dalton) 30 μ l (1-3) ve 20 μ l (5), *Bacillus sp.* amilazı (6,8)

7. ÖZGEÇMİŞ

15.07.1977 Yılında Gaziantep'in Nizip ilçesinde doğdum

1984-1989 Nizip Cumhuriyet İlkokulu'nda okudum

1989-1996 Nizip Hasan Çapan Anadolu Lise'sinde okudum

1998-2002 D.Ü. Fen-Edb. Fak. Biyoloji Bölümünde okudum

2002 D.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dal'ında Yüksek Lisans Programını kazandım.

