

28357

TOPRAK VE SU ÖRNEKLERİNDEN AMİLOLİTİK BAKTERİ VE  
MAYALARIN İZOLASYONU, TANIMLANMALARI VE BAZI  
ENZİMATİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ  
ÖZERİNE BİR ARAŞTIRMA

**Nedim ALBAYRAK**

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
GIDA BİLİMİ VE TEKNOLOJİSİ  
ANABİLİM DALI  
1993

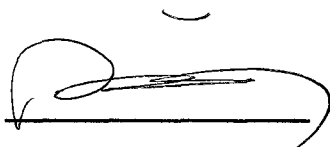
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TOPRAK ve SU ÖRNEKLERİNDEN AMİLOLİTİK  
BAKTERİ VE MAYALARIN İZOLASYONU,  
TANIMLANMALARI ve BAZI ENZİMATİK  
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ  
ÜZERİNDE BİR ARAŞTIRMA

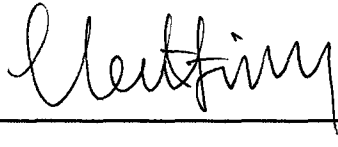
NEDİM ALBAYRAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
GIDA BİLİMİ VE TEKNOLOJİSİ  
ANABİLİM DALI

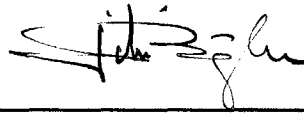
Bu tez 27 / 09 / 1993 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından  
..Doksanbeş..(.95.) not taktir edilerek Oybirligi/ Oyçokluğu  
ile kabul edilmiştir.



Doç.Dr.Sedat Dönmez  
(Danışman)



Prof.Dr.Velittin GÜRGÜN



Prof.Dr. Fikri BAŞOĞLU

## ÖZET

## YÜKSEK LİSANS TEZİ

TOPRAK VE SU ÖRNEKLERİNDEN AMİLOLİTİK BAKTERİ  
VE MAYALARIN İZOLASYONU, TANIMLANMALARI VE  
BAZİ ENZİMATİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ  
ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA

NEDİM ALBAYRAK

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Gıda Bilimi ve Teknolojisi Anabilim Dalı

Danışman : Doç.Dr. Sedat DÖNMEZ  
1993, Sayfa: 74  
Jüri : Doç.Dr. Sedat DÖNMEZ  
Prof. Dr. Velittin GÜRGÜN  
Prof. Dr. Fikri BAŞOĞLU

Bu çalışmada, bazı toprak ve su örneklerinden amilolitik bakteri ve mayalar izole edilerek, bunların amilaz enzimlerinin özellikleri araştırılmıştır.

Çalışmalarda izole edilen 10 maya ve 49 bakteri izolatından 17 bakterinin amilolitik aktivite gösterdiği anlaşılmıştır.

Sıvı ve katı ortamlarda yapılan amilolitik aktivite ölçümlerinde: doğal sıcak su ve toprak örneklerinden izole edilen bakterilerin, diğerlerine kıyasla, daha fazla aktivite gösterdikleri ve yüksek aktivite gösteren izolatların çoğunun Bacillus cinsine ait olduğu belirlenmiştir.

Sıcak su kaynağından izole edilen B. subtilis 5a-2 suşunun; maya özütü-pepton-nişasta besiyerinde (YPS Broth) 40. saatte 24 U/ml  $\alpha$ -amilaz ve 32. saatte 13 U/ml ile en yüksek pullulanaz aktivitesine erişmiştir.

Aynı bakterinin amilaz aktivitesine etkisi araştırılan karbohidratlardan, mono- ve disakkaritlerin önemli bir etkisi

bulunmazken, dekstrin'in en etkili karbohidrat olduğu saptanmış ve ortamda dekstrin kullanılması ile amilaz aktivitesi 36 U/ml'ye ulaşmıştır.

Termostabilitesi ve sıcaklık optimumu araştırılan Bacillus subtilis 5 $\alpha$ -2  $\alpha$ -amilazı; 50°C de en yüksek aktivite göstermiş, 50 ve 90°C sıcaklık aralığında aktivite değeri yaklaşık %90'in üstünde bulunmuştur. Pullulanaz ise 60°C 'de en yüksek aktiviteye erişmiş olup 60 ve 90°C sıcaklık aralığında aktivite değeri yaklaşık %95'in üstünde bulunmuştur. Sıcaklık stabilitelerinin saptanması amacıyla 100°C deki su banyosunda 2 saat inkübasyon sonunda;  $\alpha$ -amilaz aktivitesinde %23, pullulanaz aktivitesinde ise % 5 azalma olmuştur.

Aynı bakterinin  $\alpha$ -amilazınının pH 5 ve pullulanazınının pH 4-6 arasında maksimum aktivite gösterdiği saptanmıştır. Elde edilen ham enzim ekstraktı +4°C 'de 4 gün bekletildiğinde toplam aktivitede % 5 'lik bir azalma gözlenmiştir.

**ANAHTAR KELİMELER:** izolasyon, Tanımlama, Amilolitik Aktivite,  $\alpha$ -Amilaz, Pullulanaz

ABSTRACT

MASTERS THESIS

A STUDY ON SOME ENZYMATIC PROPERTIES  
OF AMYLOLITIC YEASTS AND BACTERIA  
THAT ISOLATED AND IDENTIFIED  
FROM SOIL AND WATER SAMPLES

NEDİM ALBAYRAK

Ankara University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Food Science and Technology

Supervisor: Assoc.Prof.Dr. Sedat DÖNMEZ  
1993, Page: 74

Jury : Assoc.Prof. Dr. Sedat DÖNMEZ  
Prof. Dr. Velittin GÜRGÜN  
Prof. Dr. Fikri BAŞOĞLU

In this study, amylolytic yeasts and bacteria strains were isolated and identified from different soil and water samples and determined some specifications of their amylolytic enzymes.

From the samples, 10 yeasts and 49 bacteria strains were isolated, but only 17 bacteria showed amylolytic activity. Isolated amylolytic bacteria were classified according to their total amylolytic activity on a liquid and a solid media. As a result, a Bacillus subtilis 5a-2 from hot spring sample and some other Bacillus strains from soil showed the highest activity.

Hot-spring isolate, Bacillus subtilis 5a-2 showed 24 U/ml  $\alpha$ -amylase activity at 40. hours and 13 U/ml pullulanase activity at 32. hours as it is maximum on the YPS Broth.

The effects of different C-sources on amylase activity were tested and dextrin was found to be the most effective carbohydrates with 36 U/ml of total activity.

Thermostability and optimum temperature of  $\alpha$ -amylase of Bacillus subtilis 5 $\alpha$ -2 was determined. It was shown that the highest activity at 50°C and between 50°C-90°C the activity was as high as over 90% approximately. The pullulanase activity has a maximal at 60°C and between 60°C-90°C the activity was over 95% approximately.  $\alpha$ -amylase has shown an activity of 77% and pullulanase 95 % at the end of incubation for 2 hours in a water bath of 100 °C.

Optimum pH was 5 for  $\alpha$ -amylase and pH 4-6 for pullulanase. Crude enzyme solution lost 5 % of their total amylase activity after 4 days at +4°C.

**KEY WORDS:** Isolation, Identification, amylolytic activity  
 $\alpha$ -Amylase, Pullulanase

## ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Son yıllarda biyoteknolojideki gelişmelere bağlı olarak hem endüstriyel enzim üretiminde, hem de kullanımında önemli artışlar gözlenmektedir. Enzim üretiminde ilk adım, enzimin elde edileceği kaynağın ve üretim koşullarınının saptanmasıdır. Kaynak olarak, çeşitli avantajlara sahip olmasından dolayı, en çok mikroorganizmalar üstünde durulmaktadır. Bunlar arasında Bacillus amilazları gerek sıcaklık optimumları, gerekse stabilitelelerinin yüksek olması nedeni ile, özellikle nişasta işleyen endüstrilerde, bira ve alkol sanayiinde sağladığı enerji ve zaman tasarrufuyla geniş kullanım olanağı bulmuştur.

Diğer gelişmekte olan ülkeler gibi ülkemizde de enzimlerin kullanılması ve üretilmesi için bir potansiyel ve yönelim vardır. Bu koşullar altında, ülkemizin gereksinim duyduğu çeşitli amilolitik enzimlerin üretimi için uygun organizmanın seçimi ve oluşturduğu enzimin özelliklerini saptamak amacıyla bu çalışma yapılmıştır.

Yapılan bu çalışmanın ülkemiz endüstrisine ve konu üzerinde çalışmayı düşünen araştırmacılara bir katkısı olmasını dilerim.

Bana bu konuda çalışma olanağı veren danışmanım Doç. Dr. Sedat DÖNMEZ'e (A.Ü.Z.F.), yardımlarını gördüğüm, Doç. Dr. Filiz ÖZÇELİK'e (A.Ü.Z.F.), Dr. Gönül DÖNMEZ'e (A.Ü.F.F.) ve Araş.Gör. Melike BALK'a (A.Ü.Z.F.) teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	4
2.1. Nişastanın Özellikleri.....	4
2.2. Nişastanın Parçalanmasında İşlevsel	
Amilazlar.....	6
2.2.1. $\alpha$ -(Alfa) Amilaz.....	7
2.2.2. $\beta$ -(Beta) Amilaz.....	8
2.2.3. Glukoamilaz.....	9
2.2.4. Pullulanaz.....	10
2.3. Amilolitik Enzimlerin Çeşitli Uygulama	
Alanları ve Olanakları.....	12
2.4. Çeşitli Amilolitik Mikroorganizmalar.....	17
2.4.1. Bakteriyel amilolitik enzimler.....	17
2.4.2. Çeşitli amilolitik mayalar ve	
enzimleri.....	20
2.4.3. Küflerdeki amilolitik enzimler.....	21
2.5. Farklı Karbon Kaynaklarının Amilolitik Enzim	
Sentezine Etkisi.....	22
2.6. Bazı Çevresel Koşulların Amilolitik Enzim	
Aktivitesine ve Termostabilitesine Etkisi.....	23



3. MATERYAL ve METOT.....	26
3.1. Çeşitli Amilolitik Bakteri ve Mayaların izolasyonu.....	26
3.1.1. Örneklerin alınması.....	26
3.1.2. izolasyon kaynakları.....	26
3.1.3. izolasyon basamakları.....	27
3.2. Besiyerleri ve Çözeltileri.....	27
3.2.1. izolasyonda kullanılan sıvı besiyerleri.....	27
3.2.2. izolasyonda kullanılan katı besiyerleri.....	28
3.2.3. Enzim üretiminde kullanılan besiyerleri.....	29
3.3. Mikroorganizma Gelişmesinin İzlenmesi.....	30
3.4. Enzim Aktivitelerinin Ölçülmesi.....	30
3.5. İzole Edilen Bakterilerin Amilolitik Aktivitelerine Göre Kıyaslanması.....	32
3.5.1. Katı besiyerinde amilaz aktivitesinin belirlenmesi.....	32
3.5.2. Sıvı besiyerinde amilaz aktivitesinin belirlenmesi.....	32
3.6. Bakterilerin Tanımlanması.....	33
3.7. Çeşitli Besiyerlerinde Gelişme ve Enzim Üretiminin incelenmesi.....	33
3.8. Nişasta Konsantrasyonunun Enzim Üretimine Etkisi.....	34

3.9. Farklı Karbon Kaynaklarının Bakteri Gelişmesi ve Enzim Üretimine Etkisi.....	34
3.10. Çevresel Koşulların $\alpha$ -Amilaz ve Pullulanaz Aktivitelerine Etkisi.....	35
3.10.1. Sıcaklığın etkisi.....	35
3.10.2. pH'nın etkisi.....	35
3.10.3. $\text{CaCl}_2$ 'nin etkisi.....	35
3.10.4. EDTA 'nın etkisi.....	36
3.10.5. Substrat Konsantrasyonunun etkisi.....	36
3.10.6. +4°C'de bekletmenin etkisi.....	36
4. DENEYSEL SONUÇLAR.....	37
4.1. Amilolitik Bakteri ve Mayaların İzolasyonu....	37
4.2. İzolatların Amilolitik Aktivitelerine Göre Kıyaslanması.....	38
4.2.1. Katı besiyerinde toplam amilaz aktiviteleri.....	38
4.2.2. Sıvı besiyerinde $\alpha$ -amilaz aktivitesi....	39
4.3. Bakterilerin Tanımlanması.....	40
4.4. Çeşitli Besiyerlerinde Gelişme ve Enzim Üretiminin İncelenmesi.....	42
4.5. Enzim Üretimine Nişasta Konsantrasyonunun Etkisi.....	44
4.6. Farklı Karbon Kaynaklarının, Bakteri Gelişmesi ve Enzim Üretimine Etkisi.....	45
4.7. Çeşitli Koşulların $\alpha$ -Amilaz ve Pullulanaz Aktivitelerine Etkileri.....	47
4.7.1. Sıcaklığın enzim aktivitesine etkisi....	47

4.7.2. $\alpha$ -Amilaz ve pullulanaz aktivitesine pH'nin etkisi.....	49
4.7.3. $\text{CaCl}_2$ 'nin $\alpha$ -amilaz ve pullulanaz aktivitesine etkisi.....	50
4.7.4. EDTA'nın $\alpha$ -amilaz ve pullulanaz aktivitesine etkisi.....	51
4.7.5. Substrat konsantrasyonunun $\alpha$ -amilaz aktivitesine etkisi.....	52
4.7.6. $+4^\circ\text{C}$ 'de bekletmenin $\alpha$ -amilaz ve aktivitesine etkisi.....	53
5. TARTIŞMA.....	55
KAYNAKLAR.....	66
ÖZGEÇMİŞ.....	74

**ŞEKİLLER DİZİNİ**

- Şekil 4.1. İzole edilen bakterilerin SSA Agar besiyerinde amilaz aktiviteleri.....38
- Şekil 4.2. İzole edilen bakterilerin YPS Broth besiyerinde  $\alpha$ -amilaz aktiviteleri.....39
- Şekil 4.3. B.subtilis (5 $\alpha$ -2) suşunun, YPS Broth, DFS Broth, ve N.B besiyerlerinde, Üreme,  $\alpha$ -amilaz ve pullulanaz aktiviteleri.....43
- Şekil 4.4. Farklı Karbon Kaynaklarının Üreme,  $\alpha$ -amilaz ve pullulanaz sentezine etkisi.....46
- Şekil 4.5. B.subtilis 5 $\alpha$ -2 'nin YPS Broth ortamında 37°C'deki kültür süpernatantındaki  $\alpha$ -amilaz ve pullulanaz aktivitelerine sıcaklığın etkisi.....48
- Şekil 4.6. B.subtilis 5 $\alpha$ -2'nin YPS broth ortamında 37°C'deki kültür süpernatantındaki  $\alpha$ -amilaz ve pullulanazın 100°C' deki (su banyosunda) sıcaklık stabiliteleleri.....49
- Şekil 4.7. B.subtilis 5 $\alpha$ -2 'nin YPS broth ortamında 37°C'de üretilen kültür süpernatantındaki  $\alpha$ -amilaz ve pullulanaz aktivitesine pH'ın etkisi.....50
- Şekil 4.8. B.subtilis 5 $\alpha$ -2 'nin YPS broth'ta 37°C'de üretilen kültür süpernatantındaki  $\alpha$ -amilaz ve pullulanazın aktivitesine CaCl<sub>2</sub>'nin etkisi.....51

- Şekil 4.9. B.subtilis 5 $\alpha$ -2 'nin YPS broth'ta 37°C' de  
üretilen kültür süpernatantındaki  $\alpha$ -amilaz ve  
pullulanazın aktivitesine EDTA konsantrasyonunun  
etkisi.....52
- Şekil 4.10. B.subtilis 5 $\alpha$ -2 'nin YPS broth'ta 37°C'de  
üretilen kültür süpernatantındaki  $\alpha$ -amilaz  
aktivitesine nişasta konsantrasyonunun  
etkisi.....53
- Şekil 4.11. B.subtilis 5 $\alpha$ -2 'nin YPS broth'ta 37°C'de  
üretilen kültür süpernatantındaki  $\alpha$ -amilaz  
aktivitesine +4°C'de saklamanın etkisi.....54

**ÇİZELGELER DİZİNİ**

Çizelge 2.1. Pullulana Etki Eden Çeşitli Mikroorganizma Enzimlerinin Özgüllük ve Ürün Dağılımı.....	12
Çizelge 4.1. Çeşitli kaynaklardan izole edilen bakteri ve mayaların sayıları.....	37
Çizelge 4.2. izole Edilen Bakterilere Uygulanan Çeşitli Testler.....	41
Çizelge 4.3. izole Edilen Bakterilerin Tanımlanması.....	42
Çizelge 4.4. YPS Broth Besiyerindeki (%) Nişasta Konsantrasyonunun <u>B.subtilis 5α-2</u> Bakterisinin α-Amilaz Enzim Sentezine Etkisi.....	45

## 1. GİRİŞ

Günümüzde yapılan birçok araştırmanın temel çıkış konusunu, mikroorganizmaların işlevlerinden yararlanma düşüncesi oluşturmaktadır. Bu düşünceden yola çıkan bilimin bugün ulaştığı nokta; biyolojik vasıtaların teknoloji ve sanayiye uygulanması anlamında Biyoteknolojidir (Ungan 1988).

20. Y.Y.'ın sonlarında biyodönüşüm yoluyla, ihtiyaç duyduğumuz birçok maddenin yenilenebilir kaynaklardan elde edilebildiği, doğal kaynak ve ürünlerin daha ekonomik olarak değerlendirilebildiği, daha verimli proseslerin geliştirilebildiği bir çağa doğru hızla yönelim başlamıştır. Biyodönüşüm, esasta enzim uygulamalarına dayandığından, bu yönelim: hızla bir enzim endüstrisinin gelişmesine de yol açmıştır (Yin et al 1991).

Yüksek basınç ve sıcaklıklarda kimyasal sentezlerle elde edilen birçok kimyasal maddenin, biyokimyasal prosesler ve enzim teknolojisi sayesinde: ılımlı koşullarda, daha az enerji kullanımıyla ve çevreyi kirletmeksizin üretilebilmesi olasıdır (Mot and Verachtert 1984). Pek çok uygulama alanı olan ve çeşitli sanayi dallarında kullanılan enzimlerin üretimi için -bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar gibi- pek çok kaynak mevcut olmasının yanısıra; genellikle hangi kaynaktan, hangi uygulama ve koşulları için, hangi enzimin üretileceği -zamanımızda bile- birçok araştırmanın konusu olmaktadır. Bu kaynaklar içinde, bitki ve hayvanlarla kıyaslandığında, mikrobiyel kaynaklardan enzim elde edilmesi:

çevre şartlarının kolaylıkla kontrol altında tutulabilmesi, uygun suşların seçimi ile üretim potansiyellerinin arttırılabilmesi gibi üstünlüklerinden dolayı, üretim için daha elverişlidir (Balk 1991).

Önemli bir tarımsal ürün bileşeni olan nişasta, birçok enzim ve kimyasal maddenin üretimi için kullanılmaktadır (Hyun and Zeikus 1985 a, Annous and Blaschek 1990). Mikrobiyel alemde nişasta parçalayan enzimler çok geniş bir alana dağılmış bulunmaktadır. Bununla beraber  $\alpha$ -amilaz,  $\beta$ -amilaz, glukoamilaz ve sınır dekstrinazlar (pullulanazlar) en önemli olanlarıdır (Mot and Verachtert 1984, Hyun and Zeikus 1985 a). Çeşitli amilolitik enzimlerle nişastadan gıda, kimya, eczacılık v.b. endüstrilerde kullanılan şekerler ve şekerli ürünler (Lee et al 1990, Castro et al 1992); etanol, bütanol gibi yanıcı maddeler;  $H_2$ ,  $CH_4$  gibi gazlar; laktik asit (Cassler and Imam 1991), asetik asit gibi asitler v.b. pek çok madde üretilmektedir (Hyun and Zeikus 1985 b, Antranikian 1990).

Gıda endüstrisinde kullanılan enzimlerin hemen hemen tümü hidrolazlar grubundandır ve bunların en bilinenleri proteazlar ve amilazlardır. Amilazların en çok kullanıldığı alan ise nişasta endüstrisidir (Antranikian 1990). 1980 yılında dünyada pazarlanan enzimlerin %30'unun bu alanda kullanıldığı ve bunun tutarının ise yaklaşık 113 milyon dolar olduğunu bildirilmiştir (Katkocin 1984, Wasserman 1984).

Nişasta endüstrisinde kullanılan amilazlar geleneksel olarak bazı küflerden elde edilmekte ise de, son yıllarda bakteri ve maya amilazlarının geniş pH spektrumları ve yüksek



termostabiliteeleri nedeniyle hemen hemen bütün uygulama alanlarında seçilerek kullanılmaya başlanmıştır (Wasserman 1984, Querol and Parrilla 1986). Nişasta sakkarifikasyonunda olduğu gibi çoğu endüstriyel proseslerde: daha yüksek substrat çözünürlüğü ve mikroorganizma gelişmesine engel olmak için, genellikle 60°C 'nin üstünde sıcaklık uygulanmaktadır (Hyun and Zeikus 1985 b). Enzimlerin potansiyellerini yerine getirebilmeleri için uygulanan proses parametreleriyle bağdaşan özelliklere sahip olmaları gerekmektedir (Plant et al 1987). Termostabil enzimler ve onların doğal kaynağı olabilen termofil bakterilerin, yüksek sıcaklık derecelerinde yüksek reaksiyon hızları ve reaksiyon kontrollerinin kolaylığı; bu tür enzimlerin seçilebilmesinde önemli etkenlerdendir. Nişasta endüstrisinde bu ve diğer enzim kullanım avantajlarından dolayı son yıllarda nişastanın hidrolizi, daha önce kullanılan kimyasal yöntemler yerine, enzimlerle yapılmaya başlanmıştır (Madi et al 1987).

Ülkemizde gıda sanayii ile birlikte diğer sanayi dallarında enzim tüketimi giderek artmaktadır. Bu durumu her yıl artan enzim ithalatı ile gözlemek olasıdır. Örneğin 1990 yılının ilk dokuz aylık döneminde ithal edilen enzim miktarı, bitkisel proteazlar dışında, 746 ton ve ödenen döviz miktarı ise yaklaşık 10 milyon dolardır. Bu değerlerin gelecek yıllarda daha da artacağı sanılmaktadır. Bu koşullar altında ülkemizin gereksinimi olan amilolitik enzimlerin üretimi için uygun mikroorganizmanın seçimi ve enzimlerin çeşitli özelliklerini belirlemek amacıyla bu çalışma yapılmıştır.

## 2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. Nişastanın Özellikleri

Nişasta, tarih boyunca insanoğlu tarafından en çok kullanılan maddelerden biri olmuştur. 19.y.y.'da, daha önce kullanılan buğday ve arpa nişastasına ilaveten patatesten de nişasta elde edilmeye başlanmıştır. Bu aşamayı mısır nişastası endüstrisinin hızla gelişmesi izlemektedir (Uluöz vd 1974).

Nişastanın sulu çözeltisindeki kolloidal özelliklerden en önemlileri; berraklık, renk, viskozite ve akış, jel mukavemeti, yapışkanlık mukavemeti ve film özellikleridir. Nişastanın endüstriyel önemi de bu özelliklerden ileri gelmektedir (Uluöz vd 1974). Nişastanın bileşimi dolayısıyla yüksek yoğunlukta olması, hem taşıma ve işleme fiyatlarını azaltmakta, hem de depolanabilme yeteneğini artırmaktadır (Hyun and Zeikus 1985 a).

Nişasta, bütün yüksek bitkilerde bulunan ve suda çözünmeyen granüler formda bir depo karbohidratıdır. Çeşitli bitkisel kaynaklardaki nişastanın oranı, şekli, büyüklüğü ve yapısı birbirinden farklıdır.  $(C_6H_{10}O_5)_n$  kapalı formülü ile bilinen bir polisakkarit olan nişastanın, önceleri tek ve homojen bir madde olduğu sanılmaktaydı (Uluöz vd 1974, Matur 1981, Fidan ve Şahin 1983). Ancak daha sonra yapılan araştırmalarla nişastanın amiloz ve amilopektin olarak adlandırılan iki kısımdan oluştuğu saptanmıştır (Fidan ve Şahin 1983). Farklı nişastaların amiloz ve amilopektin oranları değişik

olmakla beraber; genellikle amiloz % 20-30, amilopektin ise % 70-80 oranında bulunmaktadır (Fidan ve Şahin 1983, Ekşi 1988 a). Amiloz; glukoz ünitelerinin  $\alpha$ -1,4 glikozidik bağlantısı ile düz zincir yapı gösterdiği halde, amilopektin;  $\alpha$ -1,4 bağlı glukoz ünitelerine ek olarak, ortalama her 25 glukoz ünitesinde bir olan ve glukozun serbest 6. karbonuna  $\alpha$ -1,6 bağlantısıyla bağlanmış glukozlar ile yan zincirli yada dallanmış bir yapı gösterdiği bildirilmiştir (Matur 1981, Fidan ve Şahin 1983, Ekşi 1988 b). Amiloz, iyotla mavi renk verirken, amilopektin ise kırmızı menekşe renk vermektedir. Nişasta granülleri soğuk suda çözünmez, suyla karıştırılıp jelleşme sıcaklığına ısıtıldığı zaman, içinde bulunduğu suya kolloidal olarak dağılır ve çirışlenme (jelatinleşme) denilen bir yapı oluşturur (Uluöz vd 1974, Ekşi 1988 b, Özkaya 1988, Özkaya vd 1991). Bilinen nişastalar içinde en ufak granüllere sahip olan pirinç nişastası iken, en büyük granüller ise patates nişastasında bulunmaktadır (Yücecan ve Baykan 1988). Genellikle iri granüllü olan nişasta daha düşük derecelerde çirışlenmeye başlar. Örneğin patates nişastası 59-67°C'de, mısır nişastası 64-72°C'de çirışlenir. Çirışlenme (şişme) sıcaklığına; pH, ısıtmanın süre ve derecesi, şeker ve tuz varlığı etki eder. Nişasta çözeltisi çirışlenme sıcaklığının üzerinde ısıtılmaya devam edilirse karışım, viskoz ve yarı şeffaf bir yapı gösterir. Pişmiş nişasta peltesi soğutulduğu zaman jel halinde kalabilir, fakat yavaş yavaş soğutulduğunda amiloz kısmı tekrar sferokristaller oluşturarak çöker. Bu olaya retrogradasyon denir ve bu olay amiloz fraksiyonunun

miktarı ile orantılıdır. Nişasta taneciğinde çirışlenen kısım amilopektindir (Özkaya vd 1991).

## 2.2. Nişastanın Parçalanmasında İşlevsel Amilazlar

Nişasta hakkındaki ilk bilgileri Romalı Tarihçi Cato (M.Ö.170) vermektedir. Daha sonraları nişastanın yapışkanlığını artırmak ve kıvamlı bir şurup elde etmek amacıyla nişastanın parçalanması (modifikasyonu) yoluna gidilmiştir. Arap eczacı Ebu Mansur (M.S.975) nişastanın insan tükürüğü (pityalin) ile dönüşüme uğradığını ve yapay bir bal meydana geldiğini belirtmiştir (Uluöz vd 1974). 1811 yılında Kirchof, buğdaydan alkolle çöktürerek elde ettiği bir karışımın nişastayı şekerlendirdiğini belirtmiştir. 1833'de ise Payen ve Persöz, elde ettikleri malt ekstraktının nişastayı şekere dönüştüren termolabil bileşikler içerdiğini öne sürmüşler ve bu maddeye Diastaz adını vermişlerdir (Dönmez 1991). Daha sonraları nişasta granüllerine yüksek afiniteye sahip ve onları etkili bir şekilde parçalayan ilk mikrobiyel enzimler olarak fungal glukoamilazlar elde edilmiştir (Campus et al 1992).

Günümüzde ise çok çeşitli mikroorganizmaların, son ürünleri birbirinden farklı, birçok amilolitik enzim içerdikleri gösterilmiş, buna bağlı olarak da amilolitik enzimlerin kullanım alanları oldukça genişlemiştir. Buna ilave olarak son zamanlarda farklı özelliğe sahip amilazların belirlenmesiyle, çeşitli endüstrilerde yeni kullanım alanları

ortaya çıkmıştır (Fogarty et al 1991).

Çeşitli endüstrilerde kullanılan başlıca amilolitik enzimler:  $\alpha$ -amilaz,  $\beta$ -amilaz, glukoamilaz ve pullulanazlar olarak bildirilmiştir (Hyun and Zeikus 1985 a, Madi et al 1987).

### 2.2.1. $\alpha$ -(Alfa) Amilaz (E.C.3.2.1.1.) ( $\alpha$ -1,4-D-glukan glukanohidrolaz)

Üç veya daha fazla  $\alpha$ -1,4-glukan içeren doğrusal glukoz polimerlerine iç bağlardan etki ederek, bir dizi  $\alpha$ -konfigürasyonunda maltooligosakkarit oluşturmaktadır (Fogarty and Griffin 1975, Mot and Verachtert 1984, Yoo et al 1987, Worthington 1988, Bajpai and Bajpai 1991, Fogarty et al 1991). Bütün canlılarda  $\alpha$ -amilaz aktivitesi bulunmasına karşın, bir suş içerisinde bile, enzim aktivitesi ve sonuç ürün profilinin değişebildiği bildirilmiştir (Worthington 1988).

$\alpha$ -Amilaz, genellikle amiloz moleküllerinden 6-7, amilopektinden ise 9-10 glukoz molekülü içeren  $\alpha$ -dekstrinler oluşturmaktadır.  $\alpha$ -amilaz etkisi ile nişasta çözeltisinin viskozitesinde hızlı bir azalma meydana gelmekte ve bu nedenle  $\alpha$ -amilaz sıvılaştırıcı (liquefying) enzim olarak da adlandırılmaktadır (Fogarty and Griffin 1975, Wasserman 1984).

Worthington (1988)'a göre,  $\alpha$ -amilaz bir glikoprotein-dir. Protein zincirlerinde, iki adet -SH grubu, dört disülfid köprüsü ve sıkıca bağlanan bir  $Ca^{++}$  içerir. Enzimatik özelliklerine göre iki farklı forma sahiptir. Üre ve diğer amidler inhibe edici etkiliyken, klor en bilinen aktivatörüdür.

Ayrıca enzimin stabilizasyonu için  $Ca^{++}$  ve  $Cl^-$  iyonları gerekmektedir.

B. stearothermophilus  $\alpha$ -amilazı üzerinde yapılan bir çalışmada: enzimin iki disülfid bağıyla bağlanmış iki polipeptit zincirinden oluştuğu ve bu disülfid bağları nedeniyle sekonder yapının, enzimin termostabilitesinde etkili olduğu belirtilmiştir (Pfuelleri and Elliott 1969).

#### 2.2.2. B (Beta) Amilaz (E.C.3.2.1.2.) ( $\alpha$ -1.4 glukoz maltohidrolaz)

Nişasta molekülünün her bir zinciri uçlarındaki birimler hariç olmak üzere bir primer, iki sekonder hidroksil grubu içermekteyken, en uçtaki glukoz ünitesinde bir primer ve üç sekonder hidroksil grubu bulunmaktadır. Dolayısıyla bu uca indirgenmemiş uç (non-reducing-end) denir (Uluöz vd 1974).

$\beta$ -amilaz, substratın indirgenmeyen uçlarından etki ederek sondan bir önceki  $\alpha$ -1.4-glikozidik bağlantılarını parçalamaktadır.  $\beta$ -amilaz  $\alpha$ -1.6-bağlarına etki etmez ve dallanma noktalarında 2-3 glukoz kalıncaya kadar etkisini gösterir.  $\beta$ -amilaz etkisi sonucu,  $\beta$ -limit dekstrin olarak bilinen artık komponentle birlikte daha çok  $\beta$ -maltoz oluşturur.  $\beta$ -amilaz limit dekstrinleri parçalayamadığından amilopektinden % 50-60 maltoz oluştururken, amiloz kısmından ise, -bir kaç anormal zincir içerdiğinden dolayı ve bu anormal zincirlerin sayısına bağlı olarak- % 70-90 arasında

maltoz oluşturur. Bu nedenle  $\beta$ -amilaza şekerlendirici (saccarifying) enzim de denilmektedir (Fogarty and Griffin 1975, Matur 1981, Fidan ve Şahin 1983, Özkaya 1988).

$\beta$ -Amilaz, tatlı patates ve arpa gibi bazı bitki dokularında yaygın olarak bulunur (Fidan ve Şahin 1983). Buna karşın, amilolitik mayalarda bulunmazken (Mot and Verachtert 1984) çeşitli bakteri ve küflerde diğer amilolitik enzimlerle beraber az veya çok bulunabildiği bildirilmiştir (Fogarty and Griffin 1975, Fidan ve Şahin 1983, Castro et al 1992).

### 2.2.3. Glukoamilaz (E.C.3.2.1.3.) ( $\alpha$ -1,4-D-glukan glukanohidrolaz

Diğer bir amilolitik enzim olan glukoamilazlar, nişasta türü substratlarda indirgenmeyen zincir sonundan başlayarak  $\alpha$ -1,4 glikozidik bağlarını sırayla parçalayarak  $\alpha$ -D-glukoz üniteleri oluşturur (Hyun and Zeikus 1985 b, Abraham et al 1991). Ancak, bazı glukoamilazların  $\alpha$ -1,6 dallanma noktasına da etki ettikleri belirtilmiştir (Mot and Verachtert 1984, Ekşi 1988 a, Antranikian 1990).

Antranikian (1990)'a göre, glukoamilaz, glukoz polimerlerindeki  $\alpha$ -1,4 ve  $\alpha$ -1,6 bağlarını indirgenmeyen uçtan ayırarak glukoz oluştururken,  $\alpha$ -glukozidaz ise glukoz oligomerlerindeki  $\alpha$ -1,6 bağlarına aynı uçtan etki ederek yine glukoz oluşturmaktadır. Mot and Verachtert (1984)'e göre, glukoamilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz enzimlerinin ürün yapısı değişiktir ve  $\alpha$ -glukozidazın etkisi sonucu;  $\alpha$ -D-glukoz oluşurken,

glukoamilazın etkisi sonucu  $\beta$ -D-glukoz oluşmaktadır.

Glukoamilaz; bakteri, maya ve küflerde bulunmakla birlikte ticari preparatları bazı küflerden üretilmektedir (Hyun and Zeikus 1985 b). Glukoamilazlar; glukoz şurubu, kristal glukoz eldesi veya fruktoz üretimi için başlatıcı materyal üretiminde kullanılmaktadır (Hyun and Zeikus 1985 b, Abraham et al 1991).

#### 2.2.4. Pullulanaz (E.C.3.2.1.41) (Pullulan 6-glukanohidrolaz)

Bu enzim ilk olarak 1940 yılında maltlanmış darı ekstraktında belirlenmiştir. İlk mikrobiyel pullulanaz ise, daha önce Aerobacter aerogenes olarak tanımlanan, Klebsiella pneumoniae'den elde edilmiştir (Lappalainen et al 1991). 1961 yılında, pullulandaki  $\alpha$ -1,6 bağlarına etkili bir enzimden bahsedilmiştir (Freitag et al 1991). Günümüzde ise pek çok mikroorganizmanın bu tür aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Plant et al 1987, Antranikian 1990, Freitag et al 1991).

Plant et al (1987) tarafından, nişasta endüstrisinde genel olarak kullanılan  $\alpha$ - ve  $\beta$ -amilazların,  $\alpha$ -1,6 bağlı dallanma gösteren büyük amilopektin komponentinin parçalanmasını tam olarak gerçekleştiremediği belirtilmiştir. Bazı glukoamilazlar ise  $\alpha$ -1,6 glikozidik bağlantılarını, azalan oranda veya zayıf bir aktiviteyle parçalayabilirler. Endüstriyel öneme sahip çoğu nişastanın % 70-95 'i amilopektinden oluşur. Amilopektin moleküllerinde % 4-5 oranında bulunan  $\alpha$ -1,6 glikozidik bağlantılarının, nişastanın tam olarak şeker-



lendirilmesine etkili bir engel oluşturduğu bildirilmiştir.

Pullulan,  $\alpha$ -1,6 glikozidik bağlantıları ile bağlanmış maltotrioz ünitelerinden oluşan doğrusal bir polimerdir (Plant et al 1987, Antranikian 1990). Bazı pullulanazlar dallanmış glukoz polimeri ve pullulandaki  $\alpha$ -1,6 bağlantılarını parçalayarak maltotrioz oluştururken, bazı pullulanazlar  $\alpha$ -1,4 bağlantılarını da parçalayabilmektedirler (Plant et al 1987, Antranikian 1990, Saha and Zeikus 1990, Lappalainen et al 1991). Çeşitli pullulanazların bazı özellikleri Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Antranikian (1990)'a göre, nişastadaki  $\alpha$ -1,6 bağına etkili diğer bir enzim de izoamilazdır. Bu enzim, dallanmış glukoz polimerindeki  $\alpha$ -1,6 bağlantılarına iç bağlardan etki ederek doğrusal oligosakkaritler oluşturmaktadır. Ayrıca, izoamilazlar pullulana etki etmemektedir.

Klebsiella pneumoniae pullulanazı "Pulluzyme", Bacillus (B. acidopullulyticus) pullulanazı ise "Promozyme" ticari ismiyle pazarlanmaktadır (Lappalainen et al 1991).

**Çizelge 2.1. Pullulana Etki Eden Çeşitli Mikroorganizma Enzimlerinin Özgülük ve Ürün Dağılımı (Antranikian 1990)**

Enzim	Özgülük	Ürün	Mikroorganizma
Pullulanaz Tip-1	Pullulandaki $\alpha$ -1,6 bağı	Maltotrioz	<u>Klebsiella pneumoniae</u> <u>B. acidopullulyticus</u>
Pullulanaz Tip-2	Pullulandaki $\alpha$ -1,6bağı ve diğer polisakkarit lerdeki $\alpha$ -1,4 bağı	Maltotrioz	<u>C. thermosulfurogenes EM1</u> <u>C. thermohydrosulfuricum</u> <u>Thermoanaerobium brockii</u>
Pullulan Hidrolaz Tip-1	Pullulandaki $\alpha$ -1,4 bağı	Panose	<u>B. stearothermophilus</u> <u>Thermoactinomyces vulgaris</u>
Pullulan Hidrolaz Tip-2	Pullulandaki $\alpha$ -1,4 bağı	İzopanose	<u>Aspergillus niger</u>

### 2.3. Amilolitik Enzimlerin Çeşitli Uygulama Alanları ve Uygulama Olanakları

Amilolitik enzimler pek çok sanayi dalında yaygın olarak kullanılmaktadır. Buna bağlı olarak amilolitik enzimler konusunda yapılan araştırmalar sonucunda birçok yeni kullanım alanları çıkartılırken, bazen çok değişik özellikte amilolitik enzimler izole edilmektedir.

Yüksek şekerli şuruplar gıda sanayinde yaygın olarak kullanılmaktadır; biracılık, bisküvi, pasta, şekerlemeler, konserve, alkolsüz içki sanayii başta sayılabilecek alanlardır (Saha and Zeikus 1990). Nişasta ve çeşitli glukoz polimerlerinden amilolitik enzimlerle tatlandırıcı genel adı ile anılabilecek bir dizi ürün elde edilmektedir. Genellikle işlem süreci içinde birinci aşama;  $\alpha$ -amilaz etkisi ile polimerin daha düşük molekül ağırlıklı maltooligosakkaritlere dönüşümünü içeren sıvılaştırmadır (Lee et al 1990, Castro et al 1992). Bundan sonraki aşama glukamilaz ile şekerlendirmedir (Lee et al 1990). Ancak yüksek maltozlu şurup elde edilmek isteniyorsa  $\beta$ -amilaz ve pullulanaz, yüksek glukozlu şurup elde edilmek isteniyorsa genellikle glukamilaz ve pullulanazın daha uygun kombinasyonlarda kullanılabileceği bildirilmiştir (Hyun and Zeikus 1985 b, Abraham et al 1991, Castro et al 1992). Eğer yüksek fruktozlu şurup elde edilmek isteniyorsa, çeşitli amilolitik enzimlerle elde edilecek yüksek glukozlu şurup, glukoz izomeraz enzimi ile glukozun fruktoza dönüşümü sağlanmaktadır (Lee et al 1990, Abraham et al 1991).

Nişastanın dönüşüm işlemlerini içeren aşamalar; metal kofaktör, pH, sıcaklık gibi farklı reaksiyon koşullarına gerek duyarlar. Bu aşamalarda genellikle düşük verim sağlayan mezofil mikroorganizma sakkaridazları kullanılmaktadır (Lee et al 1990). Oysa nişastanın çeşitli ürünlere dönüşümünde uygulanan geleneksel yöntemler, son yıllarda elde edilen yeni enzimlerin uygulanmasıyla oldukça önemli değişimler göstermiştir. Örneğin, elde edilen yeni enzimlerin pH ve sıcaklık

optimumları uygulamada kolaylık sağlamaktadır (Antranikian 1990). Nişasta dönüşüm proseslerindeki yüksek sıcaklık koşullarında kullanılan amilazların termoaktivite ve termostabiliteye sahip olması, uygulamada yüksek değer oluşturmaktadır (Saha and Zeikus 1990). Endüstriyel sivilaştırma yapan termostabil  $\alpha$ -amilazlar Bacillus cinsinin çeşitli türlerinden elde edilmektedir (Jamuna and Ramakrishna 1992, Castro et al 1992). Ayrıca 80–110°C gibi yüksek sıcaklıklarda geniş bir ticari uygulamaya sahip oldukları bildirilmiştir (Kochhar and Dua 1990).

Son yıllarda çeşitli mikroorganizmalardan pullulanazların elde edilmesi, nişasta v.b. hammadde kullanılan endüstrilerde;  $\alpha$ -1,6 bağından kaynaklanan limit dekstrin sorununun çözümünü sağlamış, bu yolla şekerlenme oranları ve ürünleri geliştirmiştir (Hyun and Zeikus 1985 a, Hyun and Zeikus 1985 b, Plant et al 1987, Antranikian 1990, Lappalainen et al 1991).

Madi et al (1987) tarafından, izole edilen bir Clostridium sp. EM1 suşundaki pullulanaz enziminin asidik koşullarda son derecede aktif ve termostabil olduğu gösterilmiş ve bu özelliğinden dolayı diğer amilolitik enzimlerle birlikte glukoz ve maltoz şurubu üretiminde etkili olarak kullanılabilceği belirtilmiştir. Ayrıca bu termostabil pullulanazın kullanımıyla sakkarifikasyon için inkübasyon aşamasına gerek kalmadan indirgenmenin mümkün olabileceği de ifade edilmiştir.

Saha and Zeikus (1990) tarafından, yapılan bir çalışmada C. thermosulfurogenes 'in ürettiği  $\beta$ -amilazın 80°C' de

stabil ve 75°C de optimum aktivite gösterdiği saptanmış; yine bir ekstrem termofil bakteri olan C. termohydrosulfuricum'un pullulanaz ve glukojenik amilaz aktivitesi gösterdiği, pullulanazın 85°C de ve amilazın 75°C de optimum aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Tatlandırıcı üretiminde kullanılan ticari enzimlerle kıyaslandığında, termofil bakteri amilazlarının daha yüksek termostabiliteye ve optimal sıcaklığa sahip olduğu bildirilmiştir. Bu enzimlerle yapılan çalışmalarda yüksek maltozlu şuruplar ve nişasta derivatlarının ekonomik olarak elde edilmesinde kullanılabileceği de belirtilmiştir.

Amilazların nişastaya etki edebilmesi için nişastanın önceden çirilenmesi gerektiği (Uluöz vd 1974, Ekşi 1988 b) veya çirilenmiş nişastaya doğal nişastadan daha kolay etki ettiği (Özkaya 1988) bildirilmiştir. Ancak son zamanlarda, bazı Bacillus amilazlarının ham nişasta granüllerine de etki ettiği ve bu enzimlerin sakkarifikasyonda kullanılmasının yararlı olacağı belirtilmiştir (Kim et al 1989, Campus et al 1992).

Tekstil endüstrisinde kumaşların dokunması sırasında, mekanik zorlanmalara karşı ipliklerin korunması ve kopabilirliklerinin azaltılması için haşıl (size) denilen maddelerle haşılama (sizing) adı verilen bir işlem uygulanmakta ve bu amaçla yaygın olarak nişasta kullanılmaktadır (Matur 1981). Haşılama sonrası diğer işlemlere geçmeden önce kullanılan haşıl maddesi çeşitli yöntemlerle ortamdan uzaklaştırılmalıdır (desizing). Bu işlemler sırasında nişasta parçalanırken, yine bir glukoz polimeri olan sellüloz makromoleküllerinden

oluşan ipliklere zarar vermeyecek çalışma koşulları sağlanmalıdır. Oysa alkali ve asitlerle yapılan parçalama işleminde istenmeyen etkiler olacağından bu yöntem pek uygulanmamaktadır. Enzimlerle ise, nişasta daha kolay giderildiği gibi sadece nişastayı parçalayıp, sellüloz ve diğer liflere zarar vermemesi nedeniyle amilazlar; en güvenli nişasta hasılı sökme yöntemi olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemle elde edilen artık ürünün çevreyi kirletici boyutu olmadığı gibi, şekerli bir yan ürün olarak değerlendirilebilir (Matur 1981).

Nişastalı hammaddeler, özellikle ekonomik olması ve ekonomik kullanılması durumunda, etanol üretimi için önemli bir kaynak olacaktır. Nişastalı hammaddelerden ucuz etanol üretimi için, işlem aşamasında kullanılan bazı alet ve ekipmanlar enzim uygulaması ile azaltılarak, daha ucuz ve çabuk etanol üretilebileceği bildirilmiştir (Dönmez 1986). Nişastalı hammaddelerden etanol üretiminde fermantasyon aşamasından önce, nişastanın fermente olabilir şekerlere dönüştürülmesi gerekmektedir (Kim et al 1988). Günümüzde yaygın olarak uygulanan teknolojiye göre, nişastalı hammaddeler yüksek basınçta buharlanarak basıncın aniden kaldırılması ile nişastanın parçalanması ve daha sonra enzimatik yolla şekerlendirilerek, etanol fermantasyonuna bırakılması şeklindedir. Nişastalı hammaddelerin buharlanması, işletmede ayrı bir alet ekipmanı gerektirmekte, ayrıca buradaki enerji masrafı da toplam üretimin % 30-40'ına ulaşmaktadır. Nişasta hidrolizinin, yüksek basınçlı buhar yerine, daha düşük sıcaklık uygulamaları sonrasında, amilolitik enzim preparatları ile

gerçekleştirilmesi önemli enerji tasarrufu sağlamaktadır (Nam et al 1988).

Bira endüstrisinde de çeşitli amilolitik enzimler uygulama alanı bulmaktadır (Matur 1981). Yin et al (1991)'e göre, bakteriyel  $\beta$ -glukanaz bira endüstrisinde yaygın biçimde kullanılan enzimlerden birisidir. Bira üretiminde ekstrakt miktarı, biranın filtrasyon oranı ve raf ömrünü arttırmak amacıyla;  $\beta$ -glukandan kaynaklanan problemleri çözmek için  $\beta$ -glukanaz enzimi kullanılmaktadır.  $\beta$ -glukanazın bira yapımındaki bir diğer yararı olarak, yetersiz ya da uygun olmayan malt veya arpanın kullanımına olanak verdiği bildirilmiştir. Ayrıca  $\beta$ -glukanaz, piliçler tarafından arpa veya yulafın güç sindirimini önlemek için yem endüstrisinde de kullanılmaktadır.

#### 2.4. Çeşitli Amilolitik Mikroorganizmalar

##### 2.4.1. Bakteriyel amilolitik enzimler

Son yıllarda çeşitli bakterilerden oldukça değişik etki modellerine sahip amilolitik enzimler izole edilmiştir (Fogarty and Griffin 1975). Genel olarak kullanılan mikroorganizmalar ise Bacillus cinsi bakteriler olup, bazı Bacillus türleri farklı enzimleri birlikte oluşturmaktadır. Örneğin B.subtilis  $\alpha$ -amilaz ve pullulanaz, B.megaterium, B.polymyxa ise  $\alpha$ - ve  $\beta$ -amilaz, ayrıca B.subtilis MIR-5 olarak tanımlanmış bir suşunun  $\alpha$ - ve  $\beta$ -amilaz ürettiği belirtilmiştir (Yin et al

1991, Castro et al 1992). B.subtilis'in termostabil  $\alpha$ -amilazı GRAS onayına sahiptir (Balk 1991). Bazı bakteriyel  $\alpha$ -amilazlar ise ham nişasta granüllerini de parçalayabilmektedirler. Bunların önemlileri B.subtilis, B.stearothermophilus ve B.circulans'ın bazı suşlarıdır (Kim et al 1989, Campus et al 1992). Ayrıca bir Bacillus izolatı olan Bacillus TCRDC-25A'nın 95°C'ye kadar oldukça aktif ve 85°C'de optimum aktiviteye sahip, bir termostabil  $\alpha$ -amilaz ürettiği gösterilmiştir (Bajpai and Bajpai 1991). B.stearothermophilus  $\alpha$ -amilazının pH 6,0 dan düşük değerlerde ve yüksek sıcaklıklarda endüstriyel nişasta sıvılaştırma proseslerinde rutin olarak kullanıldığı belirtilmiştir (Brumm and Taegue 1990). B.stearothermophilus  $\alpha$ -amilazı ve  $\alpha$ -1,6 bağına etkili olan B.acidopullulyticus pullulanazı GRAS onayı aşamasındadır (Fordham and Block 1987). Kochhar and Dua (1990) tarafından, B.amyloliquefaciens'de 90°C 'de yarı ömrü 30 dakika olan sıvılaştırıcı amilaz aktivitesi bildirilmiştir. B.licheniformis 'den elde edilen termostabil bir  $\alpha$ -amilaz pH 6,5 ve 95°C'de nişastanın sıvılaştırılmasını gerçekleştirmiştir (Antranikian 1990).

Diğer bir bakteri cinsi olan Lactobacillus amylovorus sentezlediği ekstrasellüler  $\alpha$ -amilaz enzimiyle karbon kaynağı olarak nişastadan laktik asit ürettiği bildirilmiştir (Cassler and Imam 1991).

Normal koşullarda yaşayan pek çok mikroorganizma yanında son yıllarda volkanik alanlar, sıcak su kaynakları gibi bölgelerden izole edilen ekstrem termofil mikroorganizmaların enzimleri üzerinde de pek çok çalışma yapılmıştır



(Dönmez 1987, Antranikian 1990). Clostridium, Thermoanaerobium Thermobacteriodes, Thermobacter gibi termofil anaerobik bakterilerin çeşitli türleri, nişastayı parçalayan birçok enzimi sentezleyebilmektedirler ve bunların çoğunda hem  $\alpha$ -amilaz hem de pullulanaz enzimlerinin bulunduğu bildirilmiştir (Antranikian 1990).

Plant et al (1987) tarafından, Thermoanaerobium Tok6-B1 suşunun pullulanazı ile yapılan bir çalışmada, pullulanaz aktivitesi 6 M üreye ve 80°C sıcaklığa dayanıklı bulunmuş ve bu bakteriyel pullulanazın hem pullulandaki  $\alpha$ -1,6 hem de nişasta, amiloz ve amilopektindeki  $\alpha$ -1,4 bağlarına etkili olduğu saptanmıştır.

Saha and Zeikus (1990)'un C.thermosulfurogenes'in ekstrasellüler  $\beta$ -amilazı ve C.termohydrosulfuricum'un hücre içi pullulanaz ve glukojenik amilazı ile yaptığı bir çalışmada; 75°C'de optimum, 80°C'de stabil ve pH 5,5-6,0 optimum, pH 3,5-6,5'da stabil olan bir  $\beta$ -amilaz belirlenmiştir. Pullulanazın ise, optimum sıcaklığı 85°C, optimum pH sı 5,5-6,0 iken glukojenik amilazın optimum sıcaklığının 75°C ve optimum pH sinin 4,0-6,0 olduğu bildirilmiştir.

Thermus aquaticus YT-1'den üretilen termostabil pullulanazın optimum sıcaklığı 95°C ve yarı ömrünün 4,5 saat olduğu belirlenmiştir (Brown et al 1990).

Hipertermofilik bir Archaeobacterium olan Pyrococcus furiosus'un kompleks bir besin ortamında  $\alpha$ -amilaz,  $\alpha$ -glukozidaz ve pullulanaz ürettiği ve bu enzimlerin sıcaklık optimumlarının en az 100°C olduğu gibi daha yüksek sıcaklıklarda da

aktivite gösterdiği saptanmıştır (Brown et al 1990).

Pyrococcus woesei'den elde edilen çeşitli  $\alpha$ -amilazlardan molekül ağırlığı 70 kDal.'dan büyüklerinin 130°C de aktif olduğu gösterilmiştir (Antranikian 1990).

#### 2.4.2. Çeşitli amilolitik mayalar ve enzimleri

Saccharomycopsis fibuligera, Saccharomycopsis capsularis, Schwanniomyces castellii, Schwanniomyces alluvius gibi birkaç mayanın hem nişasta dönüşümü için gerekli  $\alpha$ -amilaz ve glukoamilaz enzimlerini üretirken hem de bu ürünleri fermente edebildikleri gösterilmiş, ancak bu enzimlerin termostabil olmadıkları belirtilmiştir (Wilson and Ingledew 1982, Mot and Verachtert 1984).

Kim et al (1988)'e göre, nişastayı parçalayabilen mayalar, tek aşamalı bir proste, alkol üretimi için henüz uygun değildir. Çünkü, bu mayaların hem alkol toleransları düşük, hem de fermantasyonları yavaştır.

Nişastalı hammaddelerden etanol üretimi konusunda, mayaların gerek ekonomik substrat kullanımı gerekse alkol verimleri konusundaki yetersizliklerini gidermek için, protoplast fizyonu, hibridizasyon gibi genetik çalışmalarla, çeşitli nişastalı kaynaklardan ekonomik olarak etanol üretimi için uygun maya hibritleri elde edilmeye çalışılmaktadır (Wilson and Ingledew 1982, Kim et al 1988).

Park and Azuma (1990) tarafından, yüksek amilolitik mayalar izole etmek amacıyla yapılan bir çalışmada, Candida

sp. 347 olarak tanımlanan suşun 671,3 U/ml amiloglukozidaz aktivitesi gösterdiği saptanmıştır.

Mayalar, önemli bir besin ve yem katkısı olabilen tek hücre proteini (THP) üretimi için uygun mikroorganizmalardır (Mot and Verachtert 1984, Pamir 1985). Mot and Verachtert (1984), tarafından yapılan çalışmada, nişastadan ekonomik THP üretimi için iki maya suşu kullanılmıştır. Bunlardan S.fibuligera, nişastayı glukoz ve maltoza dönüştürmekte ve ikinci maya olan Candida utilis gelişmeye bırakılmaktadır.

#### 2.4.3. Küflerdeki amilolitik enzimler

Çeşitli küfler amilolitik aktivite göstermekle birlikte, bugüne kadar birkaç küfün amilolitik enzimleri üstünde durulmuştur. Bunlardan A.niger ve A.oryzae endüstriyel olarak  $\alpha$ -amilaz ve glukoamilaz üretiminde kullanılmaktadır (Dönmez 1986, Fordham and Block 1987, Balk 1991, Abraham et al 1991). Bunlardan başka P.brunneum 'um amilazının ham nişasta granüllerini parçaladığı gösterilmiştir. A.awamori var kawachi 'nin ham nişasta granüllerine etkili glukoamilazının, ham mısır nişastasını birkaç gün inkübasyon sonunda tamamen parçalayabildiği anlaşılmıştır. Benzer olarak, çeşitli Aspergillus türleri de yakın etkiye sahip glukoamilaz ürettikleri belirtilmiştir (Dönmez 1986, Haska and Ohta 1991).

Üstünes ve Güvenç (1985), Aspergillus oryzae IAM 2736 suşundan elde edilen  $\alpha$ -amilazın optimum pH'sı 5,0 ve optimum sıcaklığı 60°C olduğu ve enzimin bu sıcaklıkta % 100 stabil

iken, 80°C'de aktivitesinin % 5'e düştüğünü bildirmiştir.

## 2.5. Farklı Karbon Kaynaklarının Amilolitik Enzim Sentezine Etkisi

Mikrobiyel enzim üretiminde kullanılacak besiyerinin bileşimi büyük önem taşımaktadır. Seçilen besiyerinde; enzim verimi, bileşenlerin yararlılığı, maliyeti ve enzim kalitesi gibi faktörler gözardı edilemez (Balk 1991). Belli bir mikroorganizma ile amilolitik enzim üretiminde besiyeri bileşimine giren karbon kaynağı çok önemlidir. Kullanılan karbon kaynağının değişmesiyle, gerek sentezlenen enzim profili gerekse enzim miktarı ve aktivitesi tamamıyla değişebilmektedir (Madi et al 1987, Jamuna and Ramakrishna 1992).

Madi et al (1987) tarafından, Clostridium sp. EM1'in amilolitik enzim sentezine çeşitli karbohidratların etkisini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada, monosakkaritlerin amilolitik enzim sentezini genellikle çok etkilemediği, fakat  $\alpha$ -1,4 ve  $\alpha$ -1,6 bağlarını içeren, maltoz, maltotrioz, pullulan, çözümlü nişasta gibi glukanların enzim sentezini görünür bir şekilde artırdığı saptanmıştır. Bu olayın bakteriyel ve fungal kaynaklı amilolitik enzimler için oldukça bilinen bir özellik olduğu da belirtilmiştir. Annous and Blaschek (1990)'e göre, Clostridium 'larda amilolitik enzim biyosentezi glukoz tarafından katabolik baskılamaya uğramaktadır ve bu olay bir çok araştırmacı tarafından gözlenmiştir. Jamuna and Ramakrishna (1992) tarafından izole edilmiş termofil bir Bacillus suşuyla

yapılan çalışmada; en yüksek  $\alpha$ -amilaz aktivitesi maltozda elde edilmiş ve bu sonuç glukozdan iki, nişastadan beş defa daha fazla bulunmuştur. Burada glukoz hücre gelişmesini nişasta ve maltozdan daha iyi etkilemiştir.

## 2.6. Bazı Çevresel Koşulların Amilolitik Enzim Aktivitesine ve Termostabilitesine Etkisi

Yin et al(1991)'e göre,mikroorganizmalardan amilolitik enzim üretimi esnasında ortama salgılanan proteaz, diğer enzimleri hızlı bir şekilde parçalayabilmektedir. Bu çalışmada, bir B.subtilis mutanı tarafından üretilen amilolitik enzim aktivitesinde proteaz etkisiyle azalma ortaya çıktığı; bununla birlikte uygun azot kaynaklarını içeren besiyerinin kullanımı ve uygun fermantasyon süresinin seçimiyle, düşük proteolitik aktivite ve yüksek amilolitik aktivite içeren bir enzim karışımının elde edilebileceği belirtilmiştir.

Madi et al (1987) tarafından bir Clostridium sp.'de yapılan çalışmada, gelişmenin tamamlanmasından sonra tüm amilolitik enzimlerin sabit kalması, spesifik proteazların olmayışına bağlanmıştır. Aynı çalışmada,  $\alpha$ -amilaz ve pullulanazın sıcaklık dayanımını, substratın önemli ölçüde artırdığıda belirlenmiştir.

Brown et al (1990), Pyrococcus furiosus'un ürettiği üç amilolitik enzimde, yüksek sıcaklıklardaki aktivite kaybının proteoliz sonucunda meydana geldiğini, proteaz aktivitesinin azaltılması ve substrat ilavesiyle enzimlerin termostabilili-

ğinin artırabileceğini bildirmiştir.

Brumm and Teague (1989) tarafından yapılan bir çalışmada,  $Ca^{++}$  varlığı ve yüksek nişasta konsantrasyonlarında B.stearothermophilus  $\alpha$ -amilazının yarı ömrünün 90 kez arttığı gözlenmiştir. B.stearothermophilus  $\alpha$ -amilazı ile yapılan bir başka çalışmada ise; pH,ısı, EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetik Asit), üre ve bazı deterjanların denatürasyonuna karşı kalsiyumun stabilite sağladığı belirtilmiştir (Brumm and Teague 1990).

Plant et al (1987) tarafından Thermo. Tok6-B1 'in pullulanazı ile yapılan bir çalışmada; enzimin substratı olmadığı durumda aktivitesinin yaklaşık % 50 düştüğü, enzimin tam aktivite gösterebilmesi ve termostabilliğinin desteklenmesi için  $Ca^{++}$  iyonlarına gereksinim duyduğu;  $Na^+$ ,  $Li^+$ ,  $K^+$ ,  $Cs^+$ ,  $Mg^{++}$  ve  $Zn^{++}$  'nin 1 mM klor tuzlarının ise çok az veya hiç etkisinin olmadığı saptanmıştır.

Hayashida et al (1988) tarafından, çeşitli iyonların B.subtilis  $\alpha$ -amilazına inhibitör etkisinin araştırıldığı bir çalışmada;  $Cu^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Hg^{+2}$  iyonlarının enzimi tamamen inhibe ederken; 2 mM konsantrasyondaki  $Zn^{+2}$  %30,3,  $Pb^{+2}$  %38,  $Cd^{+2}$  %43,  $Al^{+3}$  %38,7,  $Ag^+$  %61,2 oranlarında inhibe ettiği;  $Ba^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$ ,  $Li^+$ ,  $Cs^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Sr^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$  iyonlarının ise inhibitör etkisinin olmadığı, ayrıca  $\alpha$ -amilazın stabilizasyonu için  $Ca^{++}$  gerektiği de saptanmıştır.

Kochhar and Dua (1990), B. amylolyquefaciens'in termostabil amilazı için optimum konsantrasyon olan 10 mM  $Ca^{++}$  iyonları pH 9,0 da termostabiliteye etki etmezken, pH 6,0 da

ve 90°C'de enzimin yarı ömrünü birkaç saniyeden 30 dakikaya yükselttiği; yani Ca<sup>++</sup>'nin etkisinin ortam pH'sı ile ilgili olduğunu belirtmiştir.



### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Çeşitli Amilolitik Bakteri ve Mayaların İzolasyonu

##### 3.1.1. Örneklerin alınması

Amilolitik aktiviteye sahip çeşitli bakteri ve mayaları izole etmek amacıyla, örneğin alınacağı kaynağın farklılığına göre: ya boş bir steril tüp, ya içinde %0,85 NaCl olan serum fizyolojik su ya da bir besiyeri olan tüpler kullanılarak örnekler alınmıştır.

##### 3.1.2. İzolasyon kaynakları

Amilolitik mikroorganizmaların izole edilmesi amacıyla çeşitli bölgelerden alınan su ve toprak örnekleri incelenmiştir. Bu amaçla A..Z.F. deneme bağlarının çeşitli kısımlarından toprak ve kurumuş üzüm örnekleri, ahır gübresi rnekleri, Ankara şehir atık suyunu içeren Ankara ayı'nın su ve çamur kısımlarından örnekler alınmıştır. Diğer bir kaynak da, Ankara'nın Ayaş ilçesi yakınlarında, yaz-kış sıcaklığı 30°C-35°C arasında değişen ve kaynağın çıktığı bölgedeki birikintiden örnekler alınmıştır. Ayrıca Nuh'un Ankara Makarna Fabrikası'nın (Ankara) eşitli bölümlerindeki buğday, un, hamur, makarna parçaları ve buğday yıkama suyundan örnekler alınmıştır.



### 3.1.3. izolasyon basamakları

Belirtilen kaynaklardan alınan örnekler N. Broth, YPS Broth ve YEPD Broth besiyerlerine aşılansarak zenginleştirilmiştir. Gelişme gözlendikten sonra buradan N. Agar, YPS Agar, YEPD Agar katı besiyeri içeren plaklara yayılarak mikroorganizmalar koloni morfolojilerine göre izole edilmiştir. Maya ve bakteri olarak ayrımı yapılan koloniler öze ile alınarak YPS Broth ortamına aktarılmıştır. Burada gelişen mikroorganizmalar, aynı katı besiyeri ve tekrar sıvı besiyerine alınarak, her defasında koloni morfolojisine göre izole edilen suşların saflıkları sürekli kontrol edilmiştir (Madi et al 1987, Park and Azuma 1990). izlenen izolasyon sürecinin son basamağı olarak SA Agar ve SSA Agar besiyerleri kullanılarak, izole edilen bakteri ve mayaların zon oluşumu araştırılmıştır (Madi et al 1987). Belirgin şekilde açık zon oluşturan koloniler seçilerek agarda muhtelif aktarmalardan sonra, yatık YPS Agar stok kültürleri +4°C de ileriki denemeler için saklanmıştır.

### 3.2. Besiyerleri ve Çözeltiler

#### 3.2.1. izolasyonda kullanılan sıvı besiyerleri

\* YPS Broth (Park and Azuma 1990),

Yeast ekstrakt	1 g
Bakteriyolojik pepton	2 g

Çözünür nişasta	3 g
Distile su	100 ml

\* YEPD Broth (Park and Azuma 1990),

Yeast ekstrakt	1 g
Bakteriyel pepton	2 g
Glukoz	3 g
Distile Su	100 ml

* N.B. (Nutrient Broth)	2,37 g
Destile su	100 ml

3.2.2. izolasyonda kullanılan katı besiyerleri

\* YPS Agar (Wilson and Ingledew 1982, Park and Azuma 1990)

Yeast ekstrakt	1 g
Bak. pepton	2 g
Çözünür Nişasta	3 g
Agar	2 g
Distile Su	100 ml

\* YEPD Agar (Park and Azuma 1990)

Yeast ekstrakt	1 g
Bak. pepton	2 g
Glukoz	3 g
Agar	1,5-2 ml
Distile su	100 ml

## \* SA Agar (Madi et al 1987)

Starch azure (Sigma)	0,1 g
Agar	2 g
Distile su	100 ml

## \* SSA Agar (Madi et al 1987)

Starch azure	0,1 g
Çözünür nişasta	0,2 g
Agar	2 g
Distile su	100 ml

## \* N.A. (Nutrient Agar)

	1,3 g
Distile su	100 ml

## 3.2.3. Enzim üretiminde kullanılan besiyerleri

## \* DFS Broth (Bajpai and Bajpai 1991)

Çözünür nişasta	3 g
Yağsız soya unu <sup>(1)</sup>	2 g
MgSO <sub>4</sub>	0,05 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>(2)</sup>	0,05 g
NaCl	0,15 g
CaCl <sub>2</sub>	0,015 g
Distile su	100 ml

<sup>1</sup> Yağsız soya unu, soyanın eldeğirmeninde öğütüldükten sonra eter ile yağı çıkarılarak hazırlanmıştır.

<sup>2</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ayrı sterilize edilmiştir.

### 3.3. Mikroorganizma Gelişmesinin İzlenmesi

Çeşitli sıvı besiyerlerinde mikroorganizma gelişmesi, 600 nm dalga boyunda tanık olarak besiyeri kullanılarak Zeiss PM 2A spektrofotometresi ile ölçülmüştür (Matur 1981, Annous and Blaschek 1991). Kültür ortamının seyreltilmesinde besiyeri kullanılmıştır.

### 3.4. Enzim Aktivitelerinin Ölçülmesi

Sıvı besiyerinde gelişen mikroorganizmalarda, enzim aktivitesi ölçümlerinden önce hücre ve diğer katı partiküller 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüjle (Heraus 15B) uzaklaştırılarak, elde edilen süpernatanttaki  $\alpha$ -amilaz ve pullulanaz aktivitelerinin sırasıyla, nişasta ve pullulan'a (Sigma) etkisi ile oluşan şekerler DNS (3,5-Dinitro salisilik asit) yöntemiyle ölçülmüştür (Madi et al 1987).

$\alpha$ -Amilaz aktivitesinin ölçümü için, substrat olarak % 0,750 g nişasta 6 mM NaCl ve 20 mM sodyum fosfat tampon (pH 5,0) içerecek şekilde son hacim 750  $\mu$ l olması sağlanmıştır. Daha sonra 250  $\mu$ l enzim örneği ile karıştırılıp 25°C (oda sıcaklığı) de 3 dakika inkübasyona bırakılmıştır (Madi et al 1987, Worthington 1988).

Pullulanaz aktivitesinin ölçümü için ise, substrat olarak % 0,5 g pullulan 20 mM sodyum potasyum sitrat tampon (pH 5,0) içerecek şekilde son hacim 750  $\mu$ l hazırlanarak, 250  $\mu$ l enzim örneği ile 25°C 'de 3 dakika inkübasyona bırakılmıştır

(Madi et al 1987, Worthington 1988).

inkübasyondan sonra, tüpler buz banyosuna alınarak reaksiyon durdurulmuş ve 1 ml DNS Çözeltisi<sup>(1)</sup> ilave edilip kaynar su banyosunda 5 dakika tutulmuştur. Su banyosundan çıkarılan örnekler oda sıcaklığına soğutulup, üzerine 10 ml saf su ilave edilmiştir. Daha sonra vorteks karıştırıcıda iyice karıştırılan örneklerin 540 nm'deki spektrofotometre değerleri elde edilmiştir. Aktivite 0,3-5 µmol/ml maltozlu standart ile kıyaslanarak hesaplanmıştır (Worthington 1988).

1 U (ünite) α-amilaz veya pullulanaz aktivitesi; belirtilen koşullar altında, dakikada 1 µmol indirgen şeker oluşturan enzim miktarı olarak ölçülmüştür (Madi et al 1987, Antranikian et al 1987).

$$U/ml = \frac{\text{Serbestleşen } \mu\text{mol maltoz miktarı}}{\text{enzim miktarı(ml)} \times \text{inkübasyon süresi(dak.)}}$$

Enzim ölçümlerinde tanık olarak mikroorganizma ile aşılammış besiyerinin santrifüjlenmesiyle elde edilen süpernatant kullanılmıştır. Ayrıca enzim ölçümlerinde kullanılan tampon çözeltiler, Gomori (1955)'e göre hazırlanmış ve enzim seyreltmelerinde de aynı tamponlar kullanılmıştır.

(1) DNS Çözeltisi : 1 g DNS (Sigma) 50 ml suda çözülmüş, üzerine yavaş yavaş 30 g sodyum potasyum tartarat.4H<sub>2</sub>O (Merk)ilave edilmiştir.Daha sonra 20 ml 2 N NaOH eklenerek son hacim 100 ml'ye tamamlanmış ve hazırlanan çözelti en fazla iki hafta süreyle kullanılmıştır (Worthington 1988).

### 3.5. İzole Edilen Bakterilerin Amilolitik Aktivitelerine Göre Kıyaslanması

#### 3.5.1. Katı besiyerinde amilaz aktivitesinin belirlenmesi

Amilaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla stok kültürdeki (izole edilmiş) tüm bakteriler, YPS Broth içeren tüplere aşılanarak 24 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. inkübasyondan sonra bakteriler, petrilerdeki SSA Agar ve SA Agar plaklarına, ya muhtelif seyreltmelerle yayılarak , ya besiyerinin belirli noktalarına 5 µl damlatılarak yada steril filtre (Whatman No:1) disklerinin gelişmiş ortama, aseptik koşullarda, daldırıldıktan sonra katı besiyeri üzerine konması şeklinde, ekim yöntemleri uygulanmıştır. Burada kullanılan besiyerlerinden, bakteri süspansiyonlarından ve aşılama yöntemlerinden kaynaklanabilecek hataları en aza indirmek amacıyla, üç farklı yöntemle katı besiyerlerine ekim yapılmıştır.

Her üç yöntemle hazırlanan petriler 37°C'de gelişmeye bırakılmış ve zamana göre oluşturulan zon çapının milimetre olarak ölçülmesiyle yaklaşık bir sıralama elde edilmiştir. Ayrıca petrilerde tanık olarak amilolitik bakteriler de kullanılmıştır.

#### 3.5.2. Sıvı besiyerinde amilaz aktivitesinin belirlenmesi

izole edilen tüm bakteriler, içinde 10 ml YPS Broth olan tüplere öze ile aşılanarak 37°C'de 24 saat gelişmeye

bırakılmıştır. Daha sonra 150 ml YPS Broth besiyeri bulunan 500 ml'lik erlenmayerlere, %5 oranında aktarılmış ve 150 rpm çalkalanma hızına ayarlanmış inkübatörde 37°C'de 48 saat süreyle gelişmeye bırakılmıştır. Inkübasyon boyunca belli aralıklarla alınan örneklerde, daha önce açıklandığı şekilde (Bölüm 3.4.),  $\alpha$ -amilaz ve pullulanaz aktiviteleri ölçülmüştür.

### 3.6. Bakterilerin Tanımlanması

Amilolitik aktivite gösteren bakterilerin tanımlanması amacıyla, gram reaksiyonu, spor oluşumu ve sporların konumu, hareketlilik, 65°C'de gelişme, glukoz broth'da anaerobik şartlarda gelişme ve gaz oluşturma, kazein parçalama, indol oluşumu, jelatin parçalama, Voges-Proskauer (VP) gibi gerekli testler uygulanmıştır (Cowan and Steel 1966).

### 3.7. Çeşitli Besiyerlerinde Gelişme ve Enzim Üretiminin İncelenmesi

En yüksek amilolitik aktivite gösterdiği saptanan bakteri suşuyla denemeler sürdürülmüştür. Belirlenen bakterinin çeşitli besiyerlerinde gelişme ve enzim aktivitesinin incelenmesi amacıyla 250 ml'lik erlenmayerde 100 ml besiyeri olacak şekilde, bileşimleri Bölüm 3.2.'de verilmiş, DFS Broth, YPS Broth ve Nutrient Broth ortamlarına aşılansarak 37± 2°C ve 150 rpm döngüsel çalkalama hızı koşullarında gelişmeye

bırakılmıştır. Belli aralıklarla alınan örneklerde; üreme,  $\alpha$ -amilaz, ve pullulanaz aktivitesi ölçülmüştür.

### 3.8. Nişasta Konsantrasyonunun Enzim Üretimine Etkisi

Besiyeri bileşimine katılan nişastanın oranları değiştirilerek bakterinin farklı nişasta konsantrasyonlarında enzim sentezleme durumu araştırılmıştır. Bu amaçla % 1-2-3-4 oranlarında nişasta içeren YPS Broth besiyerleri hazırlanarak tüplere 10'ar ml koyulmuştur. Tüpler 20 saatlik bakteri örnekleriyle 10 ml aşılıp, 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılarak enzim aktiviteleri ölçülmüştür.

### 3.9. Farklı Karbon Kaynaklarının Bakteri Gelişmesi ve Enzim Üretimine Etkisi

Bakteri gelişmesi ve amilolitik enzim sentezine karbon kaynaklarının etkisini belirlemek için, farklı karbohidratları içeren besiyerleri hazırlanmıştır. Bu amaçla, YPS Broth ortamındaki nişasta yerine; glukoz, fruktoz, sakkaroz, maltoz, pullulan ve dekstrin, % 1 oranında katılmıştır. Hazırlanan besiyerlerinin 100 ml'lik miktarları 250 ml'lik erlenmayerlere konularak, 20 saatlik kültürlerle 1'er ml aşılıp ve 37°C, 150 rpm koşullarında gelişmeye bırakılmıştır. 48 saatlik inkübasyon süresi içerisinde belli aralıklarla alınan örneklerde üreme,  $\alpha$ -amilaz ve pullulanaz aktivitesi ölçümleri yapılarak, sonuçlar zamana karşı verilmiştir.



### 3.10. Çevresel Koşulların $\alpha$ -Amilaz ve Pullulanaz Aktivitelerine Etkisi

$\alpha$ -Amilaz ve pullulanaz aktivitelerine sıcaklık, pH,  $\text{CaCl}_2$ , EDTA (etilen diamin tetra asetik asit), nişasta konsantrasyonu ve  $+4^\circ\text{C}$  de depolamanın etkileri araştırılmıştır.

#### 3.10.1. Sıcaklığın etkisi

$\alpha$ -Amilaz ve pullulanazın optimum aktivite gösterdiği sıcaklık aralığını belirlemek için: 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve  $100^\circ\text{C}$  sıcaklıklarda enzimlerin aktiviteleri ölçülmüştür. Ayrıca  $\alpha$ -amilaz ve pullulanazın sıcaklık stabilitesini saptamak amacıyla, belli sıcaklıktaki su banyosunda 2 saat süreyle tutulmuştur. Inkübasyon sırasında belli aralıklarla alınan örneklerde enzim aktiviteleri ölçülmüştür.

#### 3.10.2. pH 'nın etkisi

$\alpha$ -Amilaz ve pullulanazın optimum aktivite gösterdiği pH aralığını belirlemek amacıyla: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 pH'larda hazırlanan tampon çözeltiler kullanılarak enzim aktiviteleri ölçülmüştür. (Lappalainen et al 1991).

#### 3.10.3. $\text{CaCl}_2$ 'nin etkisi

$\alpha$ -Amilaz ve pullulanaz aktivitelerine  $\text{CaCl}_2$ 'nin

etkisini belirlemek amacıyla, % 0,01- 0,05- 0,1- 0,25- 0,50- 1,0- 2,0- 4,0 oranlarında hazırlanan  $\text{CaCl}_2$  çözeltileri ile enzim örnekleri belirli oranlarda seyreltilerek aynı yöntemle enzim aktiviteleri belirlenmiştir.

#### 3.10.4. EDTA 'nın etkisi

EDTA'nın  $\alpha$ -amilaz ve pullulanaz üzerine olan etkisini belirlemek amacıyla, 0,05- 0,10- 0,20- 0,30- 0,50 mM konsantrasyonlarında hazırlanan EDTA çözeltileriyle enzim örnekleri belli oranlarda seyreltilerek,  $+4^\circ\text{C}$  'de 2 saat bekletilmiş ve enzim aktiviteleri ölçülmüştür.

#### 3.10.5. Substrat konsantrasyonunun etkisi

Bu amaçla, daha önce belirtildiği şekilde hazırlanan tamponlara % 0,5- 1,0- 1,5- 2,0- 2,5- 3,0 oranlarında nişasta ilave edilerek oluşturulan ortamlarda, aynı yöntemle enzim aktivitesi ölçülmüştür.

#### 3.10.6. $+4^\circ\text{C}$ 'de bekletmenin etkisi

Hazırlanan enzim örnekleri buzdolabı sıcaklığında ( $+4^\circ\text{C}$ ) 4 gün süreyle bekletildikten sonra alınan örneklerde enzim aktivitesi ölçülerek, bekletme sürecinde enzimin aktivite kayıpları saptanmıştır.

#### 4. DENEYSEL SONUÇLAR

##### 4.1. Amilolitik Bakteri ve Mayaların İzolasyonu

Amilolitik bakteri ve mayaların izolasyonu amacıyla yapılan çalışmalarda, incelenen ortamlardan toplam olarak, 17 bakterinin amilolitik olduğu belirlenmiştir. İzole edilen mayalardan hiç birisi amilolitik aktivite göstermemiştir.

Çizelge 4.1. Çeşitli kaynaklardan izole edilen bakteri ve mayaların sayıları

Kaynak	İzole Edilen M.O.		Amilolitik M.O.	
	Maya	Bakteri	Maya	Bakteri
Bağ Toprağı	2	5	-	1
Üzüm Cibresi	4	9	-	4
Toprak	-	4	-	-
Ahır Gübresi	-	2	-	-
Atık Su	-	9	-	1
Sıcak Su	-	4	-	4
Makarna Fab.	4	16	-	7
<b>Toplam</b>	<b>10</b>	<b>49</b>	<b>-</b>	<b>17</b>

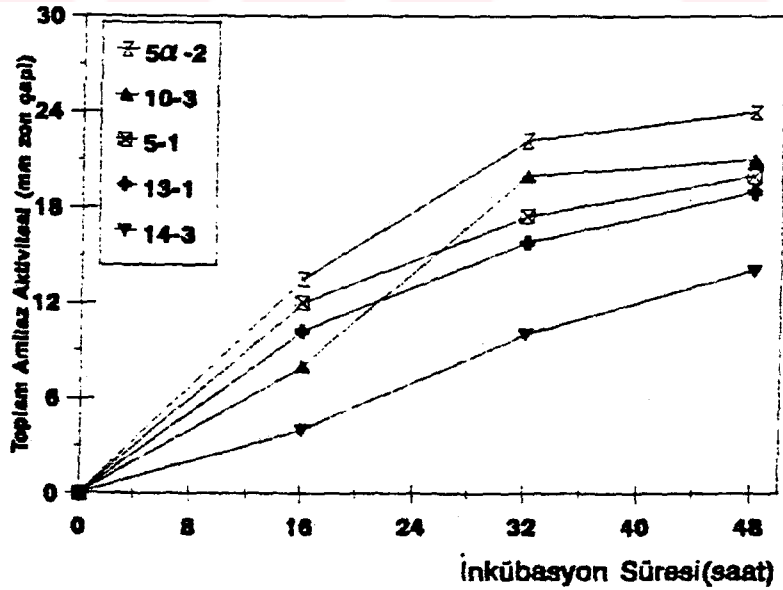
İzole edilen mayalarda herhangi bir zon oluşumu ve buna bağlı olarak amilolitik aktivite gözlenemediğinden, çalışmalar zon oluşumu pozitif olan bakterilerle sürdürülmüştür.

#### 4.2. İzolatların Amilolitik Aktivitelerine Göre Kıyaslanması

İzole edilen bakterilerden yüksek amilolitik aktivite gösterenlerin belirlenmesi amacıyla, katı ve sıvı besiyelerinde toplam amilolitik aktivite belirlenmiştir.

##### 4.2.1. Katı besiyelerinde toplam amilaz aktiviteleri

Katı besiyelerinde zon oluşturduğu belirlenerek izole edilen toplam 17 adet bakteriden yüksek amilolitik aktivite gösterenlerin seçimi amacıyla, katı besiyelerini içeren petrilere çeşitli yöntemlerle ekimi yapılarak, 37°C de inkübasyona bırakılmış ve koloni çevrelerinde oluşan zon çapları 16'şar saatlik zaman aralıklarında milimetre olarak ölçülmüştür (Şekil 4.1.).

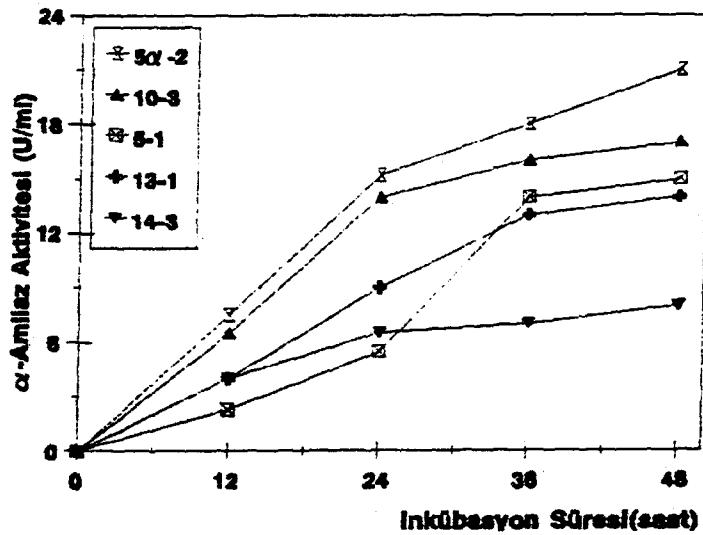


Şekil 4.1. İzole edilen bakterilerin SSA Agar besiyelerinde, 37°C amilaz aktiviteleri

Şekil 4.1.'de gösterilen 5 adet bakterinin dışında kalan diğer 12 bakteri 48 saat inkübasyon sonunda 6mm den daha az zon çapı göstermişler ve bu nedenle grafiğe alınmamışlardır. Bu kısımda tanık olarak kullanılan Endomycopsis fibuligera, Saccharomyces diastaticus, Sacc.cerevisiae, B.cereus, B. stearothermophilus zon oluşumu göstermezken; B.subtilis 8mm, B.licheniformis ise 48 saat inkübasyon sonunda 6 mm çapında zon oluşturmuştur.

#### 4.2.2. Sıvı besiyerinde $\alpha$ -amilaz aktivitesi

izole edilen 17 bakteri suşu 500 ml'lik erlenlerde 150 ml YPS Broth besiyeri bulunan ortamlara aşılansarak 150 rpm döngüsel çalkalama hızı ve 37°C sıcaklık koşullarında 48 saat inkübe edilmiştir. Kültürlerden 12 saat aralıklarla alınan örneklerde  $\alpha$ -amilaz aktivitesi ölçülmüş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. izole edilen bakterilerin YPS Broth besiyerinde, 37°C  $\alpha$ -amilaz aktiviteleri

Şekil 4.2.'den anlaşılacağı gibi sıvı besiyerindeki  $\alpha$ -amilaz aktivitesi değerleri, katı besiyeri değerlerini doğrular nitelikte bulunmuştur. Şekilde gösterilenlerin dışındaki bakteriler çok az amilolitik aktivite göstermişlerdir. Ayrıca her bir bakteriden elde edilen  $\alpha$ -amilaz ve pullulanaz aktiviteleri paralellik gösterdiğinden, Şekil 4.2.'deki bakterilere ait sadece  $\alpha$ -amilaz değerleri belirtilmiştir.

#### 4.3. Bakterilerin Tanımlanması

izole edilen bakterilerin gerek katı besiyerinde oluşturdukları zon çapı ölçümleri, gerekse sıvı besiyerinde belirlenen  $\alpha$ -amilaz ve pullulanaz aktivitesi ölçümleri sonunda elde edilen sıralamaya paralel olarak; yüksek aktivite gösteren bakteriler tür düzeyinde tanımlanırken, diğer birkaç bakterinin belirli özellikleri incelenmiştir. Tanımlama için yapılan testler ve sonuçları Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. İzole Edilen Bakterilere Uygulanan Çeşitli Testler

	5a-2	10-3	5-1	13-1	14-3	5a-1	2.4.1	11.2.a
Gram Reaksiyonu	G <sup>+</sup>	G <sup>+</sup>	G <sup>+</sup>	G <sup>+</sup>	G <sup>+</sup>	G <sup>+</sup>	G <sup>+</sup>	G <sup>+</sup>
Morfolojik Görünüş	Çubuk	Çubuk	Çubuk	Çubuk	Çubuk Zincirli	Çubuk	Kısa Çubuk Zincirli	Çubuk
Sporlanma	+	+	+	+	+	+	+	+
Spor Konumu	Sn. (1)	Sb. (2)	Sn.	Sb.	Sb.	Sn.	Sn.	Sb.
Hareketlilik	+	+	+	+	+	+	+	+
65°C de Gelişme	-	±	-	±	-	-	-	±
Jelatin Parçalama	+	+	+	+	+	+	+	+
Kazein Parçalama	+	-	+	+	+	+	-	+
İndol Oluşumu	+	+	+	+	+	+	+	+ -
Voges Prokauer	+	-	+	+	-	+	-	+
Anaerobik Glukoz Broth'da								
Gelişme	-	-	-	-	-	-	+	-
Gaz Oluşumu	-	±	-	-	-	-	+	-

(1) Sn.: Sentral

(2) Sb.: Subterminal

Çizelge 4.2.'de belirtilen biyokimyasal test sonuçları Cowan and Steel (1966)'e göre Bacillus türlerinin test sonuçları ile karşılaştırılarak izole edilen bakteriler tanımlanmıştır. İzole edilen bakterilerin tanımlanması izole edildikleri kaynağa göre Çizelge 4.3.'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. İzole Edilen Bakterilerin Tanımlanması

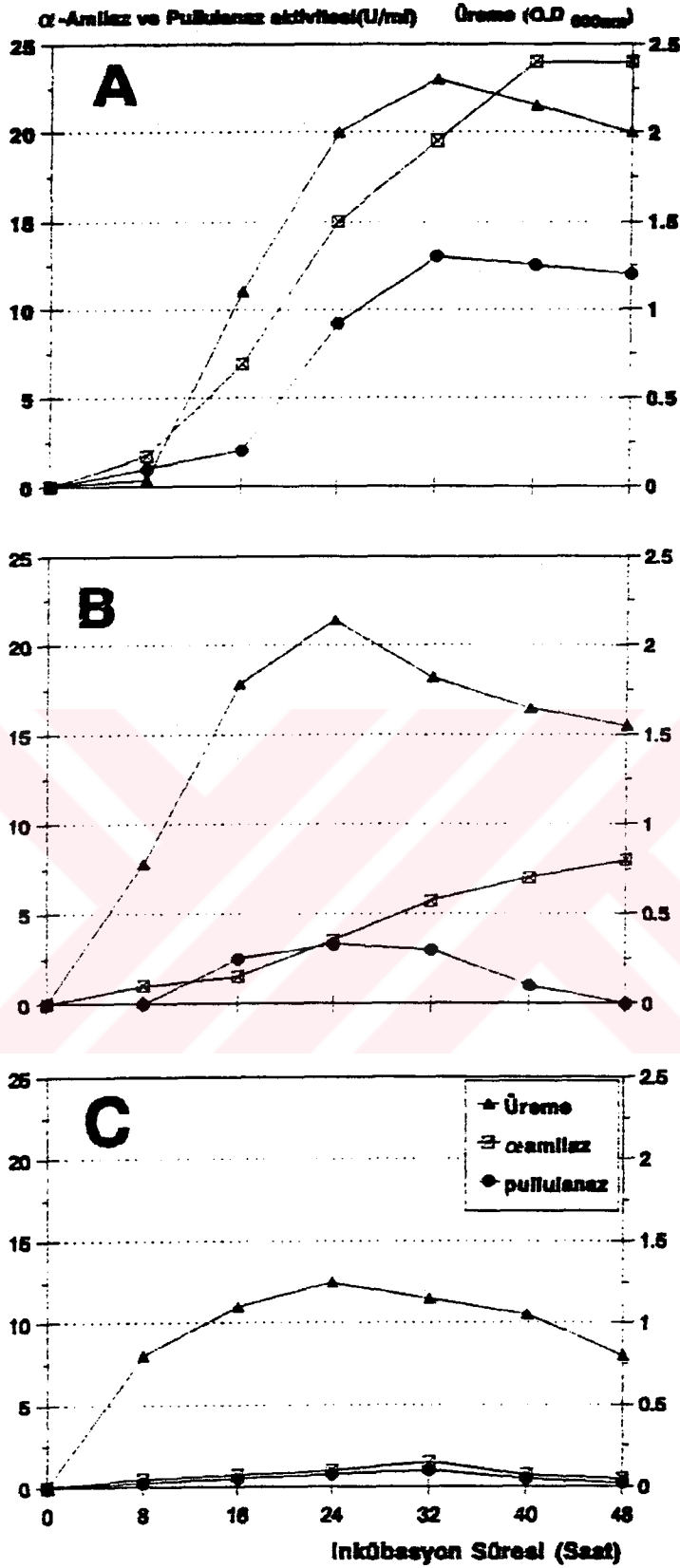
KAYNAK	BAKTERİ NUMARASI	TANIMLAMA
Sıcak Su	5 $\alpha$ -2	B. subtilis
Cibre	10-3	B. circulans
Bağ Toprağı	5-1	B. subtilis
Cibre	13-1	B. subtilis
Cibre	14-3	B. firmus
Sıcak Su	5 $\alpha$ -1	B. subtilis
Makarna Fab.	2-4-1	B. macerans
Cibre	11-2.a	B. subtilis

Katı ve sıvı besiyeri incelemeleri sonunda, en yüksek amilolitik aktivite gösterdiği saptanan ve Bacillus subtilis 5 $\alpha$ -2 olarak tanımlanan bakteri suşuyla çalışmalar sürdürülmüştür.

#### 4.4. Çeşitli Besiyerlerinde Gelişme ve Enzim Üretiminin İncelenmesi

B. subtilis 5 $\alpha$ -2 izolatının çeşitli besiyerlerinde gelişme ve enzim üretiminin incelenmesi amacıyla hazırlanan DFS Broth, YPS Broth ve Nutrient Broth ortamlarından 8 saatte bir alınan örneklerde; gelişme,  $\alpha$ -amilaz ve pullulanaz aktiviteleri ölçülmüş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.3.'de verilmiştir.





Şekil 4.3. *B.subtilis* 5 $\alpha$ -2 izolatının, YPS Broth (A), DFS Broth(B), ve N.B(C) besiyerlerinde:37°C de Üreme,  $\alpha$ -amilaz ve pullulanaz aktiviteleri

Elde edilen sonuçlara göre, bakteri en yüksek aktivite değerlerini YPS Broth ortamında göstermiştir. İnkübasyonun 40. saatinde 24 U/ml  $\alpha$ -amilaz ve 32. saatinde 13 U/ml pullulanaz maksimum değerlerine ulaşmıştır. YPS Broth besiyerinde bakterinin logaritmik gelişme aralığı 8. ve 24. saatler arası gerçekleşmiş olup daha sonra giderek azalmıştır. Bakterinin gösterdiği gelişme eğrisine göre,  $\alpha$ -amilaz ve pullulanaz olarak amilolitik enzim sentezi geç eksponansiyel faz ve sabit fazda gözlenmiştir (Şekil 4.3.A).

Bakteri, DFS Broth besiyerinde kısa sürede gelişmesine karşın, amilolitik enzim sentezi çok yavaş gerçekleşmiş, en yüksek  $\alpha$ -amilaz aktivitesi, gelişmenin 48. saatinde 7,5 U/ml iken, en yüksek pullulanaz aktivitesi ise 2,0 U/ml olarak gelişmenin 24. saatinde saptanmıştır (Şekil 4.3.B)

Nutrient Broth ortamında ise bakteri diğer besiyerlerine göre daha yavaş gelişme gösterirken, hemen hemen hiç amilolitik aktivite gözlenmemiştir (Şekil 4.3.C).

#### 4.5. Enzim Üretimine Nişasta Konsantrasyonunun Etkisi

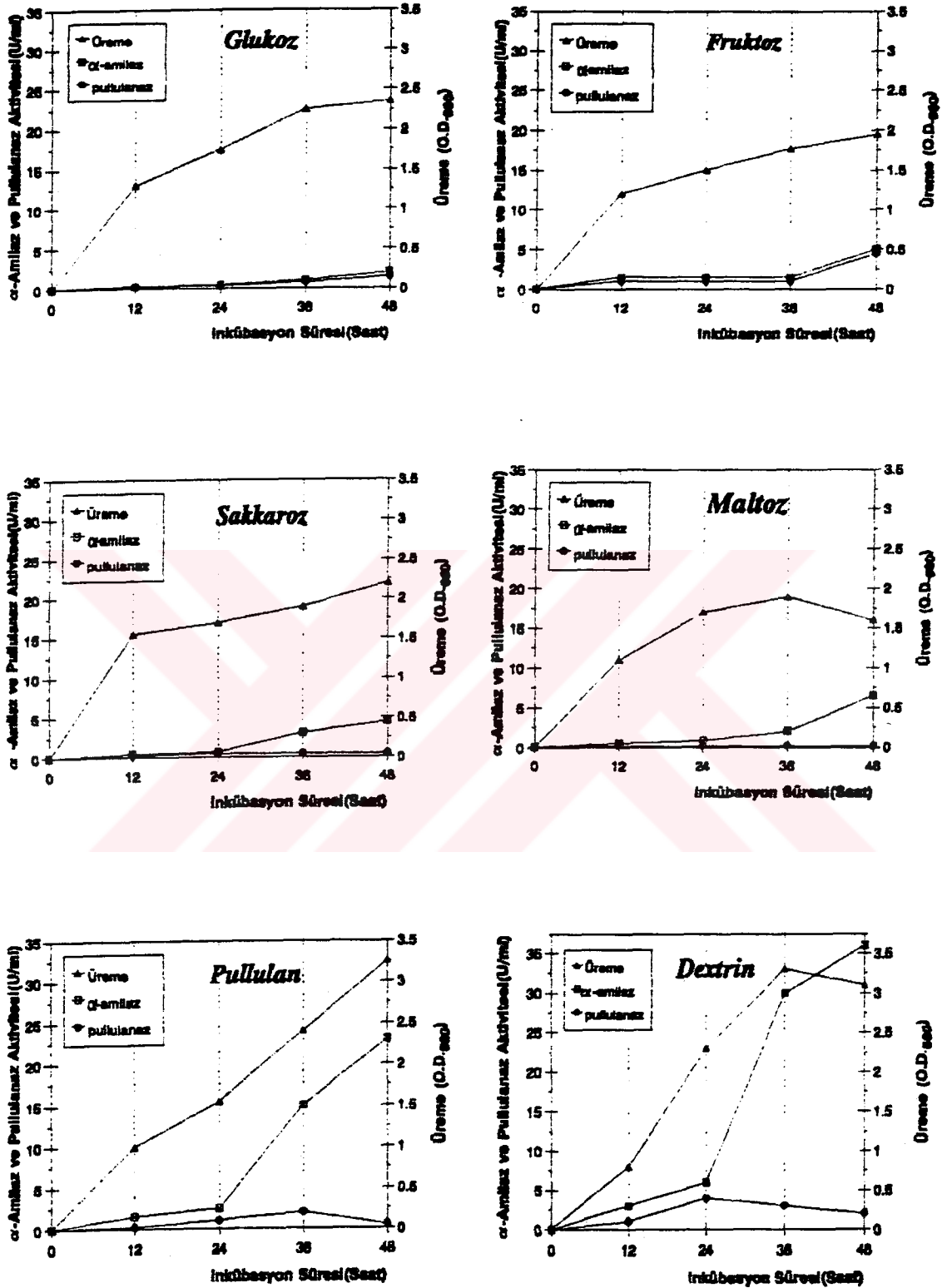
Farklı nişasta konsantrasyonlarında enzim sentezine etkisini incelemek amacıyla, Bölüm 3.8.'de belirtildiği şekilde hazırlanan ortamlarda 24 saatlik inkübasyonu sonunda  $\alpha$ -amilaz aktiviteleri ölçülmüştür (Çizelge 4.4.). Elde edilen sonuçlara göre; besiyerindeki nişasta konsantrasyonu arttıkça enzim aktivitesi artmakta, ancak artış oransal olmamaktadır.

**Çizelge 4.4. YPS Broth Besiyerindeki (%) Nişasta Konsantrasyonunun B.subtilis 5α-2 izolatının α-Amilaz Enzim Sentezine Etkisi 37°C 24 saat**

YPS Brottaki Nişasta Konsantrasyonu (%)	% 1	% 2	% 3	% 4
α-Amilaz Aktivitesi (U/ml)	4,4	8,3	11,2	12,2

#### 4.6. Farklı Karbon Kaynaklarının, Bakteri Gelişmesi ve Enzim Üretimine Etkisi

Bakteri gelişmesi ve amilolitik enzim sentezine karbon kaynaklarının etkisini belirlemek amacıyla, glukoz, fruktoz, sakkaroz, maltoz, pullulan ve dekstrin içeren ortamlarda B.subtilis 5α-2 suşunun 12 saatlik aralıkla alınan örneklerde gelişme, α-amilaz ve pullulanaz aktiviteleri ölçülerek, sonuçlar Şekil 4.4.'de verilmiştir. Glukoz, fruktoz, sakkaroz ve maltozlu ortamlarda bakteri hızlı bir gelişme göstermiş ve yaklaşık 16. saatten sonra giderek yavaşlamıştır. Amilolitik aktivite, glukoz ve fruktoz ortamında görülmezken, sakkaroz ve maltozda ise inkübasyon sonunda sırasıyla; 4,5 U/ml, 6,5 U/ml olarak düşük düzeyde α-amilaz aktivitesi gözlenmiştir. Diğer bir karbon kaynağı olan pullulan üzerinde bakterinin gelişmesi doğrusal olarak tüm inkübasyon periyoduna yayılmıştır. Bu besiyerinde α-amilaz sentezi inkübasyonun 24. saatinde artmaya başlamış ve inkübasyon sonunda 23,5 U/ml aktivite değerine ulaşırken, elde edilen pullulanaz aktivitesi ise çok az olup inkübasyonun 36. saatinde 1 U/ml olarak saptanmıştır.



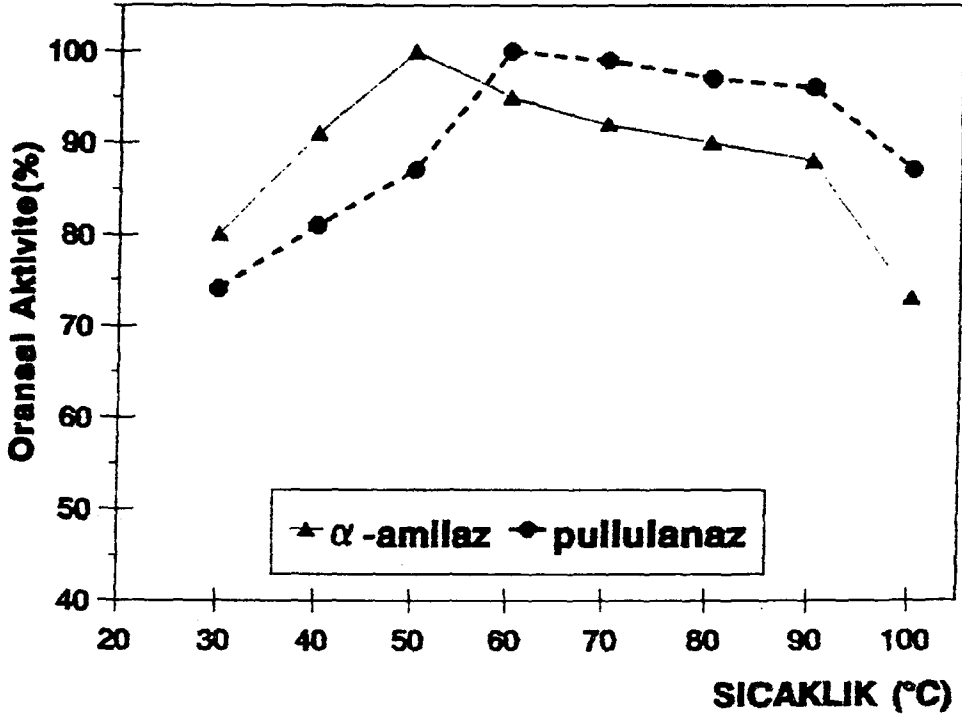
Şekil 4.4. *B. subtilis* 5a-2 izolatının: 37°C de Üreme,  $\alpha$ -amilaz ve pullulanaz sentezine farklı karbon kaynaklarının etkisi.

Diğer bir karbohidrat olan dekstrinde ise, bakteri 12. ile 36. saatler arasında hızla gelişmiş ve 36. saatten sonra düşmeye başlamıştır. Bu ortamda  $\alpha$ -amilaz sentezi inkübasyonun 24. ve 36. saatleri arasında çok hızlı bir şekilde artış gösterirken daha sonra yavaşlayarak inkübasyon sonunda 36 U/ml aktivite değerine ulaşmıştır. Pullulanaz ise inkübasyonun 24. saatinde 5 U/ml olarak saptanmış ve giderek azaldığı gözlenmiştir.

#### 4.7. Çeşitli Koşulların $\alpha$ -Amilaz ve Pullulanaz Aktivitelerine Etkileri

##### 4.7.1. Sıcaklığın enzim aktivitesine etkisi

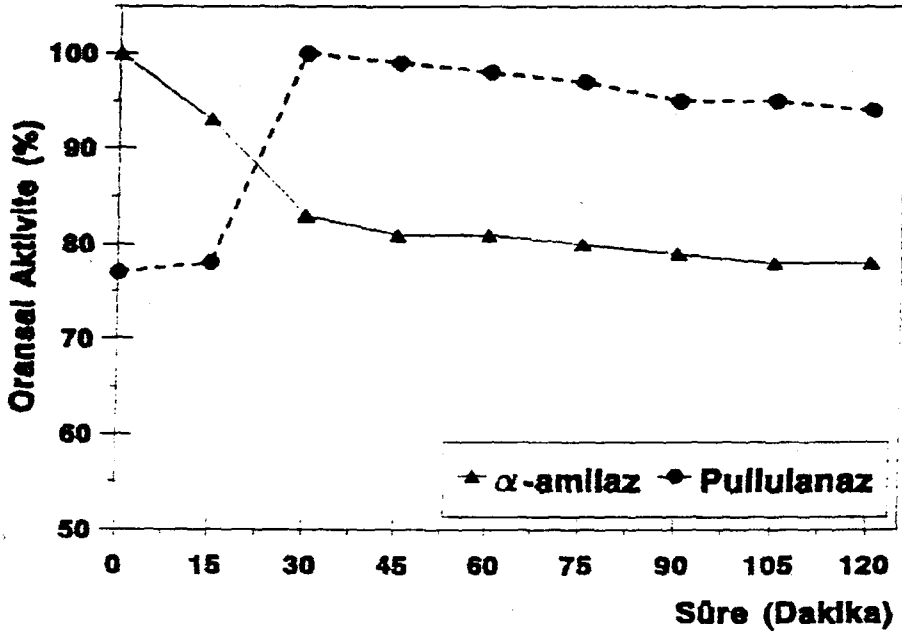
37°C'de ve YPS Broth ortamında geliştirilen B.subtilis 5 $\alpha$ -2 bakterisinin hücresiz enzim çözeltilisindeki  $\alpha$ -amilaz ve pullulanaz enzimlerinin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık aralığını belirlemek amacıyla, 30°C'den 100°C' ye kadar değişen sıcaklıklarda  $\alpha$ -amilaz ve pullulanaz aktiviteleri ölçülmüştür (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. *B.subtilis* 5 $\alpha$ -2 'nin YPS Broth ortamında 37°C'deki kültür süpernatantındaki  $\alpha$ -amilaz ve pullulanaz aktivitelerine, sıcaklığın etkisi

Elde edilen sonuçlara göre;  $\alpha$ -amilaz ve pullulanaz aktivitesi 30°C'den itibaren sıcaklık arttıkça artmaktadır.  $\alpha$ -Amilaz 50°C de en yüksek aktivite göstermiş olup, 50° ve 90°C sıcaklık aralığında aktivite değeri yaklaşık %90'nın üstündedir ve 100°C'de % 74 aktivite elde edilmiştir. Benzer şekilde pullulanaz 60°C de en yüksek aktivite göstermiş olup, 60° ve 90°C sıcaklık aralığında aktivite düzeyi % 95'in üstündedir ve 100°C'deki oransal aktivite %87 olarak saptanmıştır.

$\alpha$ -Amilaz ve pullulanazın sıcaklık stabilitesini belirlemek amacıyla 100°C' deki su banyosunda, substratsız kaba enzim örneği 2 saat bekletilmiş ve her 15 dakikada bir alınan örneklerde  $\alpha$ -amilaz ve pullulanaz aktiviteleri ölçülmüştür (Şekil 4.6.).



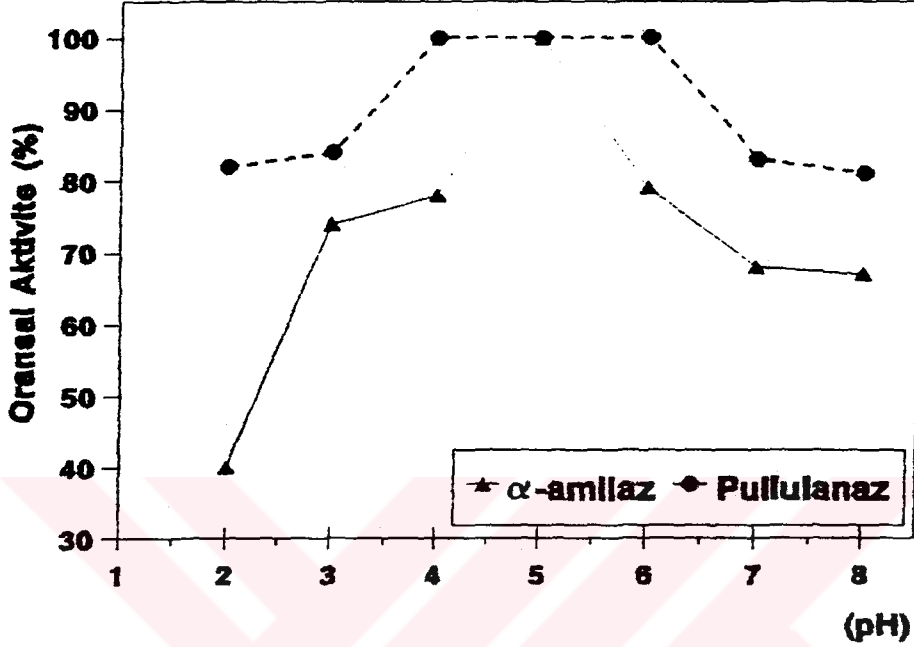
Şekil 4.6. *B. subtilis* 5a-2 'nin YPS Broth ortamında 37°C'deki kültür süpernatantındaki  $\alpha$ -amilaz ve pullulanazın 100°C'deki (su banyosunda) sıcaklık stabiliteleeri

Şekil 4.6 'da gösterilen sonuçlara göre;  $\alpha$ -amilaz 100°C sıcaklıkta 2 saat inkübasyon sonunda aktivitede % 23'lük bir düşme gözlenirken, pullulanaz ise aynı sıcaklıkta 15. ve 30. dakikalar arasında aktivite sırasıyla % 77'den % 100'e yükselmiş, daha sonra bu düzey yavaş bir şekilde azalarak inkübasyon sonunda ise enzim sadece % 5'lik bir düşmeyle % 95 aktivite göstermiştir.

#### 4.7.2. $\alpha$ -Amilaz ve pullulanaz aktivitesine pH'ın etkisi

$\alpha$ -Amilaz ve pullulanazın değişik pH'larda (pH 2-8) hazırlanan 20 mM sitrat-fosfat tampon çözeltisinde aktiviteleeri incelendiğinde;  $\alpha$ -amilaz pH 5'de en yüksek aktivite gösterirken, pH 3-8 aralığında ise yaklaşık %70'in üstünde

aktivite saptanmıştır. Pullulanaz ise pH 4-6 aralığında en yüksek aktivite gösterirken pH 2-8 aralığında ise yaklaşık %80'in üstünde aktivite elde edilmiştir (Şekil 4.7).

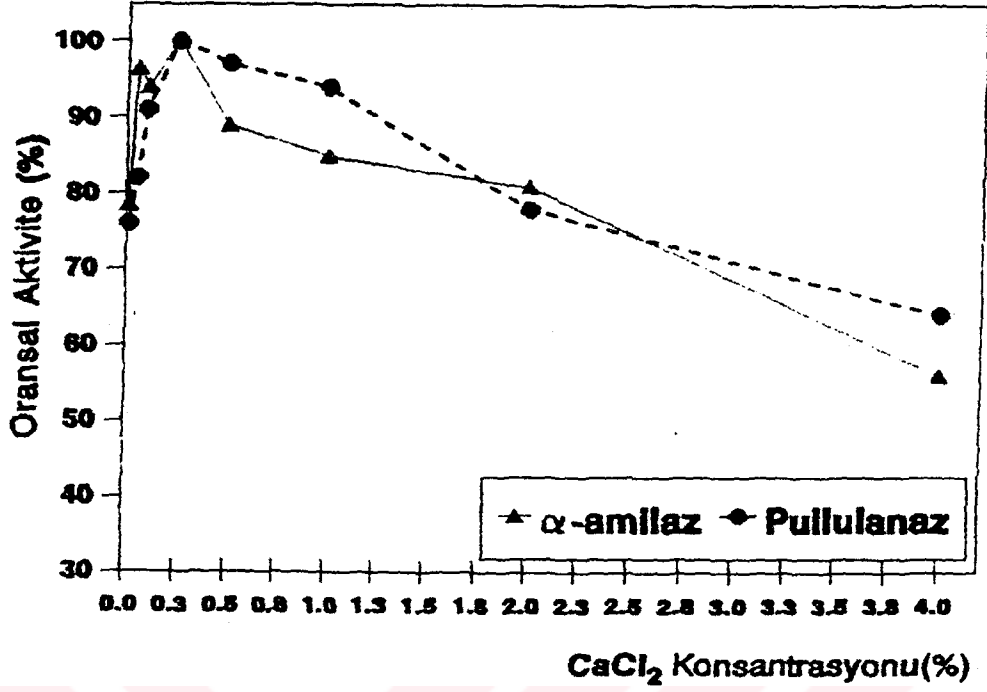


Şekil 4.7. *B. subtilis* 5 $\alpha$ -2 'nin YPS Broth ortamında, 37°C'de üretilen kültür süpernatantındaki  $\alpha$ -amilaz ve pullulanaz aktivitesine, pH'ın etkisi (20 mM Sitrat-Fosfat tampon)

#### 4.7.3. CaCl<sub>2</sub>'nin $\alpha$ -amilaz ve pullulanaz aktivitesine etkisi

Kaba enzim örnekleri, değişen konsantrasyonlarda (%0,01 - 4,0) hazırlanan CaCl<sub>2</sub> çözeltileri ile 1:1 oranında seyreltilerek ölçülen  $\alpha$ -amilaz ve pullulanaz aktiviteleri incelendiğinde; yaklaşık olarak, % 0,25 CaCl<sub>2</sub> konsantrasyonuna kadar her iki enzimin de aktiviteleri artarken, daha yüksek konsantrasyonlarda ise giderek azalmaktadır (Şekil 4.8.).

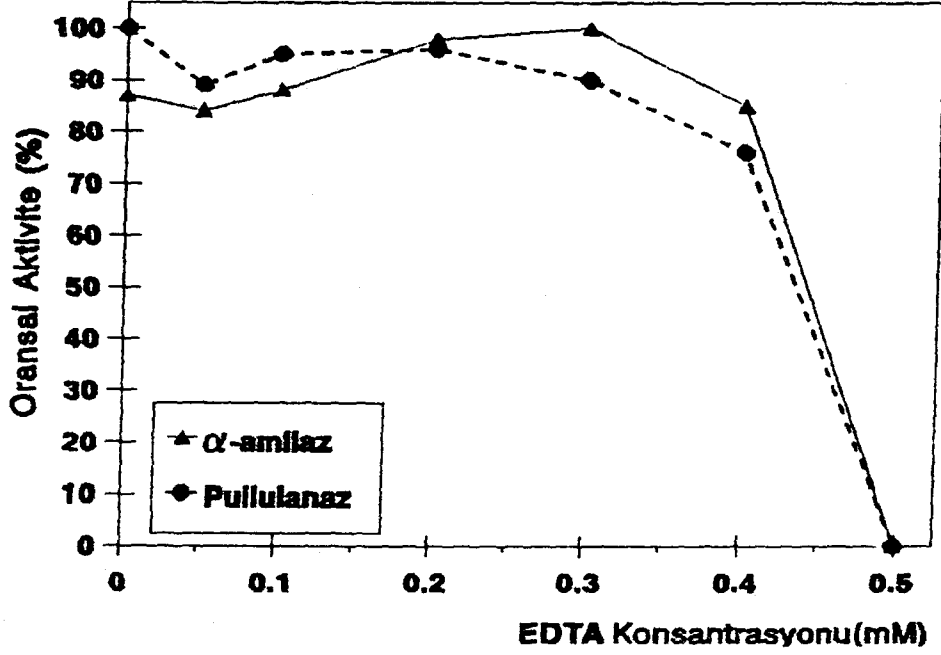




Şekil 4.8. *B. subtilis* 5α-2 'nin YPS Broth'ta 37°C' de üretilen kültür süpernatantındaki α-amilaz ve pullulanazın aktivitesine, CaCl<sub>2</sub>'nin etkisi

#### 4.7.4. EDTA'nın α-amilaz ve pullulanaz aktivitesine etkisi

EDTA'nın α-amilaz ve pullulanaz aktivitesine olan etkisini belirlemek amacıyla 0,05 - 0,5 mM arası konsantrasyonlarda hazırlanan EDTA çözeltileri ile 1:1 oranında seyreltilen kaba enzim örnekleri +4°C'de 2 saat bekletilmiş ve daha sonra aktivite değerleri saptanmıştır (Şekil 4.9).



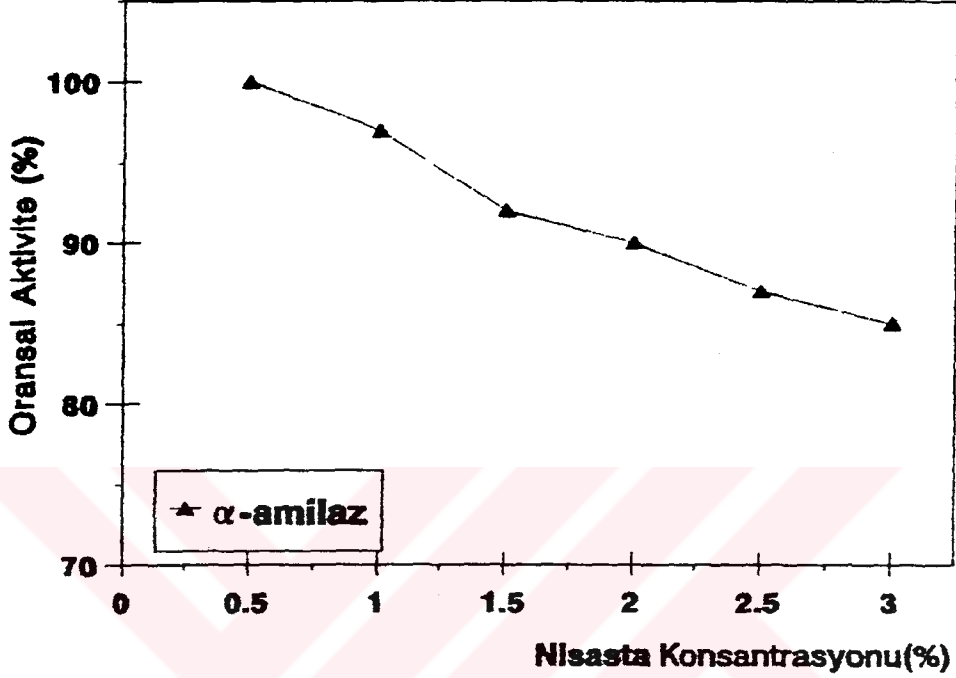
Şekil 4.9. *B.subtilis* 5 $\alpha$ -2 'nin YPS Broth'ta 37°C'de üretilen kültür süpernatantındaki  $\alpha$ -amilaz ve pullulanazın aktivitesine, EDTA'nın etkisi

Sonuçlar incelendiğinde: başlangıçta EDTA konsantrasyonu artışıyla  $\alpha$ -amilaz ve pullulanaz aktivitesi artarken en yüksek aktivite gösterilen konsantrasyonlar; sırasıyla 0,3 ve 0,2 mM olup, her iki enzim de daha yüksek konsantrasyonlarda hızla aktivite kaybetmekte ve 0,5 mM konsantrasyonda ise tamamen kaybolmaktadır (Şekil 4.9.).

#### 4.7.5. Substrat konsantrasyonunun $\alpha$ -amilaz aktivitesine etkisi

Bu amaçla % 0,5 - 3 arası konsantrasyonlarında nişasta içeren tampon çözeltiler hazırlanmış ve bu çözeltiler kullanılarak  $\alpha$ -amilaz aktivitesi ölçülmüştür (Şekil 4.10). Sonuçlar

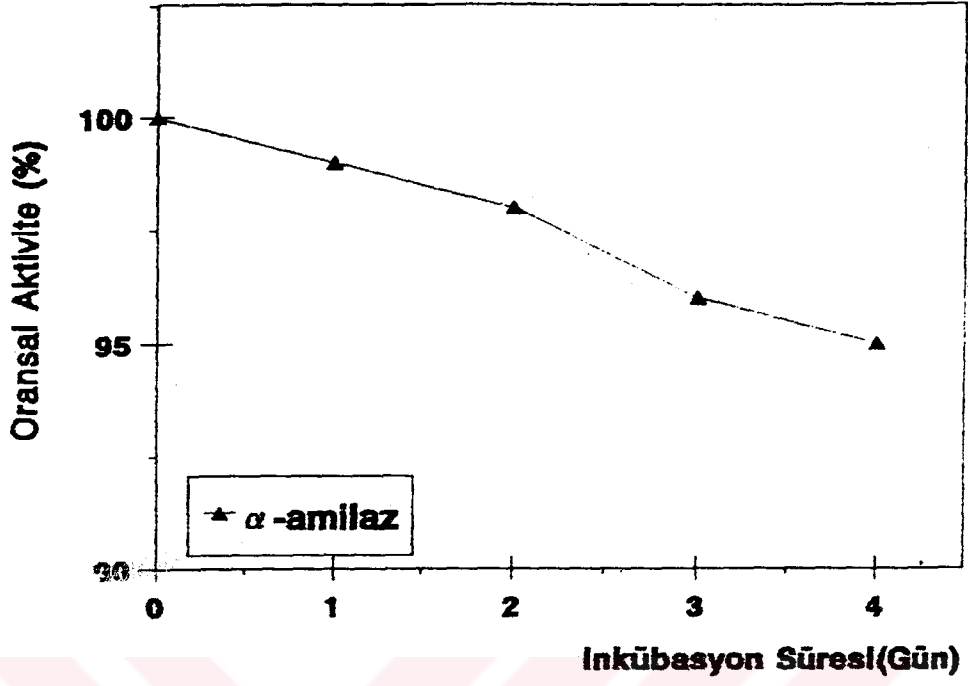
incelendiğinde en yüksek aktivite % 0,5 nişasta konsantrasyonunda elde edilmiş olup, konsantrasyon arttıkça saptanan  $\alpha$ -amilaz aktivitesi giderek azalmaktadır.



Sekil 4.10. B.subtilis 5 $\alpha$ -2 'nin YPS Broth'ta 37°C'de üretilen kültür süpernatantındaki  $\alpha$ -amilaz aktivitesine, nişasta konsantrasyonunun etkisi

#### 4.7.6. +4°C'de bekletmenin $\alpha$ -amilaz aktivitesine etkisi

Hazırlanan kaba enzim örnekleri buzdolabı sıcaklığında 4 gün boyunca saklanmış ve her 24 saatte bir alınan örneklerde  $\alpha$ -amilaz aktivitesi ölçülmüştür (Şekil 4.11.). Sonuçlar incelendiğinde enzim aktivitesinin çok yavaş bir şekilde azaldığı ve 4 günlük bekletme sonunda % 5 düzeyinde aktive kaybı olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.11. B.subtilis 5 $\alpha$ -2 'nin YPS broth'ta 37°C'de üretilen kültür süpernatantındaki  $\alpha$ -amilaz aktivitesine, +4°C'de saklamanın etkisi

## 5. TARTIŞMA

Son yıllarda gerek endüstriyel enzim üretiminde gerekse kullanımında önemli artışlar gözlenmektedir. Buna neden olarak biyoteknolojideki gelişmeler sonucu, daha önceleri hayvansal ve bitkisel kaynaklardan elde edilebilen enzimlerin, daha ekonomik ve daha kontrollü koşullarda mikrobiyel yolla eldesi gösterilebilir. Endüstriyel olarak üretilen enzimlerin yaklaşık % 80'i gıda sanayiinde kullanılmakta ve amilaz grubu enzimler bu kullanımda büyük pay almaktadır (Üstünes ve Güvenç 1985).

Bu çalışmada öncelikle, başta gıda, kimya, deterjan, tekstil v.b. endüstrilerde nişastanın parçalanmasında kullanılacak amilolitik enzimlerin üretimi için uygun özelliklere sahip mikroorganizmanın izolasyonu seçimi amaçlanmıştır. İzolasyon çalışmaları çerçevesinde incelenen çeşitli doğal kaynaklardan toplam 59 maya ve bakteri izole edilmiştir. Bunlardan starch azure içeren katı besiyerinde zon oluşumu ve sıvı besiyerinde  $\alpha$ -amilaz aktivitesi ölçülerek yapılan eleme işleminde: diğerlerinden belirgin şekilde yüksek amilolitik aktivite gösteren 5 bakteri suşu belirlenerek, tanımlanmıştır. Daha sonra yapılan katı ve sıvı besiyeri incelemeleri sonunda en yüksek amilolitik aktivite gösterdiği saptanan ve Bacillus subtilis 5 $\alpha$ -2 olarak tanımlanan, bir sıcak su kaynağına ait bu bakterinin amilolitik enzimlerinin çeşitli özellikleri saptanmıştır.

Normal koşullarda yaşayan pek çok mikroorganizma

yanında son yıllarda volkanik bölgeler, jeotermal su kaynakları, kaplıcalar gibi doğal sıcak alanlarda da belirli bir mikrobiyel floranın mevcudiyeti anlaşılmıştır (Dönmez 1987). Genellikle Antranikian et al (1987) ve Antranikian (1990) tarafından yapılan araştırmalarda: jeotermal sıcak su kaynaklarının, termofil organizmaların doğal ortamları olduğu belirtilmiş ve böyle bölgelerden alınan su ve toprak örneklerinden; alışılmamış yüksek sıcaklıklarda (40°C'den 130°C'ye kadar) gelişen mikroorganizmalar izole edilmiştir.

Bu çalışmada sıcak su kaynağından izole edilen ve Bacillus subtilis 5a-2 olarak tanımlanan suş'un termostabil  $\alpha$ -amilaz ve pullulanaz üretimi için uygun mikroorganizma olduğu anlaşılmıştır. 100°C'de iki saat inkübasyon sonunda,  $\alpha$ -amilaz aktivitesinde % 23'lük bir düşme gözlenirken, pullulanaz aktivitesinde ise sadece % 5'lik bir düşmeyle % 95 aktivite değeri gözlenmiştir (Şekil 4.6.).

Hyun and Zeikus (1985 b)'a göre, nişastanın çeşitli şeker şuruplarına dönüşümünde kullanılan amilolitik enzimlerin termostabilite ve termoaktiviteye sahip olması, yüksek değer oluşturmaktadır. Nişasta sakkarifikasyon proseslerinde, daha yüksek substrat çözünürlüğü elde etmek ve kontaminasyona engel olmak için genellikle 60°C'nin üstünde sıcaklık uygulanmaktadır. Pullulanaz ve glukoamilazın uygulamadaki faydası bu sıcaklıklarda stabil olmadıklarından dolayı biraz sınırlıdır ve bu nedenle termostabil pullulanaz ve glukoamilazın önemli bir katkısı olacaktır.

Madi et al (1987)'e göre, nişasta sakkarifikasyonunda

olduğu gibi, pek çok endüstriyel proses için termostabil enzimler gereklidir.

Plant et al (1987), amilolitik enzimlerin fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri için mevcut proses parametreleriyle bağdaşan özelliklere sahip olmaları gerektiğini, özellikle nişasta endüstrisinde kullanılan yüksek sıcaklıklarda stabil olması ve geniş asidik pH değerlerine tolere etmesi gerektiğini belirtmişlerdir.

Tatlandırıcı üretiminde kullanılan çoğu endüstriyel sakkaridazlar (amilazlar) yüksek termostabiliteye ihtiyaç göstermektedir ve termostabil sakkaridazların kullanılmasıyla reaktördeki enzimin yarı ömrünü uzatmak için birçok çalışma yapılmaktadır (Lee et al 1990).

Kochhar and Dua (1990), Saha and Zeikus (1990), Jamuna and Ramakrishna (1992)'ya göre, sıvılaştırıcı  $\alpha$ -amilazlar, 80°C ve 110°C gibi yüksek sıcaklıklarda geniş bir uygulamaya sahiptir ve bu nedenle nişasta sıvılaştırma proseslerinin ihtiyaçı olan termostabil amilazların daha çok araştırılması gerekmektedir.

Nişasta parçalayan bir endüstri kolu için gerçekten önemli olan yüksek sıcaklıklara dayanabilme yeteneği, Bacillus subtilis 5 $\alpha$ -2 bakterisinin  $\alpha$ -amilazı ve pullulanazında fazlasıyla bulunmaktadır. Antranikian (1990)'a göre, endüstriyel proseslerdeki yüksek sıcaklık uygulaması sayesinde mikrobiyel kontaminasyon riski en aza indirgenmekte, çözelti vizkozitesi düşmekte, polimer çözünürlüğu artmakta, diffüzyon oranı hızlanmaktadır.

Kullanılan karbon kaynağının amilolitik enzim üretimine etkisini belirlemek için bizim yaptığımız bu çalışmada, karbon kaynağının amilolitik enzim sentezine çok sıkı bir şekilde bağlı olduğu gözlenmiştir. Ayrıca bakteri gelişmesiyle amilolitik enzim sentezlenmesi arasındaki ilişki de yine kullanılan karbon kaynağına göre değişmiştir.

Monosakkarit olarak kullanılan glukoz ve fruktoz üzerinde bakteri hızla gelişmiş fakat herhangi bir amilolitik aktivite gözlenememiştir. Maltoz ve sakkaroz ortamında ise bakterinin sabit gelişme fazının sonuna doğru sırasıyla, 6,5 U/ml ve 4,5 U/ml gibi düşük düzeyde  $\alpha$ -amilaz aktivitesi gözlenmiştir.

Nişasta, dekstrin ve pullulan olarak  $\alpha$ -1,4 ve  $\alpha$ -1,6 bağlarını içeren polimer sakkaritlerde ise bakteri, mono- ve di- sakkaritlere kıyasla daha yavaş bir şekilde gelişmiştir. Bakterinin nişasta üstünde gösterdiği gelişme eğrisine göre: inkübasyonun 40. saatinde 24 U/ml  $\alpha$ -amilaz ve 32. saatinde 13 U/ml pullulanaz olarak en yüksek düzeye erişmiş ve  $\alpha$ -amilaz ve pullulanaz enzimlerinin sentezlenmesi, logaritmik fazın sonundan başlayarak sabit gelişme fazında gerçekleşmiştir. Bakteri, pullulan üzerinde uzun bir logaritmik faz göstermiştir ve inkübasyonun 24. saatinden başlayarak 48. saatte 23,5 U/ml  $\alpha$ -amilaz aktivitesine ulaşırken, elde edilen pullulanaz aktivitesi ise önemli düzeylerde değildir. İncelenen karbon kaynakları içerisinde en yüksek  $\alpha$ -amilaz aktivitesi dekstrin üzerinde inkübasyonun 48. saatinde 36 U/ml olarak elde edilirken, pullulanaz inkübasyonunun 24. saatinde 5 U/ml düze-



yine ulaşıp daha sonra azalmıştır. Bu çerçeve içerisinde en yüksek pullulanaz üretimi nişastalı ortamda saptanmıştır. İncelenen tüm besiyerlerinde bakterinin gösterdiği  $\alpha$ -amilaz aktivitesi, pullulanazdan daha yüksektir. Kullanılan karbon kaynağının değişmesi bakterinin bu özelliğini etkilememiştir.

Amilolitik enzim sentezine karbon kaynağının etkisi ve mikroorganizma gelişmesiyle amilolitik enzim sentezi arasındaki ilişki konusunda çeşitli araştırmacılar benzer ve bazı farklı sonuçlar elde etmişlerdir.

Matur (1981) tarafından, nişastalı ortamda üretilmekte olan B. subtilis'in kültür ortamına eklenen glukoz ve maltozun kültürde;  $\alpha$ -amilazın sentez hızını olumsuz yönde etkilemeleri, enzim sentezi üzerindeki glukoz baskılamasıyla ilgili diauxic mekanizmanın tipik bir örneği olarak belirtilmiş ve glukozun neden olduğu baskılayıcı etkiyi kaldırmak için çeşitli çalışmalar yapılmıştır.

Madi et al (1987) tarafından Clostridium sp. EM1 'le yapılan benzer bir denemede, substrat olarak riboz, fruktoz, laktoz ve glukozla çok az  $\alpha$ -amilaz ve pullulanaz aktivitesi bulunurken;  $\alpha$ -1,4 ve  $\alpha$ -1,6 bağlarını içeren glukanlarla (maltoz, maltotrioz, pullulan ve nişasta) enzim üretiminin görünür şekilde artırılabilirdiği belirtilmiş ve bu olayın bakteriyel ve fungal kaynaklı çeşitli amilolitik enzimler için bilinen bir özellik olduğu da ifade edilmiştir. Benzer olarak Antranikian (1990), Clostridiumlar'da amilolitik enzim sentezinin glukoz tarafından katabolik baskılamaya uğrarken, nişasta ile indüklendiğini belirtmiştir.

Annous and Blaschek (1990, 1991) tarafından C. acetobutylicum ATCC 824 suşuyla yapılan çalışmalarda, mikroorganizmanın glukoz veya maltozda geliştiği zaman esasen intrasellüler (membrana bağlı), fakat nişasta ve dekstrinde geliştiği zaman ise ekstrasellüler amilolitik enzimler oluşturduğu gösterilmiştir. Gelişme ortamındaki glukoz konsantrasyonundaki artma ekstrasellüler ve total enzim aktivitelerinde bir azalmaya, hücrede adsorbe edilmiş amilolitik aktivitede bir artmaya sebep olduğu belirtilmiştir.

Brown et al (1990) tarafından, Pyrococcus furiosus'da karbohidratların  $\alpha$ -amilaz, pullulanaz ve  $\alpha$ -glukozidaz olarak enzim üretimine etkisi denenmiş ve glukoz ile her üç enzim de elde edilemezken,  $\alpha$ -amilaz en yüksek pullulan ile elde edilmiş ve bunu nişasta, maltoz takip etmiştir. Pullulanaz ise en yüksek maltoz ile elde edilmiş, bunu nişasta ve pullulan takip etmiştir.

Bajpai and Bajpai (1991)'e göre, karbon kaynağı olarak nişasta yerine, 20 veya daha fazla D.E.'li nişasta parçalanma ürünlerinden olan maltodekstrinlerin kullanımıyla B.sp. TCRDC 25.A ile  $\alpha$ -amilaz üretimi önemli ölçüde artırılabilmiştir.

Castro et al (1992) tarafından, B. subtilis MIR.5 olarak tanımlanan bir suşla yapılan çalışmada: kesikli kültürde geç eksponansiyel gelişme fazında 8,4 U/ml maksimum  $\alpha$ -amilaz ve eksponansiyel gelişme fazının daha erken döneminde 522 U/ml maksimum  $\beta$ -amilaz aktiviteleri saptanmıştır. Aynı çalışmada: farklı suşlardaki farklı ayarlama modelinin, besiyeri bileşiminde yer alan gelişmeyi sınırlayan substratın

değişiminin ve farklı kültür koşullarının etkisiyle, amilolitik enzim sentezlenme aşamasının değişebileceği de belirtilmiştir.

Modern endüstrilerdeki enzim uygulamaları teknik ve ekonomik kâr elde etmek için genel bir uygulama haline gelirken, kullanılan organizmalar arasında ise Bacillus cinsi giderek önemini arttırmaktadır (Yin et al 1991). Örneğin, endüstriyel sıvılaştırma yapan termostabil  $\alpha$ -amilazlar Bacillus cinsinin birkaç türünden elde edilmektedir (Güvenç ve Üstünes 1987, Castro et al 1992). Bacillus cinsi bakterilerin genellikle çeşitli ekstrasellüler enzimleri birlikte oluşturduğu bilinmektedir. B. subtilis  $\alpha$ -amilaz ve pullulanaz, B. megaterium ve B. polymyxa  $\alpha$ - ve  $\beta$ -amilazlar, B. subtilis  $\alpha$ -amilaz,  $\beta$ -glukonaz, proteaz oluşturduğu bildirilmiştir (Yin et al 1991, Castro et al 1992).

Bu çalışmada kullanılan B. subtilis 5 $\alpha$ -2 suşunun da benzer olarak, nişastalı besi ortamında  $\alpha$ -amilaz ve pullulanaz enzimlerini birlikte oluşturduğu saptanmıştır.

Bacillus cinsi gibi çeşitli ekstrasellüler enzimleri birlikte oluşturan mikroorganizmalarda bu durum bazen olumsuz sonuçlar doğurmaktadır. Nitekim B. subtilis'ten amilolitik enzim üretimi esnasında, besiyerine salgılanan proteazın bu enzimleri hızlı bir şekilde parçalayarak; aktivitenin azalmasına yol açtığı bildirilmiştir (Yin et al 1991). Bu duruma engel olabilmek için aynı çalışmada, proteaz sentezine neden olmayacak uygun azot kaynaklarını içeren bir besiyerinin kullanılması ve uygun fermantasyon süresinin seçilmesi öne-

rılmıştır.

Bu çalışmada, amilolitik enzim üretimi amacıyla kullanılan DFS Broth ve YPS Broth besiyerlerinde, bakteri farklı düzey ve aşamalarda amilolitik enzim üretmiştir. Her iki besiyerinde de % 3 oranında nişasta bulunurken DFS Broth ortamında % 2 yağsız soya unu, YPS Broth ortamında % 1 yeast ekstrakt ve % 2 pepton bulunmaktadır. Bakterinin her iki besiyerinde gözlenen gelişme eğrilerinde belirgin bir fark gözlenemezken, DFS Broth ortamında amilolitik enzim sentezi çok yavaş bir şekilde gerçekleşmiş olup sabit gelişme fazının sonuna doğru artış gösteren  $\alpha$ -amilaz aktivitesi inkübasyon sonunda 7,5 U/ml değerine ulaşmış, en yüksek pullulanaz ise (2,0 U/ml) inkübasyonun 24. saatinde gerçekleşmiştir. Görüldüğü gibi amilolitik enzim sentezi YPS Broth ortamından, hem daha az hem de daha geç bir aşamada oluşmaktadır.

Balk (1991) tarafından Bacillus proteazlarıyla yapılan bir çalışmada, bir B.subtilis suşu ile yağsız soya unlu bir besiyerinde 181 U/ml proteaz aktivitesi elde edilmiştir. Bu bulgular çerçevesinde DFS Broth ortamında oluşacak proteaz aktivitesinin amilolitik enzimleri parçalayabilmesi, bu azalmanın nedeni olabileceği düşünülebilir.

Nutrient Broth ortamında herhangi bir  $\alpha$ -amilaz ve pullulanaz aktivitesinin gözlenememesi, amilolitik enzim sentezinin karbon kaynağına bağlılığını göstermektedir (Şekil 4.3.C.).

Plant et al (1987) tarafından yapılan bir çalışmada, pullulanaz aktivitesine EDTA ve  $\text{CaCl}_2$ 'nin etkisi incelenmiş

ve fazla miktarda EDTA ilavesinin enzim aktivitesini olumsuz yönde etkilediği ve enzimin tam aktivite gösterebilmesi için  $Ca^{++}$  iyonlarına gereksinim duyduğu belirtilmiştir. Antranikian et al (1987)'e göre, 10 mM EDTA varlığında  $\alpha$ -amilaz da %80, pullulanaz da ise %70'lik aktivite elde edilmiştir. Hayashida et al (1988) tarafından, ham nişasta granüllerine etkili B.subtilis  $\alpha$ -amilazıyla yapılan çalışmada: 0,1 mM EDTA'nın, enzimi %61,3 oranında inhibe ettiği ve bu  $\alpha$ -amilazın stabilizasyonu için  $Ca^{++}$  iyonlarının gerekli olduğu belirtilmiştir.

Lappalainen et al (1991) tarafından Bacillus acidopullulyticus'un pullulanazı ile yapılan çalışmada:  $CaCl_2$  varlığı, çok az bir oranda (% 4-8) enzimin aktivitesini etkilerken; 20 mM  $CaCl_2$  enzim termostabilitesini etkilemediği saptanmıştır. Aynı çalışmada: farklı Bacillus suşlarının pullulanaz enzimlerinin stabilite ve aktivitelerine  $Ca^{+2}$  iyonlarının etkisinin farklı olabileceği de belirtilmiştir.

$CaCl_2$  ve EDTA'nın  $\alpha$ -amilaz ve pullulanaz aktivitesine etkisi konusunda bu araştırmada: enzim aktivitelerini, her iki maddenin de kullanılan konsantrasyonlarına bağlı olarak etkiledikleri saptanmıştır. % 0,25  $CaCl_2$   $\alpha$ -amilaz ve pullulanaz aktivitesini yaklaşık % 20 arttırırken, daha yüksek konsantrasyonlarda ise aktivite giderek azalmaktadır (Şekil 4.8.). EDTA'da ise;  $\alpha$ -amilaz aktivitesi 0,3 mM konsantrasyonuna kadar artmış daha sonra hızla azalmıştır. Pullulanaz'da ise 0,2 mM EDTA konsantrasyonunda % 97 aktivite değerine ulaşılmış fakat daha sonra  $\alpha$ -amilaza benzer şekilde, daha yüksek EDTA konsantrasyonlarında hızla inaktive olmuştur.

Balk (1991)'a göre, bir B.subtilis'nin kaba proteazı 0,2 mM EDTA ile % 65 inaktive olmaktadır.

Bu çalışmada kullanılan kaba enzim çözeltisine ilave edilen EDTA ile, bu koşullar altında düşük konsantrasyonlardaki örneklerde amilolitik aktivitenin artması, proteaz aktivitesinin inaktive olmasına bağlanabilir. EDTA'nın yüksek konsantrasyonlarında ise, amilolitik enzimler üstünde olan inhibitör etkisinin sonucu enzim aktivite değerleri azalmıştır.

Pek çok bakteriyel amilaz ve pullulanazlar için asidik pH optimumu yaygındır ve nişasta teknolojisinde geçerli olan asidik koşullar altında kullanılmak için dikkate alınan herhangi bir enzimin başlıca özelliği bu olmalıdır (Plant et al 1987).

Bu çalışmada kullanılan bakterinin gerek  $\alpha$ -amilaz gerekse pullulanazı geniş bir pH aralığında (pH 3-8) stabil olup, pH 5'de optimum aktivite göstermişlerdir (Şekil 4.7.).

Sonuç olarak, bu çalışmada izole edilen B.subtilis 5 $\alpha$ -2 suşunun  $\alpha$ -amilaz ve pullulanazının saptanan özellikleri dolayısıyla, çeşitli endüstri kolları için önemli ve aranan niteliklere sahip olduğu belirlenmiştir. Ülkemizde bol olarak üretilen patates, buğday, arpa v.b. birçok tarımsal hammadde- nin bileşiminde yüksek oranda nişasta bulunmaktadır. Başta nişasta endüstrisi olmak üzere çeşitli sanayi dallarında birçok amaçla nişasta yer almakta ve buna bağlı olarak da çeşitli amilolitik enzimler kullanılmaktadır. Özellikle pullulanaz enzimi nişasta parçalayan endüstrilerdeki limit dekstrinden kaynaklanan çeşitli problemleri çözebilecektir.

B.subtilis 5 $\alpha$ -2 bakterisiyle  $\alpha$ -amilaz ve pullulanazın üretimi için seçilecek ekonomik bir besiyerinde uygun azot ve karbon kaynağının belirlenmesiyle daha yüksek enzim düzeylerine ulaşılabilecektir.



## 6. KAYNAKLAR

- ABRAHAM, T.E., JAMUNA, R., BANSILAL, C.V., and RAMAKRISHNA, S.V. 1991. Continuous Synthesis of Glukoamylase by Immobilized Fungal Mycelium of Aspergillus niger. Starch/Stärke, 43 (3): 113-116.
- ANNOUS, B.A. and BLASCHEK, H.P. 1990. Regulation and Localization of Amylotic Enzymes in Clostridium acetobutylicum ATCC 824., Appl. and Environ. Microbiol., 56 (8): 2559-2561.
- ANNOUS, B.A. and BLASCHEK, H.P. 1991 Isolation and Characterization of Clostridium acetobutylicum Mutants with Enhanced Amylolytic Activity., Appl. and Environ. Microbiol., 57 (9): 2544-2548.
- ANTRANIKIAN, G., HERZBERG, C. and GOTTSCHALK, G. 1987. Production of Thermostable  $\alpha$ -Amylase, Pullulanase and  $\alpha$ -Glucosidase in Continuous Culture by a New Clostridium Isolate., Appl. and Environ. Microbiol., 53 (7): 1668-1673 .
- ANTRANIKIAN, G. 1990. Stärke hydrolysierende Enzyme aus thermophilen anaeroben Bakterien - Eigenschaften und Biotechnologische Bedeutung-, Forum Mikrobiologie, 13 (9): 399-409.
- BAJPAI, P. and BAJPAI, P.K. 1991. Increased Production of Thermostable  $\alpha$ -Amylase Enzyme by Bacillus sp. TCRDC-25 A with Maltodextrins., Appl. Biochem. and Biotechnol., 31: 159-164.



- BALK, M. 1991. Bazı Bacillus'ların Ekstrasellüler Proteazlarının Özellikleri ve Üretim Koşullarının Optimizasyonu., A.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- BROWN, S.H., COSTANTINO, H.R. and KELLY, R.M. 1990. Characterization of Amylolytic Enzyme Activities Associated with the Hyperthermophilic Archaeobacterium Pyrococcus furiosus . Appl. and Environ. Microbiol., 56 (7): 1985-1991.
- BRUMM, P.J. and TEAGUE, W.M. 1989. Effect of Additives on the Thermostability of Bacillus stearothermophilus  $\alpha$ -Amylase., Biotech. Lett., 11 (8): 541-544.
- BRUMM, P.J. and TEAGUE, W.M. 1990. Denaturation of Bacillus stearothermophilus  $\alpha$ -Amylase by Urea and Detergents. Biotech. Lett., 12(4): 253-258.
- CAMPUS, B.G.D., PRIEST, F.G. and STARK, J.R. 1992. Hydrolysis of Starch Granules by the Amylase from Bacillus stearothermophilus NCA 26.. Process Biochem., 27: 17-21.
- CASSLER, A.B. and IMAM, S. 1991. Partial Purification and Comparative Characterization of  $\alpha$ -Amylase Secreted by Lactobacillus amylovorus., Current. Microbiol., 23: 207-213.
- CASTRO, G.R., FERRERO, M.A., ABATE, C.M., MENDEZ, B.S. and SENERIZ, F. 1992. Simultaneous Production of Alpha and Beta Amylases by Bacillus subtilis MIR-5 in Batch and Continuous Culture., Biotech. Lett., 14 (1): 49-54.

- COWAN, S.T. and STEEL, K.J. 1966. Manual for the Identification of Medical Bacteria., Chambridge Univ. Press.
- DÖNMEZ, S. 1986. Gıda Sanayiinde Kullanılan Enzimler ve Ülkemizdeki Durumu., Gıda, 11, 215-220, Ankara.
- DÖNMEZ, S. 1987. Ekstrem Termofil Mikroorganizmalar ve Bioteknolojide Uygulama Olanakları., Gıda, 12 (6):401-407, Ankara.
- DÖNMEZ, S. 1991. Enzim Teknolojisi. Ders Notları (Yayımlanmamış) Ankara.
- EKŞİ, A. 1988 a. Gıda Kimyası ve Biokimyası. Ders Notları (Yayımlanmamış), Ankara.
- EKŞİ, A. 1988 b. Meyve Suyu Durultma Tekniği. Gıda Teknolojisi Derneği Yayın No:9, Sayfa: 26-29, Ankara.
- FİDAN, I ve ŞAHİN, İ. 1983. Alkol ve Alkollü İçkiler Teknolojisi. A.Ü.Ziraat Fakültesi Yayınları: 863, A.Ü. Basımevi, Sayfa: 53-58, 132-135., Ankara.
- FOGARTY, W.M. and GRIFFIN, P.J. 1975. Purification and Properties of  $\beta$ -Amylase Produced by Bacillus polymyxa., J. Appl. Chem. Biotechnol., 25: 229-238.
- FOGARTY, W.M., KELLY, F.B., KELLY, C.T. and DOYLE, E.M. 1991. A novel malthohexaose-forming  $\alpha$ -Amylase from Bacillus caldovelox :patterns and mechanisms of action., Appl. Microbiol. Biotechnol., 36: 184-189.
- FORDHAM, J.R. and BLOCK, N.H. 1987. 3. Regulatory issues of enzyme technology. Developments in Industrial Micbiol., Vol 28: 25-31.

- FREITAG, R., SCHEPER, T., SPREINAT, A. and ANTRANIKIAN, G. 1991. On-line monitoring of pullulanase production during continuous culture of Clostridium thermosulfurogenes Appl. Microbiol. Biotechnol., 35: 471-476.
- GOMORI, G. 1955. Preparation of Buffers for Use in Enzym Studies. Methods in Enzymology., Academic Press, 1: 16-25, New York.
- GÜVENÇ, U. ve ÜSTÜNES, H. 1987. Bacillus subtilis ve Bacillus amyloliquefaciens  $\alpha$ -Amilazlarının Oluşumu ve Bazı Fizikokimyasal Özellikleri E.Ü. Müh. Fak., Gıda Müh., 5(1): 19-30.
- HASKA, N. and OHTA, Y. 1991. Glukose Production from Treated Sago Starch Granules by Raw Starch Digesting Amylase from Penicillium brunneum., Starch, 43 (3):102-107.
- HAYASHIDA, S., TERAMOTO, Y. and INOUE, T. 1988. Production and Characteristics of Raw-Potato-Starch-Digesting  $\alpha$ -Amylase from Bacillus subtilis 65., Appl. and Environ. Microbiol., 54 (6): 1516-1522.
- HYUN, H.H. and ZEIKUS, J.G. 1985 a. Simultaneous and Enhanced Production of Thermostable Amylases and Ethanol from Starch by Cocultures of Clostridium thermo-  
sulfurogenes and Clostridium thermohydrosulfuricum., App. and Env. Mic., 49(5): 1174-1181.
- HYUN, H.H. and ZEIKUS, J.G. 1985 b. General Biochemical Characterization of Thermostable Pullulanase and Glukoamylase from Clostridium thermohydrosulfuricum. Appl. and Environ. Microbiol., 49(5): 1168-1173.

- JAMUNA, R. and RAMAKRISHNA, S.V. 1992. Continuous synthesis of thermostable  $\alpha$ -amylase by Bacillus cells immobilized in calcium alginate., *Enzyme Mic. Tech.*, 14 (Jan): 36-41.
- KATKOCIN, D.M. 1984. *Enzymes.*, *Food Eng.* (May): 85-95.
- KIM, J., NANMORI, T. and SHINKE, R. 1989. Thermostable, Raw-Starch-Digesting Amylase from Bacillus stearothermophilus. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 55(6): 1638-1639.
- KIM, K., PARK, C.S. and MATTON, J.R. 1988. High-Efficiency, One-step Starch Utilization by Transformed Sacch. Cells Which Secrete Both Yeast Glukoamylase and Mouse  $\alpha$ -Amylase. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 54(4): 966-971.
- KOCHHAR, S. and DUA, R.D. 1990. Thermostable Liquefying  $\alpha$ -Amylase from Bacillus amylolyquefaciens. *Biotech. Lett.*, 12(5): 393-396.
- LAPPALAINEN, A., NIKUPAAVOLA, M.L., SUORTTI, T. and POUTANEN, K. 1991. Purification and Characterization of Bacillus acidopullulyticus Pullulanase for Enzymatic Starch Modification. *Starch/Stärke*, 43(12): 477-482.
- LEE, C., SAHA, B.C. and ZEIKUS, J.G. 1990. Characterization of Thermoanaerobacter Glucose Isomerase in Relation to Saccharidase Synthesis and Development of Single-Step Processes for Sweetener Production., *Appl. and Environ. Microbiol.*, 56(9): 2895-2901.

- MADI, E., ANTRANIKIAN, G., OHMIYA, K. and GOTTSCHALK, G. 1987. Thermostable Amylolytic Enzymes from a New Clostridium Isolate. Appl. and Environ. Microbiol., 53(7): 1661-1667.
- MATUR, A. 1981. Bacillus subtilis 'de  $\alpha$ -Amilaz Enziminin Üretimi ve Aktivitesinin Düzenlenmesi Üzerine Çalışmalar. Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Genel Biyoloji Bölümü, Doçentlik Tezi, Ankara.
- MOT, R.D. and VERACHTERT, H. 1984. Biocatalysis and Biotechnology with Yeasts. ASM. News, 50(11): 526-531.
- NAM, K.D., CHOI, M.N., KIM, W.S. and RYU, B.H. 1988. Simultaneous Saccharification and Alcohol Fermentation of Unheated Starch by Free, Immobilized and Saccharomyces cerevisiae., 66(4): 427-432.
- ÖZKAYA, H. 1988. Analitik Gıda Kalite Kontrolü. A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları, 1086, Ders Kitabı, 313, Ankara.
- ÖZKAYA, H., ŞAHİN, E. VE TÜRKER, İ. 1991. Gıda Bilimi ve Teknolojisi. A.Ü. Ziraat Fak. Yayınları, 1119, Ders Kitabı, 345, Ankara.
- PAMİR, M.H. 1985. Fermantasyon Mikrobiyolojisi. A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları No: 936, A.Ü. Basımevi, Ankara.
- PARK, Y.K. and AZUMA, E.H. 1990. Screening of Yeast Strains Capable of Hyperproducing Amylolytic Enzymes., Biotech. Lett., 12(5): 373-376.
- PFUELLER, S.L. and ELLIOTT, W.H. 1969. The Extracellular  $\alpha$ -Amylase of Bacillus stearothermophilus. The Biol. Cur., 244(1): 48-50.

- PLANT, A.R., CLEMENS, R.M, DANIEL, R.M. and MORGAN, H.W.  
1987. Purification and preliminary characterization of an extracellular pullulanase from Thermoanaerobium Tok6-B1. Appl. Microbiol. Biotechnol. 26: 427-433.
- QUEROL, E. and PARRILLA, A. 1986. Tentative rules for increasing the thermostability of enzymes by protein engineering. Enzyme Microb. Tech., 9(April):238-244.
- SAHA, B.C. and ZEIKUS, J.G. 1990. Preparation of high conversion syrups by using thermostable amylases from thermoanaerobes. Enzyme Microb. Technol., 12(March): 229-231.
- ULUÖZ, M., GÖNÜL, M. ve GÖZLÜ, S. 1974. Nişasta Özellikleri, Gelatinizasyonu, Modifikasyonu ve Gıda Endüstrisinde Kullanılması., Ege Üniversitesi Ziraat Fak. Yayın No:245, İzmir.
- UNGAN, S. 1988. Gıda Sanayiinde Bioteknolojinin Rolü. Türkiye 5.Gıda Kongresi, Gıda Teknolojisi Derneği Yayın No:8 s.157-160, Ankara.
- ÜSTÖNES, H. ve GÜVENÇ, U. 1985. Bira ve Alkol Üretiminde Kullanılan Bazı Enzimlerin Mikrobiyel Yolla Eldesi. E.Ü. Mühendislik Fak. Dergisi, B, Gıda Müh., cilt:3, sayı:1, s. 85-102.
- WASSERMAN, B.P. 1984. Thermostable Enzyme Production. Food Tech., 38(2): 78-98.
- WILSON, J.J. and INGLEDEW, W.M. 1982. Isolation and Characterization of Schwanniomyces alluvius Amylolytic Enzymes. Appl.and Environ.Microbiol., 44(2): 301-307.

- WORTHINGTON, C.C. 1988. Worthington Enzyme Manual enzymes and related biochemicals.  $\alpha$ -Amylase, 38-39, New Jersey.
- YIN, X.S., LI, Y.X. and STARK, J.R. 1991. Amylase,  $\beta$ -Glukonase and Protease Aktivities from a Mutant of Bacillus subtilis. Starch/Stärke, 43(10): 403-409.
- YOO, Y.J., HONG, J. and HATCH, R.T. 1987. Communication to the Editor Comparison of  $\alpha$ -Amylase Activities from Different Assay Methods. Biotech. Bioeng.30(July): 147-151.
- YÜCECAN, S. ve BAYKAN, S. 1988. Besin Kimyası Besin Kontrol ve Analizleri. M.E.B. Ders Kitabı, Emel Matbaası, Ankara.

**ÖZGEÇMİŞ**

1968 yılında Ankara'da doğdu. İlk, Orta, Lise öğrenimini Ankara'da tamamladı. 1986 yılında girdiği Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Bilimi ve Teknolojisi Bölümü'nden 1990 yılı Haziran ayında Ziraat Mühendisi olarak mezun oldu. Ekim 1990 - Temmuz 1993 yılları arasında, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Bilimi ve Teknolojisi Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimini tamamladı.

