

**TOPRAKTAN İZOLE EDİLEN *Bacillus sp.*
SUS'UNDAN α -AMİLAZ ÜRETİMİNİ ETKİLEYEN
FİZİKSEL FAKTÖRLERİN ARAŞTIRILMASI**

Merve BAŞKURT

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TOPRAKTAN İZOLE EDİLEN *Bacillus sp.* SUŞ' UN DAN α -AMİLAZ ÜRETİMİNİ ETKİLEYEN FİZİKSEL FAKTÖRLERİN ARAŞTIRILMASI

Merve BAŞKURT

Uludağ Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr. Elif DEMİRKAN

Bu çalışmada Türkiye' nin 15 farklı ilinden temin edilen toprak örneklerinden 60 adet bakteri izole edilmiştir. Amilaz pozitif olarak belirlenen ve R oranı en yüksek 4 adet bakterinin morfolojik ve fizyolojik özellikleri araştırılmış ve hepsinin *Bacillus* cinsine ait olduğu saptanmıştır. Nişastalı ortamda 4 adet suşun enzim üretim kapasiteleri test edilmiştir. En yüksek amilaz aktivitesine sahip 1 adet *Bacillus* suşu seçilmiş ve bu suş, *Bacillus sp.* M-10 olarak adlandırılmıştır.

Bacillus sp. M-10' un amilaz üretimini etkileyen bazı fiziksel faktörlerin etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, sıcaklık, pH, havalandırma, inokulum miktarı ve inokulum yaşı gibi fiziksel parametreler denenmiştir. *Bacillus sp.* M-10 suşunun maksimum amilaz üretimi, nişastalı ortamda, 37°C sıcaklıkta, pH 7.0, havalandırma 150 rpm, inokülasyon miktarının % 2.5 ve inokülasyon yaşının 2 gün olduğu değerlerde optimum düzeyde olduğu saptanmıştır.

Tarafımızdan modifiye edilen ortam, daha yüksek enzim aktivitesi elde etmek için en uygun ortam olup, enzim aktivitesi 48. saatte 30 U/ mL olarak bulunmuştur. Modifiye edilen ortamda enzim aktivitesinde yaklaşık % 42 oranında artış gözlenmiştir. Enzim aktivitesi üzerine sıcaklık, pH, havalandırma, inokulum miktarı ve inokulum yaşının etkili olduğu, bu fiziksel parametrelerin optimum değerlerinin kullanılmasıyla elde edilen enzim aktivitesinde artış gözlemlendiği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: İzolasyon, *Bacillus*, α -amilaz, Sıcaklık, pH, Havalandırma, İnokülüm miktarı, İnokülüm yaşı

2012, x + 66 sayfa.

ABSTRACT
MSc Thesis

INVESTIGATION OF PHYSICAL FACTORS AFFECTING THE α -AMYLASE
PRODUCTION BY *Bacillus* sp. STRAIN ISOLATED FROM THE SOIL

Merve BAŞKURT

Uludağ University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology

Supervisor: Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

In this study, sixty bacteria isolated from soil samples that come from 15 different cities of Turkey. Four bacteria with the highest rate of R which are determined to be amylase positive, are investigated for morphological and physiological. All of these are defined as *Bacillus*. In starchy medium enzyme production capacity of these 4 strain have been identified. The bacteria which has the highest amylase activity is selected as a *Bacillus* strain and these strain is named as *Bacillus* sp. M-10.

It's investigated that physical factors which are affecting the α -amylase production of *Bacillus* sp. M-10. For this purpose, temperature, pH, aeration, inoculum size and inoculum age have been tested as physical parameters. In starchy medium, 37°C temperature, pH 7.0, 150 rpm for aeration, 2.5 ml inoculation size and 2 days for inoculation age was determined as the optimum level for maximum amylase production of *Bacillus* sp. M-10 strain.

In order to enhance the production of amylase, medium was modified from us, and the enzyme activity was found 30 U/mL at 48. hour. In modified environment, enzyme activity was increased about % 42 rate. Physical parameters such as temperature, pH, aereation, inoculum size and inoculum age is effective on enzyme activity. Using optimum rates of these physical parameters increased the enzyme activity.

Key words: İsolation, *Bacillus*, α -amylase, Temperature, pH, Aeration, Inoculum size, Inoculum age.

2012, x + 66 pages.



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TOPRAKTAN İZOLE EDİLEN *Bacillus sp.* SUŞ'UNDAN α -AMİLAZ
ÜRETİMİNİ ETKİLEYEN FİZİKSEL FAKTÖRLERİN ARAŞTIRILMASI**

Merve BAŞKURT

Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA -2012

TEZ ONAYI

Merve BAŞKURT tarafından hazırlanan ‘ Toprakta izole edilen *Bacillus sp.* Suş’undan α -amilaz üretimini etkileyen fiziksel faktörlerin araştırılması ‘ adlı tez çalışması jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı’ nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

Başkan: Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

İmza

Üye: Doç. Dr. Hülya ARSLAN

İmza

Üye: Yrd. Doç. Dr. Ayşegül KUMRAL

İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Kadri ARSLAN

Enstitü Müdürü

17 / 09 / 2012

U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

17 /09 /2012

İmza

Ad ve Soyadı

Merve BAŞKURT

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmalarım sırasında bana araştırma olanağı sağlayan ve çalıőmamın her aşamasında yakın ilgi gösteren, yardım ve önerileri ile beni yőnlendiren danıőmanım Sayın Prof. Dr. Elif DEMİRKAN' a,

Çalıőmamda kullandığım toprak őrneklerini getiren bőlümümüz őkrencilerine,

Laboratuar çalıőmalarımda her zaman yardımını gėrdüğüm çalışma arkadaőım Sayın Alev USTA' ya,

Hayatımın her anında yanımda olup beni destekleyen, maddi manevi yardımlarını esirgemeyen baőtta sevgili annem Mürvet BAŞKURT olmak üzere tüm aileme en içten dileklerle teşekkür eder, sevgi ve saygılarımı sunarım.

Merve BAŞKURT

17/09/2012

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	6
2.1. Amilazların Tarihçesi.....	6
2.1.2. Amilazların Sınıflandırılması.....	7
2.1.3. α - Amilazın Kaynakları.....	10
2.1.3. <i>Bacillus</i> α -Amilazlarının Genel Özellikleri.....	12
2.1.6. α -Amilazın Endüstriyel Kullanım Alanları.....	17
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	19
3.1. Materyal.....	20
3.2. Yöntem.....	21
3.2.1. Amilaz pozitif bakterilerin izolasyonu.....	21
3.2.2. Bakteri izolasyonunda kullanılan kültür ortamı.....	21
3.2.3. <i>Bacillus</i> ' un taksonomik sınıflandırılması için morfolojik ve fizyolojik özelliklerin belirlenmesi.....	22
3.2.3.1. Hareketlilik testi.....	23
3.2.3.2. Katalaz testi.....	23
3.2.3.3. Gram boyama.....	23
3.2.3.4. Spor boyama.....	24
3.2.4. Bakteri üretiminde kullanılan besiyerleri.....	24
3.2.5. Enzim üretimi için kullanılan besiyeri.....	24
3.2.6. Bakteri üretim koşulları.....	25
3.2.7. Bakteri üremesinin ölçülmesi.....	25

3.2.8. Enzim aktivitesinin ölçülmesi	26
3.2.9. Enzim aktivitesi ölçümünde kullanılan solusyonlar	28
3.2.9.1. 0.04 M Sodyum Fosfat Tamponu (pH: 5.9).....	28
3.2.9.2. Substrat çözeltisinin hazırlanması.....	28
3.2.9.3. İyod solusyonunun hazırlanması (Stok).....	28
3.2.9.4. 1N HCl solusyonu (Stok).....	28
3.3. α -Amilaz Üretimini Etkileyen Fiziksel Faktörler	29
3.3.1. Sıcaklığın etkisi.....	29
3.3.2. pH' ın enzim aktivitesi üzerine etkisi.	29
3.3.3. Havalandırma (rpm) etkisi	29
3.3.4. İnokülasyon miktarının etkisi.....	29
3.3.5. İnokülasyon yaşının etkisi.....	30
4. BULGULAR	31
4.1. Amilaz Pozitif Bakterilerin Belirlenmesi.....	31
4.2.2.1. Koloni yapısı ve bakterilerin şekli	34
4.2.2.2. Hareketlilik testi.....	35
4.2.2.3. Gram boyama	35
4.2.2.4. Spor boyama	36
4.3. Maksimum Amilaz Üretim Ortamının Belirlenmesi.....	37
4.4. Enzim Üretimi Üzerine Etki Eden Fiziksel Faktörler	41
4.4.1. Sıcaklığın etkisi.....	41
4.4.2. pH' nın etkisi.....	42
4.4.3. Havalandırmanın (rpm) etkisi	43
4.4.4. İnokülasyon miktarının etkisi.....	45
4.4.5. İnokülasyon yaşının etkisi.....	46
4.4.6. Maksimum amilaz üretimi için optimum fiziksel faktörlerin birleştirilmesi ile amilaz veriminin artırılması	47
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	49
KAYNAKLAR	56
ÖZGEÇMİŞ	66

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde Orantı
°C	Santigrat Derece
(NH ₄) ₂ SO ₄	Amonyum Sülfat
α	Alfa
β	Beta
Ca ⁺²	Kalsiyum iyonu
CaCl ₂	Kalsiyum Klorür
CaCl ₂ .2H ₂ O	Kalsiyum Klorid Dehidrat
cm	Santimetre
dk	Dakika
γ	Gama
g	Gram
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HCl	Hidroklorik Asit
I	İyot
KI	Potasyum İyodür
KH ₂ PO ₄	Potasyum Dihidrojen Fosfat
K ₂ HPO ₄	Di Potasyum Fosfat
M	Molar
mg	Miligram
Mg ⁺²	Magnezyum İyonu
MgSO ₄	Magnezyum Sülfat
MgSO ₄ .7H ₂ O	Magnezyum Sülfat Heptahidrat
mL	Mililitre
μ L	Mikrolitre
N	Normal

NaCl	Sodyum Klorür
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	Sodyum Dihidrojen Fosfat Dehidrat
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	Disodyum Hidrojen Fosfat Heptahidrat
(NH ₄) ₂ SO ₄	Amonyum Sülfat
nm	Nanometre
OD	Optik Dansite

Kısaltmalar

GH

IU

Log

MW

rpm

Açıklama

Glikozid Hidrolaz

International Unite

Logaritmik

Molecular Weight

Revolutions Per Minute

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2. 1. Farklı amilazların nişasta molekülünü hidrolizi ve oluşan ürünler	8
Şekil 2. 2. Amiloz molekülünde tekrarlanan glikoz birimleri.....	14
Şekil 2. 3. Amilopektin molekülündeki dallanma bölgesi	15
Şekil 3. 1. Kullanılan toprak örneklerinin alındığı iller.	20
Şekil 4. 1. Amilaz pozitif izolatın besiyerindeki görüntüsü.....	31
Şekil 4. 2. <i>Bacillus</i> sp. izolatların taksonomik özellikleri	33
Şekil 4. 3. Belirlenen kolonilerde serbest oksijenin kabarcıklar halinde görünümü.....	34
Şekil 4. 4. Bakteriyal koloni tipleri	34
Şekil 4. 5. M-10 bakterisinin 100X objektifte görünümü (Olympus CH-2).....	35
Şekil 4. 6. Petri kutusundaki yumuşak agarlı besiyerinde hareketlilik kontrolü.....	35
Şekil 4. 7. Bakterilerin (Olympus CH-2) 100x objektifte Gram (+) görünümü	36
Şekil 4. 8. Bakterilerin spor boyama sonrası görünümü	36
Şekil 4. 9. R oranı yüksek 4 adet bakterinin 48. saatte enzim aktivitelerinin karşılaştırılması	38
Şekil 4. 10. <i>Bacillus</i> sp. M-10 bakterisinin üreme eğrisi	39
Şekil 4. 11. Farklı nişasta konsantrasyonlarında <i>Bacillus</i> sp. M-10' un üremesi	40
Şekil 4. 12. Farklı nişasta konsantrasyonlarında <i>Bacillus</i> sp. M-10' un α -amilaz aktivitesi.....	40
Şekil 4. 13. Farklı sıcaklık değerlerinin <i>Bacillus</i> sp. M-10' un enzim aktivitesi üzerine etkileri	42
Şekil 4. 14. Farklı pH değerlerinin <i>Bacillus</i> sp. M-10' un enzim aktivitesi üzerine etkileri	43
Şekil 4. 15. Farklı havalandırma değerlerinin <i>Bacillus</i> sp. M-10' un enzim üretimi üzerine etkisi	44

Şekil 4. 16. Farklı inokülasyon değerlerinin <i>Bacillus</i> sp. M-10' un enzim üretimi üzerine etkileri	46
Şekil 4. 17. Farklı inokülasyon yaşınının <i>Bacillus</i> sp. M-10' un enzim üretimi üzerine etkileri	47

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 1. 1. Mikrobiyal enzimlerin yıllık kullanım değerleri.....	3
Çizelge 2. 1. α -amilaz ailesi (GH ailesi)	9
Çizelge 2. 2. Amilazların uygulama alanları	19
Çizelge 3. 1. Amilaz pozitif bakterilerin seçiminde kullanılan katı besiyeri	22
Çizelge 3. 2. Biyokimyasal testlerde kullanılan besiyerleri	22
Çizelge 3. 3. Bakteri üretiminde kullanılan besiyerleri.....	24
Çizelge 3. 4. Amilaz üretim ortamının tespitinde kullanılan besiyeri.....	25
Çizelge 4. 1. Toprak örneklerinden izole edilen bakterilerin zon çapları ve R oranları .	32
Çizelge 4. 2. <i>Bacillus</i> cinsinin belirlenmesinde kullanılan morfolojik testler ve test sonuçları.....	37
Çizelge 4. 3. Nişasta içerikli besiyerinde üretilen R oranı yüksek 4 bakterinin enzim aktivitelerinin karşılaştırılması	38
Çizelge 4. 4. <i>Bacillus</i> sp. M-10' un farklı nişasta konsantrasyonunda karşılaştırılması.	39
Çizelge 4. 5. Farklı sıcaklık değerlerinin <i>Bacillus</i> sp. M-10' un enzim üretimi ve üreme üzerine etkileri	41
Çizelge 4. 6. Farklı pH değerlerinin <i>Bacillus</i> sp. M-10' un enzim üretimi ve üreme üzerine etkileri	43
Çizelge 4. 7. Farklı çalkalama hızlarında <i>Bacillus</i> sp. M-10' un enzim üretimi ve üreme üzerine etkisi	44
Çizelge 4. 8. Farklı inokülasyon miktarlarının <i>Bacillus</i> sp. M-10' un enzim üretimi ve üreme üzerine etkileri	45
Çizelge 4. 9. Farklı inokülasyon yaşının <i>Bacillus</i> sp. M-10' un enzim üretimi ve üreme üzerine etkileri	47
Çizelge 4. 10. Modifiye ortam kullanılarak <i>Bacillus</i> sp. M-10' un enzim üretimi ve üreme üzerine etkisi	48

1. GİRİŞ

Enzimler bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmaların yaşamı için temel olan protein yapısında biyomoleküllerdir ve metabolik yollara ve süreçlere katkılarından dolayı yoğun bir şekilde çalışılmaktadır. Bir canlı hücredeki tepkimelerin neredeyse tamamının yeterince hızlı olabilmesi için enzimlere gerek vardır. Enzimler substratları için son derece seçicidirler ve pek çok olası tepkimeden sadece birkaçını hızlandırırlar. Bu nedenle bir hücredeki enzimlerin kümesi o hücrede hangi metabolik yolların bulunduğunu belirler. Enzimler de diğer katalizörler gibi reaksiyon hızını arttırarak çalışırlar. Metabolik yollar, düzenleyici enzimlerin aktivitesi altında yaşamı sürdürmek için gerekli birçok farklı aktivite arasındaki etkileşimi sağlamak için, oldukça yüksek oranda ilişkilendirilmiştir (Nelson ve Cox 2005).

Enzim, kelime anlamı olarak eski Yunanca'da, ilk kez mayalardan elde edildiği için, 'mayada bulunan' (in yeast) anlamına geliyorsa da, günümüzde enzimler yaşayan tüm hücrelerden; hayvanlardan, bitkilerden ve özellikle de mikroorganizmalardan elde edilebilmektedir (Polaina ve MacCabe 2007).

Hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler artık çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere günlük ve ekonomik hayata girmiştir. Bugün enzimler ekmek, bira, peynir, bebek gıdaları üretimi, alkollü içecekler, meyve suyu ve süt üretimi ile çeşitli deterjan ve temizlik maddelerinin üretiminde yaygın bir şekilde kullanıldığı gibi, tıpta teşhis ve tedavide de önemli roller oynamaktadır (Bailey ve Ollis 1977, Gupta 2003). Ayrıca kimya, kâğıt, nişasta, biyoyakıt, kauçuk ve fotoğraf endüstrisinde, ziraatte, kontak lens temizleyicilerinden, biyolojik savaşta kullanıma kadar çok geniş alanlarda da enzimler kullanılmaktadır. Organik kimyada kullanılan metotlar ile gerçekleştirilmesi çok güç olan birçok reaksiyonun uygun ve spesifik enzimlerle kolaylıkla gerçekleşmesi, enzimlerin canlı hücrelerden izole edilerek çeşitli amaçlar için kullanılması fikrini doğurmuştur (Adams 1983).

Son yıllarda gerek endüstriyel enzim üretiminde gerekse kullanımında önemli artışlar gözlenmektedir. Bunun nedeni olarak, biyoteknolojik işleme metodlarındaki gelişmeler sonucu, daha önceleri hayvansal ve bitkisel kaynaklar kullanılarak üretilen enzimlerin, daha ekonomik ve daha kontrollü mikrobiyal teknik ve yöntemler ile üretilmesi

gösterilemektedir (Üstünes ve Güvenç 1985). Enzimlerin bu kadar fazla alanda kullanılabilir olmasının sebepleri; maliyet bakımından ucuz olması, in-vitro şartlarda aktif olması, çok farklı alanlarda kullanılabilme özelliğinde olması ve en önemlisi de enzimin alerjik ya da toksik etkiye sahip olmamasıdır (Wiseman 1987).

Endüstriyel açıdan önemli birçok kimyasal proses, yüksek sıcaklık ve basınç gibi sert koşullarda gerçekleştiğinden, bunlara alternatif yöntemler için bu ekstrem koşullara dayanıklı enzimlere gerek duyulmaktadır (Chibata 1980). Son yıllarda stratejik alan olarak değerlendirilen rekombinant DNA teknolojisinden yararlanılarak, enzim üretimi büyük boyutlara ulaşmış ve kullanımı giderek yaygınlaşmıştır (Gessese 1999). Temizlik maddeleri ve bazı gıda ürünlerine katılan enzimlerin, yüksek sıcaklığa dayanabilir olması, deterjanların yapısındaki kimyasallara karşı yapısını koruyabilmesi ve uzun süre kararlı kalabilmesi gerekmektedir. Doğada bu özelliklere istenildiği kadar sahip olamayan enzimler, rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak istenilen hale getirilmeye çalışılmaktadır (Aehle 2004).

Endüstriyel enzimlerin dünya piyasasındaki payı 1,6 milyar doları aşmaktadır (Ottrup ve Jorgensen 2002, Schallmey ve ark. 2004, Zakaria 2006). Gıda, deterjan ve nişasta endüstrileri, endüstriyel enzim üretiminin %75' ini oluşturmakta olup, proteaz, amilaz, lipaz, selüloz, pektinaz gibi hidrolazlar, en yaygın kullanılan enzim gruplarıdır (Topal ve ark. 2000). Endüstriyel alanda kullanılan enzimlerin %80' i polimerlerin doğal yapısını bozabilme yeteneğine sahip olan hidrolazlardır (Kasavi 2006).

Mikrobiyal enzimlerin yıllık kullanım değerlerinin dünyada kullanılan tüm enzimler içerisinde alkali proteazların %25, diğer proteazların %21, amilazların %18, bir proteaz olan rennin' in %10, tripsin' in %3, lipaz' ın %3, diğer karbonhidrat parçalayan enzimlerin %10 oranında kullanıldığı görülmektedir (Çizelge 1.1).

Çizelge 1. 1. Mikrobiyal enzimlerin yıllık kullanım değerleri (Kıran ve Çömlekçioğlu 2006)

Enzim	Yıllık Kullanım Oranı (%)
Proteaz	25
Diğer Proteazlar	21
Amilaz	18
Rennin	10
Tripsin	3
Lipaz	3

Günümüzde endüstriyel üretimlerde en çok kullanılan termostabil enzimler, nişasta endüstrisinde kullanılan amilazlardır ve bunlar endüstriyel enzimlerin %25'ini oluşturmaktadır (Poonam ve Dalel 1995, Crabb ve Mitchinson 1997, Rao ve ark. 1998, Sarıkaya ve Gürgün 2000). Nişasta endüstrisi, nişastanın glikoz ve diğer ürünlere parçalanması ve modifikasyonu için termostabil amilolitik enzimlerin (amilaz, glikoamilaz, izoamilaz ve pullulanaz) en yoğun kullanıldığı alandır. Nişasta endüstrisinde ekonomik işlemlerin sağlanabilmesi için kullanılan amilazların, nişastanın jelatinizasyonu (100-110 °C) ve sıvılaştırma (80-90 °C) sıcaklıklarına dayanıklı olmaları gerekmekte, bu nedenle termofilik ve termostabil amilazlara gerek duyulmaktadır (Shindhu ve ark. 1997). Amilazlar ayrıca tekstil, gıda, içki, kağıt ve bira vb. endüstrilerde yaygın olarak kullanıldığı gibi klinik, medikal ve analitik kimya alanlarında da kullanılmaktadırlar (Pandey ve ark. 2000).

α -amilaz enzimi (EC 3.2.1.1), nişasta ve glikojen moleküllerini hidrolize eden ekstrasellüler bir enzimdir. α -amilaz hayvanlar ve bitkiler tarafından da sentezlenmesine rağmen, kontrollü koşullarda kısa sürede ürün elde edilmesinden dolayı mikroorganizmalar asıl kaynağı teşkil etmektedir (Afşar 2008). Mikroorganizmalar içerisinde de doğada geniş bir yayılım alanına sahip olan bazı *Bacillus* türleri ve alt türleri gelmektedir (Wolfgang 2007).

Amilaz enziminin üretiminde, en çok *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis* ve *Rhizopus* gibi mikroorganizmalar kullanılmakta olup; hammadde olarak

nişasta içeren buğday kepeği ve mısır ıslatma suyu gibi materyallerden yararlanılmaktadır (Aiyer 2005).

1970' lerden itibaren α -amilazların endüstriyel uygulamalarında, *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis* ve *B. licheniformis* türleri kullanılmaktadır (Declerck ve ark. 2000, Sajedi ve ark. 2005).

Nişasta, α - ve β - amilazlar ve diğer ilgili enzimlerce glikoz, maltoz ve maltodekstrinlere hidrolizlenmektedir. Bu ürünlerden dekstrin, nişastanın glikoza kadar hidrolize olmasından önce oluşan kısa moleküllü ilk üründür. Dekstrinler çözünürlüğü yüksek ve dayanıklı bir ürün olup, yoğun şurup kıvamında bir maddedir ve bu maddeler gıdalarda viskozite arttırıcı, yani, koyulaştırıcı dolgu maddesi olarak kullanılmaktadır (Keskin 1982).

Başlıca nişasta endüstrisinde kullanılan ve enzim satışlarında en büyük piyasaya sahip olan α -amilaz enziminin ekmekçilikte de kullanımı oldukça iyi bilinmektedir (Gupta ve ark. 2003).

Özellikle *Bacillus*' lardan elde edilen amilazlar, tahıla dayalı bir beslenmenin yaygın olduğu ülkemizde kişi başına tüketilen enerjinin %58' i tahıllardan, bununda %44' lük kısmının ekmekten karşılanmasıyla büyük önem kazanmaktadır (Ajayi ve ark. 2006). Türk toplumunun beslenme alışkanlığı nedeniyle ekmeğe olan talep unlarda ve ekmek üretiminde endüstriyel maya kullanımı ile birlikte un ve ekmek katkı maddeleri (askorbik asit ve enzim) kullanımını zorunlu hale getirmiştir (Özer 2003). Teknolojik önemi sebebi ile ekmekçileri en fazla ilgilendiren enzim amilazdır. α -amilaz enzimleri nişastadan düşük moleküllü şekerlerin oluşması için önemlidir. Hamurda mayalanma sırasında ve pişirme başlangıcında meydana gelen değişimler α -amilaz enzim aktivitesine bağlıdır (Polaina ve MacCabe 2007).

Genel olarak mikroorganizmalardan yüksek oranda enzim verimi elde etmek için, ya mutasyonla yeni mutantlar elde edilmekte ya mikroorganizma doğrudan doğadan izole edilmekte ya da üretim ortamının değiştirilmesi yoluna gidilmektedir (Colton 1996). Enzim aktivitesini, fiziksel faktörler olarak ortam pH'sı, sıcaklık, enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu, zaman, çeşitli iyonların konsantrasyonları, inokulum miktarı, inokulum yaşı, rpm gibi parametreler etkileyebilir (Aliya ve ark.

2007). Bu faktörlerin enzim reaksiyonları üzerine etkilerini tayin etmek için, farklı koşullar altında enzim reaksiyon hızını saptamak gerekmektedir. Bir ünite enzimi veya enzim aktivitesini ölçmek için, ya kaybolan substrat miktarını veyahutta ortamda birim zamanda oluşan ürün miktarını ölçmek gerekmektedir.

Bu tez çalışmasında ülkemizin çeşitli illerinden toplanan toprak örneklerinden izole edilecek olan *Bacillus sp.* 'lerin α -amilaz üretim kapasitelerinin belirlenmesi ve bakteri üretimi ve dolayısıyla enzim aktivitesine etki eden fiziksel faktörlerin etkilerinin araştırılması planlanmıştır. Fiziksel faktörler olarak sıcaklık, pH, rpm, inokulasyon miktarı, inokulasyon yaşı olarak farklı parametreler değerlendirilecektir. Ayrıca enzimin yüksek verimde eldesi için, tarafımızdan uygun fiziksel parametre sonuçlarına göre modifiye fiziksel bir ortam hazırlanarak, enzim aktivitesinde artış yoluna gidilecektir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Amilazların Tarihçesi

Amilazlar bilinen en önemli ve eski endüstriyel enzimlerdir. Nişasta molekülünü hidroliz ederek dekstrin ve glikoz birimlerinden meydana gelen bir karışım oluştururlar. Bu enzimler günümüzde büyük bir öneme sahiptirler ve gıda, fermantasyon, tekstil ve kağıt v.b endüstrilerinde kullanılmaktadırlar (Cordeiro ve ark. 2002).

Amilazların tarihi 1811 yılında Kirchoff tarafından nişasta parçalayıcı enzimlerin bulunması ile başlamaktadır. Buna ek olarak Leuchs 1831 yılında benzer etkiyi insan tükürüğü ile elde edilebileceğini göstererek sürdürmüştür. Bernfeld (1951) tükürüğün bu özelliğine Berzelius tarafından pityalin adının verildiğini, 1833' te Payen ve Persoz'un ise maltta nişastayı parçalayan bir maddenin varlığını ortaya çıkardıklarını ve buna da diastaz adını verdiklerini belirtmektedir. 1895'te Beijerinck' in önerisinden bu yana tüm nişasta parçalayan enzimler amilazlar olarak adlandırılmıştır (Anonymous 1988). Endoamilazlar nişasta molekülünün iç kısmını hidroliz etmektedirler. Bunun sonucunda farklı uzunluklara sahip düz ya da dallı yapıya sahip oligosakkarit zincirleri oluşmaktadır. Ekzoamilazlar indirgenmeyen uçtan hidroliz gerçekleştiriler ve böylece kısa ürünler oluşur. Günümüzde nişastayı değişik ürünlere parçalayan birçok enzim bilinmektedir (Gupta ve ark. 2003). Nişastayı tamamen hidroliz etmek için çeşitli enzimlerin birlikte etki etmesi gerekmektedir.

Günümüzde amilazlar nişastaya etki mekanizmaları ve oluşturdukları ürünlere bağlı olarak α - (endoamilaz), β - (ekzoamilaz) ve γ - (ekzoamilaz) olmak üzere üç gruba ayrılmışlardır (Uhlig 1988). Milletlerarası Biyokimya Birliği (International Union of Biochemistry) tarafından yapılan enzim sınıflandırılmasında tüm enzimler katalizledikleri reaksiyon tipine göre 6 sınıfa ayrılmışlar ve amilazlar 3. sırada yer alan hidrolazlar sınıfına dahil edilmişlerdir (Mahler ve Cordes 1966).

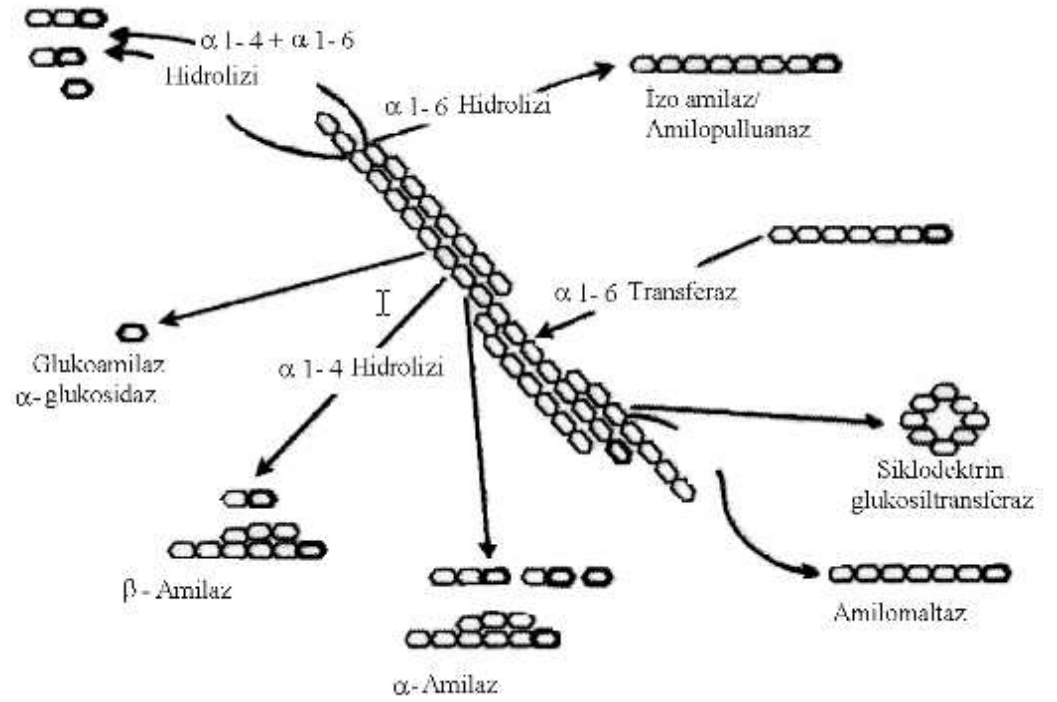
2.1.2. Amilazların Sınıflandırılması

Amilazlar nişastayı parçalama mekanizmasına göre sınıflara ayrılırlar. 1930 yılında Ohlsson' un malttan elde ettiği nişasta parçalayıcı enzimler, parçalama ürünlerinin anomerik tiplerine göre α -(alfa) ya da β -(beta) amilazlar olarak adlandırılmıştır. Mybrüch ve Necmuler (1950) ise amilazlar için endoamilazlar ve ekzoamilazlar olmak üzere başka bir adlandırma sistemi önermişlerdir (Anonymous 1988). Amilazlar; amiloz, amilopektin ve glikojen gibi polisakkaritlerde ve bunların yıkım ürünlerinde yer alan α -1-4-glikozitik bağlarını katalizler. Bir endoamilaz olan α -amilaz polisakkaritlerdeki α -1-4 bağını gelişigüzel kırar. Amilopektin ve glikojenin dallanma noktalarındaki α -(1-6) bağlarına etki etmezler (Windish ve Mhatre 1965). Birçok mikroorganizma tarafından sentezlenen α -amilazın etki mekanizması ve özellikleri enzimin kaynağına göre farklıdır. α -Amilaz tarafından amilozun hidroliziyle maltotrioz ve maltoz oluşur. Bunu takip eden ikinci reaksiyon ise, küçük bir molekül olan maltotriozun hidrolizidir. Amilopektinin hidrolizi ise bir dizi dallı α -limit dekstrinlere ilave olarak glikoz ve maltoz gibi ürünler verir (Fogarty 1983).

Bir ekzoamilaz olan β -amilazlar ise polisakkaritlerin indirgen olmayan uçlarına atak yaparak amiloz molekülünü son ürün olan glikoz veya maltozu meydana getirmek üzere hidrolize ederler. Son ürün glikoz ise, enzim glukoamilaz olarak, son ürün maltoz ise enzim β -amilaz olarak adlandırılmaktadır (Lehninger 1987).

Bakteriyel α -amilaz kullanımındaki artıştan dolayı endüstriyel kullanımına daha uygun karakteristiklerdeki enzim üretimi ve daha yüksek üretim sağlayan suşların elde edilmesi önem kazanmıştır. Bu çalışmalardan, onları üreten mikroorganizmanın çeşitliliği kadar alfa amilaz karakteristiklerinin de farklı olduğu görülmüştür (Demirkan ve ark 2005).

Amilazlar ayrıca termofilik, asidik ve alkalın amilazlar olmak üzere 3 grup halinde incelenebilir (Ingle ve Erickson 1978).



Şekil 2. 1. Farklı amilazların nişasta molekülünü hidrolizi ve oluşan ürünler (Maareal ve ark. 2002)

Glikozid hidrolazlar (EC 3.2.1.-) iki ya da daha fazla karbonhidrat arasındaki veya bir karbonhidratla karbonhidrat olmayan parça arasındaki glikozidik bağı hidroliz eden büyük bir enzim grubudur. Glikozid hidrolazlar için dizi benzerliğine dayalı bir sınıflandırma sistemi oluşturulmuştur. Böylelikle 85 farklı aile tanımlanmıştır.

Nişasta parçalayan enzimlerin çoğu primer yapılarındaki aminoasit benzerlikleri ve farklılıklarına göre glikozid hidrolazlar (GH) ailesinde sınıflandırılmıştır (Henrissat 1991). Buna göre, (i) α -amilazlar ailesi, GH13; (ii) β -amilazlar ailesi, GH14 ve (iii) glikoamilazlar (γ -) ailesi, GH15 olarak belirlenmiştir (Dinçbaş 2009).

Bir endoamilaz olan α -amilazın dahil olduğu GH13 ailesi genişlemekte ve bu aile α -amilazlarda dizi benzerliği gösteren yaklaşık 30 farklı enzim içermektedir (MacGregor 2005), (Çizelge 2.1).

Çizelge 2. 1. α -amilaz ailesi (GH ailesi) (Polaina ve MacCabe 2007)

Enzim sınıfı	Enzim	EC	GH ailesi
Hidrolazlar	α -Amilaz	3.2.1.1	13
	Oligo-1,6-glikozidaz	3.2.1.10	13
	α -Glikozidaz	3.2.1.20	13
	Pullulanaz	3.2.1.41	13
	Amilopullulanaz	3.2.1.1/41	13
	Siklomaltodekstrinaz	3.2.1.54	13
	Maltotetrahidrolaz	3.2.1.60	13
	İzoamilaz	3.2.1.68	13
	Dekstranglikozidaz	3.2.1.70	13
	Trehaloz-6-fosfat hidrolaz	3.2.1.93	13
	Maltohexaohidrolaz	3.2.1.98	13
	Maltotriohidrolaz	3.2.1.116	13
	Maltojenik α -amilaz	3.2.1.133	13
	Maltojenik amilaz	3.2.1.133	13
	Neopullulanaz	3.2.1.135	13
	Maltooligosiltrehaloz hidrolaz	3.2.1.141	13
Malto-pentaohidrolaz	3.2.1.-	13	
Transferazlar	Amilosükraz	2.4.1.4	13
	Glikosiltransferaz	2.4.1.5	70
	Sükroza fosforilaz	2.4.1.7	13
	Glukan dallı enzim	2.4.1.18	13
	Siklodekstrin glukanotransferaz	2.4.1.19	13
	4- α -Glukanotransferaz	2.4.1.25	13,77
	Glukan dallı olmayan enzim	2.4.1.25/3.2.1.33	13
	Alternansükraz	2.4.1.140	70
	Maltosiltransferaz	2.4.1.-	13
İzomerazlar	Isomaltuloz sentaz	5.4.99.11	13
	Trehaloz sentaz	5.4.99.15	13
	Maltooligosiltrehaloz sentaz	5.4.99.16	13

Günümüzde tüm bu enzimler GH ailesini oluşturan GH13, GH70 ve GH77 aileleri içerisinde sınıflandırılmaktadır (MacGregor ve ark. 2001). Ayrıca GH31 ve GH57 aileleri GH13 ailesi ile hiçbir dizi benzerliği olmadığı halde birkaç amilolitik özellikleri içermektedirler (Henrissat ve Bairoch 1996).

GH14 ailesi, bir ekzoamilaz olan β -amilazları (EC 3.2.1.2) ve β -amilazlarla dizi benzerliği içeren hipotetik proteinleri içermektedir. Aile üyelerinin yarısının β -amilaz aktivitesine sahip olduğu deneysel olarak kanıtlanmıştır. β -amilazlar özellikle bitkiler tarafından sentezlenmektedir: *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Tricum aestivum* ve *Solanum tuberosum* (Mikami ve ark. 1993; Fadıoğlu ve ark. 2004).

GH15 ailesinde bulunan ve bir ekzoamilaz olan γ -amilazlar glukoamilaz, maltaz, sakkarojenik amilaz ve amiloglikozidaz olarak da bilinmektedir. Bu enzim *Aspergillus* ya da *Rhizopus* türleri tarafından üretilen ekstrasellüler bir enzimdir. Enzim glikoprotein

yapısında bir molekül olup, bünyesinde şeker olarak glikoz, galaktoz, mannoz ve üronik asit içermektedir (Wiseman 1987).

2.1.3. α - Amilazın Kaynakları

α -amilaz nişasta ve glikojen moleküllerini hidroliz eden ekstrasellüler enzimlerdir. Bu enzimler hayvanlar ve bitkiler tarafından da sentezlenmesine rağmen, kontrollü koşullarda kısa sürede ürün elde edilmesi nedeniyle asıl kaynağını mikroorganizmalar oluşturmaktadır. Mikroorganizmalar içerisinde de *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *A. candidus* gibi bazı funguslar ile *Pseudomonas saccharophila* ve bazı *Clostridium* türleri ve en önemlisi de doğada geniş bir yayılım alanına sahip olan bazı *Bacillus* türleri ve alt türleri gelmektedir (Windish ve Mhatre 1965, Pandey ve ark. 2000).

Fungal α -amilazlar sıcaklığa bakteriyel α -amilazlardan daha az toleranslı olduğundan üzerinde çalışılan asıl enzim kaynağını daha çok bakteriyel, özellikle de *Bacillus* amilazları oluşturmaktadır (Wolfgang 2007). Bu cinsin özellikle 8 tanesinin sentezlediği α -amilaz enzimi çeşitli araştırmacılar tarafından tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. Bunlar *B. subtilis* (Coleman ve Elliott 1962, Pazur 1965, Matsuzaki ve ark. 1974), *B. amyloliquefaciens* (Borgia ve Campbell 1978), *B. caldolyticus* (Grootegoed ve ark. 1973), *B. coagulans* (Bliesmer ve Hartman 1973), *B. licheniformis* (Meer 1972, Saito 1973), *B. macerans* (Lane ve Pirt 1973), *B. stearothermophilus* (Ogasahara ve ark. 1970) ve *B. subtilis* var. *amylosacchariticus* (Matsuzaki ve ark. 1974)' dur. *Bacillus* türleri arasında da endüstriyel amaçla, α -amilaz üretiminde kullanılanlar *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis* ve *B. amyloliquefaciens* türleridir (Pandey ve ark. 2000).

Bacillus cinsi Bacillaceae familyasının bir üyesidir. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology bu cinsin 48 türü tanımlanmıştır (Priest 1977).

Bacillus hücreleri çubuk şeklinde ve düzdür, 0,5-2,5 μ m eninde 1.2-10 μ m boyundadır, uçları yuvarlak ya da kare şeklindedir ve ortamda bazen çiftler ya da zincirler halinde bulunurlar. Hepsi Gram (+) olmakla beraber, yaşlı kültürlerde Gram (-) olarak da görülebilirler. *Bacillus*' lar peritriköz kamçıya sahip olup, hareketlidir. Hepsi endospor oluşturmakta olup, endosporlar bazen oval, bazen de yuvarlaktır ya da silindirik şekilde

de olabilir. Birçok zorlu koşula karşı oldukça dirençlidir. Bu cinste yer alan bakteriler hem aerobik hem de fakültatif anaerobik koşullarda üreyebilirler (Fukara 2007). Yüksek fizyolojik yetenekleri nedeniyle sıcaklık, pH ve tuzluluğa karşı karşı toleransları vardır (Ashnaei ve ark. 2007). Gelişebildikleri minimum sıcaklık derecesi 25°C ila 75°C arasında değişmektedir. Üreyebildikleri minimum pH istekleri bazı asidofilik karakterli türler için 7.5 ila 8.0' e kadar çıkmaktadır (Hamilton 1999). Genellikle katalaz pozitif olup, fermentatif ya da oksijenli solunum gösteren bir metabolizmaya sahip kemoorganotrofturlar. Kolayca kültüre alınabilirler ve yapılarında heterojenlik yoktur (Holt ve ark. 1994).

Agardaki kolonileri kirli-beyaz veya gri renkte ve mat olup, kenarları tırtıklıdır (Bilgehan 1987).

Geniş bir habitatta bulunabilmektedirler. Özellikle toprakta, suda, fekal materyalde, çürüyen materyalde ve çeşitli gıdalarda bulunabilirler (Ayhan 2000). Patojen türleri bulunmakta olup, birkaç omurgalı ve omurgasız türüne karşı patojenite göstermektedirler (Banwart 1983).

Bacillus'lar proteolitik enzimler ve karbohidrazların önemli bir kaynağını oluşturmaktadırlar (Bailey ve Ollis 1977). *Bacillus* türleri arasında endüstriyel açıdan önemli bir yere sahip olan *Bacillus amyloliquefaciens* 1943 yılında Fukumoto isimli bir Japon araştırmacı tarafından toprakta keşfedilmiştir. Bakteriye ismi, sıvılaştıran bir amilaz üretmesi sebebiyle verilmiştir. Bu bakteriden doğal bir antibiyotik olan protein barnase, deterjanlarla kullanılan bir proteaz subsitilin ve DNA araştırmalarında kullanılan BamH1 restriksiyon enzimi ve de nişasta hidrolizinde kullanılan α -amilaz enzimi elde edilmektedir (Fukumoto 1943, Priest ve ark. 1987, James ve ark. 1986).

2.1.3. *Bacillus* α-Amilazlarının Genel Özellikleri

Karbohidrazların en önemli kaynağını *Bacillus* oluşturmaktadır. Bir karbohidraz olan α-amilaz enzimi ticari olarak kullanılan ilk enzimdir (Radley 1976; Aira ve ark. 1983). Nişasta, çok sayıda glikoz molekülünün farklı şekillerde bağlanmasıyla oluşmuş polisakkarit özellikte bir bileşiktir. Bazı bakteriler ve mantarlar tarafından üretilen α-amilaz, β-amilaz, glikoamilaz ve glikoizomeraz gibi enzimler nişastayı parçalama yeteneğine sahiptirler (Lee 1996).

Bacillus α-amilazları genel olarak 5.5-8.0 pH aralığında stabil olmalarına rağmen, optimum aktiviteyi pH: 4.8-6.5 göstermektedirler (Manning ve Campbell 1961). Farklı kaynaklardan elde edilen α-amilazların en iyi aktivite gösterdikleri pH değerlerinde de bazı farklılıklar görülmektedir. *B.sp* ANT-6 suşunun amilazı pH: 9.0' da (Burhan ve ark. 2003), *B.subtilis* JS-2004 suşunun α-amilazı pH: 8.0' de (Asgher ve ark. 2007), *B.licheniformis* 44MB82-A suşunun α-amilazı pH: 6.0-6.5 arasında (Ivanova ve ark. 1993), *B.amyloliquefaciens* α-amilazı pH: 4.0-9.0 arasında (Demirkan ve ark. 2005), *Bacillus brevis* MTCC 7521 α-amilazı pH: 6.0' da (Ray ve ark.2008) optimum aktivite göstermektedir. Bazı *Bacillus* türlerinin ise, alkalik ya da asidik α-amilaz ürettiği saptanmıştır. *Bacillus megaterium* L-49 suşu için optimum pH: 9.0-10.0 olarak belirlenirken (Jia ve ark. 2008), *Bacillus acidocaldarius* Agnano 101 suşunda 3.5 olarak saptanmıştır (Buonocore ve ark. 1976).

Farklı kaynaklardan elde edilen α-amilazların en iyi aktivite gösterdikleri sıcaklık derecelerinde de farklılıklar bulunmaktadır (Aunstrup 1973). *Bacillus stearothermophilus* α-amilazı için 70-80°C (Vihinen ve Mantsala 1990), *Bacillus subtilis* US116 α-amilazı için 65°C (Messaoud ve ark. 2004), *B. acidocaldarius* α-amilazı için 30-60°C (Koivula ve ark. 1993) optimum sıcaklık dereceleri olarak saptanmıştır. *B. licheniformis* α-amilaz enziminin 100°C' nin üstündeki sıcaklıkta bile aktivite gösterdiği ve bu nedenle endüstride kullanımının arttığı belirtilmektedir (Wiseman 1987).

Enzimin aktivite gösterebilmesi için kalsiyum (Ca⁺⁺) iyonlarına gereksinim duyduğundan enzim bir metaloproteindir (Manning ve Campbell 1961). Kalsiyum,

ekstrem pH ve sıcaklıklarda pepsin, tripsin, papain gibi proteazlara karşı enzimi dayanıklı kılmaktadır. α -amilazın katalitik aktivitesi için gerekli olan bu metalin enzime bağlanma gücü enzim kaynağına bağlıdır (Stein ve Fischer 1958).

Bakır, civa, gümüş, kurşun gibi ağır metaller enzimi inhibe etmektedir (Hidaka ve Adachi 1980, Kanno 1986).

α -amilazların çoğunun molekül ağırlığı yaklaşık olarak 45.000-60.000 Dalton arasındadır ve genellikle enzim proteininin amino asit kompozisyonlarında büyük farklılıklar yoktur (Kindle 1983). *B.amyloliquefaciens* α -amilazının molekül ağırlığı 49.000 Dalton (Tanaka ve Hoshino 2002), *B. stearotherophilus* α -amilazının molekül ağırlığı 48.000 Dalton (Osagahara ve ark. 1970), *B.subtilis* α -amilazının molekül ağırlığının ise 50.000 Dalton olduğu belirtilmektedir (Fogarty 1983).

α -amilazların, aktif merkezlerinin karboksil ve histidin gruplarının müşterek etkisi ile substratı parçaladıklarına inanılmaktadır (Wiseman 1987).

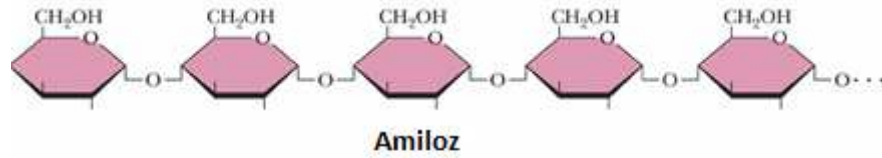
α -amilaz enzim sentezinin katabolit represyon ile düzenlendiği belirlenmiştir (Priest 1977). α -amilaz enzimi sentezinin maksimum algılama derecesindeki salgılanmasına genellikle üremenin log fazı veya sabit fazında ulaşıldığı tespit edilmiştir (Wu ve ark. 2000).

α -amilaz sentezi nişasta ya da daha düşük molekül ağırlıklı oligosakkaritler varlığında uyarılır. Nişasta, oldukça büyük bir molekül olduğu için, hücre içine girmesi oldukça güçtür. Bu maddenin nasıl uyarıcı olabileceği konusunda birkaç varsayım ileri sürülmüştür. Bunlardan biri bu molekül için hücre yüzeyinde özgül reseptörlerin bulunduğu olmakla beraber, bu varsayımı destekleyen herhangi bir bulgu mevcut değildir. İkincisi, bu molekülün organizma tarafından yavaş olarak hücre içine alınarak metabolize edilmesidir ancak, bu da kanıtlanamamıştır. Üçüncüsü ise, nişastanın hidroliz ürünlerinin enzim biyosentezinden sorumlu olacağıdır (Diril 1984).

2.1.4. Nişastanın Yapısı ve α -Amilazların Etki Mekanizmaları

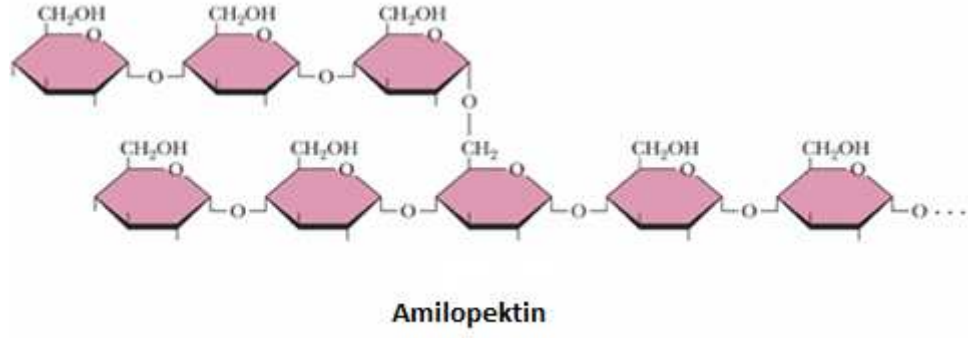
2.1.4.1. Nişastanın Yapısı ve Nişasta Kaynakları

Amilaz enzimlerinin substratı olan nişasta esasen bitkilerin bir depo karbohidratı olup, D-glukoz birimlerinden oluşan ve $(C_6H_{10}O_5)_n$ kapalı formülü ile gösterilen oldukça heterojen yapıya sahip bir moleküldür (Berkeley 1997). Bu heterojenlik, farklı molekül yapıya sahip iki polisakkarit içermesinden kaynaklanmaktadır (Bernfeld 1951). Bu polisakkaritler amiloz ve amilopektindir. Amiloz, glikoz birimlerinin α -1,4 glikozidik bağ ile bağlanmasından oluşan ve dallanma göstermeyen düz bir yapıdadır (Şekil 2.2). Amiloz suda kolayca çözünmez ve molekül ağırlığı birkaç binden 500.000 daltona kadar değişmektedir. Amiloz suda çözünmez fakat su emerek miseller haline gelebilir ve iodin ile muamele edilirse mavi renk meydana gelir (Çağatay 1976, Gözükara 2001).



Şekil 2. 2. Amiloz molekülünde tekrarlanan glikoz birimleri

Amilopektin dallı bir yapıya sahip olup, her 24-30 glikoz monomerinden birinde α -1,6 bağlantısı ile bir yan zincir başlar (Şekil 2.3). Hem amilopektin hem de amiloz glikozun polimerleridir ve tipik bir amiloz polimeri 500-20000 glikoz molekülünden, bir amilopektin molekülü ise yaklaşık iki milyon glikozdan oluşur (Ponyatovsky ve ark. 1998, Hoover 2001, Sinitsyn ve ark. 2001).



Şekil 2. 3. Amilopektin molekülündeki dallanma bölgesi

Genel olarak nişasta molekülünün iç kısmında bulunan amiloz nişasta molekülünün % 15-30' unu oluşturduğu halde, molekülün dış kısmında bulunan amilopektin % 70-80' ini oluşturmaktadır (Li ve Yeh 2001, Singh ve ark. 2003).

Doğada birçok nişasta kaynağı bulunmakta olup, endüstriyel açıdan önemli olanlar buğday, patates, mısır, pirinç, arpa, yulaf ve cassavadır. Buğday nişastasında amiloz oranı % 28, amilopektin oranı ise % 72 civarındadır (Ortalama 1:2.6). Ortalama granül büyüklüğü 10 mikron olsa da, granül çapları 1 ile 40 mikron arasında değişmektedir. Diğer doğal nişastalarla karşılaştırıldığında, doğal buğday nişastasının çok daha yüksek derecelerde jelleşmeye başladığı görülür (80-85°C) (Sivak ve Preiss 1998).

Birçok ülkede rahatlıkla yetişebilen bir bitki olan mısırdan elde edilen doğal mısır nişastası, dünyada en çok tüketilen ve ülkemizde de en çok kullanım alanı olan nişasta çeşididir. Ortalama granül büyüklüğü 15 mikron olsa da, granül çapları 3 ile 26 mikron arasında değişmektedir. Mısır nişastasında amiloz oranı % 25-28 arasında, amilopektin oranı ise % 72-75 arasında değişmektedir (Ortalama 1:3). Jelleşme derecesi ise, 62-72°C arasındadır.

Doğal patates nişastası, diğer nişastalara göre daha geniş granül yapısının yanı sıra, saydamlığı ve viskozitesi yüksek bir hamur oluşturma özelliği ile de bilinir. Ortalama granül büyüklüğü 30 mikron olsa da, granül çapları 5 ile 100 mikron arasında değişmektedir. Patates nişastasında amiloz oranı % 20-21 arasında, amilopektin oranı ise % 79-80 arasında değişmektedir (Ortalama 1:4). Jelleşme derecesi, diğer doğal

nişastalarla karşılaştırıldığında, doğal patates nişastasının çok daha düşük derecelerde jelleşmeye başladığı görülür (% 59-68 °C) (Demirkan 2009).

Pirinç nişastası tüm nişasta türleri arasında en küçük granül büyüklüğüne sahip olan nişastadır. Ortalama pirinç nişastası granül büyüklüğü 2-8 mikron arasındır. Jelleşmenin görüldüğü sıcaklık 65-73°C' dir (Bahar ve Çelebi 1998).

Nişasta, sulu asitlerle ısıtılırsa ana ürün olarak glikoz moleküllerine ayrılarak hidrolize olduğu halde 5-Hidroksimetil 2-furfuraldehit gibi istenmeyen yan ürünler de oluşturmaktadır. Bu nedenle amilaz enzimleri nişastanın hidrolizasyonunda asitlerin yerini almıştır (Piggott ve ark. 1984).

2.1.5. α -Amilazların (α -1,4 glukozidik glukoz, glukozhidrolaz, EC 3.2.1.1) etki mekanizmaları

α -amilazlar nişasta molekülündeki amiloz zincirlerinin 1,4 glukozidik bağlarına gelişigüzel saldırırlar (Windish ve Mhatre 1965). İlk saldırının helezonlar arasına düşen 1,4 glukozidik bağlar olduğu kabul edilmektedir. Böylece zincir daha küçük kısımlara ayrılır ve bu kısalmış parçalar yeniden enzimin etkisine uğrarlar. Son ürün olarak 1/10' i glikoz ve 9/10' u maltoz olan bir karışım oluşur (Yenson 1982). Ayrıca maltotriozun da ortaya çıktığı ve bunun da iki basamaklı bir reaksiyonla hidrolize olduğu belirtilmektedir (Fogarty 1983).

Enzim amilopektin molekülünün hidrolizinde 1,4 bağlarına etki etmekte, karşısına 1,6 glukozidik bağı çıkarsa atlamaktadır. Dolayısıyla bu bağları hidrolize edememektedir. Amilopektin hidrolizi sonucunda glikoz ve maltoza ilave olarak bir seri dallı sınırlı dekstrinleri adı verilen ürünler de ortaya çıkmaktadır. Dört ya da daha fazla glikoz içerikli bu dekstrinler orijinal yapının 1,6 glukozidik bağlarının hepsini içermektedir ve böylece nişastanın amilaz enzimi tarafından hidrolizi ile düşük molekül ağırlıklı dekstrinler ve oligosakkaritler oluşmaktadır (Anonymous 1988).

α -amilaz enzimlerini karakterize eden özellikler bazı indirgen grupları serbest bırakmak, çeşitli uzunluktaki dekstrinleri oluşturmak ve nişasta solüsyonun viskozitesini hızla indirmeye şeklinde özetlenebilir (Windish ve Mhatre 1965).

Nişastanın hidrolizi sonucu ortaya çıkan ürünler α -optik konformasyonu gösterdiğinden bu enzimlere α -amilazlar adı verilmiştir. Bu enzimler substratlarının iç kısımlarındaki α -1,4 bağlarına atak yaptıkları için bunlara endoamilazlar da denir (Windish ve Mhatre 1965).

2.1.6. α -Amilazın Endüstriyel Kullanım Alanları

α -Amilaz enzimi ticari olarak kullanılan ilk enzimdir. 1905 yılında Japonya'da tekstil endüstrisinde haşıl alma işlemi için *A. oryzae* kültüründen α -amilaz enzimi üretilmiştir. 1908 ve 1915'de Boiden ve Effort haşıl alma amacıyla bakteriyel amilaz üretim metodu ile ilgili bir patent almışlardır. 1939 yılında *B. subtilis* sp.'den α -amilazın endüstriyel üretimine ilk kez Japonya'da başlanmıştır. Daha sonraki yıllarda α -amilaz enzimi nişasta işleme endüstrisinde, nişasta sıvılaştırma ajanı olarak kullanılmıştır. 1959'da ise α -amilaz ve amiloglukosidaz kullanılarak nişastadan toz ve kristal dekstroz'un endüstriyel üretimine başlanmıştır (Bernfeld 1951, Sarıkaya 1995).

Tekstil endüstrisinde dokuma sırasında ipliklerin sağlam ve düzgün olup kopmaması için iplikler nişasta içeren bir çözelti ile muamele edilmektedir. Bu işleme haşılama adı verilir. Kumaş dokunduktan sonra, kumaştaki fazla nişastanın uzaklaştırılması gerekir. Bu işleme de haşıl alma adı verilmektedir. Haşıl alma ajanı olarak da yaygın olarak α -amilaz enzimi kullanılmaktadır (Dinçbaş 2009).

Gıda endüstrisinde ise nişastanın α -amilaz enzimi tarafından hidrolizi ile açığa çıkan ürünler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu ürünlerden dekstrin, nişastanın glikoza kadar hidrolize olmadan önce oluşan kısa moleküllü ilk üründür. Dekstrinler çözünürlüğü yüksek ve dayanıklı bir ürün olup, yoğun şurup kıvamında bir maddedir ve bu maddeler gıdalarda viskozite artırıcı yani, koyulaştırıcı dolgu maddesi olarak kullanılmaktadır. Nişasta dekstrinlere kadar parçalandıktan sonra glukoamilazın ortama ilavesi ile glikoza kadar ayrılmaktadır. Açığa çıkan glikoz ya şurup halinde, ya da kristal toz şeklinde elde edilmektedir. Glikoz şurubuna glikozizomeraz enzimi katılarak yüksek fruktozlu şurup

üretimi sağlanmaktadır. Bu ürün yüksek bir tatlılığa sahip olup, meşrubat üretiminde, süt ürünlerinde, ekmekçilik ürünlerinde, konservecilikte, pasta ve şekerleme yapımında yaygın olarak kullanılmaktadır (Sevim ve ark. 2006).

Nişastanın maltoza tam hidrolizi, nişastanın öncelikle α -amilaz tarafından sıvılaştırılıp, daha sonra da ortama izoamilaz ve pullulanaz enzimlerinin ilavesi ile sağlanmaktadır. Açığa çıkan yüksek saflıktaki maltoz reçel, şekerleme, ekmek ve bira üretiminde kullanıldığı gibi, gıdalarda tatlandırıcı ve kaliteyi artırıcı olarak da kullanılmaktadır. Nişasta hidrolizi sırasında yan ürün olarak açığa çıkan maltotetroz da nem tutucu özelliğinden dolayı gıda endüstrisinde kullanılmaktadır. Bira üretimi sırasında arpadaki nişastanın parçalanması için de α -amilaz enzimi kullanılmakta ve bu sırada fermente edilebilir şekerler açığa çıkmaktadır (Wiseman 1987).

α -amilaz enzimi alkol üretiminde de kullanılmaktadır. Alkol üretiminde hammadde olarak kullanılan nişastalı materyaller α -amilaz ve amiloglukosidaz enzimleri ile muamele edilmektedir. Nişasta yeterince parçalandıktan sonra ortama maya aşıl原因arak fermantasyon işlemine geçilmektedir. Fırıncılıkta, hamurun yapısını iyileştirmesinden ve ekmeğin bayatlamasını geciktirmesinden ve raf ömrünü uzatmasından (2-3 gün) dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır (Sarıkaya 1995).

α -Amilazlar meyve suyu endüstrisinde de uygulama alanı bulmakta, özellikle elma ve armut sularının berraklaştırılmasında kullanılmaktadır. Meyvelerin nişasta içeriği meyve suyunda bulanıklığa yol açmaktadır. Bu sorun ortama α -amilaz ilavesiyle çözülmektedir (Selen 2006).

α -Amilazın giderek artan bir kullanım alanı da çamaşır ve bulaşık deterjanlarıdır. Tüketiciler arasındaki modern eğilim bulaşık ve çamaşır makinelerini daha düşük sıcaklıklarda kullanmaktır. Bu düşük sıcaklıklarda elbiselerden ve bulaşıklardan nişastayı uzaklaştırmak problem olmaktadır. α -amilaz içeren deterjanlar uygun sıcaklık ve pH da bu problemi çözmeye yardımcı olmaktadır. Hayvan yemlerinde sindirimi kolaylaştırmak amacıyla da α -amilaz enzimi kullanım alanı bulmaktadır (Maarel ve ark. 2002).

Günümüze kadar gerek ülkemizde ve gerekse dünyada enzimler konusunda ve özellikle amilaz enzimi konusunda üretimi, uygulanması ve niteliklerinin belirlenmesi konusunda pek çok araştırma yapılmıştır. Giderek artan kullanım alanları sayesinde enzim üretiminin yaklaşık % 30'nu amilazlar oluşturmaktadır (Maarel ve ark. 2002).

Çizelge 2. 2. Amilazların uygulama alanları (Atlas 1994).

Kullanılan Endüstri	Kaynak		Uygulaması
	<i>Bacillus</i>	<i>Aspergillus</i>	
Alkol	+	+	Sakkarifikasyon için malt ilavesinden önce nişastanın sıvılaştırılması için
Piştirme maddesi		+	Fermente edilebilir karbonhidratların oranının artırılması
İçki	+		Arpanın hazırlanması, sıvılaştırıcı ilavesi
İçki		+	Hububatların fermentesini kolaylaştırmak, bira özelliklerinin modifikasyonu
Yem	+		Yemlerde arpanın enzimatik olarak işlenmesinin geliştirilmesi
Deterjan	+		Yıkamada temizleme gücünün artırılması
Kağıt	+		Kağıdın yazma kalitesini artırmak için şeker üretmeksizin nişastanın sıvılaştırılması
Tekstil	+		Yüksek sıcaklıklarda sürekli haşılama
Şeker	+		Glikoz, fruktoz ve maltoz üretiminde özsuda bulunan nişastayı parçalayarak filtrasyonu geliştirmek

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmada kullanılacak *Bacillus* suşları Türkiye'nin 15 farklı ilinden alınan toprak örneklerinden izole edilmiştir. İzolasyon sonucu en yüksek amilaz aktivitesine sahip *Bacillus* sp.'ler, farklı içerikli ortamlarda üretilmişler ve bunlardan en iyi enzim aktivitesinin saptandığı üreme ortamı ve *Bacillus* sp. tespit edilerek, çalışmaya bu bakteri ile devam edilmiştir ve *Bacillus* sp.' ler daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere kültür saklama besiyerinde korunmuştur.



Şekil 3. 1. Kullanılan toprak örneklerinin alındığı iller: Adana, Amasya, Balıkesir, Bilecik, Bursa, Edirne, İzmir, Kayseri, Konya, Kütahya, Mersin, Muğla, Tokat, Trabzon ve Tunceli.

3.2. Yöntem

3.2.1. Amilaz pozitif bakterilerin izolasyonu

Çalışmalarda kullanılacak olan amilaz pozitif bakterilerin izolasyonu için, toprakların ince kısımlarından 0.25 g tartılmış ve 10 mL steril fizyolojik tuzlu su içerisinde iyice vortekslenerek karıştırılmıştır. Örnekler, 60°C’ de 30 dakika tutularak vejetatif formların ölmesi, ortamda yalnızca sporlu bakterilerin kalması sağlanmış ve tüplerin ağzları kapatılarak soğumaya bırakılmıştır (Lennette ve ark. 1985).

Bakterilerin amilaz üretme kapasitelerinin katı besiyerinde belirlenmesi amacıyla tek bir besiyeri kullanılmıştır (Çizelge 3.1). Nişasta içeren ortamın hazırlanmasında, nişasta önceden çirşlendirilmiş olup, diğer tüm maddeler miktarına uygun bir şekilde ölçülüp erlende karıştırılmış ve bu şekilde otoklavlanmıştır. Karışım uygun sıcaklığa getirildikten sonra, 1/3 oranında seyreltilmiş fosforik asit ile karışımın pH’ ı 7.0’ ye ayarlanmıştır. Otoklav işlemi bittikten sonra 50-55 °C’ ye kadar soğutulan besiyerleri, 180 °C’ de 1 saat pastör fırınında steril edilen petri kaplarına 15’ er mL dökülerek soğumaya bırakılmıştır.

Farklı illerden alınan toprak örneklerinden 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} ve 10^{-9} olmak üzere seri dilüsyonlar yapılmış ve petrilere 0.1 mL örnek pipetlenerek yayma yöntemine göre ekim yapılmıştır (Temiz 1994). Ekimi tamamlanan petriler 37°C’ de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda petri kaplarına % 0.03 I ve % 0.3 KI’ lü iyot çözeltisi dökülmüş ve koloni etrafında zon oluşumunun varlığına göre bakteriler amilaz pozitif olarak değerlendirilmiştir. Zonların büyüklükleri cetvel ile ölçülmüştür. Çalışmada zon çapı büyük olan suşlar seçilmiş ve saf kültür olarak nütrient brothlu agarlı ortamda kültüre edilerek, daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere +4°C’ de saklanmıştır.

3.2.2. Bakteri izolasyonunda kullanılan kültür ortamı

Çizelge 3.1’ de içeriği verilen katı besiyerinde steril şartlarda ekim yapılarak amilaz aktivitesinin varlığı zon oluşumu ile gözlenmiştir.

Çizelge 3. 1. Amilaz pozitif bakterilerin seçiminde kullanılan katı besiyeri (Samrot 2009)

İçerik	Niştalı Besiyeri (%) (Samrot 2009)
Niştalı	1
Maya ekstraktı	0.2
Pepton	0.5
MgSO₄	0.05
NaCl	0.05
CaCl₂	0.15
Agar	2
pH	7.0

3.2.3. *Bacillus*' un taksonomik sınıflandırılması için morfolojik ve fizyolojik özelliklerin belirlenmesi

Elde edilen bakterilerden, en büyük zon çapına sahip bakterilerin saf kültürlerinin morfolojik ve fizyolojik özellikleri incelenerek, *Bergey's Manual of Systematic Microbiology*' den alınan tayin anahtarına göre *Bacillus*' lar belirlenmiştir (Buchanan and Gibbons 1974).

Çizelge 3. 2. Biyokimyasal testlerde kullanılan besiyerleri (Çotuk 2003).

İçerik	Hareketlilik Testi (%, g)	Katalaz Testi (%, g)	Spor Boyama (%, g)	Gram Boyama (%, g)
Niştalı	-	-	-	-
Nutrient Broth	0.8	0.8	0.8	0.8
Agar	1	2	1	1
pH	7.0	7.0	7.0	7.0

Bacillus cinsini tanımak için 2 adet biyokimyasal test ve 2 adet morfolojik test olmak üzere, toplam 4 adet test yapılmıştır (Çizelge 3.2).

3.2.3.1. Hareketlilik testi

Hareketlilik testi için agar ve nutrient broth kullanılarak ortam hazırlanmıştır (Çizelge 3.2). Steril petriyerler, alt taraflarından kalemle çizilerek ikiye bölünmüş ve bakteri ekilecek kısım işaretlenmiştir. Belirlenen bölgeye 0.1 mL pipetlenen üremiş sıvı kültür, çizgiyi geçmeyecek şekilde, drigalski özesi ile iyice yayıldıktan sonra 37°C' de 18 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır (Temiz 1994).

3.2.3.2. Katalaz testi

Katalaz testinde katı ve sıvı ortamlar kullanılarak, farklı yöntemlerle test yapılabilmektedir. Çalışmada ise, % 0.8 nutrient broth içeren agarlı ortama ekilmiş bakteriler, 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda oluşan koloniler üzerine 1-2 damla % 3' lük H₂O₂ damlatılmış ve gaz çıkışı olup olmamasına göre değerlendirme yapılmıştır.

3.2.3.3. Gram boyama

Gram boyama işlemi Temiz (1994)' in belirttiği yöntemle yapılmıştır. Buna göre; bakterilerin 18 saatlik taze kültürlerinden, steril öze ile alınarak 1 damla steril distile su ile yayma preparat hazırlanmış ve preparatlar havada kurumaya bırakılmıştır. Kuruma tamamlandıktan sonra lamalar 3 defa alevden geçirilerek tespit işlemi yapılmıştır. Daha sonra lamaların üzerine, mikrobiyal film tabakasını kaplayacak şekilde, bol miktarda kristal viole damlatılarak 1 dakika beklenmiştir. Kristal viole yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra lamaların üzerine % 0.5 I ve % 5 KI ile hazırlanmış gram iyodin (lugol) dökülerek yine 1 dakika beklenmiştir. Boya, suyla uzaklaştırılmış ve lamalar % 95' lik etil alkol ile renk kayboluncaya kadar yıkanmıştır. Ardından, film tabakasının üzerine safranin eklenmiş ve 45 saniye beklenmiş ve boya yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Bu şekilde hazırlanan preparatlar, havada kurutulmuş ve immersiyon yağı ile 10x100' lük objektifte, Olympus CH-2 marka ışık mikroskopunda incelenmiştir. İyi boyanmış olan örneklerde Gram (+) olan mikroorganizmalar koyu mor (menekşe) renkli, Gram (-) olanlar ise açık pembe renkli görünüşleri ile ayırt edilmiştir.

3.2.3.4. Spor boyama

Endospor boyama işlemi Özkaya-Durlu (2000)' nun belirttiği yöntemle yapılmıştır. Buna göre; taze kültürleri hazırlanan bakteriler, lam üzerine 1 damla steril distile su ile iyice yayılarak havada kurutulmuş ardından 3 kez alevden geçirilerek fikse edilmiştir. Örnekler malaşit yeşili ile alevde 5 dakika etkiye bırakılmış ve buharlaştıkça boya ilave edilmiştir. Distile su ile yıkanan örnekler 30 saniye safranin ile boyanmış ve distile suyla tekrar yıkanıp havada kurutulduktan sonra bakteri sporlarının morfolojileri, Olympus CH-2 marka araştırma mikroskobu kullanılarak incelenmiştir.

3.2.4. Bakteri üretiminde kullanılan besiyerleri

Çalışmada kullanılan bakterilerin saklanması, geliştirilmesi amacıyla farklı besiyerleri kullanılmıştır (Çizelge 3.3). Buna göre, bakterilerin buzdolabı koşullarında uzun süre dayanmalarını sağlamak için, Çizelge 3.3' de verilen *kültür saklama besiyeri* kullanılmış olup, kültürler 30 günde 1 kez yeniden hazırlanan agarlı besiyerine aşılacak sureti ile korunmuşlardır.

Çizelge 3. 3. Bakteri üretiminde kullanılan besiyerleri (Sarıkaya 1995)

İçerik	Kültür saklama besiyeri (% , g)	Bakteri geliştirme besiyeri (% , g)
Nutrient Broth	0.8	0.8
NaCl	0.8	-
Agar	2.0	-
pH	7.0	7.0

3.2.5. Enzim üretimi için kullanılan besiyeri

Biyokimyasal ve morfolojik testler sonucunda tespit edilen 4 adet R oranı (Hidroliz oranı = Koloninin çapı / Zon çapı) en yüksek *Bacillus sp.*' den, amilaz üretim kapasitesinin belirlenmesi amacıyla, nişasta içerikli besi ortamı denenmiş ve Çizelge 3.4' teki besiyeri kullanılmıştır. Bu bakteri yeni izole bir bakteri olduğundan dolayı besiyeri içeriğinde (% 1, % 0.5, % 0.3) farklı nişasta oranları kullanılmıştır.

Çizelge 3. 4. Amilaz üretim ortamının tespitinde kullanılan besiyeri

İçerik (% , g)	Amilaz üretiminde temel besiyeri
Nişasta	1
Pepton	0.5
Corn Strep Liquor	0.5
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.8
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.05
K ₂ HPO ₄	1.4
KH ₂ PO ₄	0.6
pH	7.0

3.2.6. Bakteri üretim koşulları

Kültür saklama ortamından (Çizelge 3.3) steril öze ile alınan bakteri kültürü, içerisinde 30 mL bakteri geliştirme besiyeri (Çizelge 3.3) bulunan 100 mL' lik erlene aşılansmış, 37°C' de 150 devir/dk çalkalama hızına sahip inkübatörde 18 saat süre ile üretilmiştir.

Bu bakterinin enzim üretim kapasitesini saptamak amacıyla 18 saatlik bakteri kültürlerinin 600 nm' deki optik yoğunlukları (O.D) spektrofotometre (Beckman Coulter- DU 700) kullanılarak, bir standart elde edebilmek amacıyla, steril fizyolojik tuzlu su ile 0.3' e ayarlanmıştır. Bu şekilde ayarlanan kültür çözeltilerinden, içerisinde 150 mL maksimum enzim üretiminin elde edildiği enzim üretim besiyeri (Çizelge 3.4) bulunan 500 mL' lik erlenlere %1 oranında aşılansmış ve 37°C' de 150 devir/dk çalkalama hızına sahip inkübatörde 72 saat süre boyunca inkübe edilmiştir. Üreme ve enzim aktivite tayinleri 16., 24., 40., 48., 64. ve 72. saatlerde yapılarak bakterinin gelişme grafiği çıkarılmış ve maksimum enzim üretim zamanı saptanmıştır.

3.2.7. Bakteri üremesinin ölçülmesi

Bakteri üremesinin belirlenmesi amacıyla, besiyerinin bulanıklığı spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. 3.2.6' da belirtilen yöntemle inkübasyona bırakılan besiyerlerinden, belirlenen saatlerde örnek alınarak, 600 nm dalga boyunda okunmuştur. Amilaz

üretiminde kullanılan besiyeri kör olarak kullanılmıştır ve optik yoğunluk (OD) değerlerinin okunmasıyla bakteri üreme miktarı belirlenmiştir (Sarıkaya 1995).

Elde edilen optik yoğunluk (OD) değişimleri, zamana karşı grafiklenerek gelişme eğrileri çıkarılmıştır.

3.2.8. Enzim aktivitesinin ölçülmesi

α -amilaz aktivitesinin tayininde Yoo ve ark. (1987)' in, kullandıkları dekstrinojeik bir yöntem olan iyodimetrik yöntemden faydalanılmıştır. Bu yöntemin temeli, iyotun nişasta ile verdiği renk esasına dayanmaktadır. Parçalanmış nişasta iyot ile muamele edildiğinde mavi bir renk vermektedir. Nişasta α -amilaz enzimi tarafından parçalandığında kısa zincirli dekstrinler oluşur, bu da sarı renk yerine mavi renk meydana getirmektedir. Böylece, ortamda bulunan enzimin miktarına bağlı olarak, ortamın rengi sarı ile mavi arasında değişmekte, bunun derecesi de spektrofotometrik olarak ölçülebilmektedir.

Bu amaçla, öncelikle kültür ortamından 10 ml alınarak 20 dakika süre ile santrifüj edilerek (5500 devir/dk) bakteri hücrelerinin bulunduğu pelet kısmı ile enzim içeren sıvı kısım birbirinden ayrılmıştır.

Enzim aktivite tayininde substrat çözeltisi olarak % 5' lik nişasta çözeltisi kullanılmış olup, bu çözeltiden 2,5 ml alınmış ve 0,04 M fosfat tampon çözeltisi (pH: 5.9) ile 100 ml' ye tamamlanmıştır. Substrat olarak kullanılan nişasta çözeltisi işlemden önce her seferinde taze olarak hazırlanmıştır.

Deneyleerde her bir enzim örneği için 2 adet örnek 2 adet de kontrol tüpü kullanılmıştır. Her iki tüpe de 5' er ml substrat çözeltisi konulmuş ve tüpler literatürde belirtilen 25°C yerine 37°C' lik su banyosunda 10 dakika bekletilerek reaksiyon sıcaklığına getirilmiştir. Daha sonra substrat içeren tüpe 0,04 M fosfat tamponu (pH:5.9) ile 1/10 ila 1/60 arasında seyreltilmiş enzim çözeltisinden, kontrol tüpüne ise 0,04 M fosfat tampon (pH:5.9) çözeltisinden 0.5' er ml ilave edilerek 37°C' de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda her iki tüpe de 5' er ml HCl eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Tüpler tüp karıştırıcısında (Vortex) karıştırılmış ve bu karışımdan 0.5 ml alınarak içinde 5 ml iyot çözeltisi bulunan başka bir tüpe aktarılmış

ve örnek ile kontrollerin 620 nm' deki optik yoğunlukları enzim ve substrat içermeyen iyot çözeltisine karşı okunmuştur.

İyot çözeltisi 100 ml distile su içerisinde 500 mg I ve 5.0 gr KI bulunan stok çözeltiden 1 ml alınıp, 100 ml distile suya ilave edilmek suretiyle her seferinde taze olarak hazırlanmıştır.

Örneklerdeki enzim aktivitesi aşağıdaki formülden yararlanılarak bulunmuştur.

$$\text{Aktivite (Unit/ml)} = D \cdot [(R_0 - R) / R_0] \times 100$$

Burada:

D: Enzim dilüsyon faktörünü,

R₀: Enzim yokluğunda substrat-iyot karışımının optik yoğunluğunu
(kontrol tüp),

R: Enzim varlığında substrat-iyot karışımının optik yoğunluğunu
(örnek tüp),

100: Stok iyot çözeltisinin 100 kez seyreltilmiş olduğunu ifade etmektedir.

Örnekteki enzim aktivitesi yukarıdaki formüle göre Unit (IU) cinsinden hesaplanmış olup, bu 5.9 pH' da ve 37°C' de 1 ml enzim çözeltisinin 10 dakika içerisinde % 0.1' lik nişasta çözeltisindeki 1 mg nişastayı hidroliz eden enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Yoo ve ark. 1987).

3.2.9. Enzim aktivitesi ölçümünde kullanılan solusyonlar

3.2.9.1. 0.04 M Sodyum Fosfat Tamponu (pH: 5.9)

	<u>1000 ml</u>	<u>500 ml</u>	<u>300 ml</u>	<u>100 ml</u>
X: 1M NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O, MW: 156.02g/molx 0.04M=	6.24 g	3.12 g	1.87 g	___
Y: 1M Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O, MW: 268.07g/molx 0.04M=	10.72 g	5.36 g	___	1.07 g

	<u>1000 ml</u>	<u>500 ml</u>	<u>200 ml</u>
X:	450 ml	225 ml	90 ml
Y:	50 ml	25 ml	10 ml
D. su:	500 ml	250 ml	100 ml

3.2.9.2. Substrat çözeltisinin hazırlanması

% 5' lik nişasta çözeltisi hazırlamak için 0.5 g nişasta 10 mL distile su içinde erlende karıştırılarak beçk üzerinde kaynatarak çözdürülür ve soğumaya bırakılır. Bu çözeltiden aldığımız 6.25 mL, 250 mL fosfat tamponuna (pH: 5.9) tamamlanır. Substrat çözeltisi her deney için günlük hazırlanır.

3.2.9.3. İyod solusyonunun hazırlanması (Stok)

İyottan tartılan 0.5 g ve KI' den tartılan 5 g 100 mL distile su içerisinde manyetik karıştırıcı vasıtasıyla çözdürülür ve kahverengi şişe içerisinde saklanır. Deney süresince kullanacağımız iyot solusyonu önceden hazırladığımız stok iyottan 1 mL alınıp 99 mL distile su içerisinde seyreltilerek hazırlanır. Deneyler için kullanılacak iyod solusyonu stok iyot solusyonundan günlük olarak hazırlanır.

3.2.9.4. 1N HCl solusyonu (Stok)

Stok 1N HCl solusyonu hazırlamak için HCl' den 41.4 mL alınıp, 500 mL distile suya tamamlanır. Deneyler için kullanılacak olan 0.1 N HCl hazırlamak için; stok 1N HCl solusyonundan aldığımız 50 mL' yi 500 mL distile su ile tamamlarız, daha az miktarda

kullanmak istediğimizde stoktan alınan 25 mL solusyon 250 mL distile su ile tamamlanır.

3.3. α -Amilaz Üretimini Etkileyen Fiziksel Faktörler

3.3.1. Sıcaklığın etkisi

Amilaz üretimi üzerine sıcaklığın etkisini araştırmak üzere 30, 35, 37, 40 ve 45 °C sıcaklıklar kullanılmıştır. Maksimum aktivitenin saptandığı saatte 4 adet bakteri üretilmiş ve bu saatte hem üreme hem de aktivite tayini yapılmıştır. Elde edilen sonuç, 37°C'de ölçülen enzim aktivitesi %100 olarak kabul edilerek, elde edilen diğer enzim aktivite değerleri, bağlı aktivite cinsinden grafiklendirilmiştir.

3.3.2. pH'ın enzim aktivitesi üzerine etkisi.

Farklı pH değerlerinin enzim üretimi üzerine olan etkilerinin belirlenmesi amacıyla besiyeri pH'ı 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 ve 8.0 olarak değiştirilmiş ve bu pH' larda bakteri maksimum aktivitesinin saptandığı saate kadar üretilmişlerdir. Bu saatte alınan örneklerden üreme ve enzim aktivitesi tayinleri yapılmıştır. Sonuçlar pH 7.0' de elde edilen enzim aktivite değeri % 100 olarak kabul edilmiş ve diğer sonuçların bağlı aktiviteleri buna göre düzenlenmiştir.

3.3.3. Havalandırma (rpm) etkisi

Oksijenin bakteri üremesi ve enzim üretimi üzerine etkisini belirlemek amacıyla, bakteri 37 °C' de 0 (durgun), 50, 100, 150, 200 devir/dakika çalkalama hızına sahip inkübatörde maksimum enzim aktivitesinin görüldüğü saate kadar inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda alınan örneklerde üreme ve enzim aktivite tayinleri yapılmıştır. Sonuçlar 150 rpm' de elde edilen enzim aktivite değeri % 100 olarak kabul edilmiş ve diğer sonuçların bağlı aktiviteleri buna göre düzenlenmiştir.

3.3.4. İnokülasyon miktarının etkisi

Yatık agardan steril koşullarda öze yardımı ile alınan bir öze dolusu bakteri 30 ml' lik ön inkübasyon ortamında 18 saat süre ile üretilmiştir. Sonrasında 500 ml' lik 5 adet erlene 150 ml konulup otoklavlandıktan sonra 30 ml' lik ön İnkübasyon ortamından 0.5 ml, 1 ml, 2 ml, 2.5 ml ve 3 ml oranında aşılama yapılmıştır. % 1 inokülasyon miktarında

elde edilen enzim aktivite değeri % 100 olarak kabul edilmiş ve diğer sonuçların bağlı aktiviteleri buna göre düzenlenmiştir.

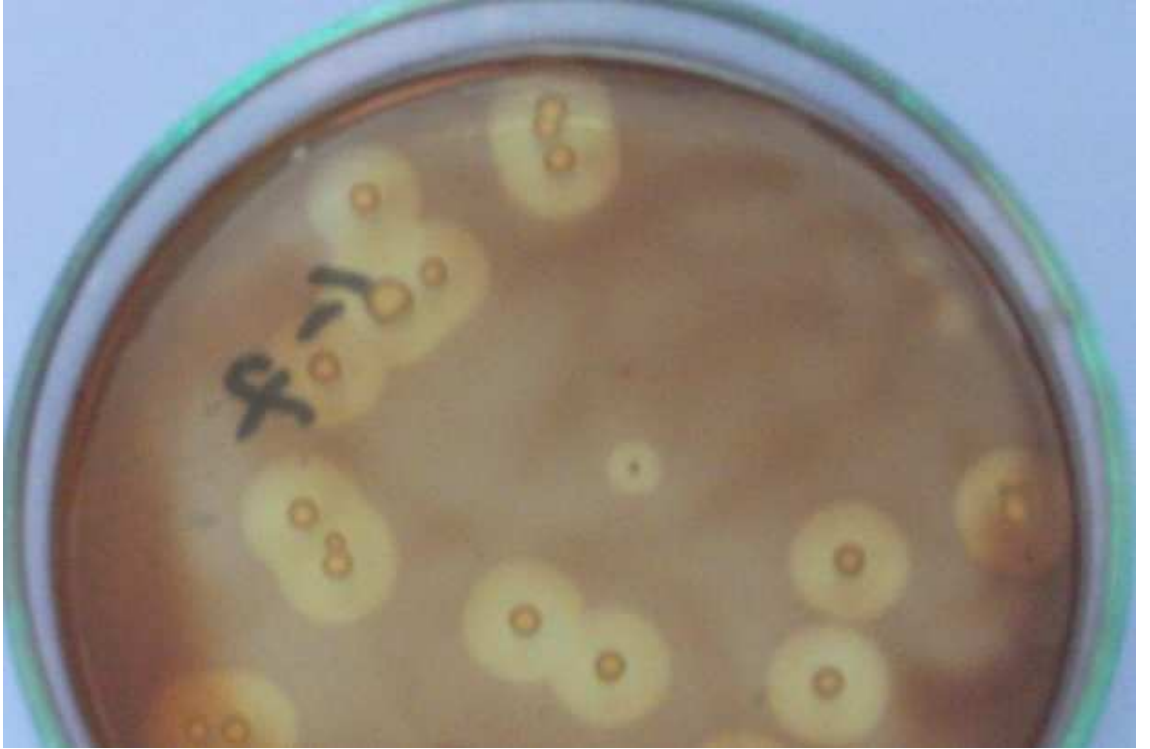
3.3.5. İnokülasyon yaşının etkisi

Bakteri üremesi ve enzim üretimi üzerine inokülasyon yaşının araştırılması amacıyla 1, 2 ve 3 günlük üreme ortamları değerlendirilmiştir ve maksimum enzim aktivitesinin elde edildiği üretim saptanmıştır. 1 günlük inokülasyon yaşında elde edilen enzim aktivite değeri % 100 olarak kabul edilmiş ve diğer sonuçların bağlı aktiviteleri buna göre düzenlenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Amilaz Pozitif Bakterilerin Belirlenmesi

Bu çalışmada Türkiye' nin 15 farklı ilinden alınan toprak örneğinden 60 adet bakteri izole edilmiştir, ancak bunlardan R oranı 0.44- 1.25 olan 18 adet amilaz pozitif bakteri değerlendirmeye alınmıştır. İzole edilen 18 bakterinin *Bacillus* olup olmadığını belirlemek üzere biyokimyasal ve morfolojik testler yapılmıştır. Amilaz pozitif özellik gösteren izolatın besiyerindeki görüntüsü Şekil 4.1' de verilmiştir.



Şekil 4. 1. Amilaz pozitif izolatın besiyerindeki görüntüsü

İzole edilen bakterilerin amilaz üretim kapasitelerini belirlemek amacıyla, agar üzerinde oluşturdukları açık renkli zon çapları cetvel ile ölçülmüştür (Çizelge 4.1). R değeri en yüksek (1- 1.25) olan 4 adet amilaz pozitif bakteri belirlenmiş ve bunlar M-10, M-11, M-13 ve M-18 olarak isimlendirilmiştir.

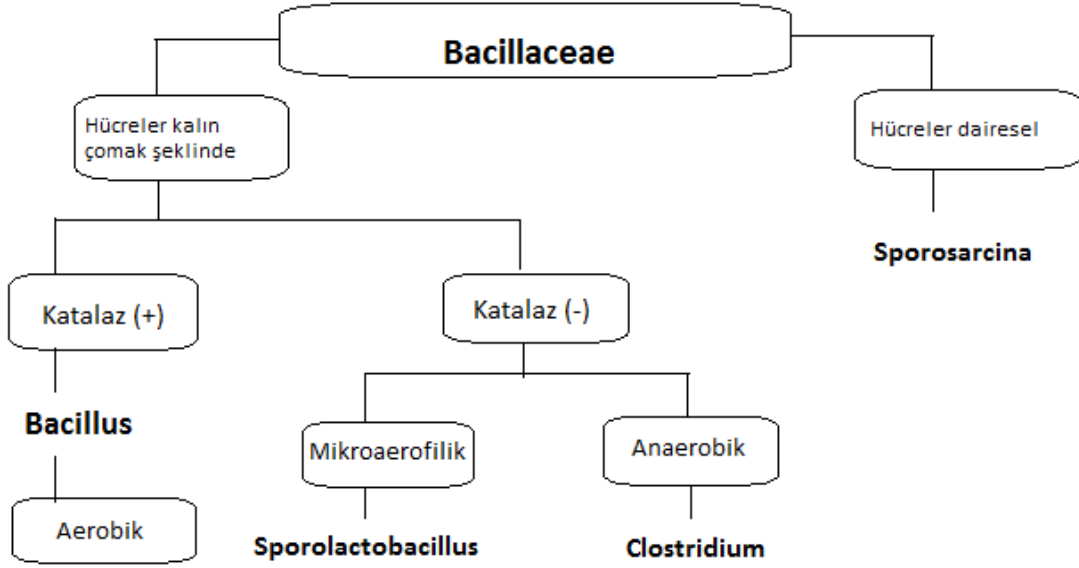
Çizelge 4. 1. Toprak örneklerinden izole edilen bakterilerin zon çapları ve R oranları

Bakteri No	İller	Koloni Çapı (mm)	Zon Çapı (mm)	R oranı (Koloni Çapı/ Zon Çapı)
1	Amasya	5	10	0.5
2	Adana	4	6	0.67
3	Muğla	5	8	0.625
4	Kayseri	5	6	0.83
5	Balıkesir	4	9	0.44
6	Bursa	5	6	0.83
7	Kütahya	4	8	0.5
8	Mersin	5	6	0.83
9	Konya	4	6	0.67
10	İzmir	4	4	1
11	Tunceli	5	4	1.25
12	Edirne	5	6	0.83
13	Bilecik	5	4	1.25
14	Trabzon	4	6	0.67
15	Tokat	4	6	0.67
16	Balıkesir	5	6	0.83
17	Konya	3	6	0.5
18	Tunceli	4	4	1

$$\mathbf{R \text{ (Hidroliz oranı)}} = \text{Kolonin çapı} / \text{Zon Çapı}$$

4.2. Biyokimyasal ve Morfolojik Testler

Genel olarak *Bacillus* cinsini belirlemek amacıyla aşağıdaki tayin anahtarı kullanılmaktadır (Şekil 4.2).



Şekil 4. 2. *Bacillus* sp. izolatların taksonomik özellikleri (Buchanan ve Gibbons 1974).

4.2.1. Biyokimyasal testler

4.2.1.1. Katalaz testi

Katalaz bir enzim olup çoğunlukla aerobik mikroorganizmalar tarafından oluşturulurlar. Bu enzim ortamdaki hidrojen peroksiti (H_2O_2) su ve oksijene ayırmaktadır. 3.2.3.2' ye göre yapılan katalaz testi sonunda, katı bakteri kültürlerine H_2O_2 damlatıldığında, serbest oksijenin gaz kabarcıkları halinde gözlenmesi, hidrojen peroksitin ayrışmasını dolayısıyla da katalaz varlığını gösterdiğinden tüm bakteriler katalaz (+) olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.3).



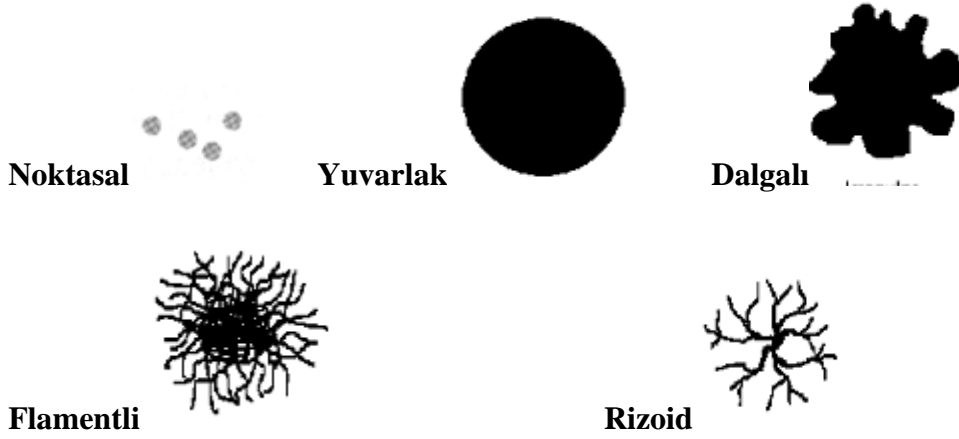
Şekil 4. 3. Belirlenen kolonilerde serbest oksijenin kabarcıklar halinde görünümü

4.2.2. Morfolojik testler

4.2.2.1. Koloni yapısı ve bakterilerin şekli

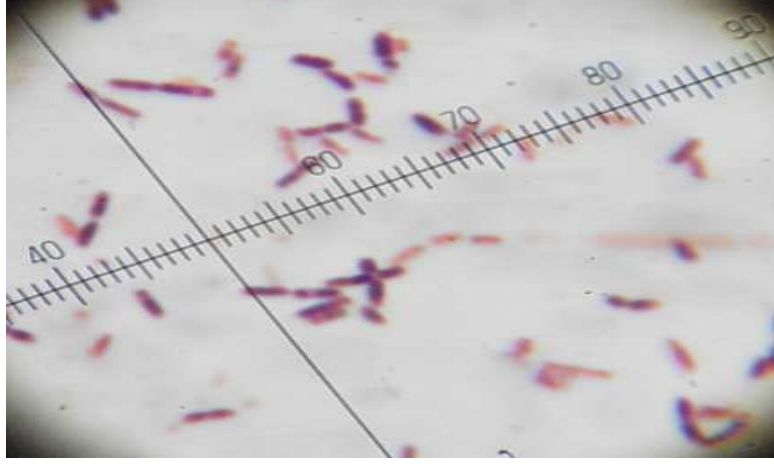
Bakteriler, farklı karakteristik koloni tiplerine sahiptirler (Şekil 4.4).

Koloni Tipleri



Şekil 4. 4. Bakteriye koloni tipleri

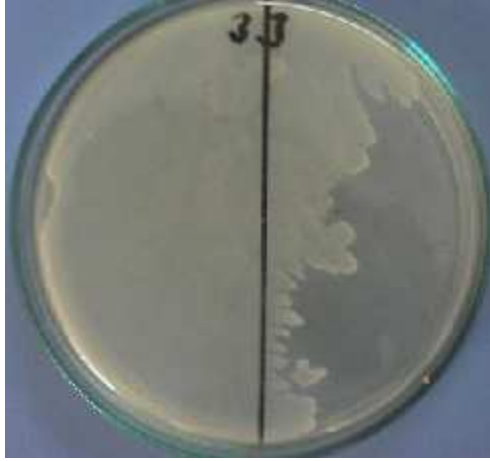
Çalışmamızda elde ettiğimiz bakterilerin noktasal, flamentli ve dalgalı koloni tipi özellik gösterdiği tespit edilmiştir. Mikroskopik incelemeler (Olympus CH-2) sonucunda ise bakterilerin hepsinin çubuk (basil) şeklinde olduğu görülmüştür (Şekil 4.5).



Şekil 4. 5. M-10 bakterisinin 100X objektifte görünümü (Olympus CH-2)

4.2.2.2. Hareketlilik testi

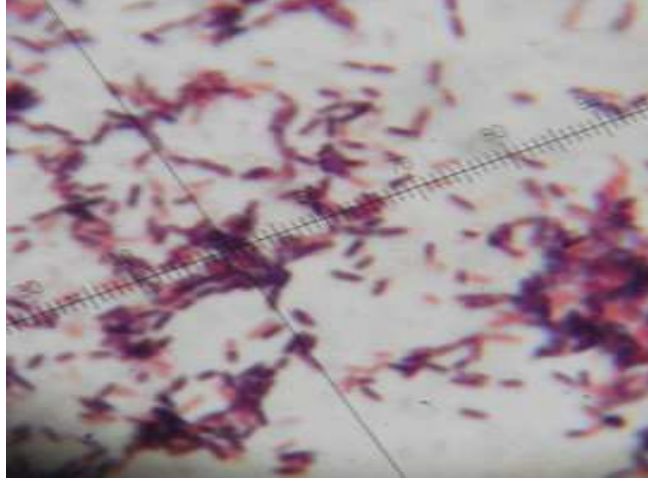
3.2.3.1' e göre yapılan hareketlilik testi sonucunda tüm bakterilerin hareketli (Şekil 4.6) olduğu belirlenmiştir (bkz. Çizelge 4.2).



Şekil 4. 6. Petri kutusundaki yumuşak agarlı besiyerinde hareketlilik kontrolü

4.2.2.3. Gram boyama

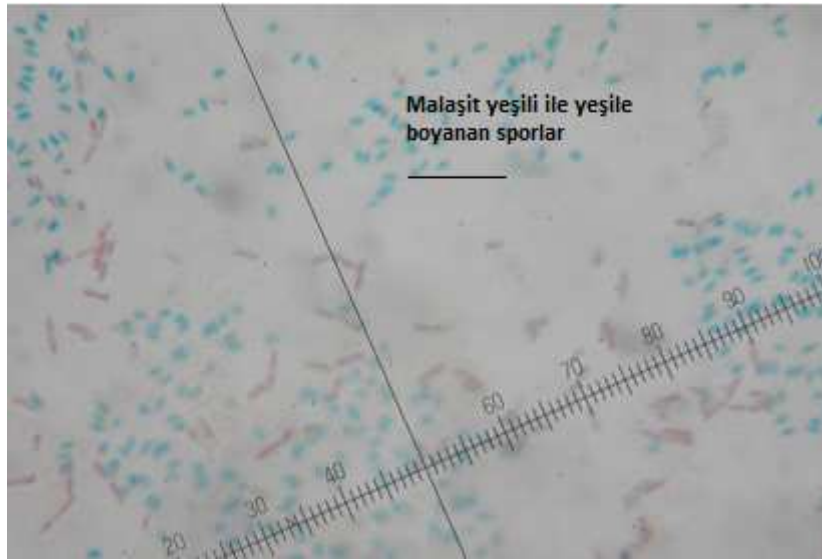
Bakterilerin tanımlanmasında önemli bir aşama olan gram boyama 3.2.3.4' e göre yapılmış olup, ilk boya olarak kullanılan kristal viyoleyi hücre içinde tutabilen bakteriler gram (+) olarak kabul edilmiş olup, denemeye alınan tüm bakteriler mor menekşe bir renk gösteren gram (+) olarak değerlendirilmişlerdir (Şekil 4.7).



Şekil 4. 7. Bakterilerin (Olympus CH-2) 100x objektifte Gram (+) görünümü

4.2.2.4. Spor boyama

Spor oluşumu Bacillaceae familyasının tipik özelliğidir. Endospor oluşumu bu familyanın üyeleri olan *Bacillus* ve *Clostridium* cinsi bakterilerde görülmektedir. Denemeye alınan bakterilerde spor boyama 3.2.3.4' e göre yapılmış olup, tüm bakterilerin sporlu oldukları ve sporun hücre içindeki konumunun terminal (uç) bölgede olduğu saptanmıştır. İncelemeler Olympus CH-2 marka ışık mikroskopunda, 100X objektifte, immersiyon yağı ile yapılmıştır (Şekil 4.8).



Şekil 4. 8. Bakterilerin spor boyama sonrası görünümü

Yapılan biyokimyasal ve morfolojik testler sonucunda tüm bakterilerin *Bacillus* cinsine ait olduğu belirlenmiştir. Çalışma sonrasında R oranı dikkate alınarak ayrılan 4 adet (M-10, M-11, M-13, M-18) bakteri üreme eğrileri çıkarılmak üzere denemeye alınmıştır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4. 2. *Bacillus* cinsinin belirlenmesinde kullanılan morfolojik testler ve test sonuçları

TESTLER	M-10	M-11	M-13	M-18
Koloni şekli	Dalgalı	Flamentli	Dalgalı	Dalgalı
Şekil	Basil	Basil	Basil	Basil
Gram Boyama	+	+	+	+
Spor boyama	+	+	+	+
Endospor Pozisyonu	T	T	T	T
Hareketlilik	+	+	+	+

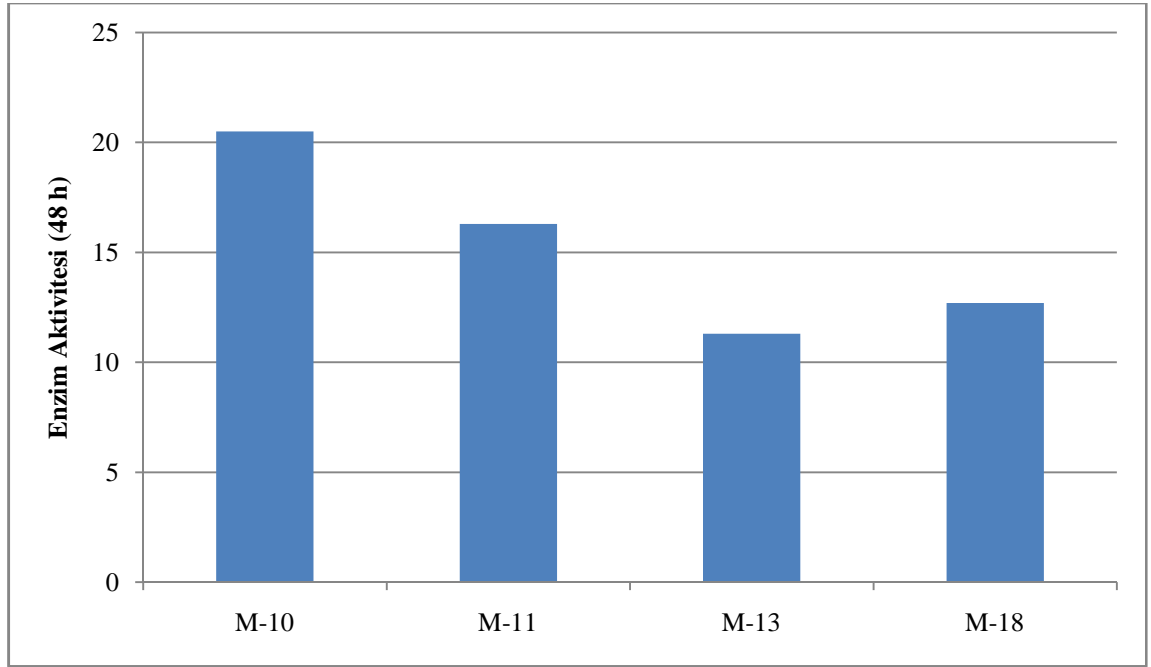
4.3. Maksimum Amilaz Üretim Ortamının Belirlenmesi

Bu 4 adet *Bacillus* sp.' den maksimum enzim üretimi amacıyla Çizelge 3.3 ve 3.4' te belirtilen besiyerleri kullanılarak üretilmiştir. 16, 24, 40, 48, 64 ve 72. saatlerde yapılan aktivite sonucuna göre İzmir ilinden alınan topraktan izole edilen ve M-10 olarak isimlendirilen *Bacillus* sp.'nin en yüksek amilaz aktivitesine sahip olduğu saptanmıştır. (bkz. Çizelge 4.3 ve Şekil 4.9).

R oranı yüksek 4 bakterinin enzim aktivitelerinin karşılaştırılması sonucu, M-10 nolu bakterinin 48. saatte 20.5 U/mL ile maksimum aktiviteye ulaşırken, maksimum üremenin 40. saatte (OD₆₀₀= 0.8) olduğu saptanmıştır. Daha sonraki çalışmalarda *Bacillus* sp. M-10 bakterisi ile devam edilmiştir.

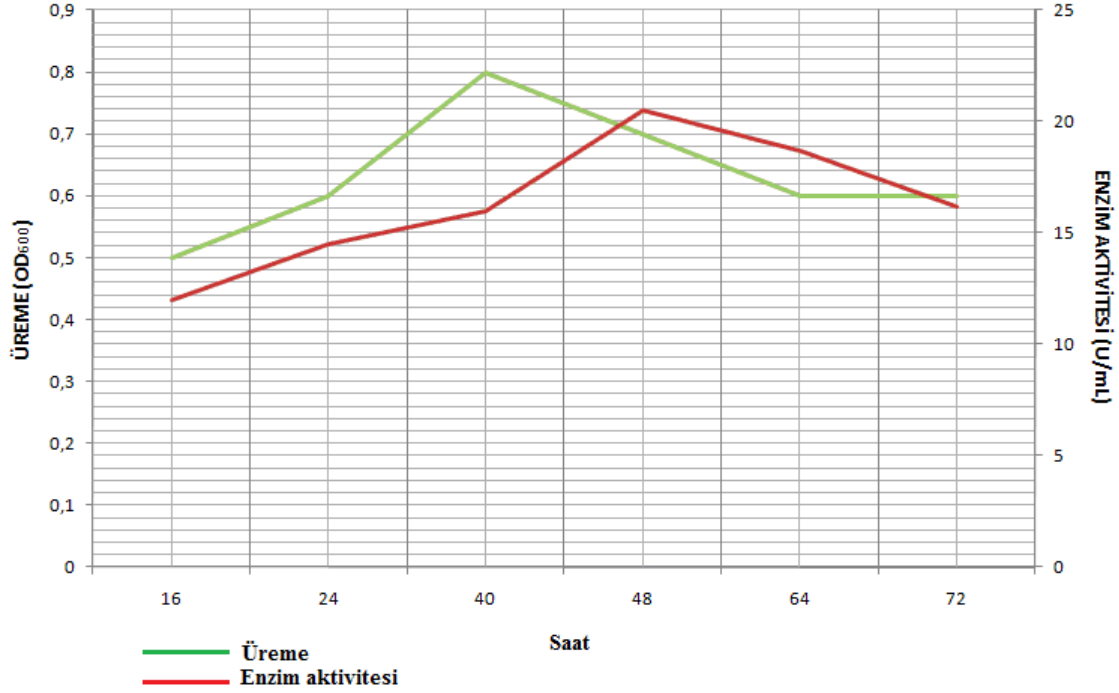
Çizelge 4. 3. Nişasta içerikli besiyerinde üretilen R oranı yüksek 4 bakterinin enzim aktivitelerinin karşılaştırılması

İnkübasyon Süresi	M-10		M-11		M-13		M-18	
	U/mL	OD ₆₀₀	U/mL	OD ₆₀₀	U/mL	OD ₆₀₀	U/mL	OD ₆₀₀
16. saat	12	0.5	–	0.4	–	0.4	–	0.5
24. saat	14.5	0.6	–	0.5	3.9	0.5	–	0.6
40. saat	16	0.8	9.7	0.7	8.75	0.7	9.1	0.8
48. saat	20.5	0.7	16.3	0.7	11.3	0.6	12.7	0.8
64. saat	18.7	0.6	16	0.6	6.2	0.5	8.3	0.7
72. saat	16.2	0.6	–	0.5	–	0.4	–	0.5



Şekil 4. 9. R oranı yüksek 4 adet bakterinin 48. saatte enzim aktivitelerinin karşılaştırılması

Maksimum enzim aktivitesinin durağan fazın ortasında olduğu gözlenmiştir. Bakteri üremesi ile enzim aktivitesi artışının paralel olmadığı saptanmıştır (Şekil 4.10).

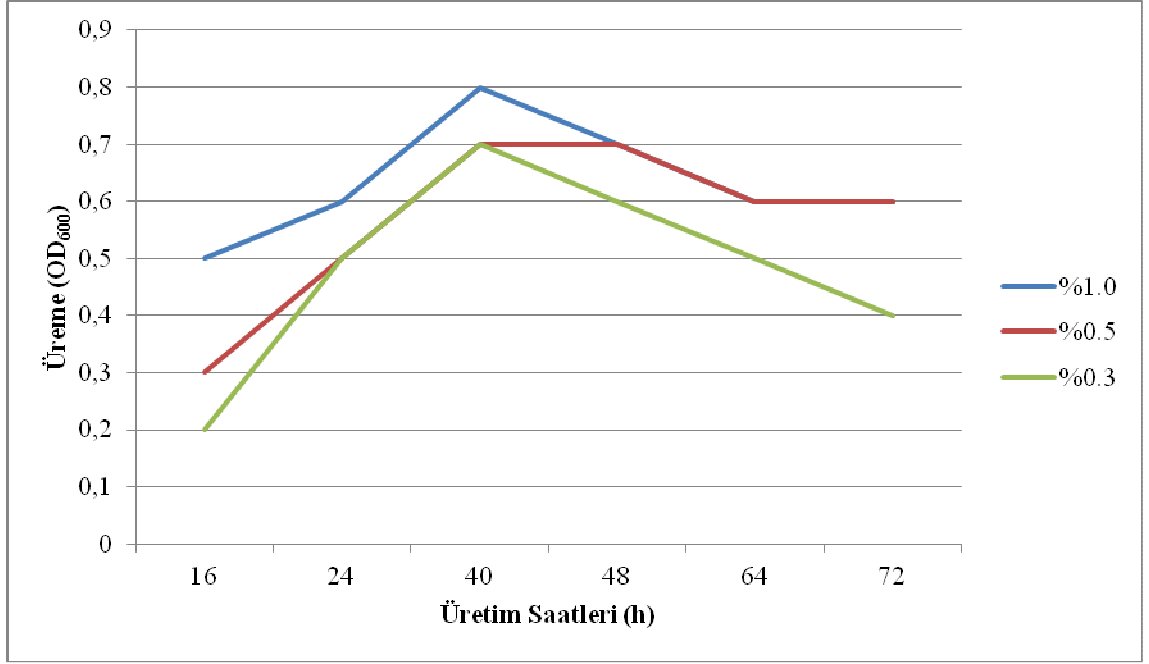


Şekil 4. 10. *Bacillus* sp. M-10 bakterisinin üreme eğrisi

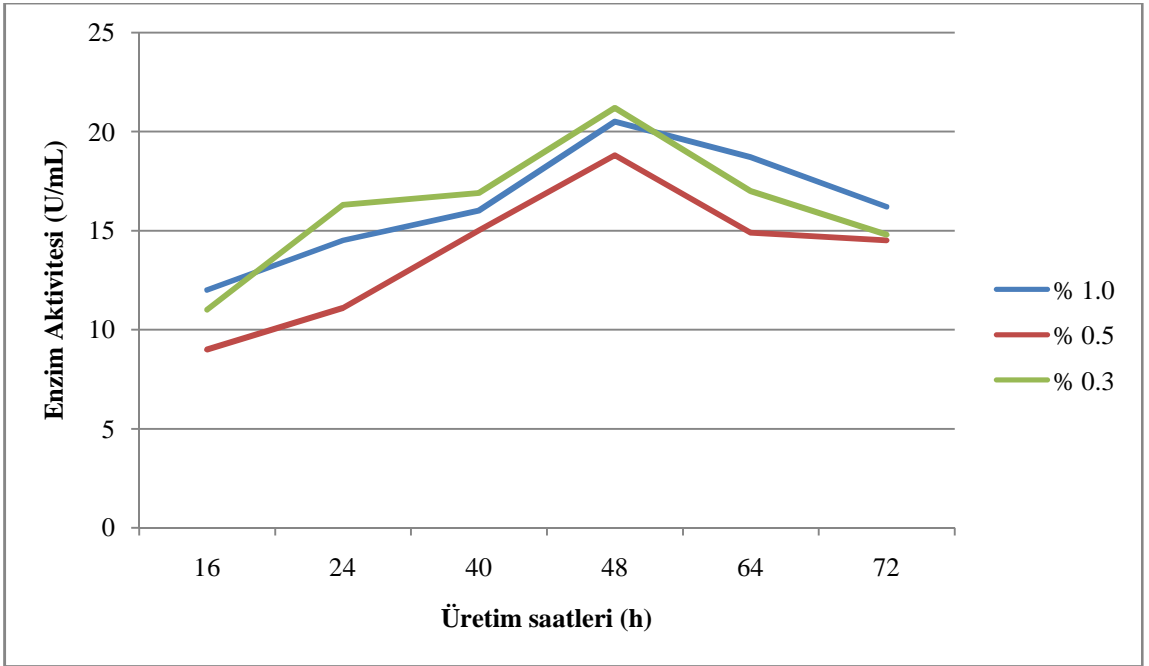
Denemeye aldığımız 4 adet *Bacillus* sp. suşlarındaki enzim aktivitelerinde düşüş gözlemlendiğinden, bu düşüşün besi ortamında % 1 oranında bulunan nişastanın fazla geldiği düşünülerek besi ortamına % 0.3 ve % 0.5 nişasta ilave edildiğinde, % 0.3 nişasta içeren besiyerinde az da olsa bir artış elde edildiğinden bundan sonraki çalışmalara bu besiyeri ile devam edilmiştir (Çizelge 4.4, Şekil 4.11, Şekil 4.12).

Çizelge 4. 4. *Bacillus* sp. M-10' un farklı nişasta konsantrasyonunda karşılaştırılması

İnkübasyon Süresi	% 1		% 0.5		% 0.3	
	U/ mL	OD ₆₀₀	U/mL	OD ₆₀₀	U/mL	OD ₆₀₀
16. saat	12	0.5	9	0.3	11	0.2
24. saat	14.5	0.6	11.1	0.5	16.3	0.5
40. saat	16	0.8	15	0.7	16.9	0.7
48. saat	20.5	0.7	18.8	0.7	21.2	0.6
64. saat	18.7	0.6	14.9	0.6	17	0.5
72. saat	16.2	0.6	14.5	0.6	14.8	0.4



Şekil 4. 11. Farklı nişasta konsantrasyonlarında *Bacillus* sp. M-10' un üremesi



Şekil 4. 12. Farklı nişasta konsantrasyonlarında *Bacillus* sp. M-10' un α -amilaz aktivitesi

Yapılan çalışmada kullanılan farklı nişasta konsantrasyonlarında, maksimum bakteri üremesini 40. saatte, amilaz aktivitesini ise, 48. saatte olduğu saptanmıştır.

4.4. Enzim Üretimi Üzerine Etki Eden Fiziksel Faktörler

Bakterilerin enzim üretim kapasiteleri, buldukları ortama bağlı olduğundan, ortam şartlarının değiştirilmesi enzim üretimine etki etmektedir. Bu nedenle besiyerinde sıcaklık, pH, havalandırma (rpm), inokülüm miktarı ve inokülasyon yaşı değiştirilmiş, değişen fiziksel şartların *Bacillus* sp. M-10' un amilaz üretim kapasitesine olan etkileri belirlenmiştir.

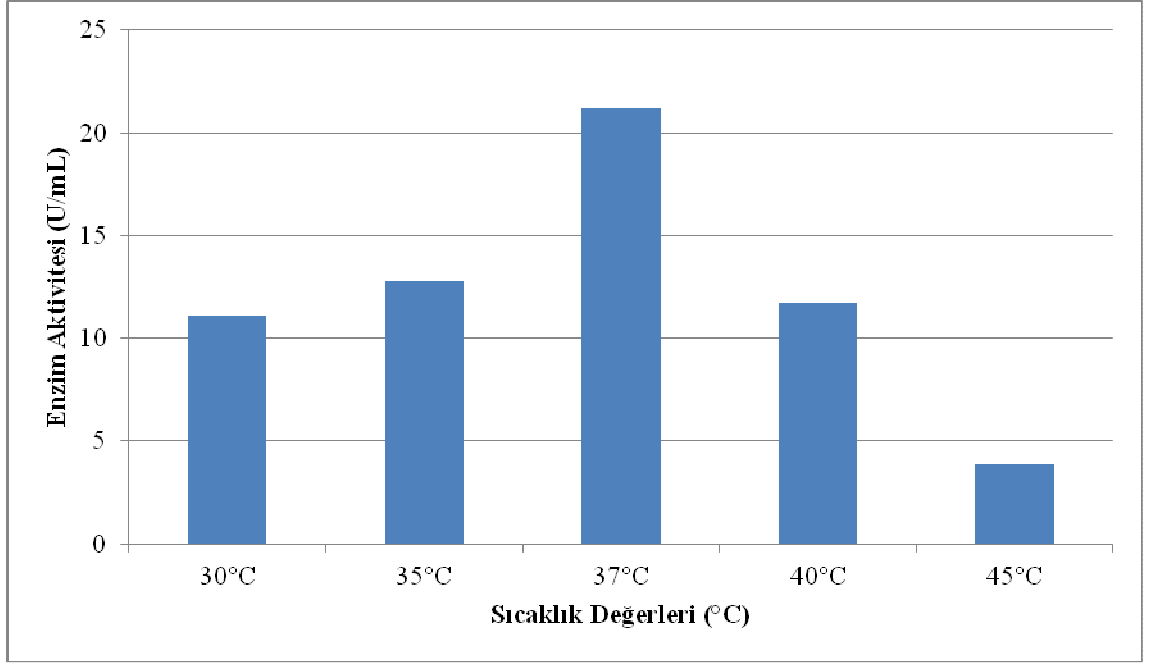
Çalışmalarda her deney iki kez tekrarlanmış olup, grafik ve çizelgelerde ortalama değerler verilmiştir.

4.4.1. Sıcaklığın etkisi

Bacillus sp. M-10 nolu bakterinin gelişimi ve enzim üretimi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla 30°C, 35°C, 37°C, 40°C ve 45°C' deki üreme ve amilaz aktivite miktarları tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre bakterinin en iyi enzim üretim sıcaklığı olarak 37°C değeri saptanmıştır. Bu değer altında ve üzerinde aktivitede ciddi düşüşler gözlenmiştir. Dolayısıyla sıcaklık değerleri enzim üretimi için 37°C > 35°C > 40°C > 30°C > 45°C olarak belirlenirken bakteri üremesi için 30°C > 35°C = 40°C > 37 °C > 45°C olarak görülmektedir (Çizelge 4.5, Şekil 4.13).

Çizelge 4. 5. Farklı sıcaklık değerlerinin *Bacillus* sp. M-10' un enzim üretimi ve üreme üzerine etkileri

Sıcaklık Değerleri (°C)	OD ₆₀₀	U/mL
30	1.5	11.1
35	1.3	12.8
37	0.9	21.2
40	1.3	11.7
45	0.6	3.9



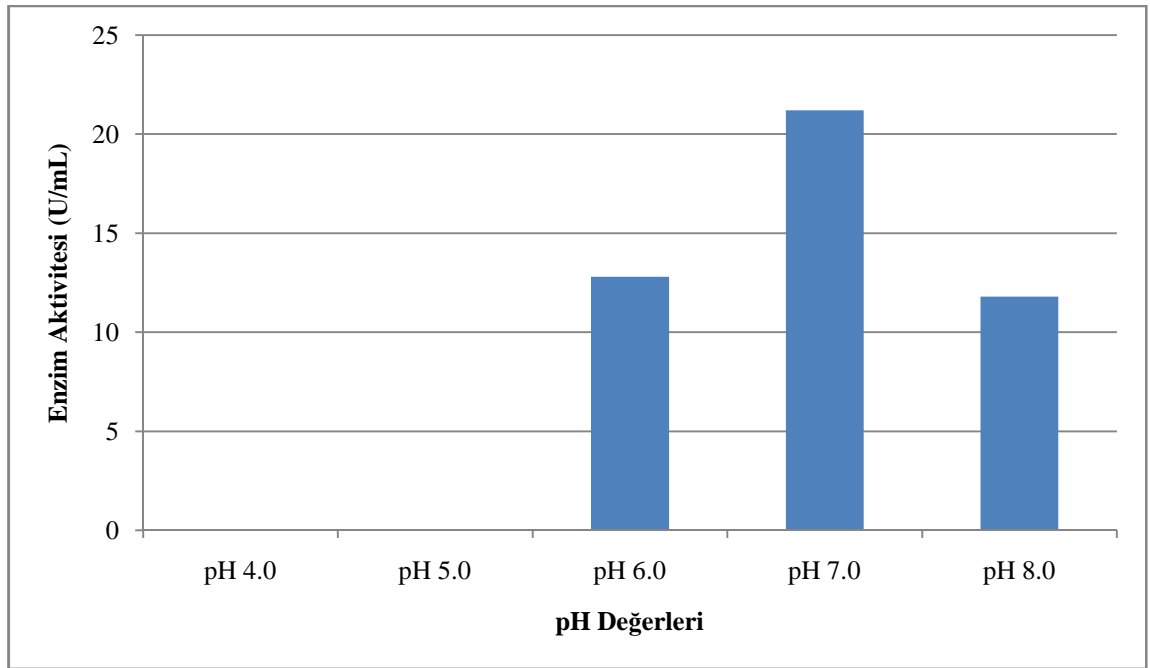
Şekil 4. 13. Farklı sıcaklık değerlerinin *Bacillus* sp. M-10' un enzim aktivitesi üzerine etkileri

4.4.2. pH' nın etkisi

Bacillus sp. M-10' dan enzim üretimi üzerine pH değerini belirlemek amacıyla 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 ve 8.0 pH' larda hazırlanan besiyerinden aktivite tayinleri ve bakteri üremesi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar çizelge ve grafik olarak ayrı ayrı verilmiş olup, buralarda da görülebileceği gibi en yüksek enzim aktivitesi pH 7.0' de elde edilmiş ve asidik ortamlarda enzim üretiminin fazla olmadığı saptanmıştır. pH 4.0 ve pH 5.0'de üremenin yok denilecek kadar az olduğu ve buna bağlı olarak enzim üretiminin olmadığı gözlenmiştir (Çizelge 4.6, Şekil 4.14).

Çizelge 4. 6. Farklı pH değerlerinin *Bacillus* sp. M-10' un enzim üretimi ve üreme üzerine etkileri

pH Değerleri	OD ₆₀₀	U/mL
4.0	0.1	–
5.0	0.02	–
6.0	1.5	12.8
7.0	0.6	21.2
8.0	1.5	11.8



Şekil 4. 14. Farklı pH değerlerinin *Bacillus* sp. M-10' un enzim aktivitesi üzerine etkileri

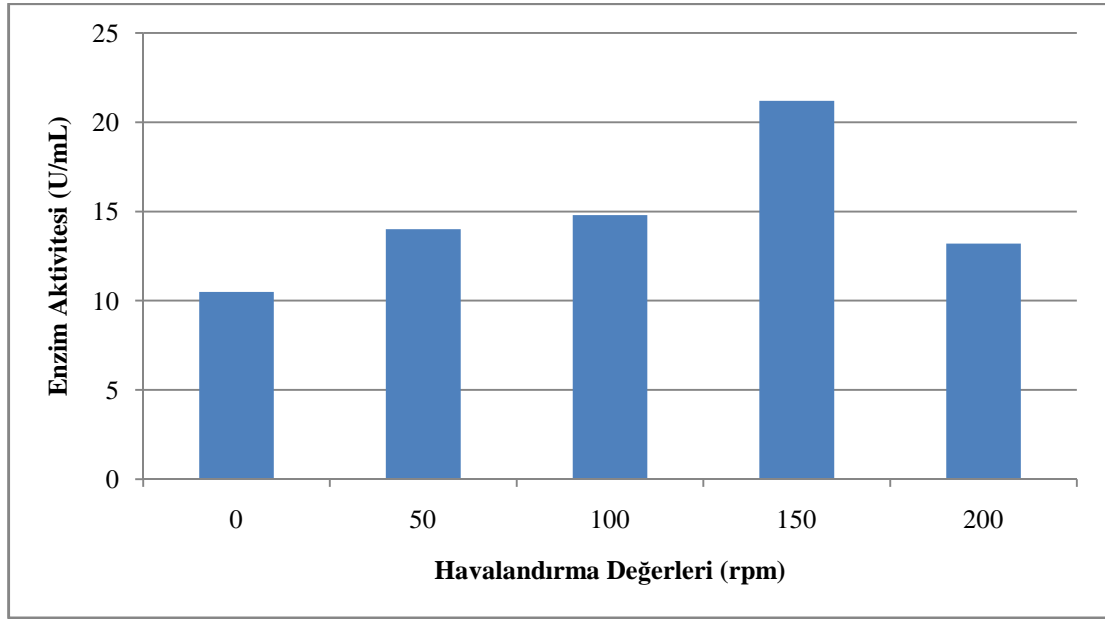
4.4.3. Havalandırmanın (rpm) etkisi

Enzim üretimi üzerine ortam bileşenlerinin yanında ortam şartlarının da etkin olduğu bilinmektedir. Sentetik ortama göre, doğal substratların kullanıldığı ortamlarda oksijen transferinin daha yavaş olduğu bilinmektedir. Oksijen transferini önemli oranda etkileyen çalkalama hızının incelendiği deney sonuçları Çizelge 4.7' de verilmiştir.

Çizelge 4. 7. Farklı çalkalama hızlarında *Bacillus* sp. M-10' un enzim üretimi ve üreme üzerine etkisi

Havalandırma (devir/dakika)	U/mL	OD ₆₀₀
0 (Durgun faz)	6	0.2
50	14	0.5
100	16.8	0.6
150	21.2	0.6
200	13.2	1.4

Elde edilen sonuçlara göre en iyi enzim üretiminin 150 rpm çalkalama hızına sahip değerde olduğu belirlenirken durgun faz (0)' da enzim aktivite değerinin oldukça düşük olduğu buna paralel olarak üremeninde düşük değerde olduğu görülmüştür. Çalkalama hızının artması ile üremede ve enzim üretiminde artış olduğu, ancak 200 rpm çalkalama hızında üremenin yüksek fakat enzim üretiminin düşük olduğu saptanmıştır (Şekil 4.15).



Şekil 4. 15. Farklı havalandırma değerlerinin *Bacillus* sp. M-10' un enzim üretimi üzerine etkisi

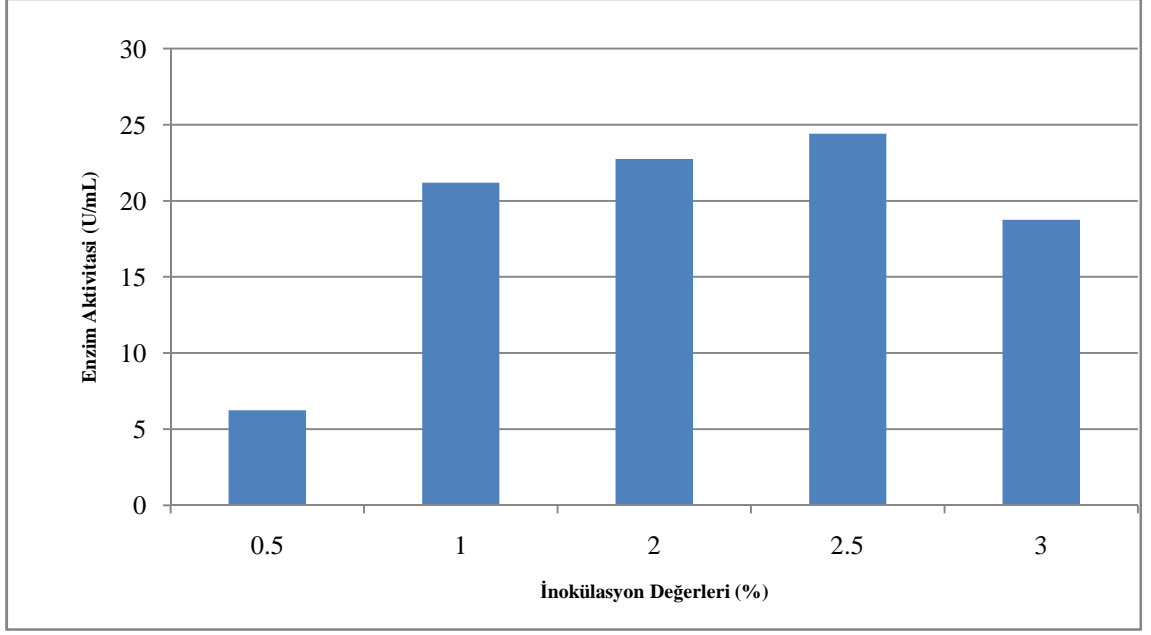
4.4.4. İnokülasyon miktarının etkisi

Düşük inokülasyon konsantrasyonlarında lag fazının uzun olduğu, halbuki yüksek inokülasyon konsantrasyonlarında ise nem içeriğinin artmasıyla yine lag fazının önemli miktarda uzayacağı belirtilmektedir (Krishna ve ark. 1996). Amilaz üretimi üzerine inokülasyon miktarının etkisini görmek amacıyla ön inkübasyon sonrası besi ortamına % 0.5, % 1, % 2, % 2.5 ve % 3 oranında aşılama yapılmış ve yapılan bu aşılama bakterinin üremesi ve enzim üretimine olan etkileri değerlendirilmiştir (bkz. Çizelge 4.8, Şekil 4.16). Üretim maksimum enzim aktivitesinin gözlemlendiği 48. saate kadar yapılmıştır.

İnokülasyon miktarı başlangıç(lag phase = gecikme fazı) fazının kontrolünde etkilidir. Elde edilen sonuçlara göre inokülasyon miktarının artırılması ile üremenin ve enzim üretiminin arttığı gözlemlenmiştir. % 2.5 luk inokülasyon miktarının enzim üretiminde en iyi oran olduğu saptanmıştır. % 3' lük aşılama miktarında enzim üretiminin azaldığı saptanmıştır. Çizelge sonuçları incelendiğinde enzim aktivite değerlerinin inokülasyon miktarlarına göre değerlendirilmesi % 2.5 > % 2 > % 1 > % 3 > % 0.5 şeklindedir (Çizelge 4.8 ve Şekil 4.16).

Çizelge 4. 8. Farklı inokülasyon miktarlarının *Bacillus* sp. M-10' un enzim üretimi ve üreme üzerine etkileri

İnokülasyon Miktarı (%)	U/mL	OD ₆₀₀
0.5	6.25	0.3
1	21.2	0.6
2	22.75	0.9
2.5	24.4	1.2
3	18.75	1.4



Şekil 4. 16. Farklı inokülasyon değerlerinin *Bacillus* sp. M-10' un enzim üretimi üzerine etkileri

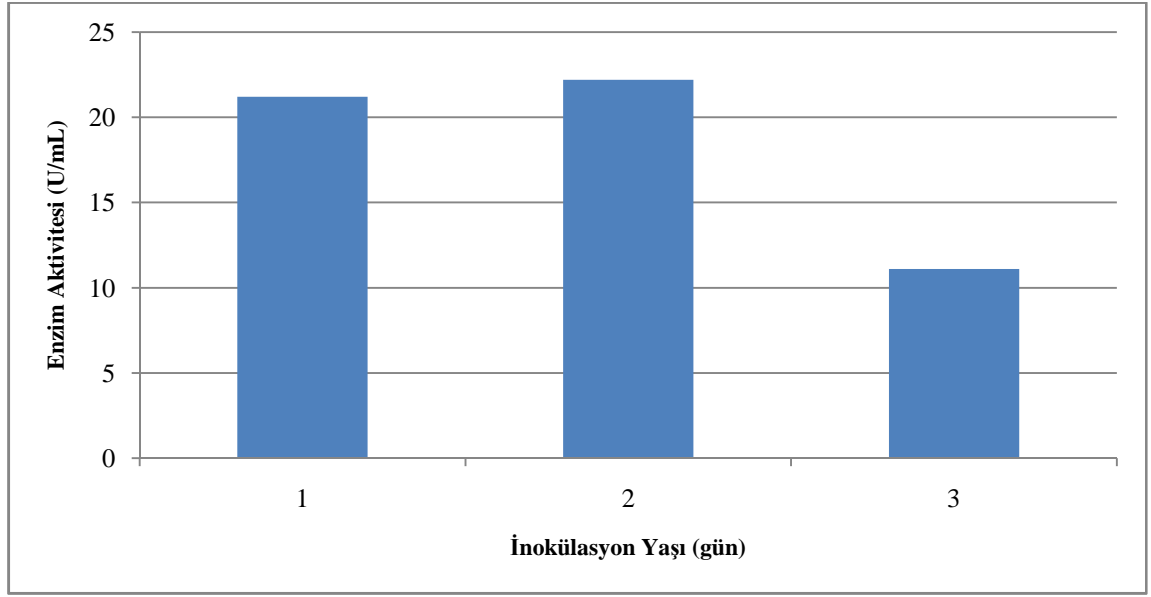
4.4.5. İnokülasyon yaşının etkisi

İnokülasyon yaşının üreme ve amilaz üretimi üzerine etkilerini tayin edebilmek amacıyla 1 günlük, 2 günlük ve 3 günlük 30 ml' lik ön inkübasyon ortamından 150 ml' lik besiyerine % 1 oranında aşılama yapılmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre inokülasyon yaşı artışının üreme ve enzim üretimi üzerine etkisinin fazla olmadığı gözlenmiş, 3 günlük kültürün yaşlı bir kültür olması sebebiyle bu kültürden yeni ortama adaptasyon zaman alacağından dolayı üreme ve enzim üretiminde düşüşler görülmüştür. Sonuç olarak en iyi inkübasyon yaşının 2 günlük olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.9, Şekil 4.17).

Çizelge 4. 9. Farklı inokülasyon yaşının *Bacillus* sp. M-10' un enzim üretimi ve üreme üzerine etkileri

İnokülasyon Yaşı (gün)	U/mL	OD ₆₀₀
1	21.2	0.6
2	22.2	0.9
3	11.1	0.6



Şekil 4. 17. Farklı inokülasyon yaşının *Bacillus* sp. M-10' un enzim üretimi üzerine etkileri

4.4.6. Maksimum amilaz üretimi için optimum fiziksel faktörlerin birleştirilmesi ile amilaz veriminin artırılması

Enzim üretimini maksimum düzeye getirip verimliliği arttırmak amacıyla fiziksel faktörlerde maksimum aktivitenin elde edildiği koşullar bir araya getirip modifiye bir çevre oluşturulmuştur. 37 °C, pH 7.0, 150 rpm, % 2.5 inokülasyon miktarı ve inokülasyon yaşı 2 günlük olan koşullar bir araya getirilerek oluşturulan optimum şartlar denemeye alınmıştır.

Elde edilen sonuç kontrol olarak değerlendirilen 21.2 U/mL ile kıyaslandığında aktivitenin 30 U/mL olduğu ve dolayısıyla enzim üretiminde % 42 oranında bir artış sağlandığı saptanmıştır (Çizelge 4.10).

Çizelge 4. 10. Modifiye ortam kullanılarak *Bacillus* sp. M-10' un enzim üretimi ve üreme üzerine etkisi

Kontrol	U/mL	OD ₆₀₀	Modifiye Ortam	U/mL	OD ₆₀₀
37 °C	21.2	0.6	37 °C	30	1.44
pH 7.0					
150 rpm					
% 1					
1 gün					
			37 °C		
			pH 7.0		
			150 rpm		
			% 2.5		
			2 gün		

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Enzimler endüstrinin farklı alanlarında yaygın olarak kullanılan biyolojik katalizörlerdir ve bu alanların sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Endüstride kullanılan α -amilaz özellikle nişasta gibi doğal kaynaklı ham maddelerin parçalanmasında kullanılmaktadır. Endüstride geniş tüketim olanakları olan bu enzim özellikle Türkiye gibi tarım atığı maddelerin bol olduğu ülkelerde önemli bir kaynaktır.

Amilaz enzimi, dünya çapında kullanımı açısından büyük bir potansiyele sahip olup, çoğunlukla mikroorganizmalardan ve özellikle de *Bacillus* cinsinden elde edilmektedir. Belirli bir mikroorganizma tipi, aynı enzimi farklı ortamlarda farklı oranlarda üretebilmektedir. Bu sebeple, enzim üretim ortamı değiştirilerek, enzim üretim kapasitesinin artırılması yoluna gidilmesi, yüksek enzim üretimi için alternatif bir yoldur. Ayrıca doğadan yeni verimli izolatların elde edilmesinde önemli bir yere sahiptir.

Endüstride oldukça değerli bir enzim olan α -amilaz enzimi; ekmek endüstrisi ve şeker sanayinde, kağıt endüstrisinde yapıştırma ve kaplamaların yapımında, biracılıkta sakkarifikasyon öncesi nişastalı ham maddelerin sıvılaştırılmasında, nişasta endüstrisinde özellikle dekstroz ve yüksek fruktoz oranlı şurupların üretiminde, tekstil endüstrisinde ürünün yapım aşamasında bulaşmış olan nişastanın uzaklaştırılmasında, fermantasyon endüstrisinde nişasta kaynaklı besi ortamı hazırlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır.

Doğadan yeni α -amilaz potent *Bacillus*ların izolasyonu birçok araştırmacı tarafından kendi doğal kaynakları kullanılarak araştırılmaktadır.

Yapılan bu çalışmada kendi doğal kaynaklarımızdan (topraktan) α -amilaz üreten yeni izolatların elde edilmesi yoluna gidilmiştir. Bu amaçla topraktan 60 adet bakteri izole edilmiştir. Çalışmamızda bakterilerin amilaz üretilip üretilmediğini belirlemek için nişasta agarlı ortamda yayma metodu kullanılmıştır. Amilaz pozitif 18 bakteri seçilmiş ve bu bakterilerin *Bacillus* olup olmadığı Bergey' s Manual of Determinative Bacteriology' e göre morfolojik ve biyokimyasal testler ile tespit edilmiştir. Testler sonucunda tüm bakteriler *Bacillus* olarak saptanmış, bu bakteriler arasından koloni çapı/ zon çapı' na

göre R oranı (1-1.25) olan 4 adet *Bacillus* sp. M-10, M-11, M-13, M-18 olarak adlandırılmıştır.

Başka araştırmacılar da bu tür çalışmalar yapmış, bunlardan Alamri (2010) 20 adet termofilik *Bacillus* sp.' den, tüm izolatlar α -amilaz üretmesine rağmen sadece 5 suşun (J5, J2, R7, A3 ve R2) yüksek oranda α -amilaz ürettiğini tespit etmişlerdir. Vaseekaran ve ark. (2010) ise farklı toprak örneklerinden 72 adet *Bacillus* sp. izole etmiş ve bu 72 suşun nişastayı parçalama yeteneğine sahip olduğunu bulmuş; çalışmaya içlerinden en yüksek α -amilaz aktivitesine sahip suş olan (BS₁) ile devam etmişlerdir.

Yaptığımız izolasyon çalışmaları sonucunda en büyük zon gösteren 4 adet *Bacillus* sp.' lerin üreme ve enzim aktiviteleri 24-72 saat boyunca takip edildiğinde *Bacillus* sp. M-10 suşunun diğerlerine göre daha verimli bir suş olduğu saptanmıştır. *Bacillus* sp. M-10' un üreme grafiği incelendiğinde maksimum enzim üretiminin durağan fazın ortasında olduğu saptanmıştır. Bu 48. saate denk gelmekte olup aktivite 20.5 U/ ml olarak saptanırken bakteri üremesinin 40. saatte O.D 0.6 olduğu gözlenmiştir. Her ne kadar Priest 1977 maksimum enzim aktivitesine logaritmik üreme fazının sonunda ulaşıldığını ve artışın bir süre durma fazında da devam ettiğini belirtmişse de, diğer bilim adamlarının yaptıkları çalışma sonuçları bunun her zaman geçerli olmadığını göstermektedir.

Sarıkaya (1995), maksimum enzim aktivitesini *Bacillus amyloliquefaciens* için 72. saatte bulurken, Alamri (2010), 12. saat sonunda, Vaseekaran (2010) ve Teodora ve Martins (2000) 24. saat sonunda Bezbaruah ve ark. (1991) 48. saat sonunda, Shatta ve ark. (1990) *Streptomyces aureofaciens* 77 bakterisinden 7 gün sonunda maksimum α -amilaz üretimini saptamışlardır. Bakteri üremesi ile enzim üretimi arasında bir paralellik olmadığı gözlenmiş olup, buna benzer sonuç yukarıdaki araştırmacılar tarafından ifade edilmiştir.

Agrawal ve ark. (2004), % 0,5 nişastalı ortamda daha iyi enzim ürettiklerini saptamışlardır (94 U/ml). Üretim ortamındaki substrat kaynağı olarak kullanılan nişasta konstrasyonu amilaz üretimini üzerinde etkili olmaktadır. Yaptığımız çalışmada % 1'lik nişasta varlığında enzim üretiminde fazla artış olmadığından nişasta konstrasyonu % 0.3 ve % 0.5 olarak değiştirilmiş ve enzim üretiminin % 0.3 nişasta varlığında fazla bir artış

göstermemesine rağmen % 0.5' e veya % 1' e göre değerlendirildiğinde bu konsantrasyon ile çalışmalara devam edilmiştir.

Bakterilerin enzim üretim kapasiteleri buldukları ortama bağlıdır ve bu ortam şartlarının değiştirilmesi enzim üretimine etki etmektedir. Özellikle besiyerinin sıcaklığı, pH'ı, havalandırılması, inokulum miktarı, inokülasyon yaşı gibi faktörler oldukça etkilidir (Sarıkaya 1995).

Ortamın sıcaklığı mikroorganizmaların üremelerine büyük ölçüde etki etmektedir. Mikroorganizmalar genellikle kendi türlerine özel sıcaklık limitleri (minimal ve maksimal) içinde gelişebilir ve üreyebilirler. Bu sınırlar arasında üremenin en iyi meydana geldiği optimal sıcaklık bulunur (Arda 2000).

Diğer yandan mikroorganizmaların üremeleri için besiyerinin pH' sının optimal sınırları içerisinde bulunması gerekmektedir. Bakterilerin optimal pH limitleri oldukça değişiktir. Yaptığımız çalışmada *Bacillus* sp. M-10 için optimum sıcaklık değeri 37 °C, pH değeri ise 7 olarak bulunmuştur. 37°C' nin altında ve üzerinde enzim üretiminde azalma saptanmıştır. Buna karşın üremede ise durumda farklılıklar görülmüş olup, düşük sıcaklıklarda bakterinin iyi geliştiği (30°C, OD₆₀₀= 1.5) belirlenmiştir. Enzim üretimindeki düşüşler enzimin yapısal özelliklerinden kaynaklanıyor olabilir. Diğer yandan pH değerlerine bakıldığında ise pH 7' nin altında ve üstünde enzim üretiminde azalmalar görülmüştür. Özellikle asidik koşulların bakterinin üremesini ve dolayısıyla alkali koşullara kıyasla enzim üretimine olumsuz yönde etkilediği belirlenmiştir.

Çalışmamıza benzer sonuçlar farklı araştırmacılar tarafından da ifade edilmiştir. Bunlardan Sudharhsan ve ark. (2007) bozulmuş gıda atıklarından izole ettikleri *Bacillus* türlerinden amilaz üretimine etki eden fiziksel ve besinsel faktörleri araştırmış, fiziksel olarak sıcaklık ve pH faktörlerinin etkisini incelemiş, maksimum enzim aktivitesinin pH 7.0 ve 37 °C' de bulunduğunu belirtmişlerdir.

Sivaramakrishnan ve ark. (2006), izole ettikleri bir *Bacillus* sp.' nin 70 °C' de üretimi sonucu maksimum α -amilaz verimi sağlamışlardır. Kathiresan ve Manivannan (2006), topraktan izole ettiği *Penicillium fellutanum* ile α -amilaz üretimine pH, sıcaklık, inkübasyon zamanı, tuzluluk ve karbon, azot kaynaklarının etkisini araştırmış, optimal

α -amilaz üretimini 96 saatlik inkübasyon sonrası, pH 6.5, sıcaklık 30 °C' de elde etmiş ve maksimum α -amilaz üretimini 136 U/mL olarak elde etmişleridir.

Agrawal ve ark. (2004), maksimal amilaz üretimine fiziksel parametrelerin etkisini araştırdıklarında *Bacillus* sp. KCA102 suşunun pH 7.1 ve 57.5 °C' de ulaştıklarını rapor etmişlerdir.

El-Tayeb ve ark. (2007)' larının yaptığı çalışmada *Bacillus subtilis* (SCH suşu) ve *Bacillus amyloliquefaciens* (267CH suşu) suşları kullanılarak α -amilaz üretimini multiprotein- mineral ortam kullanılarak biyoreaktörde gerçekleştirilmişlerdir. SCH suşu tarafından üretilen α -amilaz üretimi için en iyi pH 4-7, 267CH suşu tarafından üretilen α -amilaz üretimi için ise pH 4-8 olarak bulunmuştur. Bu bilim adamları yaptıkları bir diğer çalışmada ise nişasta konsantrasyonunun % 0.5 olduğunda en iyi enzim üretiminin 37- 75°C sıcaklık aralığında, buna karşın % 35 nişasta varlığında ise en iyi enzim üretiminin 85-95°C aralığında bulunduğunu belirtmişlerdir.

Diğer yandan, *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-645 suşundan α -amilaz üretimi için ortam parametrelerinin etkisini katı substrat fermantasyonunda incelemiştir (Selen, 2006).Yapılan çalışmada başlangıç pH' sının (pH 5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 8.0) değişmesiyle enzim üretiminde bir değişiklik saptanmamıştır. Maksimum enzim üretimini ise 33°C de rapor etmiştir.

Mamo ve ark. (1999), yeni izole edilen termofilik *Bacillus* sp. WN11' den elde edilen oldukça termostabil α -amilazın üretiminde 75-80°C sıcaklığın etkili olduğunu bulmuşlardır .

Riaz ve ark. (2009), yeni izole edilen *Bacillus subtilis* KIBGE-HAR suşundan elde edilen termostabil α -amilazın üretimi ve karakterizasyonu çalışmasında, 24 saatlik inkübasyon sonrasında hücre popülasyonu ve α -amilaz aktivitesinin maksimuma ulaştığını gözlemlemişlerdir. Enzim üretimi için optimum sıcaklık 50 °C olarak saptanırken pH 7.0 olarak saptamışlardır.

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

Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar ve diğer yapılan çalışmaların sonuçlarındaki farklılıklar bakteri türüne ve enzimin yapısına göre değişmektedir.

Diğer fiziksel faktörler olan inokulum yaşı ve inokulum miktarı ve havalandırma gibi çevresel parametreler bakterilerin gelişimi üzerine etkili olmaktadır. Yaptığımız çalışmada inokulum miktarının % 2.5, (24.4 U/ml) , inokulum yaşının 2 günlük (22.2 U/ml) ve çalkalama hızı 150 rpm (21.2 U/ml) ‘ de en yüksek enzim üretimi sağlanmıştır.

Bu faktörlerden inokulum miktarının artması ile enzim üretiminin arttığı ancak daha ileri artışın enzim üretimini düşürdüğü saptanmıştır. İnokulum miktarının artmasıyla daha fazla mikroorganizma besiyerine verildiğinden ortam içeriği hızlıca tükenmekte ve besi ortamının azlığından dolayı bakteri enzim üretmeden spor fazına geçmektedir. Bu sebeple yeterli enzim üretiminin olmadığı düşünülmüştür.

Buna karşın Selen (2006), yaptığı bir çalışmada inokulum miktarının enzim üretimi üzerine bir etkisinin olmadığını rapor etmiştir.

Fakat Shatta ve ark. (1990), *Streptomyces aureofaciens 77*’ den α -amilaz üretiminde % 4’ lük inokulasyon miktarının enzim üretimi için optimum olduğunu ifade etmiştir.

Ancak Shatta ve ark. *Streptomyces aureofaciens 77* suşundan, Jogeazi ve ark. (2011), *Bacillus subtilis* tarafından α -amilaz üretimi için en iyi inokulum miktarını % 4 olarak bulmuşlardır. Bu durumun bakteri türüne göre değişiklik gösterdiği ifade edilebilir.

İnokulum yaşına bakıldığında ise en iyi enzim üretimi 2 günlük kültürden elde edilmiştir. 1günlük genç kültürden de enzim veriminde hemen hemen aynı verime elde edilmiştir. Ancak 3 günlük yaşlı kültürde enzim veriminde % 50 oranında bir düşüş olduğu görülmüştür. Bu durum, yaşlı kültürün yeni ortama adaptasyonunu zorlaştırdığı ile ifade edilebilir.

Buna karşın Shatta ve ark. (1990) *Streptomyces aureofaciens* 77' de α -amilaz üretiminde 6 günlük yaşlı kültürün enzim üretimi için uygun olduğu ifade edilmiştir.

Bu konuda çalışmaların az olmasından dolayı bir genellemeye gidilememektedir.

Bacillus cinsine giren bakteriler aerobik koşullarda üreyip faaliyet gösterebilmeleri için ortamda yeterli miktarda oksijen bulunması gerekmektedir. Bu oksijen gereksinimi de besi ortamının belli hızda çalkalanmasıyla elde edilmektedir. Bu yüzden enzim üretiminde önemli bir fiziksel faktör olan çalkalama hızı ile yaptığımız çalışmada en iyi enzim üretimi 150 rpm çalkalama hızına sahip ortamda sağlanmıştır.

Çalkalama hızını 0 (durgun faz)' dan her 50 devir/dk artması ile enzim veriminde gözlenmiş ancak 200 rpm' de enzim veriminde % 38 oranında azalma görülmesine karşın bakteri üremesinde yarı yarıya bir artış saptanmıştır.

Sarikaya ve ark. *Bacillus amyloliquefaciens* ve *B. subtilis* ile yaptığı çalışmada en iyi çalkalama hızını 200 rpm olarak rapor etmişlerdir.

Millner ve ark. (1996), yüksek havalandırma hızının enzim üretimini arttırdığı ancak deneylerinde köpük problemi çıktığını belirtmişlerdir.

Kelly ve ark. (1997), daha yüksek α -amilaz aktivitesine ulaşmak için iki aşamalı proseslerle α -amilazın üretimini tanımlamışlardır, oksijen transfer şartları ve özellikle çözülmüş oksijen miktarı α -amilaz üretimi için en önemli faktörler olarak rapor edilmiştir. Yüksek havalandırma hızlarının iyi bir enzim verimi için önemli olduğu bulunmuştur. Babu ve Satranayana (1995), havalandırma reaktörlerle maksimum α -amilaz verimine ulaşıldığını belirtmişlerdir.

Bajpai ve ark. (1991) *B. amyloliquefaciens* ile α -amilaz üretimine oksijen transfer koşullarını incelemişler ve yüksek havalandırma hızı kullanılarak optimize edilmiş ortamda çok yüksek α -amilaz verimine ulaşabileceğini ifade etmişlerdir.

Görüldüğü gibi bakterilerden enzim üretimi inkübasyon koşullarının değiştirilmesi ile regüle edilebilmektedir. *Bacillus* türlerinin çok çeşitli özelliklerde olduğunu ve türlere bağlı olarak farklılıklarında olabileceğini göstermektedir.

Bacillus sp. M-10'dan α -amilaz üretimini arttırmak için denediğimiz fiziksel koşulların optimum olan değerleri bir araya getirilerek modifiye bir fiziksel çevre oluşturulmuş ve bu ortamda yapılan üretim sonucunda enzim üretiminde % 42 oranında artış sağlanmıştır.

Çeşitli araştırmacıların yaptığı çalışmalarda ve yaptığımız çalışmada amilaz aktivitesi üzerine sıcaklık, pH, havalandırma, inokülasyon miktarı ve inokülasyon yaşının etkili olduğu görülmüş, bu fiziksel parametrelerin optimum değerlerinin kullanılmasıyla enzim aktivitesinde artış sağlanabileceği belirlenmiştir.

Bu konuda yapılacak kapsamlı çalışmalar sonucunda enzim verimi daha da arttırılabilir ve endüstride kullanım alanı bulabilir. Ayrıca yeni izolatlardan yeni gen havuzları oluşturulabilir.

KAYNAKLAR

- Adams, M.W. 1983.** Enzymes and proteins from organisms that grow near above 100 degrees. *C. Annu Rev. Microbiol.*,47: 627-658.
- Aehle, W., 2004.** Enzymes in industry production and applications. Wiley-VCH, Weinheim. 28: 335-340.
- Afşar, A., 2008.** A research on increasing the effectiveness of degreasing process by using enzymes. *Microbiol.Res.* 45-53.
- Aira, S., Kilal, K., Imanaka, A. 1983.** Cloning and Expression of Thermostable α -Amylase Gene from *Bacillus stearothermophilus* in *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, p:1059-1065.
- Aiyer, P.V. 2005.** Amylases and their applications. *African J. Biotechno.*, 4(13): 1529-1535
- Ajayi, A.O., Fagade, O.E. 2006.** Growth pattern and structural nature of amylases produced by some *Bacillus* species in starchy substrates. *Afr. J. Biotechnol.*, 5(5):440-444.
- Alamri, S.A. 2010.** Isolation, phylogeny and characterization of new α - amylase producing thermophilic *Bacillus* sp. from the Jazan Region, Saudi Arabia. *International Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 6(4): 537-547.
- Aliya, R., Qader, S.A., Anwar, A., Igbal, S., Bano. S. 2007.** Effect of medium composition and time course on the production of alpha-amylase from *Bacillus stearothermophilus*. *Pak. J. Biochem. Mol. Biol.*, 40(2): 51-54.
- Anonymous. 1988.** Handbook of amylases and related enzymes. Edited by the Amylase Research Society of Japan, Permagan Press, Oxford.
- Arda, M. 2000.** Temel mikrobiyoloji: Bakterilerin üremelerine etkili faktörler 9.Bölüm, Medisan Yayinevi, Ankara pp: 1-17.
- Asgher, M., Asad, J.M., Rahman, S.U., Legge R.L. 2007.** A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *Journal of Food Engineering*. 79(3): 950-955.
- Ashnaei, P., Tehrani, S., Ahmadzadeh, M., Behboudi, K. 2007.** Effect of carbon and nitrogen sources on growth and biological efficacy of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* against *Rhizoctonia solani*, the casual agent of bean damping-off. *Commun Agric. Appl. Sci.* 72(4): 951-956.
- Aunstrup, K. 1973.** Industrial production of proteolytic enzymes: Industrial aspects of biochemistry, Ed.: Spencer. B., Federation of European Biochemical Societies. 30(1): 23-46.

Ayhan, K. 2000. Gıdalarda bulunan mikroorganizmalar: Gıda mikrobiyolojisi ve uygulamaları, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölü Yayını, Sim Matbaacılık Ltd., Ankara, s. 43-44.

Bahar, T and Çelebi, S.S. 1998. *Enz. Microb. Technol.* 23:301-304.

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

Bajpai, P. and Bajpai, P.K. 1991. Increased production of thermostable α -amylase enzyme by *Bacillus* sp. TCRDC-25A with maltodextrins. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 31: 159-164.

Banwart, G.J. 1983. Basic food microbiology. Avi. Publishing Company Inc, pp:118-120.

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

Bernfeld, P. 1951. Enzymes of starch degradation and synthesis: *Adv. in Enzymology*, 12: 379-428.

Bilgehan, H. 1987. Klinik mikrobiyoloji. Barış Yayınevi, Bornova, İzmir, 331 s.

Bliesmer, B.O. and Hartman, P.A. 1973. Differential heat stabilities of *Bacillus subtilis* amylases. *J. Bacteriol.*, 113: 526-528.

Borgia, P.T. and Campbell, L.L. 1978. α -Amylase from five strains of *Bacillus amyloliquefaciens*: Evidence for identical primary structures. *J.Bacteriol.*, 134(2): 389-393.

Buchanan, R.E., Gibbons, N.E. 1974. Bergey' s manual of determinative bacteriology eighth edition, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp: 747-842.

Buonocore, V., Caporale, C., Rosa, M.D. and Gambacorta, A. 1976. Stable, inducible thermoacidophilic alpha-amylase from *Bacillus acidocaldarius*. *J. Bacteriol.*, 128(2): 515-521.

Burhan, A., Nisa, U., Gökhan, C., Oemer, C., Ashabil, A., Osman, G. 2003. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. *Process Biochem.*, 38(10): 1397-1403.

Chibata, I. 1980. In food process engineering, Ed: Linko, P. and Larinkari, J., Applied Science Publishers, London, pp: 1-19.

Coleman, G. and Elliot, W.H. 1962. Studies on α -amylase formation by *Bacillus subtilis*. *Biochem. J.*, 83: 256-263.

Colton, C.K. 1996. In molecular biology and biotechnology fourth edition: Trends biotechnology, Ed: Walker, J. M. and Rapley, R., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 454 pp.

- Cordeiro, C.A.M., Martins M.L.L., Luciano A.B. 2002.** Production and properties of α -amylase from thermophilic *Bacillus* sp. *Braz. J. Microbiol.*, 33: 57-61.
- Crabb, W.D. and Mitchinson, C. 1997.** Enzymes involved in the processing of starch to sugars. *Trends in Biotechnol.*, 15: 349-352.
- Çağatay, M. 1976.** Bitki biyokimyası. A.Ü. Ziraat Fak. Yayınları, A.Ü. Basımevi, s: 98-109
- Çotuk, A. 2003.** Genel mikrobiyoloji laboratuar yöntemleri. Nobel Tıp Kitabevleri, 138 s.
- Declerck, N., Machius, M., Wiegand, G., Huber, R., Gaillardin, C. 2000.** Probing structural determinants specifying high thermostability in *Bacillus licheniformis* α -amylase. *J. Mol. Biol.*, 31: 1041-1057.
- Demirkan, E.S., Mikami, B., Adachi, M., Higasa, T. and Utsumi, S. 2005.** α -Amylase from *B. amyloliquefaciens*: purification, characterization, raw starch degradation and expression in *E. coli*. *Process Biochemistry*, 40: 2629-2636.
- Demirkan, E. 2009.** *Bacillus subtilis* α -amilaz enziminin nişasta granüllerine etkisinin taramalı elektron mikroskobu ile incelenmesi. *U.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 23(1): 13-19.
- Dinçbaş, S. 2009.** Alginat kapsüllerinde tutuklanan *Bacillus amyloliquefaciens* α -amylase enziminin farklı nişasta kaynaklarını hidrolizleme yeteneğinin araştırılması. *Yüksek Lisans Tezi*, UÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Bursa.
- Diril, N. 1984.** Alfa-amilaz enzimi üzerinde mutajenlerin etkileri. *Doktora Tezi*, H.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Ankara.
- El-Tayeb, O., Hashem, A., Mohammad, F., Aboulwafa, M. 2001.** Optimization of the industrial production of bacterial alpha amylase in Egypt. II. Role of physiological factors in productivity by two strains of *B. subtilis* and *B. amyloliquefaciens*. *Egypt. J. Biotechnol.*, 10: 23-55.
- El-Tayeb, O., Mohammad, F., Hashem, A., Aboulwafa, M. 2007.** Optimization of the industrial production of bacterial alpha amylase in Egypt. IV. Fermentor production and characterization of the enzyme of two strains of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. *African Jour. Biotechnol.*, 7(24): 4521-4536.
- Fadiloğlu, S., Erkmen, O. 2004.** Gıda sanayinde enzimlerin önemi. Gaziantep Üniversitesi, Bilimsel yayınlar kataloğu, Gaziantep, pp: 1-16.
- Fischer, E.H., Stein E.A., 1961.** Methods in Enzymology, Academic Press, New York, 313 pp.
- Fogarty, W.M. 1983.** Microbial enzymes and biotechnology: Microbial amylases. Applied Science Publisher, pp: 1-92.

Fogarty, W.M., Griffin, P.J., Joyce, A.M. 1974. Enzyme of *Bacillus* species – part 1. *Process Biochem.*, 9: 11-24

Fukara, G. 2007. Bazı ekstrem termofil bakterilerin amilazlarının özelliklerinin belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, AÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara.

Fukumoto, J. 1943. Studies on the production of bacterial amylase. I. Isolation of bacteria secreting potent amylases and their distribution in Japanese. *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, 19: 487-503

Gessese, A. 1999. Purification and characterization of two raw-starch-digesting thermostable α -amylase from a thermophilic *Bacillus*. *Enzyme microbial technology*, 25: 433-438.

Goodfellow, G., Herrera, G., Garcia, M.T., Pena, M. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th edition, Ed.: Williams and Wilkins, London, England, 787 pp.

Gözükara, E.M. 2001. Biyokimya. Nobel Tıp Kitabevleri, Türkiye, s. 225-227.

Grootegoed, J.E., Lauwers, A.M and Heinen, W. 1973. Separation and partial purification of extracellular amylase and protease from *Bacillus caldolyticus*. *Arch. Microbiol.*, 90: 223-232.

Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K. and Chauhan, B. 2003. Microbiyal α -amylases: A Biotechnological Perspective. *Process Biochem.*, 38: 1599-1616.

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

Haq, I., Ashraf, H., Qadeer, M.A. and Iqbal, J. 2003. Production of the alpha amylase by *Bacillus licheniformis* using an economical medium. *Bioresource Technology*, 87(1): 57-61.

Henrissat, B. and Bairoch, A. 1996. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.*, 280: 309-316.

Hidaka, H. and Adachi, T. 1980. Mechanism of saccharide polymerization and depolymerization, Ed: Marshall, J.J., Academic Pres., New York, 101 pp.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Ninth Edition, 559 pp.

Ingle, M.R., Erickson, R.J. 1978. Bacterial alpha-amylases. *Adv. Applied Microbiol.*, 24: 257-278.

- Ivanova, V.N., Dobрева, E.P, Emanuilova, E.I. 1993.** Purification and characterization of thermostable alpha-amylase from *Bacillus licheniformis*. *Journal of biotechnology*, 28(2-3): 277-289.
- James, E.B., David, F.O. 1986.** Biochemical engineering fundamentals. McGraw Hill Book. Company 2nd, pp: 157-175.
- Jia, S., Choe, Y.D., Cho, H. 2008.** Isolation and identification of *Bacillus megaterium* producing alkaline α -amylase. *Dpbia.*, pp: 25-31.
- Jin F., Cheng, X., Shi Y., Zhang, C., 1990.** Isolation of new thermophilic aerobic bacteria which produce thermostable α -amylase. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 36: 415-424.
- Jogezai, N., Raza, A., Abbas, F., 2011.** Optimization of cultural conditions for microbial alpha amylase production. *Journal of Microbiology and Antimicrobials.*, 3(9):221-227.
- Kanno, M. 1986.** A *Bacillus acidocaldarius* α -amylase that is highly stable to heat under acidic conditions. *Agric. Biol. Chem.*, 50(1): 23-31.
- Karmakar, S.R. 1999.** Chemical technology in the pretreatment process of textiles. Elsevier Science B.V., pp: 18-24.
- Kathiresan, K., Manivannan, S. 2006.** α -Amylase production by *Penicillium fellutanum* isolated from mangrove rhizosphere soil. *African J. Biotechnol.*, 5(10): 829-832.
- Kasavi, C. 2006.** Kovalent bağlanma ve fiziksel adsorbsiyon metodları ile proteaz enziminin immobilizasyonu. *Yüksek Lisans Tezi*, İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, İstanbul.
- Keskin, H. 1982.** Besin Kimyası: Cilt II. Fatih Yayınevi, İstanbul, 558 s.
- Kıran, Ö.E., Çömlekçioğlu, U., Dostbil, N. 2006.** Bazı Mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları. *KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9(1): 12-19
- Kindle, K.L. 1983.** Characterization and production of thermostable α -amylase. *Appl. Biochem. Biotech.*, 18: 153-170.
- Koivula, T.T., Hemila, H., Pakkanen, R., Sibakov, M. and Palva, I. 1993.** Cloning and sequencing of a gene encoding acidophilic amylase from *Bacillus acidocaldarius*. *J. Gen. Microbiol.*, 139: 2399-2407.
- Konsula, Z. and Iiakopoulou-Kyriakides, M., 2004.** Hydrolysis of starches by the action of α -amylase from *Bacillus subtilis*. *Process Biochem.*, 39: 1745-1749.

Krishna, C. and Chandrasekaran, M. 1996. Banana waste as substrate for α -amylase production by *Bacillus subtilis* BTK (106): Solid State Fermentation Applied. *Microbiol. Biotechnol.*, 46: 106–11

Kumar, S.U., Rehana, F. and Nand, K. 1990. Production of an extracellular thermostable calcium-inhibited α -amylase by *Bacillus licheniformis* MY 10. *Enzyme Microb. Technol.*, 12: 714-716.

Lane, A.G. and Pirt, S.J. 1973. Production of cyclodextrin glycoyltransferase by batch and chemostat cultures of *Bacillus macerans* in chemically defined medium. *J.Appl. Hem. Biotech.*, 23: 309-321.

Lee, B.H. 1996. Fundamentals of Biotechnology. VCH Publishers, USA, 431 pp.

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

Lennette, E.H., Balows, A., Hausler, J.W.JR., Shadomy, J.H. 1985. Manual of clinical microbiology. USA, 1149 pp.

MacGregor, E.A., Janecek, S. and Svensson, B. 2001. Relationship of sequence and structure to specificity in the α -amylase family of enzymes. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1546: 1-20.

MacGregor, E.A. 2005. An overview of clan GH-H and distantly-related families. *Biologia*, Bratislava, 60: 5-12.

Mamo, G., Gessesse, A. 1999. Effect of cultivation conditions on growth and α -amylase production by a thermophilic *Bacillus sp.* *Letter in Applied Microbiology*, 29: 61-65.

Mahler, H.R. and Cordes, E.H. 1966. Biological chemistry: The mechanism of enzyme action. Dept. Of Chemistry, Indiana University, 279 pp.

Manning, G.B. and Campbell, L.L. 1961. Thermostable α -amylase of *Bacillus stearothermophilus*. *J.Biol. Chem.*, 236(11): 2952-2957.

Matsuzaki, H., Yamane, K., Yamaguchi, K., Nagata, K. and Marou, B. 1974. Hybrid α -amylases produced by transformants of *Bacillus subtilis*. I Purification and characterization of extracellular α -amylases produced by the parental strains and transformants. *Biochim. Biophys. Acta.*, 365: 235-247.

Meer, J.L. 1972. The regulation of α -amylase production in *Bacillus licheniformis*. Antonie van Leuwenhoek: *J. Microb. Serol.*, 38: 570-585.

Mikami, B., Hehre, E.J., Sato, M., Katsube, Y., Hirose, M., Morita, Y. and Sacchettini, J.C. 1993. The 2.0 Å resolution structure of soybean β -amylase complexed with α -cyclodextrin. *Biochemistry*, 32: 6832-6845.

Milner, J. A., Martin, J. D. and Smith, A., 1996. Oxygen transfer conditions in the production of α -amylase by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Enzyme Microb. Technology*, 18: 507-512.

Nadeem, M., Qazi, J.I, Baig, S., Syed, Q. 2008. Effect of medium composition on commercially important alkaline protease production bu *Bacillus licheniformis* N-246. *Turk J. Biochem.*, 32: 171-177.

Ogasahara, K., Imanishi, A. And Isemura, T. 1970. Studies on thermophilic α -amylase from *Bacillus stearothermophilus*. I. Some general and physiochemical properties of thermophilic α -amylase., *J.Biochem.*, 67: 65-75.

Oguntimehin, G.B. 1998. Growth of and amylase production by *Bacillus licheniformis* isolated from cassava processing waste. *Nig. Food J.* 11: 58-67.

Ottrup, H., Jorgensen, S.T., 2002. The importance of *Bacillus* species in the production of industrial enzymes: Applications and systems of *Bacillus* and relatives, Ed., Berkley, R., Blackwell Science, Malden, Mass, pp: 206-208.

Oyeleke, S.B. and Oduwole, A.A. 2009. Production of amylase by bacteria isolated from a cassava waste dumpsite in Minna, Niger State, Nigeria. *African Journal of Microbiology Research*, 3(4): 143-146.

Özer, K. 2003. Ekmeğe dair. Tüketiciler Birliği Basını.

Özkaya-Durlu, F. 2000. Gıda mikrobiyolojisi ve uygulamaları. Armoni Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara, 358 s.

Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C.R., Soccol, V.T., Singh, D., Mohan, R. 2000. Advances in microbial amylases. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 31: 135-152.

Pazur, H.H. 1965. Starch chemitry and yechnology. Academic Pres, New York, 133 pp.

Polaina, J. and MacCabe, A.P. 2007. Industrial enzymes: Structure, function and applications. Springer, The Netherlands, 641 pp.

Poonam, N. and Dalel, S. 1995. Enzyme and microbial systems involved in starc processing. *Enzyme Microb. Technol.*, 17: 770-778.

Priest, F.G. 1987. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriol. Rev.*, 41(3): 711-753.

Qader, S.A., Bano, S., Aman, A., Syed, N., Azhar, A. 2006. Enhanced production and extracellular activity of commercially important amylolytic enzyme by a newly isolated strain of *Bacillus sp.* AS-1. *Turk J. Biochem.*, 31(3): 135-140.

Radley, J.A. 1976. Production Of Microbial Amylolytic Enzymes: Starch Production

Technology ,Ed.: Underkofler, L.A., Aplied Science Publishers Ltd. Ripple Road, England, pp: 295-309

Rao, M., Tankasale, A., Ghatge, M., Desphande, V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62: 597-634.

Ray, R.C., Kar, S., Nayak, S., Swain, M.R. 2008. Extracellular α -amylase production by *Bacillus brevis* MTCC 7521. *Food Biotechnology*, 22(3): 234-246.

Razak, C.N.A., Tang, S.W., Basri, M. And Salleh, A.B. 1997. Preliminary study on the production of extracellullar protease from a newly isolated *Bacillus* sp. (No.1) and the physical factors affecting its production. *Pertanika J. Sci. & Technol.*, 5(2): 169-177.

Saito, N., 1973. A thermophilic extracellular α -amylase from *Bacillus licheniformis*. *Arc. Biochem. Biophy.*, 155: 290-298.

Sajedi, R.H., Naderi-Manesh, H., Khajeh, K., Ahmadvand, R., Ranjbar, B., Asoodeh, A., Moradian, F. 2005. A Ca-independent α -amylase that is active and stable at low pH from *Bacillus* sp. KR-8104. *Enzyme and Microb. Technol.*, 36: 666-671.

Samrot, A.V., Vijay, A. 2009. α -Amylase activity of wild and mutant strains of *Bacillus* sp. *The Internet Journal of Microbiology*, Volume (6), Number 2.

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

Sarıkaya, E. and Gurgun, V. 2000. Increase of the α -amylase yield by some *Bacillus* strains. *Turkey J. Biol.*, 24: 299-308.

Saxena, K.R., Dutt, K. and Nayyar, P., 2007. A highly and thermostable alkaline α -amylase from a *Bacillus* sp. PN5. *Biores. Techno.*, 98: 260-265.

Schallmeyer, M., Singh, A., Ward, O.P. 2004. Development in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiol.*, 50: 1-17.

Selen, V. 2006. *Bacillus amyloliquefaciens* ile α -amilaz üretiminin katı substrat fermentasyonu ile incelenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Elazığ.

Sevim, E.Ç., Karaoğlu, Ş.A., Sevim, A., Özgümüş, O.B. 2006. İçme sularından izole edilen *Bacillus* suşlarının identifikasyonu ve antibiyotiklere direnç profilleri. *Türk Mikrobiyol. Cem. Derg.*, 36(4): 219-223

Shafee, N., Aris, S.N., Rahman, R.N.Z.A., Basri, M. and Salleh, A.B. 2005. Optimization of Environmental and Nutritional Conditions for the Production of

Alkaline Protease by a Newly Isolated Bacterium *Bacillus cereus* Strain 146. *Journal of Applied Sciences Research*, 1(1): 1-8.

Sharma, A., Bardhan, D. and Patel, R. 2009. Optimization of Physical parameters for lipase production from *Arthrobacter* sp. BGCC#490. *Indian J. Biochem. & Biophysics*, 46: 178-183.

Shatta, A.M., El-Hamahmy, A.F., Ahmed, F.H., İbrahim, M.M.K., Arafa, M.A.I 1990. The influence of certain nutritional and environmental factors on the production of amylase enzyme by *Streptomyces aureofaciens* 77. *Journal of Islamic Academy of Sciences*, 3(2): 134-138.

Shindhu, G.S., Sharma, P., Chakrabarti, T., Gupta, J.K. 1997. Strain improvement for the production of a thermostable α -amylase. *Enzyme Microb. Technol.*, 24: 584-589.

Sivak, M.N., and Preiss, J. 1998. Starch: *Basic Science to Biotechnology*, 41:163-170.

Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nanpothiri, K.M., Soccol, C.R. and Pandey, A. 2006. α -Amylases from microbial sources. *Food Technol. Biotechnol.*, 44(2): 173-184.

Stein, E.A. and Fischer, E.H. 1958. The resistance of α -amylases to words proteolytic attach. *J.Biol. Chem.*, 232: 867-869.

Sudharhsan, S., Senthilkumar, S. And Ranjith, K. 2007. Physical and nutritional factors affecting the production of amylase from species of bacillus isolated from spoiled food waste. *African Journal of Biotechnology*, 6(4): 430-435.

Tanaka, A. And Hoshino, E. 2002. Calcium-binding parameter of *Bacillus amyloliquefaciens* α -amylase determined by inactivation kinetics. *Biochem. J.*, 364: 635-639.

Temiz, A. 1994. Genel mikrobiyoloji uygulama teknikleri. Ankara, s. 26-120.

Teodoro, C.E. and Martins, M.L. 2000. Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus* sp.. *Brazi. J. Microb.*, 31: 28-32.

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

Topal, Ş., Pembeci, C., Borcaklı, M. 2000. Türkiye'nin tarımsal mikoflorasının endüstriyel öneme sahip bazı enzimatik aktivitelerinin incelenmesi-I: Amilaz, Proteaz, Lipaz. *Turk. J. Biol.* 24: 79-93.

Uhlig, H. 1988. Industrial enzymes and their applications. John Wiley and Sons Inc., New york, USA, 454 pp.

Üstünes, H. ve Güvenç, U. 1985. Bira ve alkol üretiminde kullanılan bazı enzimlerin mikrobiyal yolla eldesi. *Ege Üniversitesi Müh. Fak. Dergisi*, 3(1): 85-101.

Vihinen, M., Mantsala, P. 1990. Characterization of a thermostable *Bacillus stearothermophilus* alpha-amylase. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 12: 427-435.

Windish, W.W. and Mhatre, N.S. 1965. Microbial amylase. *Adv. Appl. Microbiol.*, 7: 273-304.

Wiseman, A. 1987. Handbook of Enzymes Biotechnology. Second Edition. Chapter 3: The Application of Enzymes in Industry, pp: 274-373.

Wolfgang, A. 2007. Enzyme in industry: Productions and applications. Thirdh Completely Revised Edition. Wiley –VCH Pres., 489 pp.

Yoo, Y.J., Hong, J. and Hatch, R.T. 1987. Comparison of α -amylase activities from different assay methods. *Biotech. Bioengn.*, 30(1): 147-151.

Zakaria, A.Q. 2006. Production and charcaterization of thermostable α -amylase by thermophilic *Geobacillus stearothermophilus*. *J. Biotechnol.*, 1: 850-857.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Merve Başkurt

Doğum Yeri ve Tarihi : Bursa – 19.09.1986

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Bursa Anadolu Lisesi – 2000/2004

Lisans : Eskişehir Osmangazi Üniversitesi – 2004/2008

Yüksek Lisans : Uludağ Üniversitesi – 2010/2012

Çalıştığı Kurum : İşkur - 2012

İletişim (e-posta) : mervebaskurt@hotmail.com

Yayınları : _____