

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mustafa KIRSEVEN

***Clostridium*' LARDAN ÜRETİLEN AMİLAZIN KAREKTERİZASYONU
VE BİYOGAZ VERİMLİLİĞİ ÜZERİNE ETKİSİ**

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA - 2020

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Clostridium'* LARDAN ÜRETİLEN AMİLAZIN KAREKTERİZASYONU
VE BİYOGAZ VERİMLİLİĞİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Mustafa KIRSEVEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 31/01/2020 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Prof. Dr. Osman GÜLNAZ
DANIŞMAN

.....
Prof. Dr. Fatih MATYAR
ÜYE

.....
Doç. Dr. Nebil YÜCEL
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Biyoteknoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

**Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü**

**Bu Çalışma, Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FYL -2018-10543**

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Clostridium*' LARDAN ÜRETİLEN AMİLAZIN KAREKTERİZASYONU VE BİYOGAZ VERİMLİLİĞİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Mustafa KIRSEVEN

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

Danışman : Prof. Dr. Osman GÜLNAZ
Yıl: 2020, Sayfa: 49
Jüri : Prof. Dr. Osman GÜLNAZ
: Prof. Dr. Fatih MATYAR
: Doç. Dr. Nebil YÜCEL

Bu çalışmada katı atık düzenli depolama tesisinden izole edilen *Clostridium* sp. kullanılarak amilaz üretimi ve amilaz aktivitesi üzerine sıcaklık, pH, substrat konsantrasyonunun etkisi belirlenmiş ve üretilen enzimin nişasta içerikli atık sularda biyogaz üretimi etkisi çalışılmıştır.

Çalışmada izole edilen bakterinin üreme sıcaklığı 37°C olup mezofiliktir. Enzimatik aktivite üzerine sıcaklığın etkisi 30-80°C ve pH' ın etkisi 3.0-8.0 arasında çalışılmıştır. Enzimin çalıştığı optimum sıcaklık 30°C ve pH 6.0 olarak belirlenmiştir. Zamana bağlı olarak yapılan enzimatik hidroliz çalışmasında 8 saat sonra açığa çıkan indirgen şeker oranı 3.65 mg/mL olup, bir saatte açığa çıkan şeker oranından 4.38 kat daha fazladır. Substrat konsantrasyonunun etkisi % 0.5, 0.75, 1 ve 2 nişasta konsantrasyonunda belirlenmiş ve substrat konsantrasyonu iki katına çıktığında açığa çıkan indirgen şeker oranı %39 artmıştır.

Biyogaz üretimi üzerine enzim kullanılmasının etkisi 37°C sıcaklıkta belirlenmiş ve enzim kullanılmayan kontrol grubunda 3400 mL biyogaz üretilirken enzim eklenen deney grubunda ise 3670 mL %55 CH₄, % 44 CO₂ gazından oluşan biyogaz üretilmiştir. Enzim eklenmesinin %7.3 daha fazla biyogaz üretimi sağladığı belirlenmiştir. Biyogaz üretimi kontrol grubuna göre 4 gün daha önce dengeye ulaşmıştır.

Bu çalışmada anaerob *Clostridium* sp. 'den izole edilen amilaz mezofilik biyogaz sistemlerinde kullanılabilecek bir enzimdir.

Anahtar Kelimeler: *Clostridium* sp., Biyogaz, Amilaz, Enzim Aktivitesi

ABSTRACT

MSc THESIS

CHARACTERIZATION OF AMYLASE PRODUCED FROM *Clostridium* ON BIOGAS EFFICIENCY

Mustafa KIRSEVEN

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Supervisor : Prof. Dr. Osman GÜLNAZ
Year: 2020, Page: 49
Jury : Prof. Dr. Osman GÜLNAZ
: Prof. Dr. Fatih MATYAR
: Assoc. Prof. Dr. Nebil YUCEL

In this study, *Clostridium* sp. The amylase enzyme was produced and the temperature, pH and substrate concentration were determined on the enzyme activity and the effect of the produced enzyme on biogas production in starch-containing wastewater was determined.

The reproductive temperature of the bacteria isolated in the study is 37 ° C and is mesophilic. The effect of temperature on enzymatic activity has been determined between 30-80°C and pH 'between 3.0-8.0. The optimum temperature at which the enzyme works was determined as 30°C and pH 6.0. In the enzymatic hydrolysis study, which was performed depending on time, the rate of indirect sugar released after 8 hours is 3.65 mg / mL, which is 4.38 times higher than the rate of sugar released in one hour. The effect of the substrate concentration was determined at 0.5, 0.75, 1 and 2 starch concentrations, and when the substrate concentration doubled, the reducing sugar content increased by 39%.

The effect of using enzyme on biogas production was determined at 37°C and 3400 mL biogas was produced in the control group without enzyme, whereas 3670 mL 55% CH₄ and 44% CO₂ gas were produced in the experimental group. It has been determined that the addition of enzyme provides 7.3% more biogas production. Biogas production reached equilibrium 4 days earlier than the control group.

In this study, anaerob *Clostridium* sp. It can be said that the amylase isolated from bacteria can be used in biogas systems.

Keywords: *Clostridium* sp., Biogas, Amylase, Enzyme Activity

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Nişasta bitkisel karbonhidratlar arasında hayvan ve insani tüketim amaçlı kullanılan önemli enerji kaynaklarından olup, selülozdan sonra ikinci sırayı almaktadır. Mısır, buğday ve pirinç gibi tahıl ürünlerinin temel karbonhidrat bileşeni olan nişasta, glikoz monomerlerinin α -1, 4-glikozidik bağlar ile bağlanmış olduğu bir polimerik yapıdır. İnsanlar, hayvanlar ve doğada birçok canlının temel gıda kaynağı olan nişasta önemli bir karbonhidrattır. Bitkiler tarafından fotosentez sonucunda sentezlenen nişasta yenilenebilir bir üründür.

Nişasta iki farklı temel yapıdan oluşmaktadır. Bunlardan birincisi doğrusal zincir şeklinde α -1,4-bağlı glukanolardan oluşan amiloz, ikinci temel yapı doğrusal zincire α -1,6 bağlarıyla bağlanmış dallanmış yapıda olan amilopektindir.

Amilazlar gıda, tekstil, deterjan, kağıt endüstrilerinde ve nişasta işlemede yaygın olarak kullanılmaktadır. Günümüzde mısır kullanılarak yapılan biyoetanol üretiminde kullanılan mayaların nişastayı parçalama yeteneklerinin olmaması nedeniyle, biyoetanol üretiminde nişastanın parçalanması için amilaz kullanılmaktadır.

Çalışmada toplamda 6 bakteri izole edilmiş bunlardan 4 tanesi 55°C'de 2 tanesi 37°C'de üremiştir. İzole edilen bu bakterilerden katı besiyerinde amilaz aktivitesi gösteren 2 tanesi 37°C'de üremiştir. İki bakteri BD anaerob bakteri tanımlama test kitleri kullanılarak tanımlanmış ve bakterilerden bir tanesi *Clostridium acetobutylicum* olarak diğeri *Clostridium sp.* olarak tanımlanmıştır.

Çalışmada izole edilen ve 37°C'de amilaz pozitif olan bakterilerin amilaz aktivite testleri nişastalı katı besiyerinde belirlenmiştir. *Clostridium sp.* kullanılarak amilaz besiyerinde enzim üretimi yapılmıştır.

Çalışmada kullanılan bakterinin üreme sıcaklığı 37°C olup mezofiliktir. Yapılan sıcaklık denemeleri içinde 30°C sıcaklık enzim aktivitesinin en iyi olduğu sıcaklık olarak belirlenmiştir. Enzim aktivitesi bu sıcaklıkta pH'a bağlı olarak

değişiklik göstermiş ve maksimum enzim aktivitesinin olduğu pH değeride 6.0 olarak belirlenmiştir. pH 4.0, 5.0, 7.0 ve 8.0 de enzim aktivitesi düşük olup, pH 6'daki aktivite değeri ile karşılaştırıldığında pH 6.0'ya göre pH 4.0, 5.0, 7.0 ve 8.0'de sırası ile %16, %14.7, %19 ve %27 daha düşük aktivite belirlenmiştir.

Zamana bağlı olarak yapılan enzimatik hidroliz çalışmasında 8 saat sonra parçalanen nişastadan açığa çıkan indirgen şeker oranı sabitlenmiştir. Çalışma sonunda açığa çıkan indirgen şeker oranı 3.65 mg/mL olup, bu değer 1. saatte açığa çıkan şeker oranı ile karşılaştırıldığında (0.833 mg/mL) 12 saate açığa çıkan indirgen şeker oranı 4.38 kat daha fazladır. Substrat konsantrasyonu %0.5, 0.75, 1 ve 2 nişasta olarak yapılan çalışmada, 1 saat süre sonunda enzimatik hidroliz ile açığa çıkan indirgen şeker oranları sırası ile 0.73, 0.74, 0.83 ve 1.16 mg/mL olarak belirlenmiştir. Substrat konsantrasyonu yarıya indiğinde açığa çıkan indirgen şeker oranı %12 düşerken, substrat konsantrasyonu iki katına çıktığında açığa çıkan indirgen şeker oranı %39 artmıştır.

Biyogaz üretimi üzerine enzim kullanılmasının etkisi 37°C sıcaklıkta yapılan çalışmada 12. günde enzim bulunmayan kontrol grubunda 3400 mL %55 CH₄, %44 CO₂ gazından oluşan biyogaz üretilmiştir. Enzim eklenen deney grubunda ise 3670 mL %55 CH₄, %44 CO₂ gazından oluşan biyogaz üretilmiştir. Enzim eklemenin üretilen gaz miktarı üzerine etkisi 270 mL fazla olup enzim eklenmesiyle 37°C sıcaklıkta %7.3 fazla biyogaz üretimi gerçekleşmiştir. Biyogaz üretimi üzerindeki %7.3'lük farkın yanı sıra, Şekil 4.13'de görüldüğü gibi enzim eklenen sistemde biyogazın oluşum hızı, enzim eklenmeyen sisteme göre daha hızlıdır. Biyogaz üretimi enzim eklenen sistemde 8. günde dengeye ulaşmış ve kontrol grubuna göre 4 gün daha kısa sürede biyogaz üretimi gerçekleşmiştir.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam esnasında her konuda bilgi ve önerileri ile bana yol gösteren, gelişimim yönünde büyük emek sarf eden danışman hocam sayın Prof. Dr. Osman GÜLNAZ' a sonsuz teşekkürlerimi arz ederim.

Yüksek lisans eğitimine başladığım andan bu yana laboratuvarında yaptığım deneysel çalışmalarında ve tez yazımım esnasındaki yardımlarından dolayı yüksek lisans arkadaşım Ahmet Sait YILMAZ' a teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim esnasında gerek izin konusunda, gerekse manevi olarak motive edici konuşmalarıyla desteklerini esirgemeyen müdürüm sayın Engin ARSLAN' a teşekkür ederim.

Cesaretlendiren ve destekleyici konuşmaları ile beni motive eden lisans eğitimimden beri tanıdığım dostum Hasan Cankut ERGÜN' e teşekkür ederim.

Şuan hayatta olmayan, eğitim hayatımdaki desteğini hayatım boyunca unutamayacağım Mahmut BEREKETOĞLU' nın hatırasına saygılarımla, teşekkür ederim.

Bedenen olamadıklarında bile her zaman yanımda olduklarını bildiğim kardeşlerim Ekrem ile Emrehan KIRSEVEN' e çok teşekkür ederim.

Hayatımda bir an bile desteklerini benden esirgemeyen, gölgelerini her an üzerimde hissettiğim varlıkları ile bana güç veren ve beni bu günlere getiren çocukları olmaktan gurur duyduğum babam Hamza KIRSEVEN, annem Fadime KIRSEVEN' e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XII
SİMGE VE KISALTMALAR	XIV
1. GİRİŞ	1
1.1. Bitkisel Polisakkaritler.....	2
1.1.1. Nişasta	2
1.1.2. Amiloz	3
1.1.3. Amilopektin.....	3
1.2. Amilolitik Enzimler	4
1.3. Nişastanın Endüstriyel Uygulamaları	7
1.4. Endüstrilerde Mikrobiyal Amilaz Kullanımı	7
1.5. <i>Clostridium</i> Cinsi.....	9
1.5.1. <i>Clostridium</i> Türlerinde Amilolitik Enzimler	9
1.6. Çalışmanın Amacı	10
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	11
3. MATERYAL VE METOD	15
3.1. Materyal	15
3.1.1. Katı Atık Örnekleri	15
3.1.2. RCM Agar (Reinforced <i>Clostridial</i> Medium).....	15
3.1.3. Brewer Anaerobik Agar	16
3.1.4. Amilaz Besiyeri.....	17
3.1.5. Amilaz Kullanımının Biyogaz Üretimine Etkisi	17

3.1.6. Sodyum Fosfat Tamponu (100 mM, pH 7.0).....	18
3.1.7. Dinitro Salisilik Asit Çözeltisi (DNS).....	18
3.1.8. Sitrat Tamponu.....	18
3.1.9. Sodyum-Fosfat Tamponu.....	19
3.2. Metod	20
3.2.1. Anaerob Bakterilerin İzolasyonu	20
3.2.2. Enzim Aktivitesi	20
3.2.3. Enzim Üretimi ve İzolasyonu.....	21
3.2.4. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	21
3.2.5. Enzim Aktivitesi Üzerine pH Etkisi.....	22
3.2.6. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	23
3.2.7. Zamana Bağlı Enzimin Aktivitesi	23
3.2.8. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonun Etkisi.....	23
3.2.9. Enzimin Biyogaz Verimliliği Üzerine Etkisi	24
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	25
4.1. Bakteri İzolasyon Sonuçları.....	25
4.2. Enzim İzolasyonu ve Enzim Aktivite Sonuçları	26
4.3. Sıcaklık ve pH'ın Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	28
4.3.1. 30°C Sıcaklıkta Enzim Aktivitesi.....	29
4.3.2. 40°C Sıcaklıkta Enzim Aktivitesi.....	30
4.3.3. 50°C Sıcaklıkta Enzim Aktivitesi.....	31
4.3.4. 60°C Sıcaklıkta Enzim Aktivitesi.....	32
4.3.5. 70°C Sıcaklıkta Enzim Aktivitesi.....	33
4.3.6. 80°C Sıcaklıkta Enzim Aktivitesi.....	34
4.4. Zamana ve Substrat Konsantrasyonuna Bağlı Enzim Aktivitesi	35
4.5. Biyogaz Sisteminde Enzim Uygulaması.....	37
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	41
KAYNAKLAR	43

ÖZGEÇMİŞ.....	49
---------------	----





ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 3.1. Sitrat Tampon Çözeltisi	19
Çizelge 3.2. Fosfat Tamponu Çözeltisinin Hazırlanması.....	19





ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 1.1. Nişastanın Amiloz Yapısı	3
Şekil 1.2. Nişastanın Amilopektin Yapısı	4
Şekil 1.3. Nişastanın Enzimatik Parçalanması (Antranikian, 1991)	6
Şekil 3.1. Glikoz Standart Eğrisi	22
Şekil 4.1. Amilaz Aktivitesi Olan <i>Clostridium</i> sp. Gram Boyama	26
Şekil 4.2. <i>Clostridium</i> sp.' in Nişastalı Besiyerinde Enzim Aktivitesi	27
Şekil 4.3. Üretilen Enzimin Aktivite Testi	28
Şekil 4.4. 30°C Sıcaklıkta pH 4.0-8.0 Arasında Enzim Aktivitesi	29
Şekil 4.5. 40°C Sıcaklıkta pH 4.0-8.0 Arasında Enzim Aktivitesi	30
Şekil 4.6. 50°C Sıcaklıkta pH 4.0-8.0 Arasında Enzim Aktivitesi	31
Şekil 4.7. 60°C Sıcaklıkta pH 4.0-8.0 Arasında Enzim Aktivitesi	32
Şekil 4.8. 70°C Sıcaklıkta pH 4.0-8.0 Arasında Enzim Aktivitesi	33
Şekil 4.9. 80°C Sıcaklıkta pH 4.0-8.0 Arasında Enzim Aktivitesi	34
Şekil 4.10. Zamana Bağlı Enzim Aktivitesi	36
Şekil 4.11. Konsantrasyona Bağlı Enzim Aktivitesi	37
Şekil 4.12. Enzim Uygulamasının Üretimine Etkisi	38



SİMGE VE KISALTMALAR

°C	: Santigrat Derece
ABE	: Aseton Bütanol ve Etanol Üretimi
ÇOM	: Çözünmüş Organik Madde
dev.	: Devir
DNS	: Dinitrosalisilik asit
g	: Gram
L	: Litre
M	: Molar
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
RCM	: Reinforced <i>Clostridial</i> Medium
rpm	: Dakikadaki Dönüş Sayısı
sp.	: Tür
VS.	: Uçucu Katı Madde
α	: Alfa
β	: Beta



1. GİRİŞ

Biyokimyasal reaksiyonlarda görev alan metabolizmayı düzenleyen biyolojik katalizörlere enzim denilmektedir. Enzimler girdikleri kimyasal reaksiyonların hızını değiştirip kendileri reaksiyonlardan değişikliğe uğramadan çıkarlar. Eski çağlardan bu yana enzimler; peynir, maya, bira, şarap ve sirke gibi gıda alanında kullanıldığı gibi deri ve keten üretiminde de yaygın olarak kullanılmaktaydı. Enzim endüstrisi modern biyoteknoloji sayesinde günümüzde hızla gelişmekte ve ilerlemektedir. Rekombinant gen teknolojileri enzim üretim süreçlerini kısaltmış ve ticari olarak enzimlerin kullanımını arttırmıştır. Günümüzde hayatın her alanında yer almakta olan enzimler, endüstride de yaygın olarak kullanılmaktadır. Günümüzde kullanılan endüstriyel enzimlerin çoğu hidrolitik aktivite gösteren enzimler olup, bunlar arasında amilaz kullanım oranı %25 ile oldukça yüksektir. (Sidhu ve ark, 1997; Rao ve ark,1998). Proteazlar, süt ve süt endüstrisinde yaygın olarak kullanılırken, nişasta, tekstil, deterjan ve pastacılık alanlarında amilazlar ve selülozlar yaygın olarak kullanılmaktadır (Godfrey ve West, 1996).

Yakıt olarak alkol üretiminde nişastadan fermente edilebilir şeker elde etme için amilaz kullanılmaktadır. Özellikle mısır taneleri kullanılarak biyoetanol üretiminde amilaz kullanılmaktadır (Zaldivar ve ark., 2001). Yüksek fruktozlu mısır şurubu üretiminde kullanılan amilazlar gıda sektöründe büyük öneme sahiptirler. Amilazlar nişastayı oligo-maltodekstrinlere parçalarlar ancak bu işlem için sıcaklık gerekmektedir. Bu nedenle kullanılan enzimin sıcaklık ve pH toleransının olması gerekmektedir (Shaw ve ark., 1999).

Ekstremofilik enzimler endüstriyel alanda kullanım kolaylığı, sıcaklık, basınç, pH ve tuzluluk gibi ekstrem şartlarda gösterdikleri aktivitelerinden dolayı endüstriyel alanda kullanımlarda tercih sebebi olmaktadır (Aehle, 2007). Mezofilik enzimlerin kullanım alanı oldukça sınırlıdır.

Nişasta bitkisel karbonhidratlar arasında hayvan ve insani tüketim amaçlı kullanılan önemli enerji kaynaklarından olup, selülozdan sonra ikinci sırayı almaktadır. En önemli nişasta kaynakları arasında mısır, buğday ve patates sayılmaktadır (Buchholz ve Seibel, 2008).

1.1. Bitkisel Polisakkaritler

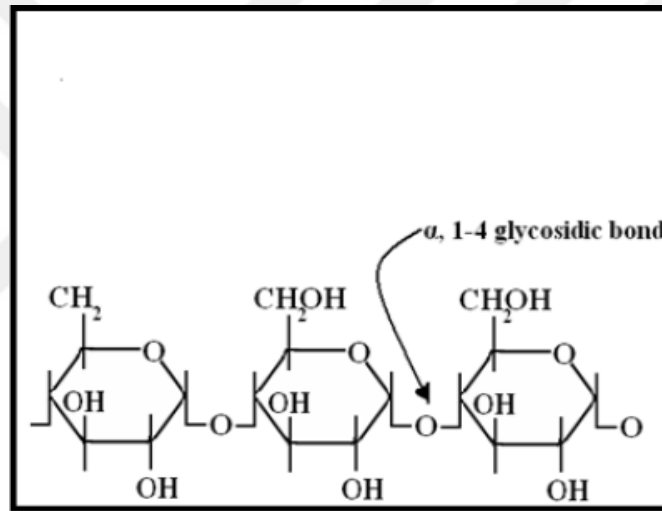
Polisakkaritler doğada en bol bulunan karbonhidratlardır ve enerji depolama ile bitki hücre duvarlarının bileşenlerini oluştururlar. Polisakkaritler, glikozidik bağlarla birleştirilmiş binlerce monosakkaritten oluşan çok büyük polimerlerdir. En bol bulunan üç polisakkarit, nişasta, glikojen ve selülozdur. Bu üçüne homopolimerler denir, çünkü her biri tam hidrolizden sonra sadece tek tip monosakkarit (glikoz) verir. Heteropolimerler (pektin), monosakkaritlere ek olarak şeker asitleri, amino şekerler veya karbonhidrat olmayan maddeler içerebilir. Polisakkaritler indirgenmeyen karbonhidratlardır ve tadı yoktur (Ochoa-Villarreal ve ark., 2012).

1.1.1. Nişasta

Mısır, buğday, pirinç gibi tahıl ürünlerinin temel karbonhidrat bileşeni olan nişasta, glikoz monomerlerinin α -1, 4-glikozidik bağlar ile bağlanmış olduğu bir polimerik yapıdır. İnsanlar, hayvanlar ve doğada birçok canlının temel gıda kaynağı olan nişasta önemli bir karbonhidrattır. Bitkiler tarafından fotosentez sonucunda sentezlenen nişasta yenilenebilir bir üründür. Nişasta, bitkilerin karanlık devre reaksiyonlarında plastidler içinde depolanmakta ve bazı alglerde fitoglikojen şeklinde depolanmaktadır (El-Fallal ve ark., 2012). Nişasta molekülleri sulu çözelti hazırlanarak ısıtıldıklarında şişmektedirler. Nişasta birçok sanayide gıdaların temel yapısını oluşturduğu gibi kıvam arttırıcı, jelleştirici, dolgu malzemesi ve su tutucu gibi amaçlarla yaygın olarak kullanılmaktadır (Mojsov, 2012).

1.1.2. Amiloz

Nişastanın Amiloz yapısı α -1, 4-glikozidik bağlar ile bağlanmış yaklaşık 6.000 glikoz molekülünden oluşur. Nişastanın amiloz yapısı genel olarak nişasta molekülünün %20-30' unu oluşturur. Nişastanın işlenmesi sırasında jelatinize olması amiloz yapısından gelmektedir. İyot ile boyanarak kompleks meydana getirebilmektedir. Bu sayede nişastanın kalitatif ve kantitatif analizi yapılabilmektedir (Dona ve ark., 2010). Nişastanın amiloz ve amilopektin yapısı şekil 1.1 ve şekil 1.2.'de verilmiştir (El-Fallal ve ark., 2012).

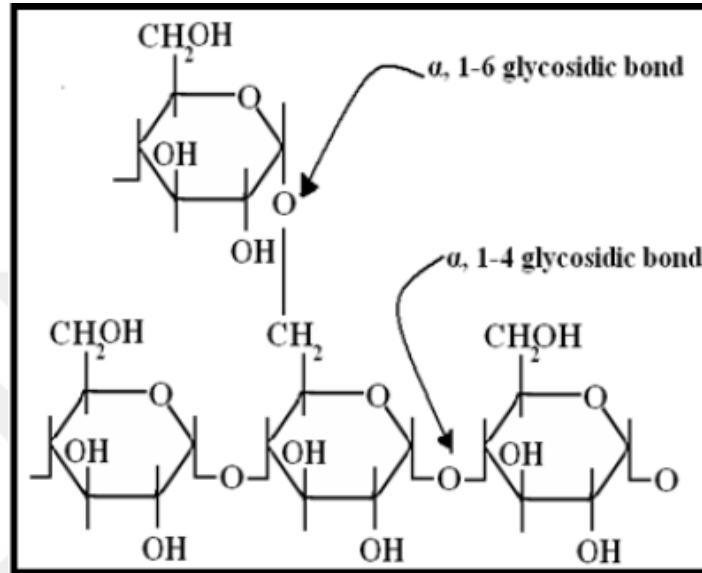


şekil 1.1. Nişastanın Amiloz Yapısı

1.1.3. Amilopektin

Dallanmış yapı olan amilopektin yapısı amiloza benzer α -1,4-glikozidik bağlardan oluşmuş lineer bir yapıdır. Ancak yan dalları bu lineer yapı ile α -1,6-glukozidik bağlar ile bağlanarak meydana gelmektedir. Nişastanın amilopektin yapısı 2.000.000 glikoz biriminden oluşmaktadır. Bu nedenle nişasta molekülleri doğadaki en büyük moleküllerinden biri olarak kabul edilir. Nişasta molekülünün %75-80' ini oluşturmaktadır (El-Fallal ve ark., 2012). Amilopektin yapısı nişastanın sudaki dispersiyonunu sağlayan yapıdır. Amilopektin yapısı azaldıkça

nişastanın sudaki çözünürlüğü artar ve iyot ile boyanmaya başlar (Dona ve ark., 2010).



Şekil 1.2. Nişastanın Amilopektin Yapısı

1.2. Amilolitik Enzimler

Selüloz ve nişasta, yeryüzündeki bol bulunan polimerlerdir. Her ikisi de glikozun farklı şekilde bağlanması ile polimerleşmiş makro moleküllerdir. Nişasta α -glikozidik bağlarla bağlanan glikoz monomerlerinden oluşurken, selülozda glikozun β -glikozidik bağlarla bağlanması ile oluşur. Bu nedenle iki polimerik yapı farklı enzimler ile parçalanabilmektedir. α -Glikozidik hidrolazlarla nişasta ve β -glikozidik hidrolazlarla selüloz parçalanarak monomerlerine ayrılmaktadır.

Nişasta iki farklı temel yapıdan oluşmaktadır. Bunlardan birincisi doğrusal zincir şeklinde α -1,4-bağlı glukanolardan oluşan amiloz, ikinci temel yapı doğrusal zincire α -1,6 bağlarıyla bağlanmış dallanmış yapı amilopektindir (Ball ve ark., 1996; Mouille ve ark., 1996). Bu nedenle nişastayı parçalayan enzimlere amilolitik

enzimler veya amilazlar denir. Amilolitik enzimler α -amilazlar, β -amilazlar ve glikoamilazlar olarak üç gruba ayrılırlar.

α -Amilazlar nişasta molekülünde α -1,4 glikozidik bağları kırarak dekstrin oligo sakkarit ve glikoz üretimi sağlar. α -amilazlar nişastayı parçalarken kısa zincirli oligosakkarit oluşturur ancak α -amilaz ile nişastanın sakkarifikasyonu sağlanacaksa nişasta molekülünün sıcaklıkla suda dağılması sağlanmalıdır. Sıcaklık, nişasta çözeltisini jelatinize eder ve jelatinizasyon viskoziteyi arttırırlar. Viskozitenin düşürülmesi için α -amilazlar kullanılır ve nişasta moleküllerinin parçalanması sağlanır. Bu işlemler yüksek sıcaklık gerektiren koşullarda gerçekleştiği için bu amaçla termostabil amilazlar kullanılır (Dubnovitsky ve ark., 2005).

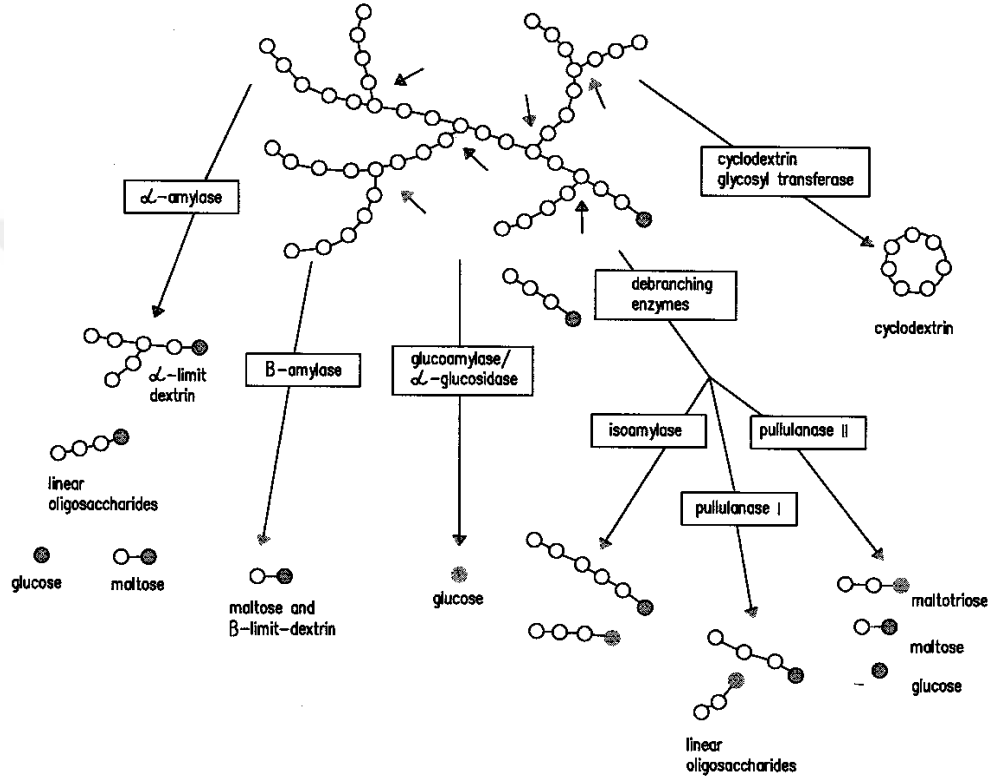
Glikoamilaz (EC 3.2.1.3) α -1,4 ve α -1,6 glikozidik bağları kırarak nişasta polimerini monomerik glikoza kadar parçalar (Sivaramakrishnan ve ark., 2006).

β -amilaz (EC 3.2.1.2), α -1,4-glukan bağlantılarını hidrolize ederek nişastadan maltoz üretir. Yüksek bitki ve tatlı patates tohumları, β -amilazın birincil kaynaklarıdır. β -amilaz meyvelerin olgunlaşması sırasında nişastayı maltoza hidroliz eder ve olgun meyvelerin tatlı olmasını sağlar. β -amilazın hidrolitik aktivitesi için optimum pH 4.0-5.5' dur. β -amilaz yüksek maltozlu şuruplar üretmek için de uygulanır (Sivaramakrishnan ve ark., 2006).

Amilazlar doğada en fazla bulunan enzimlerdendir ve bitkiler, hayvanlar ile mikroorganizmalar tarafından sentezlenebilmektedir. Mikroorganizmalardan mantarlar ve bakteriler amilaz üreten en büyük ana grubu oluştururlar. Amilazın üretilmesi, yaygın olarak kullanılması ve izolasyonu için ekstraselüler enzim üreten mikroorganizmalar tercih edilmektedir. Bu nedenle ekstraselüler enzim salgılayan *Aspergillus*'lar, bakterilerden aerob *Bacillus*'lar ve anaerob *Clostridium*'lar amilaz üreten mikroorganizmalar arasında en çok bilenenleridir (Parmer ve Pandey, 2012).

Endüstriyel amilaz üretiminde en yaygın kullanılan bakteri grubu gram pozitif hücre dışı enzim salgılayan *Bacillus*'lardır. *Bacillus*'ların tercih edilmesinin

nedeni, termostabil, alkali veya asidik pH toleransları, ekstrem termofil özelliklerde olması ve kolay üretilip, kolayca izole edilip kullanılabilir olmasıdır (Gurung ve ark., 2013).



Şekil 1.3. Nişastanın Enzimatik Parçalanması (Antranikian, 1991)

Nişastayı parçalayan bu enzimler arasında pullunazlar ve izoamilazlar bulunur ve bunlar pullunan ve amilopektinde bulunan 1,6- bağları hidrolize ederek nişastayı parçalar (Bertoldo ve Antranikian, 2002). Bu enzimler arasında en çok bilineni pullunaz (EC 3.2.1.41) ve izoamilaz (EC 3.2.1.68) enzimleridir. Bu iki enzim nişasta sektöründe yaygın kullanılan diğer önemli enzimlerdir. Pullunaz nişasta molekülündeki amilopektin ve pullunan yapısına etki ederken izoamilaz ise amilopektin yapısındaki α -1, 6 bağlarını kırar (Sivaramakrishnan ve ark., 2006).

1.3. Nişastanın Endüstriyel Uygulamaları

Nişastanın endüstride yaygın olarak kullanılmasına neden olan dört ana fizikokimyasal özellik bulunmaktadır. Bunlar, kıvam arttırıcı bir madde olarak kullanılması, jel oluşumu, macun oluşturma kabiliyeti ve güçlü yapışkan filmler üretme kabiliyetleridir. Ayrıca, nişastanın dünyanın birçok bölgesinde kolayca bulunabilen bir hammadde olması, onu farklı endüstriyel uygulamalar için ideal bir hammadde haline getirmektedir. Gıda endüstrisinde nişasta, doku ve viskozite modifiye edici, nem tutucu, jelleştirici ve hacim arttırıcı ajan olarak kullanılır. Oldukça viskoz olmasına rağmen, kağıt endüstrisinde oluklu mukavva üretimi gibi mekanik uygulamalarda ve tekstil endüstrisinde haşıl maddesi olarak kullanılmaktadır (Haki ve Rakshit, 2003 ; Lowe, 2002).

1.4. Endüstrilerde Mikrobiyal Amilaz Kullanımı

Amilazlar gıda, tekstil, deterjan ve kağıt endüstrilerinde ve nişasta işlemede yaygın olarak kullanılmaktadır. Endüstride nişasta işlemede iki ana adım vardır: sıvılaştırma ve sakarifikasyon. Her iki adım da yüksek sıcaklık gerektirir. Sıvılaştırma işleminde, saflaştırılmış granüller çözünür ve daha kısa zincir uzunluğundaki dekstrinlere dönüştürülür. Sıvılaştırma aşamasında *B. amyloliquefaciens*, *B. stearothermophilus* ve *B. licheniformis*'ten izole edilen termostabil amilazlar kullanılır. Bu enzimler yüksek sıcaklıklarda aktivite gösterebilmelerine rağmen, düşük pH' larda 9.0'un altında çalışmamaktadırlar (Vielle ve Zeikus, 2001).

Amilazlar dünya enzim pazarının yaklaşık %25' ini oluştururlar (Vaseekaran ve ark., 2010). Mantar ve bakteri amilazları endüstriyel sektörlerde çok ekonomik oldukları için yaygın olarak kullanılmaktadır (Kaur ve ark., 2012 ; Vaseekaran ve ark., 2010).

Amilaz, deterjan, ekmek, glikoz ve fruktoz şurubu, gıda, tekstil, biyoetanol üretiminde ve kağıt endüstrilerinde geniş bir uygulama alanına sahiptir (Gurung ve

ark., 2013). Endüstriyel amaçların yanı sıra amilaz, tarım sektörlerinde hayvanlar için de sindirilebilir yem üretmek için kullanılmaktadır.

Yiyecek ve içecek endüstrilerinde kullanılan en yaygın amilaz enzimi β -amilazdır (EC. 3.2.1.2) ve nişastanın maltoz çözeltilerine dönüştürülmesi sağlar (Hyun ve Zeikus, 1985). β -Amilaz, arpa, tatlı patates, soya fasulyesi ve buğday gibi daha yüksek bitkilerde ve ayrıca bazı mezofilik bakterilerde görülür. Genel olarak yapılan çalışmalarda belirtilen β -amilazlar termal olarak kararsız ve çok pahalıdır. Nişastanın biyolojik olarak işlenmesinde termostabil ve termoaktif amilaz kullanılması oldukça değerlidir. Çünkü yüksek sıcaklık nişastanın çözünürlüğünü, viskozitesini azaltır, mikrobiyal kontaminasyonunu sınırlar, reaksiyon sürelerini azaltır ve uygulama daha ekonomik hale gelir. Bu amaçla anaeroblarda *Clostridium thermosulfurogenes* termostabil β -amilaz üreten bakterilerden olup, enzimleri yüksek sıcaklıklarda kullanılabilmektedir (Shen ve ark., 1987).

Günümüzde mısır kullanılarak yapılan biyoetanol üretiminde kullanılan mayaların nişasta parçalama yeteneklerinin olmaması nedeniyle biyoetanol üretiminde nişasta parçalamada amilazlar kullanılmaktadır. Etanol üretiminde sıvılaştırma ve şekerleştirme olarak iki fazlı enzim uygulaması yapılmaktadır (Juge ve ark., 2006).

Kağıt sanayinde pürüzsüz yüzey elde etmek için kullanılan nişastanın viskozitesin düşürmek için, genel olarak α -amilazlar kullanılır (Gupta ve ark., 2003).

Tekstilde kumaşın boyanmadan önce nişastadan arındırılması gerekmektedir. Ancak nişasta sadece su ile kolayca uzaklaşmadığı için α -amilaz enzimleri kullanılarak iplik üzerindeki nişasta uzaklaştırılır (Souza ve Magalhaes, 2010).

1.5. *Clostridium* Cinsi

Clostridium cinsinin üyeleri genel olarak Gram pozitif, anaerobik, çomak şekilli bakteriler olup, ısıya dayanıklı endosporlar oluşturur. 1880 yılında cinsin tanımlanmasından sonra yaklaşık 160 tür tanımlanmıştır. Bu türlerin %70 ila 80'i hayvanlara zararsız saprofitik bakterilerdir. Bununla birlikte 13 tür patojen olarak bilinmektedir. *Clostridium* 'lar biyolojik solvent üretiminde kullanılabilen önemli grup bakterilerdir. Biyogaz, çöp gaz sistemlerinde hidrolitik aktivitelerinin yüksek olmasından dolayı oksijenin olmadığı çürütücü sistemlerde yaygın olarak bulunmaktadır. *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, aseton, bütanol ve etanol üretiminde solventojenik endüstriyel organizmalar olarak bilinmektedir ve bunların dışında *Clostridium* 'lar arasında 40 solventojenik bakteri türü belirlenmiştir.

1.5.1. *Clostridium* Türlerinde Amilolitik Enzimler

C. acetobutylicum ATCC 824 optimum pH 5.6 ve sıcaklığı 45°C olan α -amilaz üretilmiş ancak asidik ortamlarda çalışabilen termalstabilitesi yoktur (Swamy ve Seenayya, 1996). *C. perfringens* NCTC 8679 üretilen α -amilaz ortamda kalsiyum olmadan pH 6.5 ve 30°C sıcaklıkta 0.40 U/mL aktivite göstermiştir (Shih ve Labbe, 1995). Swamy ve Seenayya (1996), *Clostridium thermosulfurogenes* SV9 tarafından üretilen ve 60°C sıcaklıkta aktif pH 7.0'de optimum aktivite gösteren α -amilaz üretimi gerçekleştirmişlerdir. Üretilen enzimin amilaz enzim aktivitesi 0.60 U/mL olarak belirlenmiştir. *Clostridium thermohydrosulfuricum*, *C. acetobutylicum* ve *C. thermosaccharolyticum* dahil olmak üzere bazı *Clostridium* 'larda glukoamilazların varlığı belirlenmiştir. Özellikle, bu bakteriler tarafından üretilen glukoamilazlar termotabil olup, bu enzimlerin özelliği α -amilaz aktivitesi olmadan nişastanın hidrolize edilmesini sağlamaktadırlar (Specka ve Mayer, 1993).

1.6. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmanın amacı, Osmaniye ili Katı Atık Düzenli Depolama Sahası'ndan alınan çöp numunelerinden amilaz enzim aktivitesi gösteren anaerobik bakterilerin izolasyonu, tanımlanması, bu bakterilerden enzim üretimi ve üretilen enzimin sıcaklık, pH ve substrat konsantrasyonu karşısındaki aktiviteleri ve enzimin biyogaz üretimi üzerine etkisinin belirlenmesidir.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Spyridon ve ark., (2019) patates kabuklarından anaerob biyogaz üretimi gerçekleştirmişler, patates kabuğu ve inek gübrelerinin birlikte kullanımı ile 237.4 mL CH₄ / g VS, patates kabuklarının tek başına kullanılması ile metan veriminin 217.8 mL CH₄ / g VS olduğu belirlenmiştir. Patates kabuklarının 60:40 büyükbaş hayvan gübresi ile karıştırılması ile metan verimini % 10 oranında arttığı, ek olarak, patates kabuklarına uygulanan öğütme ve asit hidrolizi, sırasıyla 260.3 ve 283.4 mL CH₄/g VS olarak metan miktarının artırılmasında faydalı olduğu belirlenmiştir, işlenmemiş patates kabuklarına kıyasla ön işlem uygulamalarının biyogaz üretiminde metan miktarının sırasıyla %9 ve %17 oranında artmasını sağlamıştır.

Liaqurat ve ark., (2015) organik atıkların anaerobik parçalanmasında büyük baş hayvan gübresinin sebze, meyve atığı ve sürekli karışık tarımsal atıklar ile çalışan anaerobik çürütücüden α -amilaz üreten bakteri izolasyonu gerçekleştirmişler ve bu bakterilerden amilaz pozitif sonuç veren en iyi iki tanesi *Bacillus subtilis* (RAS⁻¹) ve *Clostridium perfringens* (RAS⁻⁴) olarak tanımlanmış, bu bakterilerden izole edilen amilazın pH 7.0 ile pH 9.0 arasında ve 37 °C ila 45 °C arasındaki sıcaklıklarda çalıştığı belirtilmiştir. *Clostridium perfringens*'den izole edilen enzimin mezofilik olarak çalıştığı, *Bacillus subtilis* (RAS⁻¹) için maksimum enzim aktivitesinin pH 8.0 'de 25.13 U / mL olduğunu belirtilmiştir.

Kolb, (2015) anaerobik çürütücüde atıksu çamuruna hidrolitik enzim ilavesinin 37°C mezofilik sıcaklık aralığında metan oluşumuna etkisini incelemiştir. Atıksu arıtma tesisi çamurunun metan potansiyeli 319 mL CH₄ g⁻¹ iken, Micropan Biogaz enzimleri eklenerek metan potansiyeli %8 arttı (339 ± 11 mL CH₄ g⁻¹ OS⁻¹). Novozymes enzimleri ilave edildikten sonra artış %45'ti (455 ± 28 mL CH₄ g⁻¹ OS⁻¹) olarak belirtilmiştir. Biyogaz sistemlerine enzim ilavesi durumunda hidroliz katsayıları kontrol grubu reaktörlerine göre yükselmiş, enzim

uygulamasının üretilen gaz miktarı ile maliyeti karşılaştırılmış, enzim ilavesinin maliyet çıkarıldıktan sonra %8 daha yüksek metan üretimi olduğu belirtilmiştir.

Lipinski ve Umiejewska, (2017) organik atıkların fermentasyonunda enzimatik hidroliz işleminin uygulanmasının biyogaz üretiminin verimliliğinin üzerine yapılan araştırmada pilot ölçekli biyogaz sisteminde amilaz, lipaz ve proteaz kullanılmıştır. Kullanılan %10 enzim dozunun üretilen biyogaz miktarı üzerindeki etkisini kullanılan organik atığın kg başına %48 daha fazla gaz verdiği, artan enzim konsantrasyonunun istatistiksel olarak gaz verimi üzerinde anlamlı bir artış sağlamadığı, optimum enzim konsantrasyonunun %10, çalışma sıcaklığının 35°C mezofilik ve 29 gün alıkonma zamanı olarak belirtilmiştir.

Dubrovskis ve ark., (2019) biyogaz üretimi için tarımsal artıklardan peletlenmemiş saman kullanılmış, ancak saman kullanımıyla karbon azot ilişkisinin önemli olduğunu belirtmiştir. Anaerobik sindirim sürecini iyileştirmek için çeşitli katkı maddesi olarak α -amilaz ve ksilanaz enzimlerinin (Metaferm ve Melafen) karışımının biyogaz prosesine etkisi belirlenmiştir. Mezofilik olarak gerçekleştirilen (38°C) 16 biyoreaktörün 14 katı pelet ile doldurulmuş ikisi kontrol için sadece inokulum çamuruyla doldurulmuştur. Katkı madde içermeyen kontrol sisteminde biyogaz verimi çözünmüş organik madde (ÇOM) başına belirlenmiş, 34 günlük anaerobik sindirimden sonra 0.655 L g-1ÇOM ve metan 0.301 L g-1ÇOM olarak belirlenmiş. α -Amilaz eklenmiş saman peletlerinden oluşan sistemin biyogaz verimi, 0.652 Lg-1ÇOM ve metan 0.318 Lg-1ÇOM olarak belirlenmiş, Ksilanaz ilave edilmiş saman peletlerinden biyogaz verimi, 0.689 L g-1ÇOM ve metan 0.347 L g-1ÇOM olarak belirlenmiştir. Metaferm ve Melafen karışımı eklenmiş saman peletlerinden biyogaz verimi, 0.638 L g-1ÇOM ve metan 0.254 L g-1ÇOM olarak belirlenmiştir. Çalışmada enzim ilavesinin metan üretimini arttırdığı belirtilmiştir.

Tran ve ark., (2010) aseton bütanol ve etanol üretiminde yüksek amilaz aktivitesi olan *Bacillus subtilis* WD 161 bakterisi ile *Clostridium butylicum* TISTR

1032 bakterisi kullanılmış ve nişastadan Aseton bütanol ve etanol üretimi (ABE) gerçekleştirilmiştir. Saf kültür olarak *Clostridium butylicum* TISTR 1032 bakterisi kullanıldığında elde edilen sonuçlar, karışık kültür olarak ortamda anaerobik şartları sağlamak için azot gazı geçirmeden ve indirgeyici ajan kullanmadan yapılan fermentasyon işleminden alınan sonuçlar karşılaştırıldığında karışık kültür ortamında amilaz aktivitesinin 10 kat arttığı ve ABE üretimini nişastadan 5.4 ve cassava nişastası içinde 6.5 kat arttırdığı belirtilmiştir. Bu çalışmada anaerob sistemlerde anaerob şartlar sağlamak için kullanılan maliyetli yöntemler yerine aerobik *Bacillus* bakterilerinin anaerobik *Clostridium* bakterilerinin yanına yardımcı kültür olarak eklenmesinin hem ürün artışında hemde ekonomik açıdan avantajlı olduğunu belirtmişlerdir.

Lolasi ve ark., (2018) tatlı sorgun saplarından amilaz *Nesterenkonia*, kullanılarak üretilmiş ve enziminin aktivitesi 73.3 U / mL olarak belirlenmiştir. Enzim üretilirken sap hidrolizatlarına sorgun tane ilave takviyesi ile %67 daha yüksek amilaz üretimi gerçekleşmiştir. Enzim üretilirken ortama biyo uyumlu yüzey aktif Tween 20 ve Tween 80'in (0.1 g / L) eklenmesi ile enzim aktivitesi sırasıyla 93 ve 97 U / mL'ye yükselmiştir. Elde edilen ham enzim, hem tanen içeren hem de tanen içermeyen sorgun tanelerinden (%6) etanol üretimi sürecinde kullanılmış ve sırasıyla 17.7 ve 17.0 g/ L biyoetanol üretimi sağlanmıştır.

Odnell ve ark., (2016) enerji üretimi amaçlı biyogaz tesislerinde verimliliği arttırmak için enzim uygulamalarının etkisi belirlenmiş, ortama eklenen enzimlerin anaerobik biyogaz sistemlerinde kalma süresi 24 saatten daha az olduğu bunun nedeninin enzimlerin protein yapıda olması ve ortamda bulunan proteazların enzimleri parçalanmasından ileri geldiği belirtilmektedir. Biyogaz denemelerinde %1'lik bir karışımla kullanılan subtilisin enzimi %37 oranında biyometan üretiminde artış sağlamıştır. Enzim konsantrasyonunun artırılması biyogaz verimini arttırmamıştır. Biyogaz sistemlerinde çalışabilecek enzimlerin üretilmesi gerektiği belirtilmiştir.

Rama Mohan Reddy ve ark., (1999) sürfaktanlardan Triton X-100, CHAPS, Tween-80 ve sodyum taurokolatın *Clostridium thermosulfurogenes* SV2 kültüründe termostabil amilaz üretiminde kullanımı araştırılmış, 18 saat üremiş kültüre eklenen sürfaktanların enzim üretimini indüklediği, 1.0 mM Triton X-100, 0.1 mM CHAPS, 0.1 mM Tween-80 ve 0.1 mM sodyum taurokolat uygulanan kültürde yapılan kontrolde sırasıyla %140, %34, %88 ve %28 daha fazla α -amilaz üretilmiştir.



3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Katı Atık Örnekleri

Çalışmada izole edilen, amilaz aktivitesi olan bakterilerin izole edildiği katı atık örnekleri Osmaniye ili Katı Atık Düzenli Depolama Sahası'ndan alınmıştır. Ekskavatör ile kazı yapıldığı sırada çöp üzerinden 4-5 m derinlikten alınmış örnekler, ağzı kapalı contalı plastik kutular içinde laboratuvara getirilmiştir.

Çalışmada kullanılacak biyogaz aşı üretim örnekleri aynı tesisten biyogaz toplama borularından akan sızıntı sularından anaerobik koşulları koruyarak, 250 mL ağzı kapalı şişelerle alınıp laboratuvara getirilmiştir.

3.1.2. RCM Agar (Reinforced *Clostridial* Medium)

Çalışmalarda enzim üretmek için *Clostridium* cinsi bakterilerin izolasyonunda kullanılmıştır (Gibbs ve Hirsch, 1956).

Bileşimi	g/L
Et Peptonu	10
Et özütü	10
Maya	3
Nişasta	1
D(+)Glukoz	5
L-Sistein	0.5
NaCl	5
Sodyum Asetat	3
Amonyum Demir III Sitrat	0.5
Agar	15
Distile su	1000 mL

Besiyerinin pH'sı 7.5'a ayarlandıktan sonra agar eklenip otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir. Besiyerine oksijen difüzyonunu engellemek için otoklavdan çıkarılan besiyerleri anaerobik kabinde %20 CO₂ ve %80 N₂ atmosferinde soğumaya bırakılmıştır.

3.1.3. Brewer Anaerobik Agar

Anaerobik bakterilerin üretilmesinde ve stok kültürlerde kullanılmıştır (Anonymous, 1978).

Bileşimi	g/L
Kazein Peptonu	10
Soya peptonu	5
Maya	5
L-Sistein	0.4
D(+)-Glukoz	10
NaCl	5
Na-thioglukolat	2
Metilen Mavisi	0.002
Agar	17
Distile Su	1000 mL

Besiyerinin pH'sı 7.0'ye ayarlandıktan sonra agar ilave edilip eritilir ve otoklavda 121°C'de 1.2 atm basınçta 15 dakika steril edilmiştir. Besiyerinin pH'sı 7.5'a ayarlandıktan sonra agar eklenip otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir. Besiyerine oksijen difüzyonunu engellemek için otoklavdan çıkarılan besiyerleri anaerobik kabinde %20 CO₂ ve %80 N₂ atmosferinde soğumaya bırakılmıştır.

3.1.4. Amilaz Besiyeri

Clostridium cinsi bakterilerden enzim izolasyonunda kullanılmıştır. 15 g/L agar eklenerek petride amilaz aktivitesi belirlenmiştir (Sleat ve ark., 1984).

Bileşimi	g/L
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	1
NH ₄ Cl	1
KCl	0.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5
L-Sistein	0.15
Triptikaz	0.5
Maya Özütü	0.5
Nişata	5
Resasurin	0.001
Distile Su	1000 mL

Besiyerinin pH'sı 7.5'a ayarlandıktan sonra agar eklenip otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir. Besiyerine oksijen difüzyonunu engellemek için otoklavdan çıkarılan besiyerleri anaerobik kabinde %20 CO₂ - %80 N₂ atmosferinde soğumaya bırakılmıştır.

3.1.5. Amilaz Kullanımının Biyogaz Üretimine Etkisi

Biyogaz aktivitesi için temel besiyeri olarak sentetik selüloz besiyeri nişastalı olarak modifiye edilmiş ve kullanılmıştır (Sagnak ve ark., 2011).

Bileşimi	g/L
Nişasta	10
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.25
K ₂ HPO ₄	1
KH ₂ PO ₄	1
L-cysteine HCl.H ₂ O	0.1

Besiyerinin pH'sı 7.0 ayarlandıktan sonra anaerobik kabinde %20 CO₂ - %80 N₂ atmosferinde içinden 1 dakika saf azot geçirilerek çözünmüş oksijenin uzaklaştırılması sağlanmış ve sonra biyogaz sistemine beslemesi yapılmıştır (Sagnak ve ark., 2011).

3.1.6. Sodyum Fosfat Tamponu (100 mM, pH 7.0)

İzole edilen enzimin dolapta saklanması için tampon çözelti olarak kullanılmıştır (Srivastava, 1987).

3.1.7. Dinitro Salisilik Asit Çözeltisi (DNS)

Enzim aktivitesinin belirlenmesinde ve enzimatik reaksiyon sonucu açığa çıkan indirgen şeker tayini için kullanılmıştır.

DNS çözeltisi 1 g DNS tartılarak 50 mL distile su içerisinde çözülür, üzerine 30 g K-Na-Tartarat ve 20 mL, 2M NaOH eklenerek, manyetik karıştırıcıda çözünene kadar karıştırılır ve son hacim 100 mL olana kadar saf su ilave edilir (Miller, 1951).

3.1.8. Sitrat Tamponu

İzole edilen amilaz enziminin pH aktivitesinin belirlenmesinde pH 3.0-5.0 arasındaki aktiviteyi belirlemek kullanılmıştır. Tampon çözeltinin hazırlanmasında çözelti A 0.2M sitrik asit ve çözelti B 0.2M Na₂HPO₄.7H₂O stok çözeltileri

hazırlanarak istenilen pH değerleri için uygun karışımlar Çizelge 3.1'e göre hazırlanmıştır (Temizkan ve Arda, 2004).

Çizelge 3.1. Sitrata Tampon Çözeltisi

pH	Çözelti A mL	Çözelti B mL	Saf su mL
4.0	24.3	25.7	50
4.5	21.0	29.0	50
5.0	17.9	32.1	50

3.1.9. Sodyum-Fosfat Tamponu

İzole edilen amilaz enziminin pH aktivitesinin belirlenmesinde pH 6.0-8.0 arasındaki aktiviteyi belirlemek kullanılmıştır. Tampon çözeltinin hazırlanmasında çözelti A 0.2M NaH_2PO_4 ile çözelti B 0.2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ stok çözeltileri hazırlanarak istenilen pH değerleri için uygun karışımlar Çizelge 3.2'ye göre hazırlanmıştır (Temizkan ve Arda, 2004).

Çizelge 3.2. Fosfat Tamponu Çözeltisinin Hazırlanması

pH	Çözelti A mL	Çözelti B mL	Distile Su mL
6.0	87.7	12.3	100
6.5	68.5	31.5	100
7.0	39.0	61.0	100
7.5	16.0	84.0	100
8.0	5.3	94.7	100

3.2. Metod

3.2.1. Anaerob Bakterilerin İzolasyonu

Çalışmada amilaz enzim aktivitesi gösteren anaerob bakterilerin izolasyonunda kullanılacak olan örnekler Osmaniye Katı Atık Düzenli Depolama Sahası'ndan anaerobik şartlar korunacak şekilde, su örnekleri ağzı kapalı şişelerde ve katı çöp numuneleri ağzı silikon contalı plastik kap içinde laboratuvara getirilmiştir.

Laboratuvarda bakteri izolasyonu yapılmadan önce örnekler içindeki metanojen bakterilerin öldürülmesi ve sporlu bakterilerin kalması için bir spatül (yaklaşık 1 g) numune cam tüp içinde 10 mL anaerob besiyerine konularak 80°C'de 10 dakika ısı ön işleme maruz bırakılmıştır. Bu ısı ön işleme maruz bırakılan numuneler steril edilmiş 100 mL RCM sıvı besiyerine anaerobik ekim kabini içinde ekimleri yapılmış ve şişeler 37°C ve 55°C sıcaklıkta inkübe edilmiştir (Gibbs ve Freame, 1965). 12-15 gün boyunca inkübe edilen örneklerden RCM katı besiyerine tek koloni düşecek şekliyle özeyle ekim yapılmıştır. Ekim sonrasında katı besiyeri üzerine 40°C'ye kadar soğutulmuş RCM agardan 2. kat bir besiyeri daha dökülmüştür. Örnekler 37°C ve 55°C sıcaklıkta koloni oluşumu görülünceye kadar inkübe edilmiştir. Tek düşen kolonilerden stok kültürler Brewer Agar' da yapılmıştır (Anonymous, 1978).

3.2.2. Enzim Aktivitesi

Enzim aktivitesinin belirlenmesi için anaerob nişastalı besiyeri kullanılmıştır. İzole edilen bakteriler nişasta agara çizgi ekim yapılarak Anaerobik jarda 37°C ve 55°C' de 3 gün inkübe edilmiştir. Amilaz aktivitesi iyot ile boyanarak belirlenmiş ve ekim çizgisi etrafında görülen şeffaf zon pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Amilaz aktivitesi gösteren bakteriler BD Crytal anaerobik bakteri identifikasyon test kitleri kullanılarak tanımlanmıştır.

3.2.3. Enzim Üretimi ve İzolasyonu

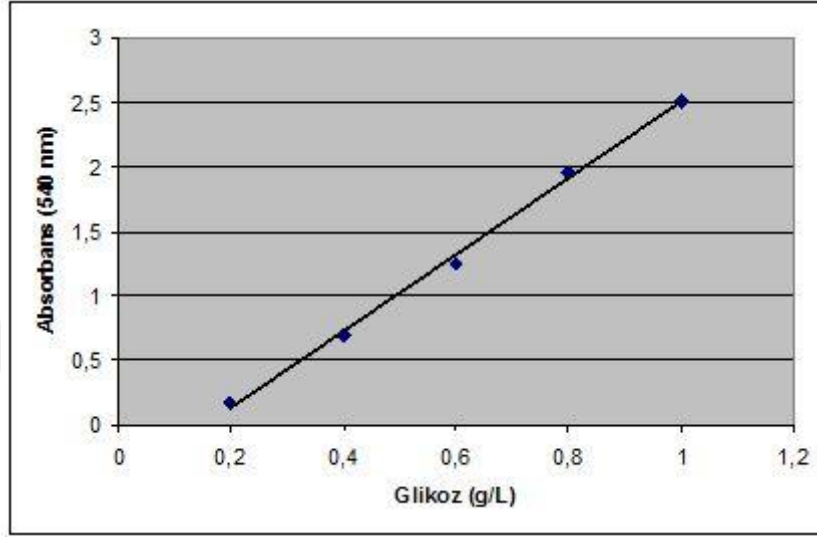
Enzim üretimi için amilaz sıvı besiyeri kullanılmıştır. Amilaz pozitif olan ve en iyi zon çapının olduğu bakteri kullanılarak enzim üretimi 37°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. 5 gün sonra inkübe edilen örnek 9000 rpm'de +4°C sıcaklıkta 30 dakika santrifüj edilerek süpernatant toplanıp temiz bir cam şişeye alınmıştır. Süpernatant üzerine daha önceden -33°C'de soğutulmuş etanol yavaş yavaş ilave edilerek alkol presipitasyon yöntemi ile enzim izole edilmiştir (Sleat ve ark., 1984). Çözelti 24 saat boyunca -33°C'de bekletilmiş, tüm örnek 9000 rpm'de +4°C 30 dakika santrifüj edilmiş pellet toplanarak pH 7.0 fosfat tamponuna alınmış buzdolabında +4°C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir. Fosfat tamponunda toplanan örnekler diyaliz membranı kullanılarak (Selüloz diyaliz tüpü, Sigma D-9777) +4°C sıcaklıkta diyaliz edilmiştir. Diyaliz sonrası örneklerin amilaz aktivitesi %1 nişasta çözeltisinden alınan 0.5 mL numune üzerine 0.5 mL enzim eklenerek 40°C sıcaklıkta 1 saat bekletilip üzerine DNS eklenerek çözeltinin renginin kiremit kırmızı rene dönüşüp dönüşmediği gözlenmiştir.

3.2.4. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

İzole edilen enzimin aktivitesinin belirlenmesi için enzimden 0.5 mL ve %1 nişasta çözeltisinden 0.5 mL alınarak çalışmada denenen sıcaklık ve pH koşullarında bir saat inkübe edilmiş ve inkübasyon sonrasında üzerine 3.0 mL DNS ayırıcı konularak kaynar su banyosunda 5 dakika kaynatma işlemi gerçekleştirilmiştir. Kaynatma işleminden sonra örnekler oda sıcaklığına kadar soğutulmuş ve spektrofotometrede köre karşı 550 nm dalga boyunda okunmuştur. Kör olarak 0.5 mL tampon-nişasta çözeltisi ve 0.5 mL destile su kullanılmıştır (Shanmughapriya ve ark., 2009).

Çalışmalarda hesaplama için kullanılan standart eğri glikoz substrat olarak kullanılmış ve hazırlanmıştır. Şekil 3.1'deki standart eğrinin regresyon

analizinden $y=2.9819x-0.4704$ denklemi elde edilmiş ve r değeri 0.997 bulunmuştur. Tüm çalışmalarda bu eğriden elde edilen denklem kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Glikoz Standart Eğrisi

3.2.5. Enzim Aktivitesi Üzerine pH Etkisi

Çalışmada izole edilen enzimin aktivitesi üzerine pH etkisinin pH 4.0'de sitrat tamponu, pH 6.0-8.0 arasında Na-Fosfat tamponları kullanılarak pH 4.0-8.0 arasında belirlenmiştir.

Her bir pH değeri için tampon içinde %1 nişasta çözeltisi hazırlanmıştır. Aktivite tayini için izole edilen 0.5 mL enzim ve farklı pH'daki substrat çözeltilerinden tüplere 0.5 mL alınan örnekler farklı sıcaklıklarda sıcak su banyosunda 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda DNS ile indirgen şeker analizi yapılmıştır (Shanmughapriya ve ark., 2009).

3.2.6. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Çalışmada izole edilen enzimin aktivitesine sıcaklığın etkisi 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C ve 80°C sıcaklıklarda belirlenmiştir.

Her bir sıcaklıkta yapılan denemeler, pH 4.0-8.0 arasında tampon çözelti içinde hazırlanan %1 nişasta çözeltisinden 0.5 mL ve 0.5 mL enzim karışımı hazırlanarak tüplerde 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C ve 80°C sıcaklıklarda su banyosunda 1 saat inkübe edilerek edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda DNS ile indirgen şeker analizi yapılmıştır (Shanmughapriya ve ark., 2009).

3.2.7. Zamana Bağlı Enzimin Aktivitesi

Çalışmada izole edilen enziminin zamana bağlı aktivitesi enzimin optimum çalıştığı sıcaklık olan 30°C ve pH 6.0'da gerçekleştirilmiştir. Tampon çözeltisi içinde hazırlanan %1 nişasta çözeltisinden 0.5 mL ve enzimden de 0.5 mL alınarak hazırlanan tüpler sıcak su banyosunda 0-12 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda her tüp belirli zaman aralıklarında alınarak DNS ile enzim aktivitesi belirlenmiştir (Shanmughapriya ve ark., 2009).

3.2.8. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Çalışmada izole edilen enziminin aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi enzimin optimum çalıştığı sıcaklık olan 30°C ve pH 6.0'de belirlenmiştir. Tampon çözeltisi içinde hazırlanmış %0.5, %0.75 %1 ve %2 nişasta çözeltisi substrat olarak kullanılmış ve 0.5 mL substrat 0.5 mL enzim alınarak hazırlanan tüpler sıcak su banyosunda 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda örneklerdeki enzim aktivitesi DNS yöntemi ile belirlenmiştir (Shanmughapriya ve ark., 2009).

3.2.9. Enzimin Biyogaz Verimliliği Üzerine Etkisi

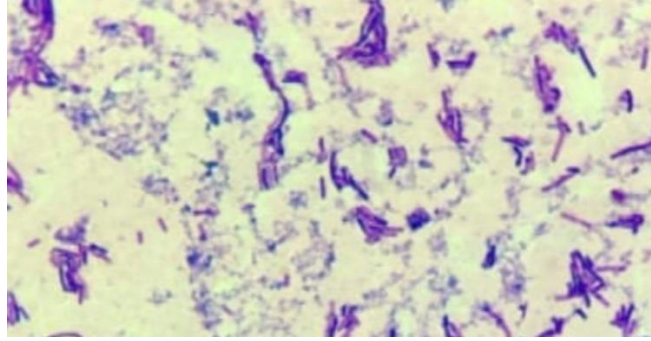
Çalışmada izole edilen ve optimum çalışma şartları belirlenen enzimin biyogaz sistemlerinde kullanılabilirliğinin belirlenmesi için laboratuvarda hazırlanan batch kültür biyogaz sisteminde belirlenmiştir. Biyogaz üretiminde kullanılacak mikrobiyal aşı kültürü Osmaniye Katı Atık Düzenli Depolama Sahası'ndan alınan sızıntı suyu örnekleri ile hazırlanmıştır. Laboratuvarda 5 L ağzı kapalı cam reaktörlerde gerçekleştirilen batch biyogaz çalışmalarında sentetik nişastalı besi ortamı kullanılmıştır. 37°C sıcaklıklarda yapılan çalışmalarda sisteme izole edilen enzimden 30 mL eklenmiştir. Kontrol grubuna nişastalı sentetik besi ortamı eklenmiş ancak enzim eklenmemiştir. 5 günlük inkübasyon boyunca çıkan gaz miktarları kümülatif olarak toplanıp biyogaz oluşum miktarları belirlenmiştir (Sagnak ve ark., 2011).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bakteri İzolasyon Sonuçları

Çalışmada Osmaniye Katı Atık Düzenli Depolama Sahası'ndan alınan çöp örneklerinden amilaz pozitif 6 anaerob bakteri izole edilmiştir. Katı atık düzenli depolama sahası, evsel atıklardan biyogaz üretim yapılan kentin atıklarının toplandığı depo sahasıdır. Sahaya gelen çöpler içinde bol miktarda evsel içerikli nişasta kaynaklı atık gelmektedir. Sahada biriken çöpler mikroorganizmalar tarafından parçalanarak su, metan, karbondioksit ve organik asitlere kadar parçalanmaktadır. Sahanın sürekli çöp alması dışardan sahaya sürekli mikroorganizma taşınmasına neden olmaktadır. Bu çalışmada sadece anaerob sporlu bakterilerin izole edilmesi ve metanojen bakterilerin elemine olması için örnekler 80°C'de 10 dakika ısıtılma tabi tutulmuştur. Ön ısıtılma tabi tutulan örnekler 37°C ve 55°C sıcaklıklarda anaerobik ortamda inkübe edilmiş, 37°C ve 55°C sıcaklıkta inkübe edilen ortamda 9-12 gün sonra renk değişimi ve üreme gözlenmiştir.

37°C ve 55°C sıcaklıkta üremenin olduğu bu ortamlardan alınan örnekler katı besiyerine ekilerek petride tek düşmüş kolonilerden stok kültürler hazırlanmıştır. Çalışmada toplamda 6 bakteri izole edilmiş bunlardan 4 tanesi 55°C'de 2 tanesi 37°C'de üremiştir. İzole edilen bu bakterilerden katı besiyerinde amilaz aktivitesi gösteren 2 tanesi 37°C'de üremiş, 55°C sıcaklıkta üreyen bakterilerde amilaz pozitif bakteri tespit edilememiştir. 37°C'de üreyen bu bakterilere gram boyama yapılmış, her ikisinin de gram pozitif çomak oldukları belirlenmiştir (Şekil 4.1). İki bakterinin spor boyama sonucunda sporlu olduğu belirlenmiştir. Bakteriler BD Anaerob bakteri tanımlama test kitleri kullanılarak tanımlanmış ve bakterilerden bir tanesi *Clostridium acetobutylicum* olarak diğeri *Clostridium sp.* olarak tanımlanmıştır. Çalışmalarda amilaz enzim aktivitesinde daha büyük zon çapı veren *Clostridium sp.* kullanılmıştır.

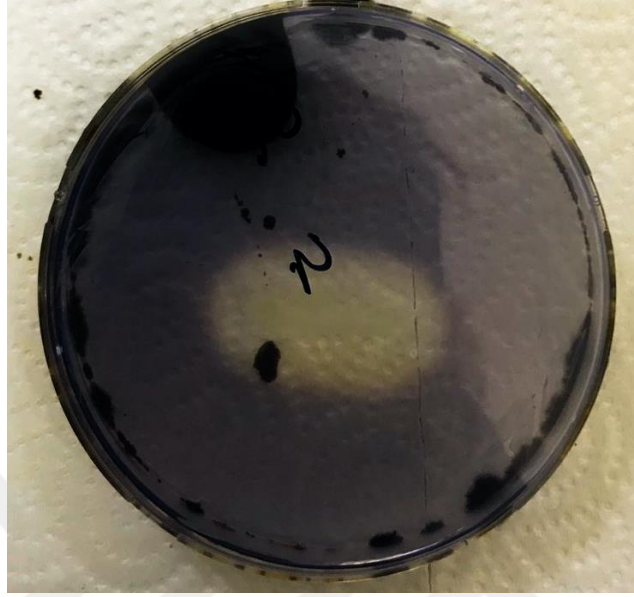


Şekil 4.1. Amilaz Aktivitesi Olan *Clostridium* sp. Gram Boyama

Anaerob bakterilerden *Clostridium*'lar gram pozitif, çomak ve spor oluşturma özelliği olan bakterilerdir. Doğada ayrıştırıcılar arasında yer alan bu bakterilerin vejetatif formları oksijene hassas olup spor formları uzun yıllar toprakta kalabilmektedir. *Clostridium*'lar doğadaki kompleks organik bileşikleri parçalayarak su, karbondioksit, alkoller ve organik asitlere kadar indirgemektedir (Angelidaki ve ark.,2011).

4.2. Enzim İzolasyonu ve Enzim Aktivite Sonuçları

Çalışmada izole edilen ve 37°C'de amilaz pozitif olan bakterilerin amilaz aktivite testleri nişastalı katı besiyerinde belirlenmiştir. Çizgi ekimler yapılan nişastalı katı besiyeri iyot buharı ile boyanmış ekim çizgisi etrafında oluşan şeffaf zon enzim üretimi bakımından pozitif olarak kabul edilmiştir. Petride amilaz aktivitesi gözlenen *Clostridium* sp. olarak tanımlanan suşun ekim çizgisi etrafında oluşan zon çapı 18 mm olarak belirlenmiştir. *Clostridium acetobutylicum* bakterisinin oluşturduğu zon çapı 10 mm olup çalışmalarda enzim üretimi için *Clostridium* sp. suşu kullanılmıştır. Şekil 4.2'de *Clostridium* sp. nişastalı besiyerinde gösterdiği enzim aktivitesi verilmiştir.



Şekil 4.2. *Clostridium sp.*' in Nişastalı Besiyerinde Enzim Aktivitesi

Clostridium sp. kullanılarak amilaz besiyerinde enzim üretimi yapılmıştır. Amilaz besiyerine 5 g/L nişasta karbon kaynağı olarak eklenmiş ve enzim üretiminde kullanılmıştır. Anaerobik şartlarda 37°C sıcaklıkta gerçekleştirilen enzim üretimi için bakteri 5 gün inkübe edilmiştir. Enzim üretimi sırasında kültür ortamı her gün elle en az bir kere çalkalanarak çöken bakterilerin besiyerine dağılması sağlanmıştır. 5. gün sonunda enzim izolasyonu için besiyeri santrifüj edilip süpernatant soğuk alkol ile çöktürülerek enzim izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Santrifüj ile toplanarak alınan enzim fosfat tamponunda pH 7.0'de çözdürülüp +4°C sıcaklıkta saklanmıştır. Enzim diyaliz tüpü kullanılarak +4°C sıcaklıkta 24 saat fosfat tamponunda pH 7.0'de diyaliz edilmiştir. Diyaliz edilen örnekler toplanarak enzimatik çalışmalarda kullanmak üzere +4°C'de saklanmıştır.

İzole edilen amilaz enziminin aktivitesi %1 nişasta çözeltisi kullanılarak analiz edilmiştir. DNS çözeltisinde meydana gelen kırmızı renk değişimi enzim aktivitesinin olduğunu göstermiştir (Şekil 4.3).



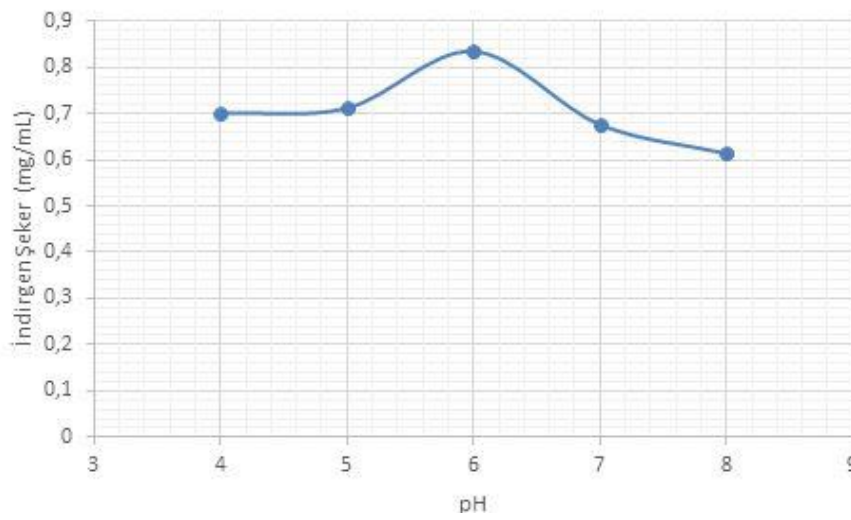
Şekil 4.3. Üretilen Enzimin Aktivite Testi

4.3. Sıcaklık ve pH'ın Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Anaerobik amilazların sıcaklık hassasiyeti olduğu bilinmektedir. Sıcaklık, enzimlerin sadece çalışması üzerine etkili olmayıp enzimin yapısını da etkileyen fiziksel bir parametredir. Birçok çalışmada optimum sıcaklık veya pH bulunup bu optimum sıcaklık veya pH koşulunda değişkenler değiştirilerek çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmada izole edilen amilaz enziminin sıcaklık aktivitesi belirlenirken enzim aktivitesi üzerine diğer bir parametre olan pH'ında etkisi aynı anda belirlenmiştir. Bu amaçla çalışmada aktivitesi belirlenirken çalışmada kullanılan her sıcaklık değerinde enzimin aktivitesi pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 ve 8.0'de çalışılmıştır. Böylece pH ve sıcaklık arasındaki ilişki ve optimum çalışma koşulları belirlenmiştir.

4.3.1. 30°C Sıcaklıkta Enzim Aktivitesi

Çalışmada kullanılan bakterinin üreme sıcaklığı 37°C olup mezofiliktir. Bakteriden izole edilen enzimin sıcaklık toleransı bakterinin yaşadığı sıcaklıklardan farklılık gösterebilir. 30°C sıcaklıkta pH 4.0-8.0 arasında izole edilen enzimin aktivite sonuçları Şekil 4.4’de verilmiştir.

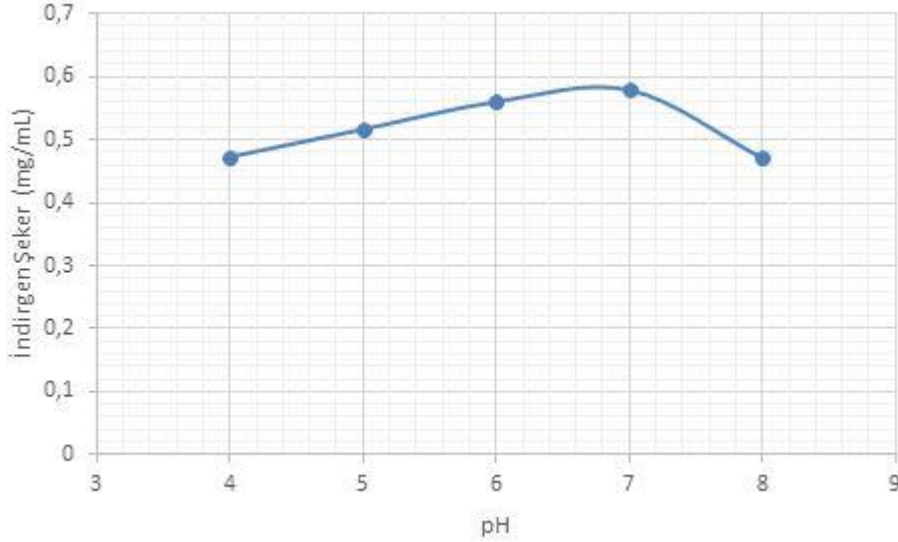


Şekil 4.4. 30°C Sıcaklıkta pH 4.0-8.0 Arasında Enzim Aktivitesi

Yapılan sıcaklık denemeleri içinde 30°C sıcaklık enzim aktivitesinin en iyi olduğu sıcaklık olarak belirlenmiştir. Enzim aktivitesi bu sıcaklıkta pH’a bağlı olarak değişiklik göstermiş ve maksimum enzim aktivitesinin olduğu pH değerinde 6.0 olarak belirlenmiştir. pH 4.0, 5.0, 7.0 ve 8.0 de enzim aktivitesi düşük olup, pH 6.0’daki aktivite değeri ile karşılaştırıldığında pH 6.0’ya göre pH 4.0, 5.0, 7.0 ve 8.0’de sırası ile %16, %14.7, %19 ve %27 daha düşük aktivite belirlenmiştir. Yüksek pH ve düşük pH değerleri enzim aktivitesini düşürmekte izole edilen enzimin çalışma pH aralığı zayıf asidik ve nötral pH değerleri olduğu görülmektedir.

4.3.2. 40°C Sıcaklıkta Enzim Aktivitesi

Bu çalışmada izole edilen enzimin 40°C sıcaklıkta pH 4.0-8.0 arasında enzimin aktivite sonuçları Şekil 4.5’de verilmiştir. Yapılan sıcaklık denemeleri içinde 40°C sıcaklık enzim aktivitesinin 30°C’ye biraz düşüş gösterdiği bir sıcaklık değeri olup bu sıcaklıkta enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH değeri 7.0 olarak belirlenmiştir. pH 4.0, 5.0, 6.0 ve 8.0 de enzim aktivitesi düşük olup, pH 7.0’deki aktivite değeri ile karşılaştırıldığında pH 7.0’ye göre pH 4.0, 5.0, 6.0 ve 8.0’de sırası ile %18.3, %12, %3 ve %18.6 daha düşük aktivite belirlenmiştir.



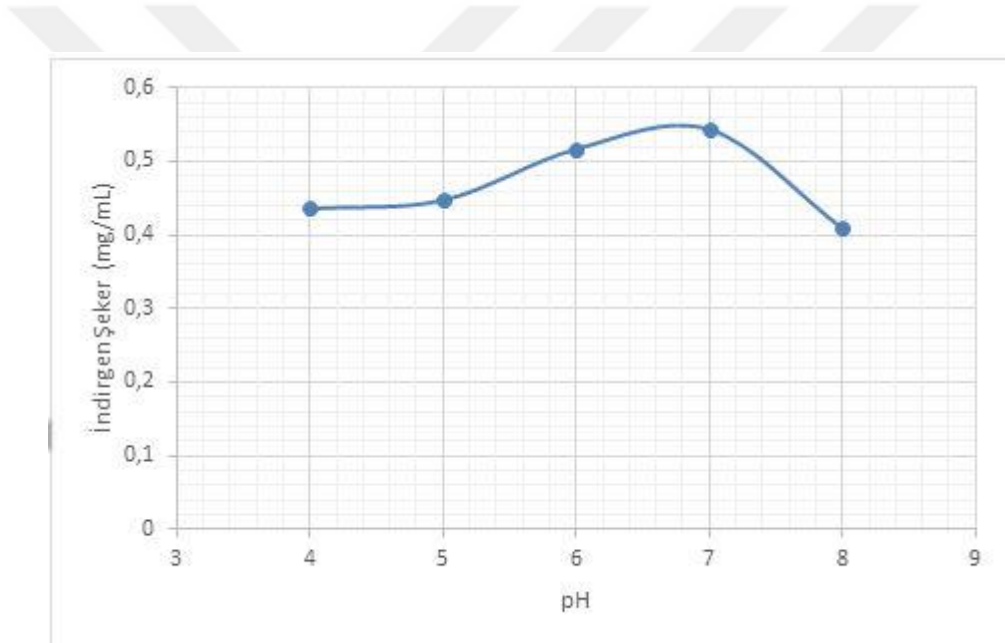
Şeki

4.3.2. 40°C Sıcaklıkta pH 4.0-8.0 Arasında Enzim Aktivitesi

Enzimin en iyi aktivite gösterdiği 30°C sıcaklıkta ve pH 6’daki aktivitesi ile 40°C sıcaklıkta ve pH 7’deki aktivitesi karşılaştırıldığında enzim 30°C’ye göre 40°C’de %30.6 daha düşük aktivite göstermiştir.

4.3.3. 50°C Sıcaklıkta Enzim Aktivitesi

Enzimin 50°C sıcaklıkta pH 4.0-8.0 arasında gösterdiği aktivite sonuçları Şekil 4.6’de verilmiştir. Yapılan sıcaklık denemeleri içinde 50°C sıcaklık enzim aktivitesinde 30°C’ye göre düşüş olduğu görülmüş olup bu sıcaklıkta enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH değeri 7.0 olarak belirlenmiştir. pH 4.0, 5.0, 6.0 ve 8.0 de enzim aktivitesi düşük olup, pH 7.0’deki aktivite değeri ile karşılaştırıldığında pH 7.0’ye göre pH 4.0, 5.0, 6.0 ve 8.0’de sırası ile %19.3, %17.6, %5 ve %25 daha düşük aktivite belirlenmiştir.

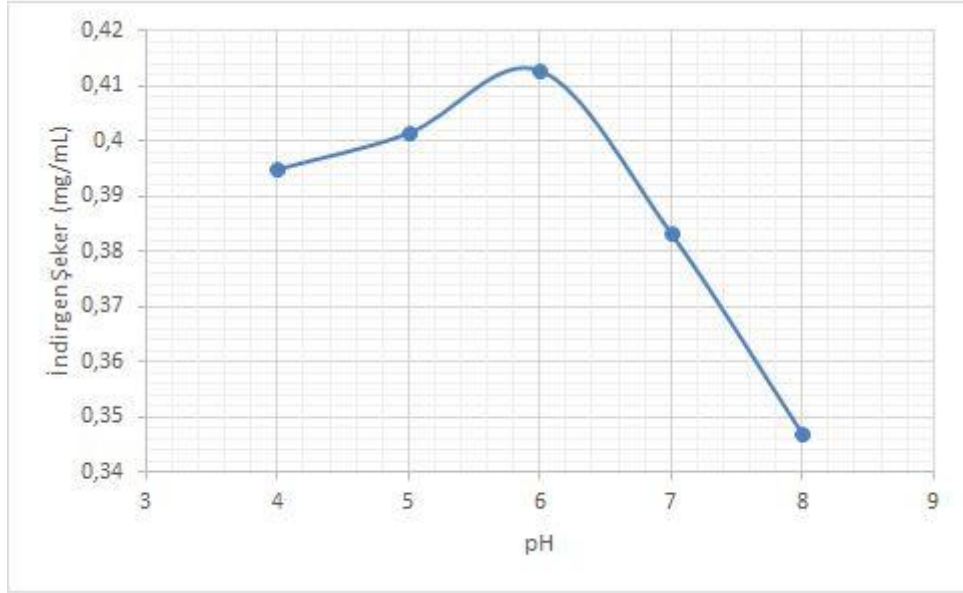


Şekil 4.6. 50°C Sıcaklıkta pH 4.0-8.0 Arasında Enzim Aktivitesi

Enzimin en iyi aktivite gösterdiği 30°C sıcaklıkta ve pH 6.0’daki aktivitesi ile 50°C sıcaklıkta ve pH 7.0’deki aktivitesi karşılaştırıldığında enzim 30°C’ye göre 50°C’de %35 daha düşük aktivite göstermiştir.

4.3.4. 60°C Sıcaklıkta Enzim Aktivitesi

Enzimin 60°C sıcaklıkta pH 4.0-8.0 arasında gösterdiği aktivite sonuçları Şekil 4.7’de verilmiştir. Yapılan sıcaklık denemeleri içinde 60°C sıcaklıkta belirlenen enzim aktivitesi, enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri olan 30°C’ye göre oldukça düşüş göstermiştir. Enzim 60°C sıcaklıkta maksimum aktiviteyi pH 6.0’da göstermiştir. pH 4.0, 5.0, 7.0 ve 8.0 de enzim aktivitesi düşük olup, pH 6.0’daki aktivite değeri ile karşılaştırıldığında pH 6.0’ya göre pH 4.0, 5.0, 7.0 ve 8.0’de sırası ile %4.4, %3, %7 ve %16 daha düşük aktivite belirlenmiştir.

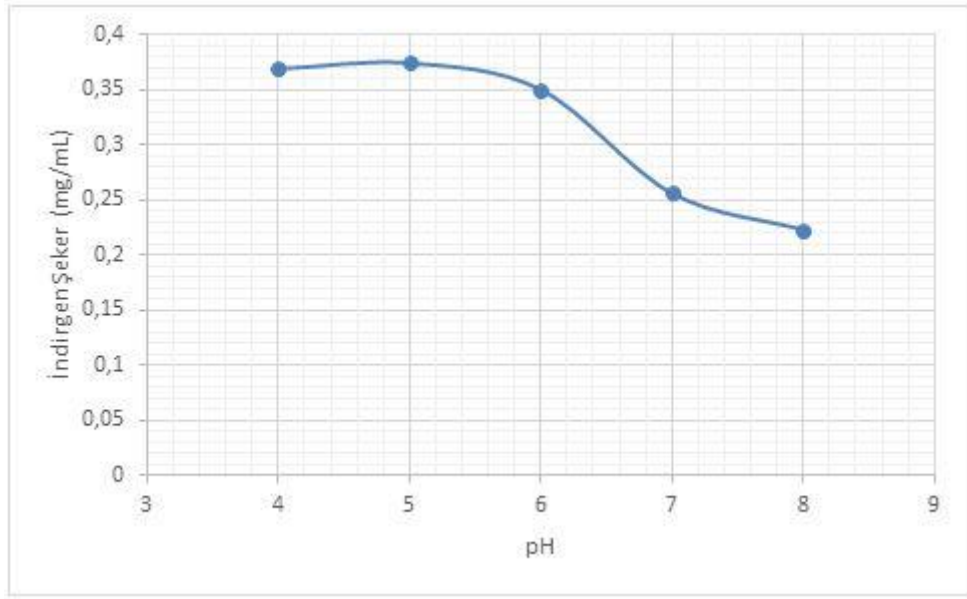


Şekil 4.7. 60°C Sıcaklıkta pH 4.0-8.0 Arasında Enzim Aktivitesi

Enzimin en iyi aktivite gösterdiği 30°C sıcaklıkta ve pH 6.0’daki aktivitesi ile 60°C sıcaklıkta ve pH 6.0’daki aktivitesi karşılaştırıldığında enzim 30°C’ye göre 60°C’de %50.5 daha düşük aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Sıcaklığın iki katına çıkışı aktiviteyi %50.5 düşürmüştür.

4.3.5. 70°C Sıcaklıkta Enzim Aktivitesi

Enzimin 70°C sıcaklıkta pH 4.0-8.0 arasında gösterdiği aktivite sonuçları Şekil 4.8’de verilmiştir. Yapılan sıcaklık denemeleri içinde 70°C sıcaklıkta belirlenen enzim aktivitesi, enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri olan 30°C’ye göre oldukça düşüş göstermiştir. Enzim 70°C sıcaklıkta maksimum aktiviteyi pH 5’da göstermiştir. pH 4.0, 6.0, 7.0 ve 8.0 de enzim aktivitesi düşük olup, pH 5.0’deki aktivite değeri ile karşılaştırıldığında pH 6.0’ya göre pH 4.0, 5.0, 7.0 ve 8.0’de sırası ile %1.3, %6.4, %31 ve %41 daha düşük aktivite belirlenmiştir.

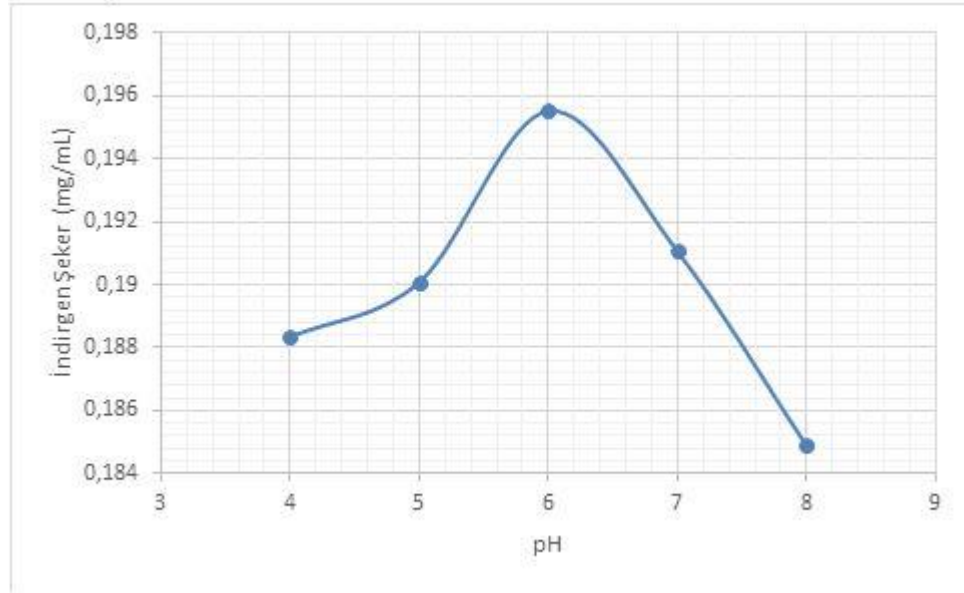


Şekil 4.8. 70°C Sıcaklıkta pH 4.0-8.0 Arasında Enzim Aktivitesi

Enzimin en iyi aktivite gösterdiği 30°C sıcaklıkta ve pH 6.0’daki aktivitesi ile 70°C sıcaklıkta ve pH 5’deki aktivitesi karşılaştırıldığında enzim 30°C’ye göre 70°C’de %55.1 daha düşük aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

4.3.6. 80°C Sıcaklıkta Enzim Aktivitesi

Enzimin 80°C sıcaklıkta pH 4.0-8.0 arasında gösterdiği aktivite sonuçları Şekil 4.9'da verilmiştir. Yapılan sıcaklık denemeleri içinde 80°C sıcaklıkta belirlenen enzim aktivitesi, enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri olan 30°C'ye göre oldukça düşüş göstermiştir. Enzim 80°C sıcaklıkta maksimum aktiviteyi pH 6.0'da göstermiştir. pH 4.0, 5.0, 7.0 ve 8.0 de enzim aktivitesi düşük olup, pH 6.0'daki aktivite değeri ile karşılaştırıldığında pH 6.0'ya göre pH 4.0, 5.0, 7.0 ve 8.0'de sırası ile %7.3, %2.5, %2 ve %5.6 daha düşük aktivite belirlenmiştir.



Şekil 4.9. 80°C Sıcaklıkta pH 4.0-8.0 Arasında Enzim Aktivitesi

Enzimin en iyi aktivite gösterdiği 30°C sıcaklıkta ve pH 6.0'daki aktivitesi ile 80°C sıcaklıkta ve pH 5.0'deki aktivitesi karşılaştırıldığında enzim 30°C'ye göre 80°C'de %76.6 daha düşük aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Bu çalışmada izole edilen anaerobik enzim mezofilik olarak en iyi 30°C sıcaklıkta çalışmıştır. Bu sıcaklıkta ve diğer sıcaklıklarda enzimin optimum çalışma pH aralığı 6.0-7.0 olarak belirlenmiştir. 30°C sıcaklıkta 6.0 optimum pH olarak belirlenmiş ve yapılan literatür taramalarında üretilen enzimin özelliklerinin bir çok araştırmada belirtilen bulgularla benzer olduğu görülmektedir.

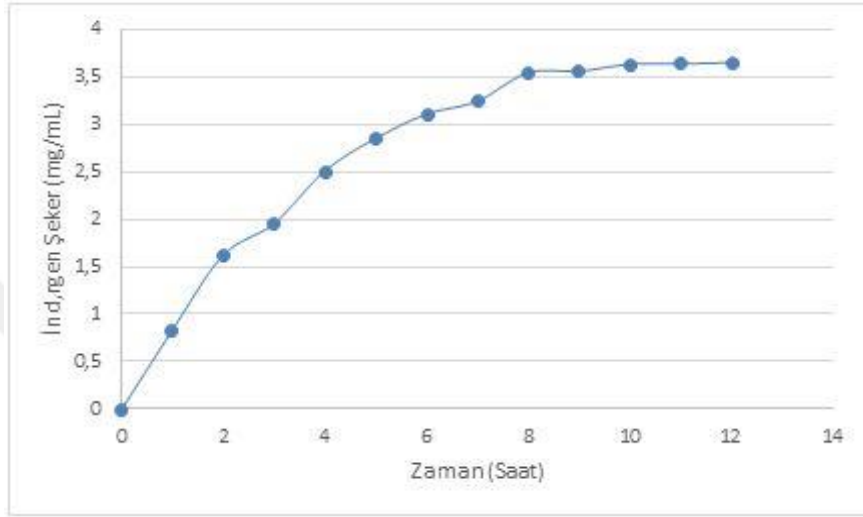
Benzer olarak amilaz çalışmalarında anaerobik *C. acetobutylicum* ATCC 824'dan izole edilen amilazın optimum çalışma pH'ı 5.6 olarak belirlenmiştir. Bu enzimin mezofilik olduğu ve yüksek sıcaklıklarda aktivitesinin oldukça düşük olduğu, optimum çalışma sıcaklığının 45°C olduğu belirtilmiştir (Swamy ve Seenayya, 1996). Anaerobik α -amilaz bir çok çalışmada termal stabilite göstermediği belirtilmiş, çalışması için ortamda Ca^{2+} iyonlarına gereksinim duyulduğu belirtilmiştir. *C. perfringens* NCTC 8679 kullanılarak üretilen α -amilazın ortamda kalsiyum olmadan pH 6.5 ve 30°C sıcaklıkta yüksek aktivite gösterdiği ve enzim aktivitesinin 0.40 U/mL olduğu belirlenmiştir (Shih ve Labbe, 1995).

Anaerobik termal stabil özellikte bir enzimi Swamy ve Seenayya (1996), *Clostridium thermosulfurogenes* SV9 kullanarak üretmişler ve üretilen α -amilazın yüksek sıcaklıklarda aktif olduğu belirtilmektedir. Enzimin çalışma sıcaklığını olarak 60°C ve optimum çalışma pH'ı olarak pH 7.0 belirtilmiştir. 60°C sıcaklıkta ve pH 7.0'de üretilen enzimin amilaz aktivitesi 0.60 U/mL olarak belirlenmiştir.

4.4. Zamana ve Substrat Konsantrasyonuna Bağlı Enzim Aktivitesi

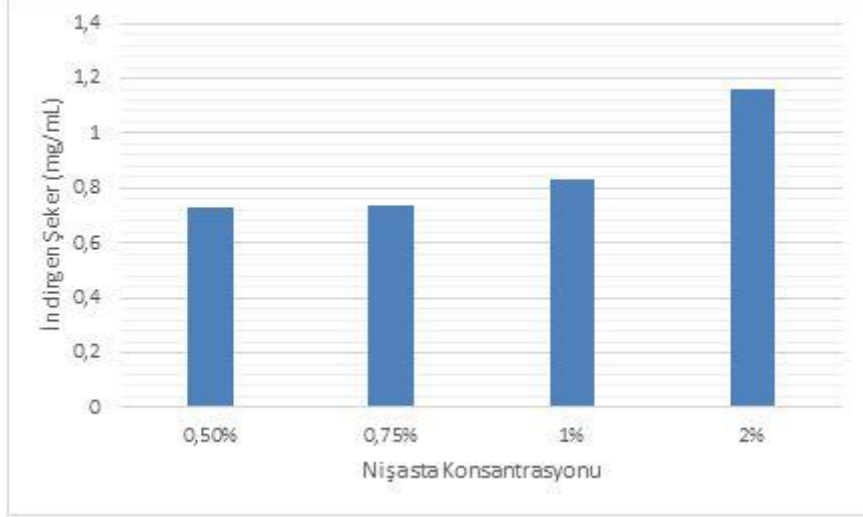
Çalışmada izole edilen enzimin pH ve sıcaklık optimizasyonu yapılmış ve enzimin optimum çalışma koşulları pH 6.0 ve 30°C sıcaklık olarak belirlenmiştir. Bu sıcaklık koşullarında enzimin zamana bağlı substrat dönüşümünü belirlemek için, 0.5 mL %1'lik nişasta çözeltisi ve 0.5 mL enzim kullanılarak pH 6.0'de ve 30°C sıcaklıkta 12 saat süre ile ağzı kapalı cam tüplerde sıcak su banyosunda

inkübe edilen örneklerin zamana bağlı olarak nişasta parçalanması ile oluşan indirgen şeker değerleri Şekil 4.10'de verilmiştir.



Şekil 4.10. Zamana Bağlı Enzim Aktivitesi

Zaman bağlı olarak yapılan enzimatik hidroliz çalışmasında enzimin substrat parçalama düzeyinin zamanla arttığı ve 8 saat sonra parçalanmış nişastadan açığa çıkan indirgen şeker oranı sabitlenmiştir. Benzer sonuçlar Padul ve ark., (2013) tarafından belirtilmiştir. Çalışma sonunda açığa çıkan indirgen şeker oranı 3.65 mg/mL olup, bu değer 1. saatte açığa çıkan şeker oranı ile karşılaştırıldığında (0.833 mg/mL) 12 saate açığa çıkan indirgen şeker oranı 4.38 kat daha fazladır. Enzim zamana bağlı olarak substrat ile daha fazla zaman etkileştiğinde katalizleyebildiği substrat miktarı fazla olmaktadır. Zaman bağlı olarak artan bir hızla substrat parçalama hızı zamanla yavaşlamakta ve bir süre sonra durmaktadır. Bunun sebebi enzimin zamanla bozulmaya başlaması veya parçalanma sonucu oluşan ürünlerin enzimin çalışmasını engellemesinden ileri gelmektedir (Simair, ve ark., 2017). Zamana bağlı olarak yapılan nişastanın enzimatik hidroliz sonuçları Şekil 4.11'de verilmiştir.



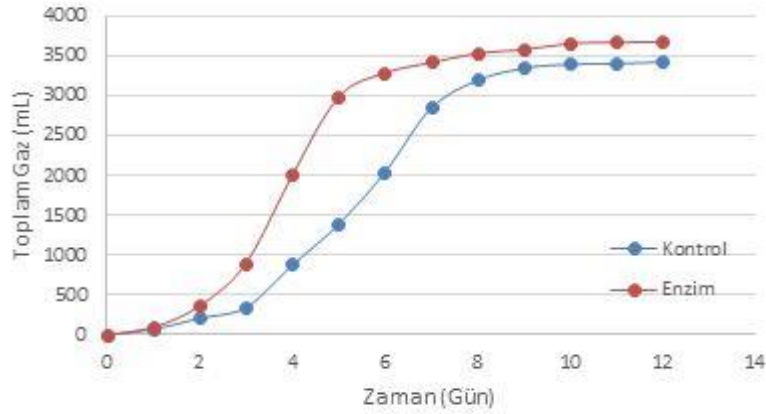
Şekil 4.11. Konsantrasyona Bağlı Enzim Aktivitesi

Substrat konsantrasyonu % 0.5, 0.75, 1 ve 2 nişasta olarak yapılan çalışmada, 1 saat süre sonunda enzimatik hidroliz ile açığa çıkan indirgen şeker oranları sırası ile 0.73, 0.74, 0.83 ve 1.16 mg/mL olarak belirlenmiştir. Enzim konsantrasyonunun sabit olduğu bu çalışmada substrat konsantrasyonu değiştirilmiş ve sonuçlar şekil 4.12’de verilmiştir. Substrat konsantrasyonun artışı aynı zamanda açığa çıkan indirgen şeker oranında artışa neden olmuştur. Substrat konsantrasyonu yarıya indiğinde açığa çıkan indirgen şeker oranı %12 düşerken, substrat konsantrasyonu iki katına çıktığında açığa çıkan indirgen şeker oranı %39 artmıştır.

4.5. Biyogaz Sisteminde Enzim Uygulaması

Bu çalışmadaki nişasta içerikli atık suların kullanılarak biyogaz üretiminde anaerobik *Clostridium*’lardan izole edilen amilazın biyogaz verimliliği üzerine etkisi belirlenmiştir. Çalışmada bazı karakteristik özellikleri açığa çıkarılan enzim biyogaz üretiminde yardımcı inokulant olarak kullanılmıştır.

Bu çalışmada anaerobik sistemde biyogaz üretimi 37°C sıcaklıkta batch sistemde belirlenmiştir. Anaerobik bakteri aşısı kültürü Osmaniye Katı Atık Düzenli Depolama Sahası'ndan alınmıştır. Mikrobiyal aşısı kültürü gelişimi sentetik nişastalı besi ortamı ile sağlanmıştır. Sentetik besi ortamına karbon kaynağı olarak 10 g/L nişasta eklenmiş ve 37°C sıcaklıkta biyogaz üretimi takip edilmiştir. Çalışmada enzim kullanılması ile anaerobik biyogaz üretimi ve verimliliğini belirlemek 3 L biyogaz çamuruna 30 mL amilaz enzimi eklenmiştir. Çalışmada kontrol grubu olarak enzim eklenmeden sadece nişasta beslenmiş sistemde 12 gün süre ile biyogaz üretimi ve verimliliği belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.12'de verilmiştir.



Şekil 4.12. Enzim Uygulamasının Üretimine Etkisi

37°C sıcaklıkta yapılan çalışmada 12. günde enzim bulunmayan kontrol grubunda 3400 mL %55 CH₄, % 44 CO₂ gazından oluşan biyogaz üretilmiştir. Enzim eklenen deney grubunda ise 3670 mL %55 CH₄, % 44 CO₂ gazından oluşan biyogaz üretilmiştir. Enzim eklenmenin üretilen gaz miktarı üzerine etkisi 270 mL fazla olup enzim eklenmesiyle 37°C sıcaklıkta %7.3 fazla biyogaz üretimi gerçekleşmiştir. Biyogaz üretimi üzerindeki %7.3'lük farkın yanı sıra Şekil 4.12'de

görüldüğü gibi enzim eklenmesinin en büyük farkı oluşan biyogazın enzim eklenmeyen sisteme göre daha hızlı olmasıdır. Biyogaz üretimi 8. günde dengeye ulaşmış 4 günlük fark olarak karşımıza çıkan bu durum sistemde daha kısa sürede biyogaz üretimi yapılabilmesini sağlayacak önemli bir sonuçtur.

Yapılan bu çalışmada anaerob *Clostridium*’lardan izole edilen amilazın optimum 37°C sıcaklıkta nişasta kaynaklı atıkların olduğu biyogaz sistemlerinde kullanmak için uygun bir enzim olabileceği görülmüştür. Enzim kullanılması ile %7.3 fazla biyogaz üretimi ve 4 günlük bekleme süresinin kısaltılması gibi önemli bir sonuç elde edilmiş bu sonuç bir çok tesiste kurulum maliyetini düşürücü etki gösterebilir.

Biyogaz sistemlerine enzim eklenmesi sistemin verimi arttırmak ve kullanılan hammadde girişlerini azaltmak için oldukça önemlidir. Bu konuda Kolb, (2015) anaerobik atıksu çamurundan biyogaz üretimi yapılan sisteme Micropan Biogas enzimi eklenerek 37 ° C mezofilik sıcaklık üretilen metan gazının 319 mL’den %8’lik bir artışla 339 mL’ye yükseldiği belirtilmiştir. Aynı sisteme Novozymes enzim karışımı ilave edildikten sonra biyogaz artışı %45’e kadar çıktığı belirtilmiştir.

Benzer olarak enzim kullanılmasının biyogaz sistemlerinde verim artışı üzerine etkisinin belirlenmesinde amilaz, lipaz ve proteaz karışımı kullanılmış ve %10 enzim konsantrasyonunda yapılan çalışmada %48 gaz veriminde artış olduğu belirtilmiştir (Lipinski ve Umiejewska, 2017).

Dubrovskis ve ark., (2019) biyogaz üretiminde α -amilaz ve Ksilanaz ilave edilmiş saman peletlerinden biyogaz üretiminde enzim ilavesinin metan üretimini arttırdığı belirtilmiştir. 16 biyoreaktörde yapılan çalışmada 38°C sıcaklıkta samandan kullanılan enzimler ile 0.655 L ve 0.301 L biyogaz üretimi sağlanmıştır.

Odnell ve ark., 2016. biyogaz tesislerinde verimliliği arttırmak için kullanılan enzimlerin biyogaz sistemlerinde uzun süre kalamadığını ve eklenen enzimlerin anaerobik biyogaz sistemlerinde kalma süresi 24 saatten daha az

olduğunu ve özellikle biyogaz sistemlerinde çalışabilecek enzimlerin üretilmesinin gerektiğini belirtilmiştir.

Liew ve ark., (2020) biyogaz sistemlerinde enzim kullanmanın biyogaz veriminde %7 ile 70 arasında artış sağladığını enzim kullanmanın sadece biyogaz veriminde artış ile değil işletme maliyetlerinin düşürülmesi, çalışma kolaylığı ve farklı substratlar kullanma kolaylığı sağladığını belirtmiştir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada katı atık düzenli depolama sahasından izole edilen *Clostridium* sp. suşları kullanılarak amilaz enzimi üretilmiş ve üretilen amilazın optimum çalışma koşulları ve bu enzim kullanılarak biyogaz sistemlerine enzim eklenmesinin biyogaz verimine etkisi belirlenmiştir.

Çalışmada izole edilen bakteri mezofilik olup üreme sıcaklığı 37°C'dir. Bu bakteriden üretilen enziminde mezofilik olduğu optimum 30°C sıcaklıkta maksimum aktivite gösterdiği belirlenmiştir. 30°C sıcaklıkta enzimin optimum çalışma pH şartları pH 6.0 olarak belirlenmiştir.

37°C sıcaklıkta yapılan çalışmada 12. günde enzim bulunmayan kontrol grubunda 3400 mL %55 CH₄, %44 CO₂ gazından oluşan biyogaz üretilmiştir. Enzim eklenen deney grubunda ise 3670 mL %55 CH₄, %44 CO₂ gazından oluşan biyogaz üretilmiştir. Enzim eklenmenin üretilen gaz miktarı üzerine etkisi 270 mL fazla olup enzim eklenmesiyle 37°C sıcaklıkta %7.3 fazla biyogaz üretimi gerçekleşmiştir.

Yapılan bu çalışmada anaerob *Clostridium*'lardan izole edilen amilazın optimum 37°C sıcaklıkta mezofilik nişasta kaynaklı atıkların olduğu biyogaz sistemlerinde kullanmak için uygun bir enzim olduğu, enzim kullanılması ile biyogaz üretiminin %7.3 arttığı ve 4 günlük bekleme süresinin kısaldığı tespit edilmiştir.

Öneriler;

Biyolojik olarak enerji üretim sistemlerinde nişasta kaynaklı biyoteknolojik ürünlerin kullanılması verimliliği arttıran ve maliyeti düşüren uygulamalar için anaerobik enzimlerin kullanılması uygun olabilir.

Bu çalışmada kullanılan enzim mezofilik olup sadece mezofilik biyogaz sistemlerinde kullanılabilir.

Enzim uygulaması aynı miktar substrat ile daha fazla gaz elde edilip, biyogaz sistemlerinin verimliliği arttırılabilir.

Enzim kullanılması ile biyogaz sistemlerinde alıkonma süresi kısaltılabileceği gibi biyogaz üretiminde de artış sağlanabilir.



KAYNAKLAR

- Aehle, W., 2007. Enzymes in Industry Production and Application. Wiley VCH Verlag, Weinheim, p. 484.
- Angelidaki, I., Karakashev, D., Batstone, D.J., Plugge, C.M., Stams, A.J., 2011. Biomethanation and its Potential Methods Enzyme, 494, 327–351.
- Anonymous, 1978. Buffer Solutions. Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, s. 370-382.
- Bertoldo, C., Antranikian, G. 2002. Starch-Hydrolyzing Enzymes From Thermophilic Archaea and Bacteria. Current Opinion in Chemical Biology, 6(2), 151–160.
- Buchholz, K., and Seibel, J., 2008. Industrial Carbohydrate Biotransformations. Carbohydrate Research, 343, 1966-1979.
- Dipali Parmar, A. P., 2012. Characterization of Amylase Producing Bacterial Isolates. Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences , 1, 42-47.
- Dona, A.C., Pages, G., Gilbert, R.G. and Kuchel, P.W., 2010. Digestion of Starch: in Vivo Andin Vitro Kinetic Models Used to Characterize Oligosaccharide or Glucose Release J. Carb.Pol. 80, 599–617.
- Dubnovitsky, A.P., Kapetaniou, E.G. and Papageorgiou, A.C., 2005. Enzyme Adaptation to Alkaline pH: Atomic Resolution (1.08 Å) Structure of Phosphoserine Aminotransferase From Bacillus Alcalophilus. Protein Science. 14,97–110.
- Dubrovskis V., Plume I. Straume, I., 2019. The Production of Methane From the Straw Pellets With Addition of Enzymes *Agronomy Research* 17(4), 1591–1598.
- El-Fallal, Amira, M. A.S., 2012. Starch and Microbial α -Amylases: From Concepts to Biotechnological Applications. in C.-F. Chang, Carbohydrates -

- Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology (pp. 459-476). CC BY 3.0 Licence.
- Gibbs, B.M., Hirsch, A., 1956. Spore Formation By *Clostridium* Species in An Artificial Medium., The Society for Applied Microbiology 67,162.
- Godfrey, T., West, S.I., 1996. Introduction to Industrial Enzymology. In *Industrial Enzymology*, edn 2. Edited by Godfrey T, West S. London: Macmillan Press, 1-8.
- Gupta, A., Gupta,V.K., Modi, D.R. and Yadava, L.P., 2008. Production and Characterization of α -amylase From *Aspergillus Niger* Biotechnol 1,1–6.
- Gurung, Neelam., Sumenta R., 2012. A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in BioMed Research International, 1-18.
- Haki, G. D. and Rakshit, S. K., 2003. Developments in Industrially Important Thermostable Enzymes: a Review Bioresour Technol, 89, 17-34.
- Hyun, H.H., Zeikus, J.G., 1985. General and Biochemical Characterization of Thermostable Extracellular β -Amylase from *Clostridium thermosulfurogenes* Applied and Environmental Microbiology, 49, 1162-1167.
- Juge, N., Nohr, J., Coeffet, M.F.L.G., Kramhoft,B., Furniss, C.S.M., Planchot,V., Archer, D.B., Williamson, G. and Svensson, B., 2006. The Activity of Barley α -Amylase On Starch Granules is Enhanced By Fusion of A Starch Binding Domain from *Aspergillus N Iger* Glucoamylase Biochem Biophysica Acta, 8, 275–284.
- Liaquat, R., Kaleem, S., Azeem, A., Jamal A. And Ishtiaq, M. A., 2015. Production and Characterization of α -Amylase From Indigenously Isolated Bacterial Strains Treating Organic Waste in Anaerobic Digester, Pakistan Journal of Agricultural Sciences., 52, 895-903
- Liew, Y.H., Chan, Y.J., Manickam, S., Chong, M.F., Chong, S., Tiong, T.J., Lim, J.W., Pan, G.T., 2020. Enzymatic Pretreatment to Enhance Anaerobic

Bioconversion of High Strength Wastewater to Biogas: A Review, Science of The Total Environment Volume 713,136373

- Lipinski, K., Umiejewska, K., 2017. Application of Multi Enzymatic Hydrolysis for Improving The Efficiency of The Biogas Production in Solid Waste Fermentation Process in Ostróda WWTP, E3S Web of Conferences, 22, 00105.
- Kaur, A., Soni, S.K., Gupta, J.K., 2003. A Solid State Fermentation Based Bacterial α -Amylase and Fungal Glucoamylase System and its Suitability for the Hydrolysis of Wheat Starch Process Biochem, 39, 185–192.
- Kolb, S., 2015. Usage Of Hydrolytic Enzymes For Anaerobic Digestion Optimization in A Wastewater Treatment Plant, *Acta hydrotechnica*, 28/48, 65-76.
- Lolasi, F., Amiri, H., Asadollahi, M.A., Karimi, K., 2018. Using Sweet Sorghum Bagasse For Production of Amylases Required for its Grain Hydrolysis via a Biorefinery Platform, *Industrial Crops and Products*, 125, 473–481.
- Lowe, D.A., 2002. Production of Enzymes in: Basic Biotechnology 2. (Colin ratledge and Bjarn Kristiansen eds) Cambridge University Press, UK., 391-407.
- Miller, G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428.
- Mojsov, D.K., 2012. Microbial α -Amylases and Their Industrial Applications: A Review, *International Journal of Management, Industrial Engineering and Engineering*, 583-609.
- Ochoa-Villarreal, M., Aispuro, E., Vargas-Arispuro, I., Martínez-Téllez, M., 2012. Plant Cell Wall Polymers: Function, Structure and Biological Activity of Their Derivatives, 10, 5772-46094.
- Odnell, A., Recktenwald, M., Stensen, K., Jonsson, B.H., Karlsson, M., 2016. Activity, Life Time and Effect of Hydrolytic Enzymes for Enhanced

- Biogas Production From Sludge Anaerobic Digestion, Water Research, 103, 462-471.
- Padul, M.V., Chougale, A.D., Dama, L.B., Chopde R.M., 2013. α -Amylase From Sugarcane Woolly Aphid (*Ceratovacuna lanigera* Zehntner), Trends Biotechnology Research
- Parmar D., Pandey A., 2012. Characterization of Amylase Producing Bacterial "Isolates. Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences, 1, 42-47.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Gathe, M.S., Deshpande, W., 1998. Molecular and Biotechnological Aspect of Microbial Proteases. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62(3):597-635.
- Rama Mohan Reddy, P., Gopal Reddy, G., 1999. Seenayya, Enhanced Production of Thermostable α -Amylase and Pullulanase in The Presence of Surfactants by *Clostridium thermosulfurogenes* SV2. Process Biochemistry, 34, 87-92.
- Sagnak, R., Kargi, F., Kapdan, I.K., 2011. Bio-Hydrogen Production From Acid Hydrolyzed Waste Ground Wheat by Dark Fermentation International Journal Hydrogen Energy, 36 (20), 12803-12809.
- Shanmughapriya, S., Kiran, G.S., Selvin, J., Gandhimathi, R., Baskar, T.B., Manilal, A., Sujith, S., 2009. Optimization, Production and Partial Characterization of an Alkalophilic Amylase Produced by Sponge Associated Marine Bacterium *Halobacterium salinarum* MMD047 Biotechnology and Bioprocess Engineering, 14, 67-75.
- Shaw, A., Bott, R., Day, A.G., 1999. Protein Engineering of α -Amylases For Low pH Performance Current Opinion Biotechnology, 10, 349-352.
- Shen, G.J., Saha, B.C., Lee, Y.E., Bhatnagar L., Zeikus, J.G., 1988. Purification and Characterization of a Novel Thermostable β -amylase From *Clostridium thermosulfurogenes*. Biochemical Journal, 254, 835-40.

- Shih, N.J. and Labbe, R.G., 1995. Purification and Characterization of An Extracellular α -Amylase From *Clostridium perfringens* Type A. *Applied Environmental Microbiology*, 61(5), 1776-1779.
- Sidhu, G.S., Sharma, P., Chakrabarti, T., Gupta, J.K., 1997. Strain Improvement For The Production Of A Thermostable α -Amylase. *Enzyme Microbiology Technology*, 21:525-530
- Simair, A.A., Qureshi, A.S., Khushk, I., Ali, C.H., Lashari, S., Bhutto, M.A., Mangrio, G.S, Lu, C., 2017. Production and Partial Characterization of α -Amylase Enzyme from *Bacillus* sp. BCC 01-50 and Potential Applications., *Biomed Research International*, 9173040
- Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K. M., Soccol, C. R., Pandey, A., 2006. α -Amylase From Microbial Sources: an Over View on Recent Developments *Food Technol Biotechnol*, 44 (2), 173-184.
- Sleat, R., Mah, R.A., Robinson, R., 1984. Isolation and Characterization of An Anaerobic *Cellulolytic bacterium*, *Clostridium cellulovorans* sp. *Applied Environmental Microbiology*, 48, 88-93.
- Souza, P.M., Magalhães, P.O., 2010. Application of Microbial α -Amylase in Industry-A Review *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 850-861.
- Specka, U., Mayer, F., 1993. Cellular Location Activity States and Macromolecular Organization of Glucoamylase in *Clostridium thermosaccharolyticum* *Archives Microbiology*, 160, 284-287.
- Spyridon, Y. L., Achinas, V., Euverink, G.J.W., 2019. Biogas Potential From the Anaerobic Digestion of Potato Peels: Process Performance and Kinetics Evaluation *Energies*, 12, 23-11.
- Srivastava, R.A.K., 1987. Purification and Chemical Characterization of Thermostable Amylase Produced by *Bacillus stearothermophilus*. *Enzyme Microbial Technology*, 9, 749-754.

- Swamy, M.V., Seenayya, G., 1996. Thermostable Pullulanase and α -Amylase Activity From *Clostridium thermosulfurogenes* SV9 Optimization of Culture Conditions for Enzyme Production, *Process Biochem*, 31(2), 157-162.
- Temizkan, G., Arda, N., 2004. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, Nobel Tıp Kitabevi, İst., 345.
- Tran, H.T. M., Cheirsilp, B., Hodgson, B., Umsakul, K., 2010. Potential Use of *Bacillus Subtilis* in a Co-Culture With *Clostridium Butylicum* For Acetone–Butanol–Ethanol Production From Cassava Starch, *Biochemical Engineering Journal*, 48, 260–267.
- Vielle C., Zeikus G. J., 2001. Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses and Molecular Mechanisms for Thermostability *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65, 1-43.
- Vaseekaran, S. B. 2010. Isolation and Identification of a Bacterial Strain Producing Tropical Agricultural Research, 22(1), 1-11.
- Voget, S., Steele, H.L., Streit, W.R., 2006. Characterization of Metagenomederived Halotolerant Cellulase *J Biotechnology* 126, 26-36.
- Wood, T.M., 1988. Preparation of Crystalline, Amorphous and Dyed Cellulase Substrate Methods *Enzymology*, 166, 19-45.
- Zaldivar, J., Nielsen J., Olsson L., 2001. Fuel Ethanol Production From Lignocellulose: A Challenge For Metabolic Engineering and Process Integration *Applied Microbiology Biotechnology*, 56, 17-34.

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Adana’da doğdum. Lisans eğitimimi 2015 yılında Mersin Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Çevre Mühendisliği Bölümü’nde tamamladım. 2016 yılında, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü İş Güvenliği Anabilim Dalı’nda tezsiz yüksek lisans eğitimi tamamladım. 2017 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladım.

