

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GEOBACILLUS SP. TARAFINDAN
TERMOSTABİL α - AMİLAZ ÜRETİMİ

Sennur ÇALIŞKAN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2011

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

GEOBACILLUS SP. TARAFINDAN TERMOSTABİL α -AMİLAZ ÜRETİMİ

Sennur ÇALIŞKAN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Cumhur ÇÖKMÜŞ

Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı kültür stoklarından temin edilen ve amilaz aktivitesine sahip 6 adet *Geobacillus* sp. izolatı ve *Geobacillus stearothermophilus* DSM 22^T standart suşu α -amilaz üretim kapasiteleri yönünden incelenmiştir. 6 adet izolatın ve standart suşun nişasta içeren katı ve sıvı besiyerlerinde amilaz aktivitesi taranmış, oluşturdıkları zon çapı ve 72. saatteki enzim aktiviteleri göz önünde bulundurularak, en yüksek aktiviteye sahip izolat olarak *Geobacillus* sp. D413 (12.10 U/ml/g) seçilmiş ve bundan sonraki çalışmalarda *G. stearothermophilus* DSM 22^T standart suşu ile birlikte kullanılmıştır. Enzim üretiminin zamana bağlı değişiminin izlenmesi sonucunda en yüksek aktivitenin 72. saatte görüldüğü, 96. saatte ise aktivitenin düşüşe geçtiği belirlenmiştir. Bakteriyel çoğalma ve enzim üretimi için en uygun besiyeri pH değerinin 7.0 olduğu ve bu pH değerinde standart suşun enzim aktivitesi 13,6 U/ml/g iken, D413 izolatının enzim aktivitesi 15,38 U/ml/g olarak tespit edilmiştir. Her iki bakterinin de enzim üretimine pH:5.0'ten itibaren başladığı ve pH 7.0'de en yüksek seviyeye ulaştıktan sonra tekrar düşüşe geçtiği belirlenmiştir. Bakteri gelişimi ve enzim üretimi için en uygun sıcaklık değeri 55°C olarak bulunmuştur. Besiyerinde bulunan karbon ve azot kaynaklarının enzim üretimi üzerine etkileri, bileşim ve oranları değiştirilerek belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, nişasta ve maltozlu besiyerlerinin bakteri gelişimi ve α -amilaz üretimi için en uygun besiyerleri olduğunu göstermiştir. Temel substrat olarak kullanılan nişastanın besiyerindeki oranı değiştirilmiş ve sonucunda nişasta miktarıyla enzim üretimi arasında doğru bir orantının olduğu belirlenmiştir. Diğer yandan azot kaynağı olarak kullanılan amonyum kloridin hem bakteriyel çoğalmayı hem de enzim üretimini inhibe ettiği tespit edilmiştir. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık ve pH değerleriyle birlikte stabiliteleri incelenmiştir. Standart suşun enzim aktivitesini gösterdiği optimum sıcaklık 65°C, optimum pH değeri de 7.5 olarak belirlenirken, D413 izolatında bu değerler sırasıyla 65°C ve pH:9.0 olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak; yapılan bu çalışma ile *Geobacillus* sp. izolatının α -amilaz üretim koşulları kısmen optimize edilmiştir.

Ağustos 2011, 57 sayfa

Anahtar Kelimeler: α -amilaz, *Geobacillus* sp., termostabil.

ABSTRACT

Master Thesis

THERMOSTABLE α -AMYLASE PRODUCTION BY *GEOBACILLUS* SP.

Sennur ÇALIŞKAN

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Cumhur ÇÖKMÜŞ

Six *Geobacillus* sp. isolates and standard strain *Geobacillus stearothermophilus* DSM 22^T, which obtained from Ankara University Department of Biology Microbiology Research Laboratory stoked culture and have amylase activity, were analyzed for their α -amylase production capacities. Amylase activity of 6 isolates and standard strain's scanned on solid and liquid nutrient media containing starch, formed zone diameter and considering the enzyme acitivity at 72. hours. *Geobacillus* sp. D413 was selected as maximum of activity in isolates; after it used with standard strain in subsequent studies. As a result of monitoring time-dependent change in enzyme production, maximum activity observed at 72. h, in spite of this at 96. h decreased the activity. pH:7.0 was determined as the most appropriate pH of medium for the bacterial growth and enzyme production and this pH value while standard strain's enzyme activity have been identified 13,6 U/ml/g, D413 isolate's enzyme activity have been determined 15,38 U/ml/g. Both bacterias started of the enzyme production at pH:5.0 and their enzyme production decreased from pH 7.0. The most appropriate temperature for bacterial growth and enzyme production was found as 55°C. The medium contained carbon and nitrogen sources effect on the enzyme production was determined by changing the composition and the rates. The results obtained, showed that with starch and maltose medium the most appropriate medium for bacterial growth and enzyme production. Starch, which is used as the basic substrate, have been modified with rate and as a result of this, a direct proportion was determined starch rate with enzyme production. On the other hand, both bacterial growth and enzyme production was inhibited by NH₄Cl, which is used as the nitrogen sources. Stabilities with temperature and pH values of the enzyme which showed maximum activity were investigated. While the optimum temperature which showed the enzyme activity of the standard strain is determined as 65°C, the optimum pH is determined as 7,5. These values were respectively determined as 65°C and pH 9.0 in D413 isolate. As a result, amylase production conditions of the *Geobacillus* sp. D413 isolate and *Geobacillus stearothermophilus* DSM 22^T ATCC have been optimized by this study.

August 2011, 57 pages

Key Words: α -amylase, *Geobacillus* sp., thermostable

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenim sürem boyunca bana her konuda destek veren, bu konuda çalışma imkanı sunarak yardım ve önerilerini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Cumhur ÇÖKMÜŞ'e;

Bu süreçte bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendirip destek olan, çalışmalarından faydalanabilmeme olanak tanıyan sevgili hocam Sayın Dr. Arzu ÇÖLERİ CİHAN'a;

Laboratuvar çalışmalarındaki deneyimiyle ve pozitif düşünmem için verdiği destekle bana çalışmam boyunca yardımcı olan sevgili arkadaşım Nilgün TEKİN'e ve çalışma arkadaşım Melih KOÇ'a;

Tüm hayatım boyunca bana maddi ve manevi destek olan, bana güvenerek verdiğim her kararda arkamda duran sevgisini hiç esirgemeyen sevgili annem, babam ve kardeşime;

Her zor anımda yanımda olan, yüksek lisansım boyunca yardımlarını esirgemeyen ve yanımda olarak bana manevi destek veren Sayın Onur Özgü ÖZDEMİR'e;

Yüksek lisans öğrenimime devam edebilmemi sağlayan ve maddi desteğiyle hayatımı bu yönde değiştiren TÜBİTAK'a

En içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Sennur ÇALIŞKAN

Ankara, Ağustos 2011

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1.GİRİŞ	1
2.1 Termofilik Mikroorganizmalar ve Yüksek Sıcaklığa Dayanıklılık Mekanizması.....	4
2.2 Amilazlar.....	5
2.3 α – Amilazlar	8
2.3.1 α -Amilaz kaynakları	10
2.3.2 Enzim karakteristiği	13
2.3.3 Termostabil α -Amilaz enziminin endüstrideki kullanım alanları.....	15
2.3.3.2 Tekstil endüstrisi.....	17
2.3.3.3 Deterjan endüstrisi.....	18
2.3.3.4 Alkol endüstrisi	18
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	20
3.1 Materyal.....	20
3.1.1 Kullanılan termofilik bakteri izolatları ve standart suş	20
3.1.2 Kullanılan çözeltiler	20
3.1.2.1 NaOH çözeltisi	20
3.1.2.2 DNS (Dinitro salisilik asit).....	20
3.1.2.3 Fosfat tamponu (pH:7.0)	20
3.1.2.4 Lugol solüsyonu.....	20
3.2 Yöntem	21
3.2.1 Bakterilerin geliştirilmesi ve muhafazası.....	21
3.2.2 Amilaz aktivitesinin belirlenmesi ve izolat seçimi.....	21
3.2.3 Enzim üretim koşullarının belirlenmesi	22
3.2.4 Maltozun ekstinksiyon katsayısının hesaplanması	22
3.2.5 Enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	22
3.2.6 Enzim ünitesinin tanımı.....	23
3.2.8 pH'nın enzim üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi	24

3.2.9 Sıcaklığın enzim üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi.....	24
3.2.10 Karbon kaynaklarının enzim üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi.....	24
3.2.11 Azot kaynaklarının enzim üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi	25
3.2.12 Sıcaklık ve pH'nın enzim aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi.....	25
3.2.13 Enzimin sıcaklık ve pH stabilitesinin belirlenmesi	25
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	26
4.1 Amilaz Aktivitesinin Belirlenmesi ve İzolat Seçimi	26
4.2 D413 İzolatının ve Standart <i>G.stearothermophilus</i> ATCC 12980 Suşunun 96 Saatlik Zamana Bağlı α -Amilaz Üretimleri.....	29
4.3 Maltozun Ekstinksiyon Katsayısı	30
4.4 pH'nın Enzim Üretimi Üzerine Etkisi.....	31
4.5 Sıcaklığın Enzim Üretimi Üzerine Etkisi	33
4.6 Farklı Karbon Kaynaklarının Enzim Üretimi Üzerine Etkisi.....	34
4.7 Farklı Azot Kaynaklarının Enzim Üretimi Üzerine Etkisi	36
4.8 Sıcaklık ve pH'nın Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	40
4.9 Enzimlerin Sıcaklık ve pH Stabilitesi.....	42
5. SONUÇ.....	45
KAYNAKLAR	47
ÖZGEÇMİŞ.....	57

SİMGELER DİZİNİ

α	Alfa
β	Beta
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
Ba	Baryum
Ca	Kalsiyum
Co	Kobalt
Cu	Bakır
E.C.	Enzyme Commission
Fe	Demir
<i>G.</i>	<i>Geobacillus</i>
g	Gram
K	Potasyum
M	Molar
Mn	Mangan
Na	Sodyum
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı
Zn	Çinko
%	Yüzde

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Amilolitik enzimlerin nişastayı hidroliz şekilleri ve oluşturdukları ürünler.....	7
Şekil 2.2 Amiloz ve Amilopektin glukoz polimerleri.....	9
Şekil 4.1 <i>Geobacillus</i> sp. izolatlarının nişastalı besiyerinde (pH:7.0) 55°C’de oluşturdukları zonlar.....	27
Şekil 4.2 <i>G. stearothermophilus</i> ve <i>Geobacillus</i> sp. D413’ün nişasta(%1.0)+ yeast ekstrakt (%0,5)+tripton (%1.0) içeren besiyerinde (pH:7.0) 55°C’de enzim üretiminin zamana bağlı değişimi.....	30
Şekil 4.3 Maltoz konsantrasyon eğrisi.....	31
Şekil 4.4 <i>G. stearothermophilus</i> ve <i>Geobacillus</i> sp. D413’ün nişasta(%1.0) +yeast ekstrakt (%0,5)+ tripton (%1.0) içeren besiyerinde, 55°C’de farklı pH değerlerindeki enzim üretimi.....	32
Şekil 4.5 <i>G. stearothermophilus</i> ve <i>Geobacillus</i> sp. D413’ün nişasta (%1.0) +yeast ekstrakt (%0,5) + tripton (%1.0) içeren besiyerinde (pH:7.0) farklı sıcaklıkların enzim üretimine etkisi.....	33
Şekil 4.6 pH:7.0 ve 55°C’de farklı karbon kaynaklarının enzim üretimine etkisi.....	34
Şekil 4.7 pH:7.0 ve 55°C’de farklı nişasta oranlarının enzim üretimi üzerine etkisi.....	35
Şekil 4.8 pH:7.0 ve 55°C’de farklı azot kaynaklarının enzim üretimine etkisi.....	36
Şekil 4.9 Azot kaynaklarının farklı oranlarının <i>G. stearothermophilus</i> ve <i>Geobacillus</i> sp. D413’ün pH:7.0 ve 55°C’deki enzim üretimi üzerine etkisi.....	37
Şekil 4.10 Farklı sıcaklık değerlerinin <i>G. stearothermophilus</i> ve <i>Geobacillus</i> sp. D413’ün pH: 7.0’ deki enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	40
Şekil 4.11 Farklı pH değerlerinin <i>G.stearothermophilus</i> ve <i>Geobacillus</i> sp. D413’ün 65°C’de enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	41
Şekil 4.12 <i>G. stearothermophilus</i> DSM 22 ^T 12980 α-amilazının termal stabilitesi.....	42
Şekil 4.13 <i>Geobacillus</i> sp. D413 α-amilazının termal stabilitesi.....	42

Şekil 4.14 <i>G. stearothermophilus</i> DSM 22 ^T 12980 α-amilazının pH stabilitesi.....	43
Şekil 4.15 <i>Geobacillus</i> sp. D413 α-amilazının pH stabilitesi.....	44

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Bazı <i>Bacillus</i> türlerine ait nişasta hidrolize eden termostabil enzimler ve kaynakları.....	12
Çizelge 2.2 Mikrobiyal α -amilazların optimum sıcaklıkları ve stabiliteleri	13
Çizelge 2.3 Mikrobiyal α -amilazların optimum pH değerleri ve stabiliteleri.....	14
Çizelge 2.4 Metal iyon konsantrasyonunun α -amilazların aktivitesi üzerindeki etkisi.....	15
Çizelge 2. 5 Bazı amilazların Ca^{+2} iyonu gereksinimleri.....	17
Çizelge 2. 6 Amilazların endüstrinin çeşitli alanlarında kullanımı.....	19
Çizelge 4.1 Katı ve sıvı besiyerindeki aktiviteye göre izolat seçimi	26
Çizelge 4.2 <i>G. stearothermophilus</i> ve <i>Geobacillus</i> sp. D413'ün nişasta(%1.0) +yeast ekstrakt (%0,5)+ tripton (%1.0) içeren besiyerinde (pH:7.0) 55°C'deki enzim üretimi.....	29
Çizelge 4.3 Farklı karbon ve azot kaynaklarının enzim üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi.....	39

1.GİRİŞ

Enzimler kimyasal tepkimelerde katalizör görevi yapan hayvan, bitki ve mikroorganizmalardan salgılanan protein yapısında moleküllerdir. Enzimler hücre içerisinde meydana gelen binlerce tepkimenin hızını ve özgüllüğünü kendisi değişikliğe uğramadan düzenleyebilirler (Bhat 2000).

İnsanlar gerçekte binlerce yıl öncesinden bu yana enzimlerden yararlanmaktadır. Örneğin alkol fermantasyonu, bira ve ekmek yapımı gibi işlemler ilk biyoteknolojik prosesler olarak tanımlanabilirler. Buna karşılık enzimler hakkında bilimsel denebilecek araştırma ve bulgular ancak geçtiğimiz yüzyılda gözlenmeye başlanmıştır. 1783 yılında Spallanzani' nin atmaca mide suyunun eti eritebildiğini bulması, 1811 yılında Kirchoff' un buğday nişastasının zamanla dekstrin ve şekerlere dönüştüğünü belirlemesi, 1830 yılında Robiquet, Boutron ve Chalan'ın amigdalinin acı badem tarafından hidrolizlendiğini keşfetmesi enzimoloji konusundaki ilk çalışmalar olarak gösterilebilir. Payen ve Persoz'un 1833 yılında nişastayı şekere dönüştüren termolabil bir maddeyi alkol çöktürmesiyle elde etmeleri enzimoloji alanındaki en önemli kilometre taşlarından biri olmuştur. Bugün amilaz olarak bilinen bu enzim o günlerde diastaz olarak adlandırılmıştı ve günümüzde enzimlere ilişkin pek çok geleneksel ve tüm sistematik adlandırmalardaki -ase eki kaynağını bu çalışmadan almıştır. Enzim terimini ilk kullanan ise 1878 yılında Kühne olmuştur.

Enzimler, Enzim Komisyonu tarafından sistematik olarak 4 numarayla tanımlanır ve E.C. X.Y.Z.V şeklinde gösterilirler. Bu gösterimde 'E.C.' Enzim Komisyonu'nu, 'X' 6 büyük gruptan birini, 'Y' bir alt sınıfı, 'Z' ikinci alt sınıfı ve 'V' ise enzim numarasını vermektedir. Örneğin, α -amilazlar için bu numara 3. 2. 1. 1' dir. '3' hidrolazları, '2' glukozil bileşiklerine etki edenleri, '1' glukozidazları ve '1' α -amilazları simgelemektedir.

Günümüzde endüstriyel alanda kullanılan enzimler genel olarak mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bununla birlikte çok az bir kısmı da bitkisel ve hayvansal kaynaklı olarak sağlanmaktadır. Enzim kaynağı olarak mikroorganizmaların tercih edilmesinin nedenleri;

- yan ürün oluşturmalarının az olması,
- aktivitelerinin yüksek olması,
- daha ekonomik olması,
- stabiliteye sahip olması,
- yüksek oranlarda ve saflıkta üretilebilmeleridir (Wiseman 1987, Horikoshi 1999).

Enzim teknolojisi; ekonomik, etkili ve biyoteknolojik tekniklere olan büyük ihtiyaç nedeniyle ilerleme kaydetmiştir. Biyoteknoloji sayesinde, yeni tür enzimlerin büyük ölçeklerde ve ekonomik olarak üretilmesi mümkün olmuştur. Buna göre bir enzimin herhangi bir endüstri alanında kullanılabilirliği; maliyet bakımından ucuz olmasını, çok farklı alanlarda kullanılabilme özelliğinde olmasını ve en önemlisi de enzimin alerjik ya da toksik etkiye sahip olmamasını gerektirmektedir (Wiseman 1987).

Ticari olarak kullanılan enzimlerin %59'unu proteazlar, %28'ini karbonhidratazlar, %3'ünü lipazlar ve %10'unu ise diğer enzimler oluşturmaktadır. Karbonhidratazlar grubuna giren α -amilaz enzimi %13'lük oran ile önemli bir yer tutmaktadır (Wiseman 1987).

Endüstride yaygın olarak kullanılan birçok enzimatik reaksiyon yüksek sıcaklıklarda gerçekleşmektedir. Enzimler protein yapısında olduğu için reaksiyonun gerçekleştiği bu yüksek sıcaklıklara dayanamamakta ve yapısı bozulmaktadır. Bu nedenle son yıllarda termostabil enzimler, endüstride ve biyoteknolojide ilgi çekici hale gelmiştir. Yüksek sıcaklıklarda enzimatik reaksiyonlar gerçekleştirmek pek çok fayda sağlamaktadır. Daha yüksek tepkime hızı ve proses verimine olanak tanırken, aynı zamanda vizkoziteyi düşürüp substrat difüzyon katsayısını, substrat ve ürün çözünürlüğünü artırır (Mozhaev 1993, Krahe vd. 1996). Yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilen biyoteknolojik üretim süreçlerinin en önemli avantajı ise yaygın mezofiller tarafından meydana getirilebilecek kontaminasyon riskinin azaltılmasıdır.

İzin verilen yüksek sıcaklıklardaki işlemler biyoyararlılık ve organik bileşenlerin çözünürlüğü üzerinde önemli bir etkisi vardır ve böylece etkili bir biyolojik iyileştirme sağlanır (Becker 1997).

Günümüz endüstrisinde en çok kullanılan termostabil enzimler amilazlardır. Amilazlar gıda endüstrisinden, deterjan üretimine, eczacılıktan tekstil endüstrisine kadar yaygın olarak kullanılmakta ve dünya enzim üretiminin %30' unu oluşturmaktadır (Van Der Maarel vd. 2002).

α -Amilaz enziminin endüstriyel üretimine ilk kez Japonya'da 1939 yılında *Bacillus subtilis* kullanılarak başlanmıştır. 1970'lerde ise *B. subtilis* ve *B. licheniformis* α -amilaz enzimi üretimi için geniş çapta kullanılmaya başlanmıştır (Sarıkaya 1995)

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Termofilik Mikroorganizmalar ve Yüksek Sıcaklığa Dayanıklılık Mekanizması

Mikroorganizmalar, diğer tüm canlılar gibi yaşamak zorunda oldukları ortama uyum sağlar ve yaşamlarını sürdürürler. 55°C ve üzerindeki sıcaklıklardaki çevre koşullarına adapte olmuş mikroorganizmalara termofilik mikroorganizmalar denir. Termofil organizmalar termotolerant veya termofil, hipertermofil ve ekstremtermofil olmak üzere üç grup içerisinde sınıflandırılmaktadır. 60-115°C arasında yaşayan organizmalar genel olarak termofil olarak adlandırılmaktadır. 80°C ve daha yüksek sıcaklıklarda yaşayan organizmalar ekstremtermofil olarak tanımlanırken, 60-80°C arası hipertermofil, 50-60°C arası termofil veya termotolerant şeklinde sınıflandırılmaktadır (Arıkan vd. 2003).

Bakteriyolojinin hemen hemen ilk dönemlerinde, termofilik bakterilerin varlığı biliniyordu. *Thermus aquaticus* ilk karakterize edilen hipertermofilik bakteridir. Termofilik bakteriler ilk kez 1879 yılında Miquel tarafından 72°C'de çoğalabilen bakteriler olarak izole edildi. Miquel bu bakterileri nehir, çamur, toprak, toz ve kanalizasyon numunelerinden elde etmiştir (Jenkins 1999).

Termofilik mikroorganizmaların biyokatalitik potansiyelleri ve enzimleri üzerinde birçok araştırmalar yapılmıştır (Gomes ve Steiner 2004). Termofilik mikroorganizmaların mezofilik mikroorganizmalara göre yüksek üreme hızları, son ürünün kolay kazanılması, yüksek işlem stabilitesi ve verimi, nişasta selüloz gibi doğal polimerleri doğrudan fermente edebilmeleri gibi birçok avantajları vardır.

Tanımlanmış olan ilk spor oluşturmeyen termofil anaerob bakteri *Methanobacterium thermoautotrophicum*'dur (Zeikus ve Wolfe 1972). Günümüze kadar elde edilen bilgilere göre anaerobik olan termofil mikroorganizmaların çeşitliliği, aerobik termofil mikroorganizmalara göre daha fazladır ve çok yüksek sıcaklıklarda geliştirilmeleri daha kolaydır. Ayrıca zorunlu anaerobik olan mikroorganizmalar yüksek oranda tuz konsantrasyonu ve düşük pH ortamlarına adaptasyon sağlamaktadır (Lowe vd. 1993).

Termofil mikroorganizmaların diğ er canlılar gibi aynı enzimleri içerirdikleri ancak bunların enzimlerinin daha termostabil, proteoliz ve denatürasyona dayanıklı olduğı anlaşılmıştır (Kumar ve Nussinov 2001).

Termofilik mikroorganizmaların yüksek sıcaklıklardaki ortamlarda yaşayabilmeleri için hücreyi dayanıklı hale getirdiğı ve hücre membranlarındaki doymuş yağ asitlerinin oranının fazla olduğı, yağ asitlerinin hücre için hidrofobik bir ortam oluşturduğı yapılan araştırmalar ile ortaya konmuştur (Herbert ve Sharp 1992).

Termofillerin disülfid bağları ve hidrofobik etkileşimler ile sıcaklığa dayanıklı hale gelebildiğı belirlenmiştir. Ayrıca DNA'larının pozitif süper sarmallar oluşturan revers giraz (reverse gyrase) içerdigi ve bu yapının DNA'nın erime noktasını yükselttiğı ve böylece mikroorganizmayı daha yüksek sıcaklıklara dayanıklı hale getirdiğı saptanmıştır (Lopez 1999, Kumar ve Nussinov 2001).

Bu organizmalar tarafından üretilen ve şaperonlar olarak bilinen özelleşmiş proteinler, denatürasyondan sonra proteinlerin doğal formları gibi tekrar katlanmalarına ve fonksiyonlarının onarılmasına yardımcı olur (Everly ve Alberto 2000).

Termofilik enzimlerin, etki mekanizmalarının mezofilik olanlarla benzer oldukları belirtilmiştir (Adams 1993, Cowan 1992, Danson ve Hough 1998). Bazı termostabil enzimlerin mezofilik konak hücrede ekspresyonu ile termostabilitelerinin bozulmadığı (Niehaus vd. 1999), bu nedenle termofilik enzimlerin yüksek sıcaklıklara adaptasyon için geliştirdikleri moleküler stratejilerin genetik bir özellik olduğı belirtilmiştir (Jaenicke ve Bohm 1998).

2.2 Amilazlar

1811 yılında Kirchoff'un buğday nişastasının zamanla dekstrin ve şekerlere dönüştüğünü belirlemesi ile başlayan amilazların tarihçesi, 1833 yılında Payen ve Persoz'un nişastayı şekere dönüştüren termolabil bir maddeyi alkol çöktürmesiyle elde etmeleri ile önemli aşamalar katetmiştir. 1930 yılında Ohlsson ise malttan elde ettiğı parçalayıcı enzimleri, elde ettiğı şeker tipine göre α ve β -amilazlar olmak üzere ikiye

ayırmıştır (Ohlsson 1930). Bunun dışında amilazlar endo ve ekzoamilazlar olarak da 2 gruba ayrılabilirler. Endoamilazlar nişasta molekülünün iç kısmındaki bağlara etki ederek değişik zincir uzunluğunda düz ve dallanmış oligosakkaritleri meydana getirirler. Ekzoamilazlar ise, nişasta molekülünü indirgen olmayan ucundan parçalarlar.

Günümüzde ise amilazlar, nişastayı parçalama mekanizmasına göre sınıflandırılmışlardır.

α -Amilazlar (E.C. 3.2.1.1): Nişasta molekülündeki amiloz zincirinin α -1,4 bağlarını rastgele parçalayarak son ürün olarak 1/10'u glikoz ve 9/10'u maltoz olan bir karışım meydana getirirler. Enzim amilopektin molekülünün hidrolizinde 1,6 glukozidik bağ ile karşılaştığında bu bağa etki gösterememektedir. Ayrıca bu enzimler nişastanın iç kısımlarındaki α -1,4 bağlarına etki yaptıkları için endoenzimlerdir.

β -Amilazlar (E.C. 3.2.1.2): Nişasta molekülünün indirgen olmayan ucunda ardı ardına gelen maltoz birimlerini uzaklaştıran enzimlerdir. Etkileri, β -1,6 bağlarına gelince durur. Böylece sınır dekstrinler meydana gelmektedir. Hidroliz sonucu açığa çıkan ürünler β -optik konformasyonu gösterdiğinden bu enzimlere de β -amilazlar adı verilmiştir. Genel olarak β -amilazlar nişastanın dış kısmındaki 1,4 bağlarına etki ettikleri için ekzoenzimlerdir. β -amilazlar bitkisel orijinli olup arpa maltı, buğday, tatlı patates ve soya fasülyesinde çok miktarda bulunurken, ilk kez 1974'de bakterilerden de izole edilmiştir (Telefoncu 1993, Sarıkaya 1995). Bakterilerden *Bacillus cereus*, *B. megaterium*, *Pseudomonas* ve *Streptomyces*'lerin β -amilaz içerdikleri tespit edilmiştir (Sarıkaya 1995). β -amilaz, ekmekcilik, biracılık ve nişastanın fermente olabilir bir şeker olan maltoza dönüştürüldüğü işlemlerde kullanılır (Telefoncu 1993, Sarıkaya 1995).

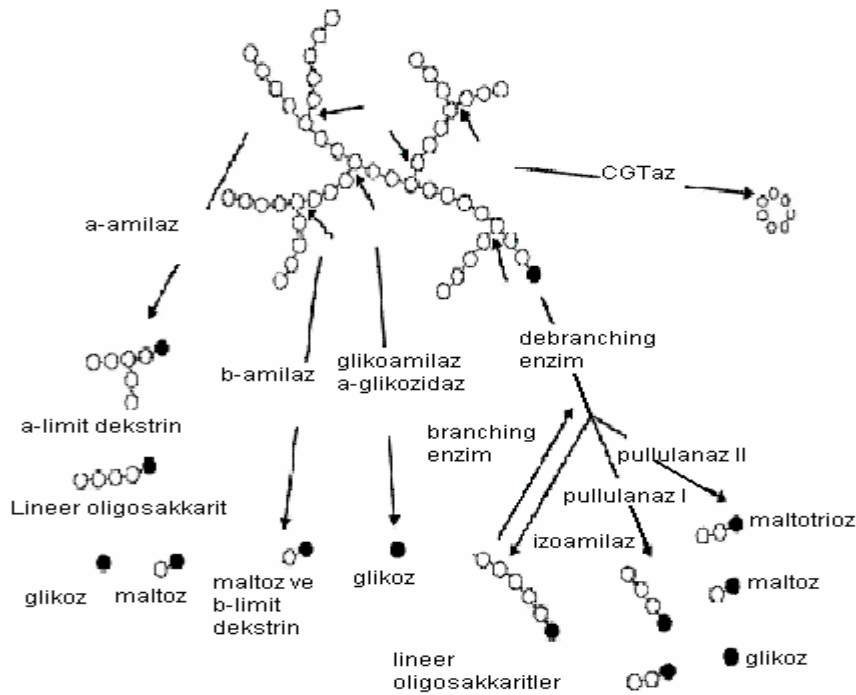
Amiloglukozidazlar (glukoamilaz, α -1,4-glukan glukanohidrolaz EC 3.2.1.3): Substrat zincirinin ucundaki indirgen olmayan kısımdan ardışık şekilde bulunan glukoz birimlerini uzaklaştıran bir ekzoenzimdir. Ürün olarak yalnızca glukoz oluşturmada amiloglukozidazı α ve β -amilazlardan ayırır. Yani α -1,6 bağlarına ne α ne de β -amilazlar etki edemez iken bu enzim hem α -1,4 bağlarını etkilemekte hem de yavaş bir

hızla olsa da α -1,6 bağlarını da hidrolize etmektedir (Yazgan ve Aksoy 1983, Telefoncu 1993, Sarıkaya 1995, Hamilton vd. 1998).

Pullulanazlar (E.C. 3.2.1.41): Substrat molekülünün sadece α -1,6 bağları üzerinde spesifik aktivite gösterdikleri için ‘sınır dekstranazlar’ olarak da adlandırılırlar (Aiyer 2005). Pullulanazlar, glukoz ve maltoz verimini arttıırırlar.

α -Glukozidazlar (E.C. 3.2.1.20): Amiloz ve amilopektinin parçalanma ürünleri olan kısa zincirli oligosakkaritlerdeki α -1,4 bağlarını hidroliz ederek serbest glukoz birimleri oluşturan enzimlerdir (Aiyer 2005).

CGTazlar (Siklodekstringlukanoferaz) (E.C. 2.4.1.19): Nişastayı, siklodekstrin adı verilen ve 6,7 veya 8 glukoz ünitesinden oluşan siklik D-glukozil birimleri oluşturan enzimlerdir. *Bacillus macerans* amilazları bunlara örnektir (Aiyer 2005).

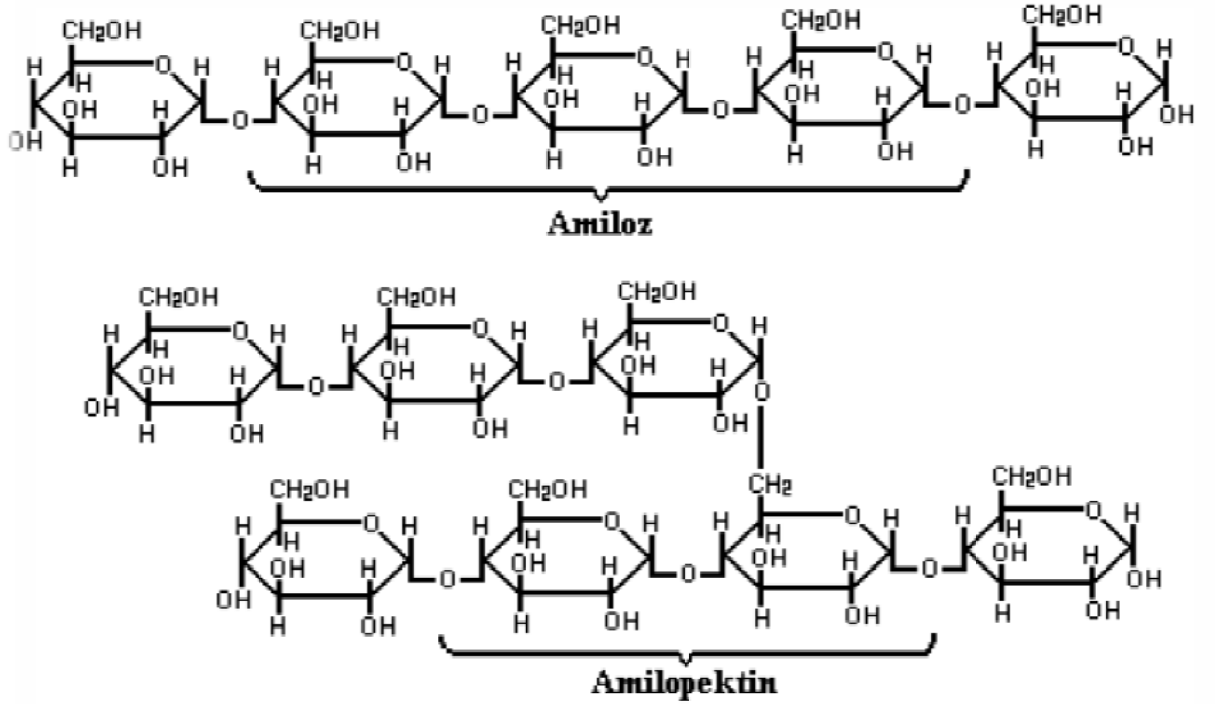


Şekil 2.1 Amilolitik enzimlerin nişastayı hidroliz şekilleri ve oluşturdıkları ürünler (Bertoldo ve Antranikan 2002)

2.3 α – Amilazlar

Bir glukozid hidrolaz ve ticari olarak kullanılan ilk enzim olan α -amilaz iç etkili bir enzimdir. Bu enzimler, bağlı polizomlar üzerinde sinyal peptid adı verilen öncül bir protein ile birlikte sentezlenir. Hidrofobik karakterli olan bu sinyal peptidler α -amilaz enziminin nereye yönlendirileceğini belirlemektedir. α -Amilaz ilgili bölgeye geldikten sonra söz konusu sinyal peptidler proteazlar vasıtasıyla enzim bünyesinden ayrılır ve serbest kalan enzim de dışarı salgılanır. Ancak enzimin hücre duvarı boyunca mı yoksa spesifik kanallar vasıtasıyla mı salgılandığı henüz tam olarak açıklanamamıştır. α -Amilaz enzimlerinin sentezi nişasta ya da daha düşük molekül ağırlıklı oligosakkaritler varlığında uyarılır. Bir nişasta molekülü amiloz ve amilopektin olmak üzere iki adet glukoz polimeri içerir. Amiloz, glukoz birimleri arasında α -1,4-glukozidik bağ ile bağlanmasından oluşan ve dallanma göstermeyen düz bir yapıda iken, amilopektin ise glukoz birimleri arasında α -1,4 bağlantısına ek olarak α -1,6-glukozidik dallanma bağ noktalarını da içermektedir. α -Amilazlar nişasta moleküllerindeki amiloz zincirlerinin α -1,4 bağlarına gelişi güzel etki ederler. İlk etkinin helozonlar arasına düşen 1,4 glikozidik bağlara olduğu kabul edilmektedir. Böylece zincir parçalar ayrılır ve bu kısalmış parçalar yeniden enzim tarafından etkilenir. Son ürün olarak 1/10'u glukoz ve 9/10'u maltoz olan bir karışım meydana gelir. Enzim amilopektin molekülünün hidrolizinde 1,6 glukozidik bağ ile karşılaştığında bu bağa etki gösterememektedir. Amilopektin hidrolizi sonucunda glukoz ve maltoza ilave olarak bir seri dallı sınır dekstrinler oluşmaktadır. Dört veya daha fazla glukoz içerikli bu dekstrinler orijinal yapının 1,6 glukoz bağlarının tümünü içermektedir (Sarıkaya 1995). Belli sayıda glukoz ünitesi kalınca dallanma noktasına amilazlar etki edemediğinden bu dekstrinlere sınır dekstrin denmektedir. Ancak bu noktada etkili enzim amiloglukozidazdır (Yazgan ve Aksoy 1983).

Nişastanın hidrolizi sonucunda ortaya çıkan ürünler α -optik konformasyonu gösterdiğinden bu enzimlere alfa-amilazlar adı verilmiştir.



Şekil 2.2 Amiloz ve Amilopektin glukoz polimerleri (Anonymous 2009d)

α - Amilazlar multidomain proteinlerdir. Temel olarak domain A, B, C olarak 3 domain içeren α -amilazlar, bazen bunlara ek olarak C-terminal ve N-terminal domainleri de bulundurabilmektedir. Domain A, 8 adet heliks tarafından çevrelenmiş 8 tane β dizisinin oluşturduğu bir yumaktır ve proteinin sonunda N-terminalinde bulunur. Domain B, β -dizilerine antiparalel olan ve $\beta 3 \rightarrow \alpha 3$ heliksine kadar uzanan A domainin karşısında bulunan çok uzun yapıda bir domaindir (Mac Gregor 1988).

α -Amilazların en önemli ve temel bir diğer domaini ise domain C'dir. Bu domain β dizilerinden meydana gelmiş ve domain A'nın hidrofobik rezidülerini solventlere karşı perdeleyerek katalitik domain olan domain A'yı stabilize ettiği düşünülmektedir. Ayrıca domain C'nin substrata bağlanmaya yardımcı olduğu tahmin edilmektedir.

α -Amilazların katalitik bölgesi A ve B domainlerinin ara yüzünde A domaininin C-terminalinin sonunda bulunur. Katalitik bölge olan domain A aktif bölgesinde asidik gruplar içerir ve enzimatik reaksiyonun çoğunu bu kısım gerçekleştirir. *B. licheniformis*' ten elde edilen α -amilazlarda aktif bölgede Asp231, Glu261 ve Asp328 birlikte çalışarak bir nişasta zincirindeki iki şeker arasındaki bağları hidroliz ederler.

α -Amilazların aktif bölgesinde 5 şeker ünitesinden oluşan kısa bir zincir mevcuttur. Genellikle kalsiyum bağlı olan bu enzimler A ve B domainleri arasında Ca^{+2} iyonu bulundurulur. Ca^{+2} iyonunun enzimin yapısını stabilize etmekle görevli olduğu bulunmuştur (Boel vd. 1990, Machius vd. 1995).

2.3.1 α -Amilaz kaynakları

Endüstriyel alanda kullanılan α -amilazlar bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kökenli olmakla birlikte, ağırlıklı olarak mikroorganizmalardan elde edilmektedirler. α -Amilaz enziminin endüstriyel üretimine ilk kez Japonya'da 1939 yılında *Bacillus subtilis* kullanılarak başlanmıştır. 1970'lerde ise *B. subtilis* ve *B. licheniformis* α -amilaz enzimi üretimi için geniş çapta kullanılmaya başlanmıştır (Sarıkaya 1995).

Bugün α -amilaz enzimi üretiminde kullanılan diğer mikroorganizmalar içerisinde *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *A. candidus* gibi bazı funguslar ile *Pseudomonas*, *Saccharophila*, bazı *Clostridium* ve *Bacillus* türleri ve alt türleri sayılabilir. Bakteriyel ve fungal amilazlar maliyet verimliliği, süreklilik, süre kısalığı ve gerekli üretim alanının az olması, modifikasyon ve optimizasyon sürecinin kısalığı gibi birçok avantajı sayesinde endüstriyel üretim için kullanılır (Arıkan vd. 2003). Bakteriler arasında *Bacillus* türleri yaygın olarak endüstriyel ihtiyaçlar için termostabil α -amilaz üretiminde kullanılmalarıyla birlikte, buna ek olarak filamentli mantarlar da yüzyıllar boyunca ticari anlamda α -amilaz üretimi için kullanılmaktadır. Özellikle Fungilere ait olan *Aspergillus* cinsinden yaygın olarak α -amilaz eldesinde faydalanılmaktadır (Vihinen ve Mantasala 1989).

Buna rağmen fungal α -amilazlar sıcaklığa bakteriyel α -amilazlardan daha az stabil olduğundan üzerinde çalışılan asıl enzim kaynağını daha çok bakteriyel; özellikle de *Bacillus* amilazları oluşturmaktadır (Wiseman 1987).

İlk termostabil α -amilaz *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* ve *Bacillus amyloliquefaciens* gibi türlerden izole edilmiştir. *Bacillus licheniformis*, *Myceliophthora thermophila*, *Pyrococcus wosei*, *Pyrococcus furiosus* ve *Thermococcus aggregans* türlerine ait α -amilazlar termofilik α -amilazlardır ve optimum sıcaklıkları 100°C'dir.

Ayrıca mezofillerin aksine *Pyrococcus* enzimleri Ca^{+2} iyonu varlığına da ihtiyaç duymamaktadırlar. Bir anaerobik bakteri olan *Thermococcus profundus*'un ise 80°C'de aktivite gösteren termostabil α -amilaz ürettiği ve bu amilazın maksimum termostabilite için Ca^{+2} iyonlarına gerek duyarak daha asidik koşullarda etkili olduğu saptanmıştır. Bunlara ek olarak 90-100°C arasında aktivite gösteren bir amilaz enziminin *Thermoproteales*, *Thermococcales* ve *Pyrodictiales*'ta bulunduğu belirtilmiştir (Eichler 2001).

Çizelge 2.1 Bazı *Bacillus* türlerine ait nişasta hidrolize eden termostabil enzimler ve kaynakları (Haki ve Rakshit 2003)

Organizma	Optimum Sıcaklık	Optimum pH	Referans
<i>B.amyloliquefaciens</i>	70°C	7.0	Underkofler 1976
<i>B. licheniformis</i>	100°C	6.0-6.5	Viara vd. 1993
<i>B.stearothermophilus</i>	70-80°C	5.0-6.0	Vihinen ve Mantsala 1990
<i>Bacillus subtilis</i>	70°C	7.0	Canganella vd. 1994
<i>L. manihotivorans</i>	55°C	5.5	Aguilar vd. 2000
<i>Myceliophthora thermophila</i>	100°C	5.6	Ramkrishna vd. 1993
<i>Pyrococcus furiosus</i>	100°C	5.5	Laderman vd. 1993a,b
<i>Pyrococcus woesei</i>	100°C	6.5-7.5	Koch vd. 1991
<i>Staphylothermu smarinus</i>	65°C	5.0	Canganella vd. 1994
<i>Thermococcus aggreganes</i>	100°C	5.5	Canganella vd. 1994
<i>Thermococcus celer</i>	90°C	5.5	Canganella vd. 1994
<i>Thermococcus fumicolans</i>	95°C	4.0-6.3	Estelle vd. 1997
<i>Thermococcus hydrothermalis</i>	85°C	4.8-7.8	Estelle vd. 1997
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	60°C	5.6	Jensen ve Olsen 1991
<i>Thermococcus profundus</i>	80°C	4.0-5.0	Kwak vd. 1998

2.3.2 Enzim karakteristiği

Endüstriyel uygulamalarda başarılı işlemler gerçekleştirebilmek için enzimin karakterizasyonun iyi yapılması gerekir. Bu amaçla α -amilaz enziminin karakterizasyon çalışmaları yapılmış ve büyük ölçüde belirlenmiştir.

Nişastanın α -amilaz tarafından hidroliz edilebilme oranı sıcaklık, pH, substrat konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu, Ca^{+2} iyonlarının varlığı gibi pek çok işlem şartlarına bağlıdır.

Weemaes vd. (1996), *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* ve *B. stearothermophilus* tarafından üretilen α -amilazın stabilitesini çalışmış ve yüksek sıcaklık ve basıncın birlikte uygulandığı şartlar altında bu 3 mikroorganizma arasında en stabil α -amilazı *B. licheniformis*'in ürettiğini tespit etmişlerdir.

Çizelge 2.2 Mikrobiyal α -amilazların optimum sıcaklıkları ve stabiliteleri

Organizma	Sıcaklık aralığı/°C	Aktivite /%	Optimum sıcaklık/°C	Referans
<i>L. manihotivorans</i>	50-60	70(50°C 1 h)	55	Aguilar vd. 2000
<i>Bacillus Sp. I-3</i>	65-100	50(80°C 2.5 h)	70	Goyal vd. 2005
<i>P. furiosus</i>	80-100	50(98°C 13h)	100	Vieille vd. 2001
<i>Thermobifidafusca</i>	50-60	70(60°C 3 h)	60	Yang ve Liu 2004
<i>A. tamaraii</i>	50-60	90(65°C 3h)	55	Moreira vd. 2004
<i>S. thermophilum</i>	55-65	50(55°C 25mn)	60	Aquino vd. 2003

Arıkan vd. (2003) pH ile ilgili yaptığı çalışmada *Bacillus sp. ANT-6* izolatından elde edilen α -amilazının optimum pH değerinin 9.0-13.0 arasında olduğunu bulmuşlardır.

Buna karşın *A. kawachii* IFO4308 ile yapılan bir diğer çalışmada ise enzimin optimum pH'sının 2.0-6.5 arasında olduğu belirlenmiştir (Sudo vd. 1994).

Çizelge 2.3 Mikrobiyal α -amilazların optimum pH değerleri ve stabiliteleri

Organizma	pH aralığı	Aktivite/%	Optimum pH	Referans
<i>Bacillus sp. I-3</i>	5.0-5.5	80	7.0	Goyal vd. 2005
<i>L. manihotivorans</i>	4.0-6.0	90	5.5	Aguilar vd. 2000
<i>Bacillus sp ANT-6</i>	9.0-13	55(pH:10 15 h)	10.5	Arıkan vd. 2003
<i>Bacillus KSM-K38</i>	6.0-11.0	80(pH:11 30 min)	8.0-9.5	Hagihara vd. 2001
<i>Bacillus sp PS-7</i>	5.0-8.0	96(pH:5.0 90 min)	6.5	Sodhi vd. 2005
<i>Cryptococcus sp.S-2</i>	5.0-7.0		6.0	Iefuji vd. 1996
<i>A.kawachii IFO4308</i>	2.0-6.5	90(pH:2.0 30 min)	5.0	Sudo vd. 1994

Amilazların çoğu Ca^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} gibi divalent iyonlar olarak adlandırılan metal iyonlarına bağlı olarak bilinirler. Ca^{+2} 'nin alkalifik *Bacillus sp. ANT- 6*'da α -amilaz aktivitesini attırdığı tespit edilmiştir (Arıkan vd. 2003). Buna karşın Ca^{+2} bağımsız enzimler de vardır. *B. thermooleovorans* NP54'den elde edilen α -amilazın üretimi ve aktivitesi için Ca^{+2} iyonuna ihtiyaç duymadığı belirtilmiştir (Malhotra vd. 2000).

Zn^{+2} iyonunun ise farklı amilazlar üzerinde farklı etkilere sahip olduğu ve *Bacillus sp.*'lerden elde edilen termostabil α -amilazı inhibe ettiği tespit edilmiştir. Zn^{+2} varlığı *ANT-6'nın* aktivitesini azaltmıştır. Aynı izolatta Na^{+2} iyonlarının 5 kat azaltıcı etki gösterdiği belirlenmiştir (Arıkan vd. 2003). *L. manihotivorans* LMG'de ise Zn^{+2} , Ba^{+2} ve K^{+} iyonlarının 10 kat arttırıcı etki gösterdiği bulunmuştur (Aguilar vd. 2000).

Fe^{+2} iyonunun *Bacillus sp. I3*'de 1 kat arttırıcı etki göstermesine karşın *Cryptococcus flavus*'da 20 kat azaltıcı etki gösterdiği belirlenmiştir (Wanderley vd. 2004, Goyal vd. 2005).

Çizelge 2.4 Metal iyon konsantrasyonun α -amilazların aktivitesi üzerindeki etkisi

Organizma	Metal iyonu	Konsantrasyon etkisi/mM	Referans
<i>Bacillus</i> sp. ANT-6	Ca^{2+}	5 kat arttırıcı	Arıkan vd. 2003
<i>L. manihotivorans</i> LMG	K^{+}	10 kat arttırıcı	Aguilar vd. 2000
<i>Bacillus</i> sp. ANT-6	Na^{+}	5 kat azaltıcı	Arıkan vd. 2003
<i>Bacillus</i> sp. L1711	Na^{+}	5 kat arttırıcı	Bernhardsdotter vd. 2005
<i>Bacillus</i> sp. L1711	Co^{2+}	5 kat arttırıcı	Bernhardsdotter vd. 2005
<i>L. manihotivorans</i> LMG	Ba^{2+}	10 kat arttırıcı	Aguilar vd. 2000
<i>L. manihotivorans</i> LMG	Zn^{2+}	10 kat arttırıcı	Aguilar vd. 2000
<i>Bacillus</i> sp. ANT-6	Zn^{2+}	5 kat azaltıcı	Arıkan vd. 2003
<i>Bacillus</i> sp. I-3	Fe^{2+}	1 kat arttırıcı	Goyal vd. 2005
<i>Cryptococcus flavus</i>	Fe^{2+}	20 kat azaltıcı	Wanderley vd. 2004

2.3.3 Termostabil α -Amilaz enziminin endüstrideki kullanım alanları

α -Amilazlar ticari olarak üretilen ve pazarlanan ilk enzimlerdir. Enzimler için global pazarlamanın 2004 yılında yaklaşık olarak 2 milyar dolar olduğu bildirilmiştir. Bunun da yıllık olarak yaklaşık % 3.3 büyüme oranına sahip olacağı beklenmektedir (Riegal ve Bissinger 2003). Gıda ve içecek sektörü karbohidraz üretiminin %90'ını kullanmaktadır. α -Amilazların global enzim marketinde yıllık satış oranının 11 milyon dolar olduğu tahmin edilmektedir (Kilara vd. 2002).

2.3.3.1 Nişasta endüstrisi

Günümüzde α -amilazın ilk ve en yaygın olarak kullanıldığı alan nişastanın hidrolizidir. Nişasta polimeri diğer polimerler gibi hidrolizinin gerçekleşmesi için enzim kombinasyonuna ihtiyaç duyar. Bu enzimler α -amilaz, glukoamilaz, β -amilaz ve izoamilazlar ya da pullunazlardır (Poonam ve Dalel 1995). Nişastaların enzimatik

dönüşümleri jelatinizasyon, sıvılaştırma (liquefaction) ve şekerleşme (saccharification) aşamalarını içerir. Jelatinizasyon nişasta moleküllerinin yüksek sıcaklıklarda ısıtılarak su alarak şişmesi, birbirinden ayrışması sonucu viskoz bir süspansiyon haline gelmesidir. Sıvılaştırma ise nişastanın kısmen hidrolize olduğu, dekstrinlerin olduğu ve viskozitesini kısmen kaybettiği aşamadır. Son aşama olan şekerleşmede ise oligosakkaritler glukoza hidroliz olurlar.

Enzim için, çözünebilir nişasta çözünmeyen nişastaya göre daha iyi bir substrattır. Bu nedenle nişastanın jelatinizasyonu gerekmektedir. Bu işlem de 70°C gibi yüksek bir sıcaklıkta gerçekleşir. Günümüzde ise nişasta endüstrisi 90-100°C sıcaklıklarda termostabil α -amilaz enzimi kullanarak bu işlemi daha kısa sürede ve daha verimli bir şekilde gerçekleştirebilmektedir. Nişasta endüstrisinde α -amilazlar iki kategoriye ayrılır. Hidroliz edecekleri nişastanın miktarına bağlı olarak sıvılaştırıcı α -amilaz % 30-% 40 ve şekerleştirmede kullanılan α -amilaz %50-%60'ını hidrolize eder. Termofilik α -amilazlar; nişasta sıvılaştırmada, dekstrinlerin ve dallanmış dekstrinlerin üretimi ile polimerizasyonun farklı adımlarında kullanılır (Leveque vd. 2000).

Ayrıca nişastanın α -amilazla sıvılaştırılması aşaması sonucunda oluşan ilk ürün olan dekstrinler de çözünürlüğü yüksek ve dayanıklı bir ürün olup, yoğun şurup kıvamında bir maddedir ve bu maddeler gıdalarda viskozite artırıcı, yani, koyulaştırıcı dolgu maddesi olarak kullanılmaktadır (Keskin 1982). Açığa çıkan glukoz, ya şurup halinde, ya da kristal toz şeklinde elde edilmektedir. Glukoz şurubuna glikozizomeraz enzimi ilave edilerek früktozlu şurup üretimi gerçekleştirilmektedir. Bu ürün yüksek düzeyde tatlılığa sahip olup, meşrubat üretimi, süt üretimi, konservecilik, ekmek, pasta ve şekerleme yapımı gibi alanlarda kullanılmaktadır (Anonymous 1988a).

Nişastanın maltoza kadar hidrolizi, nişasta molekülünün öncelikle α -amilaz enzimi 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 olarak da kullanılmaktadır (Anonymous 1988a).

Nişasta endüstrisindeki problemlerden biri α -amilaz enzimlerinin Ca^{+2} iyonu gereksinimleridir ve bu koşullarda da kalsiyum oksalat oluşmasıdır. Kalsiyum oksalat, reaksiyon borularını ve ısı değiştiricilerini tıkayabilmekte ve bunun yanında bira gibi bazı ürünlerde bulunması istenmemektedir. Kalsiyum oksalatın oluşumunun, enzimlerin Ca^{+2} iyonu gereksinimlerinin azaltılması ve üretim prosesinin düşük pH’da yapılması ile önlenebileceği belirlenmiştir. Endüstriyel olarak önemli olan bazı amilazların Ca^{+2} iyonu gereksinimleri çizelge 2.5’de gösterilmektedir (Haki ve Rakshit 2003).

Çizelge 2.5 Bazı amilazların Ca^{+2} iyonu gereksinimleri (Haki ve Rakshit 2003)

Enzim	Mikroorganizma	Uygulama Sıcaklığı (°C)	Uygulama pH’sı	Minimum Ca^{+2} miktarı (ppm)
Bakteriyel mezofilik α -amilazlar	<i>Bacillus subtilis</i>	80- 85	6.0- 7.0	150
Bakteriyel termofilik α -amilazlar	<i>B.licheniformis</i>	95- 105	6.0 –7.0	20
Fungal α -amilazlar	<i>A. oryzae</i>	55- 70	4.0 –5.0	50

2.3.3.2 Tekstil endüstrisi

Tekstil endüstrisinde kullanılan ipliklerin işlemler sırasında eğilmesini ve kopmasını engellemek gerekir. Bu da kullanılacak ipliğin sıcak nişasta ile muamele edilmesiyle sağlanabilmektedir. Nişasta, ipliği kaplayarak çok sağlam hale getirir. Böylece dokuma sırasındaki uygunsuz koşullar ve stres altında iplik, dayanıklılığını korur. Bu işleme haşıllama denir. Kumaş dokunduktan sonra, kumaştaki fazla nişastanın giderilmesi gerekmektedir. Bu işleme haşıl alma adı verilmektedir. Termostabil α -amilaz enzimi yüksek miktarlarda kullanılan nişasta moleküllerini işlemler tamamlandıktan sonra uzaklaştırmakta ve ortadan kaldırmaktadır (Tarakçioğlu 1979).

2.3.3.3 Deterjan endüstrisi

Deterjan endüstrisinde ekstrem koşullarda dayanıklılığını ve aktivitesini koruyan enzimlere gerek duyulmaktadır. Deterjan üretimi sırasında ortamın alkali pH'sı, yüksek sıcaklık ve ortamda bulunan sürfaktan maddeler enzim aktivitesini inhibe eder. Bu şartlara karşı dayanabilen termofilik enzimler bu amaçla deterjan endüstrisinde kullanılırlar (Fujiwara 2002).

2.3.3.4 Alkol endüstrisi

α -Amilaz enzimi endüstride alkol üretmek amacı ile kullanılmaktadır. Alkol üretmek amacı ile hammadde olarak kullanılan nişasta molekülleri amiloglukozidaz ve α -amilaz enzimleri ile muamele edilirler. Ortamda bulunan nişasta polimeri yeterince parçalandıktan sonra ortama fermentasyon amacı ile maya aşılanarak işleme devam edilir (Wiseman 1987).

Bunların dışında kağıt endüstrisinde kağıtların kaplamasının uygun yapılabilmesi için nişastanın viskozitesinin azaltılmasında ve ilaç endüstrisinde sindirime yardımcı amaçlı olarak da kullanılmaktadır.

Çizelge 2.6 Amilazların endüstrinin çeşitli alanlarında kullanımı

Sektör	Kullanımı	Referans
Gıda Endüstrisi	Glukoz Şurubu ve Kristal Glukoz Üretimi	Maarel vd. 2002
	Fruktoz Şurubu Üretimi	Riegal ve Bissinger 2003
	Maltoz Şurubu Üretimi	Gupta vd. 2003
	Şeker Şuruplarının Vizkozitesinin Azaltılması	
	Meyve Sularındaki Bulanıklığın Azaltılması	
	Alkol Endüstrisinde Alkol Fermentasyonu için Nişastanın Çözülmesi ve Şekerleştirilmesi	
	Ekmek Endüstrisinde Bayatlamanın Geciktirilmesi	
Deterjan Endüstrisi	Nişasta Kaynaklı Lekelerin Temizlenmesi	
Kağıt Endüstrisi	Kağıt Kaplamasının Uygunluğu için Nişastanın Vizkozitesinin Azaltılması	
Tekstil Endüstrisi	Tekstil İpliklerinin Eğilmesini Önlenmesi	
Farmasötik Endüstrisi	Tedavi Amaçlı	

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Kullanılan termofilik bakteri izolatları ve standart suş

Bu çalışmada kullanılan ve α -amilaz aktivitesi Çöleri Cihan (2007) tarafından incelenip pozitif olarak değerlendirilen 6 adet bakteri izolatı ve standart suş Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Araştırma laboratuvarı stoklarından temin edilmiştir. *G. stearothermophilus* DSM 22^T ATCC 12980 standart suş olarak kullanılmıştır.

3.1.2 Kullanılan çözeltiler

3.1.2.1 NaOH çözeltisi

Besiyerlerinin pH'sını ayarlamak amacı ile 1 N NaOH çözeltisi kullanılmıştır (Santos ve Martins 2003).

3.1.2.2 DNS (Dinitro salisilik asit)

Enzim aktivitesini durdurmak amacı ile kullanılmıştır. 1 gr DNS (50 ml de-iyonize su içinde çözüldükten sonra), 30 gr K-Na-Tartarat ve 20 ml 2N NaOH ilave edilerek, son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanır (Aiba 1983).

3.1.2.3 Fosfat tamponu (pH:7.0)

Enzimlerin aktivitelerini saptamak amacı ile kullanılmıştır.

3.1.2.4 Lugol solüsyonu

Katı besiyerinde amilaz aktivitesinin saptanması amacı ile kullanılmıştır.

3.1.3 Besiyeri

Katı Besiyeri: Bu çalışmada bakterilerin üretilmesi ve amilolitik aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla *Bacillus* türleri için uygun olan, Adhikari vd. (2010) uyguladığı ve aşağıda içeriği verilen modifiye edilmiş besiyeri kullanılmıştır. Bileşimi; %0.5 pepton, %0.5 yeast ekstrakt, %0.5 NaCl, %1.0 çözünebilir nişasta, %3.0 agar'dır. pH:7.0'ye 1 N NaOH ile ayarlanmıştır.

Sıvı Besiyeri: α -Amilaz üreticisi *Bacillus* izolatlarını enzim üretimi için geliştirmek amacıyla kullanılmıştır. Bu amaçla Santos ve Martins (2003) besiyeri modifiye edilmiştir. Bileşimi; %1.0 tripton, %0.5 yeast ekstrakt, %1.0 çözünebilir nişastadır. pH:7.0'ye 1 N NaOH ile ayarlanmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Bakterilerin geliştirilmesi ve muhafazası

Standart olarak kullanılan *G. stearothermophilus* DSM 22^T suşu izolatlarının aktifleştirilmesi ve stok olarak saklanması için %3'lük Nutrient Agara ekim yapılmış ve 55°C'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılarak üretilmiş ve +4°C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

3.2.2 Amilaz aktivitesinin belirlenmesi ve izolat seçimi

6 adet *Geobacillus* sp. izolatu ve *G. stearothermophilus* DSM 22^T suşu %1 nişasta içeren katı besiyerinde 55°C'de 24 saat süreyle geliştirilmiştir. Amilaz aktivitesinin belirlenmesi için kültürler lügol ayırıcı damlatılarak incelenmiştir. Boyama sonucunda nişastanın parçalanmadığı bölgelerde mavi-mor renkte, amilaz enzim aktivitesi sonucu nişastanın hidrolize olduğu bölgelerde ise şeffaf bir görünüm meydana gelmiştir.

Bu işlem sonucunda koloni etrafında oluşan zon çapının büyüklüğüne ve ayrıca 72. saatteki enzim aktivitelerine göre izolatlar değerlendirilmiş ve en yüksek amilaz aktivitesine sahip izolat belirlenmiştir.

3.2.3 Enzim üretim koşullarının belirlenmesi

Hücre dışı enzim üretimi için izolatlar öncelikle %3'lük Nutrient agarda 55°C'de 24 saatlik inkübasyon sonunda aktifleştirilmiştir. Katı besiyerinden alınan bakterilerin absorbansları steril %0,85 NaCl varlığında 540nm'de 0,2-0,4 aralığında olacak şekilde ayarlanmıştır. Optik dansitesi belirli aralıklara ayarlanan örneklerden, enzim üretimi için kullanılan ve %1 nişasta içeren sıvı besiyerlerine %10 oranında (5 ml'lik besiyerlerine 500 µl) inoküle edilmiştir. İnoküle edilen örnekler 55°C'de 150 rpm'de çalkalamalı inkübatörde inkübe edilerek ve çeşitli aralıklarda örnekler alınarak enzim üretimi belirlenmiştir. Inkübasyonun 24, 48 ve 72. saatlerinde alınan örnekler +4°C'de 5000 rpm'de 15 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Elde edilen peletin yaş ağırlığı belirlenip, üst sıvı hücre dışı enzim aktivitesi tayininde enzim çözeltisi olarak kullanılmıştır.

3.2.4 Maltozun ekstinksiyon katsayısının hesaplanması

Enzim aktivitesinin hesaplanmasında kullanılan maltozun ekstinksiyon katsayısının belirlenmesi için 50 mg/ml stok maltoz dH₂O'da çözülmüştür. Bu stok çözeltiden pH:7.0 fosfat tamponu kullanılarak 2.5, 2, 1.5, 1.25, 1, 0.75, 0.5, 0.3, 0.25, 0.2, 0.15 ve 0.1 olacak şekilde dilüsyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan dilüsyonların üzerine 1 ml DNS eklenerek 5 dakika süreyle kaynatılmıştır. Tüpler soğuduktan sonra 540nm dalga boyunda optik yoğunluğu ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerlerine karşı mM maltoz konsantrasyon eğrisinin eğiminden ekstinksiyon katsayısı hesaplanmıştır.

3.2.5 Enzim aktivitesinin belirlenmesi

Standart suşun ve seçilen izolatın α -amilaz üretim kapasiteleri, substrat olarak kullanılan çözünebilir nişastayı hidroliz edebilme yeteneklerine göre spektrofotometrik

olarak belirlenmiştir. Hücre dışı α -amilaz aktivitesinin tayin edildiği karışım 0.5 ml enzim çözeltisi ve 0.2 M, pH 7.0 sodyum fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış 0.5 ml %2'lik çözünür nişasta çözeltisi içermektedir. Enzim ilavesi sonucunda 60°C'de 10 dakika inkübe edilen karışımdaki reaksiyon 1ml DNS ayırıcı eklenerek durdurulmuş ve renk reaksiyonunun oluşması için 5 dakika süreyle kaynatma işlemi uygulanmıştır. 1 izolata ait 2 paralel tüpten alınan örneklerden, 2 paralel reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Tüpler soğutulduktan sonra 540nm dalga boyu kullanılarak spektrofotometrede, 0,5 ml substrat çözeltisi, 0,5 ml fosfat tamponu ve 1 ml DNS ayırıcı kullanılarak hazırlanan köre karşı okuma yapılarak standart eğriye göre maltoz oranı belirlenmiştir.

3.2.6 Enzim ünitesinin tanımı

Bir ünite (U/ml) α -amilaz, 1 μ mol indirgen şeker (maltoz) oluşturan enzim miktarı olarak tanımlanmış ve enzim aktivitesi aşağıdaki gibi hesaplanmıştır:

$$\text{Ünite/ml enzim} = \frac{\Delta OD \times V_f \times d_f}{\epsilon_{540nm} \times t \times b \times V_e}$$

OD = Optik yoğunluk

$\Delta OD = OD_{540nm} \text{ Örnek} - OD_{540nm} \text{ Kör}$

V_f = Tüpte hazırlanan toplam hacim (2 ml)

D_f = Dilüsyon faktörü

ϵ_{540nm} = Maltozun 540nm'deki ekstinksiyon katsayısı (pH7.0)*

t = Reaksiyon zamanı (10 dakika)

b = Küvetin ışık geçiş yolu (1 cm)

V_e = Küvette okutulan reaksiyon karışımındaki enzim hacmi (0.5 ml)

* : Ekstinsiyon katsayısı, enzim aktivitesinde uygulanan sıcaklığa göre L/mM.cm cinsinden hesaplanmıştır (Halvorson 1966).

3.2.7 İzolatın ve *G. stearothermophilus* ATCC 12980 suşunun 96 saatlik zamana bağlı α -amilaz üretiminin belirlenmesi

Katı besiyerinde 55°C'de 24 saat süreyle geliştirilen bakterilerin, enzim üretmesi amacıyla inoküle edildiği sıvı besiyerinden 24, 48, 72 ve 96. saatlerde 3'er paralel olacak şekilde örnekler alınarak aktivite tayini yapılmıştır.

3.2.8 pH'nın enzim üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi

Bakterilerin enzim üretimi için geliştirildikleri sıvı besiyerinin pH'sı 3-10 arasında değiştirilmiş ve bu besiyerlerinde bakteriler 72 saat süreyle inkübe edildikten sonra enzim aktiviteleri ölçülmüş ve bakterilerin enzim üretimi için ihtiyaç duyduğu optimum pH değeri belirlenmiştir.

3.2.9 Sıcaklığın enzim üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi

Enzim üretimi için ihtiyaç duyulan optimum pH'ya sahip besiyerine inoküle edilen bakteriler 50, 55 ve 60°C olmak üzere 3 farklı sıcaklıkta 72 saat süreyle inkübe edildikten sonra enzim aktivitesi ölçülmüş ve bakterilerin enzim üretimi için ihtiyaç duyduğu optimum sıcaklık değeri belirlenmiştir.

3.2.10 Karbon kaynaklarının enzim üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi

Karbon kaynaklarının enzim üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi için besiyerine karbon kaynağı olarak farklı oran ve bileşimlerde nişasta, sükroz, dekstroza, laktoz ve maltoz ilave edilmiştir. Değişik karbon kaynağı içeren besiyerlerinde 72 saat süreyle geliştirilen bakterilerin enzim aktiviteleri ölçülmüştür.

3.2.11 Azot kaynaklarının enzim üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi

Bu amaçla, besiyerine azot kaynağı olarak farklı oran ve bileşimlerde tripton, yeast ekstrakt ve amonyum klorid ilave edilmiştir. Değişik azot kaynağı içeren besiyerlerinde 72 saat süreyle geliştirilen bakterilerin enzim aktiviteleri ölçülmüştür.

3.2.12 Sıcaklık ve pH'nın enzim aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi

Enzimlerin farklı sıcaklıklardaki aktivitesinin belirlenmesi amacı ile 45-75°C arasında sıcaklık parametresi 5'er derece değiştirilerek pH:7.0 fosfat tamponu ile aktivite tayini yapılmış ve enzim aktivitesi için optimum sıcaklık değeri belirlenmiştir.

Optimum pH değerinin belirlenmesi için ise pH: 4.0 – 10.5 arasında farklı tamponlarda enzim aktivitesi ölçülmüştür. Bu amaçla pH:4-6 arasında citrat tamponu, pH:6-8 arasında fosfat tamponu ve pH:8-10.5 arasında ise Glisin-NaOH tamponu kullanılmıştır.

3.2.13 Enzimin sıcaklık ve pH stabilitesinin belirlenmesi

Enzimin termal stabilitesinin belirlenmesi amacıyla enzim, 45-75°C arasındaki sıcaklık parametresi 5'er derece değiştirilerek test edilen sıcaklık değerinde 10 dakika bekletildikten sonra hemen buz üzerine alınmış ve aktivite tayini yapılmıştır.

pH stabilitesinin belirlenmesi için ise enzim, pH: 4.0-10.5 arasındaki pH değerlerindeki tamponlarda 15 saat bekletilmiş ve ardından aktivite tayini yapılmıştır.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1 Amilaz Aktivitesinin Belirlenmesi ve İzolat Seçimi

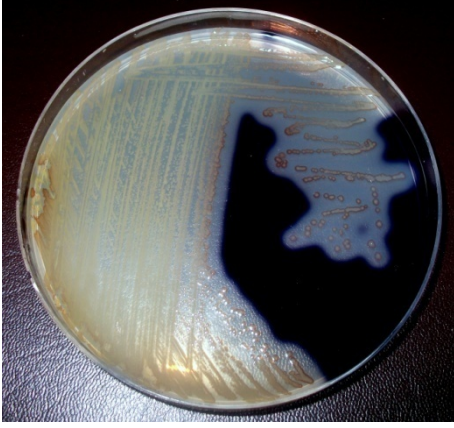
Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilen 6 adet *Geobacillus sp.* izolatı ve *G.stearothermophilus* DSM 22^T ATCC 12980 standart suşu kullanılmıştır. Bu örneklerin %1.0 oranında nişasta içeren katı besiyerinde 24 saat inkübasyon sonucunda oluşturdukları zon çapları ve 72 saat süreyle takip edilen enzim aktivite sonuçları dikkate alınarak en yüksek amilaz aktivitesine sahip izolat olarak D413 seçilmiştir.

6 adet izolatın ve standart suşun sahip olduğu zon çapı ve 72. saatteki enzim aktivitesi sonuçları çizelge 4.1’de verilmiştir.

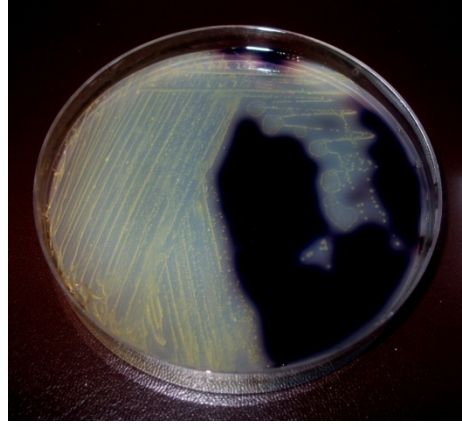
Çizelge 4.1 Katı ve sıvı besiyerindeki aktiviteye göre izolat seçimi

	Zon Çapları (cm)	Ortalama Spesifik aktivite (U/ml/g)
<i>G. stearothermophilus</i> DSM 22 ^T ATCC 12980	0,3cm	15,79
<i>Geobacillus sp.</i> A113	0,2cm	9,32
<i>Geobacillus sp.</i> C304	0,4cm	13,33
<i>Geobacillus sp.</i> D413	0,5cm	15,84
<i>Geobacillus sp.</i> D504	0,1cm	8,46
<i>Geobacillus sp.</i> D621	0,2cm	7,76
<i>Geobacillus sp.</i> D623	0,2cm	6,18

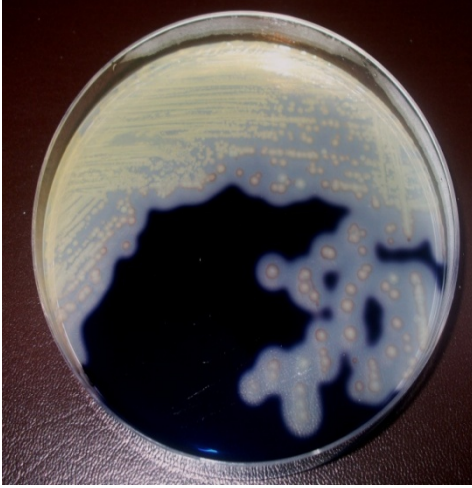
Sonuç olarak çalışmamızın devamında *Geobacillus sp.* D413 izolatı ve *G. stearothermophilus* DSM 22^T ATCC 12980 standart suşu amilaz üretim yönünden incelenmiştir.



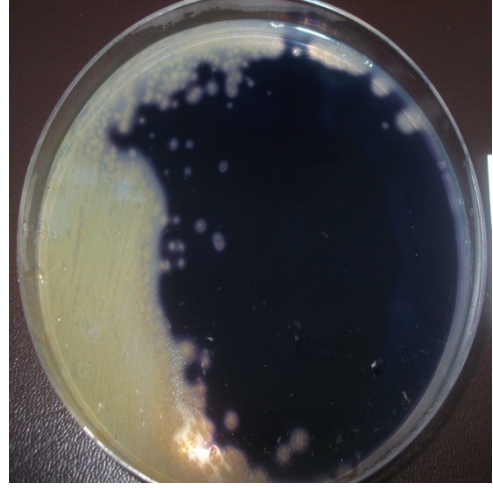
Geobacillus sp. C304



Geobacillus sp. A113

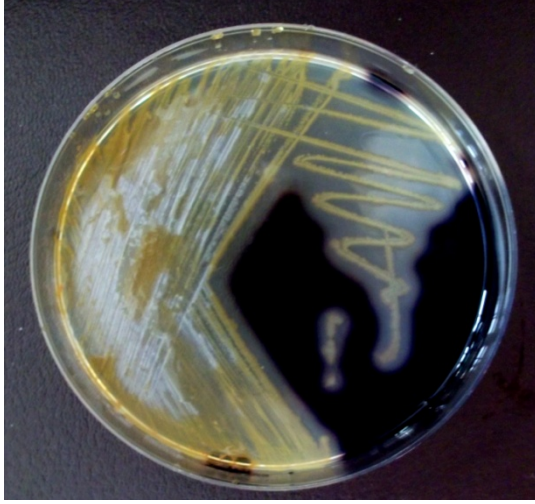


Geobacillus sp. D413

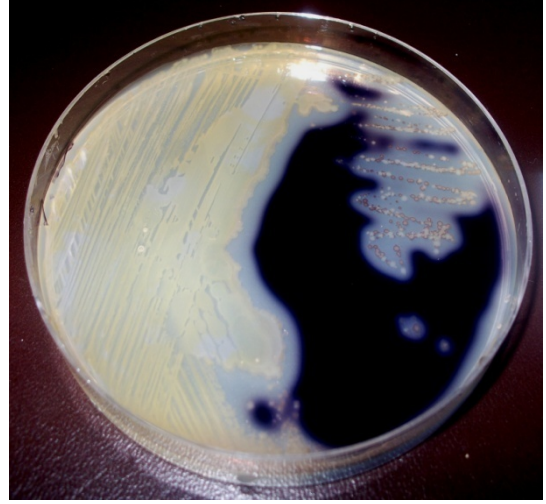


Geobacillus sp. D504

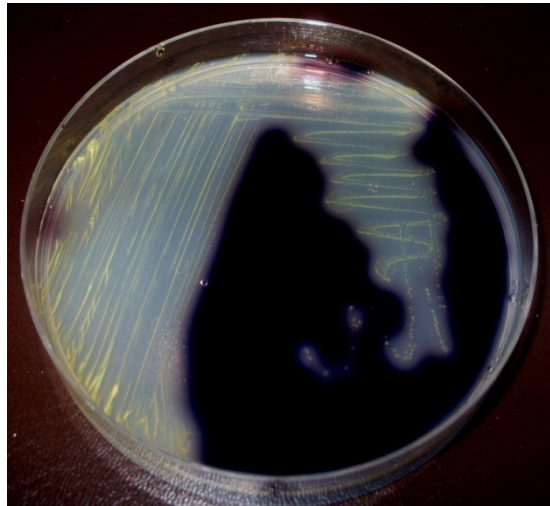
Şekil 4.1 *Geobacillus* sp. izolatlarının nişastalı (pH:7.0) besiyerinde 55°C’de oluşturdukları zonlar



Geobacillus sp. D621



Geobacillus sp. D623



G. stearothermophilus DSM 22^T
ATCC 12980

Şekil 4.1 *Geobacillus* sp. izolatlarının nişastalı (pH:7.0) besiyerinde 55°C’de oluşturdukları zonlar (devam)

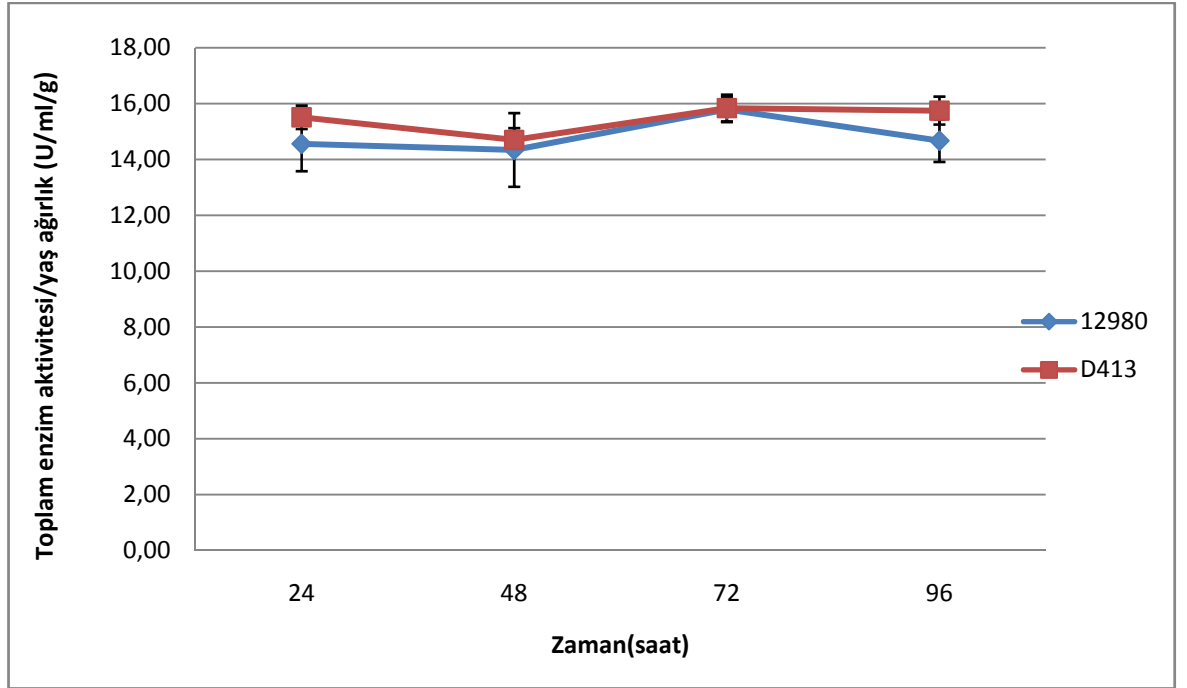
4.2 D413 İzolatının ve Standart *G. stearothermophilus* ATCC 12980 Suşunun 96 Saatlik Zamana Bağlı α -Amilaz Üretimleri

Katı besiyerinde oluşturduğu zon çapına ve 72. saatteki enzim üretimine göre belirlenen D413 izolatı ve standart suş, %1.0 oranında nişasta içeren pH:7.0 sıvı besiyerinde 55°C’de 150 rpm’de inkübe edilip +4°C 5000 rpm’de 15 dakika santrifüj edildikten sonra 24, 48, 72 ve 96. saatteki besiyeri üst sıvısı, enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. pH: 7.0 fosfat tamponundaki enzim aktivitesi dört paralelli olarak ölçülmüştür. Bunun sonucunda izolatın hücre dışı enzim aktivitesi standart suş ile karşılaştırılarak maksimum enzim üretim zamanı belirlenmiştir. Bu doğrultuda D413 ve standart suşun 24. saatteki hücre dışı enzim üretimi sırasıyla 14,5 U/ml/g ve 15,7 U/ml/g olarak ölçülmüş, 48 ve 72. saatlerde üretimin arttığı, 96. saatte ise enzim üretiminin düştüğü belirlenmiştir. Hem D413 izolatında hem standart suştaki en yüksek enzim üretimi ise 72. saatte 15,79 U/ml/g ve 15,84 U/ml/g olarak tespit edilmiştir.

Elde edilen aktivite değerleri çizelge 4.2’de gösterilmiş ve ayrıca aktivitenin zamana bağlı değişimi şekil 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2 *G. stearothermophilus* ve *Geobacillus* sp. D413’ün nişasta(%1.0)+yeast ekstrakt (%0,5)+ tripton (%1.0) içeren besiyerinde (pH:7.0) 55°C’deki enzim üretimi

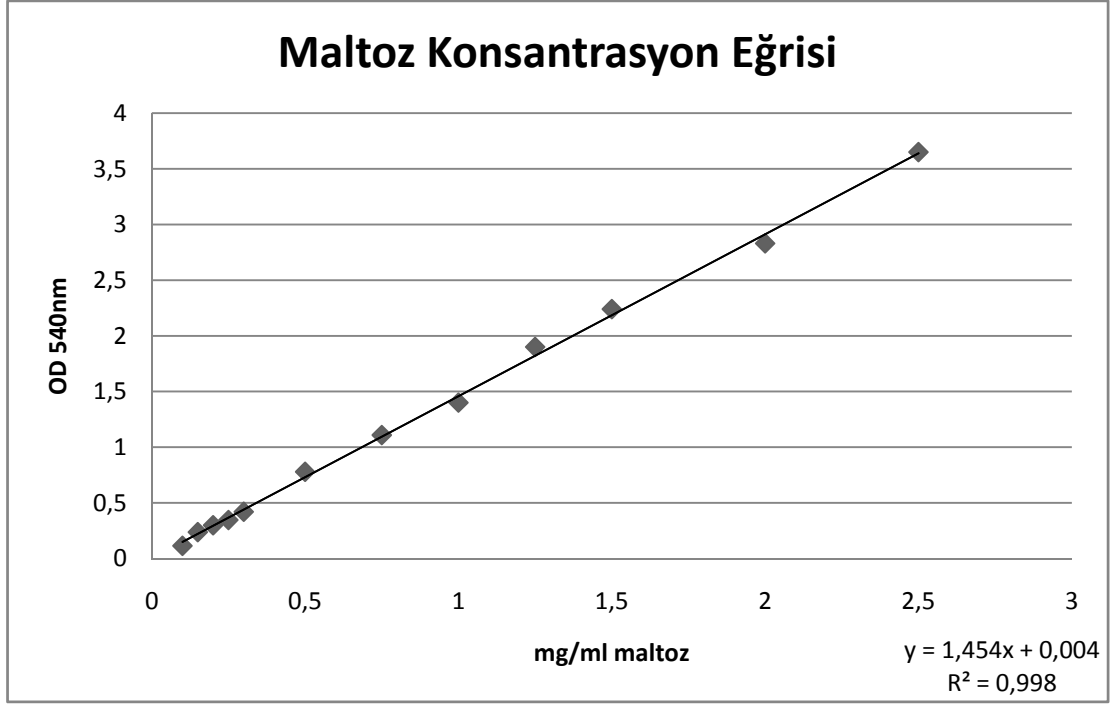
	<i>G. stearothermophilus</i> DSM 22 ^T ATCC 12980			<i>Geobacillus</i> sp. D413		
	Pelet ağırlığı(g)	Enzim ünitesi(U/ml)	Spesifik aktivite(U/ml/g)	Pelet ağırlığı(g)	Enzim ünitesi(U/ml)	Spesifik aktivite(U/ml/g)
24. saat	0.07	1,02	14,50±0,98	0.07	1.10	15,71±0,42
48. saat	0.07	1.00	14.30±1,32	0.09	1.32	14,66±0,42
72. saat	0.08	1.26	15,79±0,49	0.10	1.58	15,84±0,48
96. saat	0.06	0.88	14.60±0,76	0.07	1.10	15.71±0,5



Şekil 4.2 *G.stearothermophilus* ve *Geobacillus* sp. D413'ün nişasta(%1.0)+yeast ekstrakt (%0,5)+ tripton (%1.0) içeren besiyerinde (pH:7.0) 55°C'deki enzim üretiminin zamana bağlı değişimi

4.3 Maltozun Ekstinksiyon Katsayısı

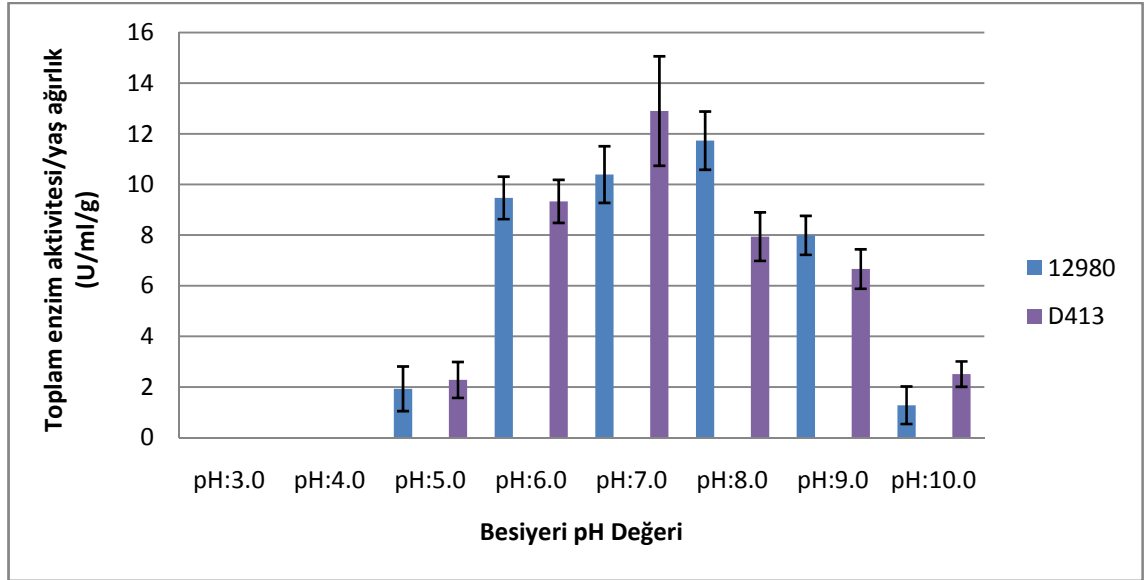
Enzim aktivitesinin hesaplanmasında kullanılan maltozun ekstinksiyon katsayısının belirlenmesi için hazırlanan dilüsyonların absorbansı 540nm'de okutulmuş buna karşılık mM maltoz konsantrasyon eğrisi çizilerek eğrinin eğiminden ekstinksiyon katsayısı hesaplanmıştır. Bu doğrultuda maltoz için hesaplanan ekstinksiyon katsayısı 1.454 mM/ml olarak belirlenmiş ve şekil 4.3'de gösterilmiştir.



Şekil 4.3 Maltoz konsantrasyon eğrisi

4.4 pH'nın Enzim Üretimi Üzerine Etkisi

Enzim üretimi için gerekli optimum besiyeri pH'sini belirlemek amacıyla, besiyerinin pH değeri 3 - 10 arasında değiştirilmiş ve 72. saatteki enzim aktivitesi ölçülmüştür. Elde edilen bulgular şekil 4.4'de gösterilmiştir.



Şekil 4.4 *G.stearothermophilus* ve *Geobacillus* sp. D413'ün nişasta (%1.0) + yeast ekstrakt (%0,5) + tripton (%1.0) içeren besiyerinde, 55°C'de farklı pH değerlerindeki enzim üretimi

Şekil 4.4'de de görüldüğü gibi pH 3.0 ve 4.0'e ayarlanmış sıvı besiyerlerinde enzim üretimi görülmezken, pH 5.0'den itibaren enzim üretimi gözlenmeye başlanmış olup maksimum üretimin pH 7.0 besiyerinde elde edildiği belirlenmiştir. Bu pH değerinin altında ve üstündeki değerlerde enzim üretiminde azalma gözlenmiştir. Ancak pH: 8.0 besiyerinde standart suşun hücre miktarı azaldığı için spesifik aktivitesi pH:7.0'ye göre daha yüksek olarak görülmüştür.

Sonuç olarak D413 izolatu ve standart suş dikkate alındığında bakteriyel büyüme ve enzim üretiminin pH: 5.0–10.0 arasında meydana geldiği, hem bakteriyel hücre gelişimi hem de enzim üretimi için besiyeri optimum pH değerinin 7.0 olduğu tespit edilmiştir.

Bu doğrultuda termofilik *Bacillus* sp. KCPSS-12 ss ile yapılan bir başka çalışmada da bakteriyel büyüme ve enzim üretiminin pH:4.0 ile pH:10.0 arasında gerçekleştiği ve optimum pH'nın 7.0 olduğu belirtilmiştir (Suman vd. 2010).

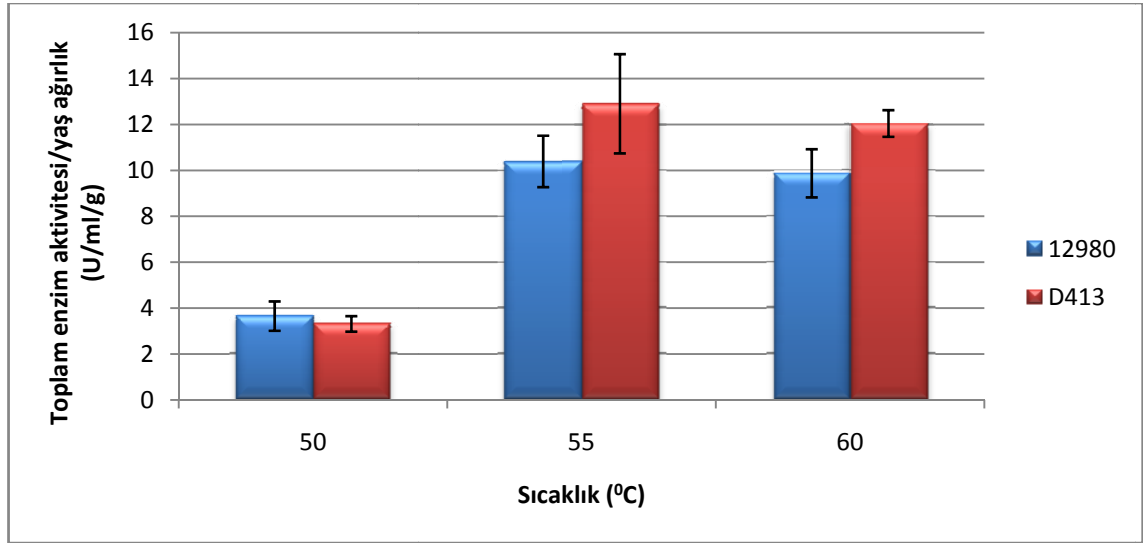
Buna karşın Ezeji ve Bahl (2006) *Geobacillus thermodenitrificans* HRO10 ile yaptıkları çalışmada optimum pH değerinin 5.5 olduğunu ve bu noktadan itibaren de enzim aktivitesinin düştüğünü tespit etmişlerdir.

Kıran vd. (2005) termofilik *Bacillus* sp. K-12'nin enzim üretiminin pH: 4.5 ile 10.5 arasında gerçekleştiğini, optimum üretimi ise pH:6-8 arasında bulmuşlardır.

Bir başka çalışmada Adhikari vd. (2010) *Geobacillus* sp. IPTN'de enzim üretiminin pH: 5.0 ve 7.0 arasında arttığını ve en yüksek enzim üretiminin pH 6.5 değerinde olduğunu gözlemlemiştir. Bunun da bakteriyel büyümenin artmasıyla doğru orantılı olduğu tahmin edilmektedir.

4.5 Sıcaklığın Enzim Üretimi Üzerine Etkisi

Enzim üretimi için gerekli optimum sıcaklık değerini belirlemek amacıyla, bakteriler optimum pH'ya sahip sıvı besiyerlerinde 50 55 ve 60°C olmak üzere üç farklı sıcaklık değerinde 72'şer saat süreyle inkübe edildikten sonra α -amilaz enzim aktivitesi ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar şekil 4.5'de gösterilmiştir.



Şekil 4.5 *G.stearothermophilus* ve *Geobacillus* sp. D413'ün nişasta (%1.0)+yeast ekstrakt (%0,5) + tripton (%1.0) içeren besiyerinde (pH:7.0) farklı sıcaklıkların enzim üretimine etkisi

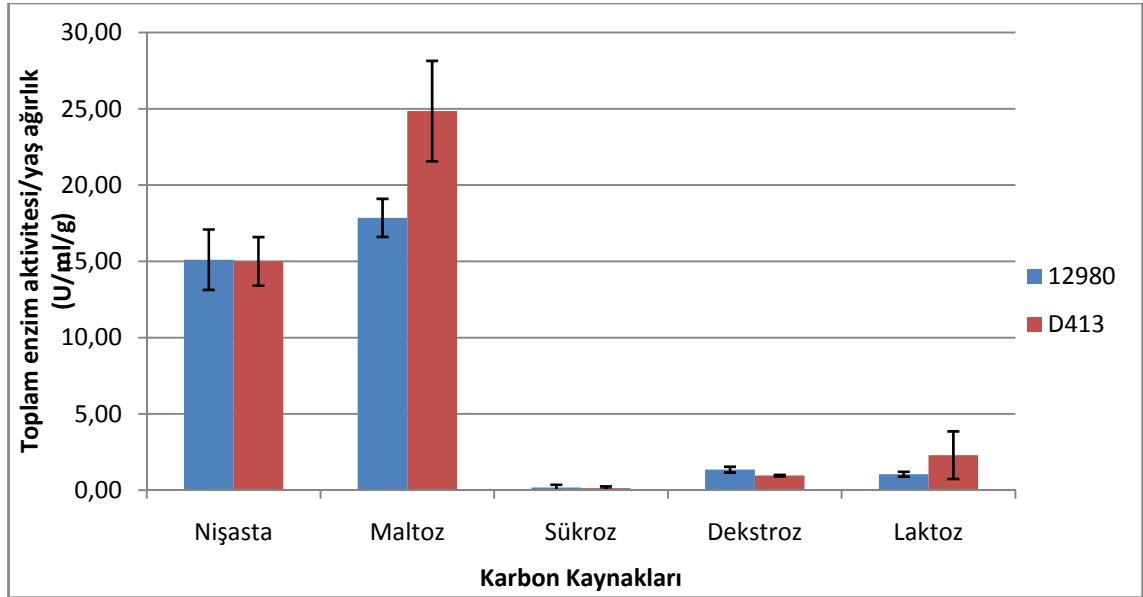
Şekilde 4.5'de görüldüğü gibi her iki izolatın da enzim üretimi için ihtiyaç duyduğu optimum sıcaklık 55°C olarak belirlenmiş olup, 50 ve 60°C'lerde enzim üretiminde düşüş olduğu tespit edilmiştir.

Bununla birlikte *Geobacillus thermodenitrificans* HRO10 ile yapılan çalışmada optimum enzim üretim sıcaklığının 80°C olduğu belirtilirken, termofilik *Bacillus* sp. K-12 izolatında enzim üretim sıcaklığının 42°C olduğu tespit edilmiştir (Ezeji ve Bahl 2006, Kıran vd. 2005).

Adhikari vd. (2010), *Geobacillus* sp. IPTN izolatında amilaz üretiminin 50°C ile 80°C arasında gerçekleştiğini, ancak enzim üretimi için ihtiyaç duyulan optimum sıcaklığın, aynı zamanda optimum büyüme sıcaklığı olan 60°C olduğunu belirtmiştir.

4.6 Farklı Karbon Kaynaklarının Enzim Üretimi Üzerine Etkisi

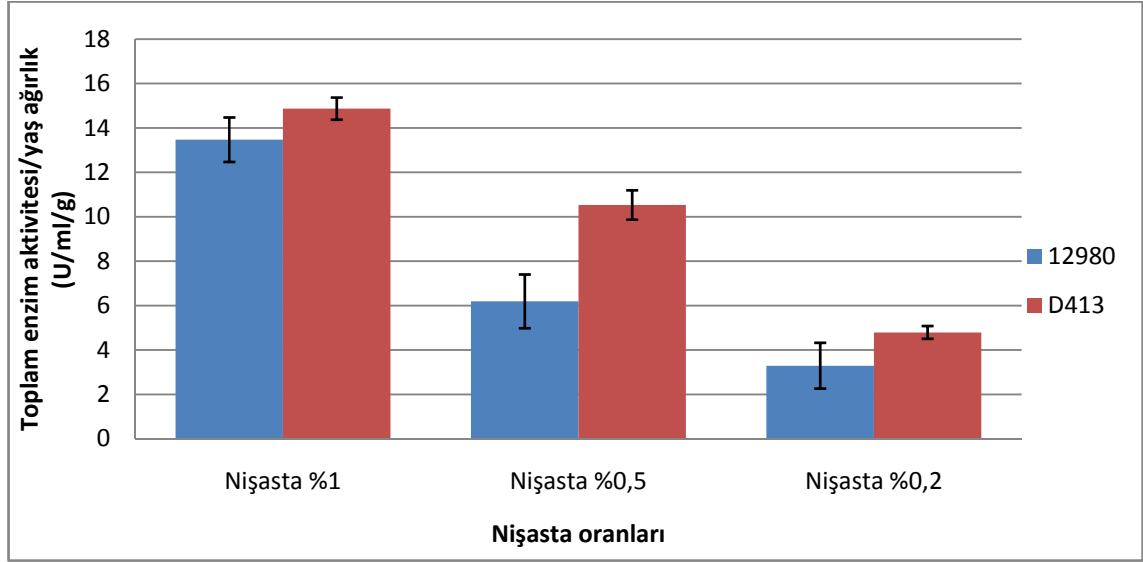
Karbon kaynaklarının enzim üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla besiyerine karbon kaynağı olarak farklı oran ve bileşimlerde nişasta, sükroz, dekstroza, laktoz ve maltoz ilave edilmiştir. Elde edilen bulgular şekilde gösterilmiştir.



Şekil 4.6 Farklı karbon kaynaklarının *G.stearothermophilus* ve *Geobacillus* sp. D413'ün pH:7.0 ve 55°C'deki enzim üretimi üzerine etkisi

Şekil 4.6'da görüldüğü gibi karbon kaynağı olarak nişasta veya maltoz kullanıldığında enzim üretiminin maksimum düzeyde gerçekleştiği, buna karşın sükroz, dekstroza veya laktoz kullanıldığında ise enzim üretiminde büyük bir düşüş olduğu gözlenmiştir. En düşük enzim üretimi sükroz içeren besiyerinde meydana gelmiş olup, bu besiyerinde

D413 izolatının ve standart suşun spesifik aktiviteleri sırasıyla 0.21 ve 0.14 U/ml/g olarak kaydedilmiştir. Maltoz içeren besiyerinde bakteri gelişimi nişastalı besiyerine göre daha az olmasına karşın, besiyerindeki enzim üretimi daha yüksek olarak tespit edilmiş; böylelikle de spesifik aktivite sonucu yükselmiştir.



Şekil 4.7 Farklı nişasta oranlarının *G.stearothermophilus* ve *Geobacillus* sp. D413'ün (pH:7.0) 55°C'deki enzim üretimi üzerine etkisi

Şekil 4.7'de gösterildiği gibi α -amilaz enzimi için temel substrat olarak kullanılan nişastanın besiyerindeki oranının azaltılmasıyla doğru orantılı olarak enzim üretiminin de azaldığı tespit edilmiştir.

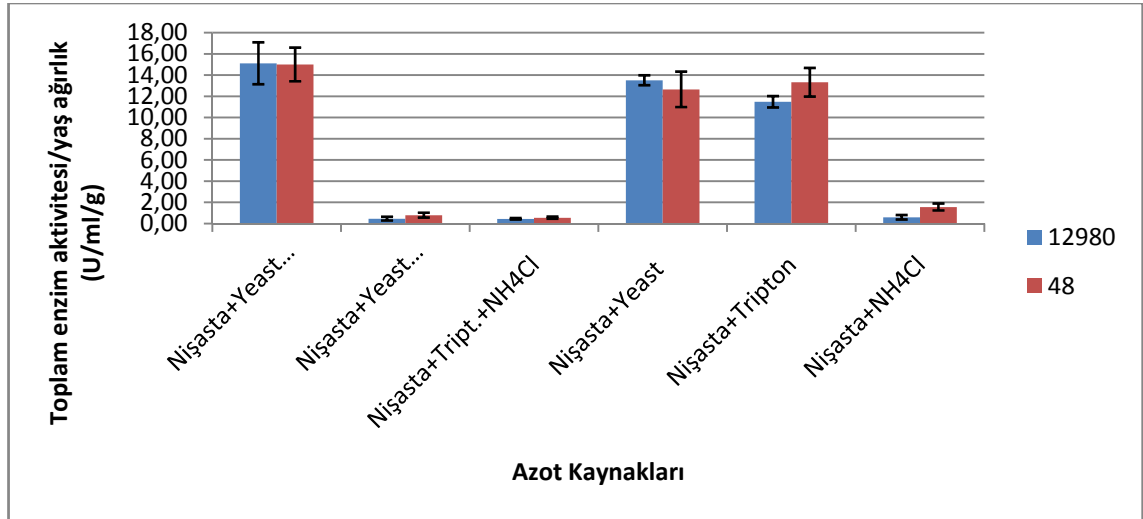
Santos ve Martins (2003) termofilik *Bacillus* sp. ile yaptığı çalışmada α -amilaz üretimi için nişasta ve maltozun en iyi karbon kaynakları olduğunu belirtmiş, bunun yanında glukoz, fruktoz ve sükrozun ise katabolik represyona sebep olarak enzim aktivitesini yüksek oranda düşürdüğünü ifade etmişlerdir.

Bir başka çalışmada termofilik *Bacillus* K-12 ile yapılan çalışmada da glukoz, laktoz ve dekstrozun karbon kaynağı olarak kullanılması sonucunda enzim aktivitesinin büyük ölçüde azaldığı, bununla hücre metabolizmasında katabolik represyon sonucu gerçekleştiği belirtilmiştir (Kıran vd. 2005).

Adhikari vd. (2010) de *Geobacillus* sp. IPTN ile yaptığı çalışmada karbon kaynağı olarak glukoz kullanıldığında enzim üretiminin düştüğünü belirtmiştir. *Bacillus* cinsinin birçok türünde karbonhidrat parçalayıcı enzimlerin sentezi, glukoz gibi çabuk metabolize edilebilen substratlar tarafından sebep olunan katabolik represyona bağlı olarak baskılanır.

4.7 Farklı Azot Kaynaklarının Enzim Üretimi Üzerine Etkisi

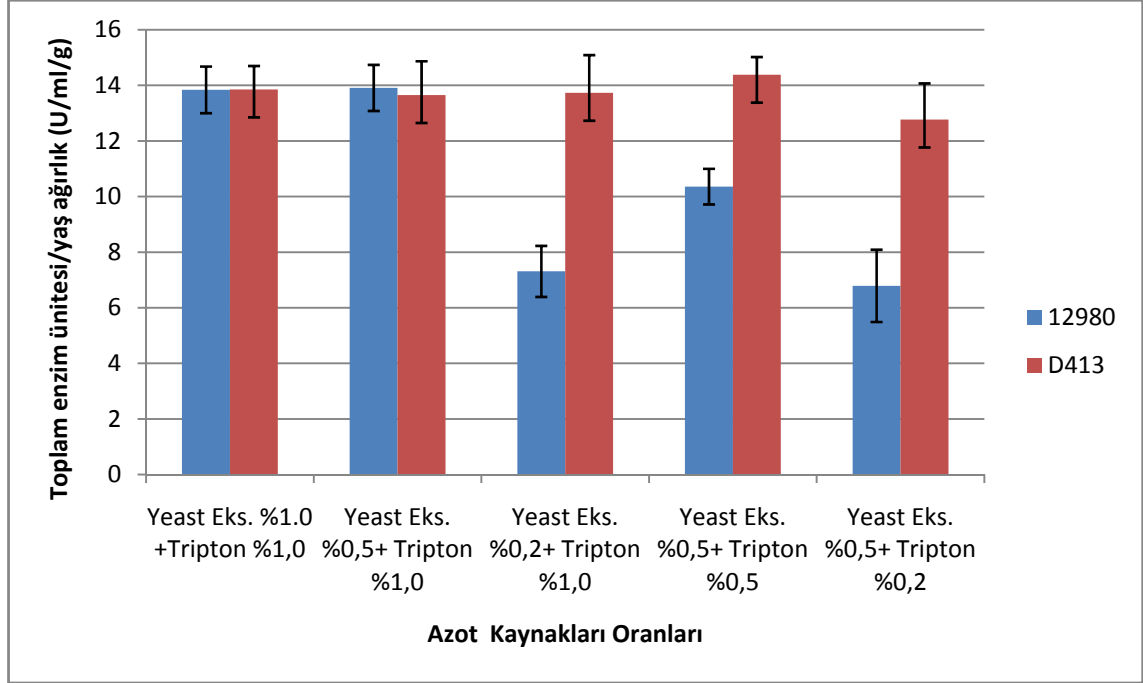
Azot kaynaklarının enzim üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla, besiyerine azot kaynağı olarak çeşitli oran ve bileşimlerde tripton, yeast ekstrakt ve amonyum klorid ilave edilmiş ve α -amilaz enzim aktivitesi ölçülmüştür. Elde edilen bulgular şekil 4.8’de gösterilmiştir.



Şekil 4.8 Farklı azot kaynaklarının *G.stearothermophilus* ve *Geobacillus* sp. D413’ün (pH:7.0) 55°C’deki enzim üretimi üzerine etkisi

Şekil 4.8’de görüldüğü üzere, azot kaynağı olarak sadece amonyum klorid içeren besiyerinde hem bakteri üremesi hem de enzim üretimi azalmıştır. Bu sonuca göre amonyum kloridin D413 izolatu ve standart suştan elde edilen α -amilaz enzimi için inhibitör etkisi yaptığı söylenebilir. Bununla birlikte besiyeri içeriğinde amonyum kloridin yanında yeast ekstrakt veya triptonun bulunması sonucunda bakteri üremesi görülürken sadece enzim üretimi azalmıştır.

Azot kaynaklarının besiyerindeki oranının enzim üretimi üzerine etkisini belirlemek amacıyla, besiyerindeki tripton ve yeast ekstrakt oranları değiştirilmiş ve sonuçları şekil 4.9’da gösterilmiştir.



Şekil 4.9 Azot kaynaklarının farklı oranlarının *G.stearothermophilus* ve *Geobacillus* sp. D413’ün (pH:7.0) 55°C’deki enzim üretimi üzerine etkisi

Şekilde de görüldüğü gibi *G.stearothermophilus* standart suşunda yeast ekstraktın oranının %0,5’den %0,2’ye düşürülmesiyle enzim üretiminin düştüğü ancak %1.0’e çıkarıldığında ise önemli bir değişimin gözlemlenmediği belirlenmiştir. Ayrıca triptonun oranının %1.0 olan temel orandan %0,5 ve %0,2’ye düşürülmesi sonucunda standart suşta enzim üretiminin oranla bağlantılı olarak azaldığı, buna karşın *Geobacillus* sp. D413 izolatında ise önemli bir değişimin görülmediği tespit edilmiştir. Sonuç olarak *Geobacillus* sp. D413 izolatının enzim üretiminin, azot kaynaklarının oranının değişmesine karşı standart suşun enzim üretimine göre daha stabil olduğu gözlenmiştir.

Kıran ve Çömlekçioğlu (2003), *Bacillus* sp. K-12’nin oransal α -amilaz aktivitesinin 48 saat inkübasyon sonunda azot kaynağı olarak maya özütü içeren besiyerinde %100, et özütü içeren besiyerinde %81, pepton içeren besiyerinde %68 ve amonyum sülfat içeren besiyerinde %10 olduğunu belirlemişlerdir.

Sarıkaya (1995), farklı azot kaynakları bulunan besiyerinde *B. amyloliquefaciens*'in α -amilaz aktivitesini test etmiştir. Çalışmada en yüksek oransal aktivitenin maya özütü içeren ortamda olduğunu belirlenmiştir.

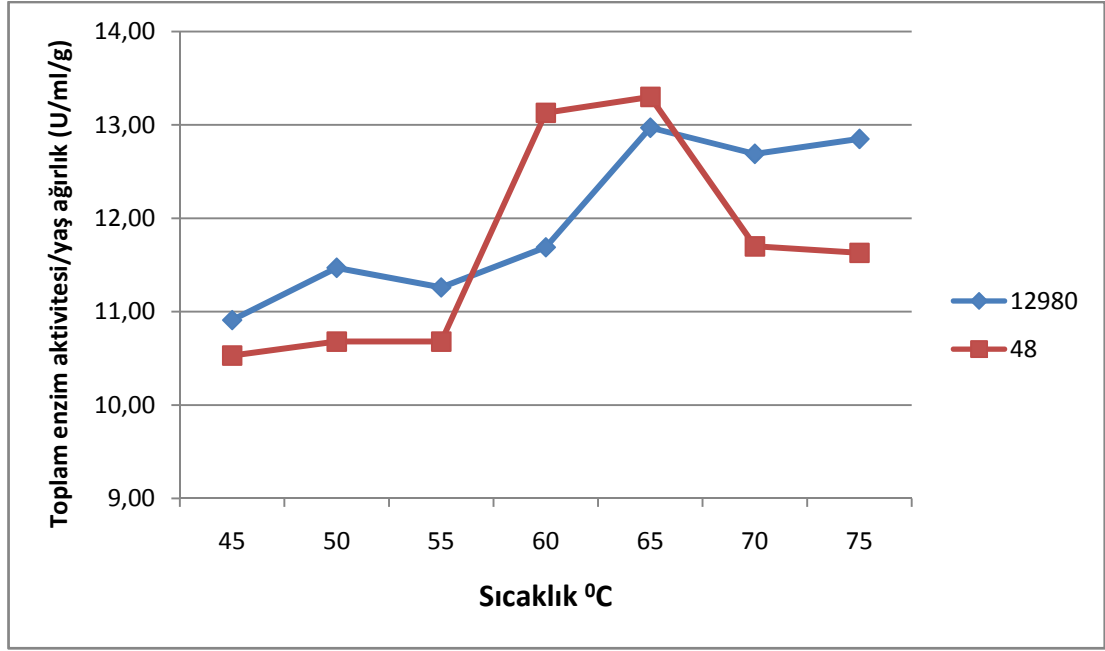
Narang ve Satyanarayana (2001), yeni izole edilmiş bir ekstrem termofil olan *Bacillus thermooleovorans* ile yaptıkları bir çalışmada bakterinin α -amilaz üretiminin tripton içeren besiyerinde maksimum düzeyde gerçekleştiğini belirtmişlerdir.

Çizelge 4.3 Farklı karbon ve azot kaynaklarının enzim üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi

Besiyerleri	<i>G. stearothermophilus</i> DSM 22 ^T 12980			<i>Geobacillus</i> sp. D413		
	Pelet (g)	Enzim Ünitesi (U/ml)	Spesifik Aktivite (U/ml/g)	Pelet (g)	Enzim Ünitesi (U/ml)	Spesifik Aktivite (U/ml/g)
Nişasta + Yeast Ekstrakt + Tripton (%1.0 + % 0.5 + % 1.0)	0,08±0,005	0,95±0,16	13,6±1,48	0,08±0,004	1,23±0,05	15,38±1,59
Nişasta + Yeast Ekstrakt + Tripton (%0.5 + % 0.5 + % 1.0)	0,09±0,006	0,55±0,10	6,19±1,21	0,07±0,005	0,73±0,04	10,53±0,66
Nişasta + Yeast Ekstrakt + Tripton (%0,2 + % 0.5 + % 1.0)	0,05±0,002	0,16±0,04	3,29±1,03	0,08±0,005	0,38±0,02	4,79±0,29
Sükroz + Yeast Ekstrakt + Tripton (%1.0 + % 0.5 + % 1.0)	0,07±0,002	0,01±0,008	0,21±0,018	0,08±0,006	0,01±0,007	0,14±0,11
Dekstroz + Yeast Ekstrakt + Tripton (%1.0 + % 0.5 + % 1.0)	0,06±0,003	0,08±0,009	1,35±0,19	0,09±0,007	0,09±0,005	0,96±0,05
Laktoz + Yeast Ekstrakt + Tripton (%1.0 + % 0.5 + % 1.0)	0,06±0,004	0,06±0,08	1,05±0,16	0,09±0,004	0,21±0,10	2,30±1,56
Maltoz + Yeast Ekstrakt + Tripton (%1.0 + % 0.5 + % 1.0)	0,05±0,002	0,89±0,06	17,85±1,25	0,06±0,005	1,49±0,20	24,85±3,29
Nişasta + Yeast Ekstrakt + Tripton (%1.0 + % 1.0 + % 1.0)	0,08±0,004	0,96±0,05	13,84±0,84	0,10±0,006	1,06±0,05	13,85±0,81
Nişasta + Yeast Ekstrakt + Tripton (%1.0 + % 0.2 + % 1.0)	0,08±0,005	0,58±0,07	7,31±0,92	0,09±0,003	1,37±0,13	13,73±1,36
Nişasta + Yeast Ekstrakt + Tripton (%1.0 + % 0.5 + % 0.5)	0,07±0,006	0,73±0,05	10,36±0,64	0,10±0,007	1,44±0,21	14,38±2,10
Nişasta + Yeast Ekstrakt + Tripton (%1.0 + % 0.5 + % 0.2)	0,08±0,003	0,54±0,10	6,79±1,30	0,10±0,009	1,28±0,09	12,77±0,90
Nişasta + Yeast Ekstrakt + NH ₄ Cl (%1.0 + % 0.5 + % 0.5)	0,07±0,004	0,03±0,01	0,46±0,18	0,10±0,005	0,08±0,02	0,80±0,23
Nişasta+ Tripton + NH ₄ Cl (%1.0 + % 1.0 + % 0.5)	0,07±0,008	0,03±0,008	0,44±0,07	0,09±0,004	0,06±0,01	0,55±0,10
Nişasta + Yeast ekstrakt (%1.0 + %0.5)	0,06±0,006	0,79±0,02	13,51±0,47	0,08±0,004	1,01±0,10	12,63±1,67
Nişasta + Tripton (%1.0 + %1)	0,08±0,007	0,92±0,04	11,48±0,54	0,08±0,005	1,06±0,10	13,32±1,35
Nişasta + NH ₄ Cl (%1.0 + %0.5)	0,03±0,003	0,02±0,001	0,59±0,21	0,03±0,003	0,05±0,01	1,56±0,33

4.8 Sıcaklık ve pH'nın Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

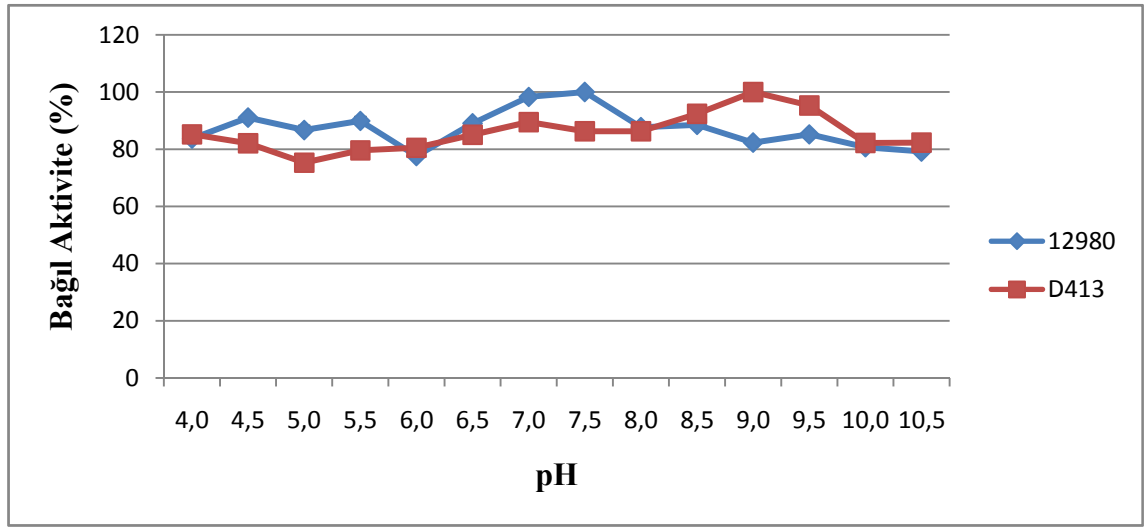
Enzimlerin optimum aktivite gösterdikleri sıcaklık değerinin belirlenmesi amacıyla, 55°C'de üretilen α -amilaz enzimlerinin aktivitesi sırasıyla 45, 50, 55, 60, 65, 70 ve 75°C'de ölçülmüştür. Elde edilen bulgular şekil 4.10'da gösterilmiştir.



Şekil 4.10 Farklı sıcaklık değerlerinin *G.stearothermophilus* ve *Geobacillus* sp. D413'ün pH:7.0'deki enzim aktivitesi üzerine etkisi

Şekil 4.10'da görüldüğü üzere her iki bakterinin enzim aktivitesi 65°C'ye kadar artmış olup, en yüksek aktiviteyi 65°C'de gösterdikten sonra bu değerden itibaren düşüşe geçtiği gözlenmiştir.

Optimum enzim aktivitesini belirlemek amacıyla pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0, 10.5 değerlerindeki tamponlarda hazırlanan substratlar kullanılarak enzim aktivitesi ölçülmüştür. Optimum pH olarak belirlenen değerdeki aktivite %100 olarak kabul edilmiş olup oransal aktiviteler bu doğrultuda hesaplanmıştır. Sonuçlar şekil 4.11'de gösterilmiştir.



Şekil 4.11 Farklı pH değerlerinin *G.stearothermophilus* ve *Geobacillus* sp. D413'ün 65°C'de enzim aktivitesi üzerine etkisi

Şekil 4.11'den anlaşılabacağı gibi standart suş olan *G. stearothermophilus*'tan elde edilen α -amilaz enzimi maksimum aktivitesini pH: 7.5'da gösterirken, bu değerden sonraki pH değerlerinde enzim aktivitesi azalmıştır. *Geobacillus* sp. D413 izolatının α -amilaz enzimi ise maksimum aktivitesini pH:9.0 tamponunda göstermiştir.

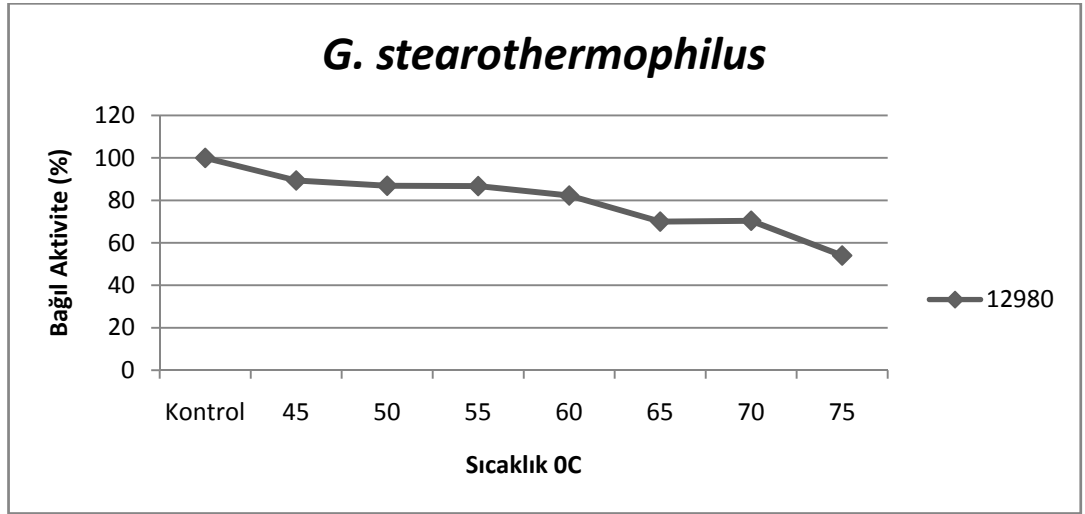
Adhikari vd. (2010) *Geobacillus* sp. IPTN ile yaptığı çalışmada enzim aktivitesi için optimum sıcaklığın 80°C, optimum pH'nın ise 5.0 olduğunu tespit etmişlerdir.

Khajeh vd. (2010) yaptıkları bir çalışmada *Geobacillus* sp. LH8 izolatından elde edilen enzimin maksimum aktiviteyi gösterdiği sıcaklık değerinin 80°C, pH değerinin ise 5-7 arası olduğunu belirlemişlerdir.

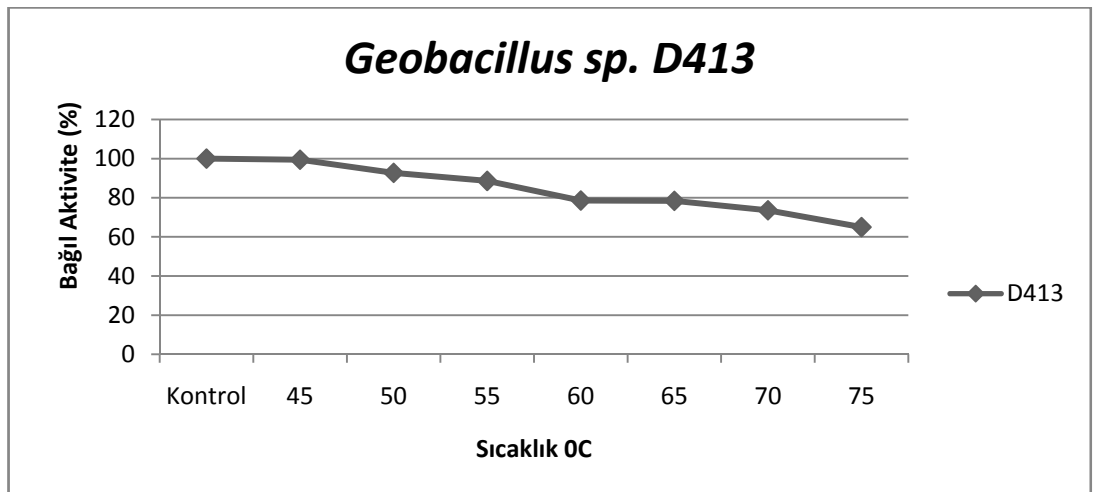
Bir başka çalışmada ise *Geobacillus thermoleovorans* YN suşundan elde edilen α -amilaz aktivitesi için optimum sıcaklığı 75°C olarak tespit etmişlerdir (Soliman vd. 2010).

4.9 Enzimlerin Sıcaklık ve pH Stabilitesi

Standart suş olan *G. stearothermophilus* ve *Geobacillus* sp. D413 izolatının α -amilaz enzimlerinin termal stabilitesini belirlemek amacıyla enzimler 45, 50, 55, 60, 65, 70 ve 75°C sıcaklıklarda 10 dakika ön inkübasyona uğratılmış ve ardından buz üzerine alındıktan sonra aktivite tayini yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar şekil 4.12 - 4.13’de verilmiştir.



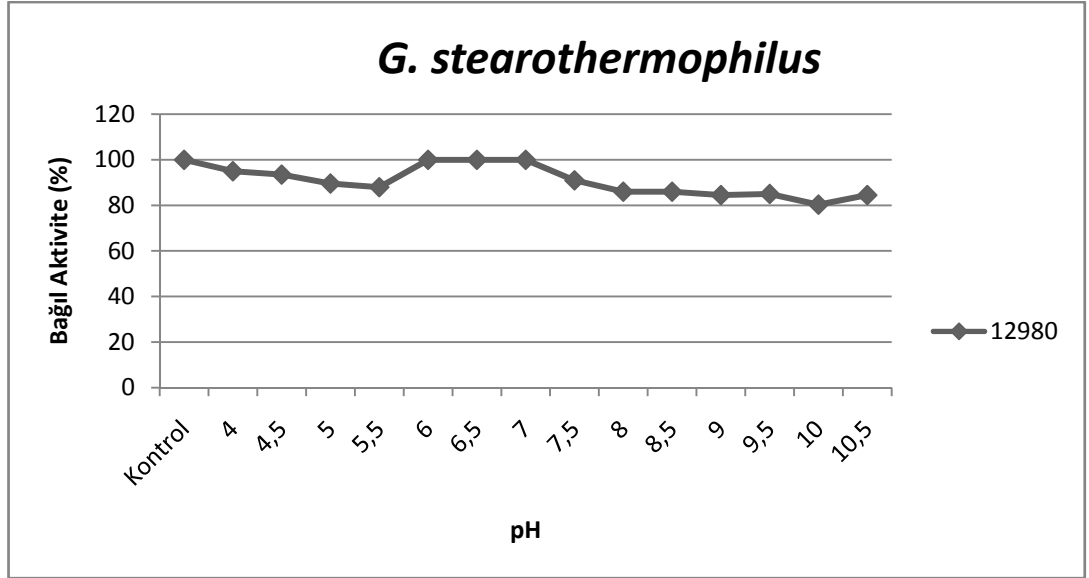
Şekil 4.12 *G. stearothermophilus* DSM 22^T 12980 α -amilazının termal stabilitesi



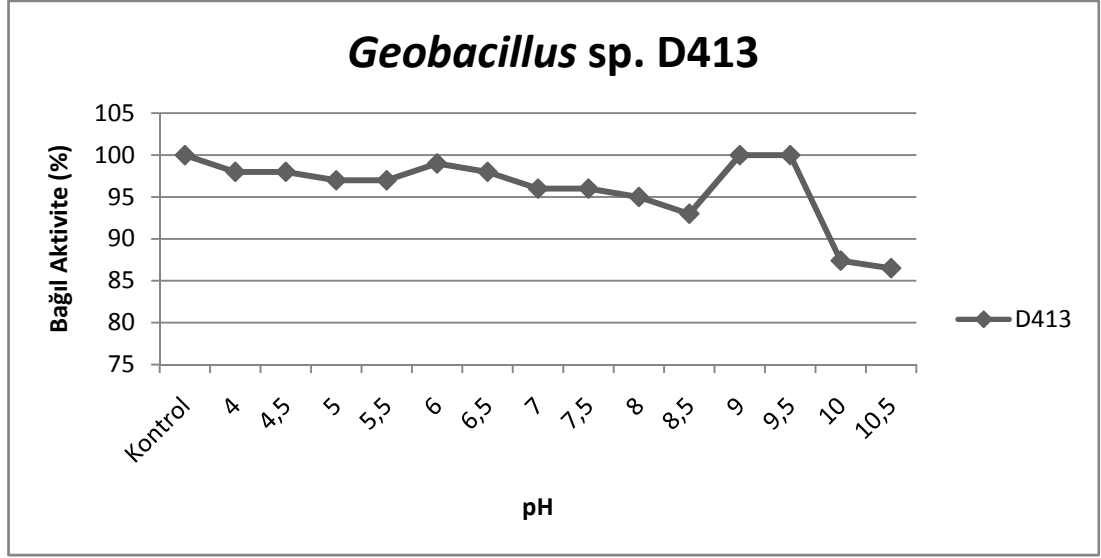
Şekil 4.13 *Geobacillus* sp. D413 α -amilazının termal stabilitesi

Şekillerde de görüldüğü gibi standart suş enziminin 45°C ön inkübasyon sıcaklığından itibaren aktivitesinde düşüş gözlenmiş olmakla birlikte, 75°C sıcaklıktaki ön inkübasyon sonucunda da aktivitesini %54 oranında koruduğu belirlenmiştir. Bunun yanında D413 izolatının α -amilaz enzimi ise standart suşa göre daha stabil olup, 75°C’de aktivitesini %65 oranında koruduğu gözlenmiştir.

Enzimlerin pH stabilitesinin belirlenmesi amacıyla pH:4.0-10,5 arasındaki farklı tamponlarda 37°C 15 saat süreyle inkübasyona bırakılmış ve optimum sıcaklık ve pH’da aktivite tayini yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar şekil 4.14 - 4.15’ de verilmiştir.



Şekil 4.14 *G. stearothermophilus* DSM 22^T 12980 α -amilazının pH stabilitesi



Şekil 4.15 *Geobacillus* sp. D413 α -amilazının pH stabilitesi

Enzimlerin pH stabilitelerinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışma sonucunda standart suş enziminin pH 10,5’da aktivitesini %85 oranında, *Geobacillus* sp. D413 izolat enziminin ise %86,5 oranında koruduğu belirlenmiştir.

Yapılan bir çalışmada *Bacillus licheniformis* MY 10 suşunun α -amilazının özellikleri incelenerek optimum 75-80°C’de ve pH 5.0-6.5’da aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Oransal enzim aktivitesinin 70, 80 ve 90°C’de 30 dakika inkübasyon sonucu sırasıyla %100, %91.5 ve %59; 60 dakika inkübasyon sonucu ise sırasıyla %92, %68 ve %37.5 olduğu belirlenmiştir (Kumar vd. 1990).

Soliman vd. (2010) yaptıkları çalışmada *Geobacillus thermoleovorans* YN suşundan elde edilen enzimin 70°C’de 60 dakika ön inkübasyon sonucunda aktivitesini %95 oranında koruduğunu göstermişlerdir.

5. SONUÇ

Tez çalışması kapsamında Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarından temin edilen 6 adet termofilik *Geobacillus* izolatı ve 1 adet standart *Geobacillus* suşunun katı besiyerinde amilaz aktivitesi yönünden incelenmiş ve en yüksek amilaz aktivitesine sahip izolat belirlenmiştir. Bundan sonraki aşamalarda en yüksek aktiviteye sahip olarak seçilen izolat kullanılmıştır.

Seçilen yüksek aktiviteli D413 izolatı ve standart suş olan *G. stearothermophilus* DSM 22^T ATCC 12980 %1.0 oranında nişasta içeren besiyerinde 55°C 150 rpm’de 96 saat süreyle inkübe edilmiş ve en yüksek aktiviteyi 72. saatte gösterdiği bulunmuştur.

Geobacillus sp. D413 izolatının yapılan besiyeri pH denemeleri sonucunda enzim üretimi için ihtiyaç duyduğu optimum pH’nın 7.0 olduğu tespit edilmiştir. Optimum pH değerinin belirlenmesini takiben enzim üretimi için gerekli olan optimum sıcaklık değerini belirlemek amacıyla 50, 55 ve 60°C’lerde inkübasyon yapılmış ve optimum sıcaklık 55°C olarak belirlenmiştir.

Enzim üretimine karbon ve azot kaynaklarının etkisini araştırmak üzere yapılan çalışmada ise, nişasta ve maltoz kullanılan besiyerlerinde enzim aktivitesinin en yüksek seviyede olduğu, buna karşın süktroz içeren besiyerinde <1.0 U/ml/g seviyesinde, dekstrozu ve laktozlu besiyerlerinde ise ≈1,0 U/ml/g seviyesinde enzim aktivitesinin olduğu gözlenmiştir. Yapılan literatür çalışmaları sonucunda, bu duruma sukroz, glukoz gibi şekerlerin katabolik represyona sebep olarak yol açtığı bulunmuştur. Ayrıca temel substrat olarak kullanılan nişastanın besiyerindeki oranıyla aktivitenin doğru orantılı olduğu belirlenmiştir.

Azot kaynağı olarak kullanılan tripton, yeast ekstrakt ve amonyum kloridin besiyerindeki bileşim ve oranı değiştirilmiş; elde edilen sonuçlara göre amonyum kloridin eklenmesi sonucunda ise enzim aktivitesinin yaklaşık 1,56 U/ml/g değerine

düştüğü belirlenmiştir. Bu sonuca göre amonyum kloridin α -amilaz için inhibitör etkisi yaptığı tespit edilmiştir. Azot kaynaklarının farklı oranlarda kullanılması sonucunda ise standart suşun enzim üretiminin tripton ve yeast ekstraktın oranının düşürölmesine paralel olarak azaldığı, ancak *Geobacillus* sp. D413 izolatının enzim üretiminin standart suşa oranla daha stabil kaldığı belirlenmiştir.

α -Amilaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık ve pH değerinin bulunması amacıyla yapılan çalışmalar sonucunda ise standart suştan elde edilen enzimin optimum aktivitesini 65°C ve pH:7.5 değerinde gösterdiği belirlenirken, D413 izolatından elde edilen enzimin ise optimum aktivite gösterdiği sıcaklık ve pH değeri sırasıyla 65°C ve 9.0 olduğu tespit edilmiştir.

Sıcaklık ve pH stabilitesinin belirlemesi amacıyla 45-75°C sıcaklıklarda ve pH: 4.0-10.5 arasında stabilite çalışmaları yapılmıştır. *Geobacillus* sp. D413 izolatından elde edilen α -amilaz enziminin aktivitesini, 75°C sıcaklıkta %65, pH:10,5 değerinde ise % 86,5 oranında koruduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak; yapılan bu çalışma ile *Geobacillus* sp. izolatının α -amilaz üretim koşulları kısmen optimize edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Anonymous. 1988a. Handbook of amylases and related enzymes. Edited by the amylase research society of japan. Pergamon press, Oxford.
- Anonymous. 2009d. Web sitesi <http://www.sigmaaldrich.com/lifescience/metabolomics/enzymeexplorer/learningcenter/carbohydrateanalysis.html>, Erişim Tarihi: 15. 12. 2009.
- Adams, M.W. 1993. Enzymes and proteins from organisms that grow near and above 100 degrees C. Annu Rev Microbiol, Vol. 47, pp. 627–58.
- Adhikari, D. K., Dheeran, P., Kumar, S., Jaiswal, Y. K. 2010. Characterization of hyperthermostable α -amylase from *Geobacillus* sp. IPTN. Appl Microbiol Biotechnol., Vol. 86, 1857–1866 DOI 10.1007/s00253-009-2430-9.
- Aguilar, G., Morlon, J., Guyot, B. Trejo-Aguilar, J.P. (2000). Purification and characterization of an extracellular α -amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010T, an amylolytic lactic acid bacterium, *Enzyme Microb. Technol.* Vol. 27, pp: 406–413.
- Aiba, S., Kılal, 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, Vol. 32, pp. 3059-1065.
- Aiyer, P.V. 2005. Amylases and their applications. African Journal of Biotechnology Vol. 4 (13), pp. 1535-1529.

- Aquino, A.C.M.M., Jorge, J.A., Terenza, H.F. and Polizeli, M.L.T.M. 2003. Studies on thermostable α -amylase from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol. 61, pp. 323–328.
- Arıkan., B., Ünalı, N., Coral, G., Colak, O., Aygan, A. and Gülnaz, O. 2003. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. Isolate ANT-6. Process Biochemistry Vol. 38:1397-1403.
- Becker, P. 1997. Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase producing thermophile *Bacillus* sp. IHI-91 on olive oil. Appl. Microb. Biotechnol. Vol. 48, 184–190.
- Bernhardsdotter, E.C.M.J., Ng, J.D., Garriott, O.K., Pusey, M.L. 2005. Enzymic properties of an alkaline chelator-resistant α -amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate L1711. Process Biochem. Vol. 40, pp. 2401–2408.
- Bertoldo, C. and Antranikian, G. 2002. Starch hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. Current Opinion in Chemical Biology Vol. 6, pp. 151-160.
- Bhat, M.K. 2000. Cellulase and related enzymes in biotechnology. Biotechnology Advances, 18 (5): 355-458.
- Boel, E., Brady, L., Brzozowski, A.M., Derewenda, Z., Dodson, G.G., Jensen, V.J., Petersen, S.B, Swift, H., Thim, L., Woldike, H.F. 1990. Calcium binding in α -amylases: an X-ray diffraction study at 2.1-Å⁰ resolution of two enzymes from *Aspergillus*. Biochemistry Vol. 29, pp. 6244-6249.
- Canganella, F., Andrade, C., Antranikian, G. 1994. Characterization of amylolytic and pullulytic enzymes from thermophilic archaea and from a new *Feravidobacterium* species. Appl. Microb. Biotechnol. Vol. 42, pp. 239–245.

- Cowan, D.A. 1992. Biochemistry and molecular biology of the extremely thermophilic archaeobacteria. In: Herbert, RA, Sharp, RJ, editors. Molecular biology and biotechnology of extremophiles. London: Blackie and Son, pp. 1–43.
- Çöleri Cihan, A. 2007. Bazı termofilik *Bacillus* türlerinin termostabil A-glukozidaz üretim kapasiteleri ve enzimlerin kısmi karakterizasyonu, Doktora Tezi
- Danson, M.J and Hough, D.W. 1998. Structure, function and stability of enzymes from the Archaea. Trends Microbiol. Vol. 6, pp. 307–14.
- Eichler, J. 2001. Biotechnological uses of archaeal extremozymes. Biotechnology Advances Vol. 19, pp. 261- 278.
- Estelle, L., Ladrat, C., Ann, G., Georges, B., Francis, D. 1997. Thermostable amylolytic enzymes of thermophilic microorganisms from deep-sea hydrothermal vents. Animal Biology. CR Acad. Sci. Paris 320, 893–898.
- Everly, C., Alberto, J. 2000. Stressors, stress and survival: overview. Front. Biosci., Vol. 5, pp. 780–786.
- Ezeji, T. C., Bahl, H. 2006. Production of raw-starch-hydrolysing α -amylase from the newly isolated *Geobacillus thermodenitrificans* HRO10. World J. Microbiol. Biotechnol. 23:1311–1315 DOI 10.1007/s11274-007-9353-3.
- Fujiwara, S. 2002. Extremophiles: Developments of their special functions and potential resource. Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol. 94(6), pp. 518-525.
- Gomes, J. and Steiner, W. 2004. Extremophiles and extremozymes. Food Technol. Biotechnol. Vol. 42 (4), pp. 223–235.

- Goyal, N., Gupta, J.K., Soni, S.K. 2005. A novel raw starch digesting thermostable α -amylase from *Bacillus* sp. I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch. *Enzyme Microb. Technol.* Vol. 37, pp. 723–734.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., Chauhan, B. 2003. Microbial α -amylases: A biotechnological perspective. *Process Biochem.* Vol. 38, pp. 1599–1616.
- Hagihara, H., Igarashi, K., Hayashi, Y., Endo, K., Ikawa-Itayama, K., Ozaki, K., Kawai, S., Ito, S. 2001. Novel α -amylase that is highly resistant to chelating reagents and chemical oxidants from the alkaliphilic *Bacillus* isolate KSM-K38. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 67, pp. 1744–1750.
- Haki, G.D. and Rakshit, S.K. 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology* Vol. 89, pp. 17–34.
- Hamilton, L.M., Kelly, C.T., and Fogarty, W.M. 1999. Purification and properties of the raw starch degrading α -amylase of *Bacillus* sp. IMD434. *Biotechnol. Lett.* 21:111-115.
- Herbert, R. and Sharp, R. 1992. *Molecular Biology and Biotechnology of Extremophiles*, Blackie & Son Ltd, New York.
- Horikoshi, K. 1999. Alkaliphiles: Some applications of their products for biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* Vol. 63 (4), pp. 735-750.
- Iefuji, H., Chino, M., Kato, M., Imura, Y. 1996. Raw starch-digesting and thermostable α -amylase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2: Purification, characterization, cloning and sequencing, *Biochem. J.* Vol. 318, pp. 989–996.

- Jaenicke, R. and Böhm, G. 1998. The stability of proteins in extreme environments. *Current Opinion in Structural Biology* Vol. 8, pp. 738-748.
- Jensen, B., Olsen, J. 1991. Physicochemical properties of a purified alpha-amylase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Enzyme Microb. Technol.* Vol. 14, pp. 112–116.
- Jenkins, J. 1999. *The Humanure Handbook* (Chapter 3. Thermophilic Microorganisms). Forest Lane, 143, Grove City, PA.
- Keskin, H. 1982. *Besin Kimyası*. Fatih Yayınevi, Cilt II, s: 558, İstanbul.
- Khajeh, K., Hosseinkhani, S., Mollania, N., Dabirmanesh, B. 2010. Purification and characterization of a thermostable phytate resistant α -amylase from *Geobacillus* sp. LH8. *International Journal of Biological Macromolecules* 46, 27–36.
- Kıran, Ö. ve Çömlekçioğlu, U. 2003. Zeytinli Ilıcası (Kahramanmaraş)’ndan termofil alkafilik amilolitik *Bacillus* sp. suşlarının izolasyonu ve amilaz üretme yetenekleri üzerine azot kaynaklarının etkisi. *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi* 6(2), s. 41-48.
- Kıran, Ö., Çömlekçioğlu, U., ARIKAN, B. 2005. Effects of Carbon Sources and Various Chemicals on the Production of a Novel Amylase from a Thermophilic *Bacillus* sp. K-12. *Turk. J. Biol.* 29, s. 99-103 © TÜBİTAK.
- Kilara, M. 2002. Desai: Enzymes. In: *Food Additives*, Branen, A.L., Davidson, P.M., Salminen, S., Thorngate J.H., III (Eds.), Marcel Dekker Inc., pp. 661–706., New York, USA.

- Koch, R., Spreinat, K., Lemke, K., Antranikian, G. 1991. Purification and Properties of a hyperthermoactive α -amylase from the archaeobacterium *Pyrococcus woesei*. Arch. Microbiol. Vol. 15, pp. 572-578.
- Krahe, M., Antranikian, G., Markel, H. 1996. Fermentation of extremophilic microorganisms. FEMS Microbiol. Rev., 18
- 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., vol. 12.
- Kumar, S. and Nussinov, R. 2001. How do thermophilic proteins deal with heat? Cell Mol. Life Sci. Vol. 58, pp. 1216-1233.
- Kwak, Y., Akeba, T., Kudo, T., 1998. Purification and characterization of enzyme from hyperthermophilic archaeon *Thermococcus profundus*, which hydrolyses both α -1-4 and α -1-6 glucosidic linkages. J. Ferment. Bioeng. Vol. 86, pp. 363–367.
- Laderman, K., Davis, B., Krutzsch, H., Lewis, M., Griko, Y., Privalov, P., Anfinsen, C. 1993a. The purification and characterization of an extremely thermostable α -amylase from the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. J. Biol. Chem. Vol. 268, pp. 24394–24401.
- Leveque, E., Janecek, S., Haye, B. and Belarbi, A. 2000. Thermophilic archaeal amylolytic enzyme. Enzyme and Microbial Technology Vol. 26, pp. 3-14.
- Lopez, G. 1999. DNA supercoiling and temperature adaptation: a clue to early diversification of life? J. Mol. Evol. Vol. 46, pp. 439–452.

- Lowe, S.E., Jain, M.K. and Zeikus, J.G. 1993. Biology, ecology, and biotechnological applications of anaerobic bacteria adapted to environmental stresses in temperature, pH, salinity or substrates. *Microbiol Rev.* Jun. Vol. 57(2), pp. 451–509.
- Mac Gregor, E.A. 1988. α -Amylase structure and activity. *J. Protein Chem.* Vol. 7, pp. 399-415.
- Machius, M., Wiegand, G., Huber, R. 1995. Crystal structure of calcium-depleted *Bacillus licheniformis* α -amylase at 2.2 Å⁰ resolution. *J. Mol. Biol.* Vol. 246, pp. 545-559r.
- Mozhaev, V. 1993. Mechanism-based strategies for protein thermostabilization. *Trends Biotechnol.* Vol. 11, pp. 88–95.
- Narang, S. and Satyanarayana, T. 2001. Thermostable α -amylase production by an extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans*. *Letters in Applied Microbiolog* Volume 32 Page 31
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kahler, M. And Antranikian, G. 1999. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl Microbiol Biotechnol.* Vol. 51, pp. 711–29.
- Ohlsson, E. 1930. The two components of malt diastase, especially with reference to the mutarotation of the products formed in the hydrolysis of starch. *Physiol. Chem.* Vol. 189, pp. 17-63.
- Poonam, N., Dalel, S. 1995. Enzyme and microbial systems involved in starch processing. *Enzyme Microb. Technol.* Vol. 17, pp. 770–778.
- Ramkrishna, S., Samir, K., Chakrabarty, S. 1993. Immobilization of α -amylase from *Mycelophthora thermophila* D-14 (ATCC 48104). *Enzyme Microbiol. Technol.* Vol. 15, pp. 801–804.

- Riegal, E.R., Bissinger, H.G. 2003. Industrial Fermentation: Principles, Processes and Products. In: *Riegal's Handbook of Industrial Chemistry*, J.A. Kent, (Ed.), Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp. 963–1045, New York, USA.
- Santos, E. O., Martins, M. L. L., 2003. Effect of the medium composition on formation of amylase by *Bacillus* sp.. *Brazilian Archives Biology and Technology*, Vol. 46 n.1, pp. 129-134.
- Sarıkaya, E. 1995. α -Amilaz üreten bazı *Bacillus* suşlarının gelişme parametreleri, enzim özellik ve üretim koşullarının optimizasyonu. Doktora Tezi (Yayınlanmamış), 114s, Ankara.
- Sodhi, H.K., Sharma, K., Gupta, J.K., Soni, S.K. 2005. Production of a thermostable α -amylase from *Bacillus* sp. PS-7 by solid- state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production. *Process Biochem.* Vol. 40, pp. 525–534.
- Soliman, N.A., Berekaa, M. M., Abdel-Fattah, Y. R., 2007. Production, partial characterization and cloning of thermostable α -amylase of a Thermophile *Geobacillus thermoleovorans* YN. *Asian Network for Scientific Information Biotechnology* Vol. 6(2), pp. 175-183.
- Sudo, S., Ishikawa, T., Sato, K., Oba, T. 1994. Comparison of acid-stable α -amylase production by *Aspergillus kawachii* in solid- state and submerged culture. *J. Ferment. Bioeng.* Vol. 77, pp. 483–489.
- Suman, S., Ramesh, K. 2010. Production of a thermostable extracellular amylase from thermophilic *Bacillus* species. *J. Pharm. Sci. & Res.* Vol. 2(2), 149-154.
- Tarakçioğlu, Y. 1979. An Amylase Producing Maltotiose from *Bacillus subtilis*. *Agric. Biol. Chem.* Vol. 49 (4), pp. 1901-1097.

- Telefoncu, A. 1993. Besin Kimyası. E. Ü. Fen Fak. Yayınları No:149, 216 s, İzmir.
- Underkofler, L. 1976. Microbial enzymes. In: Miller, B., Litsky, W. (Eds.), Industrial Microbiology. McGraw-Hill, New York.
- Van der Maarel, M.J.E.C., Van der Veen, B., Uitdehaag, J.C.M., Leemhuis, H., Dijkhuizen, L. 2002. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. J. Biotechnol. Vol. 94, pp. 137–155.
- Viara, N., Elena, P., Elka, I. 1993. Purification and characterization of a thermostable α -amylase from *Bacillus licheniformis*. J. Biotechnol. Vol. 28, pp. 277–289.
- Vieille, K., Zeikus, G.J. 2001. Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses, and molecular mechanisms of thermostability. Microbiol. Mol. Biol. Rev. Vol. 65, pp. 1–43.
- Vihinen, M., Mantsala, P. 1990. Characterization of a thermostable *Bacillus stearothermophilus* α -amylase. Biotechnol. Appl. Biochem. Vol. 12, pp. 427–435.
- Wanderley, K.J., Torres, F.A.G., Moraes, L.M.P., Ulhoa, C.J. 2004. Biochemical characterization of α -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. FEMS Microbiol. Lett. Vol. 231, pp. 165–169.
- Weemaes, C., De Cordt, S., Goossens, K., Ludikhuyze, L., Hendrickx, M., Heremans, K., Tobback, P. 1996. High pressure, thermal, and combined pressure-temperature stabilities of α -amylases from *Bacillus* species, *Biotechnol. Bioeng.* Vol. 50, pp. 49–56.

- Wiseman, A. 1987. Handbook of enzyme biotechnology. Second Edition. Chapter 3. The application of enzymes in industry, pp .274-373.
- Yang, C.H., Liu, W.H. 2004. Purification and properties of a maltotriose- producing a-amylase from *Thermobifida fusca*. Enzyme Microb. Technol. Vol. 35, pp. 254–260.
- Yazgan, O., Aksoy, A. 1983. Biyokimya Ders Notları. (Yayımlanmamıştır). s: 322, Erzurum.
- Zeikus, J.G. and Wolfe, R.S. 1972. *Methanobacterium thermoautotrophicum* sp. nov., an anaerobic, autotrophic, extrem thermophile. J. Bacteriol. Vol. 109, pp. 707-713.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Sennur ÇALIŞKAN

Doğum Yeri : İstanbul

Doğum Tarihi : 11.10.1987

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Rıfat Canayakın Süper Lisesi (2001-2005)

Lisans : Dumlupınar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü
(2005-2009)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü (2009-2011)