



T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Alginate kapsüllerinde tutuklanan *Bacillus amyloliquefaciens*  
-amilaz enziminin farklı nişasta kaynaklarını hidrolizleme  
yeteneğinin araştırılması

Serhan D. NÇBA

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA-2009



T.C.  
ULUDA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Alginat kapsüllerinde tutuklanan *Bacillus amyloliquefaciens*  
-amilaz enziminin farklı niasta kaynaklarını hidrolizleme  
yeteneğinin araştırılması

Serhan D. NÇBA

Doç. Dr. Elif DEMİRKAN  
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA-2009

T.C.  
ULUDA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Alginate kapsüllerinde tutuklanan *Bacillus amyloliquefaciens*  
-amilaz enziminin farklı niasta kaynaklarını hidrolizleme  
yeteneğinin araştırılması

Serhan DİNÇBA

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu Tez ..../...../200... tarihinde a a daki jüri tarafından oybirliği/oy  
çokluğu ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Elif DEMİRKAN

.....

Danışman

Doç. Dr. Figen ERTAN

.....

Yrd. Doç. Dr. Egemen DERE

.....

## ÖZET

Bu çalı mada *Bacillus amyloliquefaciens* kaynaklı  $\alpha$ -amilaz enzimi kalsiyum alginat kapsüllerinde immobilize edilmiştir. Serbest (immobilize edilmemiş) ve immobilize enzimin farklı niasta kaynakları (çözünür (Merck) ve patates, mısır, buğday, pirinç gibi lokal marketlerden satın alınan ticari niastalar) üzerindeki hidroliz yetenekleri araştırılmıştır. Enzim immobilizasyonu %2 alginat ve %5  $\text{CaCl}_2$  varlığında gerçekleştirilmiştir. Immobilizasyon verimi yaklaşık %89 olarak saptanmıştır.

Her iki enzim formunun kullanılan niastalarını benzer bir tarzda parçaladıkları görüldü. Immobilize enzimin sırasıyla ticari patates>çözünür patates> tic. buğday>tic. mısır>tic. pirinç ekinde hidroliz ettikleri, serbest enzimin ise sırasıyla ticari patates>çözünür patates>tic. mısır>tic. buğday>tic. pirinç niastalarını en iyi parçaladıkları saptanmıştır. Niastaların düşük ve yüksek konsantrasyonlarında fazla bir aktivite saptanmamıştır.  $\alpha$ -amilazın immobilize ve serbest formunun sırasıyla %8 ve %10, %1 pirinç niastası varlığında etki göstermediği belirlenmiştir.

Serbest ve immobilize  $\alpha$ -amilaz enzimlerinin sırasıyla, 50-60°C'ler arasındaki sıcaklıklarda ve 6.0-6.8 pH değerleri arasında optimum aktiviteye sahip oldukları tespit edilmiştir. Immobilize enzim yüksek sıcaklıklarda serbest enzime göre daha stabildir.

$\alpha$ -amilaz enzim aktivitesi metal iyonlarına bağımlı olduğundan, farklı metal iyonları kullanılarak bunların enzim aktivitesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Hiçbir metal iyonunun göreceli olarak fazla bir aktivite artışı göstermemelerine rağmen, göreceli olarak bir değerlendirme yapıldığında  $\text{Mg}^{+2}$ 'nin her iki enzim formu üzerinde stimülatör etki yaptığı, buna karşın  $\text{Cu}^{+2}$ 'nin inhibitör etkisi saptanmıştır. Diğer yandan, serbest enzimin  $\text{Li}^{+2}$ ,  $\text{Ba}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  ve  $\text{Ca}^{+2}$  varlığında immobilize enzime kıyasla daha aktif olduğu belirlenmiştir.

Her iki formdaki enzimlerin substrat parçalanma ürünlerini belirlemek üzere yapılan ince tabaka kromatografisi sonuçlarına göre, enzimlerin ni astaları az miktarda glukoz, büyük miktarda da maltoz olmak üzere maltooligosakkaritlere ayrı tırdı ı tespit edilmiştir. Serbest ve immobilize enzimlerin ni asta parçalanma ürünleri sırasıyla,  $G2=G3>G1$  ve  $G2=G3>G1>G4$  olarak görülmü tür.

Anahtar Kelimeler: *B. amyloliquefaciens*; -amilaz; immobilizasyon; Kalsiyum Alginat; Ni asta Hidrolizi; nce Tabaka Kromatografisi.

## ABSTRACT

In this study,  $\alpha$ -amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* was immobilized in calcium alginate beads. The ability of hydrolysis on various starch sources (soluble potato (Merck) and raw starches such as potato, maize, wheat, rice purchased from the local markets) of free (un-immobilized) and immobilized forms of  $\alpha$ -amylase were investigated. Enzyme immobilization was performed in the solution of 2% alginate and 5%  $\text{CaCl}_2$ . The efficiency of immobilization was determined approximately 89%.

It was indicated that both of enzyme forms hydrolysed using various starch sources on the similar pattern. Hydrolysis by immobilized enzyme was raw potato>soluble potato>raw wheat>raw maize>raw rice, respectively, while it was raw potato>soluble potato>raw maize>raw wheat>raw rice by free enzyme. At low and high concentrations of starches, the activity was not significant. Immobilized and free forms of  $\alpha$ -amylase did not show any effect in the presence of 8 and 10%, 1% rice starch, respectively.

It was determined that both the free and immobilized  $\alpha$ -amylase had optimum activity at 50 and 60°C, at pH 6 and 6.8, respectively. The immobilized enzyme was more stable than free enzyme in high temperature.

Since  $\alpha$ -amylase activity is depended on metal ions, various metal ions for their effects on the enzyme activity were tested. Though an apparent stimulatory effect of any metal ions were not detected, a stimulator effect was observed for  $\text{Mg}^{+2}$  on both forms of enzyme, however, an inhibitor effect of  $\text{Cu}^{+2}$  was determined. On the other hand, free enzyme in the presence of  $\text{Li}^{+2}$ ,  $\text{Ba}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  ve  $\text{Ca}^{+2}$  had a greater effect compared with immobilized enzyme.

In according to the results of thin layer chromatography method that was performed in order to determine the split-products of starches hydrolysed by both enzymes, it was found that the main product was maltose within maltooligosaccharides

and a little amount of glucose was also determined. The split-products of starches hydrolysed by free and immobilized enzymes were observed as  $G_2=G_3>G_1$  and  $G_2=G_3>G_1>G_4$ , respectively.

Keywords: *B. amyloliquefaciens*;  $\alpha$ -amylase; Immobilization; Calcium Alginate; Starch Hydrolysis; Thin Layer Chromatography.

## Ç NDEK LER

## SAYFA

|   |      |
|---|------|
| ÖZET.....   | iii  |
| ABSTRACT.....   | v    |
| Ç NDEK LER.....   | vii  |
| KISALTMALAR D Z N .....   | ix   |
| Ç ZELGELER D Z N .....  | x    |
| EK LLER D Z N .....   | xi   |
| S MGELER D Z N .....  | xiii |
| G R .....   | 1    |
| <br>  |      |
| 1. KAYNAK ÖZETLERİ.....   | 6    |
| 1.1. Amilazların Tarihçesi Ve Sınıflandırılması.....  | 6    |
| 1.2. -Amilazın Kaynakları.....  | 8    |
| 1.3. Ni astanın Yapısı Ve -amilazların Etki Mekanizması.....  | 10   |
| 1.3.1. Ni astanın yapısı ve ni asta kaynakları.....   | 10   |
| 1.3.2. -amilazların ( -1,4 glukon glukarohidrolaz, E.C. 3.2.1.1) etki Mekanizmaları.....  | 13   |
| 1.4. Bacillus -amilazlarının Genel Özellikleri.....   | 14   |
| 1.5. -Amilazın Endüstriyel Kullanım Alanları.....   | 16   |
| 1.6. mmobilizasyon.....   | 18   |
| <br>  |      |
| 2. MATERYAL VE METOD.....   | 23   |
| 2.1. Materyal.....  | 23   |
| 2.2. Metod.....   | 23   |
| 2.2.1. Bakteri üretim besiyerleri.....  | 23   |
| 2.2.2. Bakteri üretim ko ulları.....  | 24   |
| 2.2.3. Enzim aktivitesinin ölçülmesi.....   | 24   |
| 2.2.4. Toplam protein tayini.....   | 26   |
| 2.3. Enzimin mmobilize Edilmesi.....  | 27   |
| 2.4. Farklı Kaynaklı Ni astalar Üzerine mmobilize ve Serbest ( mmobilize Edilmemi ) Enzimlerin Etkileri.....                              | 28   |
| 2.5. mmobilize ve Serbest Enzim Formlarının Ni asta Kaynakları Üzerindeki Hidroliz Yeteneklerini Etkileyen Faktörlerin Ara tırılması..... | 28   |
| 2.5.1. Sıcaklı ın etkisi.....   | 29   |
| 2.5.2. pH'nın etkisi.....   | 29   |
| 2.5.3. Metal iyonlarının etkisi.....  | 29   |
| 2.6. nce Tabaka Kromatografisi ile Ni asta Parçalanma Ürünlerinin Belirlenmesi.....   | 29   |



|   |    |
|---|----|
| 3. ARA TIRMA SONUÇLARI.....   | 31 |
| 3.1. Bakteri Üreme E risi.....  | 31 |
| 3.2. Enzim mmobilizasyonu.....  | 32 |
| 3.3. Farklı Kaynaklı Ni astalar Üzerine mmobilize ve Serbest<br>( mmobilize Edilmemi ) Enzimlerin Etkileri.....                               | 32 |
| 3.4. mmobilize ve Serbest Enzimlerin Farklı Ni asta Kaynakları<br>Üzerindeki Hidrolize Yeteneklerini Etkileyen Faktörlerin Ara tırılması..... | 35 |
| 3.4.1. Sıcaklık ve pH'nın etkileri.....   | 35 |
| 3.4.1. Sıcaklı ın etkisi.....   | 35 |
| 3.4.2. pH'nın etkisi.....   | 39 |
| 3.4.3. Metal iyonlarının etkisi.....  | 43 |
| 3.5. nce Tabaka Kromatografisi ile Ni asta Parçalanma Ürünlerinin<br>Belirlenmesi.....  | 46 |
| 4.TARTI MA VE SONUÇ.....  | 49 |
| KAYNAKLAR.....  | 61 |
| TE EKKÜR.....   | 74 |
| ÖZGEÇM .....  | 75 |

## KISALTMALAR D Z N

|         |   |                    |
|---------|---|--------------------|
| B. Akt. | - | Ba ıl Aktivite     |
| Com.    | - | Commercial         |
| GH      | - | Glikozid Hidrolaz  |
| IU      | - | International Unit |
| Log     | - | Logaritmik         |
| Tic.    | - | Ticari             |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|   | SAYFA |
|---|-------|
| Çizelge 1.1 $\alpha$ -amilaz ailesi (GH ailesi).....  | 7     |
| Çizelge 2.1 Çalı mada kullanılan bakterinin saklanması, geli tirilmesi ve enzim üretim kapasitesinin ölçülmesinde kullanılan besiyerleri..... | 23    |
| Çizelge 3.1 mmobilize $\alpha$ -amilaz enziminin farklı ni asta kaynakları üzerindeki hidroliz yetenekleri.....                               | 33    |
| Çizelge 3.2 Serbest $\alpha$ -amilaz enziminin farklı ni asta kaynakları üzerindeki hidroliz yetenekleri.....                                 | 34    |
| Çizelge 3.3 Farklı sıcaklık derecelerinde immobilize ve serbest $\alpha$ -amilaz enzimlerinin % aktivite de erleri.....                       | 35    |
| Çizelge 3.4 mmobilize ve serbest $\alpha$ -amilaz enziminin pH'ya ba lı olarak farklı ni astalar üzerindeki % hidroliz etkisi.....            | 40    |
| Çizelge 3.5 mmobilize ve serbest $\alpha$ -amilaz enziminin metal iyonlarına ba lı olarak farklı ni astalar üzerindeki % hidroliz etkisi..... | 44    |

## EKLER DİZİNİ

|  | SAYFA |
|--|-------|
| ekil 1.1 Amiloz molekülünde tekrarlanan glukoz birimleri .....   | 11    |
| ekil 1.2 Amilopektin molekülündeki dallanma bölgesi .....  | 11    |
| ekil 1.3 $\alpha$ -amilazın reaksiyon mekanizması .....  | 14    |
| ekil 1.4 Alginatın kimyasal formülü .....  | 19    |
| ekil 2.1 $\alpha$ -amilaz enziminin kalsiyum alginat kapsüllerinde<br>immobilizasyon prosedürü.....  | 28    |
| ekil 3.1 Bacillus amyloliquefaciens'in inkübasyon süresine göre $\alpha$ -amilaz<br>üretim zamanının tayini.....                                 | 31    |
| ekil 3.2 immobilize $\alpha$ -amilaz enziminin farklı ni astası kaynakları<br>üzerindeki hidroliz yetenekleri.....                               | 33    |
| ekil 3.3 Serbest $\alpha$ -amilaz enziminin farklı ni astası kaynakları<br>üzerindeki hidroliz yetenekleri.....                                  | 34    |
| ekil 3.4 immobilize ve serbest $\alpha$ -amilaz enziminin farklı sıcaklıklarda<br>çözünür patates ni astası (%5) üzerindeki hidroliz etkisi..... | 37    |
| ekil 3.5 immobilize ve serbest $\alpha$ -amilaz enziminin farklı sıcaklıklarda<br>ticari patates ni astası (%4) üzerindeki hidroliz etkisi.....  | 37    |
| ekil 3.6 immobilize ve serbest $\alpha$ -amilaz enziminin farklı sıcaklıklarda<br>ticari mısır ni astası (%2) üzerindeki hidroliz etkisi.....    | 38    |
| ekil 3.7 immobilize ve serbest $\alpha$ -amilaz enziminin farklı sıcaklıklarda<br>ticari buğday ni astası (%5) üzerindeki hidroliz etkisi.....   | 38    |
| ekil 3.8 immobilize ve serbest $\alpha$ -amilaz enziminin farklı sıcaklıklarda<br>ticari pirinç ni astası (%4) üzerindeki hidroliz etkisi.....   | 39    |
| ekil 3.9 immobilize ve serbest $\alpha$ -amilaz enziminin pH'ya bağımlı olarak<br>çözünür patates ni astası (%5) üzerindeki hidroliz etkisi..... | 41    |
| ekil 3.10 immobilize ve serbest $\alpha$ -amilaz enziminin pH'ya bağımlı olarak<br>ticari patates ni astası (%4) üzerindeki hidroliz etkisi..... | 41    |
| ekil 3.11 immobilize ve serbest $\alpha$ -amilaz enziminin pH'ya bağımlı olarak<br>ticari mısır ni astası (%2) üzerindeki hidroliz etkisi.....   | 42    |
| ekil 3.12 immobilize ve serbest $\alpha$ -amilaz enziminin pH'ya bağımlı olarak  |       |

|   |    |
|---|----|
| ticari bu day ni astası (%5) üzerindeki hidroliz etkisi.....  | 42 |
| ekil 3.13 mmobilize ve serbest -amilaz enziminin pH'ya ba lı olarak<br>ticari pirinç ni astası (%4) üzerindeki hidroliz etkisi..... | 43 |
| ekil 3.14 mmobilize -amilazın metal iyonlarına ba lı olarak kullanılan<br>ni asta kaynakları üzerindeki hidroliz yetene i.....      | 45 |
| ekil 3.15 Serbest -amilazın metal iyonlarına ba lı olarak kullanılan<br>ni asta kaynakları üzerindeki hidroliz yetene i.....        | 45 |
| ekil 3.16 mmobilize -amilazın 1 (A) ve 5 (B) saatlik inkübasyonu<br>sonunda ni asta parçalanma ürünleri.....                        | 46 |
| ekil 3.17 Serbest -amilazın 1 (A) ve 5 (B) saatlik inkübasyonu<br>sonunda ni asta parçalanma ürünleri.....                          | 47 |

## S İMGELER DİZİNİ

|  |                              |
|--|------------------------------|
| %  | - Yüzde Orantı               |
| Al <sup>+3</sup>                                 | - Alüminyum yonu             |
| Ba <sup>+2</sup>                                 | - Baryum yonu                |
| BaCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O             | - Baryum Klorür Tetra Hidrat |
| °C   | - Santigrat Derece           |
| Ca <sup>+2</sup>                                 | - Kalsiyum yonu              |
| CaCl <sub>2</sub>                                | - Kalsiyum Klorür            |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O             | - Kalsiyum Klorür Di Hidrat  |
| cm   | - Santimetre                 |
| CO <sub>2</sub>                                  | - Karbondioksit              |
| Co <sup>+2</sup>                                 | - Kobalt yonu                |
| Cu <sup>+2</sup>                                 | - Bakır yonu                 |
| CuCl <sub>2</sub>                                | - Bakır Klorür               |
| CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O             | - Bakır Sülfat Penta Hidrat  |
| dk   | - Dakika                     |
| Fe <sup>+3</sup>                                 | - Demir yonu                 |
| gr   | - Gram                       |
| G1   | - Glukoz                     |
| G2   | - Maltoz                     |
| G3   | - Maltotrioz                 |
| G4   | - Maltotetroz                |
| G5   | - Maltopentoz                |
| G7   | - Maltoheptoz                |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>  | - Amonyum Sülfat             |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | - Di Amonyum Fosfat          |
| HCl  | - Hidroklorik Asit           |
| Hg <sup>+2</sup>                                 | - Cıva yonu                  |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                  | - Di Potasyum Fosfat         |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                  | - Potasyum Dihidrojen Fosfat |
| K <sub>m</sub>                                   | - Substrat Deri imi          |

|   |                                 |
|---|---------------------------------|
| $\text{Li}^{+2}$                          | - Lityumyonu                    |
| $\text{LiSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  | - Lityum Sülfat Mono Hidrat     |
| M   | - Molarite                      |
| Mg  | - Miligram                      |
| $\text{Mg}^{+2}$                          | - Magnezyumyonu                 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | - Magnezyum Sülfat Hekza Hidrat |
| $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | - Mangan Tetra Hidrat           |
| ml  | - Mililitre                     |
| mm  | - Milimetre                     |
| mM  | - Milimolar                     |
| $\text{Mn}^{+2}$                          | - Manganyonu                    |
| nm  | - Nanometre                     |
| N   | - Normal                        |
| $\text{Na}^+$                             | - Sodyumyonu                    |
| NaCl                                      | - Sodyum Klorür                 |
| $\text{Ni}^{+2}$                          | - Nikelyonu                     |
| $\text{Sr}^{+2}$                          | - Stronsiyumyonu                |
| \$  | - Dolar                         |
| $V_{\text{max}}$                          | - Maksimal Hız                  |
| $\mu\text{l}$                             | - Mikrolitre                    |
| $\mu\text{m}$                             | - Mikrometre                    |
|   | - Alfa                          |
|   | - Beta                          |
|   | - Gama                          |

## G R

Enzimler hücrelerde biyokimyasal reaksiyonları katalize eden protein yapısında moleküllerdir. Hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler artık çe itli amaçlarla kullanılmak üzere günlük ve ekonomik hayata girmi tir. Bugün enzimler ekmek, bira, peynir vb gıdalar ile çe itli deterjan ve temizlik maddelerinin üretiminde yaygın bir ekilde kullanıldı ı gibi, tıpta te his ve tedavide de önemli roller oynamaktadır (Bailey ve Ollis 1977, Gupta 2003). Endüstride faydalı olan ve ticari olarak kullanılan enzimlerin, bir ürünün üretilmesinde bazı avantajlara sahip olması gerekmektedir. Buna göre, bir enzimin herhangi bir endüstri alanında kullanılabilmesi için tüm i lem maliyeti bakımından ucuz olması, fiziksel ko ullara ba lı olmadan aktif olması, çok farklı alanlarda kullanılabilme özelli inde olması ve en önemlisi de enzimin alerjik ya da toksik etkiye sahip olmaması, yani güvenilir olması gerekmektedir (Wiseman 1987).

Endüstriyel enzimlerin dünya piyasasındaki payı 1,6 milyar \$' ı a maktadır (Ottrup ve Jorgensen 2002, Schallmey ve ark. 2004, Zakaria 2006). Ticari olarak kullanılan enzimlerin %59'unu proteazlar, %28'ini karbohidrazlar, %3'ünü lipazlar ve %10'unu ise di er enzimler olu turmaktadır. Karbohidrazlar grubuna giren -amilaz üretimi ise %25 ile önemli bir yer tutmaktadır (Wiseman 1987, Sidhu ve ark. 1997; Rao ve ark. 1998).

-amilaz enzimi (EC 3.2.1.1), ni asta ve glikojen moleküllerini hidrolize eden ekstrasellüler bir enzimdir. -amilaz hayvanlar ve bitkiler tarafından da sentezlenmesine ra men, kontrollü ko ullarda kısa sürede ürün elde edilmesinden dolayı mikroorganizmalar asıl kayna ı te kil etmektedir. Mikroorganizmalar içerisinde de do ada geni bir yayılı alanına sahip olan bazı Bacillus türleri ve alt türleri gelmektedir (Wolfgang 2007).



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

Yeryüzündeki bitkilerin yıllık ni asta üretimi  $2 \times 10^{10}$  ton'dur ve kalori olarak dünyanın 4/5'inin besin ihtiyacını karşılamaktadır. Ni astanın elde edildiği kaynaklar başlıca tahıl ürünü olarak pirinç, buğday, mısır, kök ürünü olarak patates, tatlı patates ve cassavadır (Sivak ve Preiss 1998).

Ni astanın enzimatik hidrolizi bazı avantajlarından dolayı %75'in üzerinde asit hidrolizinin yerini almıştır (Tanaka ve Hoshino 2002).

-amilaz enzimleri endüstride geniş bir kullanım alanına sahip olup, ni asta hidrolizinde inceltici ajan olarak, gıda endüstrisinin farklı alanlarında, meyve suyu endüstrisinde, deterjan sanayinde, eczacılıkta, tekstil endüstrisinde ve alkol üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır (Nigam ve Singh 1995, Crabb ve Mitchinson 1997, Marshal ve ark. 1999, Pandey ve Nigam 2000).

Ni asta, - ve -amilazlar ve diğer ilgili enzimlerce glukoz, maltoz ve maltodekstrinlere hidrolizlenmektedir. Bu ürünlerden dekstrin, ni astanın glukozu kadar hidrolize olmasından önce oluşan kısa moleküllü ilk üründür. Dekstrinler çözünür ve yüksek ve dayanıklı bir ürün olup, yoğurtun kıvamında bir maddedir ve bu maddeler gıdalarda viskozite artırıcı, yani, koyulaştırıcı dolgu maddesi olarak kullanılmaktadır. (Keskin 1982).

Ni asta dekstrinlere kadar parçalandıktan sonra glukozamilazın ortama ilavesi ile glukozu kadar ayrışmaktadır. Açığa çıkan glukoz yoğurt halinde, yoğurda kristal toz halinde elde edilmektedir. Glukoz yoğurubuna glukoz izomeraz enzimi katılarak yüksek fruktozlu yoğurt üretimi sağlanmaktadır. Bu ürün yüksek bir tatlılığına sahip olup, meşrubat üretiminde, süt ürünlerinde, ekmekçilik ürünlerinde, konservecilikte, pasta ve ekleme yapımında yaygın olarak kullanılmaktadır (Anonymous 1988).

Ba lıca ni asta endüstrisinde kullanılan ve enzim satı larında en büyük piyasaya sahip olan -amilaz enziminin ekmekçilikte de kullanımı oldukça iyi bilinmektedir (Gupta ve ark. 2003). Ni astayı (jelatinize olmu ) fermente olabilir ekerlere, CO<sub>2</sub> ve etil alkole çevirerek maya fermentasyonunun gerçekleşmesine yardımcı olur (Özer 2003).

Özellikle Bacillus'lardan elde edilen amilazlar, tahıla dayalı bir beslenmenin yaygın olduğu ülkemizde ki i ba ına tüketilen enerjinin % 58'i tahıllardan, bunun da % 44'lük kısmının ekmekten kar ılanmasıyla büyük önem kazanmaktadır. Farklı bölge, ya ve gelir gruplarına göre de i en ekmek tüketimi, ülkemizde günde 100 ila 800 gram arasında olup, ortalama 400 gram civarındadır. Türk toplumunun beslenme alışkanlıklarından ekme e olan talep unlarda ve ekmek üretiminde endüstriyel maya kullanımı ile birlikte un ve ekmek katkı maddeleri (askorbik asit ve enzim) kullanımını zorunlu hale getirmiştir (Özer 2003). Teknolojik önemi sebebi ile ekmekçileri en fazla ilgilendiren enzim amilazdır. -amilaz enzimi ni astadan dü ük moleküllü ekerlerin oluşması için önemlidir. Hamurda mayalanma sırasında ve pi irme ba langıcında meydana gelen de i imler -amilaz enzim aktivitesine ba lıdır (Polaina ve MacCabe 2007).

Ni astanın maltoza tam hidrolizi, ni astanın öncelikle -amilaz tarafından sıvıla tırılıp, daha sonra da ortama izoamilaz ve pullulanaz enzimlerinin ilavesi ile sağ lanmaktadır. Açık a çıkan yüksek saflıktaki maltoz reçel, ekerleme, ekmek ve bira üretiminde kullanıldı ı gibi, gıdalarda tatlandırıcı ve kaliteyi arttırıcı olarak da kullanılmaktadır. Ni asta hidrolizi sırasında yan ürün olarak açık a çıkan maltotetroz da nem tutucu özelli inden dolayı gıda endüstrisinde kullanılmaktadır (Anonymous 1988).

Bira üretimi sırasında arpadaki ni astanın parçalanması için de -amilaz enzimi kullanılmakta ve bu sırada fermente edilebilir ekerler açık a çıkmaktadır (Wiseman 1987).

Endüstride yaygın olarak kullanılan enzimlerin kimyasal süreçlerde katalizör olarak büyük bir potansiyelleri vardır. Enzimler, sadece bir kere kullanılmaları, pahalı olmaları

nedeni ile büyük masraflara neden olmaktadır. Ayrıca enzimlerin saflaştırılması ve depolama yöntemleri de oldukça zaman alıcı ve yüksek maliyetlidir. Bunun yanı sıra enzimlerin reaksiyon ortamında çözünmesi, enzimlerin bu ortamda zamanla çözünmesine neden olmaktadır, bu ise hem enzim kaybına hem de reaksiyon ortamının kirlenmesine neden olmaktadır. Endüstriyel alanlarda kullanımlarının artmasıyla enzimleri daha ekonomik ve daha kullanılabilir hale getirme yolları aranmaktadır. Bu nedenle, gerek uzun süre ve tekrar kullanılabilmek ve gerekse de istenildiğinde reaksiyon ortamından uzaklaştırılabilmek amacıyla enzimler, destek görevi gören materyaller (matriksler) yardımıyla suda çözünmeyen hale getirilerek immobilize edilmektedir (Smith 1996). Enzim immobilizasyonu 1960'lı yıllarda başlamıştır. Immobilize enzimin endüstriyel kullanımına ilk kez 1969 yılında, Tanabe Seiyaku (Japonya) firması tarafından başlanması olup, immobilize edilen aminoasit enzimi ile L-aminoasit üretimi gerçekleştirilmiştir (Chibata 1980). Enzimlerin immobilizasyonu için kullanılan yöntemler; tutuklama, fiziksel adsorpsiyon, ko-polimerizasyon ve kovalent bağlanmadır. Bunlar içerisinde de en fazla kullanılanı enkapsülasyon (tutuklama) olup, bu yöntemde enzimlerin bir yarı geçirgen polimerik membran ya da bir jel matriks içinde tutuklanması sağlanmaktadır (Chang ve ark. 1996).

Enzimler çözelti içerisinde her yere daima erişimi göstermektedir. Çözelti içerisinde tam bir hareket özgürlükleri vardır. Immobilizasyon, enzimlerin bu özgürlüklerini sınırlayıcı bir yöntem olarak düşünülmektedir (Bickerstaff 1997).

Immobilizasyon çeşitli avantajlara sahiptir;

- Enzimlerin reaksiyonlarda tekrarlı kullanımı,
- Reaksiyon sonrası enzimlerin üründen ayrılması,
- Sürekli reaktör sistemlerinde enzimlerin aralıksız kullanımı,
- Reaksiyon sonunda enzimlerin ortamdan kolaylıkla uzaklaştırılması,
- Immobilize enzimin çevre koşullarına (pH, sıcaklık gibi) daha dayanıklı olmaları,
- Birçok kez ve uzun süre kullanılabilirlikleri,
- Daha kararlı olmaları,
- Enzimin kendi kendini parçalama olasılığının azalması (Smith 1996, Rahman ve ark. 2005).

mmobilize bir enzim reaksiyon sonrası kolaylıkla yeniden elde edilebilir ve böylece tekrar kullanılması söz konusu olabilir. Bu avantajlar önceden oldukça pahalı olan enzimlerin ticari olarak daha ucuz maliyetlerle kullanılmasına olanak sağlayabilmektedir. Özellikle reaksiyon sonrası enzimin üründen ayrılmasında ayrı bir ekstraksiyon işlemi uygulanmasını gerektirmemektedir. mmobilize enzimler biyoreaktörlerin kullanılabilmesini de daha olası hale getirmektedir. mmobilize enzimler biyoreaktör içerisine yerleştirilerek substratın enzimlere doğru akmasının sağlanması ve diğer taraftan da elde edilen ürünlerin alınması gerçekleştirilebilmektedir. Bu tür sistemler haftalarca hatta aylarca sürekli olarak kullanılmaktadır (Swaisgood ve Passos 1997).

Enzim immobilizasyonu biyoteknolojinin önemli uygulamalarından biri haline gelmiştir (Smith 1996). Günümüzde çok sayıda enzim immobilize edilerek, endüstride kullanılmaktadır. Bunlar arasında en yaygın kullanılanları mikrobiyal kaynaklı  $\alpha$ -amilaz, glukoamilaz, glukoizomeraz, proteaz ve lipaz enzimleridir (Uhlir 1998).

Bu tez çalışmasında,  $\alpha$ -amilaz enzimi üretimi yapan ORBA Biyokimya (İstanbul) fabrikasından sağlanan *B. amyloliquefaciens* bakterisi kullanılmı olup, bu bakteriden üretilen  $\alpha$ -amilaz enzimi immobilize edilerek enzimin farklı kaynaklı çözümleri ni pasta (patates) ve ham ni astalar (patates, mısır, buğday, pirinç) üzerindeki hidrolizleme yetenekleri ve oluşan ürünlerin ince tabaka kromatografisi ile ayırtılması hedeflenmiştir. Ayrıca immobilize enzimin en iyi aktivite gösterdiği ni pasta kaynakları varlığında enzimin optimum sıcaklık ve pH değerleri saptanarak, çeşitli metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Diğer yandan immobilize edilmemiş serbest enzim formu da aynı denemelere tabi tutularak, immobilize enzim sonuçları serbest enzim sonuçlarıyla kıyaslanmıştır.

## 1. KAYNAK ÖZETLER

### 1.1. Amilazların Tarihçesi ve Sınıflandırılması

Amilaz enzimi çelti ni mısır kaynaklarının parçalanmasında uzun yıllardır kullanılmaktadır. Endüstriyel öneminin de yüksek olması ve yoğun bir şekilde kullanılması sebebiyle üzerinde en fazla araştırmalar yapılan bir enzimdir.

Amilaz enzimi 1811 yılında Kirchoff tarafından henüz daha ne olduğu bile anılmadan tanımlanmıştır. Benzer bir etkinin insan tükürüğü ile de elde edilebileceği Leuchs tarafından 1831 yılında gösterilmiştir. Bernfeld (1951) tükürüğün bu özelliğine Berzelius tarafından pityalin adının verildiğini, 1833'de Payen ve Persoz'un ise mısır ni mısır astayı parçalayan bir maddenin varlığını ortaya çıkardıklarını ve buna da diastaz adını verdiklerini belirtmektedir. 1895'te Beijerinck'in önerisinden bu yana tüm ni mısır parçalayan enzimler amilazlar olarak adlandırılmıştır (Anonymous 1988). 1930 yılında Ohlsson'un mısırdan elde ettiği ni mısır parçalayıcı enzimler, parçalama ürünlerinin anomerik tiplerine göre  $\alpha$ -(alfa) ya da  $\beta$ -(beta) olarak adlandırılmıştır. Mybrüch ve Necmuler (1950) ise amilazlar için endoamilazlar ve ekzoamilazlar olmak üzere bir adlandırma sistemi önermişlerdir (Anonymous 1988). Endoamilazlar tesadüfi olarak ni mısır molekülünün iç kısmını hidroliz etmektedirler. Bunun sonucunda farklı uzunluklara sahip düz ya da dallı yapıya sahip oligosakkarit zincirleri oluşmaktadır. Ekzoamilazlar indirgenmeyen uçtan hidroliz gerçekleştirirler ve böylece kısa ürünler oluşur. Bugün bilinmektedir ki, birçok enzim farklı ürünler oluşacak şekilde ni mısır hidroliz etmektedir ve ni mısır astayı tamamen hidroliz etmek için çelti enzimlerinin birlikte etki etmesi gerekmektedir. Günümüzde amilazlar ni mısır astaya etki mekanizmaları ve oluştuğu ürünler bakımından üç gruba ayrılmışlardır (Uhlir 1998). Milletlerarası Biyokimya Birliği (International Union of Biochemistry) tarafından yapılan enzim sınıflandırılmasında tüm enzimler katalizledikleri reaksiyon tipine göre 6 sınıfa ayrılmışlardır ve amilazlar 3. sırada yer alan hidrolazlar sınıfına dahil edilmişlerdir (Mahler ve Cordes 1966).

Glikozid hidrolazlar (EC 3.2.1.-) iki ya da daha fazla karbohidrat arasındaki veya bir karbohidratla karbohidrat olmayan parça arasındaki glikozidik ba ı hidroliz eden büyük bir enzim grubudur. Glikozid hidrolazlar için dizi benzerli ine dayalı bir sınıflandırma sistemi olu turulmu tur. Böylelikle 85 farklı aile tanımlanmı tır.

Ni asta parçalayan enzimlerin ço u primer yapılarındaki aminoasit benzerlikleri ve farklılıklarına göre glikozid hidrolazlar (GH) ailesinde sınıflandırılmı tır (Henrissat 1991). Buna göre, (i) -amilazlar ailesi, GH13; (ii) -amilazlar ailesi, GH14 ve (iii) glikoamilazlar ( -) ailesi, GH15 olarak belirlenmi tir.

Bir endoamilaz olan -amilazın dahil oldu u GH13 ailesi geni lemekte ve bu aile -amilazlarla dizi benzerli i gösteren yaklaşık 30 farklı enzim içermektedir (MacGregor 2005).

Çizelge 1.1. -amilaz ailesi (GH ailesi) (Polaina ve MacCabe 2007)

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

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

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

GH15 ailesinde bulunan ve bir ekzoamilaz olan  $\alpha$ -amilazlar glukoamilaz, maltaz, sakkarojenik amilaz ve amiloglikozidaz olarak da bilinmektedir. Bu enzim *Aspergillus* ya da *Rhizopus* türleri tarafından üretilen ekstrasellüler bir enzimdir. Enzim glikoprotein yapısında bir molekül olup, bünyesinde enjeksiyon olarak glukoz, galaktoz, mannoz ve üronik asit içermektedir (Wiseman 1987).

## 1.2. $\alpha$ -Amilazın Kaynakları

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

Fungal  $\alpha$ -amilazlar sıcaklıkta bakteriyel  $\alpha$ -amilazlardan daha az stabil olduğundan üzerinde çalışılan asıl enzim kaynağını daha çok bakteriyel, özellikle de *Bacillus* amilazları olmaktadır (Wolfgang 2007). Bu cinsin özellikle 8 tanesinin sentezlediği  $\alpha$ -amilaz enzimi çeşitli ara tırmacılar tarafından tanımlanmış ve karakterize edilmiştir.

Bunlar *B. subtilis* (Coleman ve Elliott 1962, Pazur 1965, Matsuzaki ve ark. 1974), *B. amyloliquefaciens* (Borgia ve Campbell 1978), *B. caldolyticus* (Grootegeod ve ark. 1973), *B. coagulans* (Bliesmer ve Hartman 1973), *B. licheniformis* (Meer 1972, Saito 1973), *B. macerans* (Lane ve Pirt 1973), *B. stearothermophilus* (Ogasahara ve ark. 1970) ve *B. subtilis* var. *amylosachariticus* (Matsuzaki ve ark. 1974)'dur. *Bacillus* türleri arasında da endüstriyel amaçla, -amilaz üretiminde kullanılanlar *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis* and *B. amyloliquefaciens* türleridir (Pandey ve ark. 2000).

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

*Bacillus* hücreleri çubuk ekinde ve düzdür, 0,5-2,5 µm eninde 1.2-10 µm boyundadır, uçları yuvarlak ya da kare ekinde ve ortamda bazen çiftler ya da zincirler halinde bulunurlar. Hepsi Gram (+) olmakla beraber, ya lı kültürlerde Gram (-) olarak da görülebilirler. *Bacillus*'lar peritriköz kamçıya sahip olup, hareketlidir. Hepsi endospor oluşturmaktadır, endosporlar bazen oval, bazen de yuvaraktır ya da silindirik ekinde de olabilir. Birçok zorlu koşula karşı oldukça dirençlidir. Bu cinste yer alan bakteriler hem aerobik hem de fakültatif anaerobik koşullarda üreyebilirler. Sıcaklık, pH ve tuzluluğa karşı yüksek fizyolojik yetenekleri nedeniyle bunlara karşı toleransları vardır. Geliştirdikleri minimum sıcaklık derecesi 25°C ila 75°C arasında değişmektedir. Genellikle katalaz pozitif olup, fermantatif ya da oksijenli solunum gösteren bir metabolizmaya sahip kemoorganotrofturlar. Kolayca kültüre alınabilirler ve yapılarında heterojenlik yoktur (Holt ve ark. 1994).

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



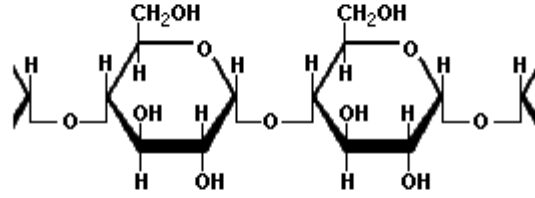
Geni bir habitatta bulunabilmektedirler. Özellikle toprakta, suda, fekal materyalde, çürüyen materyalde ve çeşitli gıdalarda bulunabilirler. Patojen türleri bulunmakta olup, birkaç omurgalı ve omurgasız türüne karşı patojenite göstermektedirler (Banwart 1983).

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

### 1.3. Niastazın Yapısı ve $\alpha$ -Amilazların Etki Mekanizması

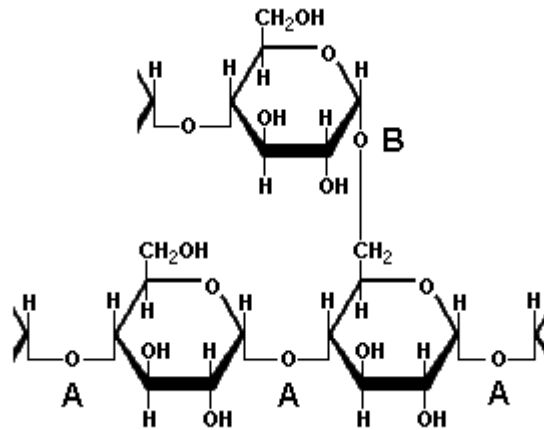
#### 1.3.1. Niastazın yapısı ve niastaz kaynakları

Amilaz enzimlerinin substratı olan niastaz esasen bitkilerin bir depo karbohidratı olup, D-glukoz birimlerinden oluşmuş ve  $(C_6H_{10}O_5)_n$  kapalı formülü ile gösterilen oldukça heterojen yapılı bir moleküldür. Bu heterojenlik, farklı molekül yapılı iki polisakkarit içermesinden kaynaklanmaktadır (Bernfeld 1951). Bu polisakkaritler amiloz ve amilopektindir. Amiloz, glukoz birimlerinin  $\alpha$ -1,4 glikozidik bağlarla bağlanmasından oluşmuş ve dallanma göstermeyen düz bir yapıdadır (Şekil 1.1). Amiloz suda kolayca çözünmez ve molekül ağırlığı birkaç binden 500.000 daltona kadar değişmektedir. Amiloz suda çözünmez fakat su emerek miseller haline gelebilir ve iodin ile muamele edilirse mavi renk meydana gelir (Çağatay 1976, Gözükara 2001).



ekil 1.1. Amiloz molekülünde tekrarlanan glukoz birimleri

Amilopektin dallı bir yapıya sahip olup, her 24-30 glukoz monomerinden birinde -1,6 ba lantısı ile bir yan zincir ba lar ( ekil 1.2). Hem amilopektin hem de amiloz glukozun polimerleridir ve tipik bir amiloz polimeri 500-20000 glukoz molekülünden, bir amilopektin molekülü ise yakla ık iki milyon glukozdan olu ur (Ponyatovsky ve ark. 1998, Hoover 2001, Sinitsyn ve ark. 2001).



ekil 1.2. Amilopektin molekülündeki dallanma bölgesi

A: -1,4 glikozidik ba lantı

B: -1,6 glikozidik ba lantı

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

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

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

Doğaldan patates ni astası, diğer ni astalara göre daha geniş granül yapısının yanı sıra, saydamlığı ve viskozitesi yüksek bir hamur oluşturma özelliği ile de bilinir. Ortalama granül büyüklüğü 30 mikron olsa da, granül çapları 5 ile 100 mikron arasında değişmektedir. Patates ni astasında amiloz oranı %20-21 arasında, amilopektin oranı ise %79-80 arasında değişmektedir (Ortalama 1:4). Jelleşme derecesi, diğer doğal ni astalarla karşılaştırıldığında, doğaldan patates ni astasının çok daha düşük derecelerde jelleşmeye başladığı görülmüştür (59-68°C).

Pirinç ni astası tüm ni asta türleri arasında en küçük granül büyüklüğüne sahip olan ni astadır. Ortalama pirinç ni astası granül büyüklüğü 2-8 mikron arasındadır. Jelleşmenin görüldüğü sıcaklık 65-73 °C'dir (Bahar ve Çelebi 1998).

Ni asta, sulu asitlerle ısıtılırsa ana ürün olarak glikoz moleküllerine ayrı ayrı hidrolize oldu u halde 5-Hidroksimetil 2-furfuraldehit gibi istenmeyen yan ürünler de olu turmaktadır. Bu nedenle amilaz enzimleri ni astanın hidrolizasyonunda asitlerin yerini almı tır (Piggott ve ark. 1984).

### 1.3.2. -Amilazların ( -1,4 glukoz glukanohidrolaz, EC 3.2.1.1) etki mekanizmaları

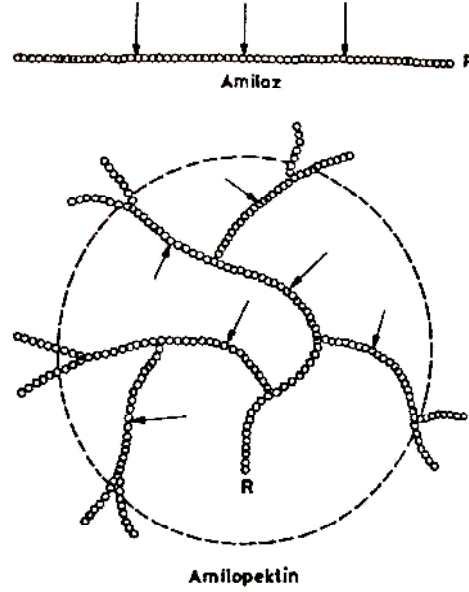
-amilazlar ni asta molekülündeki amiloz zincirlerinin 1,4 glikozidik ba larına geli güzel saldırırlar (Windish and Mhatre 1965) ( ekil 1.3). ilk saldırının helezonlar arasına dü en 1,4 glikozidik ba lar oldu u kabul edilmektedir. Böylece zincir daha küçük kısımlara ayrılır ve bu kısalmı parçalar yeniden enzimin etkisine u rurlar. Son ürün olarak 1/10'i glukoz ve 9/10'u maltoz olan bir karı m olu ur (Yenson 1981). Ayrıca maltotriozun da ortaya çıktı ı ve bunun da iki basamaklı bir reaksiyonla hidrolize oldu u belirtilmektedir (Fogarty 1983).

Enzim amilopektin molekülünün hidrolizinde 1,4 ba larına etki etmekte, kar ısına 1,6 glikozidik ba ı çıkarsa atlamaktadır ( ekil 1.3). Dolayısıyla bu ba ları hidrolize edememektedir. Amilopektin hidrolizi sonucunda glikoz ve maltoza ilave olarak bir seri dallı sınır dekstrinleri adı verilen ürünler de ortaya çıkmaktadır. Dört ya da daha fazla glikoz içerikli bu dekstrinler orijinal yapının 1,6 glikozidik ba larının hepsini içermektedir ve böylece ni astanın amilaz enzimi tarafından hidrolizi ile dü ük molekül a ırlıklı dekstrinler ve oligosakkaritler olu maktadır (Anonymous 1988).

-amilaz enzimlerini karakterize eden özellikler bazı indirgen grupları serbest bırakmak, çe itli uzunluktaki dekstrinleri olu turmak ve ni asta solüsyonunun vizkozitesini hızla indirgeme ekinde özetlenebilir (Windish ve Mhatre 1965).

Ni astanın hidrolizi sonucu ortaya çıkan ürünler -optik konformasyonu gösterdi inden bu enzimlere -amilazlar adı verilmi tir. Bu enzimler substratlarının iç

kısımlarındaki -1,4 ba larına atak yaptıkları için bunlara endoamilazlar da denir (Windish ve Mhatre 1965).



ekil 1.3. -amilazın reaksiyon mekanizması (Windish ve Mhatre 1965)

→ Amilo (1,4) dekstrinaz, -amilaz  
R: Redükte uç

#### 1.4. Bacillus -Amilazlarının Genel Özellikleri

Bacillus -amilazları genel olarak 5.5-8.0 pH aralı nda stabil olmalarına ra men, optimum aktivite gösterdikleri pH 4.8-6.5 arasında bulunmaktadır (Manning ve Campbell 1961). Farklı kaynaklardan elde edilen -amilazların en iyi aktivite gösterdikleri pH de erlerinde de bazı farklılıklar görülmektedir. B. sp ANT-6 su unun -amilazı pH 9.0'da (Burhan ve ark. 2003), B. subtilis JS-2004 su unun -amilazı pH:8.0'de (Asgher ve ark. 2007), B. licheniformis 44MB82-A su unun -amilazı pH 6.0-6.5 arasında (Ivanova ve ark. 1993), B. amyloliquefaciens -amilazı pH 4.0-9.0 arasında (Demirkan ve ark. 2005), Bacillus brevis MTCC 7521 -amilazı pH 6.0'da (Ray ve ark. 2008) optimum aktivite göstermektedir. Bazı Bacillus türlerinin ise, alkalik ya da

asidik -amilaz üretti i saptanmı tır. *Bacillus megaterium* L-49 su u için optimum pH: 9.0-10.0 olarak belirlenirken (Shiru ve ark. 2008), *Bacillus acidocaldarius* Agnano 101 su unda 3.5 olarak saptanmı tır (Buonocore ve ark. 1976).

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

Enzimin aktivite gösterebilmesi için kalsiyum ( $Ca^{++}$ ) iyonlarına gereksinim duydu undan enzim bir metaloproteindir (Manning ve Campbell 1961). Kalsiyum, ekstrem pH ve sıcaklıklarda pepsin, tripsin, papain gibi proteazlara kar ı enzimi dayanıklı kılmaktadır. -amilazın katalitik aktivitesi için gerekli olan bu metalin enzime ba lanma gücü enzim kayna ına ba lıdır (Stein ve Fischer 1958).

Bakır, civa, gümü , kur un gibi a ır metallere enzimi inhibe etmektedir (Hidaka ve Adachi 1980, Kanno 1986).

-amilazların ço unun moleköl a ırlı ı yaklaşık olarak 45.000-60.000 Dalton arasındadır ve genellikle enzim proteininin aminoasit kompozisyonlarında büyük farklılıklar yoktur (Kindle 1983). *B. amyloliquefaciens* -amilazının moleköl a ırlı ı 49.000 Dalton (Tanaka ve Hoshino 2002), *B. stearothermophilus* -amilazının moleköl a ırlı ı 48.000 Dalton (Osagahara ve ark. 1970), *B. subtilis* -amilazının moleköl a ırlı ının ise 50.000 Dalton oldu u belirtilmektedir (Fogarty 1983).

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

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

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

#### 1.5. -Amilazın Endüstriyel Kullanım Alanları

-amilaz enzimi ticari olarak kullanılan ilk enzimdir (Radley 1976). 1905 yılında Japonya'da tekstil endüstrisinde haıl alma (desizing) işlemi için *A. oryzae* kültüründen -amilaz enzimi üretilmiştir. 1939 yılında *B. subtilis*'ten -amilazın endüstriyel üretimine ilk kez Japonya'da başlanmıştır. Daha sonraki yıllarda -amilaz enzimi ni asta işleme endüstrisinde ni asta sıvılaştırma ajanı olarak kullanılmıştır (Anonymous 1988).

Tekstil endüstrisinde -amilazlar oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu işlemlerden bir tanesi tekstil sektöründe uygulanan haılama yöntemidir. Haılama, dokuma öncesi yapılan bir dokuma hazırlık işlemidir. Çözgü ipleri dokuma sırasında sürtünmeye ve gerilime maruz kalır. İpliklerin direncini artırmak için haılama işlemi gereklidir. Haılamadaki amaç dokuma sırasındaki yıpratıcı etkilerden iplikleri korumaktır. Haıl maddeleri belirli bir yapıya ve tutunma yeteneğine sahiptir. Doğal haıl maddeleri arasında ni asta ve modifiye ni asta da yer almaktadır. İlem sonrası bu maddelerin ipliklerden uzaklaştırılması gerekir. Bu işleme de haıl alma adı

verilmektedir. Ha il alma ajanı olarak da yaygın olarak -amilaz enzimi kullanılmaktadır (Hendriksen ve ark. 1999).

Aynı zamanda ha illama tekni i ka it imalatında da kullanılabilir. Bruinenberg ve ark. (1996) ka itların yüksek moleküler a ırlı a sahip ni astalarla kaplanabilirli ini ve fazla ni astanın uzakla tırılması için de -amilaz enziminin kullanılmakta oldu unu belirtmi tir. Tolan (1996)'ya göre tekstilde oldu u gibi ka it sanayisinde de ha illama tekni i i lem süresince ka itların mekanik olarak zarar görmesini engellemek amacıyla ve ka itların kalitesinin, dayanıklılı nın ve de silinebilirli inin artırılmasında kullanılmaktadır. Bu i lemde iki silindir yardımıyla ni asta ka it yüzeyine aktarılmakta ve daha sonra fazla olan ni astanın ka ittan uzakla tırılması için devamlı i lemlerle -amilaz enzimi kullanılmaktadır. Ko ullar, kullanılan ni asta kayna ına ve -amilaz enzimine ba lıdır. Kullanılan immobilize -amilaz enzimiyle en iyi ekilde parçalanabilen ni asta belirlenerek çok daha kısa sürede i lemin gerçekleştirilebilece i öngörülebilir.

Gıda endüstrisinde ise ni astanın -amilaz enzimi tarafından hidrolizi ile aç ı a çıkan ürünler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu ürünlerden dekstrin, çözünürlü ü yüksek ve dayanıklı bir ürün olup gıdalarda viskozite arttırıcı yani, koyula tırıcı dolgu maddesi olarak kullanılmaktadır (Keskin 1982).

-amilaz enzimi alkol üretiminde de kullanılmaktadır. Alkol üretiminde ham madde olarak kullanılan ni astalı materyaller -amilaz ve amiloglukozidaz enzimleri ile muamele edilmektedir. Ni asta yeterince parçalandıktan sonra ortama maya a ılanarak fermantasyon i lemine geçildi i bildirilmektedir (Uhlig 1998).



Undaki enzim aktivitesini artırmak amacıyla, una bakteriyel -amilaz enzim preparatları ile malt unu ilave edilmektedir. Bunlar; undaki ni astanın hamurda eker haline gelmesini sağlar, fermantasyonu hızlandırır, olu an gaz miktarını arttırır, ekme k yapılma süresini kısaltır, ekme k hacmini arttırır, ekme k rengini iyile tirir, ekme k in yumu ak ve taze kalma süresini arttırır ve ekme k in kalitesini düzeltici etkilerde bulunur (Anonymous 1988).

Meyve suyu endüstrisinde de uygulama alanı bulunmakta olup, özellikle elma ve armut sularının berrakla tırılmasında kullanılmaktadır. Meyveler tam olgunla madan toplandı ndan ve meyve halen ni asta içerdi inden, meyve suyunda bulanıklık görülmektedir. Bu sorun ortama -amilazın ilavesi ile giderilebilmektedir (Ek i 1988).

-amilaz ve glukoamilazlar ni astadan glukoz üretiminde de kullanılmaktadır. Hatta olu an glukoz, glukoz izomeraz enzimi kullanılarak glukozu göre iki kat daha tatlı olan fruktoza dönü türülebilmektedir. Sonuç olarak mısır, bu day ve patates ni astasından fruktoz urubu üretilebilmektedir. Fruktoz urularının pazar payı oldukça büyüktür ve me rubat üretiminde önemli bir yeri vardır. Dünya'da yılda yakla ık 10 milyar ton fruktoz urubu üretilmektedir (Madigan ve Martinko 2006). Buradan anla ılaca ı gibi multienzim sistemleri kurularak daha farklı ürünlerin de eldesi mümkün olabilmektedir.

## 1.6. mmobilizasyon

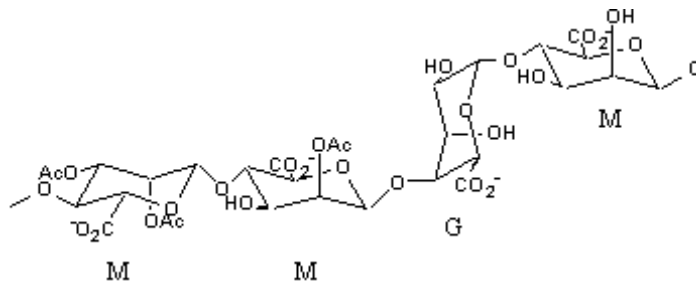
mmobilizasyon yöntemi; hücre, organel, enzim ya da çe itli proteinlerin (monoklonal antikorlar gibi) stabilitelerini arttırmak ve tekrarlı ya da devamlı kullanımlarını sa lamak için, katı bir destek üzerinde, katı bir matriks içerisinde ya da bir membranda fiziksel ya da kimyasal fiksasyonudur. Bu prensip aynı zamanda affinite kromatografisi için de kullanılmaktadır (Nagel ve ark. 1992). mmobilizasyon kelime anlamı olarak hareketi sınırlamak demektir. 1971 yılında 3. Biyoteknoloji ve biyomühendislik sempozyumu ve 1. Enzim mühendisli i konferansında modifiye edilmi enzimler için ilk olarak immobilize enzim terimi kullanılmı tır (Yıldırım ve ark. 2007).

Enzimlerin immobilizasyonu için çe itli metodlar bulunmaktadır. En çok kullanılan metodlar; tutuklama (enkapsülasyon), fiziksel adsorbiyon, ko-polimerizasyon ve kovalent ba lanmadır. Bunlardan enkapsülasyon metodu ile enzimler bir yarı geçirgen polimerik membran ve/veya jel matriksi içerisinde tutuklanmaktadır (Chang ve ark. 1996).

mmobilize edilen enzimler pH, sıcaklık gibi evre ko ullarına daha dayanıklı ve serbest enzime nazaran daha kararlıdır (Chang ve ark. 1996). Buyk protein veya enzimler kapsül içerisine giremez ya da kapsül dı na çıkamaz, fakat küçük substrat ve ürünler yarı geçirgen membrandan serbestçe geçebilir (Colton 1996). Tutuklama, bir enzim ile bir poliyonik polimer karı mıyla gerçekle tirilir. Polimerle multivalent katyonların çapraz ba lanmalarıyla bir iyon de i im reaksiyonu gerçekle ir, bo luklu bir yapı olu ur ve böylece enzim molekülleri tutuklanmı olur (Fraser ve Bickerstaff 1997).

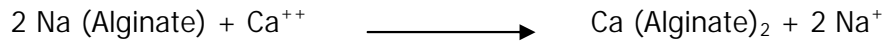
Enzimlerin tutuklanması için çok e itli polimerler kullanılmaktadır. Bunlar; silika, selüloz, agaroz jel, karragenan, kitosan, jelatin, alginik asit (alginat) vb'dir (Gemeiner 1992). En çok kullanılan alginat olup, alginatlar 65 yıldan bu yana gıda ve farmakoloji endüstrilerinde kalınla tırcı, sıvıla tırcı, film olu turucu ve jelle tirici ajanlar olarak kullanılmaktadır (Bickerstaff 1997).

Alginat alglerden elde edilen bir poliuronik asittir ve 1-4 ba lı -D-mannuronik (M) ve -L-guluronik (G) asitlerin de i en miktarlarından olu maktadır ( ekil 1.4).



ekil 1.4. Alginatın kimyasal formülü

M ve G birimleri blok ekinde dizilerek homopolimerik bölgeler (MM blokları ve GG blokları) ve heteropolimerik bölgeleri (MG blokları) meydana getirmektedirler. Molekülde G miktarı fazla ise sert ve kırılabilir bir jel oluşmaktadır; eğer M miktarı fazla ise daha yumuşak ve elastik jel oluşumu gözlenir (Smidsrod 1974). Divalent katyonların bağlanması ve sonrasında jel oluşumu yukarıda söz edilen blokların kompozisyonu ve düzenlenmesine bağlıdır. Jelin sıklıkla %20-75 arasında değişen G bileşenleri ve alg kaynağı ile bağlantılıdır. *Laminaria hyperborea*, *Macrocystis pyrifera*, *Ascophyllum nodosum*, *L. digitata* vb.'dan elde edilen alginatlar yaklaşık %70 G bileşenine sahiptir. GG blokları iki ve üç değerlikli katyonlar ( $Ca^{+2}$ ,  $Sr^{+2}$ ,  $Ba^{+2}$ ,  $Al^{+3}$ ,  $Fe^{+3}$  gibi) için öncelikli bağlanma bölgelerine sahiptir ve bağlı iyonlar diğer GG bloklarıyla etkileşime girebilmekte ve böylece jel oluşumu gerçekleştirmektedir. Bu katyonlar içerisinde en fazla  $Ca^{+2}$  kullanılmakta olup, sodyum alginat solüsyonunun bir kalsiyum solüsyonuna eklenmesiyle yüzeysel polimerizasyon meydana gelmekte ve kalsiyum iyonlarının alginat boyunca yayılımı ile çökmesi sonucu kalsiyum alginat oluşmaktadır (Cheetham ve ark. 1979).



Kalsiyum alginat jel kapsülleri enzim immobilizasyon matrisi olarak kullanılmaktadır. Kalsiyum alginat, genellikle kullanılan bir kopolimerdir. Poliakrilamid jellere benzemez, kalsiyum alginatın jelesyonu polimer zincirleri arasındaki kolavent bağlarının kırılmasına bağlıdır. Daha doğrusu, polimer moleküller kalsiyum iyonları tarafından çapraz bağlanır. Alginat ve  $CaCl_2$  konsantrasyonları enzim immobilizasyonundaki önemli parametrelerdendir. Çünkü alginat ve  $Ca^{+2}$  iyonları arasındaki çapraz bağlanma jel oluşumunu etkiler (Chang ve ark. 1996, Jankowski ve ark. 1997, Ouwerx ve ark. 1998, Simpson ve ark. 2003).

Kalsiyum alginat jellerinde tutuklanma oldukça ılıman koşullarda meydana gelmektedir (Longo ve ark. 1992, Gombotz ve Wee 1998). Ayrıca jelesyon şartları değiştirilerek bazı kapsül özellikleri kolaylıkla kontrol edilebilir. Örneğin, jel membranlarının farklı substratlara olan permeabilitesi ya da yonlu gibi kapsül özellikleridir (Poncelet ve ark. 1999). Kalsiyum alginat jelde tutuklama tekniği düşük

maliyet, kullanım kolaylığı ve toksik olmayışı nedeniyle diğer immobilizasyon teknikleri arasında kullanım avantajına sahiptir (Bladino ve ark. 2001, Dey ve ark. 2003).

Aspergillus sclerotiorum'dan elde edilerek kalsiyum alginat kapsüllerinde immobilize edilen  $\alpha$ -amilaz enziminin bazı özellikleri araştırılmış ve çözümlü  $\alpha$ -amilazla karşılaştırılmıştır. Immobilize ve çözümlü enzimler için optimum pH 5.0 ve sıcaklık 40°C olarak tespit edilmiştir. Immobilize enzimde daha iyi bir  $K_m$  değeri gözlenmiştir, fakat  $K_{cat}/K_m$  değerlerinin her iki enzim için de aynı olduğu görülmüştür. Kalsiyum alginat kapsüllerinde tutuklamayla  $\alpha$ -amilazın termal ve depolama kararlılığı artmıştır. Immobilize ve çözümlü enzimlerin 60°C'deki yarı ömürleri 164.2 ve 26.2 dakika olarak belirlenmiştir. Çözümlü enzim için termal inaktivasyon noktası 56°C iken, immobilize  $\alpha$ -amilaz için 65.48°C olduğu görülmüştür. Çözümlü ve immobilize  $\alpha$ -amilaz enziminin 60 dakikadaki ni astası hidroliz yüzdeleri %97.5 ve %92.2 olarak belirlenmiştir (Yagar ve ark. 2008).

Ertan ve ark. (2007), Aspergillus sclerotiorum'dan  $\alpha$ -amilaz enzimi üreterek kalsiyum alginat kapsüllerinde tutuklamışlardır. Optimum alginat ve kalsiyum konsantrasyonlarını %3 olarak bulmuşlar, 140 IU enzim yüklü 3mm kalınlıktaki 0.5 gr kapsüllerle en yüksek enzim aktivitesini elde etmişlerdir. Kapsüllerin 7 kez kullanıma uygun olduğu görülmüştür ve bağıncık aktivitesinin yalnızca %35'i kaybolmuştur. İncelenen çeşitli ni astası kaynakları arasında en yüksek enzim aktivitesi çözümlü patates ni astası ile elde edilmiştir.

Bacillus subtilis'ten üretilen  $\alpha$ -amilaz enzimi farklı yetiştirme şartları altında çalışılmıştır. Maksimum  $\alpha$ -amilaz üretimi 48 saatlik inkübasyon sonucunda, 40°C'de ve pH 7.5'te gerçekleşmiştir. Tanımlanan karbohidratlar arasında %1 ni astanın en iyi karbon kaynağı olduğu saptanmıştır. Organizma, azot kaynağı olarak pepton kullanıldığında daha yüksek  $\alpha$ -amilaz enzimi salgılamış ve daha iyi çoğalmıştır. Üretilen  $\alpha$ -amilaz enzimi farklı metodlarla, farklı materyallerde tutuklanmış ve enzimin immobilizasyon öncesi ve sonrası özellikleri kıyaslanmıştır. Immobilize enzimin pH değeri asidik bölgeye doğru kaymış, optimum sıcaklığı 70-80°C'ye yükselmiş ve serbest enzime kıyasla  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri ve stabilitesi yükselmiştir. Test edilen metal

içerisinde  $\text{CaCl}_2$  -amilazın aktivitesi üzerinde stimüle edici bir etki göstermiştir (El-Banna ve ark. 2007).

Konsoula ve Kyriakides (2006), *Bacillus subtilis* kaynaklı termostabil  $\alpha$ -amilaz enzimini kalsiyum alginat kapsüllerinde immobilize ederek, %2 sodyum alginat ve %5  $\text{CaCl}_2$  ile hazırlanan kapsüllerin ni astada hidrolizinde artışı gösterdiğini, %2'lik silika jel kapsül olmasına eklendiğinde daha az enzim kayıpları gözlemlendiğini ve 20 kez kullanım olanağı sağladıklarını rapor etmişlerdir.

Dey ve ark. (2003), *B. circulans* GRS 313'den maltooligosakkaridleri oluşturan  $\alpha$ -amilaz enzimini kalsiyum alginat damlacıkları içinde tutuklamaları ve damlacık boyutu 2 mm olduğunda ni astada hidrolizinde daha etkili olduğunu ve immobilize enzimin 7 kez kullanımından sonra bağıngıç aktivitesini %85 oranında koruduğunu saptamışlardır.

## 2. MATERYAL ve YÖNTEM

### 2.1. Materyal

Denemelerde -amilaz enzimi üreten bir fabrikadan (ORBA Biyokimya A. ., stanbul) temin edilen *Bacillus amyloliquefaciens* su u materyal olarak kullanılmı tır.

### 2.2. Metod

#### 2.2.1. Bakteri üretim besiyerleri

Çalı mada kullanılan bakterinin saklanması, geli tirilmesi ve enzim üretim kapasitelerinin saptanması amacıyla farklı besiyerleri kullanılmı tır (Çizelge 2.1). Buna göre, bakterilerin buzdolabı ko ullarında uzun süre dayanmalarını sa lamak için, çizelge 2.1'de verilen kültür saklama besiyeri kullanılmı olup, kültürler 30 günde bir kez yeniden hazırlanan agarlı besiyerine a ılanmak suretiyle korunmu lardır.

| Element  | Kültür saklama besiyeri (%) | Bakteri geli tirme (öninkübasyon) besiyeri (%) | Enzim Üretim Besiyeri (%) |
|--|-----------------------------|--|---------------------------|
| Nutrient Broth                                   | 0.8                         | -  | -                         |
| NaCl   | 0.8                         | -  | -                         |
| Ni asta  | 1.0                         | 0.5  | 1.0                       |
| Agar   | 2.0                         | -  | -                         |
| Bacto Pepton                                     | -                           | 0.5  | 0.5                       |
| Corn steep-liquor                                | -                           | 0.3  | 0.5                       |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>  | -                           | 0.4  | 0.8                       |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O             | -                           | 0.1  | 0.2                       |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | -                           | -  | -                         |
| Soya unu   | -                           | -  | -                         |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O             | -                           | -  | 0.05                      |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                  | -                           | -  | 1.4                       |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                  | -                           | -  | 0.6                       |
| Sitrik asit                                      | -                           | -  | -                         |
| pH   | 7.0                         | 7.0  | 7.0                       |

Çizelge 2.1. Çalı mada kullanılan bakterinin saklanması, geli tirilmesi ve enzim üretim kapasitesinin ölçülmesinde kullanılan besiyerleri. Tüm besiyerleri 121<sup>0</sup>C'de 15 dk. süre ile otoklavda sterilize edilmi lerdir (Sarıkaya 1995).

### 2.2.2. Bakteri üretim ko ulları

Kültür saklama ortamından steril bir öze yardımıyla alınan bakteri kültürü, içerisinde 30 ml geli me besiyeri bulunan 100 ml'lik erlenlere a ılanmı , 37 °C'de 150 devir/dk çalkalama hızına sahip inkübatörde 18 saat süre ile üretilmi tir.

Bu bakterinin enzim üretim kapasitesini saptamak amacıyla 18 saatlik bakteri kültürlerinin 600 nm'deki optik yo unlukları (O.D) spektrofotometre (Beckman) kullanılarak steril fizyolojik tuzlu su ile 0.3'e ayarlanmı tir. Bu ekilde ayarlanan kültür çözeltilerinden, içerisinde 150 ml enzim üretim besiyeri bulunan 500 ml'lik erlenlere %1 oranında a ılanmı ve 37°C'de 150 devir/dk çalkalama hızına sahip inkübatörde 88 saat süre boyunca inkübe edilmis tir. Protein ve enzim aktivite tayinleri 16., 24., 40., 48., 64., 72. ve 88. saatlerde yapılarak bakterinin geli me grafi i çıkarılmı tir. Böylece maksimum enzim üretim zamanı saptanmı tir.

### 2.2.3. Enzim aktivitesinin ölçülmesi

-amilaz aktivitesinin tayininde Yoo ve ark. (1987)'ın, kullandıkları dekstrinojenik bir yöntem olan iyodimetrik yöntemden faydalanılmı tir. Bu yöntemin temeli, iyotun ni asta ile verdi i renk esasına dayanmaktadır. Parçalanmamı ni asta iyot ile muamele edildi inde mavi bir renk vermektedir. Ni asta -amilaz enzimi tarafından parçalandı nda kısa zincirli dekstrinler olu ur, bu da mavi renk yerine sarı renk meydana getirmektedir. Böylece, ortamda bulunan enzimin miktarına ba lı olarak, ortamın rengi sarı ile mavi arasında de i mekte, bunun derecesi de spektrofotometrik olarak ölçülebilmektedir.

Bu amaçla, öncelikle kültür ortamından 10 ml alınarak 20 dakika süre ile santrifüj edilerek (6000 devir/dk) bakteri hücrelerinin bulundu u pelet kısmı ile enzim içeren sıvı kısım birbirinden ayrılmı tir.

Enzim aktivite tayininde substrat çözeltisi olarak %5'lik ni asta çözeltisi kullanılmı olup, bu çözeltiden 2,5 ml alınmı ve 0,04 M fosfat tampon çözeltisi (pH:5.9) ile 100 ml'ye tamamlanmı tır. Substrat olarak kullanılan ni asta çözeltisi i lemeden önce her seferinde taze olarak hazırlanmı tır.

Deneylerde her bir enzim örne i için 2 adet örnek 2 adet de kontrol tüpü kullanılmı tır. Her iki tüpe de 5'er ml substrat çözeltisi konulmu ve tüpler literatürde belirtilen 25°C yerine 37°C'lik su banyosunda 10 dakika bekletilerek reaksiyon sıcaklı na getirilmı tır. Daha sonra örnek içeren tüpe 0,04 M fosfat tamponu (pH:5.9) ile 1/10 ila 1/60 arasında seyreltilmi enzim çözeltisinden, kontrol tüpüne ise 0,04 M fosfat tampon (pH:5.9) çözeltisinden 0.5'er ml ilave edilerek 37°C'de 10 dakika inkübasyona bırakılmı tır. nkübasyon süresi sonunda her iki tüpe de 5'er ml HCl eklenerek reaksiyon durdurulmu tur. Tüpler tüp karı tırıcısında (Vortex) karı tırılmı ve bu karı imdan 0.5 ml alınarak içinde 5 ml iyot çözeltisi bulunan ba ka bir tüpe aktarılmı ve örnek ile kontrollerin 620 nm'deki optik yo unlukları enzim ve substrat içermeyen iyot çözeltisine kar ı okunmu tur.

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

Örneklerdeki enzim aktivitesi a a ıdaki formülden yararlanılarak bulunmu tur.

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

Burada:

D : Enzim dilüsyon faktörünü,

R<sub>0</sub>: Enzim yoklu unda substrat-iyot karı ımının optik yo unlu unu  
(kontrol tüp),

R : Enzim varlı nda substrat-iyot karı ımının optik yo unlu unu  
(örnek tüp),

100 : Stok iyot çözeltisinin 100 kez seyreltilmi oldu unu ifade etmektedir.



Örnekteki enzim aktivitesi yukarıdaki formüle göre Unit (IU) cinsinden hesaplanmıştır olup, bu 5.9 pH'da ve 37<sup>0</sup>C'de 1 ml enzim çözeltisinin 10 dakika içerisinde % 0.1'lik ni astu çözeltisindeki 1 mg ni astayı hidroliz eden enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Yoo ve ark. 1987).

#### 2.2.4. Toplam protein tayini

Toplam protein miktarını saptamak amacıyla Gürgün (1974)'de belirtilen Stickland'ın geliştirdiği bir yöntemden yararlanılmıştır. Buna göre, kültürden alınan 10 ml örnek 20 dakika süreyle santrifüj edilerek (6000 devir/dk) üst kısım sedimentten ayrılmıştır ve sediment üzerine 6.6 ml distile su ve 1.2 ml %20'lik NaOH ilave edilerek kuvvetlice karıştırılmıştır. Bu şekilde hazırlanan tüpler kaynar su banyosunda 5 dakika süreyle bekletilmiş ve derhal buzlu soğuk su içine alınarak soğutulduktan sonra üzerlerine 0.2 ml %25'lik CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O çözeltisi konulmuştur. Tüpler tüp karıştırıcısında iyice karıştırıldıktan sonra 30 dakika süreyle oda sıcaklığında bekletilmiş ve 10 dakika süreyle santrifüj edilerek (6000 devir/dk) üstte toplanan berrak kısmın 545 nm'deki optik yoğunluğunu standart örneğe karşı ölçümü yapılmıştır. Standart örneğin hazırlanması amacıyla aynı işlem bir tüp içerisine örnek yerine 6.6 ml distile su konularak yürütülmüştür.

Örneklerdeki protein miktarı "Sıvı Serum Albümin" kullanılarak hazırlanan standart eşiği yardımıyla bulunmuştur.

### 2.3. Enzimin İmmobilize Edilmesi

2.2.3 bölümünde belirtildiği şekilde yapılan üretim sonucunda kültür ortamı 20 dk süre ile santrifüjlenerek (6000 devir/dk) bakteri hücreleri uzaklaştırılmış ve enzim içeren süpernatant kısmı immobilizasyon çalışmaları için kullanılmıştır.

Enzim çözeltisi ve fosfat tamponunda çözölen sodyum alginatın belirli hacmi, karışımındaki sodyum alginatın son konsantrasyonu %2 olacak şekilde karıştırılmıştır. Buz dolu bir kaba yerleştirilen beher içinde toz halindeki sodyum alginat fosfat tamponunda nazikçe çözüldürölmü ve yavaş bir şekilde enzim çözeltisi eklenerek yine nazik bir şekilde karıştırılmıştır.

Elde edilen karışım 10 ml'lik, 0,8 mm çaplı bir ucu sahip enjektöre çekilmiş ve içinde %5 CaCl<sub>2</sub> bulunan solüsyona 10 cm yükseklikten damlatılarak kapsül oluşturulmuştur. Manyetik karıştırıcıda 1 saat boyunca nazik bir şekilde karıştırılmıştır. Tüm işlemler +4°C olacak şekilde hazırlanan bir düzenekte yapılmıştır.

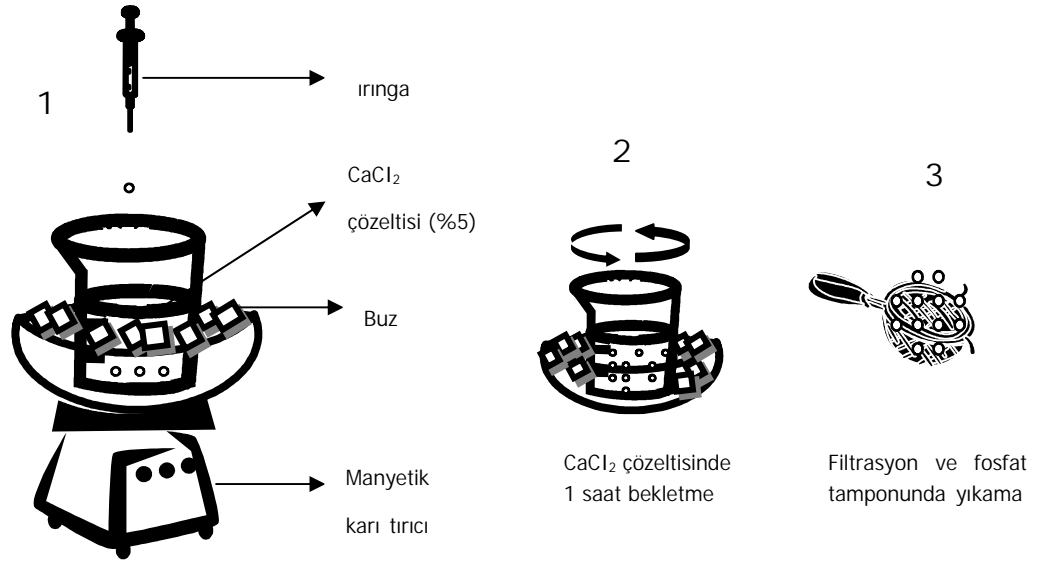
Kalsiyum alginat kapsülleri filtrasyonla kalsiyum klorür solüsyonundan ayrılmış ve fosfat tamponuyla yıkanmıştır. Serbest enzimin (immobilize edilmemiş), CaCl<sub>2</sub> çözeltisi ve yıkamanın protein içerikleri Lowry metodu (Lowry ve ark. 1951) kullanılarak tespit edilmiştir. İmmobilizasyon verimi şu formülle hesaplanmıştır:

$$\text{İmmobilizasyon verimi (\%)} = (a_{\text{imm}}/a_{\text{serbest}}) \times 100$$

$a_{\text{imm}}$  : immobilize enzimin aktivitesi

$a_{\text{serbest}}$ : serbest enziminin aktivitesi

(Won ve ark. 2005)



ekil 2.1. -amilaz enziminin kalsiyum alginat kapsüllerinde immobilizasyon prosedürü

#### 2.4. Farklı Kaynaklı Ni astalar Üzerine immobilize ve Serbest ( immobilize Edilmemi ) Enzimlerin Hidrolizleme Yetenekleri

Çalı mada, %1, %2, %4, %5, %6, %8 ve %10'luk çözünür patates ni astası ve ticari patates, mısır, bu day ve pirinç ni astaları substrat çözeltisi olarak kullanılmı olup, bu çözeltiden 2,5 ml alınımı ve 0,04 M fosfat tamponu çözeltisi (pH: 5,9) ile 100 ml'ye tamamlanımı tır. Enzim aktivitesi 2.2.3'te belirtildi i ekilde yapılmı ve aktiviteler 2.2.3'te belirtilen formül ile hesaplanımı tır. Ni astalar fosfat tamponunda çiri lendirilerek hazırlanımı tır. Çözünür patates ni astası Merck'ten sa lanırken, ticari ni astalar farklı firmalarca üretilmi olup, marketlerden temin edilmi tır.

#### 2.5. immobilize ve Serbest Enzim Formlarının Ni asta Kaynakları Üzerindeki Hidroliz Yeteneklerini Etkileyen Faktörlerin Ara tırılması

Serbest ve immobilize enzim formlarının maksimum aktivite gösterdikleri ni asta kaynakları varlı nda enzimlerin hidroliz yetene ine sıcaklık, pH ve metal iyonlarının etkileri ara tırılmı tır.

### 2.5.1. Sıcaklı ın etkisi

Her iki enzim formunun aktivitesi üzerine sıcaklı ın etkisini ara tırmak amacıyla 2.2.3'te verilen aktivite tayini 40, 45, 50, 55, 60, 70 ve 80°C sıcaklık de erlerinde yapılarak, optimum sıcaklık dereceleri saptanmı tır.

### 2.5.2. pH'nın etkisi

Her iki enzim formunun aktivitesi üzerine farklı pH de erlerinin etkilerini belirlemek üzere enzim reaksiyonunun ölçüldü ü 2.2.3'te verilen tamponun pH'sı 4.0, 5.0, 5.9, 6.0, 6.4, 6.8, 7.0, 7.4, 7.8 ve 8.0'lik pH de erlerinde ayarlanmı ve aktiviteler 37°C'de ölçülmü tür.

### 2.5.3. Metal iyonlarının etkisi

Bu çalı mada,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuCl}_2$  ve  $\text{LiSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  metal iyonları kullanılmı tır. Metal iyonları substrat çözeltilisi ierisine 5 mM konsantrasyonda katılmı tır. Aktiviteler, hiçbir metal iyonu iermeyen kontrollerle elde edilen sonuç 100 kabul edilip, buna göre % olarak hesaplanmı tır.

## 2.6. İnce Tabaka Kromatografisi ile Ni asta Parçalanma Ürünlerinin Belirlenmesi

Serbest ve immobilize *B. amyloliquefaciens* -amilaz enzimlerinin farklı ni asta kaynaklarını hidrolizlemesi sonucunda açığı a çıkan son ürünlerini saptamak amacıyla ince tabaka kromatografisi (TLC) yönteminden faydalanılmı tır (Stahl 1965).

Kromatografik yöntem için maksimum aktivitenin elde edildi i yüzdelerdeki ni asta çözeltilerinden 5 ml alınmı ve dilüe edilmemi 0.5 ml serbest enzim çözeltilisi ve 2 gr

immobilize enzim ile karı tırıldıktan sonra 37<sup>0</sup>C'de 1 ve 5 saat sürelerle inkübe edilmi tir. Bu süre sonunda tüpler içerisine 5 ml 0.1 N HCl çözeltisi ilave edilerek reaksiyon durdurulmu tur.

Reaksiyon sonucunda hidroliz ürünlerinin çe idini saptamak için 20×10 cm boyutunda, 0.2 mm incelikte hazır silika jel plakaları kullanılmı tir. Örnekler oda sıcaklı ında plakanın altından 2 cm yukarıda ve örnekler arası en az 1.5 cm olacak ekilde bir mikro ırınga (Hamilton) yardımıyla 5 µl olarak tatbik edilmi ve plakaların oda sıcaklı ında kuruması sa lanmı tir.

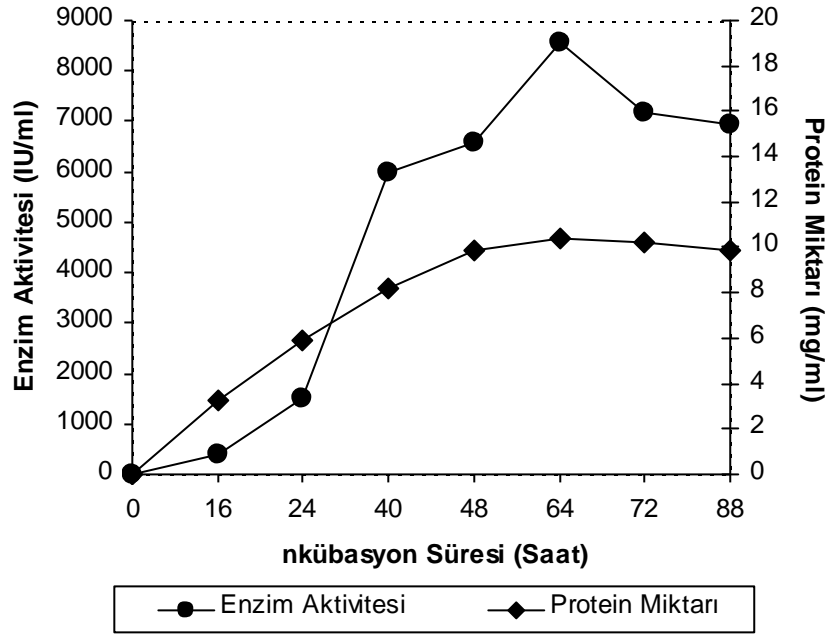
Parçalanma ürünlerinin çe idini belirlemek amacıyla glukoz ve maltoz ekerleri standart olarak kullanılmı tir.

Enzim hidroliz ürünlerini ince tabaka kromatografisi ile ayırmak için çözücü olarak bütanol; etanol; distile su (5:3:2) karı ımından yararlanılmı tir (Jensen ve ark. 1988). Örneklerin uygulandı ı plaka a a ıdan yukarı usulüne göre, içinde çözücü bulunan kromatografi tankına dikey olarak ve çözücüye alt kenarından 1.5 cm batacak ekilde konulmu tur. Plaka, oda sıcaklı ındaki tank içerisinde çözücü 10-15 cm yukarıya çıkıncaya kadar tutulmu tur. Daha sonra plaka çıkarılmı ve 110<sup>0</sup>C'lik etüvde 10 dakika süre ile tutularak kuruması sa lanmı tir. nce tabaka silika jel plakası üzerinde hidroliz ürünleri olan karbohidratların görünmesini sa lamak için plaka üzerinde sülfürik asit: metanol (1:3, v/v) çözeltisi dikkatlice püskürtülmü tür. Püskürtme i leminden sonra plaka 10 dakika süre ile 110<sup>0</sup>C'lik etüvde kurutulmu ve böylece karbohidratlar beyaz plaka üzerinde siyah ya da kahverengi noktalar halinde görünür hale getirilmı tir (Robyt ve White 1987).

### 3. ARA TIRMA SONUÇLARI

#### 3.1. Bakteri Üreme E risi

ORBA Biyokimya A. . ( stanbul)'dan temin edilen *B. amyloliquefaciens* su undan maksimum enzim üretim zamanının tayini amacıyla 2.2.1 ve 2.2.2'de belirtilen besiyerleri ve kültür artlarında bakteri üretilmi tir. 16., 24., 40., 48., 64., 72. ve 88. saatlerde yapılan aktivite tayin sonuçlarına göre en yüksek enzim aktivitesinin 64. saatte görüldü ü tespit edilmi tir. Enzim üretimi bakteri üremesi ile paralel olup, maksimum enzim üretimine logaritmik fazın sonundaki duraklama fazında ula ıldı ı saptanmı tir. Bundan sonraki çalı malarda üretim bu saatte yapılmı tir.



ekil 3.1. *B. amyloliquefaciens*'in inkübasyon süresine göre -amilaz üretim zamanının tayini

### 3.2. Enzim immobilizasyonu

2.2.3.'te belirtilen ekilde 64 saatlik üretim sonucunda bakteri hücreleri kültür ortamından santrifügasyonla uzaklaştırılmış ve enzim içeren süpernatant kısmı immobilizasyon için kullanılmıştır.

%2 alginat ve %5 CaCl<sub>2</sub> varlığında hazırlanan immobilizasyon sonucunda verim %89 olarak saptanmıştır.

### 3.3. Farklı Kaynaklı Ni astalar Üzerine immobilize ve Serbest ( immobilize Edilmemiş ) Enzimlerin Etkileri

2.4.'te belirtildiği gibi immobilize ve serbest enzim %1, %2, %4, %5, %6, %8 ve %10 oranlarında substrat çözeltisi olarak kullanılan çözünür patates ni astası ve ham patates, mısır, buğday ve pirinç ni asta kaynaklarıyla muamele edilmiş ve bunlar üzerindeki hidroliz yetenekleri belirlenmiştir (Çizelge 3.1, 3.2 ve ekil 3.2, 3.3).

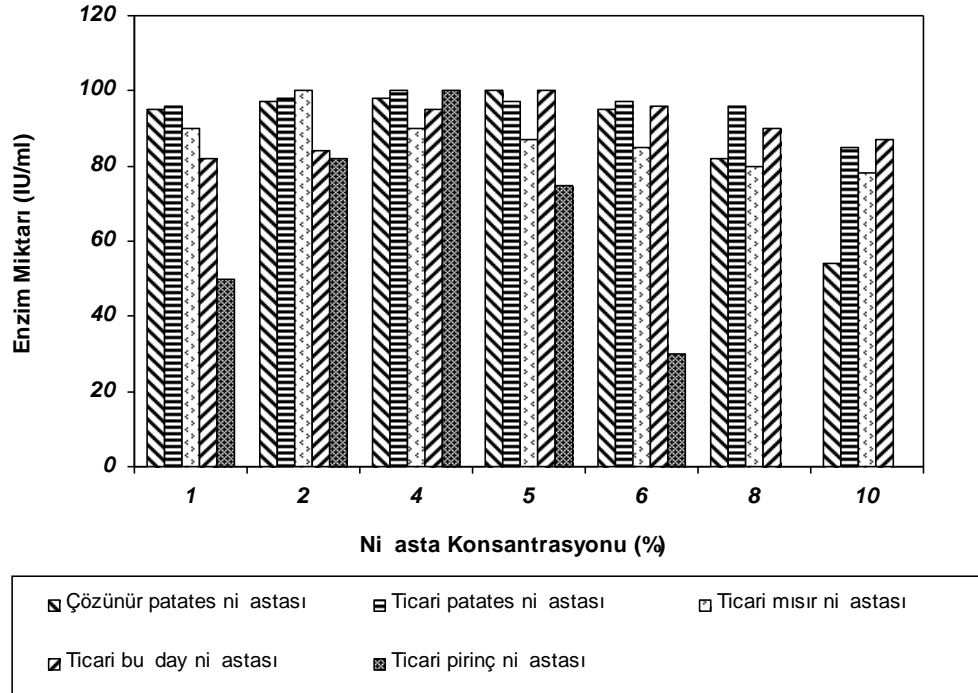
Çizelgeler 3.1 ve 3.2 ve ekiller 3.2 ve 3.3'te görüldüğü gibi immobilize ve serbest enzimlerin genel olarak çözünür patates ve ham buğdayın %5 konsantrasyonunda, ham patates ve pirincin %4 konsantrasyonunda ve mısırın %2 konsantrasyonunda en yüksek düzeyde parçalama gösterdikleri tespit edilmiştir.

Diğer yandan aktivitelere bakıldığında immobilize enzim varlığında en iyi parçalamanın sırasıyla ticari patates>çözünür patates>buğday>mısır>pirinç ni astası olduğu, serbest enzim varlığında ise sırasıyla ticari patates>çözünür patates>mısır>buğday>pirinç ni astası şeklinde olduğu saptanmıştır. Genel olarak bu aktivite dikkate alındığında ise her iki enzim formunun ni asta kaynaklarını benzer bir tarzda parçaladıkları görülmüştür. immobilize enzimin %8 ve %10 konsantrasyondaki ticari pirinç ni astası varlığında hiçbir etki göstermedikleri saptanmıştır. Buna karşın

serbest enzimin %8 ve %10 ticari ni asta varlı ında az da olsa aktivite gösterdi i ancak %1 konsantrasyonda hiç aktivitenin olmadığını saptanmıştır.

| Ni asta<br>Yüzdeleri<br>(%) | Çözünür<br>Patates (%5) |                | Ticari<br>Patates (%4) |                | Ticari<br>Mısır (%2) |                | Ticari<br>Bu day (%5) |                | Ticari<br>Pirinç (%4) |                |
|-----------------------------|-------------------------|----------------|------------------------|----------------|----------------------|----------------|-----------------------|----------------|-----------------------|----------------|
|                             | IU/ml                   | B. Akt.<br>(%) | IU/ml                  | B. Akt.<br>(%) | IU/ml                | B. Akt.<br>(%) | IU/ml                 | B. Akt.<br>(%) | IU/ml                 | B. Akt.<br>(%) |
| 1                           | 9160                    | 95             | 9350                   | 96             | 6045                 | 90             | 7505                  | 82             | 2003                  | 50             |
| 2                           | 9353                    | 97             | 9545                   | 98             | 6717                 | 100            | 7688                  | 84             | 3284                  | 82             |
| 4                           | 9450                    | 98             | 9740                   | 100            | 6045                 | 90             | 8695                  | 95             | 4006                  | 100            |
| 5                           | 9643                    | 100            | 9447                   | 97             | 5843                 | 87             | 9153                  | 100            | 3004                  | 75             |
| 6                           | 9160                    | 95             | 9447                   | 97             | 5709                 | 85             | 8786                  | 96             | 1201                  | 30             |
| 8                           | 7907                    | 82             | 9350                   | 96             | 5373                 | 80             | 8237                  | 90             | 0                     | 0              |
| 10                          | 5207                    | 54             | 8279                   | 85             | 5239                 | 78             | 7963                  | 87             | 0                     | 0              |

Çizelge 3.1. immobilize -amilaz enziminin farklı ni asta kaynakları üzerindeki hidroliz yetenekleri



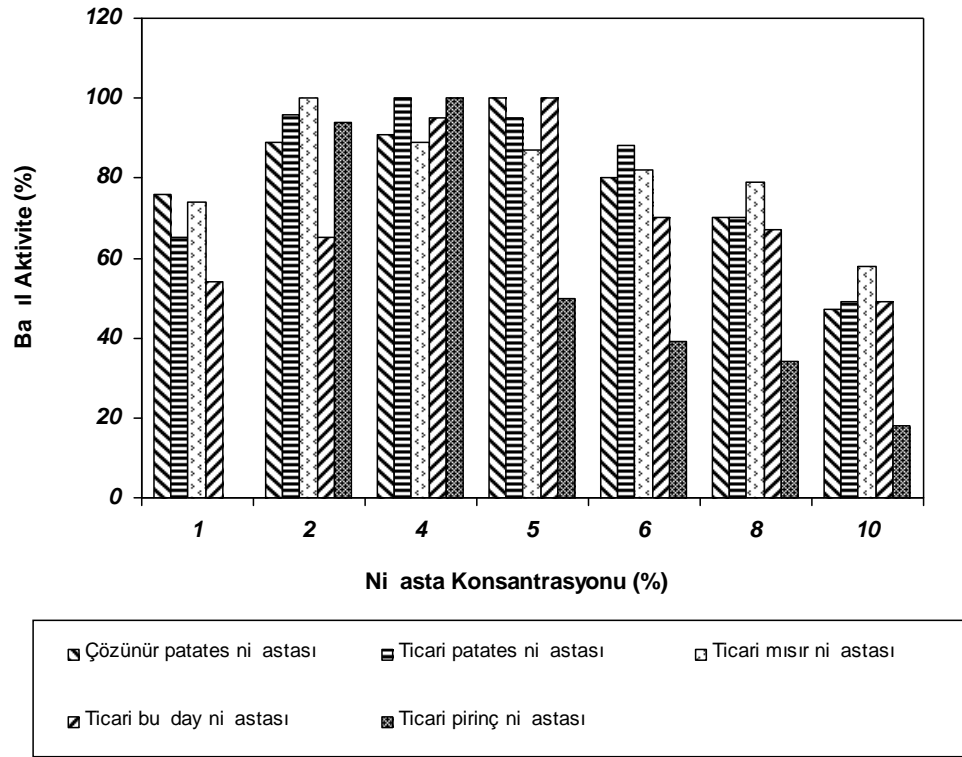
Çizelge 3.2. immobilize -amilaz enziminin farklı ni asta kaynakları üzerindeki hidroliz yetenekleri

Çalışmalarında her deney iki kez tekrarlanmıştır olup, ortalama değerler verilmiştir.



| Ni asta<br>Yüzdeleri<br>(%) | Çözünür<br>Patates (%5) |                | Ticari<br>Patates (%4) |                | Ticari<br>Mısır (%2) |                | Ticari<br>Bu day (%5) |                | Ticari<br>Pirinç (%4) |                |
|-----------------------------|-------------------------|----------------|------------------------|----------------|----------------------|----------------|-----------------------|----------------|-----------------------|----------------|
|                             | IU/ml                   | B. Akt.<br>(%) | IU/ml                  | B. Akt.<br>(%) | IU/ml                | B. Akt.<br>(%) | IU/ml                 | B. Akt.<br>(%) | IU/ml                 | B. Akt.<br>(%) |
| 1                           | 6400                    | 76             | 5786                   | 65             | 5487                 | 74             | 3309                  | 54             | 0                     | 0              |
| 2                           | 7495                    | 89             | 8545                   | 96             | 7415                 | 100            | 3983                  | 65             | 3603                  | 94             |
| 4                           | 7664                    | 91             | 8902                   | 100            | 6599                 | 89             | 5821                  | 95             | 3834                  | 100            |
| 5                           | 8422                    | 100            | 8456                   | 95             | 6451                 | 87             | 6128                  | 100            | 1917                  | 50             |
| 6                           | 6737                    | 80             | 7933                   | 88             | 5932                 | 80             | 4289                  | 70             | 1495                  | 39             |
| 8                           | 5895                    | 70             | 6231                   | 70             | 5857                 | 79             | 4105                  | 67             | 1303                  | 34             |
| 10                          | 3958                    | 47             | 4361                   | 49             | 4300                 | 58             | 3002                  | 49             | 690                   | 18             |

Çizelge 3.2. Serbest -amilaz enziminin farklı ni asta kaynakları üzerindeki hidroliz yetenekleri



ekil 3.3. Serbest -amilaz enziminin farklı ni asta kaynakları üzerindeki hidroliz yetenekleri

Çalı malarda her deney iki kez tekrarlanmı olup, ortalama de erler verilmi tir.

### 3.4. İmmobilize ve Serbest Enzimlerin Farklı Ni Asta Kaynakları Üzerindeki Hidroliz Yeteneklerini Etkileyen Faktörlerin Ara tırılması

#### 3.4.1. Sıcaklı ın etkisi

Serbest ve immobilize enzim formlarının maksimum aktivite gösterdiği % ni astası kaynakları varlığı nda hidrolizleme yetene ine sıcaklı ın etkisini belirlemek üzere 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80 °C sıcaklık derecelerinde enzim aktivite tayinleri yapılmıştır. Sonuçlar her bir ni astası kayna ı için ayrı ayrı grafiklendirilmiştir ( ekil 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8).

Her bir sıcaklık derecesinde elde edilen aktivite değerleri kontrol olarak kullanılan sıcaklık derecesinde (37°C) elde edilen değer (%100) ile kıyaslanarak yüzde olarak hesaplanmıştır.

| Sıcaklık<br>Değerleri<br>(°C) | Çözünür<br>Patates (%5) |               | Tic. Patates<br>(%4) |               | Tic. Mısır<br>(%2) |               | Tic. Buğday<br>(%5) |               | Tic. Pirinç<br>(%4) |               |
|-------------------------------|-------------------------|---------------|----------------------|---------------|--------------------|---------------|---------------------|---------------|---------------------|---------------|
|                               | mmo.<br>Enzim           | Ser.<br>Enzim | mmo.<br>Enzim        | Ser.<br>Enzim | mmo.<br>Enzim      | Ser.<br>Enzim | mmo.<br>Enzim       | Ser.<br>Enzim | mmo.<br>Enzim       | Ser.<br>Enzim |
| 37 (K)                        | 100                     | 100           | 100                  | 100           | 100                | 100           | 100                 | 100           | 100                 | 100           |
| 40                            | 107                     | 112           | 104                  | 111           | 103                | 115           | 110                 | 104           | 136                 | 117           |
| 45                            | 111                     | 121           | 119                  | 130           | 104                | 129           | 119                 | 128           | 454                 | 157           |
| 50                            | 148                     | 129           | 123                  | 140           | 106                | 132           | 138                 | 164           | 527                 | 189           |
| 55                            | 151                     | 147           | 120                  | 131           | 124                | 140           | 128                 | 174           | 481                 | 142           |
| 60                            | 159                     | 127           | 119                  | 113           | 115                | 100           | 124                 | 144           | 427                 | 96            |
| 70                            | 151                     | 85            | 117                  | 55            | 110                | 41            | 98                  | 46            | 281                 | 46            |
| 80                            | 96                      | 23            | 77                   | 16            | 61                 | 6             | 19                  | 0             | 54                  | 17            |

Çizelge 3.3. Farklı sıcaklık derecelerinde immobilize ve serbest -amilaz enzimlerinin % aktivite değerleri (K: Kontrol)

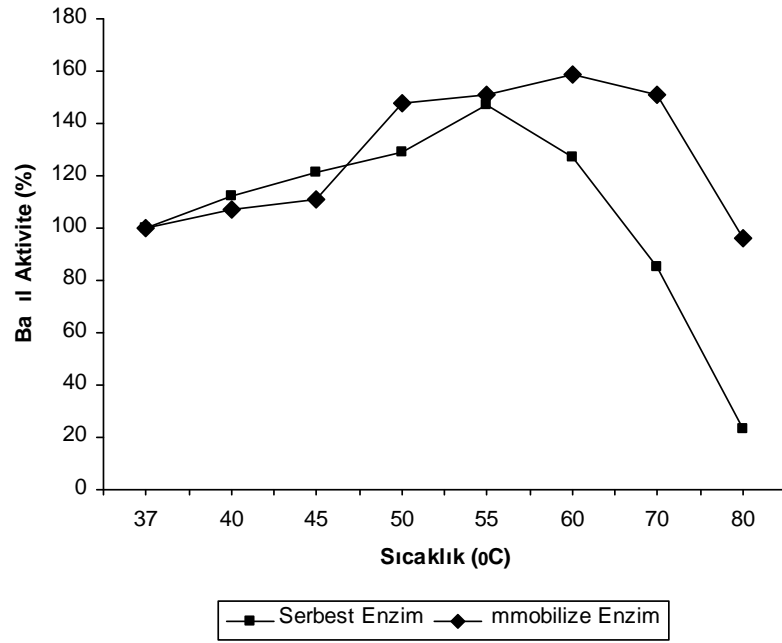
Çizelge 3.3 ve ekil 3.4-3.8'de görüldü ü gibi immobilize enzimin %5 çözünür patates ni astası varlığı nda 60°C'de; ticari patates, pirinç ve buğday ni astaları varlığı nda 50°C'de; ticari mısır ni astası varlığı nda ise 55°C'de maksimum aktivite gösterdiği saptanmıştır. Diğer yandan serbest enzimle yapılan çalı malarda ise çözünür

patates, ticari mısır ve bu day ni astalarında en yüksek aktivite 55<sup>0</sup>C'de elde edilirken, ticari patates ve pirinç ni astaları varlı ında ise 50<sup>0</sup>C olarak saptanmı tır.

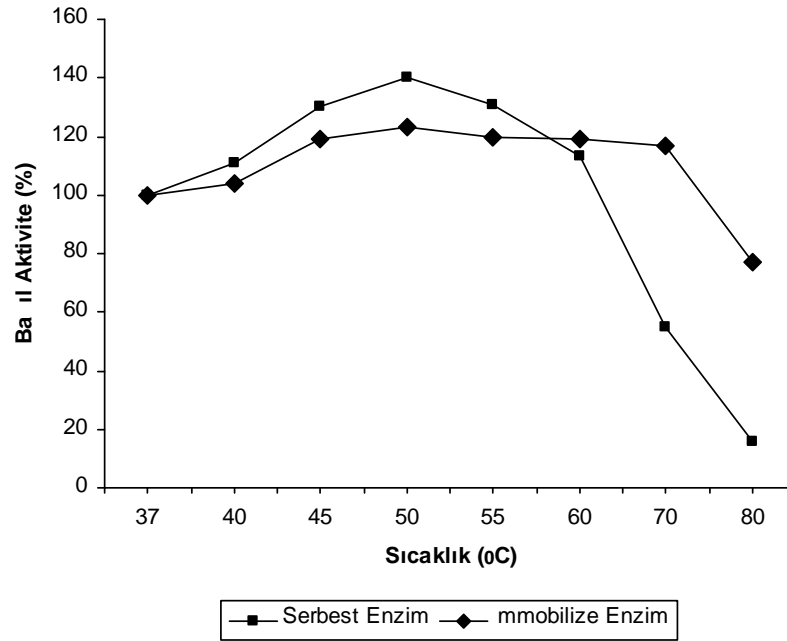
Sıcaklı ın her 10<sup>0</sup>C'de artması ile her iki enzimin aktivitesinin kademeli olarak maksimum sıcaklık derecesine kadar arttı ı gözlemlenmi tir.

Yapılan çalı malarda immobilize enzimin serbest enzime göre yüksek sıcaklıklarda yüksek aktivite gösterdi i saptanmı tır ( ekil 3.4, 3.5, 3.6, 3.7 3.8). mmobilize enzimin çözüdür patates ni astası varlı ında aktivitesinin 70<sup>0</sup>C'de kontrole göre %51'lik bir artı gösterdi i, 80<sup>0</sup>C'de ise %96'sını korudu u tespit edilmi tir. Ticari patates ni astası varlı ında 70<sup>0</sup>C'de %17'lik bir artı gösterdi i, 80<sup>0</sup>C'de ise aktivitesinin %77'sini korudu u saptanmı tır. Mısır ni astası varlı ında aktivitesinin 70<sup>0</sup>C'de %10'luk bir artı gösterdi i, 80<sup>0</sup>C'de ise %61'ini korudu u belirlenmi tir. Ticari bu day ni astası 70<sup>0</sup>C'de %98'ini korurken, 80<sup>0</sup>C'de aktivitenin %81 azaldı ı saptanmı tır. Pirinç ni astası varlı ında ise 70<sup>0</sup>C'de aktivitenin %181 arttı ı, 80<sup>0</sup>C'de ise aktivitenin %54'ünün korundu u gözlenmi tir.

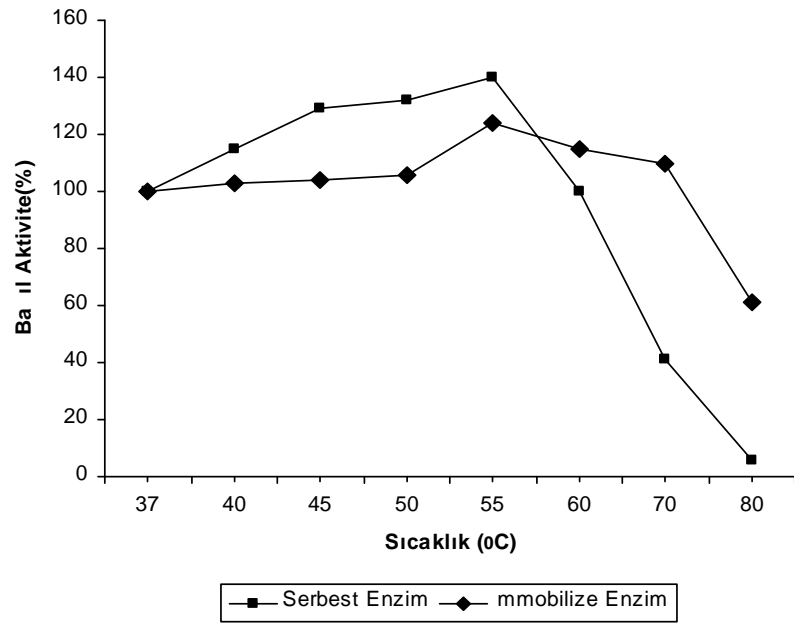
Serbest enzimin ise yüksek sıcaklıklarda aktivitesini koruyamadı ı, özellikle 60<sup>0</sup>C'lik sıcaklıktan itibaren aktivitelere önemli dü ü ler gösterdi i saptanmı tır. Bu day ni astası dı ındaki di er ni asta kaynakları varlı ında enzim yüksek sıcaklıklarda (70<sup>0</sup>C-80<sup>0</sup>C) az aktivite göstermesine ra men bu sonuçlar göz ardı edilmi tir.



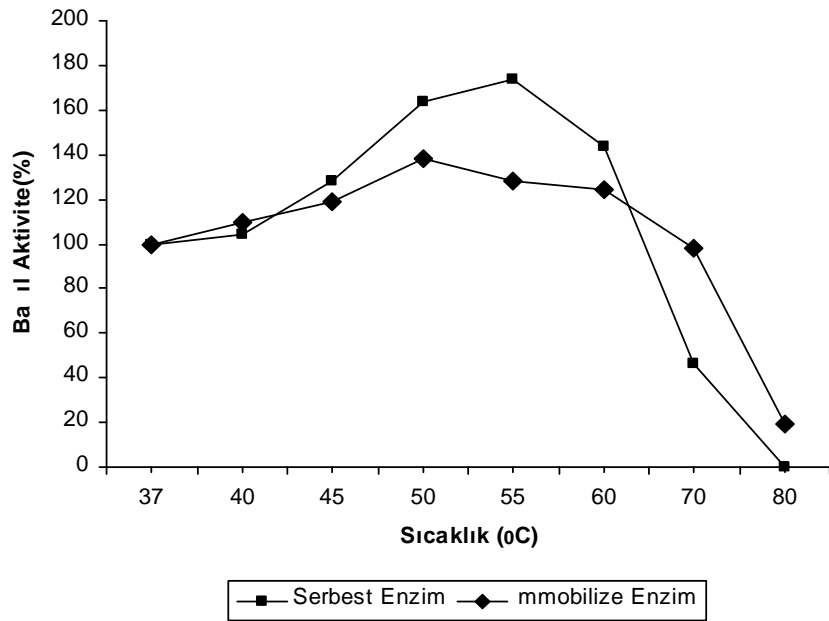
ekil 3.4. mmobilize ve serbest  $\alpha$ -amilaz enziminin farklı sıcaklıklarda çözünür patates ni astası (%5) üzerindeki hidroliz etkisi



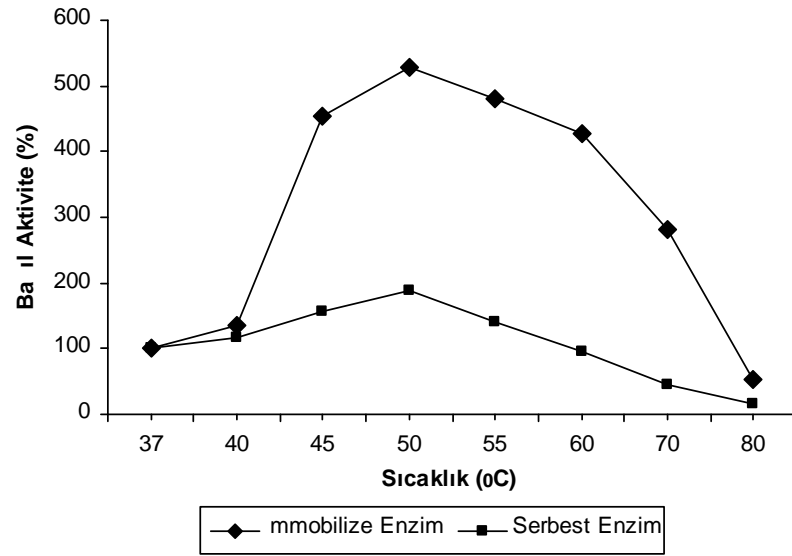
ekil 3.5. mmobilize ve serbest  $\alpha$ -amilaz enziminin farklı sıcaklıklarda ticari patates ni astası (%4) üzerindeki hidroliz etkisi



ekil 3.6. mmobilize ve serbest  $\alpha$ -amilaz enziminin farklı sıcaklıklarda ticari mısır ni astası (%2) üzerindeki hidroliz etkisi



ekil 3.7. mmobilize ve serbest  $\alpha$ -amilaz enziminin sıcaklığı bağılı olarak ticari buğday ni astası (%5) üzerindeki hidroliz etkisi



ekil 3.8. mmobilize ve serbest  $\alpha$ -amilaz enziminin farklı sıcaklıklarda ticari pirinç ni astası (%4) üzerindeki hidroliz etkisi

Çalı malarda her deney iki kez tekrarlanmı olup, ortalama de erler verilmi tir.

### 3.4.2. pH'nın etkisi

Serbest ve immobilize enzimin en yüksek aktivite gösterdikleri ni asta kaynakları üzerindeki hidroliz yetene ine pH'nın etkisini incelemek amacıyla 4.0, 5.0, 6.0, 6.4, 6.8, 7.0, 7.4, 7.8 ve 8.0 pH de erleri kullanılmı tir. Sonuçlar her bir ni asta kayna ı için birlikte verilmi tir.

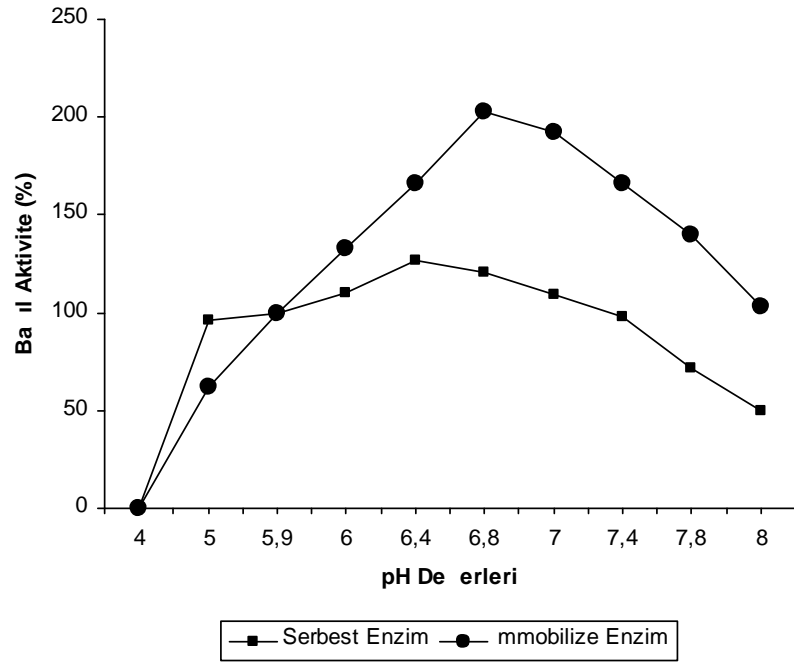
Çalı malar sırasında elde edilen aktivite de erleri, kontrol olarak kullanılan pH de erinde (pH:5,9) elde edilen de erler %100 olarak kabul edilerek hesaplanmı tir (Çizelge 3.4).

| pH De erleri | Çözünür Patates (%5) |            | Ticari Patates (%4) |            | Ticari Mısır (%2) |            | Ticari Bu day (%5) |            | Ticari Pirinç (%4) |            |
|--------------|----------------------|------------|---------------------|------------|-------------------|------------|--------------------|------------|--------------------|------------|
|              | mmo. Enzim           | Ser. Enzim | mmo. Enzim          | Ser. Enzim | mmo. Enzim        | Ser. Enzim | mmo. Enzim         | Ser. Enzim | mmo. Enzim         | Ser. Enzim |
| 4.0          | 0                    | 0          | 0                   | 0          | 0                 | 0          | 0                  | 0          | 0                  | 0          |
| 5.0          | 62                   | 96         | 65                  | 83         | 69                | 61         | 26                 | 89         | 68                 | 87         |
| 5.9 (K)      | 100                  | 100        | 100                 | 100        | 100               | 100        | 100                | 100        | 100                | 100        |
| 6.0          | 133                  | 110        | 134                 | 104        | 90                | 116        | 146                | 112        | 175                | 133        |
| 6.4          | 166                  | 127        | 97                  | 122        | 84                | 113        | 161                | 146        | 212                | 120        |
| 6.8          | 203                  | 121        | 80                  | 124        | 71                | 98         | 215                | 108        | 181                | 91         |
| 7.0          | 192                  | 109        | 74                  | 110        | 60                | 95         | 203                | 106        | 125                | 83         |
| 7.4          | 166                  | 98         | 57                  | 109        | 49                | 92         | 157                | 83         | 81                 | 62         |
| 7.8          | 140                  | 72         | 38                  | 103        | 35                | 85         | 42                 | 79         | 62                 | 16         |
| 8.0          | 103                  | 50         | 34                  | 77         | 32                | 63         | 34                 | 32         | 18                 | 8          |

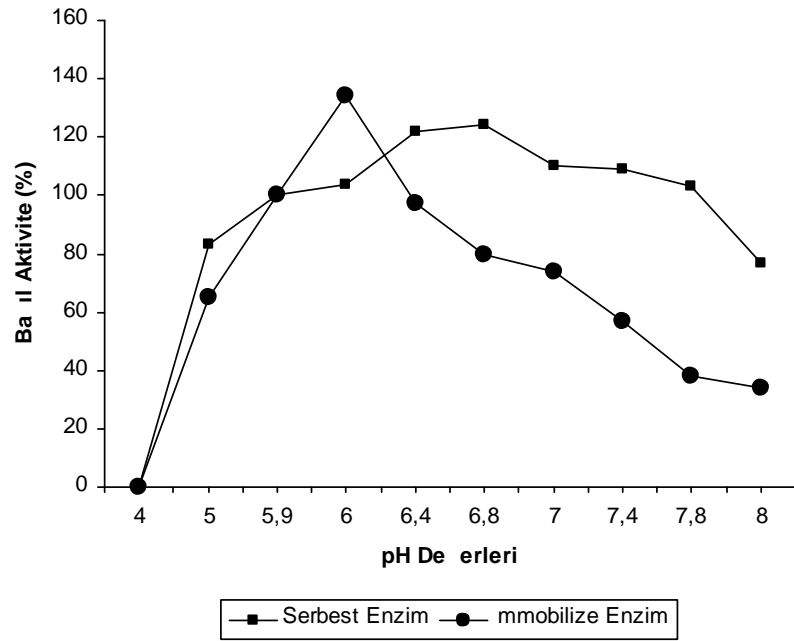
Çizelge 3.4. mmobilize ve serbest -amilaz enziminin pH'ya ba lı olarak farklı ni astalar üzerindeki % hidroliz etkisi (K: Kontrol)

Çizelge 3.4.'te görüldü ü gibi immobilize enzimin çözünür patates ve ticari bu day ni astaları varlı nda pH 6.8'de, ticari pirinç varlı nda pH 6.4, ticari patates varlı nda 6.0 ve ticari mısır ni astası varlı nda 5.9'da maksimum aktivite elde edilmi tir. Di er yandan serbest enzimle yapılan çalı malarda ise ticari patates ni astası varlı nda pH 6.8, çözünür patates ve ticari bu day ni astaları varlı nda pH 6.4, ticari mısır ve pirinç varlı nda ise pH 6.0'da en yüksek aktivite saptanmı tır.

Yapılan çalı malarda immobilize enzimin alkali taraftaki aktivitenin asidik tarafa göre yüksek oldu u, buna kar ın serbest enzimin hem asidik, hem de alkali tarafta aktivitesini korudu u ancak pH 4.0'ta her iki enzimin aktivitesinin kayboldu u saptanmı tır. mmobilize enzimin çözünür patates ni astası varlı nda pH 8.0'de aktivitesini maksimum aktiviteye göre %50'sini korudu u saptanmı tır. Ticari pirinç ni astası varlı nda ise sadece serbest enzimin aktivitesinde %92'lik kayıp gözlenmi tir. mmobilize enzim pH 8.0'de kontrole göre %3'lük bir aktivite artı ı gösterirken, denemeye alınan di er ni astalar varlı nda immobilize ve serbest enzim fazla bir aktivite artı ı göstermemi tir.

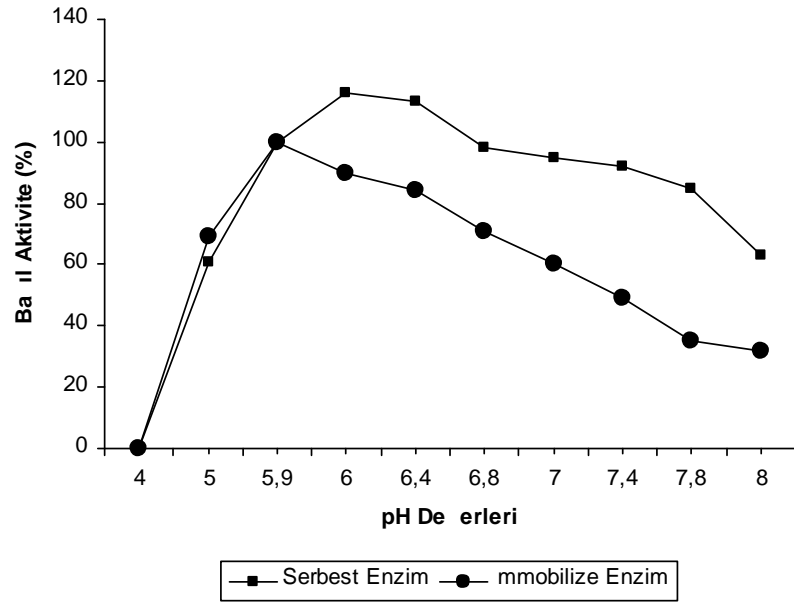


ekil 3.9. mmobilize ve serbest  $\alpha$ -amilaz enziminin pH'ya ba lı olarak  $\%5$  çözünür patates ni astası üzerindeki hidroliz etkisi

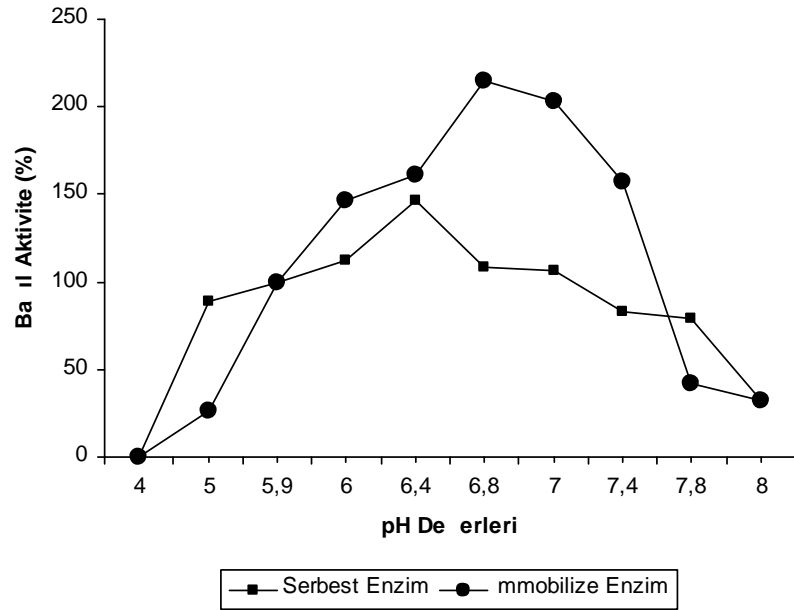


ekil 3.10. mmobilize ve serbest  $\alpha$ -amilaz enziminin pH'ya ba lı olarak ticari patates ni astası ( $\%4$ ) üzerindeki hidroliz etkisi

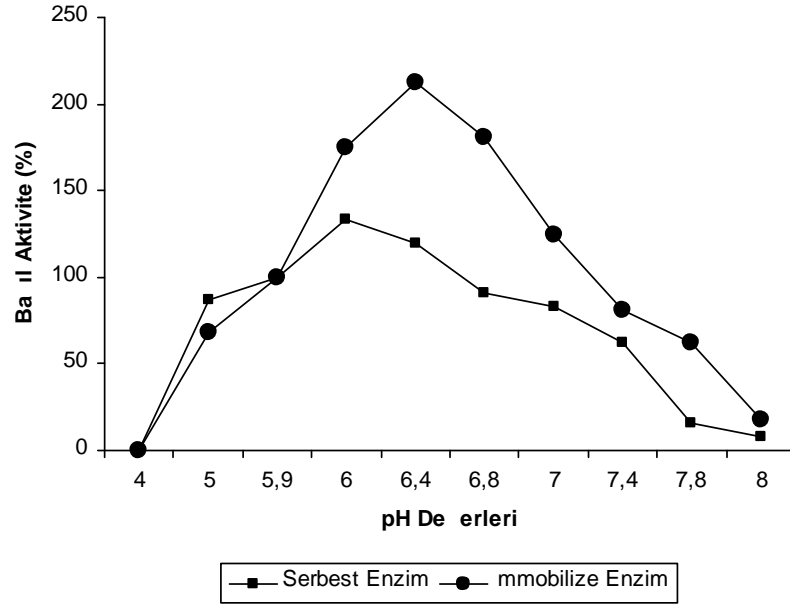




ekil 3.11. mmobilize ve serbest -amilaz enziminin pH'ya ba lı olarak ticari mısır ni astası (%2) üzerindeki hidroliz etkisi



ekil 3.12. mmobilize ve serbest -amilaz enziminin pH'ya ba lı olarak ticari bu day ni astası (%5) üzerindeki hidroliz etkisi



ekil 3.13. mmobilize ve serbest  $\alpha$ -amilaz enziminin pH'ya ba lı olarak ticari pirinç ni astası (%4) üzerindeki hidroliz etkisi

Çalı malarda her deney iki kez tekrarlanmı olup, ortalama de erler verilmi tir.

### 3.4.3. Metal iyonlarının etkisi

Bu çalı mada,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuCl}_2$  ve  $\text{LiSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  metallerinin pH 5.9 ve  $37^\circ\text{C}$  sıcaklıkta immobilize ve serbest enzim aktivitesi üzerine etkileri ve bunun ni asta hidrolizini ne ekilde etkiledi i ara tırılmı tır.

Elde edilen sonuçlar içerisinde hiçbir metal iyonu bulunmayan kontrol çözelti ile elde edilen aktivite %100 olarak kabul edilip, buna göre % olarak hesaplanmı tır (Çizelge 3.5).

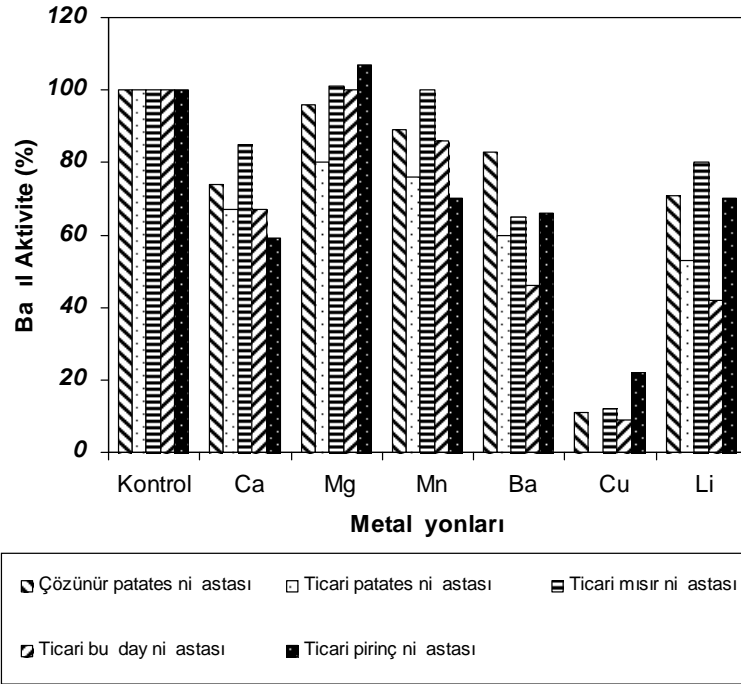
Çizelge 3.4 ve ekil 3.14 ve 3.15'te görüldü ü gibi ticari pirinç ni astasını hariç tutacak olursak metal iyonları içerisinde  $\text{Mg}^{+2}$  ve  $\text{Li}^{+2}$ 'un her iki enzim formunun aktivitesi üzerinde etkili oldu u saptanmı tır. Ayrıca  $\text{Li}^{+2}$  ve  $\text{Mn}^{+2}$  iyonlarının da serbest enzim üzerinde stimülatör etki gösterdi i görülmü tür. Sonuçlar ni astalar varlı nda

irdelendi inde çözümlü patates ni astası ortamındaki  $Ca^{+2}$ ,  $Ba^{+2}$  ve  $Li^{+2}$  iyonları serbest enzim üzerinde aktivator rol oynarken immobilize enzim bu metaller varlı ında kayda de er bir aktivite göstermemi tir. Ticari patates ni astası varlı ında ise kontrole göre  $Mg^{+2}$  ve  $Li^{+2}$  stimulator etki gösterirken, immobilize enzimin aktivitesinde bir artı saptanmamı tir. Ticari mısır ni astası varlı ında  $Li^{+2}$  iyonunun serbest enzimin,  $Mg^{+2}$  iyonunun ise immobilize enzimin aktivitesini kayda de meyecek bir oranda arttırdı ı gözlenmi tir. Ticari bu day varlı ında  $Mn^{+2}$  ve  $Li^{+2}$  serbest enzim aktivitesi üzerinde aktifli ini gösterirken, immobilize enzim varlı ında bir sonuç alınamamı tir. Ticari pirinç varlı ında ise metal iyonlarından  $Ca^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$  ve  $Mn^{+2}$  iyi bir etki gösterirken,  $Mg^{+2}$  immobilize enzim üzerinde az bir aktivite artı ı göstermi tir.  $Cu^{+2}$  iyonu varlı ında tüm ni asta kaynakları ortamında güçlü bir inhibitör etki gözlenmi tir.

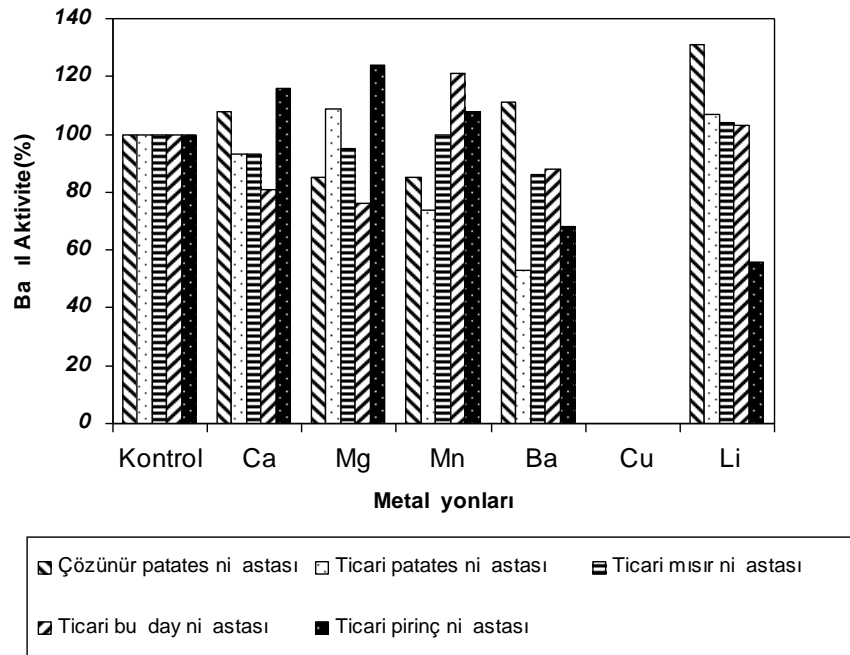
Tüm sonuçlar dikkate alındı ında immobilize enzimin kullanılan metaller varlı ında kayda de er bir aktivite artı ı göstermedi i, buna kar ın serbest enzimle yapılan çalı malar sonucunda aktivitede artı lar sa lanmı olup, özellikle çözümlü patates ortamında  $Li^{+2}$  bulundu unda %31'lik, pirinç ni astası varlı ında  $Mg^{+2}$  iyonu ile %24, bu day ni astası varlı ında ise  $Mn^{+2}$  ile %21'lik bir aktivite artı ı görülmü tür.  $Ca^{+2}$  iyonunun ise pirinç ni astası varlı ında %16'lık bir aktivite artı ına sebep oldu u tespit edilmi tir.

| Metal iyonları (5mM) | Çözümlü Patates (%5) |            | Ticari Patates (%4) |            | Ticari Mısır (%2) |            | Ticari Bu day (%5) |            | Ticari Pirinç (%4) |            |
|----------------------|----------------------|------------|---------------------|------------|-------------------|------------|--------------------|------------|--------------------|------------|
|                      | mmo. Enzim           | Ser. Enzim | mmo. Enzim          | Ser. Enzim | mmo. Enzim        | Ser. Enzim | mmo. Enzim         | Ser. Enzim | mmo. Enzim         | Ser. Enzim |
| Kontrol              | 100                  | 100        | 100                 | 100        | 100               | 100        | 100                | 100        | 100                | 100        |
| $Ca^{+2}$            | 74                   | 108        | 67                  | 93         | 85                | 93         | 67                 | 81         | 59                 | 116        |
| $Mg^{+2}$            | 96                   | 85         | 80                  | 109        | 101               | 95         | 100                | 76         | 107                | 124        |
| $Mn^{+2}$            | 89                   | 85         | 76                  | 74         | 100               | 100        | 86                 | 121        | 70                 | 108        |
| $Ba^{+2}$            | 83                   | 111        | 60                  | 53         | 65                | 86         | 46                 | 88         | 66                 | 68         |
| $Cu^{+2}$            | 11                   | 0          | 0                   | 0          | 12                | 0          | 9                  | 0          | 22                 | 0          |
| $Li^{+2}$            | 71                   | 131        | 53                  | 107        | 80                | 104        | 42                 | 103        | 70                 | 56         |

Çizelge 3.5. immobilize ve serbest -amilaz enziminin metal iyonlarına ba lı olarak farklı ni astalar üzerindeki % hidroliz etkisi



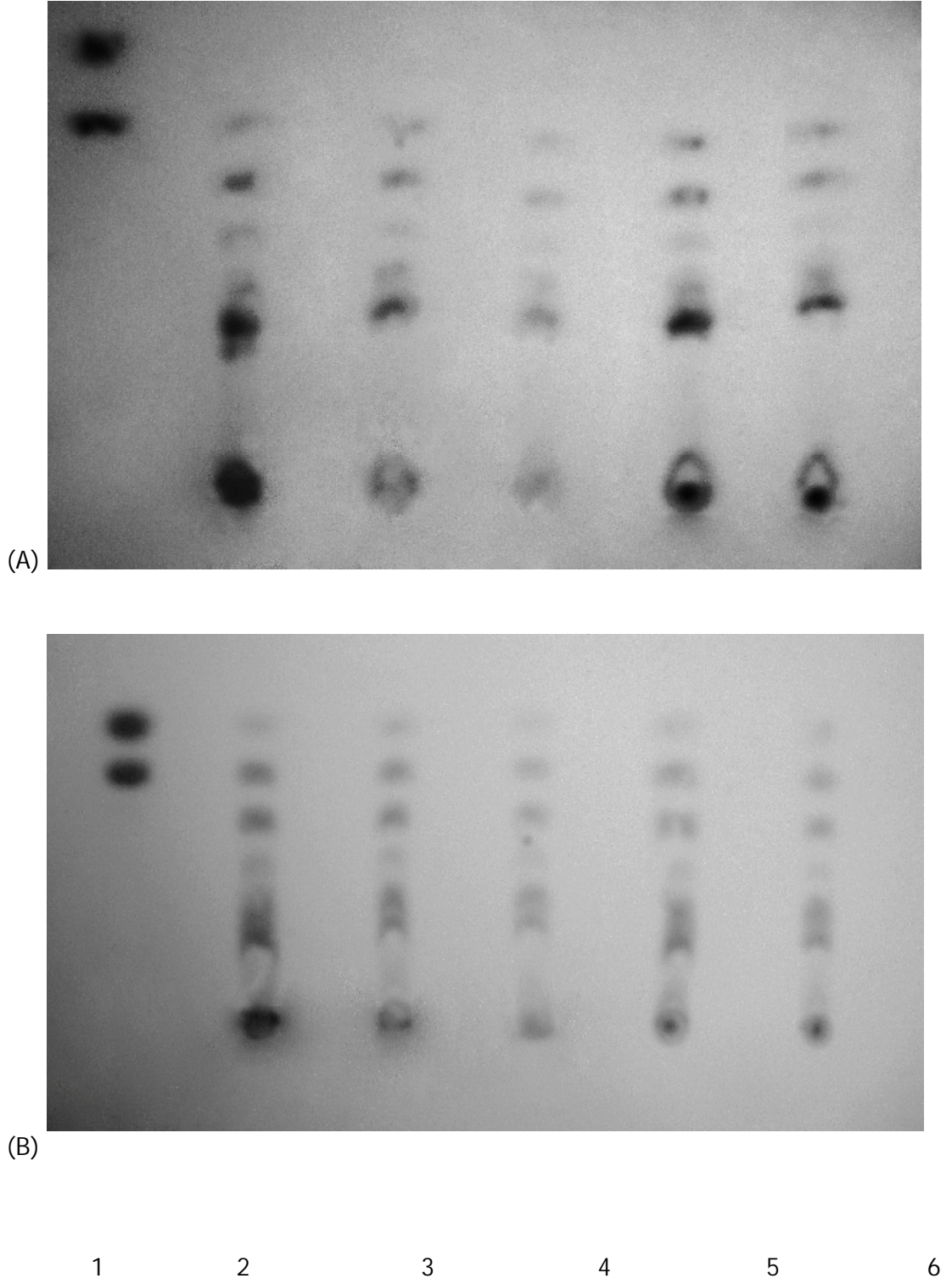
ekil 3.14. mmobilize -amilazın metal iyonlarına ba lı olarak kullanılan ni asta kaynakları üzerindeki hidroliz yetene i



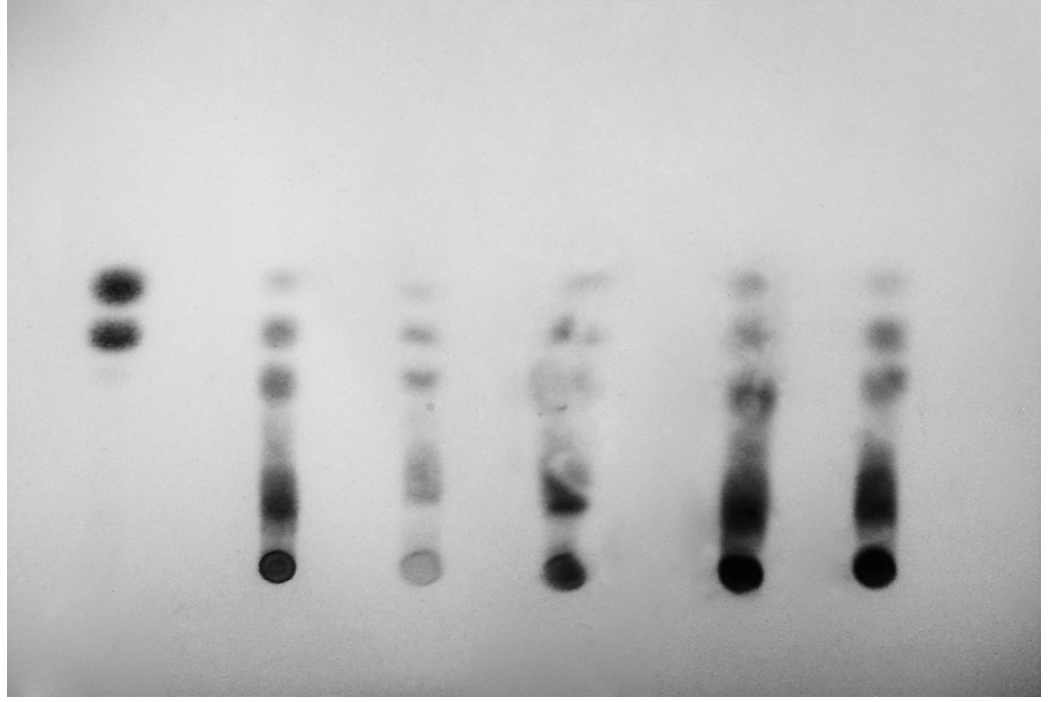
ekil 3.15. Serbest -amilazın metal iyonlarına ba lı olarak kullanılan ni asta kaynakları üzerindeki hidroliz yetene i

### 3.5. İnce Tabaka Kromatografisi ile Ni<sup>2+</sup> İstisna Parçalanma Ürünlerinin Belirlenmesi

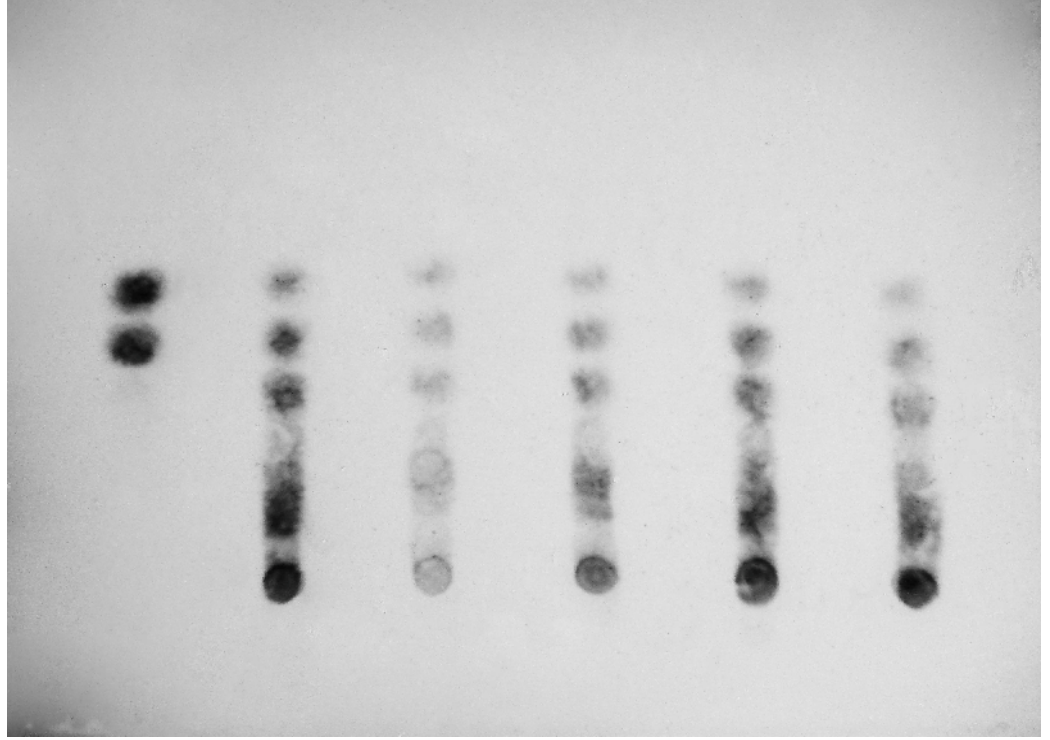
Çalış mada immobilize ve serbest  $\alpha$ -amilaz enziminin substrat parçalanma ürünlerini saptamak amacıyla kromatografi yönteminden faydalanılmıştır. Kromatografik yöntem için en fazla aktivitenin görüldüğü yüzdelerdeki ni<sup>2+</sup> istisna çözeltilerinden 5 ml alınmış ve dilüe edilmemi 0.5 ml serbest enzim çözeltisi ve 2 gr kapsül ekleindeki immobilize enzim ile karıştırıldıktan sonra 37<sup>0</sup>C'de 1 ve 5 saat sürelerle inkübe edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda silika jel plakası üzerinde ni<sup>2+</sup> istisna'nın hidrolizi sırasında oluşan ürünler kalitatif olarak belirlenmiştir.



ekil 3.16. immobilize  $\alpha$ -amilazın 1 (A) ve 5 (B) saatlik inkübasyonu sonunda ni  $\alpha$ -asta parçalanma ürünleri. 1-Standartlar (Glikoz ve Maltoz), 2-çözünür patates, 3-ticari patates, 4-ticari mısır, 5-ticari bu day, 6-ticari piriç



(A)



(B)

1

2

3

4

5

6

ekil 3.17. Serbest  $\alpha$ -amilazın 1 (A) ve 5 (B) saatlik inkübasyonu sonunda ni-asta parçalanma ürünleri. 1-Standartlar (Glikoz ve Maltoz), 2-çözünür patates, 3-ticari patates, 4-ticari mısır, 5-ticari buğday, 6-ticari pirinç

ekil 3.16'da görüldü ü gibi ni astaların immobilize enzim tarafından 1 saatlik hidrolizi sonucunda enzimin pirinç, bu day ve mısır ni astalarını çok az miktarda glukoz kadar parçaladı ı saptanırken (foto rafta görülmemi tir) çözünür ve ticari patates ni astaları varlı ında ise glukoz saptanmamı tır. 5 saatlik hidrolizleme sonucunda ise tüm ni astalar ba ta glukoz olmak üzere büyük oranda maltoza ve glukozu parçalanmı tır. Parçalanma ürünlerinden biri olan maltozdan ba ka iki ayrı ürünün daha olu tu u net bir ekilde görülmektedir ( ekil 3.16, 3.17).

Serbest enzimin ise tüm ni astaları 1. saatte daha az olmakla beraber 5. saatte daha fazla glukozu parçaladı ı belirlenmi tir. Ancak burada glukoz ve maltozdan ba ka, bir tane daha ürünün olu tu u net bir ekilde görülmü tür ( ekil 3.17).



#### 4. TARTI MA VE SONUÇ

Enzimler farklı endüstri dallarında yaygın olarak kullanılan biyolojik katalizörlerdir. Endüstriyel alanlarda kullanımlarının artmasıyla enzimlerin daha ekonomik ve kullanı lı hale getirmek için uygulanan yöntemlerden birisi de enzimlerin çözünmeyen ve destek görevi gören materyaller (matriksler) yardımıyla suda çözünmeyen hale getirilmeleri yani immobilize edilmeleridir. Enzim immobilizasyonu biyoteknolojinin önemli uygulamalarından biri haline gelmiştir (Smith 1996). Günümüzde çok sayıda enzim immobilize edilerek, endüstride kullanılmaktadır. Bunlar arasında en yaygın kullanılanları mikrobiyal kaynaklı -amilaz, glucoamilaz, glucoizomeraz, proteaz ve lipaz enzimleridir (Uhlig 1998). -amilaz enzimi gıda, ka t, tekstil ve farmakoloji endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Ohdan ve ark. 2000, Haq ve ark. 2003).

Yapılan çalı mada *B. amyloliquefaciens*'ten elde edilen -amilaz enzimi kalsiyum alginat kapsüllerinde immobilize edilmiştir. %2 alginat ve %5  $CaCl_2$  kullanılarak gerçekleştirilen immobilizasyon sonucunda verim %89 olarak tespit edilmiştir.

Ertan ve ark. (2007), *Aspergillus sclerotiorum*'dan -amilaz enzimi üreterek kalsiyum alginat kapsüllerinde tutuklamı larıdır. Optimum %3 alginat ve kalsiyum konsantrasyonlarını kullandıklarında verim %40 olarak elde edilmiştir.

Konsoula ve Kyriakides (2006), *Bacillus subtilis* kaynaklı termostabil -amilaz enzimini %2'lik sodyum alginat ve %5'lik  $CaCl_2$  varlı ında immobilize ederek, immobilizasyon ko ullarını ara tırmı larıdır.

Dey ve ark.(2003), *B. circulans* GRS 313'ten elde ettikleri amilaz enzimini %2  $CaCl_2$  ve %4 alginat varlı ında immobilize etmişler ve %75 verim sa lamı larıdır.

Kumar ve ark. (2006) *Aspergillus oryzae* -amilazını kalsiyum alginat kapsüllerinde tutuklamaları ve 6 kullanım sonunda aktivitenin %30'unu kayb ettiklerini rapor etmişlerdir. 3 kullanım sonunda 1 mm'den büyük kapsüller kullanıldığında aktivitenin %40'ının kaybolduğunu rapor etmişlerdir.

Lim ve ark. (2003) arpadan elde ettikleri -amilazı çapraz bağlanma metoduyla glutaraldehid kullanarak silika taneciklerinde immobilize ederek, enzimin endüstride kullanılabilirliğini araştırmışlardır.

-amilaz enziminin özellikle endüstride niasta kullanılan alanlarda fazla rabet görmesinden dolayı çalı şmada farklı niasta kaynakları kullanılarak serbest ve immobilize enzimlerin niastaları parçalama yetenekleri karşılaştırılmıştır. Yapılan deneylerde serbest ve immobilize enzimlerin niastaları genel olarak aynı tarzda hidroliz ettikleri saptanmıştır. Buna göre aktivitelere bakıldığında (Çizelge 3.1 ve 3.3) her iki enzimin ticari patates ve çözü nür patates niastalarını hemen hemen aynı tarzda parçaladıkları görü lmesine rağmen, bir sıralama yapılacak olursa immobilize enzimin sırasıyla ticari patates>çözü nür patates>tic. bu day>tic. mısır>tic. pirinç eklinde hidroliz ettikleri, serbest enzimin ise sırasıyla ticari patates>çözü nür patates>tic. mısır>tic. bu day>tic. pirinç eklinde parçaladığı görü lmü tür. Çizelge ve ekillerde de görü ldü ü gibi enzimlerin en iyi aktivite gösterdikleri niastaların % oranlarına bakıldığında ise her iki enzim için aynı sonuçlar elde edilmiştir. immobilize ve serbest enzimlerin çözü nür patates ve ticari bu dayın %5 konsantrasyonunda, ticari patates ve pirincin %4 konsantrasyonunda ve mısırın %2 konsantrasyonunda diğer oranlara nazaran en yüksek düzeyde parçalama gösterdikleri tespit edilmiştir. Ticari mısır niastası varlığında her iki enzimin de fazla bir aktivite göstermediği pirinçte ise oldukça düşük aktivitelerin olduğu saptanmıştır.

Serbest enzimin ticari pirincin %1 konsantrasyonunda aktivite saptanmaması, ancak %8 ve %10 konsantrasyonlar gibi yüksek konsantrasyonlarda parçalamanın az da olsa gerçekleştiği tespit edilmiştir. immobilize enzimin ise pirincin düşük konsantrasyonlarında oldukça iyi parçalama gösterdiği, ancak yüksek konsantrasyonlarda (%8 ve %10) parçalamanın olmadığı belirlenmiştir. Bu durum

Komolprasert ve Ofoli (1991) tarafından farklı bir şekilde ifade edilmiş, B. licheniformis serbest -amilaz enzimi kullanılarak yapılan ni astada hidrolizleme çalışmaları, ni astada konsantrasyonunun artmasının ni astada hidrolizini azalttığı, çünkü enzim molekülünün yüksek ni astada konsantrasyonunda hareketinin sınırlandırıldığı ifade edilmiştir. Yapılan çalışmada ise farklı bir sonuç elde edilmiş olup, %4 ve %5 ni astada konsantrasyonlarında maksimum aktiviteler saptanmıştır.

En yüksek aktivitenin görüldüğü ni astalar %100 kabul edilerek hesaplanan bağıl aktivitelere bakıldığında her iki enzimin ni astaları aynı tarzda hidroliz ettikleri ancak immobilize enzimin genel olarak tüm ni astaları serbest enzime kıyasla daha iyi parçaladıkları saptanmıştır. Bu durum immobilize enzim örneklerinde yüklenen enzim miktarının yüksek olmasıyla açıklanabilir. Ancak immobilize enzimin birden fazla kullanımı dikkate alındığında, immobilize enzimin serbest enzime nazaran ni astada parçalama endüstrisinde kullanılabilirliği düşünülmektedir. Dey ve ark. (2003) tarafından da bu durum rapor edilmiştir.

Yapılan bir çalışmada, kalsiyum alginat kapsüllerinde immobilize edilen *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC 23842 -amilaz enziminin ni astada hidrolizi üzerinde verimliliği rapor edilmiştir. Ticari patates ni astasının hidrolizinde görülen jelesyon ile ilgili problemlerin aklanmasında da önemli olduğu gözlemlenmiştir. *B. amyloliquefaciens* -amilazının patates, buğday ve pirinç ni astalarını hidrolizlediği rapor edilmiştir. Serbest enzim ticari patates ni astasını %85 oranında hidroliz etmiştir (Gangadharan ve ark. 2009).

Yapılan çalışmada immobilize enzimin ni astada kaynaklarını sırasıyla tic. patates>çözünür patates>tic. buğday>tic. mısır>tic. pirinç şeklinde hidroliz ettiği saptanmıştır. Buna karşın Rajagopalan ve Krishnan (2008) immobilize ve serbest -amilaz enzimi ile patates, pirinç, buğday ve mısır ile hidrolizleme çalışmaları yapmışlardır. Yaptıkları çalışmada serbest enzimin en iyi patates, pirinç ve buğday ni astalarını hidroliz ettiğini ancak çözünür ni astada ve mısır ni astasını %69 ve %64 olarak hidroliz ettiklerini göstermişlerdir. Serbest enzimin hidrolizleme derecesinin

immobilize enzime kıyasla %10-20 daha az oldu u saptanmı tır. Dolayısıyla bu durum enzimin 3 boyutlu yapısının substrata olan ilgisinden kaynaklanıyor olabilir. Çünkü di er ara tırmacılar tarafından da immobilize -amilazın farklı ekillerde substrat spesifitesi gösterdiklerini rapor edilmi tir. Konsoula ve Kyriakides (2006) immobilize -amilaz ile mısır ve pirinç ni astalarına kıyasla patates ni astası üzerinde maksimum hidroliz rapor etmi lerdir.

Ertan ve ark. (2007) *Aspergillus sclerotiorum* -amilazını kalsiyum alginat kapsüllerinde immobilize etmi ler ve bu day, pirinç ve çözünür patates ni astası üzerindeki hidrolizleme yetene ini zamana göre ara tırmı lardır. Ni asta kaynakları immobilize enzimle 10, 30, 60 ve 120 dakika muamele edilmi tir. Zamana göre farklı bir hidroliz düzeni görülmü tür. 10. ve 30. dk sonunda en iyi hidrolizin pirinç ni astasında, 60. dk'da bu day, 120. dk sonunda ise çözünür patates ni astasında oldu u belirlenmi tir.

Alüminyum oksit üzerine adsorbsiyon metoduyla immobilize edilen -amilaz enziminin dü ük moleköl a ırlı ina sahip ni astaların hidrolizini gerçekle tirdi i rapor edilmi tir (Reshmi ve ark. 2006).

mmobilizasyon, enzimin 3 boyutlu yapısını de i tirmekte olup, bunun da enzimin substrata olan ilgisini de i tirdi i ve böylece ürün spesifitesinin arttı ı rapor edilmi tir. (Ivanova ve Dobрева 1994).

Amilazların ni astaları hidroliz yeteneklerinin farklı olması ni astaların granül büyüklü ü, amiloz ve amilopektinin farklı oranları ile açıklanabilir olabilece i dü ünülmekte, ancak Kimura ve Robty (1995), granüldeki amiloz miktarının enzim tesir oranını etkilemedi ini rapor etmi lerdir. Bu konuda tam bir bilgi olmadı ından bu durum tam olarak açıklanamamı tır.

Ancak kullanılan su un farklı tipi ve farklı ni asta kaynakları ve ni astadaki amiloz-amilopektin oranı ve molekül a ırlıkları -amilaz enziminin ni asta substratlarını farklı parçalama yetenekleriyle açıklanabilece i de rapor edilmi tir (Marchal ve ark. 1999).

-amilazlar A, B ve C bölgeleri içeren çok bölgeli proteinlerdir (Juszczak 2003). Bazı amilazların ni asta ba lanma bölgesi (Starch binding domain) olarak adlandırılan bir bölge içerdikleri bilinmektedir (MacGregor ve ark. 2001). Fakat enzimin ni asta granülleri üzerindeki adsorbsiyon mekanizması hala net de ildir. Bazı çalı malar bunu enzimin C ba lanma bölgesiyle açıklamaktadır. Bu bölgenin ticari ni asta üzerinde çok etkin oldu u saptanmı tir (Dettori-Campus ve ark. 1992, Mikami ve ark. 1999). Bu konuda yeterli çalı malar bulunmadı ndan amiloz ve amilopektin oranının etkisi hakkında bir genelleme yapılmamı tir.

Serbest ve immobilize enzimlerin ni asta parçalanması üzerinde bazı faktörler etkili olmakta ve bunlar genel olarak sıcaklık, pH ve metal iyonlarıdır. Serbest ve immobilize enzimlerin yüksek aktivite gösterdikleri % ni asta oranları kullanılarak yapılan çalı mada immobilize enzimin maksimum aktiviteye çözünür patates ni astası varlı nda 60°C'de; ticari patates, pirinç ve bu day ni astaları varlı nda 50°C'de; ticari mısır ni astası varlı nda ise 55°C'de ula tı ı tespit edilmi tir. Serbest enzimin ise çözünür patates, ticari mısır ve bu day ni astaları varlı nda en yüksek aktiviteye 55°C'de, ticari patates ve pirinç ni astaları varlı nda ise 50°C'de ula tı ı saptanmı tir.

Farklı ara tırmacılar tarafından yapılan çalı malarda Bacillus türlerinin genellikle 40, 50 ve 55°C'de optimum aktivite gösterdikleri saptanmı tir (Manning ve Campbell 1961, Boyer ve Ingle 1972, Fogarty 1983, Jamuna ve ark. 1991).

Serbest enzimin yüksek sıcaklıklarda aktivitesini koruyamadı ı, özellikle 60°C'lik sıcaklıktan itibaren aktivitelerde önemli dü ü ler gösterdi i saptanmı tir. Bunun nedeninin immobilize edilen enzimin kapsül içinde korunmasından dolayı direkt olarak sıcaklıktan etkilenmedi i dü ünülmektedir. Chang ve ark. (1996)'nın bildirdi ine göre immobilize edilen enzimler pH, sıcaklık gibi çevre ko ullarına daha dayanıklı ve serbest

enzime nazaran daha kararlıdır. Di er ara tırmacılar da immobilize enzimin yüksek sıcaklıkta aktivite gösterdi ini rapor etmi lerdir. Bu ara tırmacılarından Roy ve Gupta (2004), *Bacillus acidopullulyticus*'tan elde edilen glikoamilaz ve pullulanaz enzimini kalsiyum alginat kapsüllerinde immobilize etmi ler ve immobilize enzimlerin serbest enzimlere kıyasla 45<sup>0</sup>C'de daha stabil olduklarını göstermi lerdir.

Di er yandan serbest enzimin *Halobacterium halobium* -amilaz enzimi kullanılarak yapılan bir çalı mada 60<sup>0</sup>C'de inaktive oldu u, ancak immobilize enzimin 65<sup>0</sup>C'ye kadar aktivitesini korudu u ve immobilize enzim aktivitesinin serbest enzime kıyasla çok daha iyi bir eilde oldu u ifade edilmi tir (Patel ve ark. 1996).

Dey ve ark. (2003), *Bacillus circulans* GRS 313'ten elde edilen -amilazı kalsiyum alginat kapsüllerinde immobilize etmi ler ve immobilizasyon sonucunda enzimin stabilitesinin 50<sup>0</sup>C'den 57<sup>0</sup>C'ye çıktığını rapor etmi lerdir.

Serbest enzime kıyasla immobilize enzim daha yüksek sıcaklıklarda daha yüksek aktivite göstermi tir (Gangadharan ve ark. 2009).

Kumar ve ark. (2006) *Aspergillus oryzae* -amilazını kalsiyum alginat kapsüllerinde tutuklamı lar ve immobilize enzimin serbest enzime kıyasla sıcaklık kar ısında daha stabil oldu u sonuna varmı lardır. Serbest enzim için optimum sıcaklık de eri 54<sup>0</sup>C iken, immobilize enzimde 60<sup>0</sup>C'ye yükseldi ini saptamı lardır.

mmobilize ve serbest enzimin katalitik aktiviteleri farklı sıcaklıklarda kar ıla tırılmı ve immobilize enzimin sıcaklı a serbest formlardan daha dayanıklı olması sebebiyle yüksek aktiviteye sahip oldu u rapor edilmi tir (Hasırcı ve ark 2006, Kahraman ve ark. 2007).

immobilize -amilaz enzimi 70 ve 80°C'lerde serbest enzime nazaran daha iyi bir aktivite göstermi tir. immobilize enzimlerin optimum sıcaklıklarında bir artış saptanmı tır (Sadhukhan ve ark. 1993, Yoshida ve ark. 1989).

Ni astası hidrolizini etkileyen önemli bir parametre pH'dır. pH'nın etkileri kontrol edildi inde ise immobilize enzimin çözünür ve ticari patates ni astası varlı ında pH 6.8'de, ticari pirinç varlı ında pH 6.4, ticari patates varlı ında 6.0 ve ticari mısır ni astası varlı ında 5.9'da maksimum aktivite elde edilmi tir. Di er yandan serbest enzimle yapılan çalı malarda ise ticari patates ni astası varlı ında pH 6.8, çözünür patates ve ticari bu day ni astaları varlı ında 6.4, ticari mısır ve pirinç varlı ında ise 6.0'da en yüksek aktivite saptanmı tır.

pH ile ilgili yapılan çalı malarda immobilize enzimin alkali pH'daki aktivitenin asidik pH'ya göre yüksek oldu u, buna kar ın serbest enzimin hem asidik, hem de alkali pH'da aktivitesini korudu u ancak pH 4.0'ta her iki enzimin aktivitesinin kayboldu u saptanmı tır. immobilize enzimin çözünür patates varlı ında pH 8.0'de aktivitesini maksimum aktiviteye göre %50'sini korudu u saptanmı tır. Ticari pirinç ni astası varlı ında ise serbest enzimin aktivitesinde kontrole göre %92'lik kayıp gözlenmi tir. Di er enzimlerde ise pH 8.0'de az da olsa aktivite göstermi tir.

Reshmi ve ark. (2006)'ya göre serbest ve immobilize -amilaz enzimi pH 6'da maksimum aktivite göstermi tir. Ve serbest enzime kıyasla immobilize enzim daha yüksek pH'larda daha yüksek stabilite sergilemi tir.

Tee ve Kaletunç (2009)'a göre serbest ve kovalent ba ılı -amilazın maksimum aktiviteleri pH 5.5 ve 6.0'da görülmü tür.

Bezbaruah ve ark. (1991) Bacillus su larının -amilaz enzimlerinin genellikle alkaliye toleranslı ve alkali pH'da daha stabil kaldı ını belirtmi lerdir.

Patel ve ark. (1996), *Halobacterium halobium*'dan elde ettikleri  $\alpha$ -amilaz enzimini kalsiyum alginatta immobilize etmişler ve bu immobilize enzimin serbest enzime nazaran pH, sıcaklık, saklama süresi deimleri açısından daha stabil olduğunu bildirmişlerdir. Serbest enzimin asidik pH'da inhibe olduğunu, immobilize enzimin ise %75-80 aktivitesini koruduğu ve alkali bölümde daha stabil kaldığını rapor etmişlerdir.

Kumar ve ark. (2006), *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -amilazını kalsiyum alginatta immobilize etmişler ve serbest enzimin 5.5-6.0 optimum pH'da aktif olduğunu, immobilize enzimin ise pH 6.0-6.5'da aktif olduğunu rapor etmişlerdir.

$\alpha$ -Amilaz bir metaloproteindir (Manning ve Campbell 1961). Metal iyonları ile yapılan çalı mada,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuCl}_2$  ve  $\text{LiSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  metallerinin pH 5.9 ve 37°C sıcaklıkta immobilize ve serbest enzim aktivitesi üzerine etkileri ve bunun ni asta hidrolizini ne ekilde etkiledi i ara tırılmıştır.

Metal iyonları içerisinde  $\text{Mg}^{+2}$ 'un genel olarak her iki enzimin aktivitesi üzerinde stimülatör etki gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Li}^{+2}$ ,  $\text{Ba}^{+2}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  iyonlarının serbest enzim üzerinde aktive edici etki gösterirken, immobilize enzim kullanılan metal iyonları varlığında kayda değer bir aktivite artışı göstermemiştir. Diğer yandan özellikle  $\text{Cu}^{+2}$  iyonu tüm ni asta kaynakları ortamında güçlü inhibitör etki göstermiştir. Diğer yandan serbest enzimle yapılan çalı malar sonucunda aktivitede artışları saptanmıştır, özellikle çözümlü patates ortamında  $\text{Li}^{+2}$  bulunduğunda kontrole göre %31'lik, pirinç ni astası ortamında  $\text{Mg}^{+2}$  %24'lük ve bu day ni astası ortamında  $\text{Mg}^{+2}$  varlığında %21'lik bir artış görülmüştür.  $\text{Ca}^{+2}$  varlığında serbest enzim aktivite gösterirken immobilize enzimin aktivitesinin azaldığı tespit edilmiştir ( ekil 3.14, 3.15).

Çe itli metal iyonlarının farklı *Bacillus* türlerinden elde edilen  $\alpha$ -amilaz enzimi üzerine de i ik etkide buldukları belirtilmektedir. Bunlardan Srivastava (1987) *B. stearothermophilus*'tan elde edilen  $\alpha$ -amilaz enzimi üzerine  $\text{Ca}^{+2}$  ve  $\text{Ba}^{+2}$ 'nin stimülatör etki yaptığını halde,  $\text{Ag}^{+2}$  ve  $\text{Fe}^{+2}$ 'in çok kuvvetli bir inhibitör etkisi olduğunu saptamıştır. Buna kar ın Krishnan ve Chandra (1983) ise *B. licheniformis*'in bir su undan elde



ettikleri  $\alpha$ -amilaz üzerine  $\text{Ca}^{+2}$  ve  $\text{Mg}^{+2}$  'un aktivator etki yaptığını ancak,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$  ve  $\text{Mn}^{+2}$  ile  $\text{Ag}^{+2}$  ve  $\text{Cu}^{+2}$  'nın enzim aktivitesini önemli bir ölçüde azalttığını belirtmişlerdir. Kanno (1986) ise *B. acidocaldarius*  $\alpha$ -amilaz üzerine  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$  ve  $\text{Cu}^{+2}$  'ın inhibitör etkisinin olduğunu belirtmiştir. Manning ve Campbell (1961) ile Deshpande ve Cheryan (1984) metaller içerisinde özellikle  $\text{Ca}^{+2}$  'un  $\alpha$ -amilaz tarafından ni astanın hidrolizi için gerekli bir metal iyonu olduğunu ifade etmektedirler.

Dey ve ark. (2003)'ünün yaptıkları çalışmada  $\text{Mg}^{+2}$  ve  $\text{Co}^{+2}$  iyonlarının immobilize  $\alpha$ -amilazın aktivitesini arttırdığı görülmüşken,  $\text{Hg}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  ve  $\text{Fe}^{+2}$  metal iyonlarının inhibe edici etki gösterdiği belirlenmiştir.  $\text{Hg}^{+2}$  en düşük konsantrasyonda kullanılmasına rağmen yüksek bir inhibisyona yol açarak yalnızca %27'lik bir aktivite görülmesine neden olmuştur.

Diğer yandan  $\alpha$ -amilaz enziminin 5mM  $\text{CaCl}_2$  varlığında aktivitesinin arttığı ifade edilmiştir (Gangadharan ve ark. 2009).

$\text{Ca}^{+2}$  iyonlarının  $\alpha$ -amilaza bağlanmasının enzimin aktivitesi ve stabilitesini sağlamada önemli rol oynadığı rapor edilmiştir (Haq 2003, Tanaka ve Hoshino 2002). Ancak yaptığımız çalışmada  $\text{Mg}^{+2}$  iyonunun enzim üzerinde etkili olduğunu saptanmıştır.

El-Banna ve ark. (2007), *B. subtilis*  $\alpha$ -amilazını kalsiyum alginatta immobilize etmişlerdir. Çeşitli metal iyonlarının aktivite üzerindeki etkilerini araştırmışlardır.  $\text{Na}^{+2}$  ve  $\text{Ca}^{+2}$  iyonlarını hem serbest, hem de immobilize enzim için son derece aktive edici bulmuşlardır.  $\text{Co}^{+2}$  ve  $\text{Ni}^{+2}$  iyonlarının ise inhibe edici etki gösterdiklerini tespit etmişlerdir.

$\alpha$ -amilaz enziminin aktivitesini etkileyen faktörler araştırmacılar tarafından da farklı olarak değerlendirilmekte ve kullanılan enzimin kaynağına bağlı olarak değerlendirilmektedir.

-amilaz enziminin substrat parçalamaya ürünleri ba ta gıda olmak üzere farklı alanlarda kullanıldı ndan, ortaya çıkan son ürünlerin bilinmesi oldukça önemlidir. Bu yüzden *B. amyloliquefaciens* -amilaz enziminin immobilize ve serbest formları farklı ni astalara maruz bırakılarak (1 ve 5 saat) hidrolizleme sonucu ortaya çıkan son ürünler TLC ile tespit edilmiştir ( ekil 3.16, 3.17).

Ni astaların immobilize enzim tarafından 1 saatlik hidrolizi sonucunda enzimin pirinç, buğday ve mısır ni astalarını çok az miktarda glukoz kadar parçaladığı saptanırken (foto rafta görülmemektedir), çözümlü ve ham patates ni astalarının ise glukoz kadar parçalanmadığı görülmüştür. 5 saatlik hidrolizleme sonucunda ise tüm ni astalar ba ta büyük oranda maltoz olmak üzere maltoz ve glukoz parçalanmıştır ( $G_2 > G_1$ ). Parçalanma ürünlerinden biri olan maltozdan ba ka iki ayrı ürünün daha olabileceği net bir şekilde görülmektedir ( ekil 3.16).

Serbest enzim ise tüm ni astaları 1. saatte daha az olmakla beraber 5. saatte daha fazla glukoz parçaladıkları belirlenmiştir. Burada da en fazla parçalanma ürünü maltoz olarak gözlemlenmiştir ( $G_2 > G_1$ ). Ancak burada glukoz ( $G_1$ ) ve maltozdan ( $G_2$ ) ba ka bir tane daha ürünün olabileceği net bir şekilde görülmüştür ( ekil 3.17). Net olarak parçalandığı tespit edilen ürünle ilgili standart maddeler bulunmadığı için kesin tanımlar yapılmamıştır. Buna karşın, Demirkan ve ark. (2005)'e göre bu ürünlerin maltotrioz ( $G_3$ ) ve maltotetroz ( $G_4$ ) oldukları anlaşılmaktadır.

Yaptığımız 5 saatlik hidrolizleme sonucunda tüm ni astaların immobilize enzim tarafından hidrolizi sonucu ortaya çıkan son ürünler sırasıyla  $G_2 = G_3 > G_1 > G_4$  olarak, serbest enzim tarafından ise  $G_2 = G_3 > G_1$  olarak tespit edilmiştir ( ekil 3.16 ve 3.17).

Çeşitli ara tırmacılar tarafından da farklı *Bacillus* suşlarında elde edilen -amilaz enzimlerinin substrat hidroliz ürünleri belirlenmiştir. Bunlardan Kanno (1986), *B. acidocaldarius* -amilaz enzim ile yaptığı çalışmada hidroliz ürünleri olarak glukoz ( $G_1$ ), maltoz ( $G_2$ ), maltotrioz ( $G_3$ ), maltotetroz ( $G_4$ ) ve maltopentoz ( $G_5$ ) olduğunu

saptamı tır. Srivastava (1987) da aynı sonuçları *B. stearothermophilus* -amilaz enzimi ile elde etmi tır.

Ni astanın glukoz ve maltoza hidrolizi için immobilize -amilaz enzimi kullanılmı tır (Klibanov 1983, Reshmi ve ark. 2007).

mmobilize bakteriyal -amilaz enziminin ni asta hidrolizlemesi konusunda çalı malar yapılmı ve yapılan hidrolizleme i lemi sonucunda farklı, heterojen ürünlerin ortaya çıktığı saptanmı tır (Kvesitadze ve Dvali 1982, Tarhan 1989, Tumturk ve ark. 2000, Shewale ve Pandit 2007).

Dey ve ark. (2003), *Bacillus circulans* GRS 313'ten elde edilen -amilazı kalsiyum alginat kapsüllerinde immobilize etmi ler ve çe itli ni asta kaynaklarının hidrolizi ile maltooligosakkaritlerin yanında glukozun da açığı çıktığını rapor etmi ler ve bunun glukoz urubu üretimi açısından olumlu oldu unu belirtmi lerdir.

*Bacillus subtilis* KCC103 -amilazının çözünür ni astayı maltooligosakkaritlere parçaladığı gösterilmı tır (Dillirani ve ark. 2006).

Çalı maların ço u bulunan sonuca uygun olarak ni astanın glukoz ve maltoza dönü tü ünü göstermi tır (Dey ve ark. 2003, Park ve ark. 2005).

Shewale ve Pandit (2007) immobilize *B. licheniformis* -amilazının çözünür ni astayı hidroliz zamanının artmasıyla G1, G2, G3, G4 ve G5'e hidroliz ettiklerini saptamı tır. Ana ürün olarak G5 ve G3'te gözlemlenmi lerdir. mmobilize -amilazın ni asta hidrolizi sonucu olu an sakkarid kompozisyonu serbest enziminkinden farklı bulunmu tur. Serbest enzimin ni astayı hidrolizlemesi sonucunda maltotrioz, maltopentoz ve maltoheksoz açığı çıkarken, immobilize enzimin hidrolizlemesiyle maltotrioz ve maltopentozun açığı çıktığı tespit edilmi tır.

Rajagopalan ve Krishnan (2008), B. subtilis KCC103 -amilazını kalsiyum alginatla immobilize ederek yaptıkları çalı mada 7 saatlik bir reaksiyon sonucunda serbest ve immobilize enzimler kullanılarak çe itli ni astalardan maltooligosakkaritler elde etmi lerdir. Serbest ve immobilize enzim çözünmü ni astayı glukozdan, maltoheptoz (G1-G7)'a kadar parçalamı lardır. Ancak serbest enzimle elde edilen ürünler sırasıyla G3>G2>G4>G5 eklinde artmakta oldu u rapor edilirken, immobilize -amilaz varlı nda ise glukozun çok dü ük miktarlarda oldu u ve olu an ürünlerin sırasıyla G2>G3>G4>G5 oldu u tespit edilmi tir. Aynı bilim adamları patates ni astası kullandıklarında serbest enzimlerin maltoheptoz olu turdu u, immobilize enzimle yapılan çalı mada ise böyle bir ürün olu madı ı görülmü tür. Pirinç, bu day ve mısır ni astalarından olu an ürün da ılımının (G1-G3) çözünür ve ticari patates ni astalarından (G1-G5) farklı oldu unu gözlemlenmiştir.

Ortaya çıkan son ürünler de glukoz ve maltoz eker gruplarının elde edilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Messouad ve ark. 2003, Anonymous 1988).

Enzimlerin endüstriyel alanlarda kullanımının gittikçe artması, elde edilecek verimlili in de arttırılması ihtiyacını do urmaktadır. Bu nedenle enzimler immobilize edilerek ve çe itli ilave tekniklerle kullanılabilirlikleri arttırılabilir. mmobilizasyon devamlı ve tekrarlı bir teknik olarak endüstriyel uygulamalarda kullanılabilir ve reaksiyon ortamından ayrılabilmesiyle ekonomik öneminin büyüklü ü göz önüne alınmalıdır. -amilaz enziminin immobilizasyonu ile ilgili yapılan çalı malar arttıkça ticari önemleri daha iyi anlaşı lıp, kullanım alanları da geni lemektedir ve endüstriyel alanlarda da bu konuya olan ilgi artmaktadır. Endüstrinin hemen her dalında kullanılan enzimlerin, özellikle -amilaz enziminin dı ÷lkelerden satın alınması yerine ülkemizde enzim üretimiyle ilgili sanayi alanlarının olu turulması ve ÷lke ekonomisine katkıda bulunulması gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

ANONYMOUS, 1988. Handbook of Amylases and Related Enzymes. Edited by the Amylase Research Society of Japan, Pergamon Press Oxford.

ASGHER, M., J.M. ASAD, S.U. RAHMAN, R.L. LEGGE. 2007. A thermostable  $\alpha$ -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. Journal of food engineering. 79 (3) 950-955.

BAHAR, T., S.S. ÇELEBİ . 1998. Characterization of glucoamylase immobilized on magnetic poly(styrene) particles, Enzyme & Microb. Technol. 23:301-304.

BAILEY, J.E. and OLLIS, D.F. 1977. Biochemical Engineering Fundamentals: International Student Edition, Chapter 1. 7:39-50.

BANWART, G.J. 1983. Basic Food Microbiology. Avi. Publishing company Inc. Westport-connecticut. 72-74 p.

BERNFELD, P. 1951. Enzymes of Starch Degradation and Synthesis Adv. in Enzymology. XII:379-428.

BEZBARUAH, R.L., R.K. GOGOI, K.R. PILLAI and J.N. NIGAM. 1991. Amylase production by tree *Bacillus* strains active at alkaline pH. J. Basic Microbiol. 31(1):13-20.

BICKERSTAFF, G.F. 1997. Immobilisation of Enzymes and Cells, Methods in Biotechnology. Published by Humana Press, 1, New York and London. 61 p.

BİLGEHAN, H. 1987. Klinik Mikrobiyoloji. Barış Yayınevi. Bornova- zmir. 331 p.

BLADINO, A., M. MACIAS and D. CANTERO. 2001. Immobilization of glucose oxidase with calcium alginate gel capsules, Process Biochem. 36:601-606.

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

BORGIA, P.T. and L.L. CAMPBELL. 1978.  $\alpha$ -amylase from five strains of *Bacillus amyloliquefaciens*: Evidence for identical Primary structures. *J. Bacteriol.* 134 (2) 389-393.

BOYER E.W. and INGLE, M.B. 1972. Extracellular alkaline amylase from *Bacillus* species. *J. Bacteriol.* 110(3):992-1000.

BRUINENBERG, P.M., A.C. HULST, A. FABER, R.H. VOOGD. 1996. A process for surface sizing or coating of paper. European Patent Application EP 0,690,170 A1.

BUONOCORE, V., C. CAPORALE, M.D. ROSA, and A. GAMBACORTA. 1976. Stable, inducible thermoacidophilic  $\alpha$ -amylase from *Bacillus acidocaldarius*. *J. Bacteriol.* 128 (2) 515–521.

BURHAN, A., U. N SA, C. GOEKHAN, C. OEMER, A. ASHABIL, G. OSMAN. 2003. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. *Process Biochemistry (Process Biochem.)*. 38 (10) 1397-1403.

CHIBATA, I. 1980. "in Food Process Engineering (eds Linko, P. and Larinkari, J.)", Applied Science Publishers, London. 2:1-19.

CHANG, H.N., G.H. SEONG, I.K. YOO, J.K. PARK and J.H. SEO. 1996. Microencapsulation of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* cells with invertase activity in liquidcore alginate capsules. *Biotechnol. Bioeng.* 51:157–162.

CHEETHAM, P.S.J., K.W. BLUNT and C. BUCKE. 1979. physical studies on cell immobilization using calcium alginate gels. *Biotech. Bioeng.* 21:2155-2168.

COLEMAN, G. and ELLIOTT, W.H. 1962. Studies on  $\alpha$ -amylase formation by *Bacillus subtilis*. *Biochem. J.* 83:256-263.

COLTON, C.K. 1996. Trends Biotechnol. "in Molecular Biology and Biotechnology Fourth Edition, Eds John M. Walker and Ralph Rapley", The Royal Society of Chemistry, Cambridge. 454 p.

CRABB, W.D. and C. MITCHINSON. 1997. Enzymes involved in the processing of starch to sugars, *Tibtech.* 15:349-352.

ÇA ATAY, M. 1976. Bitki Biyokimyası. A.Ü. Ziraat Fak. Yayınları (A.Ü. Basımevi), sayfa: 98-109.

DECLERCK, N., M. MACHIUS, G. WIEGAND, R. HUBER, C. GAILLARDIN. 2000. Probing structural determinants specifying high thermostability in *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase. *J. Mol. Biol.* 31:1041-1057.

DEM RKAN, E.S., B. MIKAMI, M. ADACHI, T. HIGASA and S. UTSUMI. 2005.  $\alpha$ -Amylase from *B. amyloliquefaciens*: purification, characterization, raw starch degradation and expression in *E. coli*. *Process Biochemistry.* 40:2629-2636.

DESHPANDE, S.S. and M. CHERYAN. 1984. Effects of phytic acid, divalent cations and their interactions on  $\alpha$ -amylase activity. *J. Food Science.* 49:516-519.

DETTORI-CAMPUS, B.G., F.G. PRIEST and J.R. STARK. 1992. Hydrolysis of starch granules by the amylase from *B. stearothermophilus* NCA. *Process Biochem.*, 27:17-21.

DEY, G., B. SINGH and R. BANERJEE. 2003. Immobilization of  $\alpha$ -Amylase Produced by *Bacillus circulans* GRS 313. *Brazilian Archives of Biology and Technology.* 46(2):167-176.

DILLIRANI, N., R. GOBINATH and K. CHANDRARAJ. 2006. Purification and characterization of a maltooligosaccharide-forming  $\alpha$ -amylase from a new *Bacillus subtilis* KCC103. *Appl Microbiol Biotechnol.* 73:591-597.

D R L, N. 1984. Alfa-amilaz enzimi üzerinde mutajenlerin etkileri. H.Ü. Biyoloji Bölümü, Doktora Tezi.

EK , A. 1988. Meyve Suyu Durultma Tekni i. Gıda Teknolojisi Derne i, Ankara. Yayın No:9, 127 s.

EL-BANNA, E.T., A.A. AHMED, I.A. MOHAMED and I.I. IBRAHIM. 2007. Production and Immobilization of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis*. *Pakistan Journal of Biological Sciences.* 10(12):2039-2047.

ERTAN, F., H. YAGAR, B. BALKAN. 2007. Optimization of  $\alpha$ -Amylase Immobilization in Calcium Alginate Beads. *Preparative Biochemistry and Biotechnology,* 37(3):195-204.

FOGARTY, W.M. 1983. *Microbial enzymes and Biotechnology.* Chapter 1: Microbial amylases. Applied Science Publisher. 1-92 p.

FRASER, J.E. and G.F. BICKERSTAFF. 1997. in Immobilization of Enzymes and Cells, ed. G. F. Bickerstaff, Humana Press, New Jersey. 61-66 p.

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

GANGADHARAN, D., K.M. NAMPOOTHIRI, S. SIVARAMAKRISHNAN and A. PANDEY. 2009. Immobilized bacterial  $\alpha$ -amylase for effective hydrolysis of raw and soluble starch. Food Research International. 42(4):436-442.

GEMEINER, P. 1992. in Enzyme Engineering, ed. P. Gemeiner, Ellis Horwood, New York. 13-119 p.

GOMBOTZ, W.R. and S.F. WEE. 1998. Protein release from alginate matrices, Adv Drug Deliv Rev. 31:267-285.

GÖZÜKARA, E.M. 2001. B YOK MYA. Nobel Tıp Kitabevleri, 1,4, Türkiye. 225-227 s.

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

GUPTA, R., P. GIGRAS, H. MOHAPATRA, V. K. GOSWAMI, B. CHAUHAN. 2003. Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. Process Biochemistry 00:1-18.

GÜRGÜN, V. 1974. Untersuchungen über den anaeroben Dunkel Stoff weehsel einiger arten der phototrophen purpur bacterien. Doktora Tezi., Göttingen.

HAS RC , N., S. AKSOY and H. TUMTURK. 2006. Activation of poly(dimer acid-co-alkyl polyamine) particles for covalent immobilization of  $\alpha$ -amylase, Reactive and Functional Polymers 66:1546–1551.

HAQ, I., H. ASHRAF, M.A. QADEER and J. IQBAL. 2003. Production of alpha amylase by *Bacillus licheniformis* using an economical medium. Bioresource Technology. 87(1):57-61.



HENDRIKSEN, H.V., S. PEDERSEN, H.B. Frantzen. 1999. A process for textile warp sizing using enzymatically modified starches. Patent Application WO 99/35325.

HENRISSAT, B. 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280:309-316.

HENRISSAT, B. and A. BAIROCH. 1996. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* 316:695-696.

HIDAKA, H. and ADACHI, T. 1980. Mechanism of sacharide polymerization and depolymerization (J.J. Marshall, ed). Academic Pres., New York. 101 p.

HOLT, J.G., N.R. KRIEG, P.H.A. SNEATH, J.T. STALEY and S.T. WILLIAMS. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* Ninth Edition. 559 p.

HOOVER, R. 2001. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review, *Carbohydrate Polymer.* 45:253-267.

IVANOVA, V.N., E.P. DOBREVA, E.I. EMANUILOVA. 1993. Purification and characterization of a thermostable alpha-amylase from *Bacillus licheniformis*. *Journal of biotechnology.* 28(2-3):277-289.

IVANOVA, V., E. DOBREVA. 1994. Catalytic properties of immobilized purified thermostable -amylase from *bacillus licheniformis* 44MB82-A. *Process Biochem.* 29:607-612.

JAMUNA, R., BINDU, C. and RAMAKRISHNA, S.V. 1991. Synthesis of thermostable -amylase by *Bacilus* Isolate R-8. *Starch/Stärke* 43(1):28-32.

JANKOWSKI, T.T., M. ZIELINSKA and A. WYSAKOWSKA. 1997. Encapsulation of lactic acid bacteria with alginate/starch capsules. *Biotechnol. Tech.* 11:31-34.

JENSEN, B., J. OLSEN and K. ALLERMANN. 1988. Purification of extracellular amylolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Can. J. Microbiol.* 34:218-223.

JUSZCZAK, L., T. FORTUNA and F. KROK. 2003. Non-contact atomic force microscopy of starch granules surface: Part I. Potato and tapioca starches, *Starch/Stärke.* 55:1-7.

KAHRAMAN, M.V., G. BAYRAMOGLU, N. KAYAMAN-APOHAN and A. GUNGOR. 2007. UV-curable methacrylated/fumaric acid modified epoxy as a potential support for enzyme immobilization, *Reactive and Functional Polymers*. 67:97-103.

KANNO, M. 1986. A *Bacillus acidocaldarius*  $\alpha$ -amylase that is highly stable to heat under acidic conditions. *Agric. Biol. Chem.* 50 (1) 23-31.

KESK N, H. 1982. *Besin Kimyası. Cilt II. Fatih yayınevi, İstanbul.* 558 s.

KIMURA, A. and J.F. ROBTY. 1995. Reaction of enzymes with starch granules: kinetics and products of the reaction with glucoamylase. *Carbohydr. Res.* 227:87-107.

KINDLE, K.L. 1983. Characterization and Production of thermostable  $\alpha$ -amylase. *Appl. Biochem. Biotech.* 18:153-170.

KLIBANOV, A. 1983. Immobilized enzymes and cells as practical catalysts. *Science.* 219:722-727.

KOIVULA, T.T., H. HEMILA, R. PAKKANEN, M. SIBAKOV and I. PALVA. 1993. Cloning and Sequencing of a gene encoding acidophilic amylase from *Bacillus acidocaldarius*. *J. Gen. Microbiol.*, 139:2399-2407.

KOMOLPRASERT, V., R.Y. OFOLI. 1991. Starch hydrolysis kinetics of *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* 51:209-223.

KONSOULA, Z., M.L. KYRIAKIDES. 2006. Starch hydrolysis by the action of an entrapped in alginate capsules  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis*. *Process biochemistry.* 41(2):343-349.

KRISHNAN, T. and A.K. CHANDRA. 1983. Purification and Characterization of  $\alpha$ -Amylase from *Bacillus licheniformis* CUM 305. *Appl. Envir. Microbiol.* 46(2):430-437.

KVESITADZE, G.I., M. DVALI. 1982. Immobilization of mold and bacterial amylases on silica carriers. *Biotechnol. Bioeng.* 14:1765-1772.

KUMAR, R.S.S., K.S. VISHWANATH, S.A. SINGH, A.G.A. RAO. 2006. Entrapment of  $\alpha$ -amylase in alginate beads: Single step protocol for purification and thermal stabilization. *Process Biochemistry.* 41:2282–2288.

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

LI, J-Y. and A-I. YEH. 2001. Relationships between thermal, rheological characteristics and swelling power for various starches, *J. Food Engineering*. 50:41-148.

LIM, L.H., D.G. MACDONALD and G.A. HILL. 2003. Hydrolysis of starch particles using immobilized barley  $\alpha$ -amylase. *Biochemical Engineering Journal*. 13 (1) 53-62.

LONGO, M.A., I.S. NOVELLA, L.A. GARCIA and M. DIAZ, (1992). Diffusion of proteases individually in calcium alginate beads, *Enzyme Microb Technol*. 14:586-590.

LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.C. FORR and R.J. RONDALL. 1951. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275.

MACGREGOR, E.A., S. JANE EK and B. SVENSSON. 2001. Relationship of sequence and structure to specificity in the  $\alpha$ -amylase family of enzymes. *Biochem. Biophys. Acta*. 1546:1-20.

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

MADIGAN, M.T. and J.M. MARTINKO. 2006. *Biology of Microorganisms Eleventh Edition*, Prentice Hall. 956 p.

MAHLER, H.R. and CORDES, E.H. 1966. *Biological Chemistry. The mechanism of enzyme action*. Dept. of Chemistry. Indiana Univ. 279 p.

MANNING, G.B. and CAMPBELL, L.L. 1961. Thermostable  $\alpha$ -amylase of *Bacillus stearothermophilus*. *J. Biol. Chem*. 236 (11) 2952-2957.

MARSHAL, L.M., J. JONKERS, G.Th. FRANKE and J. TRAMPER. 1999. The effect of process conditions on the hydrolysis of amylopectin potato starch: an experimental design approach, *Biotechnol Bioeng*. 62:348-357.

MATSUZAKI, H., K. YAMANE, K. YAMAGUCHI, K. NAGATA and B. MAROU. 1974. Hybrid  $\alpha$ -amylases produced by transformants of *Bacillus subtilis*. I Purification and Characterization of extracellular  $\alpha$ -amylases produced by the parental strains and transformants: *Biochim. Biophys. Acta*. 365:235-247.

MEER, J.L. 1972. The regulation of  $\alpha$ -amylase production in *Bacillus licheniformis*. *Antonie van Leeuwenhoek: J. Microb. Serol.* 38:570-585.

MESSAOUD, E.B., M.B. AL , N. ELLEUCH, N.F. MASMOUDI and S. BEJAR. 2003. Purification and properties of a maltoheptaose- and maltohexaose-forming amylase produced by *Bacillus subtilis* US 116. *Enzyme and microbial technology.* 34 (7) 662-666.

MIKAMI, B., E.J. HEHRE, M. SATO, Y. KATSUBE, M. HIROSE, Y. MORITA and J.C. SACCHETTINI. 1993. The 2.0 Å resolution structure of soybean  $\alpha$ -amylase complexed with  $\alpha$ -cyclodextrin. *Biochemistry.* 32:6832-6845.

MIKAMI, B., M. ADACHI, T. KAGE, E. SARIKAYA, T. NANMORI, R. SHINKE, and S. UTSUMI. 1999. Structure of raw-starch digesting *Bacillus cereus*  $\alpha$ -amylase complexed with maltose. *Biochemistry.*, 38(22):7050-7061.

NAGEL, B., H. DELLWEG and L.M. GIERASCH. 1992. Glossary For Chemists of Terms Used In Biotechnology. *Pure & Appl. Chem.* 64 (1) 143-168.

NIGAM, P. and D. SINGH. 1995. Enzyme and microbial systems involved in starch processing. *Enzyme Microb. Technol.* 17:770-778.

OGASAHARA, K., A. IMANISHI and T. ISEMURA. 1970. Studies on thermophilic  $\alpha$ -amylase from *Bacillus stearothermophilus*. I. Some general and physicochemical properties of thermophilic  $\alpha$ -amylase., *J. Biochem.* 67:65-75.

OHDAN, K., T. KURIKI, H. TAKATA, H. KANEKO and S. OKADA. 2000. Introduction of raw starch-binding domains into *Bacillus subtilis*  $\alpha$ -amylase by fusion with the starch-binding domain of *Bacillus cyclomaltodextrin* glucanotransferase. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(7):3058-3064.

OTTRUP, H., S. T. JORGENSEN. 2002. The importance of *Bacillus* species in the production of industrial enzymes. In: Berkley, R. (Ed.), *Applications and Systems of Bacillus and Relatives*. Blackwell Science, Malden, Mass. 206-208 p.

OUWERX, C., N. VELINGS, M.M. MESTDAGH, M.A.V. AXELOS. 1998. Physico-chemical properties and rheology of alginate gel beads formed with various divalent cations. *Polymer Gels and Networks.* 6:393-408.

ÖZER, K. 2003. *Ekme e dair. Tüketiciler Birli i Basını.*

PANDEY, A., P. NIGAM, C.R. SOCCOL, V.T. SOCCOL, D. SINGH, R. MOHAN. 2000. Advances in microbial amylases, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31:135-152.

PARK, D., S. HAAM, K. JANG, I.S. AHN and W.S. KIM. 2005. Immobilization of starch-converting enzymes on surface-modified carriers using single and co-immobilized systems: properties and application to starch hydrolysis. *Process Biochem.* 40:53-61.

PATEL, S., R. BAGAI, and D. Madamwar. 1996. Stabilization of a Halophilic  $\alpha$ -Amylase by Calcium Alginate Immobilization, *Biocatalysis and Biotransformation.* 14(2):147-155.

PAZUR, H.H. 1965. *Starch chemistry and technology*, Academic Pres, New York. p: 133.

PIGGOTT, R., A. ROSSITER, A.S. ORTLEPP, T.J. PEMBROKE, J.F. OLLINGTON. 1984. Cloning in *Bacillus subtilis* of an extremely thermostable  $\alpha$ -amylase: Comparison with other cloned heatstable  $\alpha$ -amylase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 122(1):175-183.

POLAINA, J. and A.P. MACCABE. 2007. *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications*. Springer, Netherlands.

PONCELET, A.D., V. BABAK, C. DULIEU and A. PICOT. 1999. Physico-chemical approach to production of alginate beads by emulsification-internal ionotropic gelation *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 155, 2-3:171-176.

PONYATOVSKY, E.G., V.V. SINITSYN and T.A. POZDNYAKOVA. 1998. The metastable T-P phase diagram and anomalous thermodynamic properties of supercooled water. *J. Chem. Phys.* 109:2413-2421.

PRIEST, F.G. 1977. Extracellular Enzyme Synthesis in the Genus *Bacillus*. *Bacteriol. Rev.* 41(3)711-753.

PRIEST, F.G., M. GOODFELLOW, L.A. SHUTE and R.C.W. BERKELEY. 1987. *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov., nom. rev. *int. J. Syst. Bacteriol.* 37:69-71.

RADLEY, J.A. 1976. *Production of Microbial Amylolytic Enzymes: Starch Production Technology* (L.A. Underkofler Edt). Applied Science Publisher Ld., England. Chapter 16:295-309 p.

RAHMAN, M.B.A., S. MD-TAJUDIN, M.Z. HUSSEIN, R.N.Z. RAHMAN, A.B. SALLEH and M. BASRI. 2005. Application of natural kaolin as support for the immobilization of lipase from *Candida rigosa* as biocatalyst for effective esterification. *Appl. Clay Sci.* 29:111-116.

RAJAGOPALAN, G. and C. KRISHNAN. 2008. Immobilization of malto-Oligosaccharide forming  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* KCC103: properties and application in starch hydrolysis, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* 83:1511-1517.

RAO, M., A. TANKASALE, M. GHATGE, V. DESPHANDE. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:597-634.

RAY, R.C., S. KAR, S. NAYAK, M.R. SWAIN. 2008. Extracellular  $\alpha$ -Amylase Production by *Bacillus brevis* MTCC 7521. *Food Biotechnology.* 22 (3) 234-246.

RESHMI, R., G. SANJAY, S. SUGUNAN. 2006. Enhanced activity and stability of  $\alpha$ -amylase immobilized on alumina. *Catalysis Communications.* 7:460-465.

ROBTY, J.F. and B.J. WHITE. 1987. *Biochemical Techniques. Theory and Practice*, Chapter 4, Chromatic Techniques, Brooks/Cole Publishing Company, California. 87 p.

ROY, I. M.N. GUPTA. 2004. Hydrolysis of starch by a mixture of glucoamylase and pullulanase entrapped individually in calcium alginate beads, *Enzyme and Microbial Technology.* 34:26-32.

SADHUKHAN, R., S.K. RAY and S.L. CHAKRABARTY. 1993. Immobilization of  $\alpha$ -amylase from *Myceliophthora thermophila* D-14 (ATCC48104). *Enzyme Mikrobiol. Technol.* 15:801-804.

SAITO, N. 1973. A thermophilic extracellular  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis*. *Arc. Biochem. Biophys.* 155:290-298.

SAJEDI, R.H. H. NADERI-MANESH, K. KHAJEH, R. AHMADVAND, B. RANJBAR, A. ASOODEH, F. MORADIAN. 2005. A Ca-independent  $\alpha$ -amylase that is active and stable at low pH from the *Bacillus* sp. KR-8104. *Enzyme and Microb. Technol.* 36:666-671.

SARIKAYA, S. 1995. Alfa Amilaz Üreten Bazı *Bacillus* Su larının Geli me Parametreleri, Enzim Özellik ve Üretim Ko ullarının Optimizasyonu. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, 22 s.

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

SHEWALE, S.D. and A.B. PANDIT. 2007. Hydrolysis of soluble starch using *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase immobilized on superporous CELBEADS. *Carbohydrate Research.* 342:997-1008.

SHIRU, J., C. YONG-DEOK, C. HOON. 2008. Isolation and identification of *Bacillus megaterium* producing Alkaline  $\alpha$ -amylase. *Journal of Environmental and Sanitary Engineering.* 23:25-31.

SIDHU G.S., P. SHARMA, T. CHAKRABARTI, J.K. GUPTA 1997. Strain improvement for the production of a thermostable  $\alpha$ -amylase. *Enzyme Microb. Technol.* 24:584-589.

SIMPSON, N.E., C.G. SAMUEL, J.B. STEPHEN and I. CONSTANTINIDIS. 2003. NMR properties of alginate microbeads. *Biomaterials.* 24(27):4941-4948.

SINGH, N., J. SINGH, L. KAUR, N.S. SODHI and B.S. Gill. 2003. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources, *Food Chem.* 81:219-231.

SINITSYN, V.V., E.G. PONYATOVSKY, A.I. KOLESNIKOV, U. DAHLBORG and M. CALVO-DAHLBORG. 2001. Thermodynamic properties and structural features of water at normal and high pressures, *Solid State Ionics.* 145:415-420.

SIVAK, M.N., J. PREISS. 1998. *Starch: Basic Science to Biotechnology.* *Advances in Food and Nutrition Research*, vol. 41. New York: Academic Pres, 70-163 p.

SMIDSRD, O. 1974. Molecular basis for some physical properties of alginates in the gel state. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* 57:263-274.

SMITH, J.E. 1996. *Biotechnology.* Third edition, Cambridge University Pres.

SRIVASTAVA, R.A.K. 1987. Purification and Chemical Characterization of Thermostable Amylases Produced by *Bacillus stearothermophilus*. *Enzyme Microb. Technol.* 9.

STAHL, E. 1965. *Thin-layer Chromatography. A Laboratory Handbook.*

STEIN, E.A. and E.H. FISCHER. 1958. The resistance of  $\alpha$ -amylases to words proteolytic attack. *J. Biol. Chem.* 232:867-869.

SWAISGOOD, H. E. and F. M. L. PASSOS. 1997. In *Immobilization of Enzymes and Cells*, ed. G. F. Bickerstaff, Humana Press, New Jersey. 237-242 p.

TANAKA, A. and E. HOSHINO. 2002. Calcium-binding parameter of *Bacillus amyloliquefaciens*  $\alpha$ -amylase determined by inactivation kinetics. *Biochem. J.* 364:635-639.

TARHAN, L. 1989. *Starch.* 41:315–318.

TEE B.L. and G. KALETUNC. 2009. Immobilization of a Thermostable  $\alpha$ -Amylase by Covalent Binding to an Alginate Matrix Increases High Temperature Usability. *American Institute of Chemical Engineers Biotechnol. Prog.* 25:436-445.

TOLAN, J.S. 1996. Pulp and paper. In: Godfrey T, West S. 1996. *Industrial enzymology*, 2nd ed. New York, Stockton Pres. 38-327 p.

TÜMTÜRK, H., S. AKSOY and N. HASIRCI. 2000. Covalent immobilization of  $\alpha$ -amylase onto poly(2-hydroxyethyl methacrylate) and poly(styrene -2-hydroxyethyl methacrylate) microspheres and the effect of  $\text{Ca}^{2+}$  ions on the enzyme activity, *Food Chemistry.* 68(3):259-266.

UHLIG, H. 1998. *Industrial Enzymes and Their Applications*, John Wiley and Sons Inc., New York.

VIHINEN, M., MANTSALA P. 1990. Characterization of a thermostable *Bacillus stearothermophilus*  $\alpha$ -amylase. *Biotechnology and Applied Biochemistry.* 12:427-435.

WINDISH, W.W. and N.S. MHATRE. 1965. Microbial Amylase. *Adv. Appl. Microbiol.* 7:273-304.

WISEMAN, A. 1987. *Handbook of Enzyme Biotechnology. Second Edition.* Chapter 3. The application of enzymes in Industry. 274-373 p.

WOLFGANG, A. 2007. *Enzyme in Industry: Production and Applications. Thirdh Completely Revised Edition.* Wiley-VCH Pres.



WON, K., S. Kim, K.J. Kim, H.W. Park and S.J. Moon. 2005. Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads. *Proc. Biochem.* 40:2149-2154.

WU, Y., Q. XIE, A. ZHOU, Y. ZHANG, L. NIE, S. YAO, X. MO. 2000. Detection and Analysis of *Bacillus subtilis* Growth with Piezoelectric Quartz Crystal Impedance Based on Starch Hydrolysis. *Analytical Biochemistry*, Academic Press. 285 (1) 50-57(8).

YAGAR, H., F. ERTAN and B. BALKAN. 2008. Comparison of Some Properties of Free and Immobilized  $\alpha$ -Amylase by *Aspergillus sclerotiorum* in Calcium Alginate Gel Beads, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 38 (1) 13-23.

YENSON, M. 1981. İnsan Biyokimyası. İstanbul. Üniv. Tıp Fak. Biyokimya Kürsüsü. 143-145 s.

YILDIRIM, A., F. BARDAKÇI, M. KARATA ve B. TANYOLAÇ. 2007. Moleküler Biyoloji: Protein Sentezi ve Yıkımı. Nobel Yayın Dağıtım. 290 s.

YOO, Y.J., HONG, J. and HATCH, R.T. 1987. Comparison of  $\alpha$ -amylase activities from different assay methods. *Biotech. Bioengn.* 30:147-151.

YOSHIDA, M., K. OISHI, T. KIMURA, M. OGATA and I. NAKAKUKI. 1989. Continuous production of maltose using a dual immobilized enzyme system. *Agric. Biol. Chem.* 35:3139-3142.

ZAKARIA, A.Q. 2006. Production and characterization of thermostable  $\alpha$ -amylase by thermophilic *Geobacillus stearothermophilus*. *J. Biotechnol.* 1:850–857.

## TE EKKÜR

Tez alı malarım sırasında her konuda ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, çalı malarımın bütün a amalarında beni destekleyerek yönlendiren ve bana her konuda çalı ma olana ı veren danı manım sayın Doç. Dr. Elif DEM RKAN'a,

Tez alı masına ba larken kendi laboratuvarında tez konusu ile ilgili de erli bilgilerini payla an Trakya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji Anabilim dalı üretim yesi sayın Doç. Dr. Figen ERTAN'a,

Çalı mamda kullanılmak üzere materyal deste i sa layan ORBA Biyokimya ( stanbul)'dan sayın Dr. Mehmet BATUM'a,

Laboratuvar alı malarımda her zaman yardımlarını gördü m çalı ma arkada ım Sayın Nihan SEV N'e,

Çalı malarıma her zaman müsamaha gösterip, maddi ve manevi yardımlarını benden esirgemeyen patronum Sayın Kadri RTMEN'e,

Hayatımın her safhasında benim arkamda duran, çok sevdi im A LEM'e en içten dileklerle te ekkür eder, saygılar sunarım.

## ÖZGEÇM

1985 yılında Bursa'da do du. İlk ve Orta öğrenimini Bursa'da tamamladı. 2003 yılında Uluda Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde öğrenime hak kazandı ve 2007 yılında birincilikle mezun oldu. Aynı yıl Uluda Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans'a başladı.