

Fındık Küspesi Kullanarak *Bacillus amyloliquefaciens*'den α -Amilaz Üretiminin İncelenmesi

Veyis SELEN^a, M. Şaban TANYILDIZI^a, Dursun ÖZER^a

^aFırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, 23279, Elazığ
e-posta: vselen@firat.edu.tr, mtanyildizi@firat.edu.tr, dozer@firat.edu.tr

Geliş Tarihi: 21 Mart 2011; Kabul Tarihi: 20 Mayıs 2011

Özet

Bu çalışmada, *Bacillus amyloliquefaciens* ile fındık küspesi (FK)'nden α -amilaz üretimi üzerine ortam şartlarının ve bileşiminin etkileri incelenmiştir. Kesikli fermantasyon ile α -amilaz üretimi üzerine pepton, yeast ekstrakt (YE), amonyum sülfat ((NH₄)₂SO₄), FK, potasyum dihidrojen fosfat (KH₂PO₄), magnezyum sülfat (MgSO₄), sodyum klorür (NaCl) ve kalsiyum klorür (CaCl₂) konsantrasyonlarının yanı sıra fermantasyon sıcaklığı ve karıştırma hızı gibi üretim parametrelerinin etkileri de incelenmiştir. Deneysel çalışma sonucunda belirlenen optimum ortam bileşimi (FK 20 g/l, pepton 5 g/l, YE 2.5 g/l, (NH₄)₂SO₄ 5 g/l) ve şartlarında (çalkalama hızı 150 rpm ve fermantasyon sıcaklığı 33 °C) elde edilen maksimum enzim aktivitesi 9092 U/ml olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar FK içeren ortamdaki α -amilaz üretiminin, çözünebilir nişasta ve diğer komponentlerin kullanıldığı konvensiyonel besi ortamlarına göre çok daha yüksek olduğunu göstermiştir. Fındık yağı üretim prosesinde yan ürün olan fındık küspesinin α -amilaz üretimi için iyi bir substrat olduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: α -Amilaz, Fındık küspesi, *Bacillus amyloliquefaciens*, Katı substrat fermantasyonu.

Investigation of α -Amylase Production Using Hazelnut Cake from *Bacillus amyloliquefaciens*

Abstract

In this study α -amylase production with *Bacillus amyloliquefaciens* was investigated for optimum fermentation medium and conditions using hazelnut cake (HC) in shaken-culture. The effects of different production parameters, such as pepton, yeast ekstrakt (YE), ammonium sulphate ((NH₄)₂SO₄), FK, potassium dihydrogen phosphate (KH₂PO₄), magnesium sulphate (MgSO₄), sodium chloride (NaCl), calcium chloride (CaCl₂) concentration, fermentation temperature and shaking speed on α -amylase production by batch fermentation were examined. The maximum α -amylase activity (9092 U/ml) was obtained under the following optimized fermentation conditions; HC 20 g/l, peptone 5 g/l, yeast extract (YE) 2.5 g/l, ammonium sulphate ((NH₄)₂SO₄) 5 g/l, shaking speed 150 rpm and fermentation temperature 33 °C. The results indicated that the production of α -amylase was greater in the medium containing HC than that in the conventional medium containing soluble starch and other components. HC, by-product of hazelnut oil processing, was found a good substrate for α -amylase production.

Key words: α -Amylase, Hazelnut cake, *Bacillus amyloliquefaciens*, Solid substrate fermentation.

1. Giriş

α -Amilaz; amiloz ve dallanmış amilopektin gibi polisakkaritlerde ve bunların yıkım ürünlerinde yer alan α -1-4-glikozitik bağlarını

gelişi güzel kıran ekstrasellüler bir enzimdir (Kandra, 2003; Tanyıldızı vd., 2007). Nişasta sınıvlaştırma, kağıt endüstrisi ve tekstil başta olmak üzere daha bir çok endüstri kolunda yaygın olarak kullanılan α -amilazın ekonomik olarak üretilmesi,

fermantasyon ortamı maliyetinin düşürülmesi ile sağlanabilmektedir. Pahalı olan sentetik ortam bileşenleri yerine çok daha ekonomik ve ucuz olan endüstriyel ve tarımsal yan ürün ve atıklar kullanılabilir (Haq vd., 2003). Katı substrat fermentasyonu (KSF) genel olarak suda çözünmeyen katı substratların varlığında değişen miktarlarda serbest suyun bulunduğu ortamda mikrobiyal üretimlerin gerçekleşmesi olarak tanımlanabilir (Doelle vd., 1992). Katı substrat fermentasyonunda çoğunlukla mantarlar düşünülmesine rağmen doğada bakterilerin de bu ortamlarda geliştiği görülmektedir. Kullanılan katı substrat hem destek materyali hem de karbon ve nütrient kaynağı olarak işlev görmektedir (Ooijkaas vd., 2000). Son yıllarda kassava bagası, şeker kamışı küspesi, kahve kabuğu ve atıkları, elma posası, arpa, soya fasulyesi atıkları, meyve suyu endüstrisi atıkları gibi katı substratlar, bu amaçla biyoproseslerde kullanılmaktadır (Tanyıldızı vd., 2007; Haq vd., 2003; Berovic ve Ostrovernik, 1997). Bu atık ve yan ürünler kullanılarak etanol, tek hücre proteini, mantar, enzimler, organik asitler ve amino asitlerin üretimleri yapılmaktadır (Pandey vd., 2000). Ayrıca fermentasyon sonrasında ortamda kalan protein içeriği zenginleşen ve besin değeri artan katı materyal hayvan yemi olarak değerlendirilebilmektedir (Berovic ve Ostrovernik, 1997).

Bu çalışmada, fındık küspesinin kullanıldığı ortamda *Bacillus amyloliquefaciens* ile α -amilaz üretimi için optimum fermentasyon parametreleri araştırılmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Doğal substrat ve kimyasallar

Bu çalışmada, Ordu Yağ Sanayi A.Ş. Fabrikası'ndan temin edilen bünyesindeki yağın ekstraksiyonla uzaklaştırılması sonucu arta kalan fındık küspesi doğal substrat olarak kullanılmıştır. Kullanılan doğal substratın -50 meshlik

fraksiyonu 70 °C'de 24 saat süreyle etüvde kurutulmuş ve kapalı kaplarda muhafaza edilerek deneylerde kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan diğer tüm kimyasallar analitik saflıkta olup Merck ve Sigma firmalarından temin edilmiştir.

2.2. Mikroorganizma

Bacillus amyloliquefaciens NRRL B-645 türü bakteri NRRL (National Center for Agricultural Utilization Research, USA) kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

Bakteri normal şartlarda gram-pozitif ve çubuk şeklindedir.

2.3. Mikroorganizma büyüme ortamı ve şartları

Mikroorganizmanın gelişimi ve saklanması için kullanılan besi ortamları Tablo 1.'de verilmiştir (Syu ve Chen, 1997; Yıldız, 1993). Stok kültürler 4 °C'de kültür saklama besi ortamının bulunduğu eğik deney tüplerinde muhafaza edilmiş ve her 1 aylık periyotlar ile stok kültürler yenilenmiştir.

Enzim üretiminde kullanılacak mikroorganizma Tablo 1.'de verilen bakteri gelişim besi ortamından 50 ml alınarak erlende geliştirilmiştir. Bu fermentasyon çözeltisinin başlangıç pH'sı 1 N HCl ve 1 N NaOH kullanılarak 7.0'e ayarlanmıştır. Otoklavda (Prior Clave 129) sterillenen besi ortamına (121 °C, 1.2 bar, 15 dk) steril şartlarda ön ekim yapıldıktan sonra orbital çalkalayıcıda (37 °C'de ve 150 rpm) 18 saat süreyle inkübe edilmiştir. α -Amilaz üretim ortamı ise; sırasıyla azot kaynakları, substrat ve iz elementlerin (CaCl₂, NaCl, MgCl₂) konsantrasyonları değiştirilerek incelenmiştir. Son olarak da belirlenen optimum fermentasyon ortamı kullanılarak başlangıç pH'sı, ortam sıcaklığı ve çalkalama hızının enzim üretimi üzerine etkisi incelenmiştir. Deneylerde hem maliyet hem de içerdiği minerallerin olumlu etkisinden dolayı musluk suyu kullanılmıştır (Tanyıldızı vd., 2007).

Tablo 1. *Bacillus amyloliquefaciens* için saklama ve gelişim besi yeri bileşimleri.

Bileşen	Kültür Saklama Besiyeri (g/l) (Yıldız, 1993)	Bakteri Gelişim Besiyeri (g/l) (Syu ve Chen, 1997)
Glikoz	4.0	10.0
Pepton		1.0
Yeast ekstrakt	0.5	1.0
MgSO ₄ .7H ₂ O		0.5
NaCl	2.0	
CaCl ₂ .2H ₂ O		0.1
KH ₂ PO ₄		1.0
Et peptonu	8.0	
Kazein peptonu	2.0	
Agar-agar	18.0	
MnSO ₄ .7H ₂ O		0.01
FeSO ₄ .7H ₂ O		0.01
(NH ₄) ₂ SO ₄		5.0

2.4. Analitik yöntemler

Fermantasyon süresince, farklı zamanlarda alınan örnekler 5000 rpm'de 15 dk. santrifüjlenerek (Hettich Eba 21) fermantasyon sıvısında aktivite tayini yapılmıştır. Aktivite ölçümlerinde %3' lük 2.3 ml çözünür nişasta, 1 ml 0.1 M CaCl₂, 250 ml 0.1 M potasyum fosfat tamponu (0.025 M NaCl içeren, pH=6.2), 200 ml dH₂O'dan oluşan karışım substrat çözeltisi olarak kullanılmıştır. Aktivite ölçümlerinde bir kontrol ve üç numune tüpü olmak üzere toplam dört tüp kullanılmıştır. Tüplere 4.5 ml substrat çözeltileri eklendikten sonra 37 °C'de su banyosunda 5 dakika süreyle tutulmuştur. Daha sonra numune tüplerine 0.5 ml enzim ilave edilmiş ve 37 °C'de 30 dakika süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonrasında kontrol tüpüne ve örnek

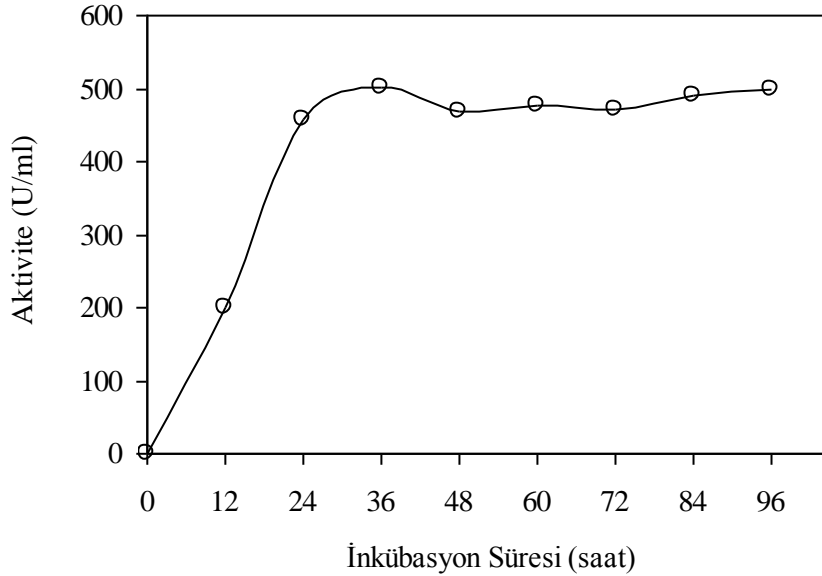
tüplerine reaksiyonu durdurmak amacıyla 1 M 0.9 ml HCl çözeltisi eklenmiştir. Kontrol tüpüne 0.5 ml enzim çözeltisi konduktan sonra renk oluşumunu gözlemek amacıyla 0.1 ml iyot ayıracağı (% 0.3 I, % 3 KI) ilave edilmiştir. 4 ml dH₂O ile hacim tamamlandıktan sonra vorteks'de karıştırılarak absorbansların okunmasına geçilmiştir. α-Amilaz aktivitesi iyodun nişasta ile verdiği renk esasına göre spektrofotometre (620 nm) (Chebios Optimum-One UV&VIS) kullanılarak belirlenmiştir. 1 birim enzim aktivitesi (U/ml), 37 °C'de iyot çözeltisi ile nişastanın verdiği renkteki 0.0284 OD'lik azalma olarak tanımlanmıştır (Pfueller ve Eliot, 1969).

3. Bulgular

Mikrobiyal enzim üretiminde en önemli parametrelerden biri fermantasyon ortamının

bileşimidir. Ortam bileşenleri içerisinde ise karbon kaynağı, ortam maliyetinin yaklaşık %60-80'ini oluşturduğundan enzim üretim maliyetini azaltmak amacıyla sürekli olarak ucuz ve doğal substratlar araştırılmaktadır (Rehm vd., 1987). Fermantasyon proseslerinde uygun substratın seçimi kritik faktör olarak tanımlanmaktadır (Kunamneni vd., 2005). Sadece musluk suyu ve FK'den oluşan fermantasyon ortamında α -amilaz aktivitesinin zamanla değişimi Şekil 1.'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi 72 saat takip edilen α -amilaz aktivitesi 36'ncı saatin sonunda maksimum değere (500 U/ml) ulaşmıştır

ve bu seviyede sabit kalmıştır. Bu sonuçlar bize FK kullanarak *B. amyloliquefaciens* ile α -amilaz üretilbileceğini göstermektedir. Fermantasyon proseslerinde ideal bir substrat mikroorganizmanın ihtiyaç duyduğu tüm nütrientleri içeren maddedir (Pandey vd., 2000). Ancak çoğu substrat maksimum üretim için gerekli olan konsantrasyonun altında bileşen içerdiğinden fermantasyon ortamına eklenmesi gerekmektedir (Sodhi vd., 2005). Çalışmanın devamında enzim aktivitesini artırmak için ortam bileşenleri ve miktarları ile fermantasyon koşulları araştırılmıştır.



Şekil 1. Fındık küspesinin kullanıldığı ortamda enzim aktivitesinin zamanla değişimi (pH_b=7.0, FK konsantrasyonu: 10 g/l, fermantasyon sıcaklığı: 37 °C, çalkalama hızı: 150 rpm).

Mikrobiyal üretimlerde C/N oranının önemli bir parametre olduğu bilinmektedir ve yapılan çalışmalarda C/N oranı optimum olduğunda, α -amilaz üretiminin maksimum değere ulaştığı belirtilmektedir (Farez-Vidal vd., 1992). Bu nedenle fermantasyon ortamına çeşitli azotlu maddeler (pepton, yeast ekstrakt (YE), amonyum sülfat) ilave edilerek bunların enzim üretimi üzerine etkileri incelenmiştir. Şekil 2'den görüldüğü gibi düşük pepton ve YE konsantrasyonlarında azot kaynağının yetersiz olması, yüksek pepton ve YE

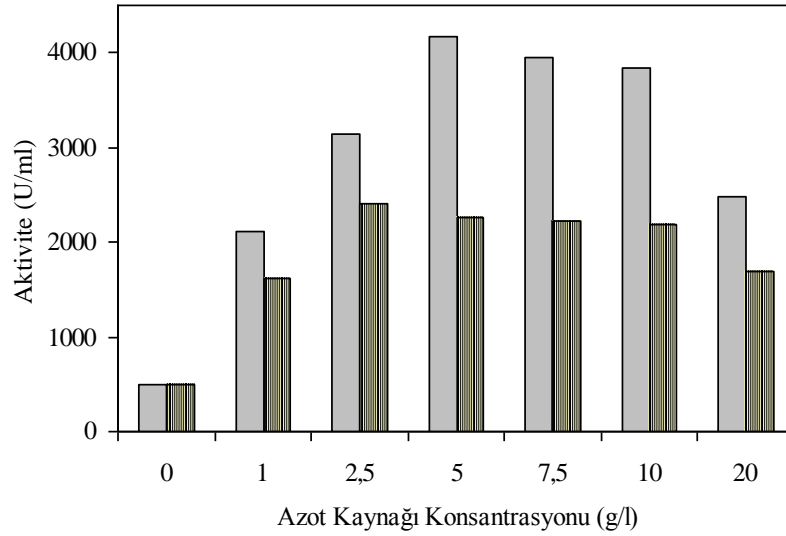
konsantrasyonlarında ise enzim üretiminin bastırıldığı dolayısıyla her iki durumda da enzim üretiminde bir düşüşün olduğu görülmüştür.

Azot kaynağı olarak sadece peptonun kullanıldığı ortamda maksimum enzim üretimi 4170 U/ml (5 g/l pepton) iken YE kullanıldığı ortamda 2408 U/ml (2,5 g/l YE) olarak belirlenmiştir. Her iki azot kaynağının optimum değerlerinin birlikte kullanılmasıyla maksimum enzim aktivitesi 5084 U/ml olarak belirlenmiştir. Literatürde organik azot kaynaklarının (pepton, YE, beef ekstrakt, mısır ıslatma şurubu vb.)

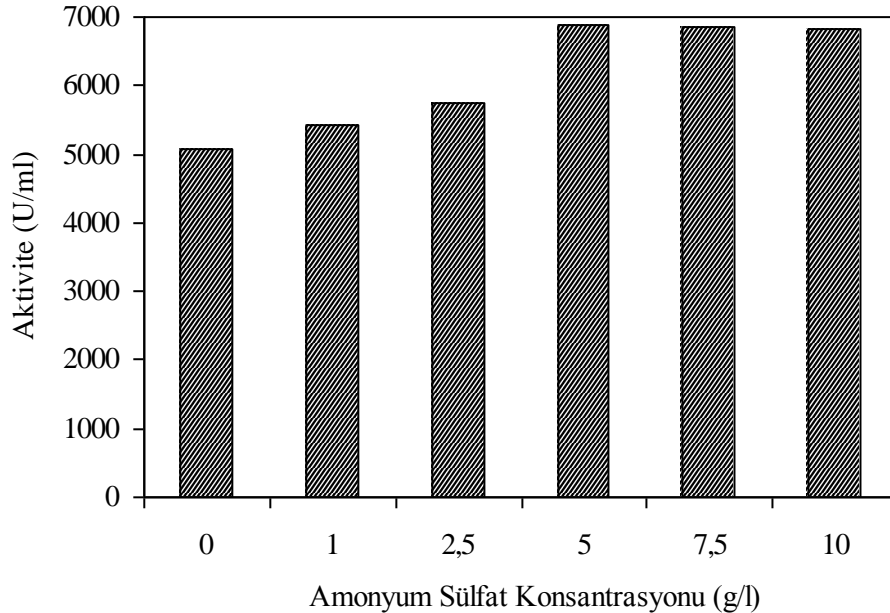
yanında inorganik azot kaynaklarının da (amonyum hidrojen fosfat, amonyum sülfat, amonyum klorür) α -amilaz üretimini artırdığı ifade edilmektedir (Farez-Vidal vd., 1992; Jin vd., 1990; Cheng vd., 1989; Ramesh vd., 2001; Imai vd., 1993; Babu ve Satyanara, 1995). Yukarıdaki belirtilen ortama ilave inorganik azot kaynağı olarak amonyum sülfat çeşitli konsantrasyonlarda

fermantasyon ortamına eklenerek enzim üretimine etkisi araştırılmıştır (Şekil 3).

Şekil 3'den görüldüğü gibi ortama $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ilavesiyle enzim üretiminin arttığı gözlenmiş ve maksimum enzim üretimi 6874 U/ml olarak 5 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ kullanıldığı fermantasyon ortamında ölçülmüştür.



Şekil 2. Pepton \square ve YE \blacksquare konsantrasyonunun α -amilaz üretimine etkisi ($\text{pH}_b=7.0$, FK konsantrasyonu: 10 g/l, fermantasyon sıcaklığı: 37 °C, çalkalama hızı: 150 rpm).

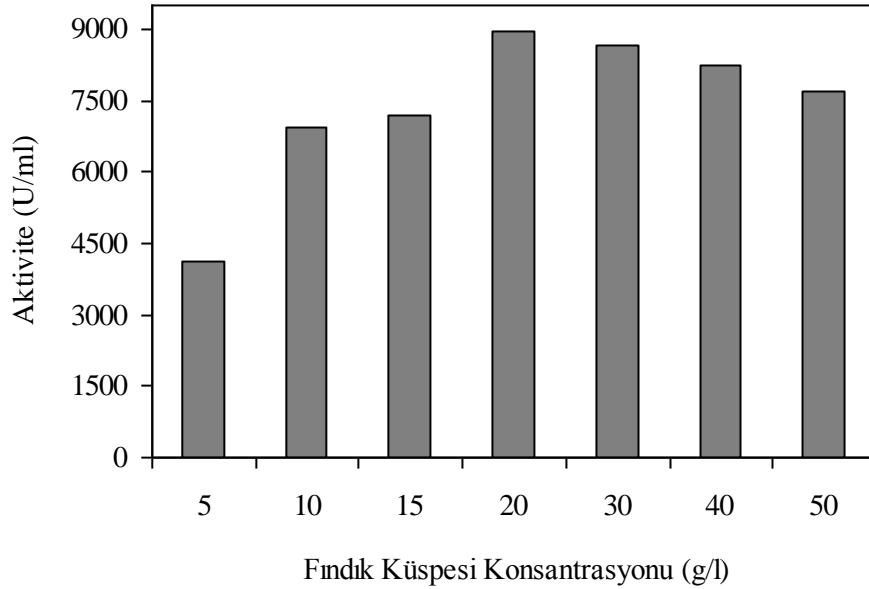


Şekil 3. Amonyum sülfat konsantrasyonunun α -amilaz üretimine etkisi ($\text{pH}_b=7.0$, FK konsantrasyonu: 10 g/l, Pepton konsantrasyonu: 5 g/l, YE konsantrasyonu: 2,5 g/l, fermantasyon sıcaklığı: 37 °C, çalkalama hızı: 150 rpm).

Azot kaynağı olarak pepton ve YE'a ilaveten $(NH_4)_2SO_4$ 'ün kullanıldığı ortamlarda enzim üretiminde gözlenen bu artış, farklı azot kaynaklarının birlikte kullanılmasıyla *B. amyloliquefaciens*'in daha yüksek enzim üretim kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir.

Katı substratların kullanıldığı fermantasyonlarda en önemli parametreler katı substrat konsantrasyonu ve serbest su miktarıdır. Bu iki parametre birbiriyle yakından ilişkilidir. Özellikle ortamın su içeriğinin kritik öneme sahip olduğu bilinmektedir (Gervais ve Molin, 2003).

Çalışmanın bu kısmında farklı FK konsantrasyonlarında yapılan deney sonuçları Şekil 4'de verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi enzim aktivitesi (8952 U/ml) 20 g/L FK konsantrasyonuna kadar artarken daha yüksek katı substrat konsantrasyonlarında bir düşüş gözlenmektedir. Yetersiz serbest su miktarları ortamın daha viskoz olmasına ve dolayısıyla mikroorganizmanın ihtiyaç duyduğu oksijen ve/veya nütriyentlerin sağlanamamasına neden olmaktadır (Pandey vd., 2000; Ellaiah vd., 2002).



Şekil 4. Fındık küspesi konsantrasyonunun α -amilaz üretimine etkisi ($pH_b=7.0$, Pepton konsantrasyonu: 5 g/l, YE konsantrasyonu: 2,5 g/l, $(NH_4)_2SO_4$ konsantrasyonu: 5 g/l, fermantasyon sıcaklığı: 37 °C, çalkalama hızı: 150 rpm).

Yapılan birçok çalışmada (Wu vd., 1999; Fishcher ve Stein, 1961; Ramesh ve Lonsane, 1989) enzim aktivitesini arttırıcı yönde etkilerinin bulunduğu belirtilen KH_2PO_4 , $MgSO_4$, NaCl ve $CaCl_2$ gibi tuzların da benzer şekilde enzim üretimi üzerine olan etkileri incelenmiş ancak enzim aktivitesinde kayda değer bir artış gözlenmemiştir. Bunun nedeni olarak mikroorganizmanın enzim üretiminde ihtiyaç

duyduğu bu kimyasalları kullanılan FK ve musluk suyundan karşıladığı düşünülmektedir. Bu sonuç enzim üretim maliyetinin düşürülmesi bakımından önemlidir.

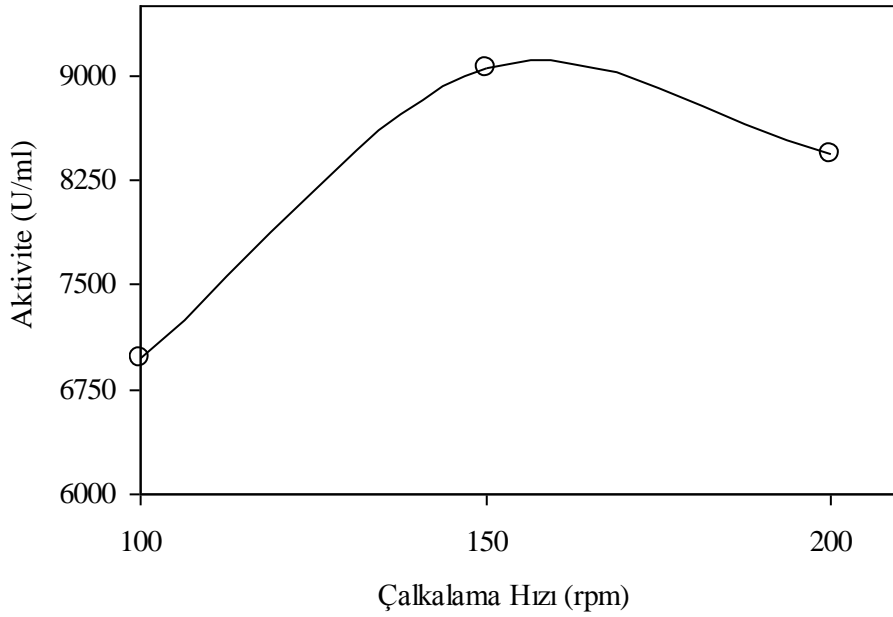
Enzim üretimi üzerine ortam bileşenlerinin yanında ortam şartlarının da etkin olduğu bilinmektedir. Katı substratların kullanıldığı ortamlarda ortamın viskoz olduğu ve böylece

kütle ve enerji transferlerinin daha yavaş olduğu bilinmektedir (Gervais ve Molin, 2003).

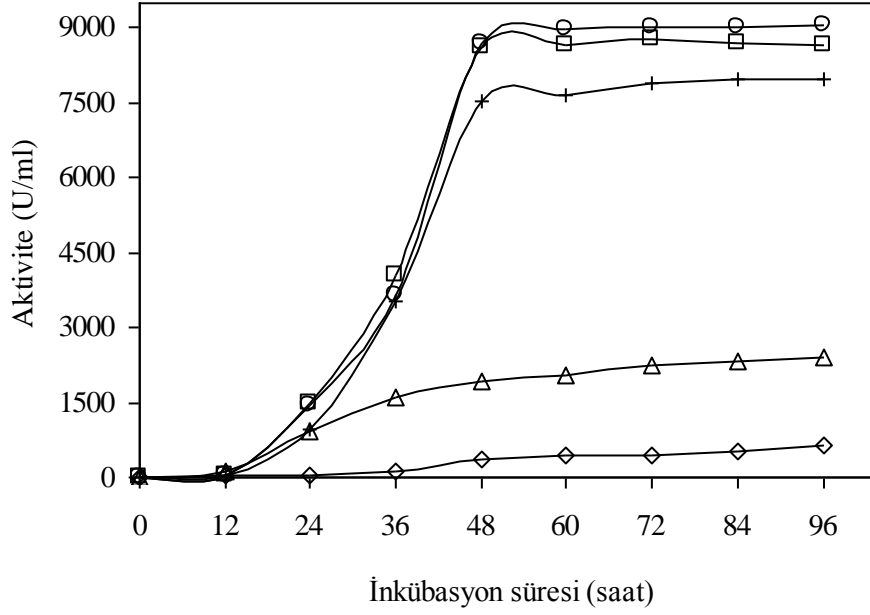
Ortam homojenizasyonu sağlayan çalkalama hızının incelendiği deney sonucunda maksimum enzim aktivitesine 150 rpm çalkalama hızında ulaşılmıştır (Şekil 5). Daha düşük karıştırma hızında enzim aktivitesinde gözlenen düşüş viskoz doğal ortamın tamamında mikroorganizma ile substratın bir şekilde temas edememesinden kaynaklanmaktadır. Yüksek karıştırma hızlarında ise mikroorganizmanın morfolojisinin olumsuz yönde etkilenebileceğinden aktivitede azalma gözlenmiştir.

Fermentasyon proseslerinde mikroorganizmanın gelişebilmesi ve metabolitleri üretebilme yeteneğinin ortam sıcaklığıyla yakından ilişkilidir. Özellikle katı substratların

kullanıldığı proseslerde oluşan viskoz ortam ısı transferini güçleştirdiğinden sıcaklık kontrolü daha bir önem kazanmaktadır (Pandey vd., 2000). Fermentasyon sıcaklığının enzim üretimi üzerine etkisinin incelemek amacıyla farklı ortam sıcaklıklarında deneyler yapılmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 6.'da verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi 30, 33 ve 37 °C'de yapılan deneylerde elde edilen enzim aktiviteleri birbirlerine yakın olmasına rağmen maksimum enzim aktivitesi 33°C'de belirlenmiştir. Bu değer katı substratların kullanıldığı fermentasyon çalışmalarıyla uyum içerisindedir (Tanyıldızı vd., 2007; Krishna ve Chandrasekaran, 1996).



Şekil 5. Çalkalama hızının α -amilaz üretimine etkisi ($pH_b=7.0$, FK konsantrasyonu: 20 g/l, Pepton konsantrasyonu: 5 g/l, YE konsantrasyonu: 2,5 g/l, $(NH_4)_2SO_4$ konsantrasyonu: 5 g/l, fermentasyon sıcaklığı: 37 °C).



Şekil 6. Ortam sıcaklığının α -amilaz üretimine etkisi (+ 30 °C, ◻ 33 °C, × 37 °C, △ 40 °C, ◇ 45 °C, pH₀=7.0, Pepton konsantrasyonu: 5 g/l, YE konsantrasyonu: 2,5 g/l, (NH₄)₂SO₄ konsantrasyonu: 5 g/l, çalkalama hızı: 150 rpm).

4. Sonuç

Katı substrat olarak fındık küspesinin (20 g/l) kullanıldığı fermentasyon ortamına ilaveten çeşitli organik (pepton; 5 g/l, YE; 2.5 g/l) ve inorganik azot (amonyum sülfat; 5 g/l) kaynaklarının eklendiği deneyler sonucunda yüksek düzeyde bir enzim aktivitesine (8952 U/ml) ulaşılmıştır. Fiziksel parametrelerin optimize edilmesiyle de (çalkalama hızı; 150 rpm, fermentasyon sıcaklığı; 33 °C) 9092 U/ml enzim aktivitesi değerine ulaşılmıştır. Ucuz ve bol miktarda yan ürün olarak açığa çıkan fındık küspesinin, çözünebilir nişasta içeren fermentasyon ortamına kıyasla α -amilaz üretimini yaklaşık olarak 2.5 kat arttırdığı belirlenmiştir (Tanyıldızı vd., 2006). Yapılan bu çalışma ile endüstriyel öneme sahip α -amilaz üretimi için, fındık küspesinin temel bileşen olarak kullanıldığı katı substrat fermentasyonunda yüksek düzeylerde üretilebileceği ortaya konmuştur.

Kaynaklar

- Babu, K.R. ve Satyanara, T., 1995. α -amylase Production by Thermophilic *Bacillus coagulans* in Solid State Fermentation, *Process Biochemistry*, 30: 305-309.
- Berovic, M. ve Ostroversnik, H., 1997. Production of *Aspergillus niger* pectolytic by solid state bioprocessing of apple pomace, *Journal of Biotechnology*, 53: 47-53.
- Cheng, C. Y., Yabe, I., Toda, K., 1989. Predominant growth of α -amylase regulation mutant in continuous culture of *Bacillus caldolyticus*, *Journal Fermentation and Bioengineering*, 67: 176-181.
- Doelle, H.W., Mitchell, D A., Rolz, C.E., 1992. Solid-substrate cultivation, p. 1-16, Elsevier, England.
- Ellaiah, P., Adinarayana, K., Bhavani, Y., Padmaja, P., Srinivasulu B., 2002. Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state

- fermentation by a newly isolated *Aspergillus* species, *Process Biochemistry*, 38: 615-620.
- Farez-Vidal, M. E., Fernandez-Vivas, A., Arias, J. M., 1992. Production of alpha-amylase by *Myxococcus coralloides*, *Journal of Applied Bacteriology*, 213, 148-156.
- Fischer, E. H. ve Stein, E. A., 1961. *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, 313.
- Ramesh, M. V. ve Lonsane, B. K., 1989. Solid state fermentation for production of α -amylase by *Bacillus megaterium* 16M, *Biotechnology Letters*, 11, 49.
- Gervais, D.P. ve Molin, P., 2003. The role of water in solid-state fermentation, *Biochemical Engineering Journal*, 13 (2-3), 85-101.
- Haq, I., Ashraf, H., Iqbal, J. and Qadeer, M. A., 2003. Production of alpha amylase by *Bacillus licheniformis* using economical medium, *Bioresource Technology*, 87: 57-61.
- Imai, Y., Suzuki, M., Masoto, M., Nagayasu, K., 1993. Amylase production by *Aspergillus oryzae* in a new kind fermentor with a rotary draft tube, *Journal Fermentation and Bioengineering*, 76: 459-464.
- Jin, F., Cheng, X., Shi, Y., Zhang, C., 1990. Isolation of new thermophilic aerobic bacteria which produce thermostable α -amylase, *Journal Genetic Applied Microbiology*, 36, 415-424.
- Kandra, L., 2003. α -Amylases of medical and industrial importance, *Journal of Molecular Structure (Theochem)*, 666-667: 487-498.
- Krishna, C. ve Chandrasekaran, M., 1996. Banana waste as substrate for α -amylase production by *Bacillus subtilis* (CBTK 106) under solid-state fermentation, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46: 106-111.
- Kunamneni, A., Permaul, K., Singh, S., 2005. Amylase production in solid state fermentation by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*, *The Society for Biotechnology*, 100: 168-171.
- Ooijkaas, L., P., Weber, F., J., Buitelaar, R., M., Tramper, J., Rinzema, A., 2000. Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems, *Tibtech*, 18: 356-360.
- Pandey, A., Soccol, C. R., Nigam, P., Soccol, V. T., Vandenberghe, L. P. S., 2000. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse, *Bioresource Technology*, 74: 81-87.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Mitchell, D., 2000. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products, *Process Biochemistry*, 35: 1153-1169.
- Pfueller, S. L. ve Eliot, W. H., 1969. The extracellular α -amylase of *Bacillus stearothermophilus*, *Journal of Biological Chemistry*, 244: 48-54.
- Ramesh, B., Reddy, P.R.M., Seennayya, G., Reddy, G., 2001. Effect of various flours on the production of thermostable β -amylase and pullulanase by *Costridium thermosulfurogenes* SV2, *Biosource Technology*, 76: 169-171.
- Rehm, J., Reed, G., Kennedy, J. F., 1987. *Biotechnology*, Vol:7a: 5-100, Wiley-VCH, New York.
- Sodhi, H. K., Sharma, K., Gupta, J. K., Soni, S. K., 2005. Production of a thermostable α -amylase from *Bacillus* sp. PS-7 by solid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production, *Process Biochemistry*, 40: 525-534.
- Syu, M. J. ve Chen, Y. H., 1997. A study on the α -amylase fermentation performed by *Bacillus amyloliquefaciens*, *Chemical Engineering Journal*, 65: 237-247.
- Tanyıldızı, M. S., Özer, D., Elibol, M., 2007. Production of bacterial α -amylase by *B. amyloliquefaciens* under solid substrate fermentation, *Biochemical Engineering Journal*, 37: 294-297.
- Tanyıldızı, M. S., Elibol, M., Özer, D., 2006. Optimization of growth medium for the production of α -amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* using response surface

- methodology, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81: 618–622.
- Wu, W.X., Mabinadji, J., Bertrand, T. F., 1999. Effect of growth culture conditions on production of an extracellular thermostable alpha-amylase from an isolate *Bacillus sp.*, *Agriculture Life Science*, 45: 404-408.
- Yıldız, S., 1993. Değişik bakteri ve substratlar kullanılarak amilaz üretiminin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.